

**Expressionsstudie von Transport- und Adapterproteinen sowie
hormonellen Rezeptoren in der Darmwand von
Wildtyp- und NOD2-Knockout-Mäusen**

**Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Medizin**

**Aus der
Abteilung für Gastroenterologie,
Endokrinologie und Stoffwechselerkrankungen
der Universitätsmedizin Rostock**

**Ärztlicher Direktor:
Herr Professor Dr. med. Georg Lamprecht**

**Vorgelegt von
Daniel Bastmeyer**

Rostock, September 2019



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung 4.0
International Lizenz.

Dekan der Universitätsmedizin: Herr Prof. Dr. med. Emil C. Reisiger

- 1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Georg Lamprecht**
- 2. Gutachter: Frau Prof. Dr. med. Ursula Seidler**
- 3. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp**

Datum der Einreichung: 11.09.2019

Datum der Verteidigung: 28.01.2020

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
1.1 Aufbau und Funktion des Darms.....	1
1.2 Mechanismen der Sekretion und Absorption von Natrium und Chlorid im Darm.....	3
1.2.1 Transportproteine der elektroneutralen Natriumchlorid-Absorption.....	4
1.2.2 Transportproteine der elektrogenen Chlorid-Sekretion	8
1.2.3 PDZ-Adapterproteine der NHERF-Familie.....	10
1.3 Kurzdarmsyndrom und Adaptationsmechanismen.....	12
1.3.1 Strukturelle Adaptation durch IGF1 und GLP2.....	13
1.4 NOD2-Gen: Funktion und pathophysiologische Auswirkung einer Genmutation.....	17
1.4.1 Bedeutung der NOD2-Genmutation für die Pathogenese des Kurzdarmsyndroms.....	18
1.5 Haushaltsgene: Funktion und Expression im Gastrointestinaltrakt.....	18
2 ZIELSTELLUNG.....	21
3 MATERIAL UND METHODEN	22
3.1 Mäuse, Gewebeentnahmen und Gewebeprozessierung.....	22
3.2 Isolation der RNA.....	22
3.3 RNA-Konzentrationsmessung und RNA-Qualitätskontrolle	23
3.4 Synthese der cDNA	24
3.5 Genexpressionsanalyse mittels qPCR	25
3.5.1 Das Prinzip der PCR.....	25
3.5.2 Messung der relativen Genexpression und Durchführung der qPCR.....	26
3.5.3 Detektion durch SYBR® Green.....	27
3.5.4 Detektion durch TaqMan®	34
3.6 Statistik.....	36
4 ERGEBNISSE.....	37
4.1 Expression der Haushaltsgene entlang der Darmlängsachse.....	37
4.2 Genexpression der Transportproteine entlang der Darmlängsachse.....	41

4.2.1 DRA.....	41
4.2.2 PAT1.....	42
4.2.3 NHE3.....	43
4.2.4 CFTR.....	44
4.2.5 ANO1.....	45
4.3 Genexpression der Adapterproteine entlang der Darmlängsachse.....	46
4.3.1 NHERF1.....	46
4.3.2 NHERF2.....	47
4.3.3 PDZK1.....	48
4.3.4 IKEPP.....	49
4.3.5 SNX27.....	50
4.4 Genexpression der hormonellen Rezeptoren entlang der Darmlängsachse.....	51
4.4.1 IGF1-Rezeptor.....	51
4.4.2 GLP2-Rezeptor.....	52
4.5 Zusammenfassende Darstellung der Zielgenexpression entlang der Darmlängsachse.....	53
5 DISKUSSION.....	56
5.1 qPCR – Vor- und Nachteile der Methodik.....	56
5.1.1 Verwendung von SYBR® Green und TaqMan®.....	57
5.2 Vergleich der verwendeten Haushaltsgene.....	57
5.2.1 <i>beta</i> -Aktin.....	57
5.2.2 ZK-18.....	58
5.2.3 Villin.....	58
5.3 Vergleich der Ergebnisse mit Expressions- und immunhistologischen Studien.....	59
5.3.1 Transportproteine.....	59
5.3.2 Adapterproteine.....	61
5.3.3 Hormonelle Rezeptoren.....	61
5.4 Funktionelle Interpretation der Ergebnisse.....	62
5.4.1 Transportproteine.....	62
5.4.2 Adapterproteine.....	64

5.4.3 Hormonelle Rezeptoren.....	66
6 ZUSAMMENFASSUNG.....	69
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	71
8 ANHANG.....	87
8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	87
8.2 Abbildungsverzeichnis.....	89
8.3 Tabellenverzeichnis.....	91
8.4 Lebenslauf.....	92
8.5 Danksagung.....	93
8.6 Eidesstattliche Erklärung.....	94
9 THESEN.....	95

1 EINLEITUNG

1.1 Aufbau und Funktion des Darms

Der menschliche Darm besitzt durch seine besondere Oberflächenbeschaffenheit und seine Länge von etwa fünf Metern eine sehr große Kontaktfläche mit dem Inhalt des Darmlumens. Zu seinen wesentlichen Aufgaben gehören neben der Digestion und Resorption von Fetten, Kohlenhydraten sowie Aminosäuren auch die Aufnahme von Vitaminen, Spurenelementen, Elektrolyten und Wasser.

Anatomisch wird der Darm in den Dünndarm und den Dickdarm eingeteilt (**Abbildung 1**). Der Dünndarm gliedert sich von proximal nach distal in Duodenum, Jejunum und Ileum. Der Dickdarm besteht aus dem Zökum, dem Kolon und dem distalen Rektum. Von luminal nach serosal wird die Darmwand von der *Tunica mucosa*, der *Tunica submucosa*, der *Tunica muscularis* und der *Tunica adventitia* gebildet. Die Mukosa des Darms wird von einem einreihigen hochprismatischen Epithel ausgekleidet.

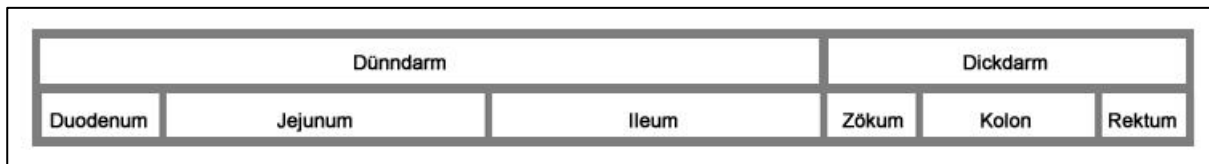


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Darms (von proximal nach distal).

Durch ca. 10 mm hohe zirkuläre Kerkring-Falten, 0,5 - 1 mm lange Zotten und 1 - 1,4 μm lange Mikrovilli weisen die Abschnitte des Dünndarms eine stark vergrößerte Oberfläche auf [1]. Die Mukosa des Dünndarms setzt sich aus Krypten und Zotten zusammen (**Abbildung 2A**), wobei v. a. die Epithelzellen der Zotten Mikrovilli tragen. Von duodenal nach ileal nimmt die Länge der Villi ab, die Tiefe der Krypten hingegen zu. Im Gegensatz zum Dünndarm gibt es im Dickdarm keine Villi (**Abbildung 2B**). Die Krypten des Dickdarms sind tiefer und stehen dichter als im Dünndarm [2]. Zu den wichtigsten Funktionen des Dickdarms zählen der Weitertransport der Nahrung sowie die Resorption von NaCl und Wasser [1]. Aufgrund seiner anatomischen und histologischen Beschaffenheit ist jedoch der Dünndarm das primäre Organ zur Verdauung und Resorption von Nährstoffen und trägt daneben auch zur Resorption von Wasser bei [3].

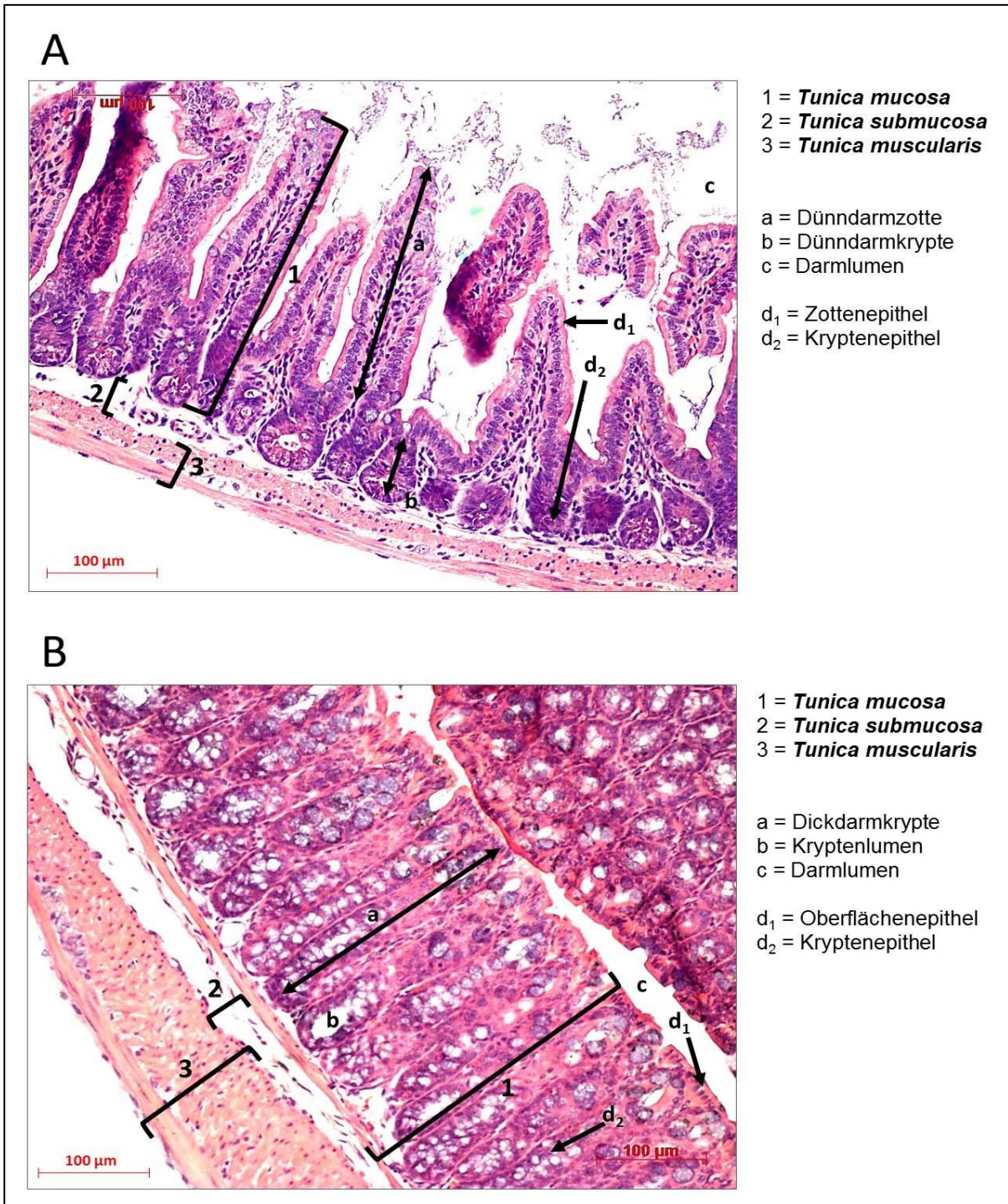


Abbildung 2 (unveröffentlichte Abbildung, bereitgestellt von Peggy Berlin): Histologischer Aufbau des Darms (A: Dünndarm, B: Dickdarm).

Neben Makronährstoffen und Vitaminen werden im Dünndarm täglich bis zu 10 l Flüssigkeit und bis zu 100 g anorganischer Elektrolyte absorbiert. Von diesem Flüssigkeitsvolumen werden etwa 2 - 3 l über die Nahrung aufgenommen. Der größere Anteil setzt sich aus den Sekreten der

Speicheldrüsen, des Magens, des Darms, der Gallenblase und der Bauchspeicheldrüse zusammen [4]. Als Hauptresorptionsort nimmt der Dünndarm etwa 80 % dieser Flüssigkeit auf. Nur ein geringer Anteil gelangt in den Dickdarm und wird dort größtenteils resorbiert, sodass lediglich 1 % der Flüssigkeit mit dem Stuhl ausgeschieden wird [5].

Für die Resorption von Wasser gibt es in der Darmwand keine aktiven Transportmechanismen. Die Aufnahme von Wasser und Elektrolyten aus dem Darmlumen erfolgt durch intestinale, epitheliale Iontentransporter, auf die im Folgenden genauer eingegangen wird [5].

1.2 Mechanismen der Sekretion und Absorption von Natrium und Chlorid im Darm

Für die Aufrechterhaltung einer ausreichenden Resorption von Na^+ , Cl^- und Wasser sind vier verschiedene Transportmechanismen verantwortlich, die von *Kato und Romero* [5] zusammengefasst wurden: (I) die nährstoffgekoppelte Na^+ -Resorption, (II) die elektroneutrale NaCl -Resorption, (III) die elektrogene Cl^- -Sekretion und (IV) die elektrogene Na^+ -Resorption.

Bei der (I) nährstoffgekoppelten Na^+ -Resorption wird Na^+ entlang eines elektrochemischen Gradienten, der durch eine basal lokalisierte Na^+/K^+ -Adenosintriphosphatase (ATPase) aufrechterhalten wird, passiv und transepithelial in die Zelle aufgenommen. Die Resorption von Na^+ erfolgt über Cotransporter gekoppelt an die Aufnahme von Glucose (Sodium Glucose Cotransporters, SGLTs) oder Aminosäuren (Solute Carriers, Slc6 etc.). Durch die Entstehung eines negativen luminalen Potenzials kommt es zu einem parazellulären Einstrom von Cl^- und Wasser. Die nährstoffgekoppelte Na^+ -Resorption findet im Dünndarm statt [3, 5].

Die (II) elektroneutrale NaCl -Resorption beruht auf einer Kopplung zweier Transportmechanismen. Hierbei wird durch Antiporter der Transport von Na^+ gegen Wasserstoff (Na^+/H^+ -Antiporter) und Cl^- gegen HCO_3^- ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter) vermittelt, wodurch es zu einer Aufnahme von NaCl und sekundär zur Wasserresorption aus dem Darmlumen kommt. Dieser Vorgang findet überwiegend im Ileum und im proximalen Kolon statt.

Die (III) elektrogene Chloridsekretion erfolgt in Enterozyten des Dünndarms und des Dickdarms. Hierbei wird Cl^- durch die Erhöhung von intrazellulärem Ca^{2+} , zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) oder zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) ins Darmlumen sekretiert. Durch das entstehende lumenegative Potenzial kommt es sekundär zu einer parazellulären Sekretion von Na^+ und Wasser.

Im distalen Kolon findet über einen epithelialen Na^+ -Kanal (*Epithelial Na^+ -Channel*, ENaC) zudem eine (IV) elektrogene Na^+ -Resorption statt. Die luminalen Na^+ -Konzentration nimmt vom proximalen bis zum distalen Kolon immer weiter ab. Die Resorption erfolgt entgegen des Konzentrationsgradienten durch ein intrazelluläres negatives Membranpotenzial [5]. Luminal kommt es zu einem negativen transepithelialen Potenzial und in Folge davon zu einem passiven Einstrom von Cl^- und Wasser.

1.2.1 Transportproteine der elektroneutralen Natriumchlorid-Absorption

Bereits im Jahr 1983 wurde von *Knickelbein et al.* der Transport von Na^+ und Cl^- an der Bürstensaummembran im Ileum von Kaninchen untersucht [6, 7]. Durch den Nachweis eines Na^+/H^+ - und eines $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers an der Epithelmembran konnte gezeigt werden, dass eine funktionell gekoppelte NaCl -Resorption im Darm stattfindet (**Abbildung 3**).

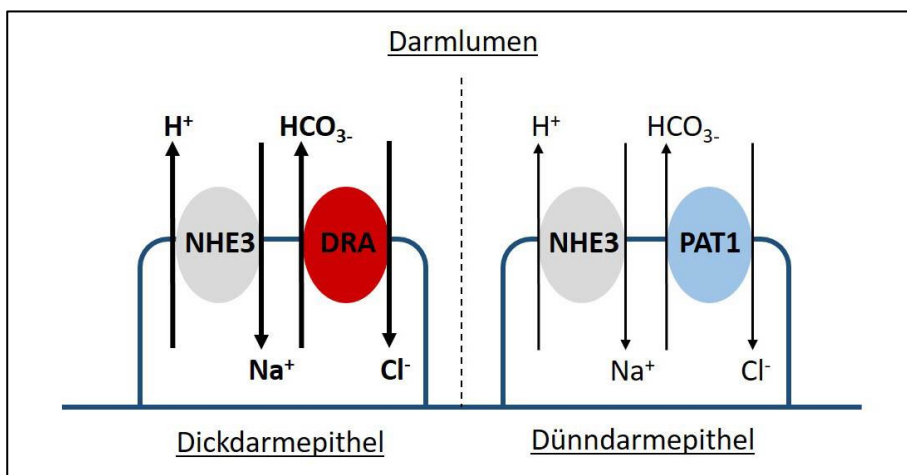


Abbildung 3: Transportproteine der elektroneutralen NaCl -Absorption.

1.2.1.1 DRA: $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher der SLC26-Genfamilie

Das Transportprotein *Down Regulated in Adenoma* (DRA, SLC26A3) ist ein $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher und stellt ein Mitglied der SLC26-Genfamilie dar, welche eine Gruppe von Anionenaustauschern kodiert [8].

Das DRA-Gen wurde 1993 von *Schweinfest et al.* in der Mukosa des Kolons identifiziert [9]. Ihre Untersuchungen zeigten, dass die Expression dieses Gens in Adenomen und Adenokarzinomen geringer ausgeprägt war als in der physiologischen, nicht neoplastischen Mukosa. Aufgrund dieser Tatsache nannten sie das auf dem Chromosomen 7 lokalisierte Gen *Down Regulated in Adenoma* und vermuteten, dass das Gen eine Rolle in der Tumorsuppression spielt [9].

Erst einige Jahre später wurde die Funktion von DRA festgestellt: *Höglund et al.* konnten die Lokalisation des Gens bestimmen, das für das Krankheitsbild der sogenannten kongenitalen Chlorid-Diarrhoe (*Chloride-Losing Diarrhea*, CLD) – hervorgerufen durch einen defekten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher [10] – verantwortlich ist [11]. Sie fanden dabei heraus, dass sich das Gen an der gleichen Stelle wie das DRA-Gen befindet [11]. Weitere Untersuchungen zeigten schließlich, dass Mutationen des DRA-Gens eine CLD verursachen [12, 13]. Bei der CLD handelt es sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die mit schweren, lebenslangen Durchfällen mit hohem Cl^- -Gehalt einhergeht [14]. Sie wurde erstmalig von *Darrow* [15] und *Gamble* [14] an Patienten beschrieben, die an Durchfall und einer metabolischen Alkalose litten.

Im Kolon ist DRA als $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher – gekoppelt mit dem Na^+/H^+ -Austauscher NHE3 (**Kapitel 1.2.1.3**) – hauptverantwortlich für die elektroneutrale Absorption von NaCl und Wasser im unteren Gastrointestinaltrakt [6, 7, 16–19]. Dagegen trägt DRA im Duodenum [20] und Pankreas im Zusammenspiel mit CFTR (**Kapitel 1.2.2.1**) zur basalen und zur cAMP-stimulierten Sekretion von Cl^- und HCO_3^- bei [21–23]. DRA ist auch für den Transport von Sulfaten und OH-Ionen verantwortlich [24, 25]. Durch eine Mutation im DRA-Gen kommt es bei der Maus neben der klinischen Manifestation von Durchfällen auch zu einer verminderten HCO_3^- -Sekretion und einem Mangel einer auf dem Epithel haftenden Schleimschicht im Kolon [26]. Im Gegensatz dazu werden in DRA-Knockout (KO)-Mäusen keine pathophysiologischen Veränderungen im oberen Gastrointestinaltrakt beschrieben [27].

DRA wird stark in den differenzierten Epithelzellen der Oberfläche und geringfügig auch in den undifferenzierten Kryptenzellen [13] des Kolons, Ileums und Duodenums von Mensch, Maus und Ratte exprimiert [22, 28]. Hierbei findet sich die stärkste Expression im Kolon und Duodenum [22], wo DRA vor allem im unteren Bereich der Zotten lokalisiert ist [21]. Bei differenzierter Betrachtung des Kolons findet man im distalen Kolon und im Zökum die stärkste Genexpression, im proximalen Kolon die geringste [29, 30]. Des Weiteren wird DRA in den Epithelzellen der Pankreasgänge [23], der Schweißdrüsen und der Samenblase exprimiert [31]. Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich DRA in der apikalen Membran der Zellen befindet [22, 29].

1.2.1.2 PAT1: Cl⁻/HCO₃⁻-Austauscher der SLC26-Genfamilie

Neben DRA stellt auch der *Putative Anion exchanger 1* (PAT1, SLC26A6) einen Anionenaustauscher der SLC26-Genfamilie dar. Das Transmembranprotein PAT1 wird durch das SLC26A6-Gen kodiert, welches auf dem Chromosom 3 lokalisiert ist [32].

Bei der Identifizierung des Gens konnten *Lohi et al.* durch immunhistochemische Untersuchungen eine apikale Lokalisation des Proteins feststellen, weswegen sie eine Transportfunktion des Proteins vermuteten und es *Putative Anion exchanger 1* nannten [32]. Zusammen mit DRA spielt PAT1 eine wichtige Rolle in der duodenalen HCO₃⁻-Sekretion, wobei PAT1 für die unstimulierte und DRA für die cAMP-stimulierte Sekretion hauptverantwortlich ist [5]. Daneben besitzt PAT1 in den Enterozyten des Duodenums eine pH-regulierende Funktion [33]. Versuche an SLC26A6-KO-Mäusen zeigten, dass durch die fehlende Transportfunktion von PAT1 sowohl die HCO₃⁻-Sekretion der Enterozyten [34] als auch die elektroneutrale NaCl-Resorption im Dünndarm eingeschränkt ist [35], was eine funktionelle Kopplung von PAT1 mit NHE3 (**Kapitel 1.2.1.3**) bei der elektroneutralen NaCl-Absorption im Dünndarm vermuten lässt. Allerdings zeigten PAT1-KO-Mäuse im Gegensatz zu DRA-KO-Mäusen keine Durchfallerscheinungen und zudem nur eine geringere Abnahme der Cl⁻-Absorption [18, 34]. Neben dieser Funktion von PAT1 konnten *Xia et al.* eine gemeinsame Rolle von PAT1 und NHE3 bei der jejunalen NaHCO₃⁻-Reabsorption zeigen, bei der PAT1 keine HCO₃⁻-Sekretion, sondern eine HCO₃⁻-Absorption vermittelt [36]. Durch Versuche an Frosch-Eizellen wurde darüber hinaus festgestellt, dass PAT1 als Cl⁻/HCO₃⁻- und Cl⁻/OH⁻-Austauscher fungiert, eine Affinität für Formiat, Sulfat sowie Oxalat besitzt und dabei auch einen elektrogenen Transport vermittelt [37, 38].

PAT1 wird an der Oberfläche von Zellen des Magens, des Intestinums, des Herzens und der Niere exprimiert [30, 32, 39–41]. Im Gegensatz zu DRA wird PAT1 verstärkt im Dünndarm und kaum im Dickdarm exprimiert [30]. Immunhistochemische Studien belegten, dass PAT1 insbesondere in der apikalen Membran der Villus-Enterozyten lokalisiert ist [30]. Des Weiteren konnte eine starke Aktivität von PAT1 im Bereich der oberen Zottenhälfte nachgewiesen werden [42].

1.2.1.3 NHE3: Na⁺/H⁺-Austauscher der SLC9-Genfamilie

Der Kationenaustauscher *Na⁺/H⁺-Exchanger 3* (NHE3, SLC9A3) wurde im Jahr 1992 von *Tse et al.* identifiziert [43] und stellt ein Mitglied der SLC9-Genfamilie dar, zu der insgesamt neun Transportproteine zählen, die in der Plasmamembran oder intrazellulär lokalisiert sind [44].

Wie bereits erwähnt, unterstützt NHE3 durch die Aufnahme von Na^+ aus dem Darmlumen die mit DRA – und in geringerem Umfang auch mit PAT1 – gekoppelte elektroneutrale Resorption von NaCl und Wasser [6, 7, 16–18, 35]. An NHE3-KO-Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese aufgrund einer verminderten Wasserresorption und Protonensekretion an Durchfällen und Azidose litten [45]. Neben NHE3 wird auch NHE2 in der apikalen Membran von Epithelzellen des Intestinums und der Niere exprimiert [46, 47]. Bei NHE2-KO-Mäusen wurde allerdings keine klinische Symptomatik festgestellt [48, 49] und zudem konnten Durchfälle in NHE3-KO-Mäusen durch NHE2 nicht kompensiert werden [50]. Dies spricht dafür, dass NHE3 den klinisch bedeutsameren Na^+/H^+ -Austauscher darstellt.

NHE3 wird epithelspezifisch [51] in der apikalen Membran von Zellen des Intestinums, des Magens und der Niere exprimiert [29, 43, 47, 48, 51–54]. Die Expression entlang des Intestinums ist in der Literatur unterschiedlich beschrieben [29, 43, 52, 53]. *Orlowski et al.* fanden eine stärkere Expression von NHE3 im Dickdarm im Vergleich zum Dünndarm und im Dünndarm eine prominentere Expression in proximalen Anteilen [52]. Im Gegensatz dazu beschrieben *Dudeja et al.* die stärkste Expression von NHE3 im Ileum mit absteigender Tendenz nach distal und proximal [53]. Untersuchungen von *Talbot et al.* zeigten im Bereich des Dickdarms die stärkste Expression im proximalen Kolon und eine fehlende Expression im distalen Kolon sowie im Zökum [29]. Mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen konnte nachgewiesen werden, dass NHE3 im Dünndarm insbesondere im Bereich der mittleren sowie der oberen Villusfraktion [51] und im Dickdarm im Bereich des Oberflächenepithels sowie im oberen Kryptenabschnitt [29, 51] lokalisiert ist.

Des Weiteren spielt NHE3 eine Rolle bei der Regulierung des Peptidtransporters 1 (PepT1) – einem Mitglied der SLC15-Genfamilie, welches für die intestinale Resorption von Oligopeptiden mitverantwortlich ist [55]. Untersuchungen haben ergeben, dass PepT1 an der apikalen Seite der Enterozyten lokalisiert ist und insbesondere im Dünndarm exprimiert wird [56–58]. Neben dem Transport von Di- und Tripeptiden, ist PepT1 auch für die Aufnahme von verschiedenen Medikamenten verantwortlich [56]. Der durch PepT1 durchgeführte Transport von Oligopeptiden über die apikale Membran der Enterozyten erfolgt dabei über einen elektrochemischen Protonengradienten [59, 60]. Mehrere Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass der durch NHE3 geschaffene Protonengradient die zelluläre Aufnahme von Oligopeptiden durch PepT1 erhöht [61, 62].

1.2.2 Transportproteine der elektrogenen Chlorid-Sekretion

Die Transportkanäle CFTR und ANO1 vermitteln über die apikale Zellmembran des Darmepithels eine elektrogene Cl⁻-Sekretion (**Abbildung 4**).

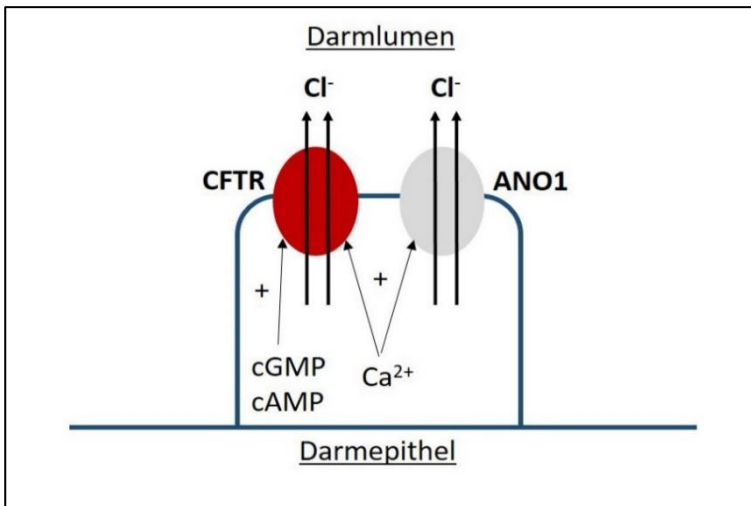


Abbildung 4: Transportproteine der elektrogenen Cl⁻-Sekretion.

1.2.2.1 CFTR: Cl⁻-Kanal der ABC-Transporter-Genfamilie

Das *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR)-Gen kodiert ein Transmembranprotein, welches den Transport von Cl⁻ reguliert und zu der ABC (*ATP-Binding Cassette*)-Transporterfamilie gehört [63].

Der CFTR-Kanal vermittelt eine elektrogene Sekretion von Cl⁻. Der elektrochemische Gradient dafür wird durch eine basal lokalisierte Na⁺/K⁺-ATPase aufrechterhalten. Sekundär erfolgt der parazelluläre Export von Na⁺ und Wasser [5, 64]. Der Ionentransport über den CFTR-Kanal kann durch cAMP [65], cGMP [66] und Ca²⁺ [67] stimuliert werden. Neben dem Cl⁻-Export kann über den CFTR-Kanal auch eine Sekretion von HCO₃⁻-Ionen erfolgen [68]. Außerdem besitzt CFTR regulierende Funktionen im intestinalen Ionentransport: Studien an der Maus zeigten, dass CFTR die Transportvorgänge von DRA und PAT1 aktiviert und den Cl⁻/HCO₃⁻-Austausch steigert [69, 70]. Andererseits kann auch DRA über seine *SLC26T-Sulfate Transporter and Anti-Sigma Factor Antagonist* (STAS)-Domäne die CFTR-Leitfähigkeit stimulieren [71]. Darüber hinaus wurde eine cAMP-abhängige Hemmung von ENaC [72] und von NHE3 [73] unter Koexpression von CFTR beschrieben, die eine vermehrte Na⁺-Absorption bei Patienten mit Mukoviszidose erklärt [63].

Verschiedene Mutationen im CFTR-Gen führen zur angeborenen Stoffwechselerkrankung Mukoviszidose, welche autosomal rezessiv vererbt wird. Hierbei findet in Drüsenepithelien eine verminderte Sekretion von Cl^- und sekundär eine Dehydratation der Sekrete mit Funktionseinschränkung der betroffenen Organe statt. In der Lunge kommt es folglich zu gehäuften Infektionen mit Umbau des Lungengewebes und progredienter respiratorischer Insuffizienz. Im Gastrointestinaltrakt können Malabsorptionsstörungen oder ein Mekonium-Ileus auftreten [63]. CFTR wird insbesondere in den Epithelzellen des Intestinums, der Lunge, des Pankreas, der Gallenblase und der Schweißdrüsen exprimiert [63, 74, 75]. Im Darm zeigten immunhistochemische Untersuchungen ein prominentes Vorkommen des CFTR-Kanals an der apikalen Membran der Kryptenzellen mit einem absteigenden Gradienten auf der Krypten-Villus-Achse [68, 75]. *Ameen et al.* konnten zudem im proximalen Dünndarm Subpopulationen von Villuszellen identifizieren, welche CFTR stark exprimieren [74].

1.2.2.2 ANO1: Ca^{2+} -aktivierter Cl^- -Kanal der TMEM16-Genfamilie

Anoctamin 1 (ANO1, TMEM16A) ist ein Mitglied der TMEM16-Genfamilie und fungiert als Ca^{2+} -aktivierter Cl^- -Kanal. Das Protein wurde – ohne seine Funktion zu kennen – zunächst in gastrointestinalen Stromatumoren entdeckt, in denen es stark exprimiert wurde [76, 77]. Später konnten *Yang et al.* zeigen, dass ANO1 ein Transportprotein ist, welches Ca^{2+} -abhängig die Sekretion von Cl^- vermittelt [78].

ANO1 wird im Gastrointestinaltrakt, in der Lunge, im Pankreas, in der Niere, in den Gallenwegen, in den Speicheldrüsen sowie in Nervenzellen von Ganglien und der Retina exprimiert [78–81]. Im Kolon wird ANO1 vereinzelt in den Enterozyten der Kryptenbasis [82–84] sowie in den *interstitiellen Zellen von Cajal* exprimiert, welche eine Vermittlungsfunktion zwischen dem autonomen Nervensystem und der glatten Muskulatur der Darmwand besitzen. In den *interstitiellen Zellen von Cajal* ist ANO1 bei der Schrittmacherfunktion dieser Zellen beteiligt [82, 85, 86].

Zur Lokalisation von ANO1 wurden in der Literatur kontroverse Ergebnisse beschrieben. Immunfluoreszenz-Untersuchungen zeigten in Enterozyten keine apikale, sondern eine basolaterale Lokalisation von ANO1 [84]. Allerdings gab es in anderen Studien Hinweise darauf, dass ANO1 an der apikalen Zellmembran lokalisiert ist. *Ousingsawat et al.* wiesen in Epithelzellen des Kolons von TMEM16A-KO-Mäusen eine fehlende Cl^- -Sekretion in das Darmlumen nach Gabe von Carbachol nach [87].

1.2.3 PDZ-Adapterproteine der NHERF-Familie: Regulation des intestinalen Ionen- und Wassertransports

Für die Regulation des Ionen- und Wassertransports im Darm spielen sogenannte PDZ-Adapterproteine eine entscheidende Rolle. PDZ-Adapterproteine sind intrazelluläre Regulatorproteine, die über ihre PDZ-Domäne mit den entsprechenden PDZ-Interaktionsmotiven anderer intrazellulärer Proteine und Transmembranproteine in Interaktion treten und dadurch deren Aktivität beeinflussen können. Ihr Name beruht auf den ersten Proteinen, in denen PDZ-Domänen nachgewiesen werden konnten: dem *Postsynaptic Density Protein 95*, dem *Drosophila Homolog Disc-Large Protein* und dem *Tight Junction Protein ZO-1* [88]. PDZ-Domänen sind 90-100 Aminosäuren lange globuläre Strukturen, die aus sechs beta-Faltblättern und zwei alpha-Helices zusammengesetzt sind [89]. Neben ihren PDZ-Domänen können PDZ-Proteine auch weitere Domänen besitzen, durch die sie mit anderen Proteinen in Interaktion treten [88].

Eine besondere Klasse stellen die PDZ-Adapterproteine der *NHE Regulatory Factor* (NHERF)-Familie dar. Zu den PDZ-Adapterproteinen der NHERF-Familie, die in **Abbildung 5** aufgelistet sind, zählen vier Mitglieder und das kürzlich als weiteres Familienmitglied identifizierte Protein Sorting Nexin 27 (SNX27) [90]. Über diese Wechselwirkung können PDZ-Adapterproteine der NHERF-Familie das *Trafficking*, das endozytotische *Recycling* und die Membranretention von Transportproteinen beeinflussen [88, 91]. Die PDZ-Adapterproteine der NHERF-Familie werden insbesondere in den Epithelien des Intestinums und der Niere exprimiert [92].

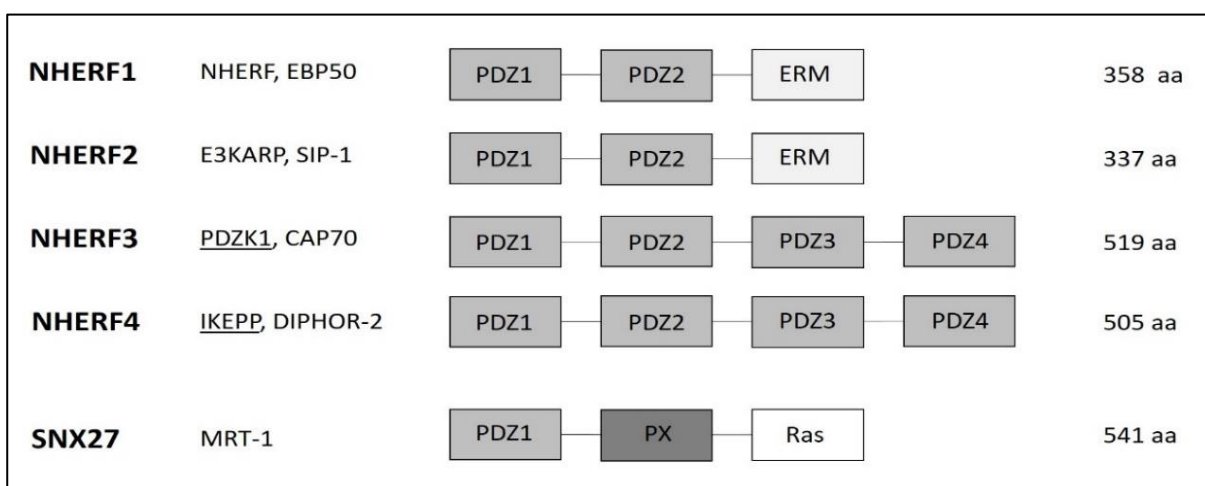


Abbildung 5: Darstellung der PDZ-Adapterproteine der NHERF-Familie sowie des Proteins SNX27 (Name / alternative Bezeichnungen / Interaktions-Domänen / Anzahl der Aminosäuren) modifiziert nach [92, 93].

NHERF1 besitzt zwei PDZ-Domänen und eine Ezrin-Radixin-Moesin (ERM)-Domäne, die für eine Verankerung mit Proteinen des Zytoskeletts verantwortlich ist [92]. Mit seinen PDZ-Domänen geht es eine Bindung mit DRA [Natour und Lamprecht; unveröffentlichte Daten], PAT1 [94, 95], NHE3 [95, 96] und CFTR [88, 97–99] ein. Einerseits bewirkt NHERF1 durch eine Interaktion mit NHE3 eine cAMP-vermittelte Inhibition des Na⁺/H⁺-Austausches [96]. Andererseits kommt es in NHERF1-KO-Enterozyten der Maus zu einer reduzierten Aktivität des durch NHE3-vermittelten Transports. Dabei konnte eine hemmende Wirkung von Forskolin, 8-Br-cGMP und Ionomycin auf NHE3 nachgewiesen werden [100]. Diese Untersuchungen legen nahe, dass NHERF1 einen relevanten, regulatorischen Einfluss auf NHE3 hat. Durch eine Bindung an CFTR kann NHERF1 die apikale Polarisation des Kanals beeinflussen [97] und die Leitfähigkeit des Kanals erhöhen [99]. Zudem hemmt NHERF1 die Bindung von CFTR an den *CFTR-Associated Ligand* (CAL) und verstärkt dadurch die Expression von CFTR an der Zellmembran [98].

NHERF2 besitzt wie NHERF1 zwei PDZ-Domänen sowie eine ERM-Domäne und führt zu einer cAMP-vermittelten Hemmung von NHE3 [96], an welches es über die zweite PDZ-Domäne bindet [19, 101]. NHERF2 wird außerdem für die Ca²⁺-abhängige Inhibition von NHE3 benötigt, die durch Bildung eines NHE3-NHERF2-Komplexes und daraus folgender Oligomerisation und Endozytose von NHE3 herbeigeführt wird [102].

Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigen eine apikale Lokalisation von NHERF2 im proximalen Kolon sowie eine Kolokalisation mit DRA und NHE3 [19], was neben der Bindung von NHERF2 an NHE3 auch eine Bindung an DRA vermuten lässt. In den Epithelien der Atemwege zeigt sich zudem eine Kolokalisation von NHERF2 mit CFTR [103]. Hier bildet NHERF2 einen Komplex mit dem Strukturprotein Ezrin und CFTR, welcher zu einer Verstärkung der cAMP-stimulierten Aktivierung und zu einer Stabilisierung von CFTR in der apikalen Membran führt [103]. Des Weiteren hat eine Deletion des PDZ-Interaktionsmotivs von CFTR eine Abnahme der Halbwertszeit in der apikalen Zellmembran zur Folge [104].

Das *PDZ Domain Protein Kidney 1* (**PDZK1**, NHERF3) besitzt vier PDZ-Domänen und wird stark im Dünndarm, in der Niere und der Leber sowie sehr gering auch in der Bauchspeicheldrüse, dem Kolon und dem Magen exprimiert [105, 106]. PDZK1 kann über seine PDZ-Domänen mit DRA [105], PAT1 [95], NHE3 [95] und CFTR [106] interagieren. Durch Bindung an den C-Terminus von CFTR ermöglicht PDZK1 die Dimerisierung von CFTR und erhöht so dessen Kanalaktivität [106]. PDZK1 bewirkt Ca²⁺-abhängig eine Hemmung von NHE3 [54, 88]. In PDZK1-KO-Mäusen kommt es auch zu einer geringeren Transportaktivität [100] und

einem Defekt in der Membranverankerung [107] von NHE3. Außerdem wurde in PDZK1-KO-Mäusen eine Reduktion der maximalen CFTR-Aktivierung beschrieben [107].

Das *Intestinal and Kidney Enriched PDZ-Protein* (**IKEPP**, NHERF4) ist das vierte Mitglied der NHERF-Familie und wurde zuerst von *Scott et al.* als ein regulierendes Protein entdeckt, welches die Aktivität der Guanylyl Cyclase C (GC-C) moduliert [108]. IKEPP besitzt wie PDZK1 vier PDZ-Domänen und wird an der apikalen Seite der Epithelzellen des Intestinums und der Niere exprimiert [108]. IKEPP kann durch Bindung an NHE3 dessen Transportaktivität Ca^{2+} -abhängig stimulieren [88]. Weiterhin wurde von *Natour und Lamprecht* eine Bindung von IKEPP an DRA beschrieben [27].

Neben den genannten vier Mitgliedern spielt auch das Protein **SNX27** als neu beschriebenes NHERF-Familienmitglied eine bedeutende Rolle in der Regulation des intestinalen Elektrolyt- und Wassertransports und ist wesentlich an dem endosomalen *Sorting* und *Signaling* von interagierenden Proteinen beteiligt [109, 110]. Es gehört zu der SNX-Familie, deren Proteine durch ein Phospholipid-Bindemotiv (PX-Domäne) gekennzeichnet sind. Neben diesem Motiv besitzt SNX27 eine PDZ-Domäne und eine *Rat Sarcoma* (Ras)-Domäne [109]. In der eigenen Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die PDZ-Domäne von SNX27 spezifisch an das C-terminale PDZ-Bindemotiv von DRA bindet. Außerdem wurde eine starke Reduktion der DRA-Aktivität in Zellen mit einem SNX27-KO festgestellt [90]. Weiterhin ist bekannt, dass SNX27 mit seiner PDZ-Domäne an NHE3 bindet und dadurch die basale Transportaktivität von NHE3 aufrechterhält [111]. Des Weiteren zeigten die Studien von *Singh et al.*, dass SNX27 für die Exozytose von NHE3 von frühen Endosomen zur Plasmamembran benötigt wird [111].

1.3 Kurzdarmsyndrom und Adaptationsmechanismen

Das Kurzdarmsyndrom (KDS) beschreibt einen Krankheitszustand, bei dem die Darmfunktion nach einer ausgedehnten Dünndarmresektion so stark eingeschränkt ist, dass sie durch spezielle diätetische Maßnahmen oder parenterale Therapie unterstützt werden muss [112]. Es kommt v. a. aufgrund einer geringeren Schleimhautoberfläche zu einer verminderten Verdauung und Resorption von Makronährstoffen, Vitaminen, Mineralien und Wasser. Die Folgen sind Durchfälle, Fettstühle, Gewichtsverlust, Exsikkose und spezifische Mangelerscheinungen [113].

Die häufigsten Ursachen für ein KDS stellen multiple Resektionen beim Morbus Crohn, Darmresektionen aufgrund von Durchblutungsstörungen, Tumorerkrankungen, Strahlenschäden oder

Bauchverletzungen dar [114]. Es wird davon ausgegangen, dass ein KDS erst bei einer Restdünndarmlänge von weniger als 200 cm auftritt [115].

Im menschlichen Darm kann durch bislang unvollständig geklärte Mechanismen eine Adaptation an die Kurzdarmsituation stattfinden, die das postoperative *Outcome* der Patienten maßgeblich beeinflusst. Im Rahmen dieser Adaptation kann es zu einer erhöhten Expression von Transportproteinen, zu einer beschleunigten Kryptenzelldifferenzierung und zu einer Anpassung der Darmmotilität kommen. Neben funktionellen Veränderungen kann die Adaptation auch eine strukturelle Anpassung, also verstärktes Wachstum von Darmkrypten und Dünndarmzotten sowie eine gesteigerte Angiogenese bewirken [116]. Diese Adaptationsmechanismen bewirken eine verbesserte Resorption von Makronährstoffen, Vitaminen, Mineralien sowie Wasser und dadurch eine Verbesserung der Krankheitssymptomatik bei Patienten mit einem Kurzdarm [116]. Daneben haben Untersuchungen gezeigt, dass sowohl die strukturelle als auch die funktionelle, postoperative Adaptation im Ileum stärker ist als im Jejunum [117, 118]. Bei der strukturellen Adaptation an das KDS spielen die Hormone *Glucagon-like Peptid 2* (GLP2) und *Insulin-like Growth Factor* (IGF1) sowie deren Rezeptoren, der *Glucagon-like Peptid 2 Rezeptor* (GLP2-Rezeptor) und der *Insulin-like Growth Factor Rezeptor* (IGF1-Rezeptor), eine entscheidende Rolle [116]. Daher wird im Folgenden näher auf sie eingegangen.

1.3.1 Strukturelle Adaptation durch IGF1 und GLP2

1.3.1.1 IGF1- und GLP2-Rezeptor: Funktion und Expression

Der **IGF1-Rezeptor** ist ein transmembranöser Typ-1-Rezeptor mit Thyrosinkinaseaktivität, welcher durch IGF1 aktiviert wird. Er besteht aus zwei *alpha*-Untereinheiten, die als Hormonbindungsstelle fungieren, sowie zwei *beta*-Untereinheiten, die enzymatische Aktivität besitzen [119].

Expressionsstudien wiesen den IGF1-Rezeptor in den intestinalen Epithelzellen des Menschen [120], des Kaninchens [121], des Schweins [122] und der Ratte [123] nach. Es zeigte sich eine starke Expression in den proliferativen Zellen der Krypten mit absteigender Expressionsstärke entlang der Krypten-Villus-Achse [123]. Später konnten *Ye et al.* die Expression vom IGF1-Rezeptor in der enteroendokrinen *Secretin Tumor Cell Line 1* (STC 1)-Zelllinie nachweisen und gingen daher davon aus, dass der IGF1-Rezeptor auch in den reifenden endokrinen Zellen des intestinalen Kryptenepithels exprimiert wird [124].

Der **GLP2-Rezeptor** gehört zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) und wurde zuerst von *Munroe et al.* im Intestinum der Ratte und des Menschen beschrieben [125]. Er vermittelt seine Wirkung durch einen intrazellulären cAMP-Anstieg, der über eine Aktivierung durch GLP2 erreicht wird [125, 126].

Erste Expressionsstudien zeigten eine GLP2-Rezeptor-Expression im Gastrointestinaltrakt, im Hypothalamus und in den A-Zellen des Pankreas [125, 127]. Innerhalb der Darmwand erbrachten Expressionsstudien abweichende Ergebnisse zur Verteilung des GLP2-Rezeptors. Immunhistochemische Untersuchungen von *Yusta et al.* sowie *Guan et al.* lokalisierten den GLP2-Rezeptor in enteroendokrinen Epithelzellpopulationen des Magens, Duodenums, Jejunums, Ileums und des Kolons [128, 129]. Dagegen zeigten *Orskov et al.* durch *In-situ*-Hybridisierung und immunhistochemische Färbungen im Darm der Maus und des Menschen eine Expression des GLP2-Rezeptors in subepithelialen Myofibroblasten [130]. Auch *Pedersen et al.* konnten mittels quantitativer PCR und Immunhistochemie keine Expression des GLP2-Rezeptors im intestinalen Epithel detektieren [131]. Sie konnten eine starke GLP2-Rezeptor-Expression in den Neuronen der Muskelschichten der Darmwand, sowie eine geringere Expression in der *Lamina propria* der Mukosa nachweisen [131], in der sich subepitheliale Myofibroblasten befinden.

1.3.1.2 Physiologische Wirkung von IGF1 und GLP2

Das Wachstumshormon **IGF1** wird insbesondere in der Leber und im Knochen synthetisiert [119]. Im Intestinum wird IGF1 von subepithelialen Myofibroblasten gebildet und wirkt parakrin [119, 132] auf die Zellen, die den IGF1-Rezeptor exprimieren.

Die intestinale Wirkung durch IGF1 wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen untersucht. IGF1 verbesserte demnach die Resorption von Makronährstoffen und Elektrolyten [133], führte zu einer Vergrößerung der Krypten [134] und der Dünndarmzotten sowie zu einer Erhöhung des Darmgewichts [135]. Zudem wurde die Umstellung von parenteraler auf enterale Ernährung durch eine IGF1-Behandlung bei Ratten mit KDS erleichtert [136]. Neben diesen positiven Wirkungen durch IGF1 wurden jedoch auch negative beschrieben, die eine therapeutische Behandlung mit IGF1 nicht möglich machen. *Pucilowska et al.* zeigten, dass die IGF1-mRNA in Fibroblasten und Myofibroblasten von Patienten mit Morbus Crohn stark erhöht ist und vermuteten daher einen Einfluss von IGF1 auf den fibrotischen Umbau im Krankheitsverlauf [137]. Außerdem ist in der Literatur eine Aktivierung von Fibroblasten zur verstärkten Produktion extrazellulärer Matrix durch IGF1 beschrieben [138].

Das Hormon **GLP2** wird in den enteroendokrinen L-Zellen, die insbesondere in den Darmkrypten des proximalen Kolons und des distalen Ileums vorkommen, synthetisiert. Es vermittelt seine Wirkung wie IGF1 v. a. parakrin auf benachbarte Zellen, die den GLP2-Rezeptor exprimieren [139, 140]. Die Sekretion von GLP2 aus den L-Zellen wird durch neuroendokrine Faktoren und luminalen Nährstoffe beeinflusst [139, 141, 142]. Die Versuche von *Xiao et al.* zeigten, dass die Sekretion von GLP2 nach einer gemischten Mahlzeit, sowie nach alleiniger Zufuhr von einfachen Kohlenhydraten und Fetten stimuliert wurde [142]. GLP2 wird durch das Enzym Dipeptidyl Peptidase 4 (DPP 4) abgebaut [143, 144].

Untersuchungen zur intestinalen Wirkung von GLP2 und GLP2-Analoga zeigten intestinotrophe und antiapoptotische Effekte. GLP2 führte zu einer Erhöhung des Darmgewichts, stimulierte die Proliferation des Kryptenepithels, induzierte das Wachstum der Darmzotten [125, 130, 145–148] und senkte die Apoptoserate der Enterozyten [147–149]. Bei Patienten mit KDS führte die Applikation von GLP2 zu einer verbesserten Nährstoffresorption und einem besseren Ernährungszustand [150]. Diese Effekte konnten auch durch die längere Verabreichung des GLP2-Analogons Teduglutid beobachtet werden [151, 152]. In intestinalen Zellkulturen und in subepithelialen Myofibroblasten des Maudarms konnte nachgewiesen werden, dass GLP2 neben der proliferativen Wirkung zu einer erhöhten Expression der IGF1-mRNA und zu einer erhöhten Sekretion von IGF1 führte [132, 153]. Mehrere Untersuchungen konnten zeigen, dass bei IGF1-KO-Mäusen keine intestinotrophe Wirkung durch GLP2 stattfindet [153, 154]. Daraus leiteten *Rowland et al.* ab, dass GLP2 seine wachstumsfördernde Wirkung über IGF1 vermittelt [154, 155]. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass GLP2-immunreaktive Zellen neben IGF1 auch Keratinozyten-Wachstumsfaktoren (KGF) produzierten [130]. Zudem detektierten *Guan et al.* den GLP2-Rezeptor an enterischen Neuronen. Er war an diesen Nervenzellen mit dem Enzym *Endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS) und dem Hormon *Vasoactive Intestinal Polypeptide* (VIP) kolokalisiert [129]. Sie vermuteten daher, dass es durch die Aktivierung des GLP2-Rezeptors dieser Zellen zu einer Ausschüttung von Stickstoffmonoxid (NO) und VIP kommt.

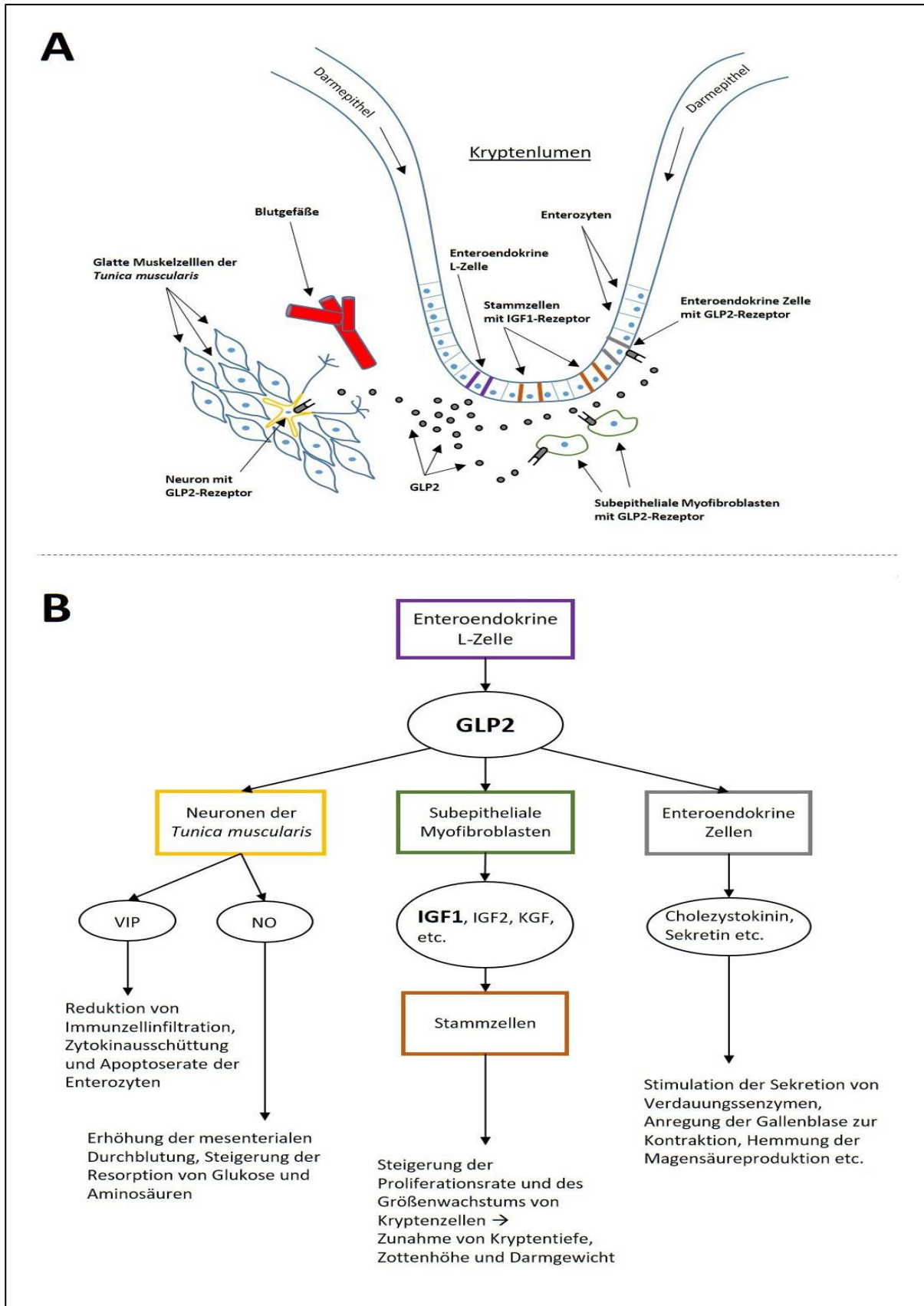


Abbildung 6: Wirkung durch GLP2. **A** zeigt eine orientierende histologische Übersicht mit den Zellen, die eine Rolle bei der durch GLP2 vermittelten Wirkung spielen. **B** beschreibt die GLP2-Kaskade und die daraus resultierenden Effekte. Modifiziert nach [140].

1.4 NOD2-Gen: Funktion und pathophysiologische Auswirkung einer Genmutation

Das *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2* (NOD2)-Gen kodiert auf dem menschlichen Chromosomen 16 für das intrazelluläre NOD2-Rezeptorprotein, welches zur Familie der *NOD Like Receptor* (NLR)-Proteine gehört und eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem einnimmt. NLR-Proteine sind *Pattern Recognition Receptors* (PRR), die *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs) oder *Microbe Associated Molecular Patterns* (MAMPs) erkennen und eine Abwehrreaktion gegen bakterielle Erreger einleiten können. Der NOD2-Rezeptor besteht aus drei Domänen: an der C-terminalen Seite liegt die *Leucine Rich Repeats* (LRR)-Domäne, an der N-terminalen Seite die *Caspase Activation And Recruitment Domäne* (CARD) und zentral die verknüpfende NOD-Domäne. Über die LRR-Domäne wird das *Muramyl-Dipeptid* (MDP), ein Bestandteil der bakteriellen Zellwand, erkannt. Diese Erkennung führt zu einer Aktivierung der NOD-Domäne und dadurch zu einer Oligomerisierung des NOD2-Rezeptors, wodurch die CARD-Domäne eine Signalkaskade in Gang setzt. Am Ende dieser Signalkaskade steht die Aktivierung des *Nuclear Factor Kappa-Light-Chain Enhancer Of Activated B-Cells* (NF- κ B)-Transkriptionsfaktors, die wiederum zu der Synthese zahlreicher proinflammatorischer Zytokine führt [156–158].

Der NOD2-Rezeptor wird einerseits in myeloischen Zellen, wie den Monozyten, Granulozyten und dendritischen Zellen exprimiert [159, 160]. Andererseits wurde der Rezeptor auch in den Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes, der Speicheldrüsen, der Lunge und der Niere nachgewiesen [161]. Darüber hinaus konnte eine starke Anreicherung der NOD2-mRNA in den intestinalen Krypten und hier insbesondere in den Paneth-Zellen gefunden werden [162, 163].

Verschiedene Mutationen im NOD2-Gen stellen einen Risikofaktor für das Auftreten eines Morbus Crohn dar [164, 165], wobei sich über 90% der Mutationen im Bereich der LRR-Domäne befinden [166]. Dabei sind die pathophysiologischen Mechanismen, die die Genese eines Morbus Crohn bei Patienten mit NOD2-Mutationen begünstigen, noch nicht hinreichend geklärt. Bei ilealem Morbus Crohn konnte eine verminderte Sekretion antimikrobieller Peptide der Paneth-Zellen, wie z.B. *alpha*-Defensine oder Lysozyme, und eine daraus resultierende Beeinflussung der Darmflora festgestellt werden [167, 168]. Diese verminderte Sekretion fiel besonders bei Patienten mit NOD2-Mutationen auf [169, 170]. Darüber hinaus konnte ein direkter Einfluss des NOD2-Status auf die Zusammensetzung der intestinalen Flora gezeigt werden [171–173], wobei NOD2-KO-Mäuse eine verminderte Abwehr gegen die Kolonisation pathogener Bakterien zeigten [171]. Es ist also davon auszugehen, dass eine NOD2-*loss of function*-Mutation eine eingeschränkte antibakterielle Aktivität der Paneth-Zellen zur Folge hat, aus der

wiederum eine Veränderung der Darmflora resultiert [157]. In der Folge kommt es zu einer Reduktion von Bakterien mit protektiver Darmfunktion sowie zu einer Dysbiose [168].

1.4.1 Bedeutung der NOD2-Genmutation für die Pathogenese des Kurzdarmsyndroms

Die NOD2-Mutation spielt ebenfalls eine Rolle bei der Pathogenese des KDS. *Lamprecht et al.* stellten anhand einer Kohortenstudie fest, dass das Risiko, nach einer ausgedehnten intestinalen Resektion ein KDS zu entwickeln, bei Patienten mit einer NOD2-Genmutation gegenüber Patienten ohne NOD2-Genmutation signifikant erhöht ist. Dieser signifikante Unterschied wurde allerdings nur bei Patienten festgestellt, die nicht an einem Morbus Crohn litten [174]. Bereits zuvor publizierten *Fishbein et al.*, dass bei einem sehr hohen Anteil von untersuchten Patienten, die aufgrund eines Darmversagens ein Darmtransplantat erhielten und zugleich nicht an Morbus Crohn litten, eine NOD2-Mutation vorlag [175]. Weiterhin wird vermutet, dass Patienten mit einer NOD2-Mutation nach einer ausgedehnten Darmresektion ein höheres Risiko tragen, eine Darmtuberkulose oder opportunistische Infektionen zu entwickeln [176]. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass der NOD2-Status eine erhebliche Rolle für das postoperative *Outcome* spielt, wobei die Ursachen dafür noch nicht hinreichend geklärt sind.

1.5 Haushaltsgene: Funktion und Expression im Gastrointestinaltrakt

In der vorliegenden Arbeit wurden die epithelzellspezifischen Gene Zytokeratin 18 (ZK-18) und Villin sowie das nicht epithelzellspezifische Gen *beta*-Aktin als Haushaltsgene verwendet, um die relative Genexpression (**Kapitel 3.5.2**) der oben beschriebenen Transport- und Adapterproteine sowie der hormonellen Rezeptoren auf der Längsachse des Maudarms zu bestimmen.

Aktin ist ein zelluläres Strukturprotein, das eine essentielle Komponente des Zytoskeletts bildet und u.a. der Aufrechterhaltung des Zellgerüsts, der Zellmigration, der Zellteilung und der Zelldifferenzierung dient [177, 178]. Insgesamt gibt es sechs verschiedene Isoformen des Aktins, von denen ***beta*-Aktin** eine zytoplasmatische Unterform darstellt, die ubiquitär exprimiert wird [179].

Zytokeratine sind epitheliale Intermediärfilamente, die neben Mikrotubuli und Mikrofilamenten eine wichtige Komponente des Zytoskeletts in eukaryotischen Zellen bilden und einen hohen Stellenwert im Aufbau und in der Funktion der Zelle besitzen [180]. **ZK-18** wird dabei in den proliferativen Zellen der Krypten und nicht in den differenzierten Zellen der Villi exprimiert (**Abbildung 7**) [181]. ZK-18 findet zudem Verwendung als epithelspezifischer Marker [182].

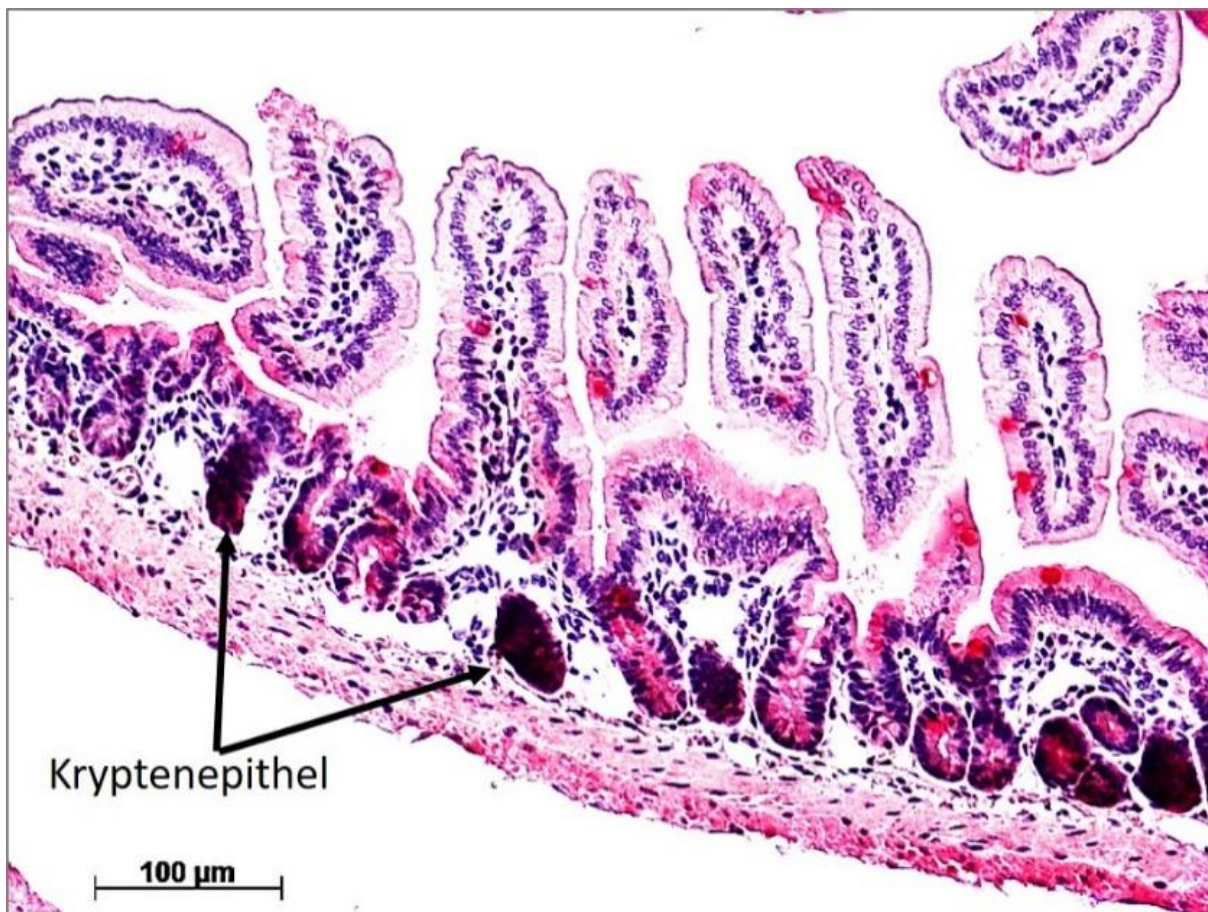


Abbildung 7 (unveröffentlichte Abbildung, bereitgestellt von Peggy Berlin): Ileum einer WT-Maus. Anfärbung des Epithels durch einen ZK-18-Antikörper.

Villin ist ein Aktin-bindendes Protein, welches die Struktur und den Aufbau von Aktin reguliert. Es wird epithelzellspezifisch und insbesondere in den Zellen synthetisiert, die einen Bürstensaum enthalten. Bereits in den undifferenzierten Zellen der Krypten findet eine Villinproduktion statt, die in den differenzierten Zellen der Zottenbasis ihr Maximum erreicht (**Abbildung 8**) [183].

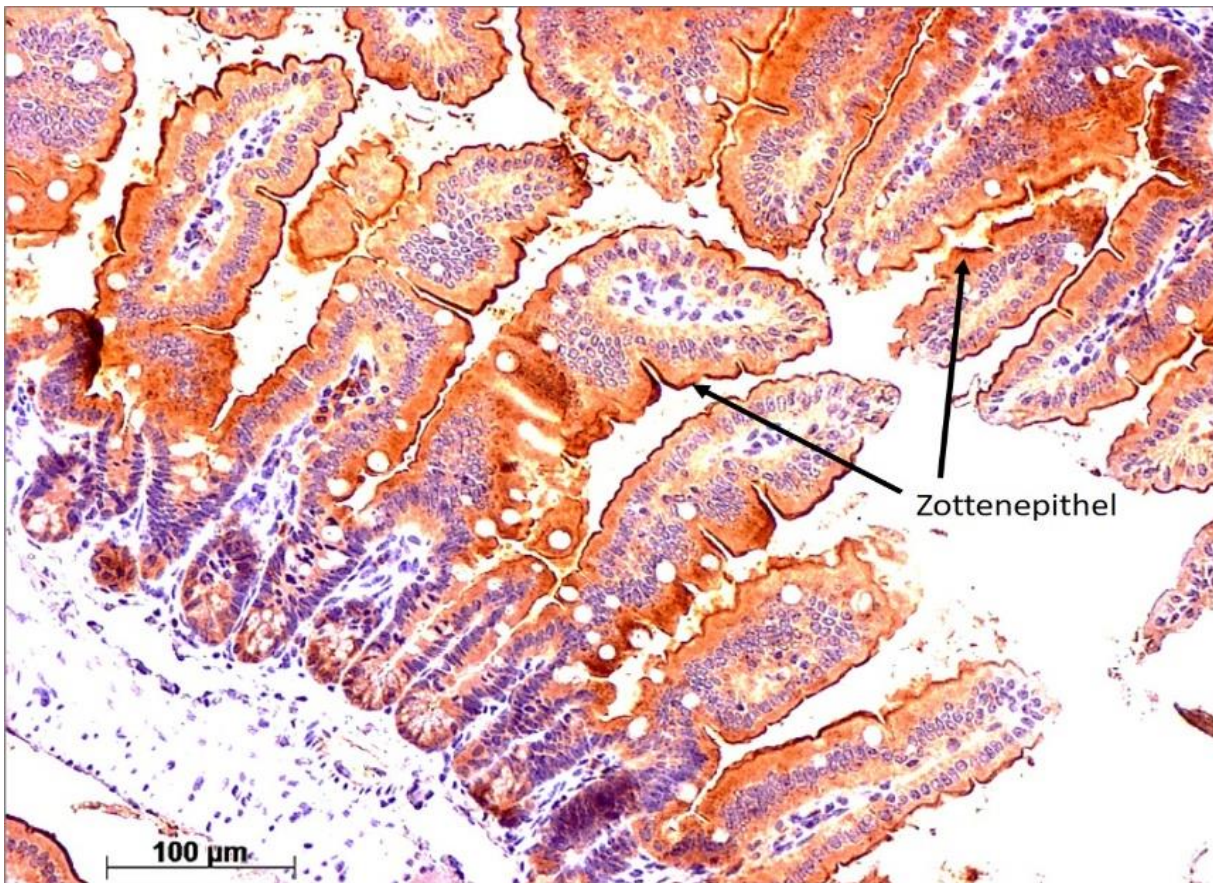


Abbildung 8 (unveröffentlichte Abbildung, bereitgestellt von Peggy Berlin): Ileum einer WT-Maus. Anfärbung des Epithels durch einen Villin-Antikörper.

2 ZIELSTELLUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte die basale Expression von Transportproteinen, Adapterproteinen und hormonellen Rezeptoren in der Darmwand der Maus untersucht werden. Dabei sollte einerseits die Expression der Proteine differenziert auf der Längsachse des Darms vom Duodenum bis zum Rektum ermittelt werden. Andererseits sollte die Expression von WT-Mäusen mit der von NOD2-KO-Mäusen verglichen werden.

Die Expressionsdaten von WT- und NOD2-KO-Mäusen wurden gegenübergestellt, um mögliche Unterschiede in der basalen Expression zu identifizieren, die bei Patienten mit NOD2-Mutationen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Darmversagens nach einer ausgedehnten Darmresektion erklären könnten. Darüber hinaus dienen die Ergebnisse dieser Arbeit dem Vergleich mit einer Expressionsanalyse der untersuchten Zielgene in einem Kurzdarmmodell der Maus.

Die Transportproteine, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sind *DRA*, *PAT1*, *NHE3*, *CFTR* und *ANO1*. Aufgrund ihrer apikal-transmembranösen Lokalisation findet über sie der Transport von Elektrolyten und Wasser zwischen dem Darmlumen und der Epithelzelle statt. Dieser durch die Transportproteine vermittelte Austausch wird wiederum von intrazellulären Adapterproteinen beeinflusst, wobei die Transportaktivität hoch- oder runterreguliert werden kann. Zu den untersuchten Adapterproteinen gehören *NHERF1*, *NHERF2*, *PDZK1*, *IKEPP* und *SNX27*. Des Weiteren wurden die hormonellen Rezeptoren *GLP2*- und *IGF1*-Rezeptor untersucht, die postoperativ nach einer ausgedehnten Darmresektion eine Adaptation der Darmschleimhaut vermitteln können.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Mäuse, Gewebeentnahmen und Gewebeprozessierung

Für die Untersuchungen wurden männliche Mäuse der Stämme C57BL/6J (Wildtyp, WT) und B6.129S1-Nod2tm1Flv/J (NOD2-KO) von der Firma *Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA* bezogen und in der zentralen Versuchstierhaltung des Rudolf-Zenker-Institutes für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock (Leitung: Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar) gezüchtet. Die Zucht und Haltung der Mäuse erfolgte unter Umsetzung der Richtlinie 2010/63/EU unter *Specific Pathogen Free* (SPF)-Bedingungen. Drei Tage vor Organentnahme wurden die Tiere in die chronische Haltung verbracht, wo sie Standardfutter und Wasser *ad libitum* erhielten.

Die Tiere wurden durch eine intraperitoneale Injektionsnarkose aus Ketamin (80-100 mg/kg KG) und Xylazin (5-15 mg/kg KG) narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Der Darm wurde zügig explantiert, mit kalter physiologischer Kochsalzlösung gespült und vermessen. Anschließend wurde der Darm in Segmente mit jeweils einer Länge von etwa 1-1,5 cm aufgeteilt, wobei die Segmente jeweils im Wechsel entweder zur weiteren molekularbiologischen Untersuchung in flüssigen Stickstoff gefroren – und anschließend bei -80°C asserviert – oder für histologische Untersuchungen in 4%ige Formafix-Lösung eingelegt wurden.

Von jedem Stamm wurden jeweils sechs Mäuse verwendet (n=6). Dabei betrug das Alter der Mäuse durchschnittlich $5,1 \pm 1,3$ Monate (WT) bzw. $4,3 \pm 1,3$ Monate (NOD2-KO) und das durchschnittliche Körpergewicht $28,5 \pm 1,6$ g (WT) bzw. $28,8 \pm 1,7$ g (NOD2-KO), wobei sich Durchschnittsalter und -gewicht zwischen den untersuchten Gruppen nicht signifikant unterschieden.

3.2 Isolation der RNA

Für die RNA-Isolation wurde das *RNeasy Minikit (250)* nach der Anleitung des Herstellers (*RNeasy Mini Handbook, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland*) verwendet.

Die einzelnen Darmabschnitte wurden unter Konservierung in flüssigem Stickstoff zunächst abgewogen und bei Bedarf mit einem Mörser zerkleinert, um ein Maximalgewicht von 30 mg pro Probe für die weitere Durchführung nicht zu überschreiten.

Den Proben wurde jeweils eine Stahlkugel (*Stainless Steel Beads 7 mm, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland*) sowie ein Gemisch aus 6 µl *beta*-Mercaptoethanol und 600 µl RLT-Lysepuffer (1:100) zugegeben. Anschließend wurde das Gewebe durch den *Tissue Lyser LT (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland)* für 5 min bei 50 Hz homogenisiert und für 2 min bei 14.000 g zentrifugiert. Der abgenommene Überstand wurde mit 70% Ethanol vermischt. 700 µl dieses Lysat-Ethanol-Gemisches wurden auf eine *RNeasy*-Säule gegeben und zentrifugiert. Es folgte die Gabe von 350 µl RW1-Puffer auf die Säule mit anschließender Zentrifugation und die Zugabe von 80 µl DNase Mix (10 µl DNase Stock Lösung [*RNase-Free DNase Set, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland*] + 70 µl RDD-Puffer) mit anschließender Inkubation der Proben für 15 min bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurden erneut 350 µl RW1-Puffer zugegeben. Im Anschluss folgten zwei weitere Waschungen mit 500 µl RPE-Puffer (mit absolutem Ethanol versetzt) und Zentrifugation. Nach Überführen der Säule auf ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß wurde die RNA durch Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser für 1 min bei 8000 g in der Zentrifuge ausgewaschen.

3.3 RNA-Konzentrationsmessung und RNA-Qualitätskontrolle

Sowohl die RNA-Konzentration als auch die Reinheit der RNA-Probe wurden durch photometrische Messung mit dem Nanophotometer bestimmt. Dazu wurde 1 µl der zuvor isolierten RNA verwendet. Die Reinheit der RNA wurde durch das Absorptionsverhältnis der RNA-Probe bei 260 nm sowie 280 nm Wellenlänge UV-Licht ermittelt (A260/A280-Ratio). Bei einem Quotienten von etwa 2,0 ist dabei von einer reinen, nicht kontaminierten RNA auszugehen. Durch diese Kontrolle wurde sichergestellt, dass nur RNA-Proben zur weiteren Untersuchung verwendet wurden, bei denen die A260/A280-Ratio zwischen 1,9 und 2,1 lag.

Zur weiteren Kontrolle der Qualität wurden die RNA-Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese elektrophoretisch untersucht. Bei der Gelelektrophorese wird die RNA in einem elektrischen Feld nach Größe in einzelne Untereinheiten aufgetrennt. Für die Herstellung eines 1,5 %igen Agarosegels (**Tabelle 1**) wurde die Agarose in TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer durch Aufkochen gelöst und mit Ethidiumbromid versetzt. In jede Geltasche wurde 1,5 µg RNA, zusammen mit 2 µl Ladepuffer (aus 50 % Glycerin, 120 mM EDTA, 10 mM Tris, 5 % A. dest.), aufgetragen. Um die jeweilige Fragmentgröße bestimmen zu können, wurde zudem 8 µl eines Markers (*Mass Ruler Express DNA Ladder Mix Reverse*) auf das Gel pipettiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei einer angelegten Spannung von 90 V über einen Zeitraum

von 45 min. Anschließend konnten die Fragmente mithilfe von UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die zuvor isolierte RNA wurde in der gelelektrophoretischen Auftrennung durch scharf abgrenzbare 18S- und 28S-Banden nachgewiesen. Zur weiteren Untersuchung wurden nur diejenigen RNA-Proben verwendet, die dieses Merkmal in der Elektrophorese aufwiesen (**Abbildung 9**).

Tabelle 1: Zusammensetzung des Agarosegels (1,5%ig).

Reagenzien
1,5 g Agarose
100 ml 0,5 % TAE-Puffer
4 µl Ethidiumbromid-Lösung

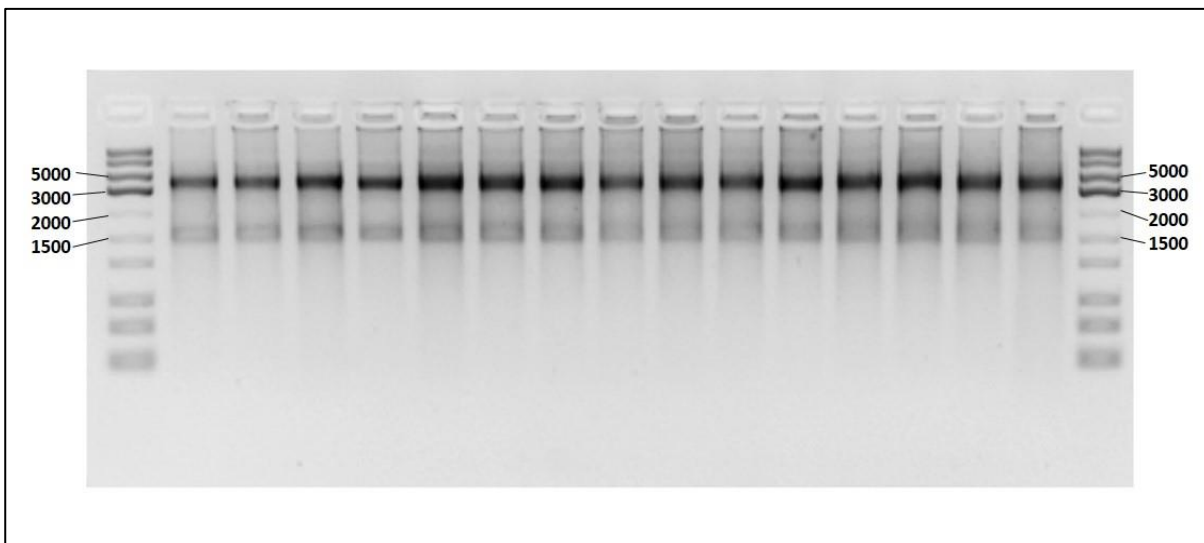


Abbildung 9: 18S- und 28S-Banden der RNA nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proben. Die Zahlen beschriften die Größe des verwendeten Markers (in bp).

3.4 Synthese der cDNA

Für die Synthese der cDNA wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystems)* verwendet. Es wurden 2 µg RNA in einem Volumen von 10 µl mit RNase-freiem Wasser für die cDNA-Synthese versetzt. Anschließend wurde der Mastermix, dessen Reagenzien in **Tabelle 2** aufgelistet sind, hinzugegeben.

Tabelle 2: Mastermix für die cDNA-Synthese.

Reagenz	Volumen in μl
10 x Reverse Transkriptase (RT)-Puffer	2,0
25 x Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) Mix (100 mM)	0,8
10 x Reverse Transkriptase (RT) Random Primer	2,0
MultiScribe Reverse Transkriptase (RT)	1,0
Nukleasefreies Wasser	4,2
Totalvolumen	10,0

Tabelle 3: Temperaturprotokoll der cDNA-Synthese.

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Zeit	10 min	120 min	5 min	∞

Die RNA wurde in einem Ansatz von 20 μl im Thermocycler (*ThermoCycler, Biozym*) in vier Schritten in cDNA umgeschrieben (**Tabelle 3**). Nach der Transkription wurden die Proben in einem Verhältnis von 1:20 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt.

3.5 Genexpressionsanalyse mittels qPCR

3.5.1 Das Prinzip der PCR

Die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) ist eine molekularbiologische Methode, durch die spezifische Nukleinsäuresequenzen vervielfältigt und nachgewiesen werden können. Bei einer PCR werden mehrere Zyklen durchlaufen, die jeweils aus den folgenden Schritten bestehen: der Denaturierung, der Primerhybridisierung und der Elongation. Die Denaturierung erfolgt bei 95°C und dient der Lösung der Wasserstoffbrückenbindungen, durch die die doppelsträngige (*ds*) DNA zusammengehalten wird. Bei der Primerhybridisierung

kommt es bei einer Abkühlung auf 60°C zur Anlagerung der Primer an das 5'- und 3'-Ende des zu amplifizierenden Bereichs. Die Elongation erfolgt bei 60°C zur Amplifikation der DNA durch eine hitzebeständige *Taq*-Polymerase bei Anwesenheit freier Desoxynucleosid-Triphosphate (dNTPs). Dieses Prinzip führt pro Zyklus zu einer Verdopplung und über mehrere Zyklen hinweg zu einer exponentiellen Vervielfältigung der spezifischen DNA-Abschnitte.

Bei einer quantitativen Echtzeit-PCR (*real-time quantitative PCR*, qPCR) wird durch den zusätzlichen Einsatz von fluoreszierenden Molekülen nach jedem Zyklus die Menge der neu synthetisierten DNA von optischen Detektionseinheiten bestimmt. Sobald bestimmte DNA-Sequenzen amplifiziert werden, zeigt sich ein Anstieg des Fluoreszenzsignals. Die qPCR erlaubt somit eine Aussage über die Stärke der Expression der untersuchten Gene.

3.5.2 Messung der relativen Genexpression und Durchführung der qPCR

Die Quantifizierung der DNA-Moleküle wird durch den *Threshold Cycle* (CT-Wert) beschrieben, der den Zyklus angibt, bei dem die Fluoreszenz erstmalig einen definierten Schwellenwert – den sog. *Threshold* – überschreitet. Je kleiner der CT-Wert ist, desto stärker ist also die Expression. Um die Expression der einzelnen Gene und Darmabschnitte untereinander besser vergleichen zu können, wurden die Zielgene an die Haushaltsgene *beta*-Aktin, ZK-18 und Villin (**Kapitel 1.5**) normiert. Durch diese Normierung wurde der Δ CT-Wert (= $CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Haushaltsgen}}$) gebildet. Um das Ausmaß der mRNA-Expression besser beschreiben zu können, wurde die relative Genexpression als $2^{-\Delta CT}$ -Wert dargestellt.

Die Analyse der Genexpression erfolgte durch qPCR am *Applied Biosystems ViiA 7 Real-Time PCR System*. Die Proben wurden nach den Ansätzen in **Tabelle 12** bzw. **Tabelle 5** jeweils als Duplikate (TaqMan[®]) bzw. Triplikate (SYBR[®] Green) auf eine 96-Well-Reaktionsplatte (*MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems*) aufgetragen. Die Ergebnisse wurden nur dann verwertet, wenn die Abweichung der CT-Werte der Duplikate und Triplikate geringer als 0,5 war. Zudem wurde für jedes Zielgen eine Negativkontrolle (*Non Template Control*, NTC) mit nukleasefreiem Wasser durchgeführt, um falsch positive Werte identifizieren zu können.

Die Expressionsanalyse erfolgte für die Gene DRA, NHE3, CFTR, ANO1, PAT1 sowie NHERF1, NHERF2, IKEPP und PDZK1 durch SYBR[®] Green und für SNX 27, GLP2-Rezeptor und IGF1-Rezeptor durch TaqMan[®]-Sonden.

3.5.3 Detektion durch SYBR® Green

SYBR® Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich sequenzunabhängig in *dsDNA* einbindet. Unter Anregung von kurzwelligem UV-Licht emittiert der Farbstoff längerwelliges Licht im Bereich von 530 nm, welches von optischen Detektionseinheiten gemessen werden kann. Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz steigt so mit der Menge der amplifizierten *dsDNA*. Der Ablauf einer qPCR ist in **Tabelle 4** zusammengefasst.

Tabelle 4: PCR-Protokoll für SYBR® Green.

Schritt	Temperatur in °C	Zeit in min	Anzahl an Zyklen
Initiale Denaturierung	95	10	1
Denaturierung	95	1	40
Primerhybridisierung und Elongation	60	0,25	
Schmelzkurvenanalyse	60 – 90 (0,05/s)	10	1

Die Verwendung von SYBR® Green kann dazu führen, dass sich der Farbstoff während des Ablaufs der qPCR auch in unspezifische *dsDNA*-Abschnitte oder in Primerdimere, welche insbesondere bei der Verwendung von erhöhten Primerkonzentrationen auftreten können, einlagert. Während der Schmelzkurvenanalyse wird die Probe erhitzt und die *dsDNA* bei einer bestimmten Temperatur in Einzelstrang-DNA denaturiert, wodurch sich der Fluoreszenzfarbstoff wieder freisetzt. Durch diesen Vorgang sinkt das Fluoreszenzsignal bei der Temperatur am stärksten, bei der die *dsDNA* nahezu vollständig denaturiert. In der Analyse wird die Schmelzkurve als erste Ableitung des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit des Zyklus dargestellt. In dieser Ableitung gibt der Peak der Kurve den Schmelzpunkt des Amplifikats an. Da sich die Schmelzpunkte spezifischer DNA-Abschnitte von Schmelzpunkten unspezifischer DNA-Produkte sowie Primerdimeren unterscheiden, ist mithilfe der Schmelzkurvenanalyse eine Differenzierung amplifizierter spezifischer und unspezifischer DNA-Abschnitte möglich. So konnte für jede Probe überprüft werden, ob es sich bei dem Amplifikationsprodukt tatsächlich um das Zielgen handelt.

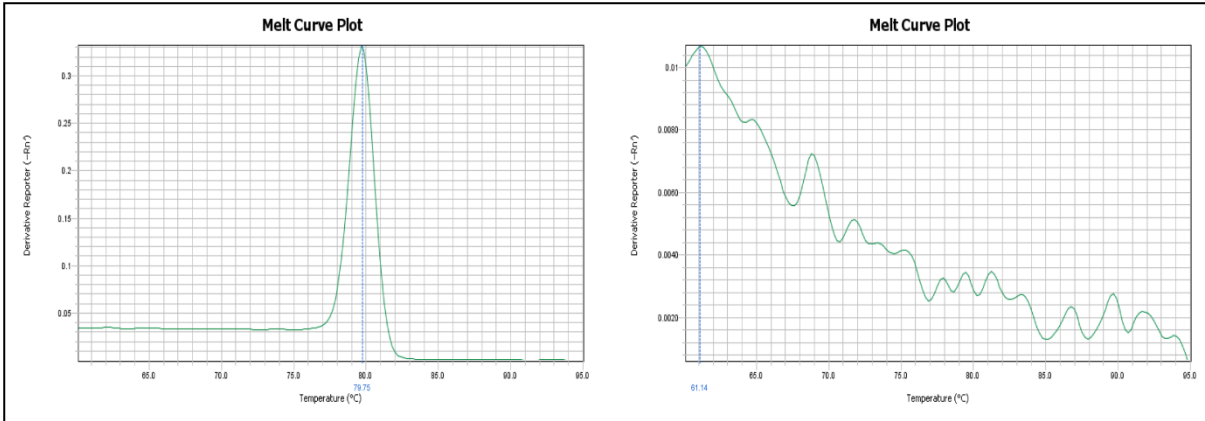


Abbildung 10: Beispiel einer Schmelzkurvenanalyse. Der linke Graph zeigt die Schmelzkurve des Amplifikats des Zielgens, der rechte Graph die Schmelzkurve der Negativkontrolle.

Für die Durchführung der qPCR mit SYBR[®] Green wurde der *Maxima SYBR[®] Green/ROX qPCR Master Mix (2X)* verwendet, welcher eine *Hot Start Taq DNA-Polymerase* und dNTPs in einem optimierten PCR-Puffer mit ROX-passivem Referenzfarbstoff enthielt.

Jeder Ansatz setzte sich aus 12,5 µl Mastermix, 2,5 µl cDNA, nukleasefreiem Wasser sowie je 1-3 µl Vorwärts- und Rückwärts-Primer (**Tabelle 7**) zu einem 25 µl-Gesamtvolumen zusammen (**Tabelle 5**). Bei den Negativkontrollen wurde anstatt der cDNA nukleasefreies Wasser verwendet.

Tabelle 5: PCR-Ansatz für SYBR[®] Green mit cDNA.

Reagenz	Konzentration	Volumen in µl
Master Mix		12,5
Vorwärts-Primer	100-300 nM	1-3
Rückwärts-Primer	100-300 nM	1-3
cDNA	5 ng/µl	2,5
Nukleasefreies Wasser		auf 25
Totalvolumen		25 µl

Tabelle 6: Auflistung der für die spezifischen Zielgene verwendeten Vorwärts- und Rückwärts-Primer, deren Schmelztemperaturen und der Schmelztemperaturen der Amplifikate.

Gen	Primersequenz (FP / RP) (Sequenz 5' → 3')	Schmelztemp. Amplifikat	Schmelztemp. Primer
DRA	CATCCCCATCGAACTCATCAT / AGACTCATGTTCCCAACCACG	80°C	62 / 64°C
NHE 3	GCGCCTGGAGTCCTTTAAGTC / TGCTATTCCCTCCGCTTCTGTG	82°C	66 / 64°C
CFTR	CAGCTCAAACAACTGGAATCTGAA / GTCTGGCGTCGGAAGGC	80°C	68 / 58°C
ANO1	GGCTCTCCTATCCCTTCTCCC / TTCATAGACTATTGTGCTCCGGG	80°C	68 / 68°C
PAT1	CGAACTTGGTTCCGATGCTC / AGCCATTCACGCACAGGATAC	83°C	60 / 64°C
NHERF 1	CTAAATTCCCAAGACAGCCCC / GCCAAGGAGATGTTGAGGTCC	81°C	64 / 66°C
NHERF 2	TAGTCGATCCTGAGACTGATG / ATTGTCCTTCTCTGAGCCTG	84°C	64 / 62°C
PDZK 1	AGACCGAACTCTCAGCACAGC / CAGTTCCTGGGCCCTCAAG	81°C	66 / 62°C
IKEPP	TTTCATCTCCAGGTGACCC / TGTCTCCGCCACAGGATAT	84°C	62 / 62°C
ZK-18	GTCTCAACGATGCCCTGGAC / TCGGACACCACTCTGCCAT	82°C	64 / 60°C
<i>beta</i> -Aktin	TCATTGCTCCTCCTGAGCG / CGTACTCCTGCTTGCTGATCC	83°C	60 / 66°C
Villin	AGTCCCCCATCTTCCAACAAC / ACCTGTTCCACCTTAGCCACA	82°C	64 / 64°C

Bei der Verwendung von SYBR[®] Green ist die Bestimmung der optimalen Primerkonzentration und der Primereffizienz notwendig, um einerseits eine maximale Effizienz der Amplifikationsrate zu erhalten und andererseits die Primer der jeweiligen Gene in ihrer Effizienz untereinander gut vergleichen zu können. Die Bestimmung der optimalen Primerkonzentration und der Primereffizienz erfolgte an bakterieller Plasmid-DNA, die zunächst isoliert werden musste.

3.5.3.1 Anzüchten von Bakterienkulturen und Isolation der Plasmid-DNA

Zunächst wurden kommerziell erworbene Klone (*Source Bioscience, Nottingham, United Kingdom*) in Form transformierter *Escherichia coli*-Stocks, die jeweils die DNA-Zielsequenz enthielten, angezüchtet. Die verwendeten Klone sind in **Tabelle 8** aufgelistet. Dazu wurden die Bakterien in *Lysogeny Broth* (LB)-Medium, welches zur Selektion der Bakterienstämme mit Ampicillin bzw. Kanamycin versetzt worden war, über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 37°C und 180 rpm kultiviert. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers mithilfe des *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I* (*peqlab, Erlangen, Deutschland*). Nach erfolgter Isolation der Plasmid-DNA wurde die Konzentration am Nanophotometer gemessen und die *A260/A280*-Ratio zur Kontrolle der Reinheit bestimmt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA 1:1000 verdünnt.

3.5.3.2 Optimierung der Primkonzentration und Bestimmung der Primereffizienz

Die Optimierung der Primerkonzentration erfolgte durch Verwendung von Konzentrationen im Bereich von 100 nM, 200 nM und 300 nM für Vorwärts- und Rückwärts-Primer. Insgesamt wurden also neun mögliche Kombinationen der Primerkonzentration getestet (**Tabelle 7**).

Tabelle 7: Schema zur Optimierung der Primerkonzentration durch Testung verschiedener Konzentrationen für den Vorwärts- und Rückwärts-Primer.

Rückwärts-Primer	Vorwärts-Primer		
	100 nM	200 nM	300 nM
100 nM	100 / 100	200 / 100	300 / 100
200 nM	100 / 200	200 / 200	300 / 200
300 nM	100 / 300	200 / 300	300 / 300

Tabelle 8: Verwendete bakterielle Klone für die zu untersuchenden Gene.

Gen	Clone Accession / IMAGE ID
DRA	BC139273 / 8862295
NHE3	AK033564 / 5041861
CFTR	CN460318.1 / 30652797
ANO1	BC062959 / 30547439
PAT1	BC028856 / 4165725
NHERF1	BC085141 / 6413140
NHERF2	BC065778 / 3467172
PDZK1	BC013512 / 4234949
IKEPP	BC037630 / 4971283
ZK-18	AK167265.1 / 314094
<i>beta</i> -Aktin	BC138614 / 8861634
Villin	BC145671 / 40130974

Tabelle 9: PCR-Ansatz für SYBR® Green basierte PCR mit Plasmid-DNA.

Reagenz	Konzentration / Menge	Volumen in µl
Master Mix	1 x	12,5
Vorwärts-Primer	100-300 nM	1-3
Rückwärts-Primer	100-300 nM	1-3
Plasmid-DNA	1 ng	1 ng / c (Plasmid-DNA [ng/µl])
Nukleasefreies Wasser		auf 25
Totalvolumen		25

Für die Optimierung der Primerkonzentration wurden die Primer mit einer qPCR unter Verwendung von 1 ng Plasmid-DNA getestet (**Tabelle 9**).

Zur Beurteilung der optimalen Primerkonzentration wurden die CT-Werte der einzelnen Primer-Kombinationen, die Negativkontrollen und die Schmelzkurven betrachtet. Ausgewählt wurden jeweils die Primerkonzentrationen, die in der Auswertung negative NTCs und in der Schmelzkurve nur einen Peak zeigten. Zudem wurde bei Einhaltung dieser Kriterien die Primerkonzentration für ein Gen verwendet, die einen möglichst niedrigen CT-Wert hatte. Die verwendeten Primerkonzentrationen sind in **Tabelle 10** aufgelistet.

Nach Bestimmung der optimalen Primerkonzentration wurde die Effizienz der Primer an einer Verdünnungsreihe der Plasmid-DNA getestet. Die bereits 1.000-fach verdünnte Plasmid-DNA wurde weiter in einer 1:10-fachen Verdünnungsreihe sechsmal verdünnt. Für die Bestimmung der Primereffizienz wurden nach Tabelle 11 PCR-Läufe mit der optimierten Primerkonzentration an 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, 1 pg, 0,1 pg, 0,01 pg sowie 1 fg der Plasmid-DNA durchgeführt (**Abbildung 11**). Anschließend wurden die CT-Werte der einzelnen Plasmid-Verdünnungen in Abhängigkeit von der verwendeten Menge Plasmid-DNA in einfach logarithmischer Darstellung graphisch abgebildet. Mit den Werten wurde eine lineare Funktion gebildet (**Abbildung 12**). Um die Effizienz E der Primer zu bestimmen, wurde die Steigung dieser Funktion in der Formel $E = 10^{(1 / \text{Steigung der Funktion})}$ berücksichtigt.

Die Primereffizienz entspricht dem Faktor, um den die Menge an *dsDNA* in einem PCR-Zyklus vervielfältigt wird. Bei einer Effizienz von 2,00 ist von einer maximalen Primereffizienz auszugehen. In diesem Fall herrschen optimale Bedingungen und die Menge an *dsDNA* würde sich in jedem Zyklus verdoppeln. Aufgrund von Messungenauigkeiten kommt es allerdings auch vor, dass Effizienzen $> 2,00$ gemessen werden. Die errechneten Primereffizienzen sind in **Tabelle 12** aufgelistet.

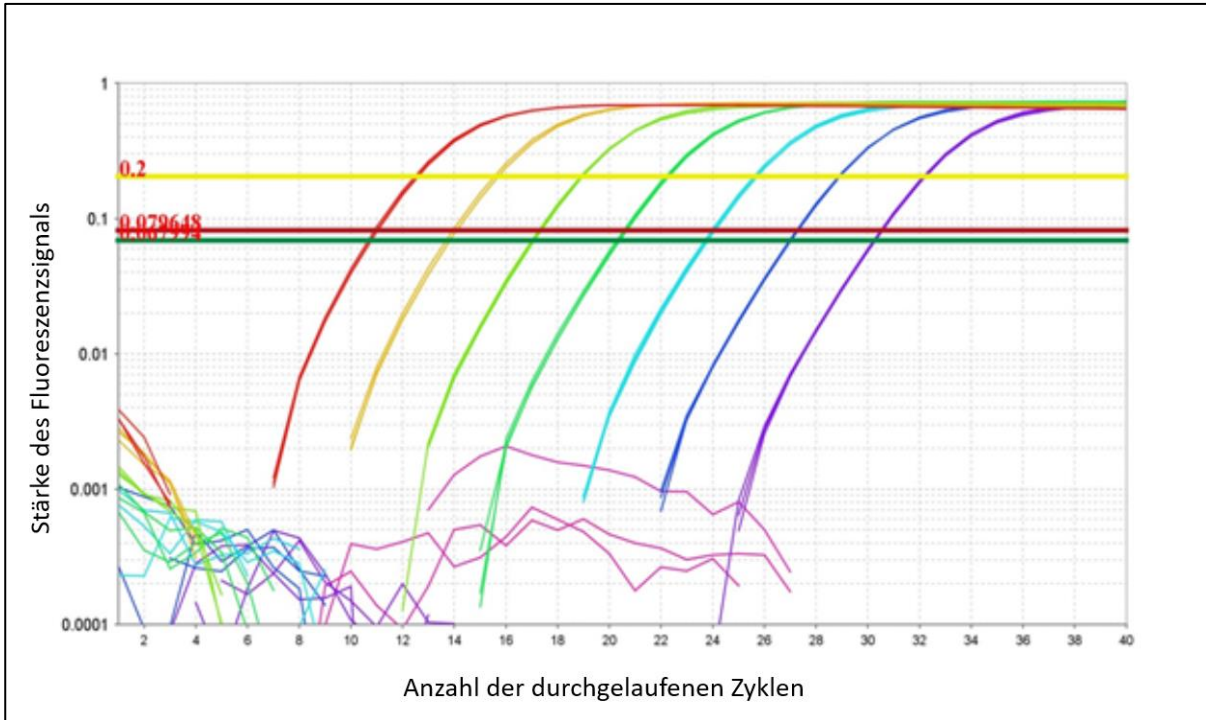


Abbildung 11: Darstellung von Amplifikationskurven einer Plasmid-Verdünnungsreihe.

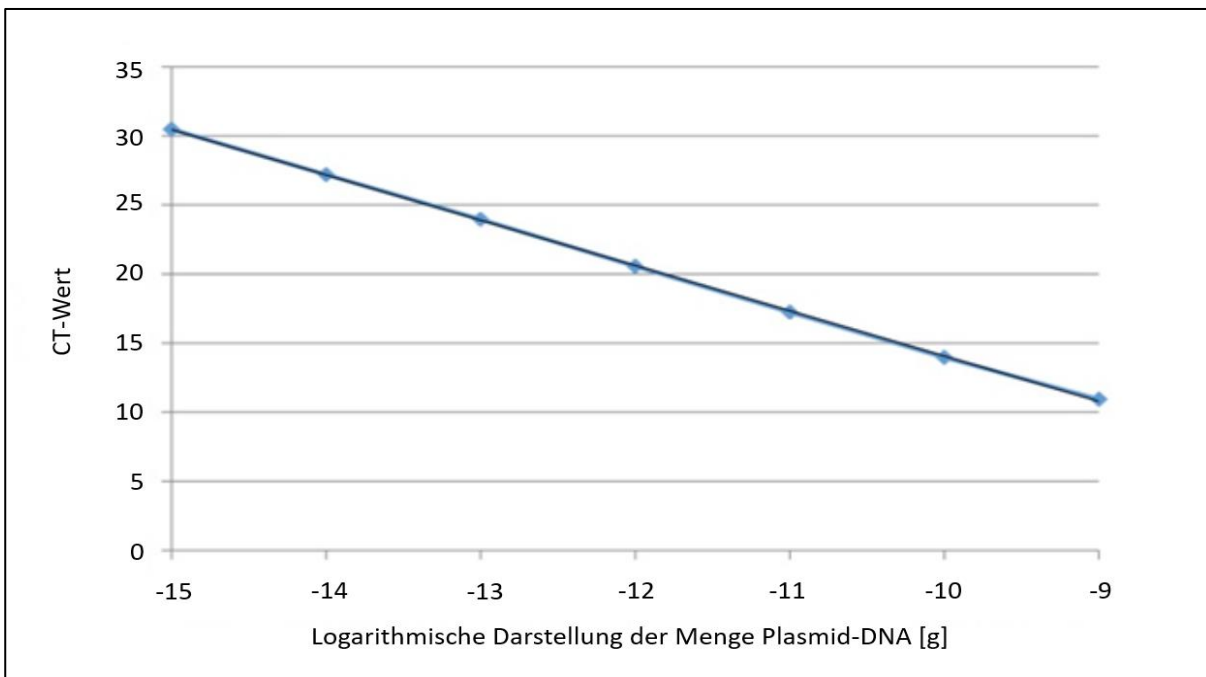


Abbildung 12: Graphische Darstellung der CT-Werte in Abhängigkeit der verwendeten Plasmidmenge (in g) zur Bestimmung der Primereffizienz.

Tabelle 10: Verwendete Primerkonzentration und Primereffizienz.

Gen	Primerkonzentration in nM (FP / RP)	Primereffizienz
DRA	300 / 100	2,07
NHE3	300 / 300	2,03
CFTR	200 / 100	1,94
ANO1	100 / 200	1,90
PAT1	200 / 100	2,04
NHERF1	100 / 100	2,02
NHERF2	200 / 200	2,11
PDZK1	300 / 200	1,99
IKEPP	200 / 200	2,05
ZK-18	200 / 200	1,99
<i>beta</i> -Aktin	300 / 300	2,03
Villin	200 / 300	1,94

3.5.4 Detektion durch TaqMan®

Beim TaqMan®-System werden sequenzspezifische, fluoreszenzmarkierte Sonden eingesetzt. Diese Sonden sind Oligonukleotide und enthalten am 5'-Ende einen Fluoreszenzfarbstoff sowie am 3'-Ende ein Quencher-Molekül, welches aufgrund der Nähe zum Fluoreszenzfarbstoff zu einer Unterdrückung des Fluoreszenzsignals führt. Nach der Denaturierung der *ds*DNA kommt es zu einer sequenzspezifischen Anlagerung der Sonde an die Einzelstrang-DNA und zu einer Elongation durch die *Taq*-DNA-Polymerase. Da diese Polymerase auch eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität besitzt, kommt es zu einer Trennung vom Fluoreszenzfarbstoff und Quencher-Molekül. Dadurch wird das Fluoreszenzsignal nicht mehr unterdrückt und es kann von den optischen Detektoren des Geräts gemessen werden.

Das PCR-Protokoll entsprach dem PCR-Protokoll für SYBR® Green. Allerdings erfolgte am Ende des PCR-Laufs keine Schmelzkurvenanalyse (Tabelle 13).

Tabelle 11: PCR-Protokoll für TaqMan[®]-basierte PCR.

Schritt	Temperatur in °C	Zeit in min	Anzahl an Zyklen
Initiale Denaturierung	95	10	1
Denaturierung	95	0,25	40
Primerhybridisierung und Elongation	60	1	

Tabelle 12: PCR-Ansatz für TaqMan[®]-basierte PCR.

Reagenz	Volumen in µl
TaqMan [®] Universal PCR Master Mix (2x)	6,25
Nukleasefreies Wasser	3,125
cDNA	2,5 (= 15 ng)
TaqMan [®] -Assays	0,625
Totalvolumen	12,5

Tabelle 13: Gene und verwendete TaqMan[®]-Sonden

Gen	TaqMan [®] -Sonde
IGF1-Rezeptor	Mm00802831_m1
GLP2-Rezeptor	Mm01329475_m1
SNX27	Mm01261512_m1
ZK-18	Mm01601704_g1
<i>beta</i> -Aktin	Mm00607939_s1
Villin	Mm00494146_m1

3.6 Statistik

Die Daten wurden mit der Software *IBM SPSS Statistics® Version 22 (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.)* ausgewertet. Es wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ verwendet und p-Werte $< 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Angabe der Standardabweichung aufgeführt. Mittels des Zweistichproben-t-Tests für unabhängige Stichproben wurden die Ergebnisse der WT- und NOD2-Mäuse miteinander verglichen.

4 ERGEBNISSE

In diesem Kapitel wurden die Expressionsdaten der Transport- und Adapterproteine sowie der hormonellen Rezeptoren auf der Längsachse des Darms graphisch veranschaulicht und beschrieben. Das Ausmaß ihrer Expression wurde durch Normierung an die Haushaltsgene, die bereits in **Kapitel 1.5** beschrieben wurden, als $2^{-\Delta CT}$ -Wert (**Kapitel 3.5.2**) dargestellt. Um die Ergebnisse der Transport- und Adapterproteine sowie der hormonellen Rezeptoren besser interpretieren zu können, wurde zunächst die Expression der Haushaltsgene bestimmt.

4.1 Expression der Haushaltsgene entlang der Darmlängsachse

Die Expression der Haushaltsgene wurde mittels SYBR[®] Green und TaqMan[®] bestimmt. Die Ergebnisse erbrachten dabei nahezu gleiche Expressionsprofile für die Haushaltsgene. Daher wurde die Expression der Haushaltsgene exemplarisch nur für SYBR[®] Green dargestellt.

Im Folgenden wurde die Expression der Haushaltsgene durch CT-Werte – also ohne Normierung auf ein Referenzgen – entlang der Längsachse des Darms dargestellt.

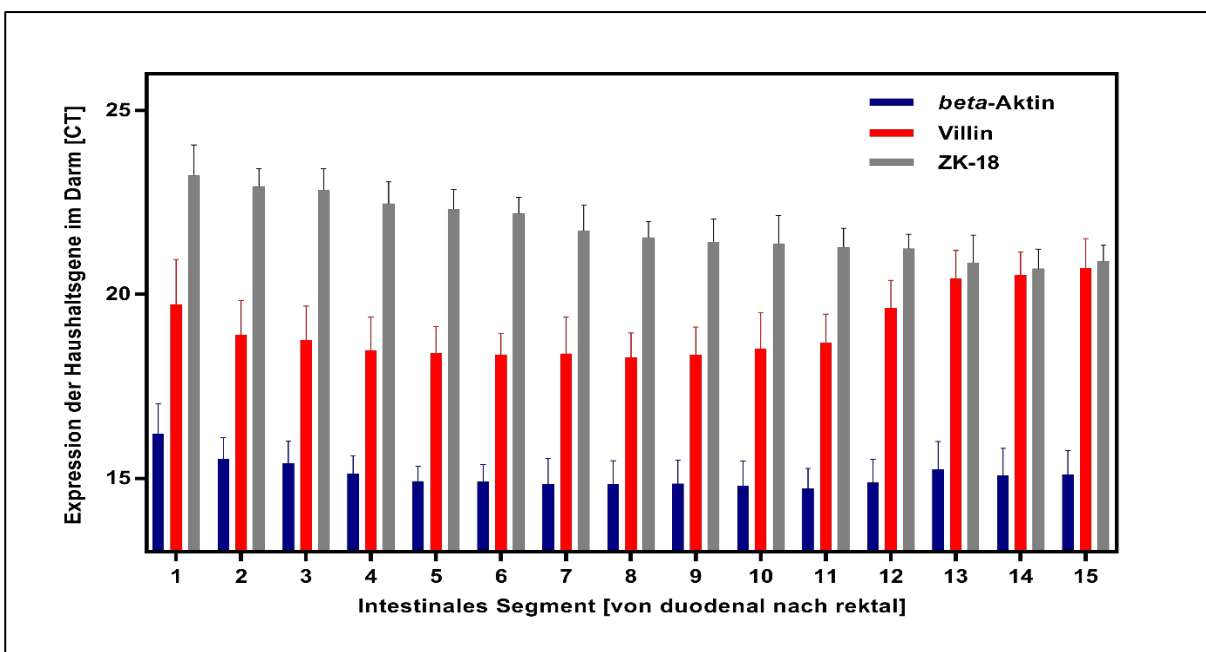


Abbildung 13: Intestinale Genexpression der Haushaltsgene. Das Ausmaß der Expression ist als CT-Wert beschrieben. Die Segmente 1-11 entsprechen dem Dünndarm (Segment 1 = Duodenum, Segmente 2-11 = Jejunum und Ileum) und die Segmente 12-15 dem Dickdarm (Segment 12 = Zökum, Segmente 13-14 = Kolon, Segment 15 = Rektum). MW+SD; n=12 Segmente 2-9 und 11-15, n=7 Segment 10, n=10 Segment 1.

Auf **Abbildung 13** ist zu erkennen, dass *beta*-Aktin von allen Haushaltsgenen am stärksten exprimiert wurde und zugleich die geringste CT-Wert-Schwankung auf der Längsachse von duodenal bis rektal aufwies. Villin zeigte eine starke Expression im Jejunum und Ileum mit einem Abfall der Expression in den Darmabschnitten des Kolons. ZK-18 wurde stärker im Dickdarm exprimiert und zeigte eine zunehmende Abnahme der Expression nach proximal. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde *beta*-Aktin im Folgenden als Haushaltsgen zur Normierung von Villin und ZK-18 verwendet. Um einen Unterschied in der Genexpression von *beta*-Aktin in WT- und NOD2-KO-Mäusen ausschließen zu können, wurden zunächst die CT-Werte von *beta*-Aktin der WT- und der NOD2-KO-Mausgruppe verglichen (**Abbildung 14**).

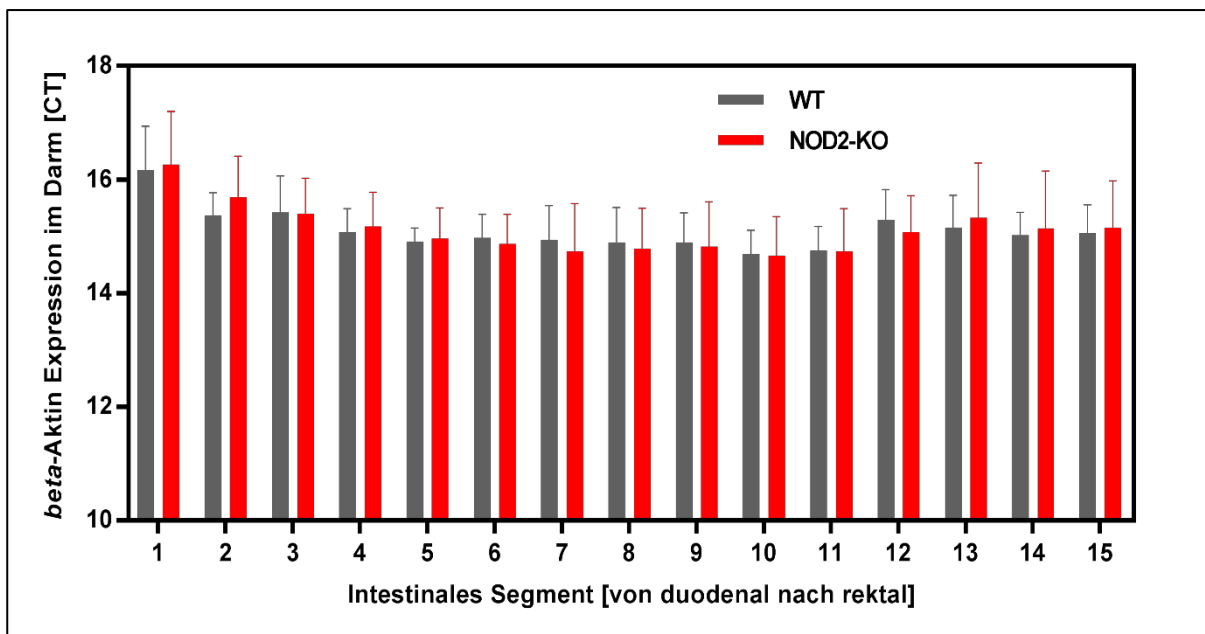


Abbildung 14: Intestinale Genexpression von *beta*-Aktin. Das Ausmaß der Expression ist als CT-Wert beschrieben. Die Segmente 1-11 entsprechen dem Dünndarm (Segment 1 = Duodenum, Segmente 2-11 = Jejunum und Ileum) und die Segmente 12-15 dem Dickdarm (Segment 12 = Zökum, Segmente 13-14 = Kolon, Segment 15 = Rektum). MW+SD; je n=6 für NOD2-KO und WT Segmente 2-9 und 11-15, je n=5 für NOD2-KO und WT Segment 1, n=3 für WT und n=4 für NOD2-KO Segment 10.

Abbildung 14 zeigt eine gleichmäßige Verteilung der *beta*-Aktin-Expression auf der Längsachse des Darms. Es sind keine Unterschiede in der Expression zwischen WT- und NOD2-KO-Mäusen zu erkennen. Auf dieser Grundlage wurde im Folgenden die Expression von Villin und ZK-18 normiert auf *beta*-Aktin dargestellt.

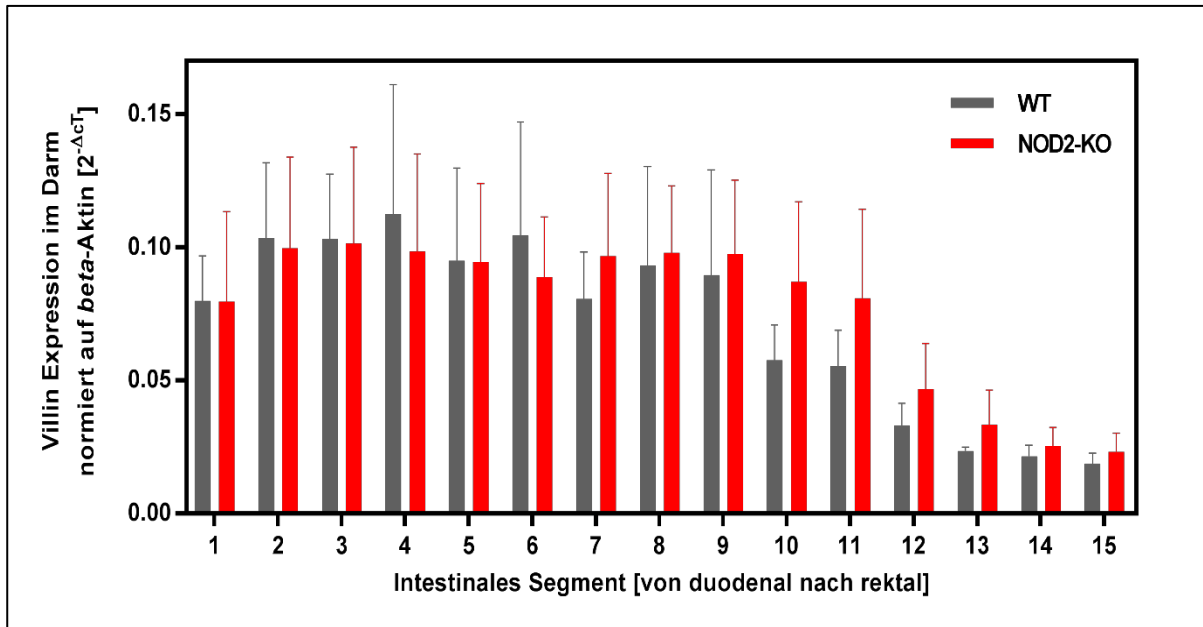


Abbildung 15: Intestinale Genexpression von Villin. Das Ausmaß der Expression ist als $2^{-[\Delta\text{CT-Wert}]}$ beschrieben. Die Segmente 1-11 entsprechen dem Dünndarm (Segment 1 = Duodenum, Segmente 2-11 = Jejunum und Ileum) und die Segmente 12-15 dem Dickdarm (Segment 12 = Zökum, Segmente 13-14 = Kolon, Segment 15 = Rektum). MW+SD; je n=6 für NOD2-KO und WT Segmente 2-9 und 11-15, je n=5 für NOD2-KO und WT Segment 1, n=3 für WT und n=4 für NOD2-KO Segment 10.

Diese Abbildung zeigt deutlich, dass die Expression von Villin im Dünndarm stärker ausgeprägt war als im Dickdarm. Am stärksten war die Genexpression in proximalen Dünndarmabschnitten – das Duodenum ausgenommen. Die Expression nahm nach distal immer weiter ab. Zwischen WT- und NOD2-KO-Mäusen bestanden keine signifikanten Unterschiede in den jeweiligen Darmabschnitten.

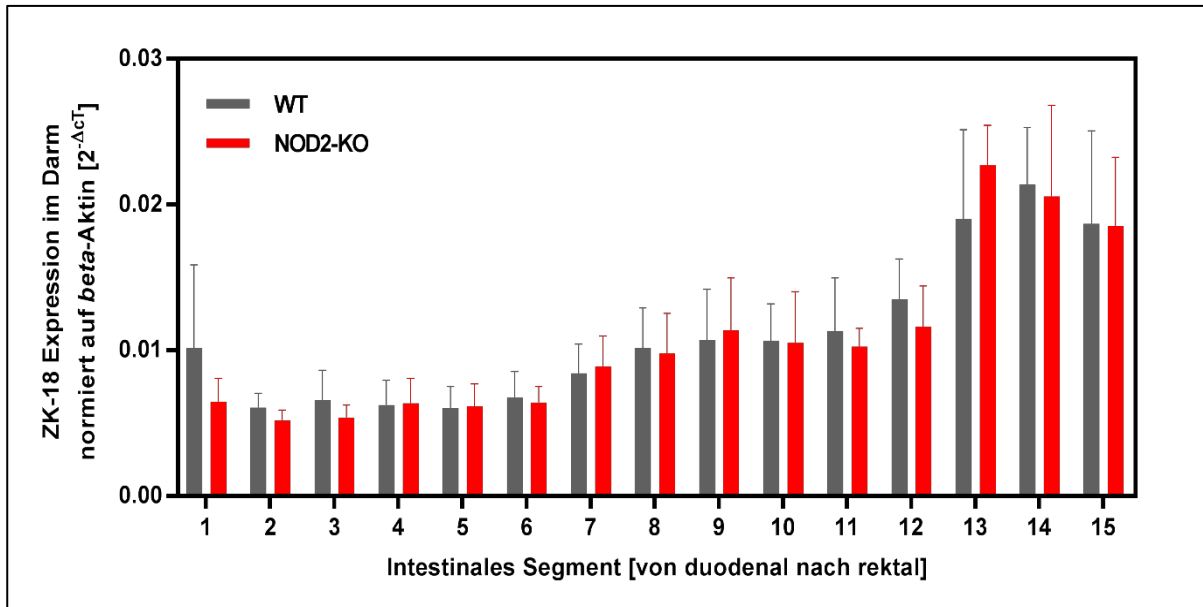


Abbildung 16: Intestinale Genexpression von ZK-18. Das Ausmaß der Expression ist als beschrieben als $2^{-\Delta CT}$ -Wert]. Die Segmente 1-11 entsprechen dem Dünndarm (Segment 1 = Duodenum, Segmente 2-11 = Jejunum und Ileum) und die Segmente 12-15 dem Dickdarm (Segment 12 = Zökum, Segmente 13-14 = Kolon, Segment 15 = Rektum). MW+SD; je n=6 für NOD2-KO und WT Segmente 2-9 und 11-15, je n=5 für NOD2-KO und WT Segment 1, n=3 für WT und n=4 für NOD2-KO Segment 10.

Im Gegensatz zu Villin wurde ZK-18 stärker im Dickdarm als im Dünndarm exprimiert. In proximalen Abschnitten des Dickdarms war die Expression am stärksten. Im Dünndarm nahm die Expression nach proximal ab, wurde allerdings im Duodenum wieder stärker. Zwischen WT- und NOD2-KO-Mäusen zeigten sich auch für ZK-18 keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression der jeweiligen Darmabschnitte.

Zusammenfassend ergaben die Expressionsdaten, dass die Verwendung von *beta*-Aktin als Haushaltsgen aufgrund seiner geringen Schwankung auf der Längsachse des Darms am besten geeignet war, um das Ausmaß der Expression der zu untersuchenden Proteine von proximalen mit distalen Darmabschnitten vergleichen zu können. Darüber hinaus wurden die Zielgene im Dünndarm auf Villin und im Dickdarm auf ZK-18 normiert, um die Genexpression differenzierter betrachten zu können und sie mit epithelzellspezifischen Genen vergleichen zu können.

4.2 Genexpression der Transportproteine entlang der Darmlängsachse

4.2.1 DRA

Die Normierung auf *beta*-Aktin zeigt, dass DRA stark im Dickdarm exprimiert wurde, aber nur gering im Dünndarm (**Abbildung 17A**). Im Dickdarm wurde DRA am stärksten im Zökum exprimiert und am geringsten im proximalen Kolon (**Abbildung 17C**). Im Dünndarm ist ein leichter Anstieg der Expression von distal nach proximal (**Abbildung 17B**) zu erkennen. Im Bereich des Duodenums war die DRA-Expression bei WT-Mäusen tendenziell stärker ausgeprägt als bei NOD2-KO-Mäusen – allerdings ohne Nachweis einer statistischen Signifikanz.

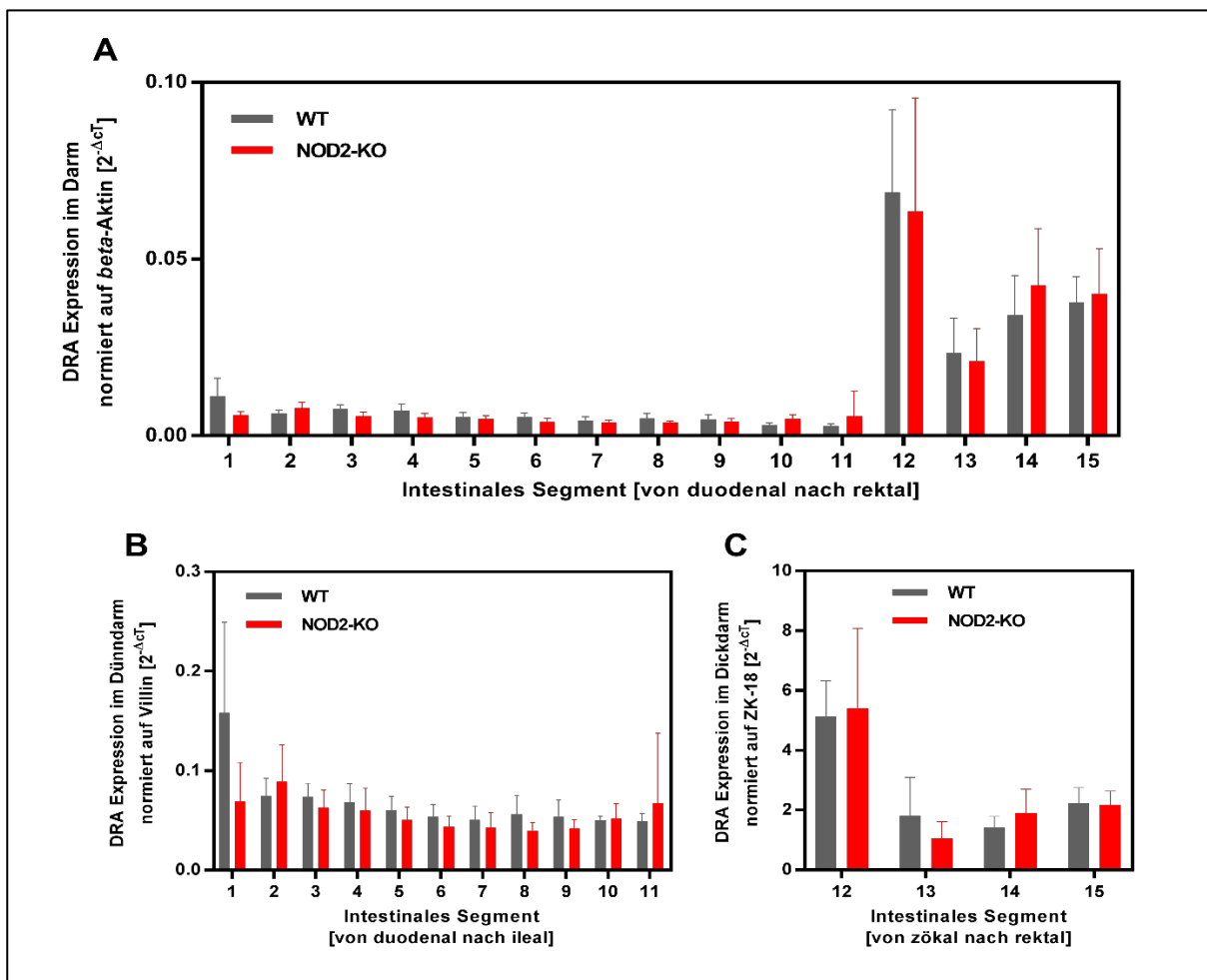


Abbildung 17: Intestinale Genexpression von DRA normiert auf *beta*-Aktin (A), Villin (B) und ZK-18 (C). Die Segmente 1-11 entsprechen dem Dünndarm (Segment 1 = Duodenum, Segmente 2-11 = Jejunum und Ileum) und die Segmente 12-15 dem Dickdarm (Segment 12 = Zökum, Segmente 13-14 = Kolon, Segment 15 = Rektum). MW+SD; je n=6 für NOD2-KO und WT Segmente 2-9 und 11-15, je n=5 für NOD2-KO und WT Segment 1, n=3 für WT und n=4 für NOD2-KO Segment 10.

4.2.2 PAT1

PAT1 wurde stark im Dünndarm und nur minimal im Dickdarm exprimiert (**Abbildung 18A**). Im Dünndarm war die Expression von PAT1 besonders stark im Duodenum sowie Jejunum und wurde nach distal sukzessiv geringer (**Abbildung 18B**). Die Expression war bei WT- und NOD2-KO gleichermaßen ausgeprägt.

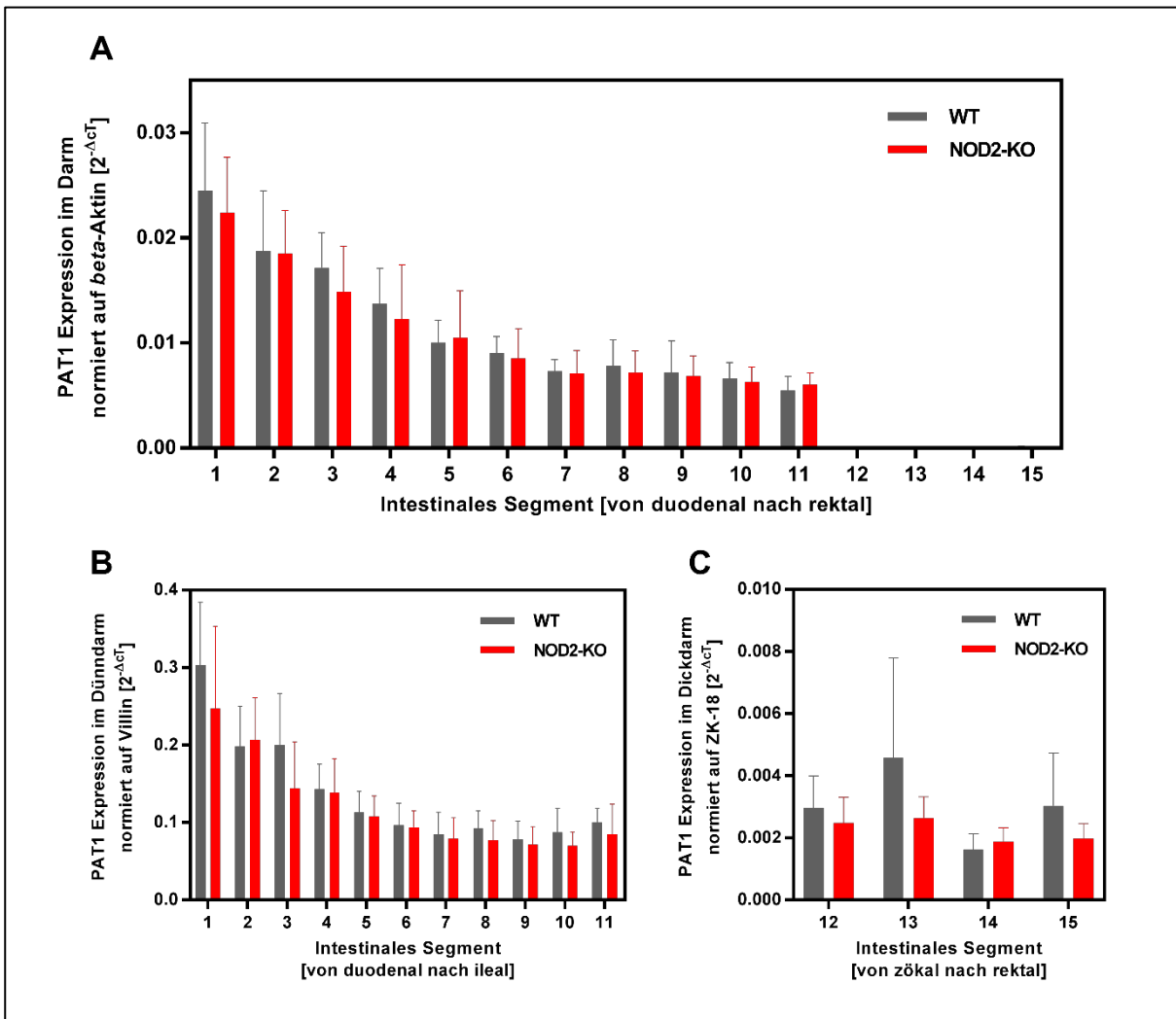


Abbildung 18: Intestinale Genexpression von PAT1 normiert auf *beta*-Aktin (A), Villin (B) und ZK-18 (C). Die Segmente 1-11 entsprechen dem Dünndarm (Segment 1 = Duodenum, Segmente 2-11 = Jejunum und Ileum) und die Segmente 12-15 dem Dickdarm (Segment 12 = Zökum, Segmente 13-14 = Kolon, Segment 15 = Rektum). MW+SD; je n=6 für NOD2-KO und WT Segmente 2-9 und 11-15, je n=5 für NOD2-KO und WT Segment 1, n=3 für WT und n=4 für NOD2-KO Segment 10.

4.2.3 NHE3

NHE3 wurde sowohl im Dünndarm als auch im Dickdarm exprimiert (**Abbildung 19A**). Im Dickdarm zeigte sich eine starke Expression im Kolon, eine geringe im Zökum und im Rektum (**Abbildung 19C**). Im Dünndarm wurde NHE3 vermehrt in den proximalen Bereichen und geringer im Ileum exprimiert (**Abbildung 19B**). Zudem wurde NHE3 im Dickdarm (**Abbildung 19C**) und im proximalen Dünndarm (**Abbildung 19B**) in NOD2-KO-Mäusen stärker exprimiert als in WT-Mäusen. Die Normierung auf *beta*-Aktin zeigte im Duodenum einen signifikanten Unterschied zwischen der WT- und NOD2-KO-Genexpression.

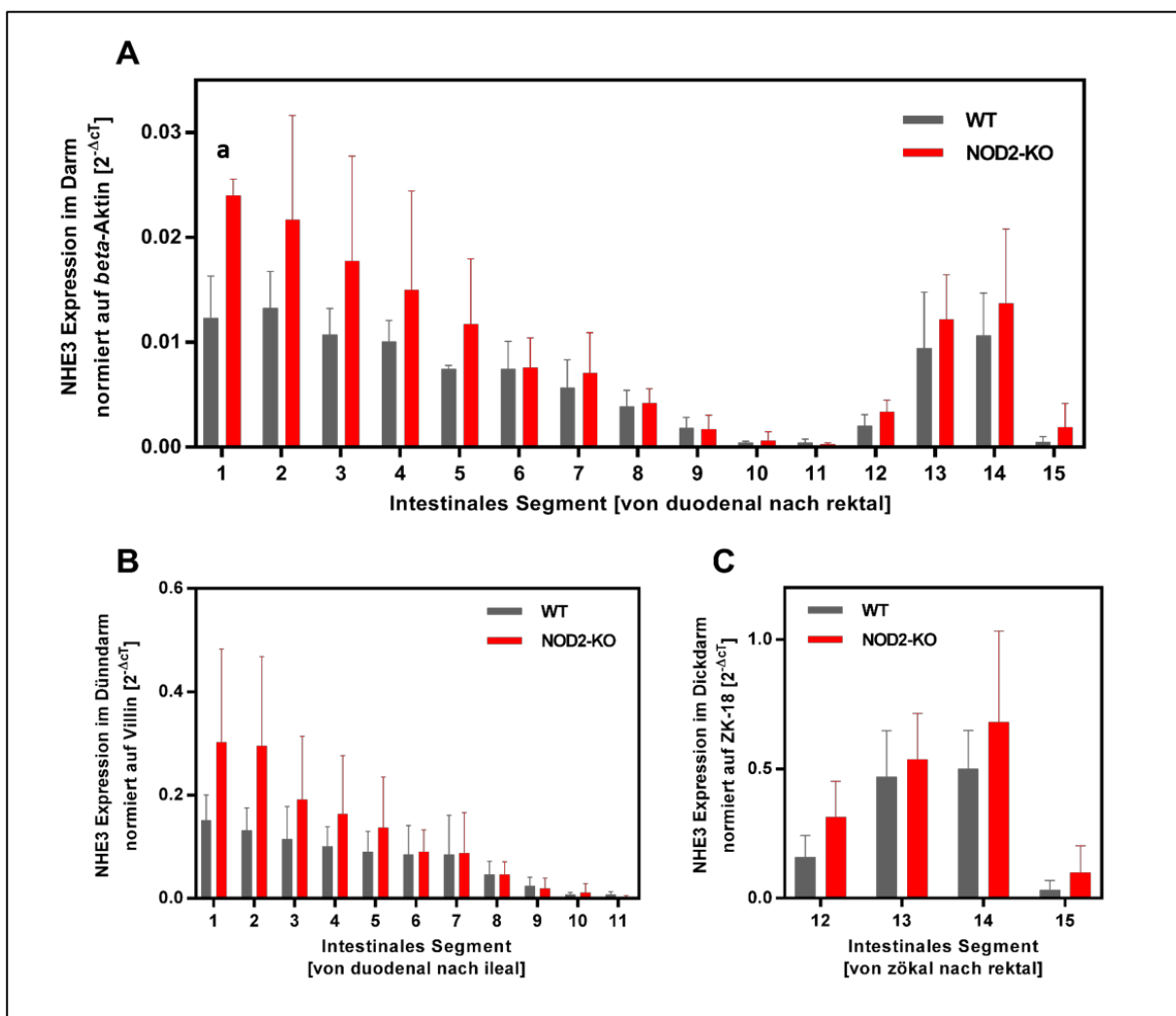


Abbildung 19: Intestinale Genexpression von NHE3 normiert auf *beta*-Aktin (A), Villin (B) und ZK-18 (C). Die Segmente 1-11 entsprechen dem Dünndarm (Segment 1 = Duodenum, Segmente 2-11 = Jejunum und Ileum) und die Segmente 12-15 dem Dickdarm (Segment 12 = Zökum, Segmente 13-14 = Kolon, Segment 15 = Rektum). MW+SD; je n=6 für NOD2-KO und WT Segmente 2-9 und 11-15, je n=5 für NOD2-KO und WT Segment 1, n=3 für WT und n=4 für NOD2-KO Segment 10. (a) p=0,001.

4.2.4 CFTR

CFTR wurde im gesamten Intestinum exprimiert, wobei die Expression in den Segmenten des Dickdarms am stärksten ausgeprägt war (**Abbildung 20A**). Die Normierungen auf *beta*-Aktin und ZK-18 zeigten, dass die Expression im Zökum und im Kolon am stärksten und im Rektum am geringsten war (**Abbildung 20C**). Im Dünndarm wurde CFTR in den distalen Segmenten etwas stärker exprimiert als in den proximalen (**Abbildung 20B**). WT- und NOD2-KO-Mäuse zeigten keine signifikanten Unterschiede in ihrer Expression.

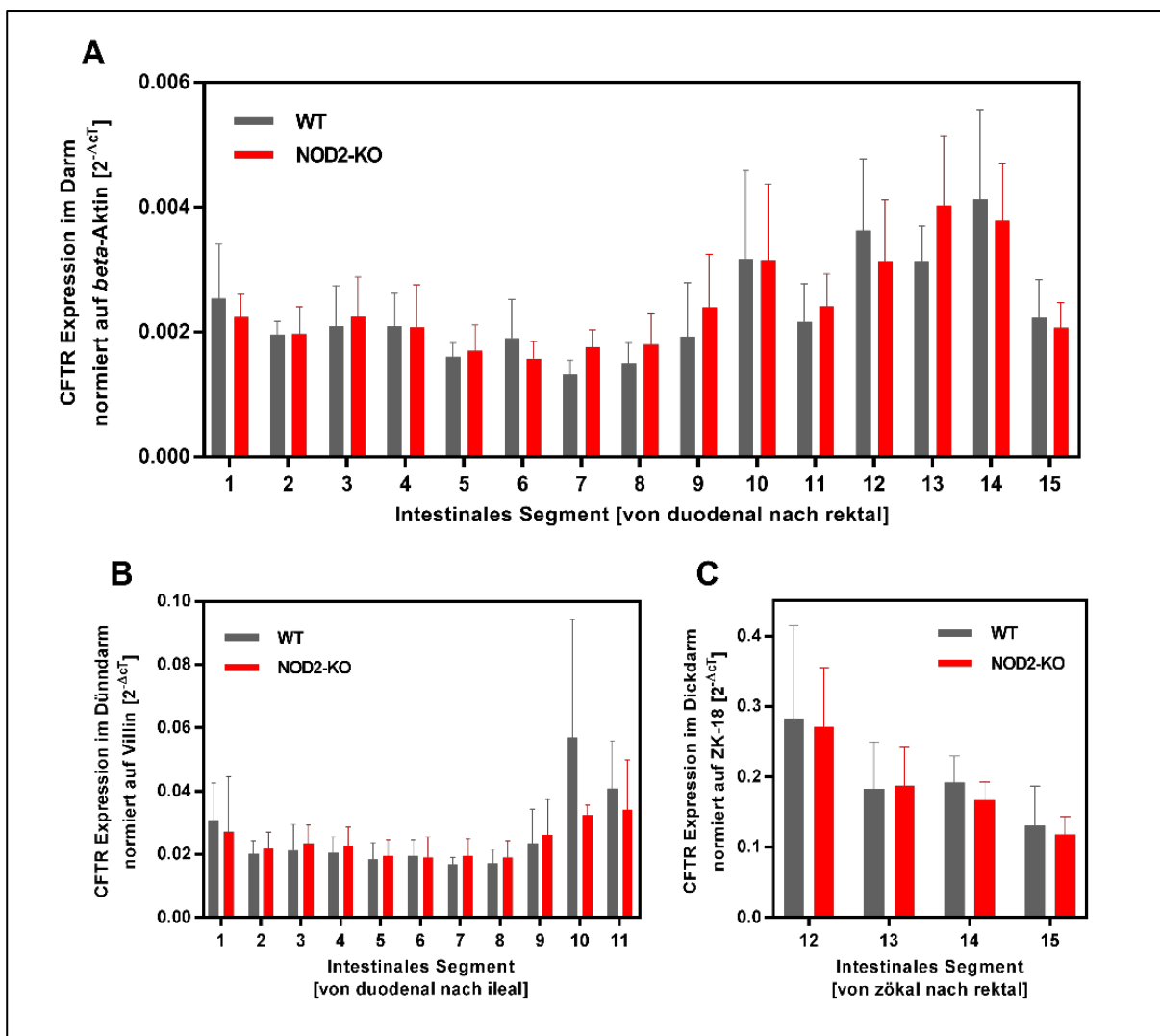


Abbildung 20: Intestinale Genexpression von CFTR normiert auf *beta*-Aktin (A), Villin (B) und ZK-18 (C). Die Segmente 1-11 entsprechen dem Dünndarm (Segment 1 = Duodenum, Segmente 2-11 = Jejunum und Ileum) und die Segmente 12-15 dem Dickdarm (Segment 12 = Zökum, Segmente 13-14 = Kolon, Segment 15 = Rektum). MW+SD; je n=6 für NOD2-KO und WT Segmente 2-9 und 11-15, je n=5 für NOD2-KO und WT Segment 1, n=3 für WT und n=4 für NOD2-KO Segment 10.

4.2.5 ANO1

ANO1 wurde im Intestinum nahezu ausschließlich im Bereich des Kolons und Rektums exprimiert (**Abbildung 21A**). Im Dickdarm war die Expression im Rektum am stärksten und nahm nach proximal weiter ab (**Abbildung 21C**). Es waren keine Unterschiede in der Expression von WT- und NOD2-KO-Mäusen nachzuweisen.

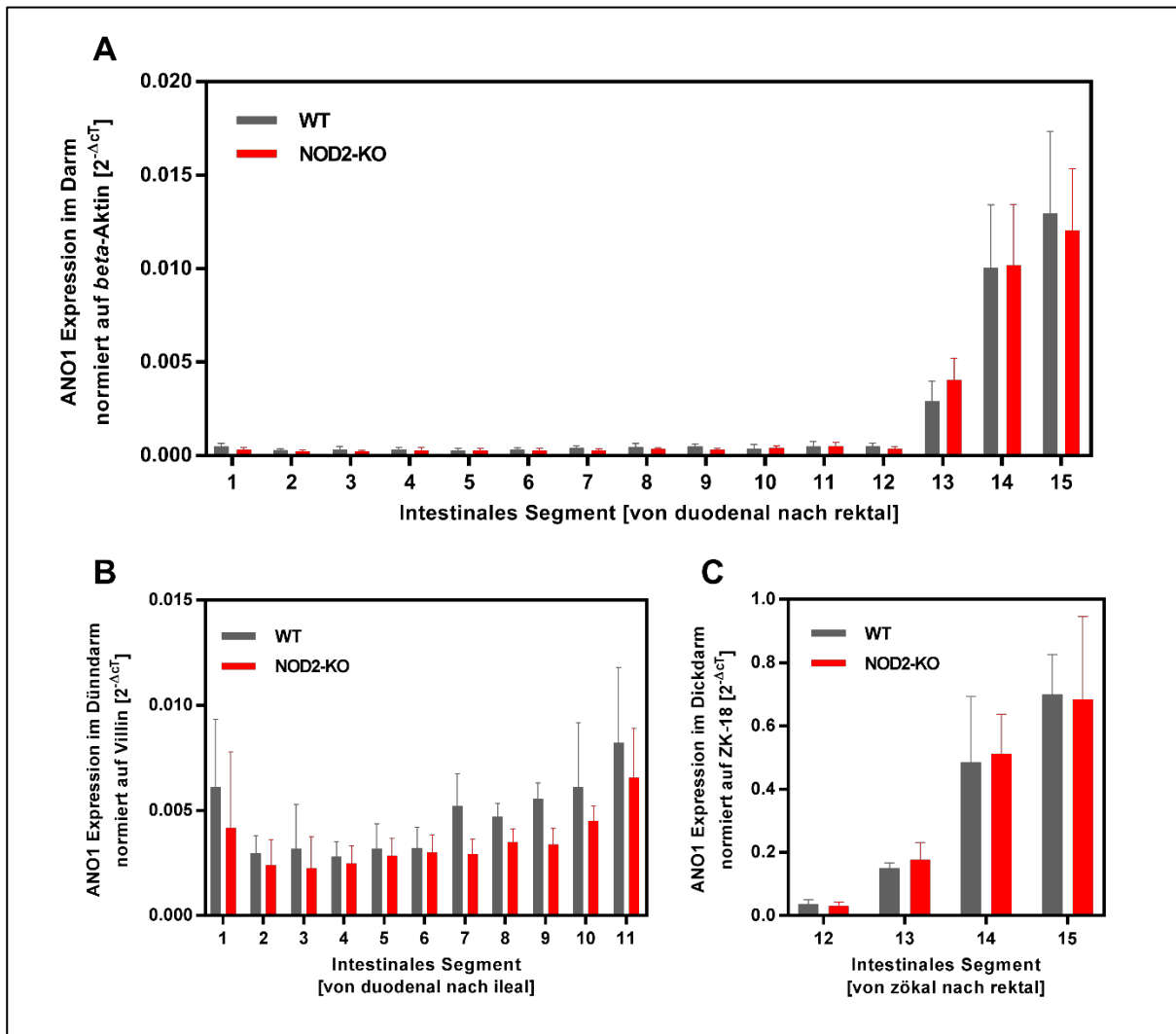


Abbildung 21: Intestinale Genexpression von ANO1 normiert auf *beta*-Aktin (A), Villin (B) und ZK-18 (C). Die Segmente 1-11 entsprechen dem Dünndarm (Segment 1 = Duodenum, Segmente 2-11 = Jejunum und Ileum) und die Segmente 12-15 dem Dickdarm (Segment 12 = Zöcum, Segmente 13-14 = Kolon, Segment 15 = Rektum). MW+SD; je n=6 für NOD2-KO und WT Segmente 2-9 und 11-15, je n=5 für NOD2-KO und WT Segment 1, n=3 für WT und n=4 für NOD2-KO Segment 10.

4.3 Genexpression der Adapterproteine entlang der Darmlängsachse

4.3.1 NHERF1

NHERF1 wurde entlang der gesamten Darmlängsachse exprimiert. Die Expression war im Dünndarm stärker als im Dickdarm (**Abbildung 22A**). In den Segmenten des Dünndarms lag eine etwa gleich ausgeprägte Expression von NHERF1 vor (**Abbildung 22B**). Im Dickdarm nahm die Expression vom Zökum bis zum Rektum weiter ab (**Abbildung 22C**). Es konnte keine signifikant unterschiedliche Expression von NHERF1 in WT und NOD2-KO Mäusen nachgewiesen werden.

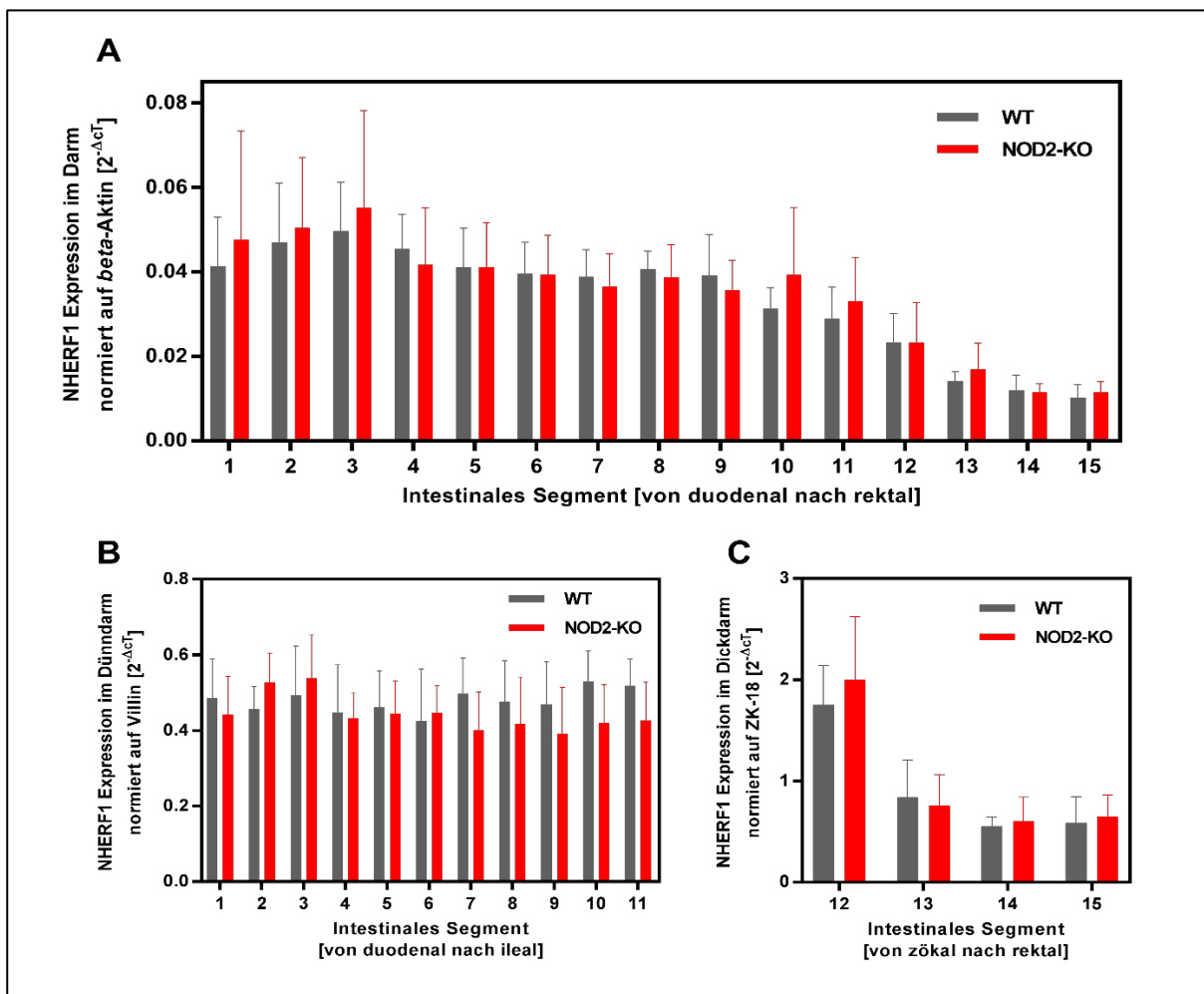


Abbildung 22: Intestinale Genexpression von NHERF1 normiert auf *beta*-Aktin (A), Villin (B) und ZK-18 (C). Die Segmente 1-11 entsprechen dem Dünndarm (Segment 1 = Duodenum, Segmente 2-11 = Jejunum und Ileum) und die Segmente 12-15 dem Dickdarm (Segment 12 = Zökum, Segmente 13-14 = Kolon, Segment 15 = Rektum). MW+SD; je n=6 für NOD2-KO und WT Segmente 2-9 und 11-15, je n=5 für NOD2-KO und WT Segment 1, n=3 für WT und n=4 für NOD2-KO Segment 10.

4.3.2 NHERF2

Im Gegensatz zu NHERF1 wurde NHERF2 stärker im Dickdarm als im Dünndarm exprimiert (**Abbildung 23A**). Im Dickdarm war die Expression im Bereich des proximalen Kolons am stärksten (**Abbildung 23C**). Im Dünndarm nahm die Expression von den proximalen zu den ilealen Darmsegmenten etwas zu (**Abbildung 23B**). Die Expression zeigte bei WT-Mäusen eine ähnliche Verteilung wie bei den NOD2-KO-Mäusen.

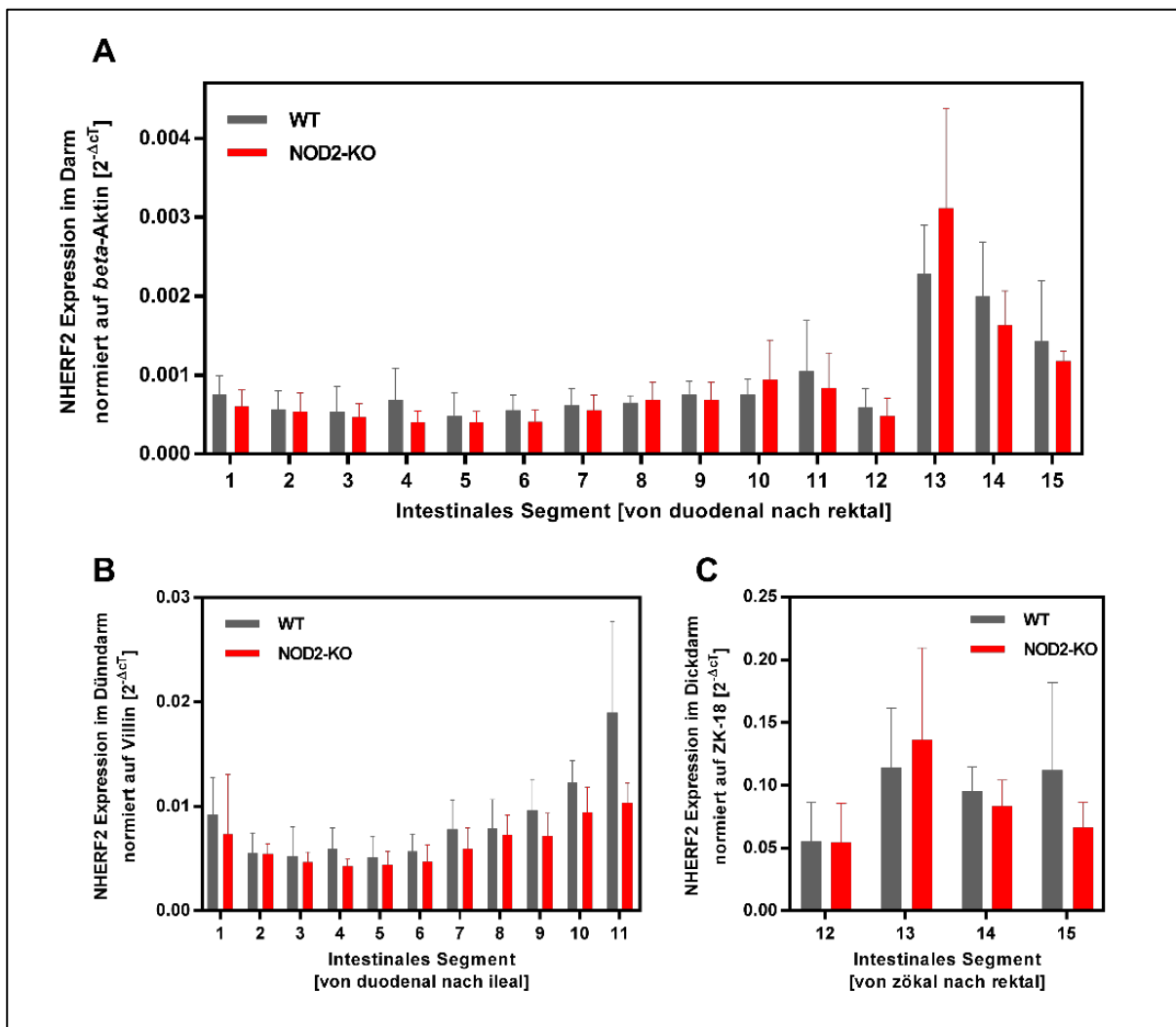


Abbildung 23: Intestinale Genexpression von NHERF2 normiert auf *beta*-Aktin (A), Villin (B) und ZK-18 (C). Die Segmente 1-11 entsprechen dem Dünndarm (Segment 1 = Duodenum, Segmente 2-11 = Jejunum und Ileum) und die Segmente 12-15 dem Dickdarm (Segment 12 = Zökum, Segmente 13-14 = Kolon, Segment 15 = Rektum). MW+SD; je n=6 für NOD2-KO und WT Segmente 2-9 und 11-15, je n=5 für NOD2-KO und WT Segment 1, n=3 für WT und n=4 für NOD2-KO Segment 10.

4.3.3 PDZK1

PDZK1 wurde im Intestinaltrakt insbesondere im Dünndarm exprimiert. Im Dickdarm wurde nur eine minimale Expression detektiert (**Abbildung 24A**). In den Segmenten des Dünndarms zeigte sich eine gleichmäßige Expression von PDZK1 mit etwas stärkerer Expression im proximalen Dünndarm (**Abbildung 24B**). Die Expression war bei WT- und NOD2-KO-Mäusen vergleichbar stark ausgeprägt.

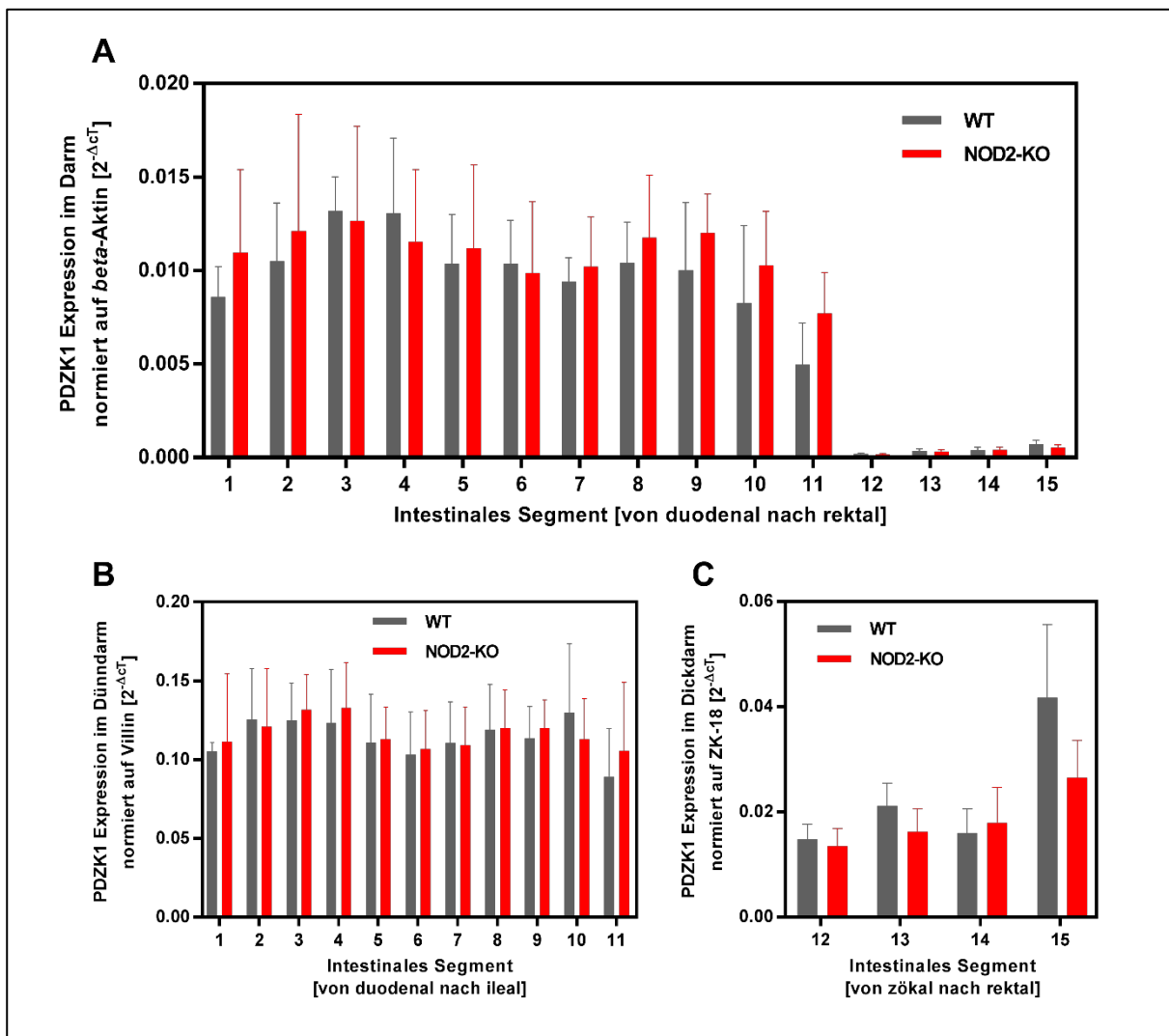


Abbildung 24: Intestinale Genexpression von PDZK1 normiert auf *beta*-Aktin (A), Villin (B) und ZK-18 (C). Die Segmente 1-11 entsprechen dem Dünndarm (Segment 1 = Duodenum, Segmente 2-11 = Jejunum und Ileum) und die Segmente 12-15 dem Dickdarm (Segment 12 = Zökum, Segmente 13-14 = Kolon, Segment 15 = Rektum). MW+SD; je n=6 für NOD2-KO und WT Segmente 2-9 und 11-15, je n=5 für NOD2-KO und WT Segment 1, n=3 für WT und n=4 für NOD2-KO Segment 10.

4.3.4 IKEPP

IKEPP wurde im gesamten Intestinum exprimiert. Die Expression war im Dünndarm stärker als im Dickdarm (**Abbildung 25A**). Im Dünndarm zeigte die Normierung auf Villin eine gleichmäßige Verteilung der Expression auf der Längsachse mit einem Anstieg in den distalen Segmenten bei den WT-Mäusen (**Abbildung 25B**). In diesen Segmenten bestanden allerdings keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression der WT- und NOD2-KO-Mäuse. Im Dickdarm nahm die Expression von zökal nach rektal ab (**Abbildungen 25A und 25C**).

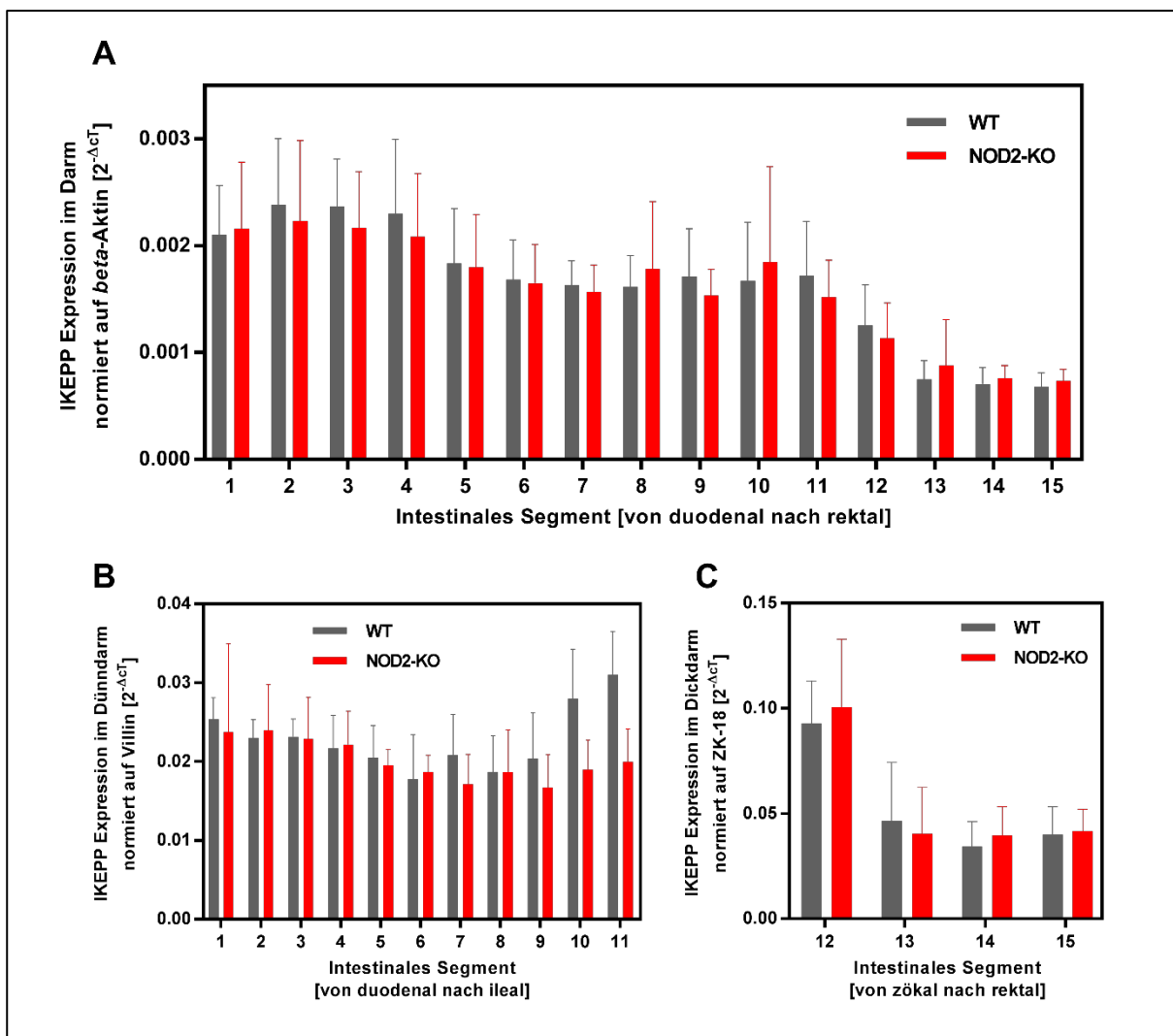


Abbildung 25: Intestinale Genexpression von IKEPP normiert auf *beta*-Aktin (A), Villin (B) und ZK-18 (C). Die Segmente 1-11 entsprechen dem Dünndarm (Segment 1 = Duodenum, Segmente 2-11 = Jejunum und Ileum) und die Segmente 12-15 dem Dickdarm (Segment 12 = Zökum, Segmente 13-14 = Kolon, Segment 15 = Rektum). MW+SD; je n=6 für NOD2-KO und WT Segmente 2-9 und 11-15, je n=5 für NOD2-KO und WT Segment 1, n=3 für WT und n=4 für NOD2-KO Segment 10.

4.3.5 SNX27

SNX27 wurde im Dünndarm und im Dickdarm exprimiert. Die Normierung auf *beta*-Aktin zeigte, dass die Expression von SNX27 im Dickdarm stärker als im Dünndarm ausgeprägt war (**Abbildung 26A**). Im Dünndarm war die Expression entlang der Längsachse gleichmäßig verteilt (**Abbildung 26B**) und auch im Dickdarm zeigten sich keine relevanten Unterschiede von zökal nach rektal (**Abbildung 26C**). WT- und NOD2-KO-Mäuse zeigten keine relevanten Unterschiede in der Genexpression.

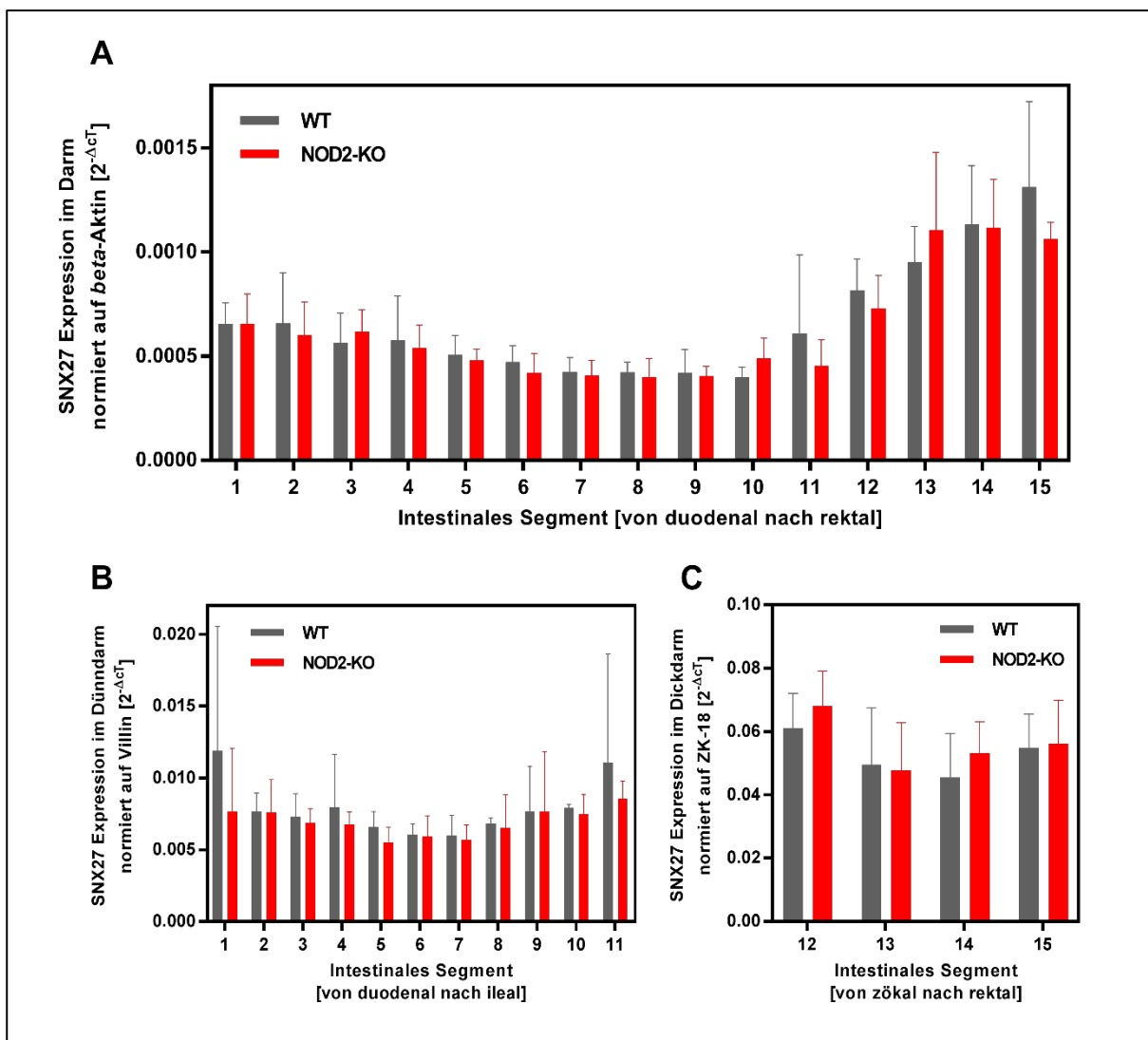


Abbildung 26: Intestinale Genexpression von SNX27 normiert auf *beta*-Aktin (A), Villin (B) und ZK-18 (C). Die Segmente 1-11 entsprechen dem Dünndarm (Segment 1 = Duodenum, Segmente 2-11 = Jejunum und Ileum) und die Segmente 12-15 dem Dickdarm (Segment 12 = Zökum, Segmente 13-14 = Kolon, Segment 15 = Rektum). MW+SD; je n=6 für NOD2-KO und WT Segmente 2-9 und 11-15, je n=5 für NOD2-KO und WT Segment 1, n=3 für WT und n=4 für NOD2-KO Segment 10.

4.4 Genexpression der hormonellen Rezeptoren entlang der Darmlängsachse

4.4.1 IGF1-Rezeptor

Der IGF1-Rezeptor wurde im Dünndarm, noch stärker aber im Dickdarm exprimiert (**Abbildung 27A**). Im Dünndarm zeigte sich ein Anstieg der Expression von proximal nach distal (**Abbildung 27B**). Im Dickdarm war die Expression im Kolon und im Rektum am höchsten (**Abbildungen 27A und 27C**). Der IGF1-Rezeptor wurde in WT-Mäusen stärker exprimiert als in NOD2-Mäusen – allerdings ohne Nachweis einer statistischen Signifikanz.

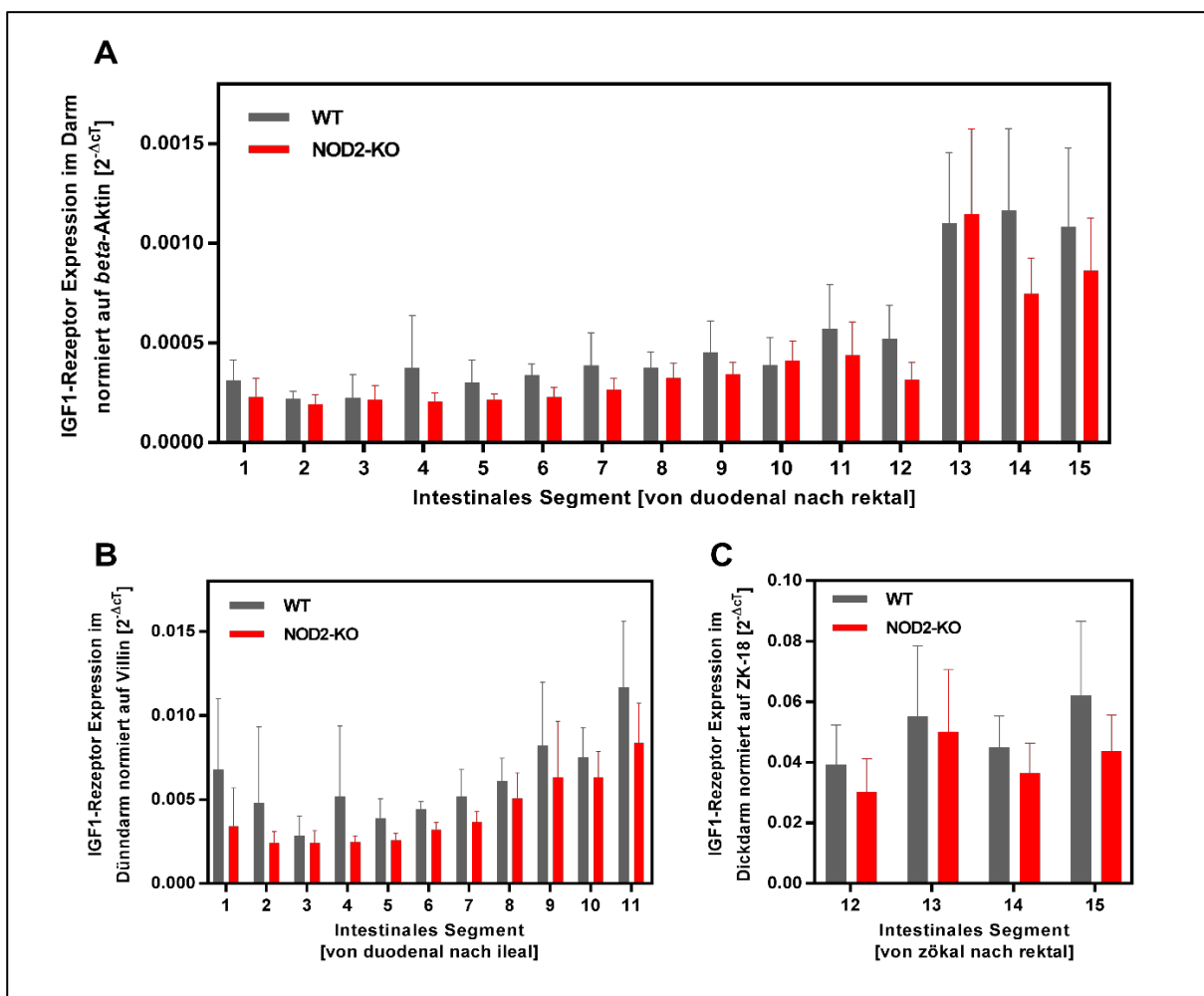


Abbildung 27: Intestinale Genexpression des IGF1-Rezeptors normiert auf *beta*-Aktin (A), Villin (B) und ZK-18 (C). Die Segmente 1-11 entsprechen dem Dünndarm (Segment 1 = Duodenum, Segmente 2-11 = Jejunum und Ileum) und die Segmente 12-15 dem Dickdarm (Segment 12 = Zökum, Segmente 13-14 = Kolon, Segment 15 = Rektum). MW+SD; je n=6 für NOD2-KO und WT Segmente 2-9 und 11-15, je n=5 für NOD2-KO und WT Segment 1, n=3 für WT und n=4 für NOD2-KO Segment 10.

4.4.2 GLP2-Rezeptor

Der GLP2-Rezeptor wurde im Dünndarm und im Dickdarm exprimiert, wobei die Expression im Dickdarm stärker als im Dünndarm war (**Abbildung 28A**). Im Dünndarm war die Expression in den distalen Segmenten etwas stärker ausgeprägt als in den proximalen (**Abbildung 28B**). Alle Normierungen zeigten, dass die Expression des GLP2-Rezeptors in WT-Mäusen stärker als in NOD2-KO-Mäusen ausgeprägt war. Signifikante Unterschiede zwischen WT- und NOD2-KO-Mäusen bestanden bei der Normierung auf *beta*-Aktin in den Segmenten 5, 6, 7 und bei der Normierung auf Villin im Segment 6.

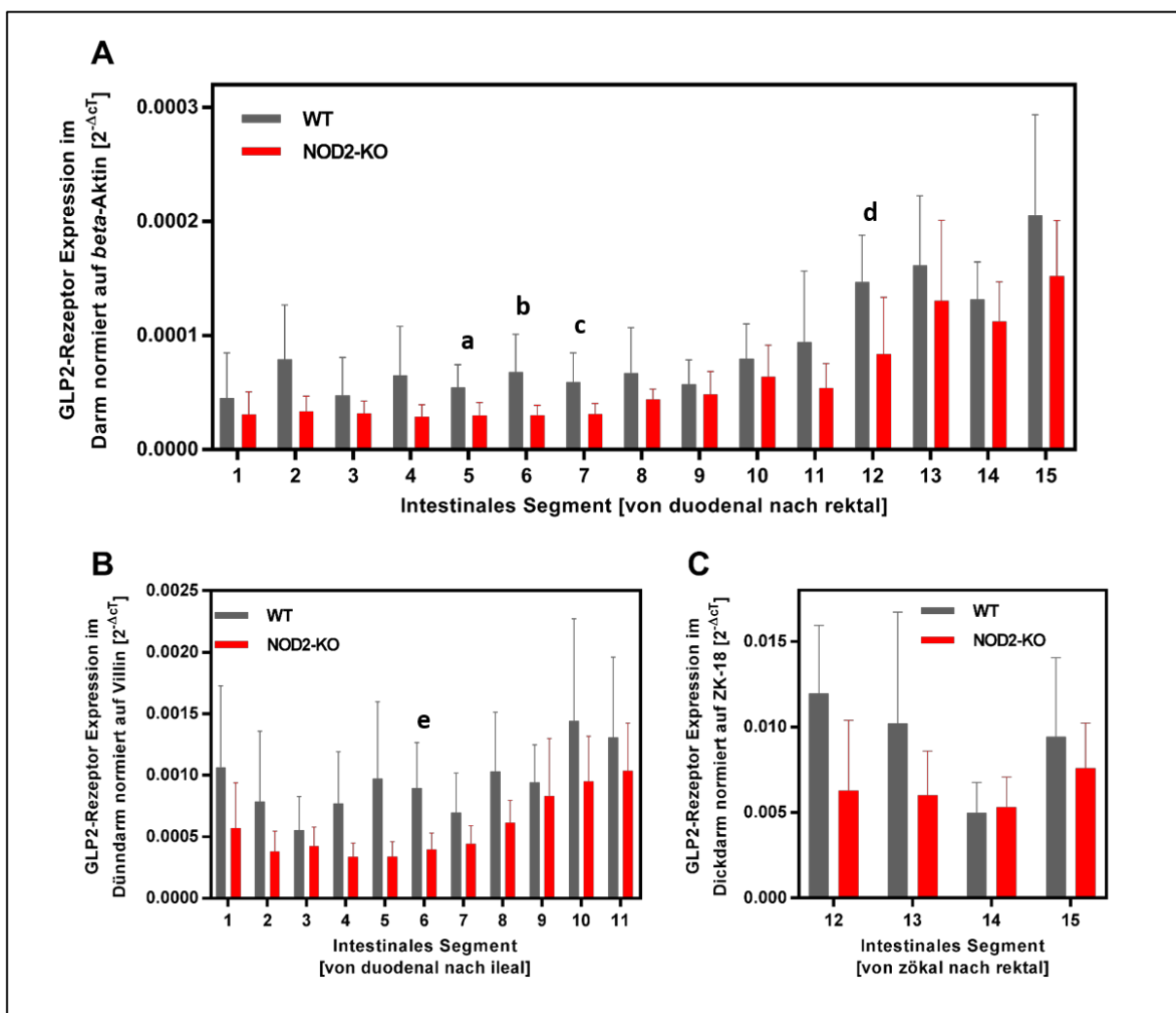


Abbildung 28: Intestinale Genexpression des GLP2-Rezeptors normiert auf *beta*-Aktin (A), Villin (B) und ZK-18 (C). Die Segmente 1-11 entsprechen dem Dünndarm (Segment 1 = Duodenum, Segmente 2-11 = Jejunum und Ileum) und die Segmente 12-15 dem Dickdarm (Segment 12 = Zökum, Segmente 13-14 = Kolon, Segment 15 = Rektum). MW+SD; je n=6 für NOD2-KO und WT Segmente 2-9 und 11-15, je n=5 für NOD2-KO und WT Segment 1, n=3 für WT und n=4 für NOD2-KO Segment 10. (a) p=0,023, (b) p=0,032, (c) p=0,044, (d) p=0,037, (e) p=0,021.

4.5 Zusammenfassende Darstellung der Zielgenexpression entlang der Darmlängsachse

Im Folgenden wurde die Expression der Transport- und Adapterproteine sowie der hormonellen Rezeptoren zusammenfassend dargestellt, um die Ergebnisse entlang der Längsachse des Darms übersichtlich interpretieren zu können. Dafür wurden die Gene zunächst auf *beta*-Aktin normiert. Anschließend wurde der $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Wert mit einem Faktor multipliziert, sodass die jeweils stärkste Expression des Zielgens 1,0 entsprach. Dies ermöglichte eine bessere Vergleichbarkeit der unterschiedlich stark exprimierten Gene in einer Abbildung.

Auf den folgenden Seiten wurde die Genexpression aller Zielgene zusammenfassend durch Kurvendiagramme dargestellt.

Dabei zeigt **Abbildung 29** die intestinale Genexpression der Transportproteine der elektroneutralen NaCl-Resorption (**A**) – DRA, PAT1 und NHE3 – sowie die Genexpression der Transporter der elektrogenen Chloridsekretion (**B**) – CFTR und ANO1.

Die **Abbildung 30** stellt die intestinale Genexpression der Adapterproteine NHERF1, NHERF2, PDZK1, IKEPP und SNX27 (**A**) sowie der hormonellen Rezeptoren von IGF1 und GLP2 (**B**) übersichtlich dar. Um eine übersichtliche Darstellung zu gewährleisten, wurden für den Vergleich der Adapterproteine nur Expressionsdaten von WT-Mäusen verwendet.

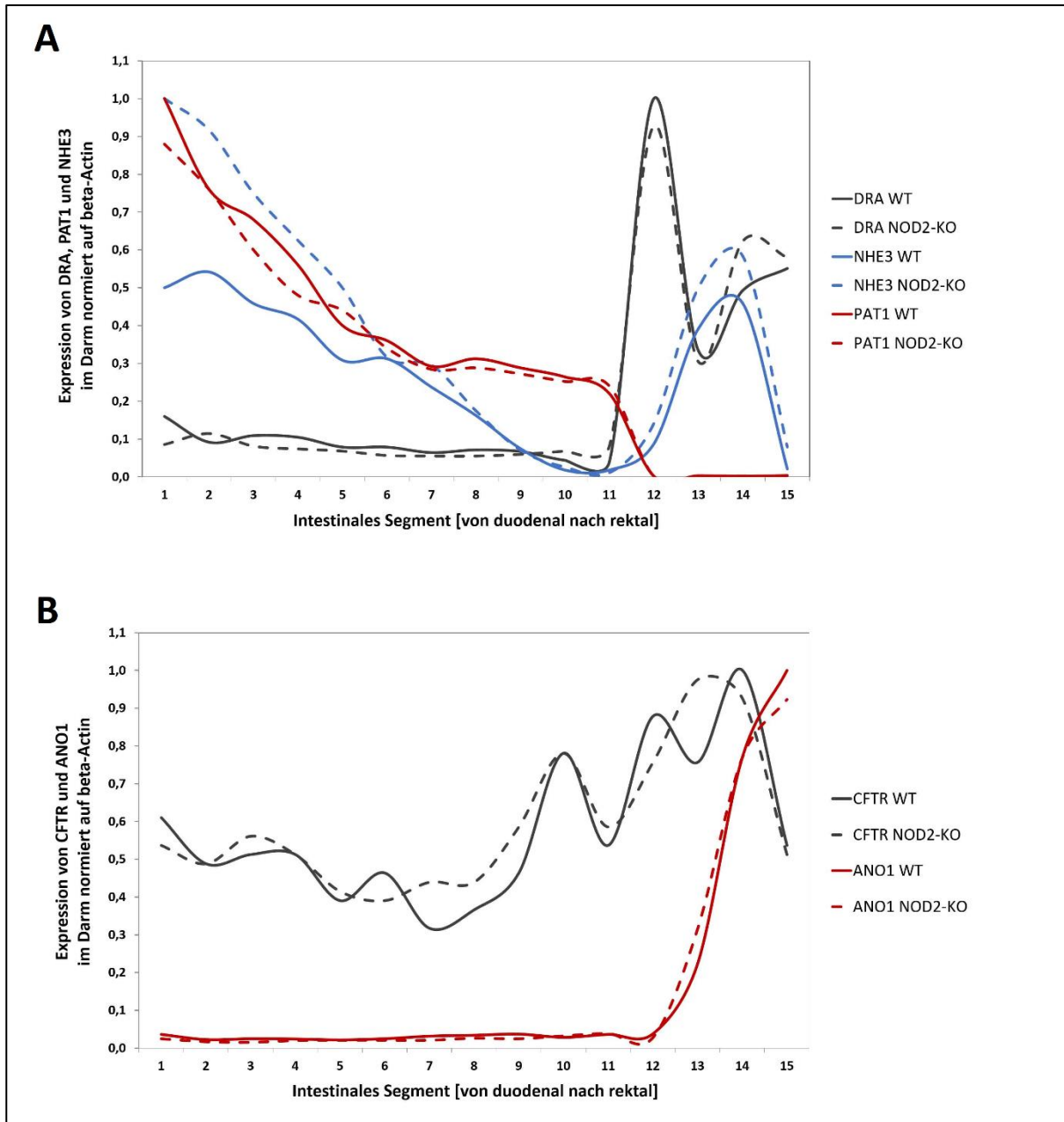


Abbildung 29: Intestinale Genexpression der Transportproteine (Transporter der elektroneutralen NaCl-Resorption [A] und der elektrogenen Cl-Sekretion [B]) normiert auf *beta*-Aktin. Die Segmente 1-11 entsprechen dem Dünndarm (Segment 1 = Duodenum, Segmente 2-11 = Jejunum und Ileum) und die Segmente 12-15 dem Dickdarm (Segment 12 = Zökum, Segmente 13-14 = Kolon, Segment 15 = Rektum). MW+SD; je n=6 für NOD2-KO und WT Segmente 2-9 und 11-15, je n=5 für NOD2-KO und WT Segment 1, n=3 für WT und n=4 für NOD2-KO Segment 10.

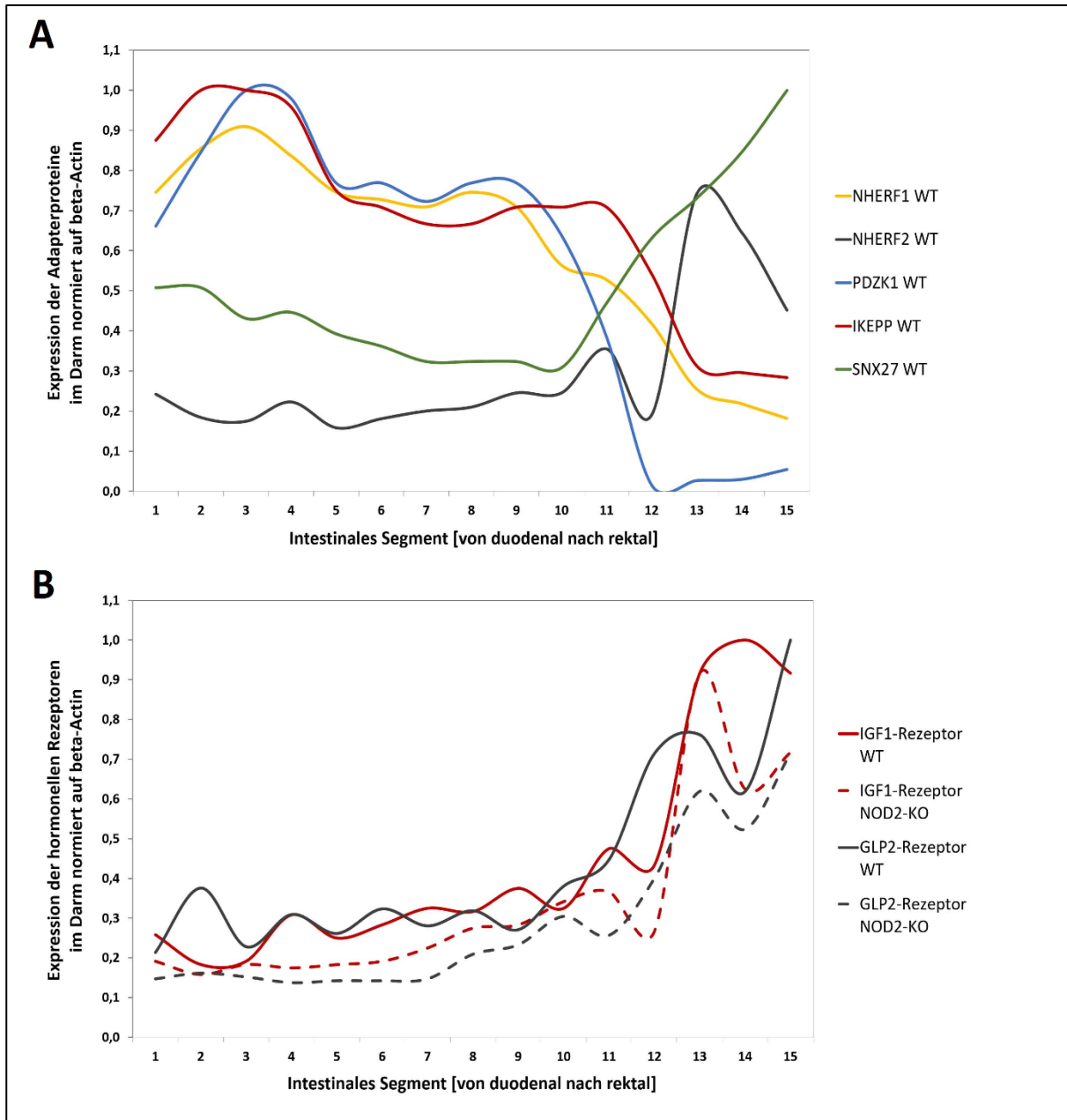


Abbildung 30: Intestinale Genexpression der Adapterproteine [A] und der hormonellen Rezeptoren [B] normiert auf *beta*-Aktin. Die Segmente 1-11 entsprechen dem Dünndarm (Segment 1 = Duodenum, Segmente 2-11 = Jejunum und Ileum) und die Segmente 12-15 dem Dickdarm (Segment 12 = Zökum, Segmente 13-14 = Kolon, Segment 15 = Rektum). MW+SD; je n=6 für NOD2-KO und WT Segmente 2-9 und 11-15, je n=5 für NOD2-KO und WT Segment 1, n=3 für WT und n=4 für NOD2-KO Segment 10.

5 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Transport- und Adapterproteinen sowie hormonellen Rezeptoren in der Darmwand der Maus untersucht. Um das Ausmaß der Expression in den jeweiligen Darmabschnitten zu messen, wurde die qPCR als Methode verwendet. In der Diskussion wurde zunächst auf die Vor- und Nachteile dieser Methode eingegangen. Anschließend wurden die Haushaltsgene, die für die Bestimmung der relativen Genexpression der Zielgene untersucht wurden, miteinander verglichen. Die gemessenen Ergebnisse der Zielgene wurden darüber hinaus bereits bestehenden Expressions- und immunhistologischen Studien gegenübergestellt, um Ähnlichkeiten oder Differenzen aufzuzeigen. Zuletzt wurden die gemessenen Ergebnisse funktionell interpretiert und in einen klinischen Bezug gestellt.

5.1 qPCR: Vor- und Nachteile der Methodik

Mithilfe der qPCR können Nukleinsäuresequenzen in Echtzeit nachgewiesen und quantifiziert werden. Die qPCR ist für den Nachweis der gesuchten Gensequenz sowohl ein sehr sensitives als auch ein spezifisches Untersuchungsverfahren. Im Gegensatz zu anderen PCR-Methoden ist mit der qPCR eine Quantifizierung der gesuchten Gensequenz möglich. Die Normierung des Zielgens auf das Referenzgen erlaubt die quantitative Messung der Genexpression.

Allerdings ist die Aussagekraft der gemessenen PCR-Ergebnisse begrenzt. Funktionell gesehen sind für die Physiologie bzw. Pathophysiologie der intestinalen Ionentransportprozesse die Transportproteine, die an der apikalen Seite der Epithelzelle lokalisiert sind, von entscheidender Bedeutung, da sie den Ionen- und Wassertransport zwischen dem Darmlumen und der Epithelzelle vermitteln. Für ihre Regulation sind die regulatorischen Adapterproteine von Relevanz, welche speziell in den intestinalen Epithelzellen exprimiert werden. Im Gegensatz zu immunchemischen Methoden und Blotting-Verfahren ist es mit Hilfe der qPCR nicht möglich, Proteine direkt nachzuweisen, sondern lediglich ihre kodierende Gensequenz. Ein Problem kann sich u.a. daraus ergeben, dass nicht die gesamte RNA, die in der qPCR nachgewiesen wird, auch in ein Protein translatiert wird [184] und somit keine funktionelle Bedeutung hätte. Trotzdem ist anzunehmen, dass die starke Expression eines Gens auch zu einer starken funktionellen Aktivität auf Proteinebene führt. Durch die qPCR ist im Gegensatz zu histologischen Untersuchungen eine genaue Lokalisierung der Proteine in der Darmwand sowie eine absolute, optische

Quantifizierung nicht möglich. Durch die Untersuchungsergebnisse kann also nicht genau festgelegt werden, in welchen Zellen der Darmwand das zu untersuchende Protein exprimiert wird und ob es an der apikalen Zellmembran lokalisiert ist.

5.1.1 Verwendung von SYBR[®] Green und TaqMan[®]

Für die Expressionsbestimmung der Transport- und Adapterproteine wurde – mit Ausnahme von SNX27 – SYBR[®] Green verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green lagert sich sequenzunabhängig in *dsDNA*, was zu einer eingeschränkten Spezifität der SYBR[®] Green-Methode führen kann. Bei Kontaminationen der Proben oder durch Auftreten von Primerdimeren kann es daher zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Durch das Durchführen von NTC`s und die Analyse der Schmelzkurven konnten falsch positive Ergebnisse allerdings detektiert und von der Auswertung ausgeschlossen werden. Dies führte zu einer Optimierung der Spezifität. Des Weiteren wurde SYBR[®] Green verwendet, da für einen großen Anteil der zu untersuchenden Proteine keine genspezifischen Sonden zur Verfügung stehen. Für SNX27 wurde SYBR[®] Green nicht verwendet, da es bei diesem Gen stets zu falsch positiven Ergebnissen in den NTC`s kam, die in der Schmelzkurvenanalyse nicht als Primerdimere identifiziert werden konnten.

Neben SNX27 wurde auch die Expression der hormonellen Rezeptoren mittels TaqMan[®] bestimmt. Beim TaqMan[®]-System werden Sonden verwendet, die aufgrund ihrer hohen Spezifität keine falsch positiven Ergebnisse verursachen und auch keiner Primeroptimierung bedürfen. Von der Arbeitsgruppe um *Tajadini et al.* konnte bei einem Vergleich der TaqMan[®]- und SYBR[®] Green-Methode festgestellt werden, dass die Spezifität und Qualität der Ergebnisse beider Methoden unter optimierten Bedingungen für SYBR[®] Green, die in der vorliegenden Arbeit eingehalten wurden, etwa gleich sind [185].

5.2 Vergleich der verwendeten Haushaltsgene

5.2.1 *beta*-Aktin

Wie bereits erwähnt, ist *beta*-Aktin ein zelluläres Strukturprotein, welches ubiquitär exprimiert wird und keinen regulatorischen Schwankungen unterliegt [179]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten deutlich, dass *beta*-Aktin entlang der Längsachse des Darms die geringste CT-Wert-

Schwankung aller Referenzgene aufweist (**Kapitel 4.1.2**). *Beta*-Aktin wurde also am gleichmäßigsten exprimiert. Diese Eigenschaft hat bei der Normierung an *beta*-Aktin den Vorteil, dass die Expression der Dünndarmsegmente mit der Expression der Dickdarmsegmente eines Zielgens gut miteinander verglichen werden kann.

Ein möglicher Nachteil bei der Normierung der Zielgene auf *beta*-Aktin ist die nicht-epithelspezifische Expression. Wie oben beschrieben, ist die basale Expression der Zielgene von entscheidender funktioneller Bedeutung. Ein Problem bei der Bestimmung der Genexpression tritt dann auf, wenn sich in den zu untersuchenden Proben das Verhältnis von Epithelzellen zu Nicht-Epithelzellen verändert. Das ist z.B. dann möglich, wenn die *Tunica muscularis* in den Darmsegmenten unterschiedlich dick ist. In diesem Fall würde die Expression von *beta*-Aktin gleich bleiben, während sich die des Zielgens ändert. Denn die Zielgene – mit Ausnahme des GLP2-Rezeptors – werden vornehmlich epithelial exprimiert. In einem solchen Fall ist die Vergleichbarkeit der Expression der Zielgene erschwert.

Aus diesem Grund wurden die Zielgene zusätzlich an den epithelspezifischen Referenzgenen ZK-18 und Villin normiert. Die Expressionsstärke von ZK-18 und Villin ändert sich bei Änderung des Verhältnisses von Epithelzellen zu Nicht-Epithelzellen in gleicher Weise wie die Expressionsstärke der Zielgene.

5.2.2 ZK-18

ZK-18 wird im Intestinum in den proliferativen Krypten des Dünn- und Dickdarms exprimiert [181]. Die Expressionsdaten von ZK-18 zeigen, dass das Gen wesentlich stärker im Dickdarm als im Dünndarm exprimiert wurde. Im Dünndarm nahm die ZK-18-Expression von ileal nach jejunal weiter ab (**Kapitel 4.1.2**). Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit dem histologischen Aufbau des Darms, da die Tiefe und Dichte der Krypten von distal nach proximal abnimmt [2]. ZK-18 wurde deshalb nicht als Normierungsgen für den Vergleich von Dickdarm- und Dünndarmsegmenten eingesetzt. Dennoch ist ZK-18 einerseits wegen seiner epithelspezifischen und andererseits aufgrund seiner starken Expression im Dickdarm gut dafür geeignet, die Expression eines Zielgens innerhalb der Dickdarmsegmente zu vergleichen.

5.2.3 Villin

Villin wird intestinal in den Epithelzellen der Krypten und Zotten exprimiert, wobei die Villinproduktion in den Epithelien der Zotten stärker ist. Das Maximum der Villinproduktion wird in

den Epithelzellen der Zottenbasis erreicht [183]. Die Expressionsdaten von Villin demonstrieren einerseits, dass Villin im Dünndarm deutlich stärker exprimiert wurde als im Dickdarm und andererseits, dass die Expression von ileal nach jejunal leicht zunahm (**Kapitel 4.1.2**). Die Ergebnisse passen mit dem histologischen Aufbau des Darms zusammen, da einerseits im Dickdarm keine Villi vorhanden sind und andererseits die Villushöhe von ileal nach jejunal zunimmt [2]. Wie ZK-18 kann Villin aufgrund seiner unterschiedlich starken Ausprägung auf der Längsachse des Darms nicht als Normierungsgen für den Vergleich der Expression eines Zielgens zwischen Dickdarm- und Dünndarmsegmenten eingesetzt werden. Allerdings eignet es sich aufgrund seiner epithelspezifischen und hohen Expression im Dünndarm gut dafür, die Expression der Zielgene innerhalb der Dünndarmsegmente miteinander zu vergleichen.

5.3 Vergleich der Ergebnisse mit Expressions- und immunhistologischen Studien

5.3.1 Transportproteine

Die Untersuchungen ergaben eine starke DRA-Expression im Dickdarm mit einem Maximum im Bereich des Zökums und eine geringere Expression im Dünndarm mit einem Höchstwert im Duodenum (**Kapitel 4.2.1**). Die Ergebnisse stimmen weitestgehend mit früheren Studien überein. *Jacob et al.* konnten durch Western-Blot und Immunhistochemie den DRA-Transporter im Gastrointestinaltrakt des Menschen, des Kaninchens und der Ratte verstärkt im Kolon und Duodenum nachweisen [22]. *Talbot et al.* wiesen DRA im Gastrointestinaltrakt von Maus und Ratte mittels Immunfluoreszenz und Western-Blot im Dickdarm insbesondere im Zökum und mittlerem Bereich des Kolons nach [29]. Auch *Wang et al.* zeigten durch Northern-Blot-Untersuchungen im Dickdarm der Maus eine starke Expression von DRA im Zökum und im distalen Kolon. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnten die beiden vorgenannten Arbeitsgruppen DRA im proximalen Kolon nicht nachgewiesen [29, 30]. *Lamprecht et al.* konnten DRA hingegen in Epithelzellen von humanen Biopsien des proximalen Kolons zusammen mit NHE3 und NHERF2 durch Immunfluoreszenz nachweisen [19].

Über die Verteilung von PAT1 entlang des Gastrointestinaltraktes gibt es bislang erst wenige Untersuchungen. Die Expressionsdaten der vorliegenden Arbeit ergaben, dass PAT1 fast ausschließlich im Dünndarm und hier verstärkt in den proximalen Segmenten exprimiert wurde (**Kapitel 4.2.2**). Diese Ergebnisse werden von den Untersuchungen von *Wang et al.* bestätigt,

die PAT1 im Gastrointestinaltrakt der Maus mittels Northern-Blot nur im Dünndarm nachweisen konnten. Zudem zeigten ihre Northern-Blot-Untersuchungen prominentere RNA-Banden im Bereich des Duodenum und Jejunum als im Ileum [30]. Das Expressionsmuster von PAT1 lässt vermuten, dass PAT1 Villus-spezifisch, also nicht in den Krypten exprimiert wird.

NHE3 wurde v. a. im Kolon und in proximalen Dünndarmabschnitten exprimiert. Eine sehr geringe Expression zeigte sich in den distalen Abschnitten des Dün- und Dickdarms (**Kapitel 4.2.3**). Die Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungen von *Orlowski et al.*, die NHE3 zum ersten Mal im Gastrointestinaltrakt der Ratte mittels Northern-Blot sowohl im Dünndarm als auch im Dickdarm nachweisen konnten [52]. Im Dickdarm wiesen sie eine starke NHE3-Expression im Bereich des proximalen Kolons nach, im Bereich des Zökums sowie des distalen Kolons eine lediglich geringe Expression. Im Dünndarm detektierten sie NHE3 vor allen in den proximalen Abschnitten [52]. *Talbot et al.* wiesen NHE3 im Dickdarm von Maus und Ratte mittels Immunfluoreszenz und Western-Blot nach. Anders als DRA war NHE3 in den proximalen sowie mittleren Abschnitten des Kolons, nicht aber im Zökum sowie im distalen Bereich des Kolons nachweisbar [29]. Auch in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine sehr geringe NHE3-Expression im Zökum sowie im distalsten Dickdarmabschnitt. Andere Ergebnisse erzielten *Dudeja et al.* im humanen Gastrointestinaltrakt, die ebenfalls mittels PCR die stärkste NHE3-Expression im Ileum mit abnehmender Expression in distaleren und proximaleren Darmabschnitten nachwiesen [53].

CFTR konnte in der vorliegenden Arbeit im gesamten Intestinum nachgewiesen werden, wobei die Expression im Dickdarm etwas stärker als im Dünndarm ausgeprägt war (**Kapitel 4.2.4**). *Strong et al.* konnten CFTR beim Menschen durch *In-situ*-Hybridisierung in Epithelzellen des Dün- und Dickdarms nachweisen, wobei sie CFTR insbesondere in den Kryptenzellen und weniger in den Villuszellen detektierten [75]. Auch *Liu et al.* konnten CFTR durch Western-Blot und qPCR-Untersuchungen in den Epithelzellen des Maudünndarms mit einem absteigenden Gradienten auf der Krypten-Villus-Achse nachweisen [68]. Die vorrangige Expression von CFTR in den Epithelzellen der Krypten könnte erklären, dass CFTR im Dickdarm etwas stärker als im Dünndarm exprimiert wird.

ANO1 wurde in der vorliegenden Arbeit vermehrt in den distalen Abschnitten des Dickdarms, hingegen kaum im Dünndarm exprimiert (**Kapitel 4.2.5**). In der Literatur gibt es bislang noch keine Untersuchungen, die eine differenzierte Expression von ANO1 auf der Längsachse des Darms beschreiben. Mittels PCR und Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass ANO1 im Intestinum der Maus, des Menschen und des Affens in den *interstitiellen Zellen von Cajal*,

die im gesamten Gastrointestinaltrakt vorkommen, exprimiert wird [82, 85, 86]. Zudem konnte ANO1 von mehreren Arbeitsgruppen in den Epithelzellen des Kolons der Maus [82], des Meerschweinchens [84] und in einer humanen Zellkultur [83] mittels qPCR und Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. In der Literatur gibt es bislang keinen Nachweis für eine Expression von ANO1 in den Epithelien des Dünndarms. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen damit übereinstimmend vermuten, dass ANO1 im Dünndarmepithel nicht exprimiert wird.

5.3.2 Adapterproteine

Bislang gibt es zu den untersuchten Regulatorproteinen NHERF1, NHERF2, PDZK1, IKEPP und SNX27 kaum Expressionsdaten entlang der Längsachse des Darms.

Rossmann et al. untersuchten die Lokalisation von PDZK1 im Intestinum des Kaninchens und konnten das Regulatorprotein mithilfe eines Western-Blots in den Epithelzellen des Duodenums und Ileums, nicht aber in den Epithelien des Kolons detektieren [105]. Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergaben eine sehr geringe Expression von PDZK1 im Dickdarm (**Kapitel 4.3.3**).

Daneben zeigten die Untersuchungen dieser Arbeit, dass NHERF2 im proximalen Kolon sehr stark exprimiert wurde (**Kapitel 4.3.2**). Auch *Lamprecht et al.* wiesen NHERF2 in den Epithelzellen des humanen, proximalen Kolon – kolokalisiert mit DRA und NHE3 – durch Immunfluoreszenz nach [19].

5.3.3 Hormonelle Rezeptoren

Die Analysen der vorliegenden Arbeit ergaben, dass der GLP2-Rezeptor im Dünn- und Dickdarm exprimiert wird, allerdings im Dickdarm eine stärkere Expression aufwies (**Kapitel 4.4.1**). Diese Ergebnisse widersprechen denen von *Munroe et al.*, die im Gastrointestinaltrakt der Ratte mittels Northern-Blot die stärkste GLP2-Rezeptor-Expression im Jejunum und eine geringere Expression im Kolon detektierten [125]. Allerdings erscheinen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (**Kapitel 4.4.1**) aufgrund der vorwiegend im Kolon und Ileum lokalisierten L-Zellen und der beschriebenen parakrinen Wirkung von GLP2 [139, 140] plausibel. Über die zellspezifische Lokalisation des GLP2-Rezeptors im Gastrointestinaltrakt kamen diverse Arbeitsgruppen zu unterschiedlichen Ergebnissen [128–131]. Hierzu kann anhand der qPCR-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit allerdings keine Stellung bezogen werden.

Der IGF1-Rezeptor wurde in dieser Arbeit im gesamten Intestinaltrakt nachgewiesen. Die stärkste Expression wurde im Dickdarm gemessen (**Kapitel 4.4.2**). Frühere Untersuchungen konnten den IGF1-Rezeptor in den intestinalen Epithelzellen verschiedener Spezies nachweisen [120–123]. *Laburthe et al.* konnten durch IGF1-Bindungsstudien im Intestinaltrakt der Ratte feststellen, dass IGF1 besonders stark an Kryptenzellen und weniger an Villuszellen bindet. Zudem zeigten sie, dass die Bindung von IGF1 im Kolon stärker ist als in den Abschnitten des Dünndarms [123]. Die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit stimmen insoweit mit diesen Ergebnissen überein, als dass der IGF1-Rezeptor verstärkt im Kolon exprimiert wurde.

5.4 Funktionelle Interpretation der Ergebnisse

5.4.1 Transportproteine

Die Expressionsdaten von DRA und NHE3 zeigen, dass die Expression beider Transporter im Kolon stark ausgeprägt war (**Kapitel 4.2.1** und **4.2.3**). Es liegt also nahe, dass im Kolon die gekoppelte, elektroneutrale NaCl-Absorption stattfindet. Dies wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen demonstriert [6, 7, 16–18]. Im Gegensatz zu DRA wird NHE3 im Zökum und im distalen Dickdarm kaum exprimiert, was eine gekoppelte Funktion der beiden Transporter in diesem Bereich ausschließen würde. Möglicherweise trägt DRA in diesem Bereich gemeinsam mit NHE2, das von mehreren Arbeitsgruppen mittels Northern-Blot verstärkt im Dickdarm gefunden wurde [46, 186, 187], zur NaCl-Absorption bei. Zudem ist in diesen Darmbereichen eine Schutzfunktion von DRA, welche von *Xiao et al.* an Untersuchungen einer DRA-KO-Maus beschrieben wurde [26], anzunehmen. *Xiao et al.* konnten darin zeigen, dass DRA an der Bildung einer intestinalen, adhärennten Schleimschicht beteiligt ist. Damit übereinstimmend vermuten *Talbot et al.* basierend auf ihren Untersuchungen eine durch DRA vermittelte Aufrechterhaltung einer alkalischen Schleimhautoberfläche im Zökum zur Neutralisierung von H⁺-Ionen [29]. Darüber hinaus konnten *Whittamore et al.* nachweisen, dass DRA im Zökum der Maus für eine SO₄²⁻-Sekretion, welche u. a. zur Aufrechterhaltung und zum Wachstum der bakteriellen Darmflora beiträgt, verantwortlich ist [25].

Im Dünndarm erbrachten die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit eine wesentlich geringere DRA-Expression als im Dickdarm (**Kapitel 4.2.1**). Ergebnisse an DRA-KO-Mäusen zeigten, dass ein Funktionsverlust von DRA im oberen Gastrointestinaltrakt keine pathophysiologischen Auswirkungen hat [27]. Dies lässt vermuten, dass die funktionelle Relevanz von DRA

im Dickdarm höher ist als im Dünndarm. Dennoch konnte auch im Dünndarm eine Kopplung von DRA und NHE3 zur elektroneutralen NaCl-Resorption nachgewiesen werden [18]. Im Dünndarm zeigte sich in der vorliegenden Arbeit die stärkste DRA-Expression im Duodenum, wo verschiedene Arbeitsgruppen eine gekoppelte Funktion von DRA mit CFTR zur basalen und cAMP-stimulierten Sekretion von Cl⁻ und HCO₃⁻ beschrieben [21–23], die hier zur pH-Neutralisierung des sauren Mageninhaltes dient.

Wie bereits beschrieben wurde in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, dass neben DRA auch NHE3 stark im Kolon exprimiert wurde (**Kapitel 4.2.3**) und hier an der elektroneutralen NaCl-Absorption beteiligt ist [6, 7, 16, 17, 17, 18]. Die vorliegenden Expressionsdaten zeigen, dass NHE3 zudem stark im Duodenum und in proximalen Dünndarmabschnitten exprimiert wurde. In diesen Bereichen des Darms ist anzunehmen, dass NHE3 eine regulierende Funktion von PepT1 einnimmt. Die Arbeitsgruppen um Watanabe et al. sowie Kennedy et al. konnten eine gekoppelte Funktion von NHE3 und PepT1 an Zelllinien nachweisen, wobei der durch NHE3 vermittelte Na⁺/H⁺-Austausch und dadurch geschaffene Protonengradient die zelluläre Aufnahme von Oligopeptiden durch PepT1 erhöht [61, 62]. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass auch PepT1 an der apikalen Seite der Enterozyten lokalisiert ist und insbesondere im Dünndarm exprimiert wird [56-58]. Dies spricht dafür, dass im Dünndarm eine gekoppelte Funktion von NHE3 mit PepT1 zur Aufnahme von Peptiden stattfindet.

Im Gegensatz zu DRA wurde nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit auch PAT1 insbesondere im Dünndarm exprimiert (**Kapitel 4.2.2**). *Seidler et al.* konnten an PAT1-KO-Mäusen feststellen, dass deren NaCl-Absorption im Dünndarm eingeschränkt ist [35]. In Zusammenschau dieser Ergebnisse ist zu vermuten, dass NHE3 und PAT1 im Dünndarm zu einer gekoppelten NaCl-Absorption beitragen. Trotzdem entwickelten PAT1-KO-Mäuse keinen Durchfall [34, 35]. Dies stellt die funktionelle Relevanz der Kopplung von PAT1 und NHE3 im Dünndarm zur elektroneutralen Resorption von NaCl in Frage. Die starke Expression von NHE3 und PAT1 in den proximalen Dünndarmabschnitten könnte neben der NaCl-Absorption auch auf eine NHE3-PAT1-gekoppelte NaHCO₃-Absorption in diesem Bereich hinweisen. Diese wurde von *Xia et al.* in der Maus beschrieben [36]. Die starke Expression von PAT1 im Duodenum deutet auf eine funktionelle Relevanz in diesem Darmbereich hin. PAT1 ist im Duodenum neben DRA an der HCO₃⁻-Sekretion der Enterozyten beteiligt und besitzt hier eine pH-regulierende Funktion in den duodenalen Villus-Epithelzellen der Maus [5, 33, 34].

Neben der funktionellen Relevanz der jeweiligen Transportproteine wurde in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, dass NHE3 insbesondere im Dünndarm von NOD2-KO-Mäusen stärker exprimiert wird (**Kapitel 4.2.3**). Dies könnte zur Folge haben, dass die Na⁺- bzw. NaCl-Aufnahme im Dünndarm bei NOD2-KO-Mäusen stärker ist als bei WT-Mäusen. In der Literatur gibt es hierzu bislang keine weiterführenden Untersuchungen.

CFTR konnte in der vorliegenden Arbeit im gesamten Intestinum nachweisen (**Kapitel 4.2.4**). Es ist also davon auszugehen, dass CFTR im Dünndarm und im Dickdarm aktiv ist. Neben der Transportfunktion von Cl⁻ und der sekundären Sekretion von Wasser kommt es zur Verflüssigung der aufgenommenen Nahrung. Darüber hinaus besitzt CFTR auch eine regulierende Funktion, indem es die Transportaktivität von DRA und PAT1 steigert [69, 70].

ANO1 wurde ausschließlich im Dickdarm nachgewiesen. Die stärkste Expression zeigte sich hier in den distalen Abschnitten (**Kapitel 4.2.5**). Bisherige Untersuchungen zur Lokalisation von ANO1 haben ergeben, dass ANO1 in den *interstitiellen Zellen von Cajal* und in Enterozyten exprimiert wird [82–86]. Aus den Expressionsdaten der vorliegenden Arbeit lässt sich nicht ableiten, ob ANO1 tatsächlich in den Enterozyten des Dickdarms stärker exprimiert wird als im Epithel des Dünndarms oder ob die Darmwand im Dickdarm mehr *interstitielle Zellen von Cajal* enthält als die Darmwand im Dünndarm. Es ist also lediglich zu vermuten, dass ANO1 als CaCC im Dickdarm an den epithelialen Ionentransportprozessen beteiligt ist. Für die Expression von ANO1 an der apikalen Membran der Epithelzellen könnte die Beteiligung eines apikalen CaCC an der Pathogenese der Rotavirus-Diarrhoe sprechen [188]. Diese Beteiligung wurde von *Ko et al.* sowohl an einer menschlichen Kolon-Zelllinie als auch an Enterozyten der Maus nachgewiesen. Ohne die molekulare Identität des CaCC zu kennen, vermuteten sie als dafür möglichen Kandidaten auch ANO1 [188]. Weiterhin spricht für eine apikale Lokalisation von ANO1 in den Enterozyten, dass ein Rotavirus-Toxin über die Aktivierung von ANO1 im Kolon der Maus eine Diarrhoe induziert [189]. Gegen eine apikale Lokalisation von ANO1 spricht, dass der Transporter in immunhistochemischen Untersuchungen von *Quanhua et al.* nur an der basolateralen Membran von Kolonozyten detektiert werden konnte [84]. Dies würde gegen eine direkte Beteiligung an den intestinalen Ionentransportprozessen sprechen.

5.4.2 Adapterproteine

NHERF1 wurde im gesamten Intestinaltrakt exprimiert (**Kapitel 4.3.1**). Dabei war die Expression im Dünndarm stärker als im Dickdarm. Es liegt also nahe, dass NHERF1 im Dünndarm

funktionell aktiver ist als im Dickdarm. Dennoch ist die Expression im Dickdarm so ausgeprägt, dass hier ein Einfluss von NHERF1 auf die elektroneutrale NaCl-Absorption möglich ist. Die starke Expression von NHERF1 im Dünndarm ist nur schwer zu interpretieren. Aufgrund der Expressionsdaten der Transportproteine ist im Dünndarm eine Regulation von DRA, PAT1, NHE3 und CFTR durch NHERF1 theoretisch denkbar. Interaktionen von NHERF1 mit DRA [Natour und Lamprecht; unveröffentlichte Daten], PAT1 [94, 95], NHE3 [95, 96] und CFTR [88, 97–99] wurden in der Literatur beschrieben.

NHERF2 zeigt hingegen eine deutlich stärkere Expression im Kolon als im Dünndarm (**Kapitel 4.3.2**). Dies lässt vermuten, dass NHERF2 wesentlich in die Regulation der elektroneutralen, DRA-NHE3-gekoppelten NaCl-Absorption involviert ist. Auch *Lamprecht et al.* konnten im Kolon eine Kolo-kalisation von DRA, NHE3 und NHERF2 nachweisen, die für eine regulatorische Wirkung von NHERF2 auf DRA und NHE3 sprechen kann [19]. In humanen Epithelzellen der Atemwege wurde außerdem eine Interaktion von NHERF2 und CFTR beschrieben [103]. Vergleicht man die Expressionsdaten von CFTR und NHERF2, wäre eine Interaktion sowohl im Dünndarm als auch im Dickdarm denkbar.

PDZK1 wurde fast ausschließlich im Dünndarm exprimiert (**Kapitel 4.3.3**). Zu diesem Ergebnis kamen auch *Rossmann et al.* [105]. Aufgrund der sehr geringen Expression im Kolon ist zu vermuten, dass PDZK1 hauptsächlich im Dünndarm funktionell aktiv ist und kaum Einfluss auf die DRA-NHE3-gekoppelte elektroneutrale NaCl-Absorption im Dickdarm hat. Die Interaktionen, die von PDZK1 mit DRA [105], PAT1 [95], NHE3 [95] und CFTR [106] beschrieben wurden, finden also vermutlich vorwiegend im Dünndarm statt.

Des Weiteren wurde eine regulierende Funktion von PDZK1 auf die Wirkung von PepT1 nachgewiesen. Sugiura et al. zeigten, dass die Resorption von PepT1-Substraten in Dünndarmzellen von PDZK1-KO-Mäusen verglichen mit der Absorption in WT-Mäusen vermindert war. Mithilfe von Western-Blot und immunhistochemischen Untersuchungen an Dünndarmzellen konnten sie ein geringeres Vorkommen von PepT1 an der apikalen Zellmembran in PDZK1-KO-Mäusen als in WT-Mäusen nachweisen [190]. Aufgrund des Expressionsprofils von PDZK1 in der vorliegenden Arbeit und der Ergebnisse von Sugiura et al. ist zu vermuten, dass PDZK1 den durch PepT1 vermittelten Transport von Oligopeptiden an der apikalen Zellmembran der Enterozyten im Dünndarm stimuliert.

IKEPP wurde im gesamten Intestinum exprimiert (**Kapitel 4.3.4**). Die Expression war im Dünndarm stärker als im Dickdarm. Dies könnte dafür sprechen, dass IKEPP im Dünndarm

einen größeren Einfluss auf die intestinalen Ionentransportprozesse besitzt. Interaktionen mit DRA [27] und NHE3 [88] sind in der Literatur beschrieben.

Über die funktionelle Relevanz von SNX27 ist bislang noch nicht viel bekannt. Es wird im gesamten Intestinum exprimiert, im Dickdarm allerdings stärker als im Dünndarm (**Kapitel 4.3.5**). Neben einer Interaktion mit NHE3 [111] konnte auch eine Bindung von SNX27 mit DRA [90] festgestellt werden. Ein Einfluss von SNX27 auf die elektroneutrale NaCl-Absorption im Dickdarm ist also denkbar.

Wie bereits in **Kapitel 1.4.1** erwähnt, stellten *Lamprecht et al.* anhand einer Kohortenstudie bei Patienten, die nicht an Morbus Crohn litten, folgendes fest: Das Risiko, nach einer ausgedehnten intestinalen Resektion ein KDS zu entwickeln, ist bei Patienten mit einer NOD2-Genmutation gegenüber Patienten ohne NOD2-Genmutation signifikant erhöht [174]. Die Ursachen dieser Beobachtung konnten noch nicht hinreichend geklärt werden. Denkbar ist, dass bei Patienten mit einer NOD2-Genmutation die funktionelle und strukturelle Adaptation (**Kapitel 1.3.1**) an die Kurzdarmsituation geringer ausgeprägt ist als bei Patienten ohne NOD2-Genmutation. Betrachtet man die Ergebnisse der Transport- und Adapterproteine zusammenfassend, wurden – mit Ausnahme von NHE3, der im proximalen Dünndarm von NOD2-KO-Mäusen stärker exprimiert war als im proximalen Dünndarm von WT-Mäusen – keine signifikanten Unterschiede in der basalen Expression zwischen WT- und NOD2-KO-Mäusen gemessen. Es ergaben sich aus diesem Vergleich also keine Hinweise dafür, warum Patienten mit einer NOD2-Mutation nach einer ausgedehnten Darmresektion ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Kurzdarmsyndroms tragen. Um dieser Frage weiter nachzugehen, sollte in diesem Zusammenhang auch geklärt werden, ob in einem Kurzdarmmodell der Maus funktionelle und strukturelle Adaptationsvorgänge stattfinden und ob sich diese in WT- und NOD2-KO-Mäusen signifikant unterscheiden.

5.4.3 Hormonelle Rezeptoren

Die Ergebnisse der hormonellen Rezeptoren für IGF1 und GLP2 zeigten ein insgesamt ähnliches Expressionsmuster entlang der Längsachse des Darms (**Kapitel 4.4.1 und 4.4.2**). Dies stützt einerseits die Annahme, dass die Hormone GLP2 und IGF1 ihre wachstumsfördernde Wirkung im Intestinaltrakt gekoppelt ausüben und andererseits die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen, die eine Abhängigkeit der GLP2-Wirkung von IGF1 und dem IGF1-Rezeptor

in der Darmwand der Maus nachweisen konnten [153–155]. Weiterhin war anhand der Ergebnisse zu erkennen, dass beide Rezeptoren im gesamten Intestinaltrakt und jeweils am stärksten im Dickdarm exprimiert wurden. Das lässt vermuten, dass die durch GLP2 und IGF1 vermittelten Adaptationsvorgänge nach einer ausgedehnten Darmresektion auch im Dickdarm eine große Rolle spielen könnten. Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist außerdem zu erkennen, dass die Expression des IGF1- und GLP2-Rezeptors im Dünndarm von distal nach proximal abnahm bzw. im Ileum stärker war als im Jejunum (**Abbildungen 27 und 28**). Diese Ergebnisse passen zu denen von *Thompson et al.* sowie *Appleton et alii*. *Thompson et al.* konnten durch proximale bzw. distale Dünndarmresektion bei Hunden folgendes zeigen: Die Hunde, die einer distalen Dünndarmresektion unterzogen wurden, zeigten ein schlechteres funktionelles *Outcome* als die Hunde, bei denen eine proximale Dünndarmresektion durchgeführt wurde. Zudem konnten sie nachweisen, dass nur bei den Hunden, die eine proximale Dünndarmresektion erhielten, das Krypten- und Villuswachstum postoperative signifikant erhöht war [118]. *Appleton et al.* demonstrierten an Ratten, dass eine Jejunum-, nicht aber eine Ileumresektion zu einer erhöhten Produktionsrate der Kryptenzellen führt [117]. Nach diesen Ergebnissen kann im Ileum also eine stärkere funktionelle Adaptation als im Jejunum stattfinden. Dagegen zeigten die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, dass auch im Jejunum eine signifikant erhöhte Kryptenproliferation und Villuselongation nach Ileumresektion in der Maus stattfindet. Eine Ursache der Untersuchungsergebnisse von *Thompson et al.* sowie *Appleton et al.* könnte die – im Vergleich zum Ileum – geringere jejunale Expression des IGF1- und GLP2-Rezeptors sein, die eine verminderte strukturelle Adaptation durch IGF1 und GLP2 nach Ileumresektion zur Folge haben könnte.

5.4.3.1 GLP2-Rezeptor: Verminderte Genexpression in NOD2-KO-Mäusen als eine mögliche Ursache für die Entstehung eines KDS nach ausgedehnter Darmresektion?

Für das schlechte *Outcome* der Patienten mit NOD2-Mutationen nach einer ausgedehnten Darmresektion diskutierten *Lamprecht et al.* als Ursache die – möglicherweise durch NOD2-Mutationen entstehende – eingeschränkte immunologische und mechanische Barrierefunktion der Darmwand sowie das daraus resultierende erhöhte Risiko für perioperative Komplikationen mit noch ausgedehnteren Darmresektionen. Andererseits vermuteten sie auch eine eingeschränkte Adaptation der Darmschleimhaut des Restdarms als mögliche Ursache [174].

Wie in **Kapitel 4.4.1** beschrieben, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Expressionsunterschied des GLP2-Rezeptors in WT- und NOD2-KO-Mäusen gefunden. Ob es einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen dem NOD2-Gen und dem GLP2 Rezeptor gibt, ist in der Literatur bislang nicht beschrieben. Möglicherweise sind in der Darmwand von NOD2-KO-Mäusen die GLP2-Rezeptor exprimierenden, subepithelialen Myofibroblasten sowie Neuronen der Muskelschichten vermindert. Dies könnte eine geringere Expression des GLP2-Rezeptors in NOD2-KO-Mäusen erklären. Neben dem GLP2-Rezeptor zeigte sich auch für den IGF1-Rezeptor eine tendenziell geringere Genexpression in den NOD2-KO-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen, allerdings ohne Nachweis eines statistisch signifikanten Unterschieds. Eine verminderte Expression des GLP2-Rezeptors – und evtl. auch des IGF1-Rezeptors – könnte eine schwächere, strukturelle Adaptation nach ausgedehnter Darmresektion zur Folge haben. Betrachtet man die intestinale Wirkung von GLP2 [145–148], könnte eine verminderte GLP2-Rezeptor-Expression ein geringeres postoperatives Wachstum der Krypten und Zotten zur Folge haben. Durch ein Wachstum der Krypten und Zotten würden die Resorptionsfläche und damit vermutlich auch die Anzahl der Transportproteine steigen. *Guan et al.* zeigten zudem, dass eine Aktivierung des GLP2-Rezeptors an enterischen Neuronen möglicherweise zu einer Ausschüttung von NO und VIP führt [129]. NO und VIP, die bei verminderter GLP2-Rezeptor-Expression möglicherweise vermindert ausgeschüttet werden, erhöhen die Resorption von Nährstoffen sowie den mesenterialen Blutfluss und verhindern eine Immunzellinfiltration [140].

Ob die adaptionsvermittelnde Wirkung des GLP2-Rezeptors eine Bedeutung für die Entwicklung eines schwerer verlaufenden KDS in Patienten mit NOD2-Mutationen hat, sollte in weitergehenden Studien geklärt werden. Dieser Aspekt ist ebenfalls hinsichtlich eines möglichen therapeutischen Ansatzes bei Patienten mit NOD2-Mutationen, z. B. durch eine postoperative Dosiserhöhung des GLP2-Analogons Teduglutid, interessant und wird in zukünftigen Forschungsprojekten der Arbeitsgruppe experimentell untersucht.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die intestinalen Ionentransportprozesse sind für die Absorption und Sekretion von Elektrolyten und Wasser von entscheidender Bedeutung. Der Transport von Elektrolyten zwischen dem Darmlumen und der Epithelzelle findet über apikal lokalisierte Ionentransportproteine statt, wobei sekundär der Transport von Wasser stattfindet. Dieser Transport wird wiederum von zellulären Adapterproteinen reguliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Expressionsstudie zur Verteilung der Transport- und Adapterproteine in der Darmwand der Maus durchgeführt. Durch qPCR konnte die Expression der Transport- und Adapterproteine differenziert auf der Längsachse des Darms bestimmt werden. Dies dient zum einen dem besseren allgemeinen Verständnis der intestinalen Ionentransportprozesse und bildet zum anderen die Grundlage für weitergehende Studien, in denen mögliche Adaptationsvorgänge im Kurzdarmmodell der Maus untersucht werden sollen. Eine Adaptation der Schleimhaut nach Darmresektion kann über hormonelle Rezeptoren vermittelt werden. Neben der Expression der Transport- und Adapterproteine wurde daher auch die basale Expression des IGF1- und GLP2-Rezeptors in der Darmwand untersucht.

In vorangegangenen Studien wurde bereits gezeigt, dass Patienten mit einer NOD2-Genmutation nach einer ausgedehnten Darmresektion ein erhöhtes Risiko tragen, postoperativ ein Kurzdarmsyndrom zu entwickeln. Ob sich die basale Expression der Ionentransporter und Hormonrezeptoren entlang der Darmlängsachse zwischen WT und NOD2-KO Mäusen unterscheidet, war daher eine weitere Fragestellung dieser Arbeit. Die Erkenntnisse sollten eine Grundlage für zukünftige experimentelle Studien bilden, in denen die Adaptationsfähigkeit des Darms in der Kurzdarmsituation abhängig vom NOD2-Status untersucht werden soll.

Die Expressionsstudie hat ergeben, dass DRA und NHE3 stark im Kolon exprimiert werden, in dem bereits auch schon andere Arbeitsgruppen eine funktionelle Kopplung von DRA und NHE3 zur elektroneutralen NaCl-Resorption nachweisen konnten. DRA wird zudem stark im Zökum und NHE3 stark im proximalen Dünndarm exprimiert. Daneben war die Expression von PAT1 auf den Dünndarm beschränkt und nahm hier nach distal ab. CFTR wurde sowohl im Dickdarm als auch im Dünndarm exprimiert, stärker jedoch im Dickdarm. ANO1 wurde nahezu

ausschließlich im Dickdarm exprimiert, wobei die Expression im distalen Dickdarm am stärksten war. NHE3 wurde im proximalen Dünndarm bei NOD2-KO-Mäusen stärker exprimiert als bei WT-Mäusen.

Die Adapterproteine wurden – bis auf PDZK1 – jeweils im gesamten Intestinum exprimiert. NHERF1 wurde am stärksten im Dünndarm und NHERF2 überwiegend im Dickdarm exprimiert. PDZK1 wurde nur im Dünndarm exprimiert. Die Expression von IKEPP war im Dünndarm stärker als im Dickdarm, umgekehrt war die Expression von SNX27 im Dickdarm stärker als im Dünndarm.

Der IGF1- und der GLP2-Rezeptor wurden im gesamten Intestinum exprimiert, verstärkt allerdings im Dickdarm. Beide Rezeptoren wurden in NOD2-KO-Mäusen geringer exprimiert als in den WT-Mäusen, wobei nur die Expression des GLP2-Rezeptors in WT- und NOD2-KO-Mäusen signifikante Unterschiede zeigte. Möglicherweise gibt es also einen Zusammenhang zwischen der Expression des GLP2-Rezeptors und dem NOD2-Genstatus. Aus diesem Grund ist der GLP2-Rezeptor zukünftig ein interessantes Protein, um nach einer Ursache für die häufige Entwicklung eines postoperativen Kurzdarmsyndroms bei Patienten mit NOD2-Mutationen zu suchen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Welsch U, Sobotta J (2006) Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie ; mit 21 Tabellen, 2., völlig überarb. Aufl. Student consult. Elsevier, Urban und Fischer, München, Jena
2. Lüllmann-Rauch R (2009) Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen, 3., vollst. überarb. Aufl. Thieme, Stuttgart
3. Golenhofen K (2000) Physiologie heute: Lehrbuch, Kompendium, Fragen und Antworten ; mit 7 Tabellen, 2. Aufl. GK 1. Urban und Fischer, München, Jena
4. Klinke R, Bauer C (1996) Lehrbuch der Physiologie: 52 Tabellen, 2., neugestaltete und überarb. Aufl. Thieme, Stuttgart, New York
5. Kato A, Romero MF (2011) Regulation of electroneutral NaCl absorption by the small intestine. *Annu Rev Physiol* 73: 261–281. doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142244
6. Knickelbein R, Aronson PS, Atherton W et al. (1983) Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. I. Evidence for Na-H exchange. *Am J Physiol* 245(4): G504-10
7. Knickelbein R, Aronson PS, Schron CM et al. (1985) Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. II. Evidence for Cl-HCO₃ exchange and mechanism of coupling. *Am J Physiol* 249(2 Pt 1): G236-45
8. Mount DB, Romero MF (2004) The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers. *Pflugers Arch* 447(5): 710–721. doi: 10.1007/s00424-003-1090-3
9. Schweinfest CW, Henderson KW, Suster S et al. (1993) Identification of a colon mucosa gene that is down-regulated in colon adenomas and adenocarcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(9): 4166–4170
10. Holmberg C, Perheentupa J, Launiala K (1975) Colonic electrolyte transport in health and in congenital chloride diarrhea. *J Clin Invest* 56(2): 302–310. doi: 10.1172/JCI108094
11. Hoglund P, Haila S, Scherer SW et al. (1996) Positional candidate genes for congenital chloride diarrhea suggested by high-resolution physical mapping in chromosome region 7q31. *Genome Res* 6(3): 202–210
12. Hoglund P, Haila S, Gustavson KH et al. (1998) Clustering of private mutations in the congenital chloride diarrhea/down-regulated in adenoma gene. *Hum Mutat* 11(4): 321–327. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(1998)11:4<321:AID-HUMU10>3.0.CO;2-A

-
13. Hoglund P, Haila S, Socha J et al. (1996) Mutations of the Down-regulated in adenoma (DRA) gene cause congenital chloride diarrhoea. *Nat Genet* 14(3): 316–319. doi: 10.1038/ng1196-316
 14. Gamble JL, Fahey KR, Appleton J et al. (1945) Congenital alkalosis with diarrhea. *The Journal of Pediatrics* 26(6): 509–518. doi: 10.1016/S0022-3476(45)80078-1
 15. Darrow DC (1945) Congenital alkalosis with diarrhea. *The Journal of Pediatrics* 26(6): 519–532. doi: 10.1016/S0022-3476(45)80079-3
 16. Musch MW, Arvans DL, Wu GD et al. (2009) Functional coupling of the downregulated in adenoma Cl⁻/base exchanger DRA and the apical Na⁺/H⁺ exchangers NHE2 and NHE3. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296(2): G202-10. doi: 10.1152/ajpgi.90350.2008
 17. Melvin JE, Park K, Richardson L et al. (1999) Mouse Down-regulated in Adenoma (DRA) Is an Intestinal Cl⁻/HCO₃⁻ Exchanger and Is Up-regulated in Colon of Mice Lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ Exchanger. *Journal of Biological Chemistry* 274(32): 22855–22861. doi: 10.1074/jbc.274.32.22855
 18. Walker NM, Simpson JE, Yen P-F et al. (2008) Down-regulated in adenoma Cl/HCO₃ exchanger couples with Na/H exchanger 3 for NaCl absorption in murine small intestine. *Gastroenterology* 135(5): 1645-1653.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2008.07.083
 19. Lamprecht G, Heil A, Baisch S et al. (2002) The down regulated in adenoma (dra) gene product binds to the second PDZ domain of the NHE3 kinase A regulatory protein (E3KARP), potentially linking intestinal Cl⁻/HCO₃⁻ exchange to Na⁺/H⁺ exchange. *Biochemistry* 41(41): 12336–12342
 20. Walker NM, Simpson JE, Hoover EE et al. (2011) Functional activity of Pat-1 (Slc26a6) Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in the lower villus epithelium of murine duodenum. *Acta Physiol (Oxf)* 201(1): 21–31. doi: 10.1111/j.1748-1716.2010.02210.x
 21. Walker NM, Simpson JE, Brazill JM et al. (2009) Role of down-regulated in adenoma anion exchanger in HCO₃⁻ secretion across murine duodenum. *Gastroenterology* 136(3): 893–901. doi: 10.1053/j.gastro.2008.11.016
 22. Jacob P, Rossmann H, Lamprecht G et al. (2002) Down-regulated in adenoma mediates apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in rabbit, rat, and human duodenum. *Gastroenterology* 122(3): 709–724
 23. Greeley T, Shumaker H, Wang Z et al. (2001) Downregulated in adenoma and putative anion transporter are regulated by CFTR in cultured pancreatic duct cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281(5): G1301-8

-
24. Silberg DG, Wang W, Moseley RH et al. (1995) The Down Regulated in Adenoma (dra) Gene Encodes an Intestine-specific Membrane Sulfate Transport Protein. *Journal of Biological Chemistry* 270(20): 11897–11902. doi: 10.1074/jbc.270.20.11897
 25. Whittamore JM, Freel RW, Hatch M (2013) Sulfate secretion and chloride absorption are mediated by the anion exchanger DRA (Slc26a3) in the mouse cecum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305(2): G172-84. doi: 10.1152/ajpgi.00084.2013
 26. Xiao F, Yu Q, Li J et al. (2014) Slc26a3 deficiency is associated with loss of colonic HCO₃⁻ secretion, absence of a firm mucus layer and barrier impairment in mice. *Acta Physiol (Oxf)* 211(1): 161–175. doi: 10.1111/apha.12220
 27. Lamprecht G, Gaco V, Turner JR et al. (2009) Regulation of the intestinal anion exchanger DRA (downregulated in adenoma). *Ann N Y Acad Sci* 1165: 261–266. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04044.x
 28. Byeon MK, Westerman MA, Maroulakou IG et al. (1996) The down-regulated in adenoma (DRA) gene encodes an intestine-specific membrane glycoprotein. *Oncogene* 12(2): 387–396
 29. Talbot C, Lytle C (2010) Segregation of Na/H exchanger-3 and Cl/HCO₃⁻ exchanger SLC26A3 (DRA) in rodent cecum and colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299(2): G358-67. doi: 10.1152/ajpgi.00151.2010
 30. Wang Z, Petrovic S, Mann E et al. (2002) Identification of an apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger in the small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282(3): G573-9. doi: 10.1152/ajpgi.00338.2001
 31. Haila S, Saarialho-Kere U, Karjalainen-Lindsberg ML et al. (2000) The congenital chloride diarrhea gene is expressed in seminal vesicle, sweat gland, inflammatory colon epithelium, and in some dysplastic colon cells. *Histochem Cell Biol* 113(4): 279–286
 32. Lohi H, Kujala M, Kerkela E et al. (2000) Mapping of five new putative anion transporter genes in human and characterization of SLC26A6, a candidate gene for pancreatic anion exchanger. *Genomics* 70(1): 102–112. doi: 10.1006/geno.2000.6355
 33. Simpson JE, Walker NM, Supuran CT et al. (2010) Putative anion transporter-1 (Pat-1, Slc26a6) contributes to intracellular pH regulation during H⁺-dipeptide transport in duodenal villous epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298(5): G683-91. doi: 10.1152/ajpgi.00293.2009
 34. Wang Z, Wang T, Petrovic S et al. (2005) Renal and intestinal transport defects in Slc26a6-null mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 288(4): C957-65. doi: 10.1152/ajpcell.00505.2004

-
35. Seidler U, Rottinghaus I, Hillesheim J et al. (2008) Sodium and chloride absorptive defects in the small intestine in Slc26a6 null mice. *Pflugers Arch* 455(4): 757–766. doi: 10.1007/s00424-007-0318-z
 36. Xia W, Yu Q, Riederer B et al. (2014) The distinct roles of anion transporters Slc26a3 (DRA) and Slc26a6 (PAT-1) in fluid and electrolyte absorption in the murine small intestine. *Pflugers Arch* 466(8): 1541–1556. doi: 10.1007/s00424-013-1381-2
 37. Jiang Z, Grichtchenko II, Boron WF et al. (2002) Specificity of anion exchange mediated by mouse Slc26a6. *J Biol Chem* 277(37): 33963–33967. doi: 10.1074/jbc.M202660200
 38. Xie Q, Welch R, Mercado A et al. (2002) Molecular characterization of the murine Slc26a6 anion exchanger: functional comparison with Slc26a1. *Am J Physiol Renal Physiol* 283(4): F826-38. doi: 10.1152/ajprenal.00079.2002
 39. Petrovic S, Wang Z, Ma L et al. (2002) Colocalization of the apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger PAT1 and gastric H-K-ATPase in stomach parietal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283(5): G1207-16. doi: 10.1152/ajpgi.00137.2002
 40. Kim HJ, Myers R, Sihm C-R et al. (2013) Slc26a6 functions as an electrogenic Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 100(3): 383–391. doi: 10.1093/cvr/cvt195
 41. Knauf F, Yang CL, Thomson RB et al. (2001) Identification of a chloride-formate exchanger expressed on the brush border membrane of renal proximal tubule cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(16): 9425–9430. doi: 10.1073/pnas.141241098
 42. Simpson JE, Schweinfest CW, Shull GE et al. (2007) PAT-1 (Slc26a6) is the predominant apical membrane Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger in the upper villous epithelium of the murine duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292(4): G1079-88. doi: 10.1152/ajpgi.00354.2006
 43. Tse CM, Brant SR, Walker MS et al. (1992) Cloning and sequencing of a rabbit cDNA encoding an intestinal and kidney-specific Na⁺/H⁺ exchanger isoform (NHE-3). *J Biol Chem* 267(13): 9340–9346
 44. Zachos NC, Tse M, Donowitz M (2005) Molecular physiology of intestinal Na⁺/H⁺ exchange. *Annu Rev Physiol* 67: 411–443. doi: 10.1146/annurev.physiol.67.031103.153004
 45. Schultheis PJ, Clarke LL, Meneton P et al. (1998) Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *Nat Genet* 19(3): 282–285. doi: 10.1038/969
 46. Tse CM, Levine SA, Yun CH et al. (1993) Cloning and expression of a rabbit cDNA encoding a serum-activated ethylisopropylamiloride-resistant epithelial Na⁺/H⁺ exchanger isoform (NHE-2). *J Biol Chem* 268(16): 11917–11924

-
47. McSwine RL, Musch MW, Bookstein C et al. (1998) Regulation of apical membrane Na⁺/H⁺ exchangers NHE2 and NHE3 in intestinal epithelial cell line C2/bbe. *Am J Physiol* 275(3 Pt 1): C693-701
 48. Schultheis PJ, Clarke LL, Meneton P et al. (1998) Targeted disruption of the murine Na⁺/H⁺ exchanger isoform 2 gene causes reduced viability of gastric parietal cells and loss of net acid secretion. *J Clin Invest* 101(6): 1243–1253. doi: 10.1172/JCI1249
 49. Gawenis LR, Stien X, Shull GE et al. (2002) Intestinal NaCl transport in NHE2 and NHE3 knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282(5): G776-84. doi: 10.1152/ajpgi.00297.2001
 50. Ledoussal C, Woo AL, Miller ML et al. (2001) Loss of the NHE2 Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger has no apparent effect on diarrheal state of NHE3-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281(6): G1385-96
 51. Bookstein C, DePaoli AM, Xie Y et al. (1994) Na⁺/H⁺ exchangers, NHE-1 and NHE-3, of rat intestine. Expression and localization. *J Clin Invest* 93(1): 106–113. doi: 10.1172/JCI116933
 52. Orłowski J, Kandasamy RA, Shull GE (1992) Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na/H exchanger NHE-1 and two structurally related proteins. *J Biol Chem* 267(13): 9331–9339
 53. Dudeja PK, Rao DD, Syed I et al. (1996) Intestinal distribution of human Na⁺/H⁺ exchanger isoforms NHE-1, NHE-2, and NHE-3 mRNA. *Am J Physiol* 271(3 Pt 1): G483-93
 54. Cinar A, Chen M, Riederer B et al. (2007) NHE3 inhibition by cAMP and Ca²⁺ is abolished in PDZ-domain protein PDZK1-deficient murine enterocytes. *J Physiol* 581(Pt 3): 1235–1246. doi: 10.1113/jphysiol.2007.131722
 55. Wang CY, Liu S, Xie XN, Tan ZR et al. (2017) Regulation profile of the intestine peptide transporter 1 (PepT1)
 56. Jappar D, Wu SP, Hu Y, Smith DE (2010) Significance and regional dependency of peptide transporter (PEPT) 1 in the intestinal permeability of glycylsarcosine: in situ single-pass perfusion studies in wild-type and Pept1 knockout mice
 57. Ogihara H, Saito H, Shin BC, Terado T, Takenoshita S, Nagamachi Y, Inui K, Takata K. (1996) Immuno-localization of H⁺/peptide cotransporter in rat digestive tract

-
58. Terada T, Shimada Y, Pan X, Kishimoto K, Sakurai T, Doi R, Onodera H, Katsura T, Imamura M, Inui K (2005) Expression profiles of various transporters for oligopeptides amino acids and organic ions along the human digestive tract
 59. Ingersoll SA, Ayyadurai S, Charania MA, Laroui H, Yan Y, Merlin D (2012) The role and pathophysiological relevance of membrane transporter PepT1 in intestinal inflammation and inflammatory bowel disease
 60. Newstead S (2015) Molecular insights into proton coupled peptide transport in the PTR family of oligopeptide transporters
 61. Watanabe C, Kato Y, Ito S, Kubo Y, Sai Y, Tsuji A (2005) Na⁺/H⁺ exchanger 3 affects transport property of H⁺/oligopeptide transporter 1
 62. Kennedy DJ, Leibach FH, Ganapathy V, Thwaites DT (2002) Optimal absorptive transport of the dipeptide glycylsarcosine is dependent on functional Na⁺/H⁺ exchange activity
 63. Gortner L, Meyer S, Sitzmann FC (2012) Pädiatrie: 304 Tabellen ; [plus DVD mit Video-filmen], 4., vollst. überarb. und erw. Aufl. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart
 64. Thiagarajah JR, Verkman AS (2003) CFTR pharmacology and its role in intestinal fluid secretion. *Curr Opin Pharmacol* 3(6): 594–599
 65. Field M (1971) Ion transport in rabbit ileal mucosa. II. Effects of cyclic 3', 5'-AMP. *Am J Physiol* 221(4): 992–997
 66. Guandalini S, Rao MC, Smith PL et al. (1982) cGMP modulation of ileal ion transport: in vitro effects of Escherichia coli heat-stable enterotoxin. *Am J Physiol* 243(1): G36-41
 67. Donowitz M, Asarkof N (1982) Calcium dependence of basal electrolyte transport in rabbit ileum. *Am J Physiol* 243(1): G28-35
 68. Liu J, Walker NM, Cook MT et al. (2012) Functional Cftr in crypt epithelium of organotypic enteroid cultures from murine small intestine. *Am J Physiol Cell Physiol* 302(10): C1492-503. doi: 10.1152/ajpcell.00392.2011
 69. Simpson JE, Gawenis LR, Walker NM et al. (2005) Chloride conductance of CFTR facilitates basal Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in the villous epithelium of intact murine duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288(6): G1241-51. doi: 10.1152/ajpgi.00493.2004
 70. Ko SBH, Shcheynikov N, Choi JY et al. (2002) A molecular mechanism for aberrant CFTR-dependent HCO₃⁻ transport in cystic fibrosis. *EMBO J* 21(21): 5662–5672
 71. Ko SBH, Zeng W, Dorwart MR et al. (2004) Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporters. *Nat Cell Biol* 6(4): 343–350. doi: 10.1038/ncb1115
 72. Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC et al. (1995) CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* 269(5225): 847–850

-
73. Gawenis LR, Franklin CL, Simpson JE et al. (2003) cAMP inhibition of murine intestinal Na/H exchange requires CFTR-mediated cell shrinkage of villus epithelium. *Gastroenterology* 125(4): 1148–1163
 74. Ameen NA, Ardito T, Kashgarian M et al. (1995) A unique subset of rat and human intestinal villus cells express the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Gastroenterology* 108(4): 1016–1023
 75. Strong TV, Boehm K, Collins FS (1994) Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA in the human gastrointestinal tract by in situ hybridization. *J Clin Invest* 93(1): 347–354. doi: 10.1172/JCI116966
 76. Miwa S, Nakajima T, Murai Y et al. (2008) Mutation assay of the novel gene DOG1 in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *J Gastroenterol* 43(7): 531–537. doi: 10.1007/s00535-008-2195-4
 77. West RB, Corless CL, Chen X et al. (2004) The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. *Am J Pathol* 165(1): 107–113. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63279-8
 78. Yang YD, Cho H, Koo JY et al. (2008) TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* 455(7217): 1210–1215. doi: 10.1038/nature07313
 79. Rock JR, O'Neal WK, Gabriel SE et al. (2009) Transmembrane protein 16A (TMEM16A) is a Ca²⁺-regulated Cl⁻ secretory channel in mouse airways. *J Biol Chem* 284(22): 14875–14880. doi: 10.1074/jbc.C109.000869
 80. Dutta AK, Khimji A-k, Kresge C et al. (2011) Identification and functional characterization of TMEM16A, a Ca²⁺-activated Cl⁻ channel activated by extracellular nucleotides, in biliary epithelium. *J Biol Chem* 286(1): 766–776. doi: 10.1074/jbc.M110.164970
 81. Huang F, Rock JR, Harfe BD et al. (2009) Studies on expression and function of the TMEM16A calcium-activated chloride channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(50): 21413–21418. doi: 10.1073/pnas.0911935106
 82. Gomez-Pinilla PJ, Gibbons SJ, Bardsley MR et al. (2009) Ano1 is a selective marker of interstitial cells of Cajal in the human and mouse gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296(6): G1370-81. doi: 10.1152/ajpgi.00074.2009
 83. Mroz MS, Keely SJ (2012) Epidermal growth factor chronically upregulates Ca(2+)-dependent Cl(-) conductance and TMEM16A expression in intestinal epithelial cells. *J Physiol* 590(8): 1907–1920. doi: 10.1113/jphysiol.2011.226126

-
84. He Q, Halm ST, Zhang J et al. (2011) Activation of the basolateral membrane Cl⁻ conductance essential for electrogenic K⁺ secretion suppresses electrogenic Cl⁻ secretion. *Exp Physiol* 96(3): 305–316. doi: 10.1113/expphysiol.2010.055038
 85. Hwang SJ, Blair PJA, Britton FC et al. (2009) Expression of anoctamin 1/TMEM16A by interstitial cells of Cajal is fundamental for slow wave activity in gastrointestinal muscles. *J Physiol* 587(Pt 20): 4887–4904. doi: 10.1113/jphysiol.2009.176198
 86. Zhu MH, Kim TW, Ro S et al. (2009) A Ca²⁺-activated Cl⁻ conductance in interstitial cells of Cajal linked to slow wave currents and pacemaker activity. *J Physiol* 587(Pt 20): 4905–4918. doi: 10.1113/jphysiol.2009.176206
 87. Ousingsawat J, Martins JR, Schreiber R et al. (2009) Loss of TMEM16A causes a defect in epithelial Ca²⁺-dependent chloride transport. *J Biol Chem* 284(42): 28698–28703. doi: 10.1074/jbc.M109.012120
 88. Lamprecht G, Seidler U (2006) The emerging role of PDZ adapter proteins for regulation of intestinal ion transport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291(5): G766-77. doi: 10.1152/ajpgi.00135.2006
 89. Harris BZ, Lim WA (2001) Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci* 114(Pt 18): 3219–3231
 90. Bannert K (2013) Gehört Sorting Nexin 27 (SNX27) zur NHERF-Familie? (Masterarbeit): Bindungsstudien an den intestinalen Anionenaustauscher DRA (SLC26A3)
 91. Grant BD, Donaldson JG (2009) Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(9): 597–608. doi: 10.1038/nrm2755
 92. Donowitz M, Cha B, Zachos NC et al. (2005) NHERF family and NHE3 regulation. *J Physiol* 567(Pt 1): 3–11. doi: 10.1113/jphysiol.2005.090399
 93. Rincón E, Sáez de Guinoa J, Gharbi SI et al. (2011) Translocation dynamics of sorting nexin 27 in activated T cells. *J Cell Sci* 124(Pt 5): 776–788. doi: 10.1242/jcs.072447
 94. Lohi H, Lamprecht G, Markovich D et al. (2003) Isoforms of SLC26A6 mediate anion transport and have functional PDZ interaction domains. *Am J Physiol Cell Physiol* 284(3): C769-79. doi: 10.1152/ajpcell.00270.2002
 95. Gisler SM, Pribanic S, Bacic D et al. (2003) PDZK1: I. a major scaffold in brush borders of proximal tubular cells. *Kidney Int* 64(5): 1733–1745. doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00266.x
 96. Yun CH, Oh S, Zizak M et al. (1997) cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na⁺/H⁺ exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(7): 3010–3015

-
97. Moyer BD, Denton J, Karlson KH et al. (1999) A PDZ-interacting domain in CFTR is an apical membrane polarization signal. *J Clin Invest* 104(10): 1353–1361. doi: 10.1172/JCI7453
 98. Cheng J, Moyer BD, Milewski M et al. (2002) A Golgi-associated PDZ domain protein modulates cystic fibrosis transmembrane regulator plasma membrane expression. *J Biol Chem* 277(5): 3520–3529. doi: 10.1074/jbc.M110177200
 99. Raghuram V, Mak DO, Foskett JK (2001) Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator single-channel gating by bivalent PDZ-domain-mediated interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(3): 1300–1305. doi: 10.1073/pnas.031538898
 100. Cinar A, Chen M, Riederer B, Hogema B, de Jonge H, Donowitz M, Weinman EJ, Kocher O, Seidler U (ed) Differential effects of PDZ-adaptorprotein NHERF1, E3KARP and PDZK1 knockout on the regulation of NHE3 transport activity in native murine colonic epithelium (abstract)
 101. Yun CH, Lamprecht G, Forster DV et al. (1998) NHE3 kinase A regulatory protein E3KARP binds the epithelial brush border Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 and the cytoskeletal protein ezrin. *J Biol Chem* 273(40): 25856–25863
 102. Kim JH, Lee-Kwon W, Park JB et al. (2002) Ca²⁺-dependent inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger 3 (NHE3) requires an NHE3-E3KARP- α -actinin-4 complex for oligomerization and endocytosis. *J Biol Chem* 277(26): 23714–23724. doi: 10.1074/jbc.M200835200
 103. Sun F, Hug MJ, Lewarchik CM et al. (2000) E3KARP mediates the association of ezrin and protein kinase A with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway cells. *J Biol Chem* 275(38): 29539–29546. doi: 10.1074/jbc.M004961200
 104. Swiatecka-Urban A, Duhaime M, Coutermarsh B et al. (2002) PDZ domain interaction controls the endocytic recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 277(42): 40099–40105. doi: 10.1074/jbc.M206964200
 105. Rossmann H, Jacob P, Baisch S et al. (2005) The CFTR associated protein CAP70 interacts with the apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger DRA in rabbit small intestinal mucosa. *Biochemistry* 44(11): 4477–4487. doi: 10.1021/bi048828b
 106. Wang S, Yue H, Derin RB et al. (2000) Accessory protein facilitated CFTR-CFTR interaction, a molecular mechanism to potentiate the chloride channel activity. *Cell* 103(1): 169–179
 107. Cinar A, Hillesheim J, Tuo B et al. (2005) The PDZ-domain binding protein PDZK1/CAP70 is involved in the regulation of murine intestinal NHE3 and CFTR function. *Z Gastroenterol* 43(05). doi: 10.1055/s-2005-919844

-
108. Scott RO, Thelin WR, Milgram SL (2002) A novel PDZ protein regulates the activity of guanylyl cyclase C, the heat-stable enterotoxin receptor. *J Biol Chem* 277(25): 22934–22941. doi: 10.1074/jbc.M202434200
 109. Cullen PJ (2008) Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(7): 574–582. doi: 10.1038/nrm2427
 110. Lauffer BEL, Melero C, Temkin P et al. (2010) SNX27 mediates PDZ-directed sorting from endosomes to the plasma membrane. *J Cell Biol* 190(4): 565–574. doi: 10.1083/jcb.201004060
 111. Singh V, Yang J, Cha B et al. (2015) Sorting nexin 27 regulates basal and stimulated brush border trafficking of NHE3. *Mol Biol Cell* 26(11): 2030–2043. doi: 10.1091/mbc.E14-12-1597
 112. Matarese LE, Jeppesen PB, O'Keefe SJD (2014) Short bowel syndrome in adults: the need for an interdisciplinary approach and coordinated care. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 38(1 Suppl): 60S-64S. doi: 10.1177/0148607113518946
 113. Jeppesen PB (2014) Spectrum of short bowel syndrome in adults: intestinal insufficiency to intestinal failure. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 38(1 Suppl): 8S-13S. doi: 10.1177/0148607114520994
 114. Pironi L, Arends J, Bozzetti F et al. (2016) ESPEN guidelines on chronic intestinal failure in adults. *Clin Nutr* 35(2): 247–307. doi: 10.1016/j.clnu.2016.01.020
 115. Nightingale J, Woodward JM (2006) Guidelines for management of patients with a short bowel. *Gut* 55 Suppl 4: iv1-12. doi: 10.1136/gut.2006.091108
 116. Tappenden KA (2014) Intestinal adaptation following resection. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 38(1 Suppl): 23S-31S. doi: 10.1177/0148607114525210
 117. Appleton GV, Bristol JB, Williamson RC (1987) Proximal enterectomy provides a stronger systemic stimulus to intestinal adaptation than distal enterectomy. *Gut* 28 Suppl: 165–168
 118. Thompson JS, Quigley EM, Adrian TE (1999) Factors affecting outcome following proximal and distal intestinal resection in the dog: an examination of the relative roles of mucosal adaptation, motility, luminal factors, and enteric peptides. *Dig Dis Sci* 44(1): 63–74
 119. Horn F, Moc I, Ziegler P et al. (2015) *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium*, 6., überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, Stuttgart, New York

-
120. Rouyer-Fessard C, Gammeltoft S, Laburthe M (1990) Expression of two types of receptor for insulinlike growth factors in human colonic epithelium. *Gastroenterology* 98(3): 703–707
121. Termanini B, Nardi RV, Finan TM et al. (1990) Insulinlike growth factor I receptors in rabbit gastrointestinal tract. Characterization and autoradiographic localization. *Gastroenterology* 99(1): 51–60
122. Schober DA, Simmen FA, Hadsell DL et al. (1990) Perinatal expression of type I IGF receptors in porcine small intestine. *Endocrinology* 126(2): 1125–1132. doi: 10.1210/endo-126-2-1125
123. Laburthe M, Rouyer-Fessard C, Gammeltoft S (1988) Receptors for insulin-like growth factors I and II in rat gastrointestinal epithelium. *Am J Physiol* 254(3 Pt 1): G457-62
124. Ye F, Chevrier AM, Langlois D et al. (1998) Insulin-like growth factor I receptors are expressed by the enteroendocrine cell line STC-1: relationship with proliferation and cholecystokinin expression. *Horm Res* 50(3): 183–189
125. Munroe DG, Gupta AK, Kooshesh F et al. (1999) Prototypic G protein-coupled receptor for the intestinotrophic factor glucagon-like peptide 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(4): 1569–1573
126. Walsh NA, Yusta B, DaCambre MP et al. (2003) Glucagon-like peptide-2 receptor activation in the rat intestinal mucosa. *Endocrinology* 144(10): 4385–4392. doi: 10.1210/en.2003-0309
127. Heer J de, Pedersen J, Orskov C et al. (2007) The alpha cell expresses glucagon-like peptide-2 receptors and glucagon-like peptide-2 stimulates glucagon secretion from the rat pancreas. *Diabetologia* 50(10): 2135–2142. doi: 10.1007/s00125-007-0761-6
128. Yusta B, Huang L, Munroe D et al. (2000) Enteroendocrine localization of GLP-2 receptor expression in humans and rodents. *Gastroenterology* 119(3): 744–755
129. Guan X, Karpen HE, Stephens J et al. (2006) GLP-2 receptor localizes to enteric neurons and endocrine cells expressing vasoactive peptides and mediates increased blood flow. *Gastroenterology* 130(1): 150–164. doi: 10.1053/j.gastro.2005.11.005
130. Orskov C, Hartmann B, Poulsen SS et al. (2005) GLP-2 stimulates colonic growth via KGF, released by subepithelial myofibroblasts with GLP-2 receptors. *Regul Pept* 124(1-3): 105–112. doi: 10.1016/j.regpep.2004.07.009
131. Pedersen J, Pedersen NB, Brix SW et al. (2015) The glucagon-like peptide 2 receptor is expressed in enteric neurons and not in the epithelium of the intestine. *Peptides* 67: 20–28. doi: 10.1016/j.peptides.2015.02.007

-
132. Leen JLS, Izzo A, Upadhyay C et al. (2011) Mechanism of action of glucagon-like peptide-2 to increase IGF-I mRNA in intestinal subepithelial fibroblasts. *Endocrinology* 152(2): 436–446. doi: 10.1210/en.2010-0822
133. Alexander AN, Carey HV (1999) Oral IGF-I enhances nutrient and electrolyte absorption in neonatal piglet intestine. *Am J Physiol* 277(3 Pt 1): G619-25
134. Ohneda K, Ulshen MH, Fuller CR et al. (1997) Enhanced growth of small bowel in transgenic mice expressing human insulin-like growth factor I. *Gastroenterology* 112(2): 444–454
135. Burrin DG, Wester TJ, Davis TA et al. (1996) Orally administered IGF-I increases intestinal mucosal growth in formula-fed neonatal pigs. *Am J Physiol* 270(5 Pt 2): R1085-91
136. Gillingham MB, Dahly EM, Murali SG et al. (2003) IGF-I treatment facilitates transition from parenteral to enteral nutrition in rats with short bowel syndrome. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284(2): R363-71. doi: 10.1152/ajpregu.00247.2002
137. Pucilowska JB, McNaughton KK, Mohapatra NK et al. (2000) IGF-I and procollagen alpha1(I) are coexpressed in a subset of mesenchymal cells in active Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279(6): G1307-22
138. Fiocchi C, Lund PK (2011) Themes in fibrosis and gastrointestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300(5): G677-83. doi: 10.1152/ajpgi.00104.2011
139. Brubaker PL, Anini Y (2003) Direct and indirect mechanisms regulating secretion of glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-2. *Can J Physiol Pharmacol* 81(11): 1005–1012. doi: 10.1139/y03-107
140. Connor EE, Evock-Clover CM, Wall EH et al. (2016) Glucagon-like peptide 2 and its beneficial effects on gut function and health in production animals. *Domest Anim Endocrinol* 56 Suppl: S56-65. doi: 10.1016/j.domaniend.2015.11.008
141. Liu X, Murali SG, Holst JJ et al. (2008) Enteral nutrients potentiate the intestinotropic action of glucagon-like peptide-2 in association with increased insulin-like growth factor-I responses in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295(6): R1794-802. doi: 10.1152/ajpregu.90616.2008
142. Xiao Q, Boushey RP, Drucker DJ et al. (1999) Secretion of the intestinotropic hormone glucagon-like peptide 2 is differentially regulated by nutrients in humans. *Gastroenterology* 117(1): 99–105
143. Thulesen J, Hartmann B, Hare KJ et al. (2004) Glucagon-like peptide 2 (GLP-2) accelerates the growth of colonic neoplasms in mice. *Gut* 53(8): 1145–1150. doi: 10.1136/gut.2003.035212

-
144. Hartmann B, Harr MB, Jeppesen PB et al. (2000) In vivo and in vitro degradation of glucagon-like peptide-2 in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85(8): 2884–2888. doi: 10.1210/jcem.85.8.6717
145. Drucker DJ, Erlich P, Asa SL et al. (1996) Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(15): 7911–7916
146. Tsai CH, Hill M, Drucker DJ (1997) Biological determinants of intestinotrophic properties of GLP-2 in vivo. *Am J Physiol* 272(3 Pt 1): G662-8
147. Tsai CH, Hill M, Asa SL et al. (1997) Intestinal growth-promoting properties of glucagon-like peptide-2 in mice. *Am J Physiol* 273(1 Pt 1): E77-84
148. Burrin DG, Stoll B, Guan X et al. (2005) Glucagon-like peptide 2 dose-dependently activates intestinal cell survival and proliferation in neonatal piglets. *Endocrinology* 146(1): 22–32. doi: 10.1210/en.2004-1119
149. Yusta B, Boushey RP, Drucker DJ (2000) The glucagon-like peptide-2 receptor mediates direct inhibition of cellular apoptosis via a cAMP-dependent protein kinase-independent pathway. *J Biol Chem* 275(45): 35345–35352. doi: 10.1074/jbc.M005510200
150. Jeppesen PB, Hartmann B, Thulesen J et al. (2001) Glucagon-like peptide 2 improves nutrient absorption and nutritional status in short-bowel patients with no colon. *Gastroenterology* 120(4): 806–815
151. Thymann T, Stoll B, Mecklenburg L et al. (2014) Acute effects of the glucagon-like peptide 2 analogue, teduglutide, on intestinal adaptation in short bowel syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 58(6): 694–702. doi: 10.1097/MPG.0000000000000295
152. Buchman AL, Katz S, Fang JC et al. (2010) Teduglutide, a novel mucosally active analog of glucagon-like peptide-2 (GLP-2) for the treatment of moderate to severe Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 16(6): 962–973. doi: 10.1002/ibd.21117
153. Dube PE, Forse CL, Bahrami J et al. (2006) The essential role of insulin-like growth factor-1 in the intestinal tropic effects of glucagon-like peptide-2 in mice. *Gastroenterology* 131(2): 589–605. doi: 10.1053/j.gastro.2006.05.055
154. Rowland KJ, Trivedi S, Lee D et al. (2011) Loss of glucagon-like peptide-2-induced proliferation following intestinal epithelial insulin-like growth factor-1-receptor deletion. *Gastroenterology* 141(6): 2166-2175.e7. doi: 10.1053/j.gastro.2011.09.014
155. Dong CX, Zhao W, Solomon C et al. (2014) The intestinal epithelial insulin-like growth factor-1 receptor links glucagon-like peptide-2 action to gut barrier function. *Endocrinology* 155(2): 370–379. doi: 10.1210/en.2013-1871

-
156. Biswas A, Kobayashi KS (2013) Regulation of intestinal microbiota by the NLR protein family. *Int Immunol* 25(4): 207–214. doi: 10.1093/intimm/dxs116
157. Sidiq T, Yoshihama S, Downs I et al. (2016) Nod2: A Critical Regulator of Ileal Microbiota and Crohn's Disease. *Front Immunol* 7: 367. doi: 10.3389/fimmu.2016.00367
158. Strober W, Watanabe T (2011) NOD2, an intracellular innate immune sensor involved in host defense and Crohn's disease. *Mucosal Immunol* 4(5): 484–495. doi: 10.1038/mi.2011.29
159. Ikeuchi T, Nakamura T, Fukumoto S et al. (2013) A vitamin D3 analog augmented interleukin-8 production by human monocytic cells in response to various microbe-related synthetic ligands, especially NOD2 agonistic muramyl dipeptide. *Int Immunopharmacol* 15(1): 15–22. doi: 10.1016/j.intimp.2012.10.027
160. Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N et al. (2002) Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* 277(44): 41701–41705. doi: 10.1074/jbc.M206473200
161. Uehara A, Fujimoto Y, Fukase K et al. (2007) Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Mol Immunol* 44(12): 3100–3111. doi: 10.1016/j.molimm.2007.02.007
162. Lala S, Ogura Y, Osborne C et al. (2003) Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* 125(1): 47–57
163. Ogura Y, Lala S, Xin W et al. (2003) Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* 52(11): 1591–1597
164. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N et al. (2001) A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411(6837): 603–606. doi: 10.1038/35079114
165. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H et al. (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411(6837): 599–603. doi: 10.1038/35079107
166. Lesage S, Zouali H, Cezard J-P et al. (2002) CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 70(4): 845–857. doi: 10.1086/339432
167. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E et al. (2005) Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(50): 18129–18134. doi: 10.1073/pnas.0505256102

-
168. Liu T-C, Gurram B, Baldrige MT et al. (2016) Paneth cell defects in Crohn's disease patients promote dysbiosis. *JCI Insight* 1(8): e86907. doi: 10.1172/jci.insight.86907
169. Wehkamp J, Schmid M, Fellermann K et al. (2005) Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease. *J Leukoc Biol* 77(4): 460–465. doi: 10.1189/jlb.0904543
170. Elphick D, Liddell S, Mahida YR (2008) Impaired luminal processing of human defensin-5 in Crohn's disease: persistence in a complex with chymotrypsinogen and trypsin. *Am J Pathol* 172(3): 702–713. doi: 10.2353/ajpath.2008.070755
171. Petnicki-Ocwieja T, Hrnčir T, Liu Y-J et al. (2009) Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(37): 15813–15818. doi: 10.1073/pnas.0907722106
172. Rehman A, Sina C, Gavrilova O et al. (2011) Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut* 60(10): 1354–1362. doi: 10.1136/gut.2010.216259
173. Schaffler H, Kaschitzki A, Alberts C et al. (2016) Alterations in the mucosa-associated bacterial composition in Crohn's disease: a pilot study. *Int J Colorectal Dis* 31(5): 961–971. doi: 10.1007/s00384-016-2548-z
174. Schaffler H, Schneider N, Hsieh C-J et al. (2013) NOD2 mutations are associated with the development of intestinal failure in the absence of Crohn's disease. *Clin Nutr* 32(6): 1029–1035. doi: 10.1016/j.clnu.2013.02.014
175. Fishbein T, Novitskiy G, Mishra L et al. (2008) NOD2-expressing bone marrow-derived cells appear to regulate epithelial innate immunity of the transplanted human small intestine. *Gut* 57(3): 323–330. doi: 10.1136/gut.2007.133322
176. Schaffler H, Teufel M, Fleischer S et al. (2014) Two patients with intestinal failure requiring home parenteral nutrition, a NOD2 mutation and tuberculous lymphadenitis. *BMC Gastroenterol* 14: 43. doi: 10.1186/1471-230X-14-43
177. Artman L, Dormoy-Raclet V, Roretz C von et al. (2014) Planning your every move: the role of beta-actin and its post-transcriptional regulation in cell motility. *Semin Cell Dev Biol* 34: 33–43. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.05.012
178. Bunnell TM, Burbach BJ, Shimizu Y et al. (2011) beta-Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. *Mol Biol Cell* 22(21): 4047–4058. doi: 10.1091/mbc.E11-06-0582
179. Perrin BJ, Ervasti JM (2010) The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67(10): 630–634. doi: 10.1002/cm.20475

-
180. Ku NO, Zhou X, Toivola DM et al. (1999) The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease. *Am J Physiol* 277(6 Pt 1): G1108-37
181. Flint N, Pemberton PW, Lobley RW et al. (1994) Cytokeratin expression in epithelial cells isolated from the crypt and villus regions of the rodent small intestine. *Epithelial Cell Biol* 3(1): 16–23
182. Weng Y-R, Cui Y, Fang J-Y (2012) Biological functions of cytokeratin 18 in cancer. *Mol Cancer Res* 10(4): 485–493
183. Friederich, E., Pringault, E., Arpin, M., Louvard, D. From the structure to the function of villin, an actin-binding protein of the brush border. *BioEssays* 12, 403–408 (1990)
184. Rifai N (2009) *Clinical Chemistry*. Volume 55, Number 4: 601–844
185. Tajadini M, Panjehpour M, Javanmard SH (2014) Comparison of SYBR Green and Taq-Man methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Adv Biomed Res* 3: 85. doi: 10.4103/2277-9175.127998
186. Malakooti J, Dahdal RY, Schmidt L et al. (1999) Molecular cloning, tissue distribution, and functional expression of the human Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger NHE2. *Am J Physiol* 277(2 Pt 1): G383-90
187. Bookstein C, Xie Y, Rabenau K et al. (1997) Tissue distribution of Na⁺/H⁺ exchanger isoforms NHE2 and NHE4 in rat intestine and kidney. *Am J Physiol* 273(5 Pt 1): C1496-505
188. Ko E-A, Jin B-J, Namkung W et al. (2014) Chloride channel inhibition by a red wine extract and a synthetic small molecule prevents rotaviral secretory diarrhoea in neonatal mice. *Gut* 63(7): 1120–1129. doi: 10.1136/gutjnl-2013-305663
189. Ousingsawat J, Mirza M, Tian Y et al. (2011) Rotavirus toxin NSP4 induces diarrhea by activation of TMEM16A and inhibition of Na⁺ absorption. *Pflugers Arch* 461(5): 579–589. doi: 10.1007/s00424-011-0947-0
190. Sugiura T, Kato Y, Wakayama T, Silver DL, Kubo Y, Iseki S, Tsuji A (2008) PDZK1 regulates two intestinal solute carriers (Slc15a1 and Slc22a5) in mice

8 ANHANG

8.1 Abkürzungsverzeichnis

cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
ANO1	Anoctamin 1
ATPase	Adenosintriphosphatase
CaCC	Ca ²⁺ -abhängiger Chloridkanal
CARD	Caspase Activation and Recruitment Domain
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CLD	Chloride Losing Diarrhea
CT	Threshold Cycle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DRA	Down Regulated in Adenoma
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENaC	Epithelial Na ⁺ -Channel
ERM	Ezrin-Radixin-Moesin
GLP2	Glucagon Like Peptid
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
IGF1	Insulin Growth Factor 1
IKEPP	Intestinal and Kidney Enriched PDZ Protein
KGF	Keratinocyte Growth Factor
KDS	Kurzdarmsyndrom
KO	Knockout
LRR	Leucine Rich Repeats

MW	Mittelwert
NHE3	Na ⁺ -H ⁺ -Exchanger 3
NHERF	Na ⁺ -H ⁺ -Exchanger Regulatory Factor
NO	Stickstoffmonoxid
NTC	Non Template Control
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
NOD2	Nucleotide Binding Oligomerization Domain 2
PAT1	Putative Anion Transporter 1
PCR	Polymerase Chain Reaction
qPCR	quantitative real-time Polymerase Chain Reaction
PDZ	PSD95, DLG, ZO-1
PDZK1	PDZ Domain Protein Kidney 1
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger RNA
RT	Reverse Transkriptase
SD	Standardabweichung
SNX27	Sorting Nexin 27
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VIP	Vasoaktives Intestinales Polypeptid
WT	Wildtyp
ZK-18	Zytokeratin 18

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Darms.....	1
Abbildung 2: Histologischer Aufbau des Darms.....	2
Abbildung 3: Transportproteine der elektroneutralen NaCl-Absorption.....	4
Abbildung 4: Transportproteine der elektrogenen Cl ⁻ -Sekretion.....	8
Abbildung 5: Darstellung der PDZ-Adapterproteine.....	10
Abbildung 6: Wirkung durch GLP2.....	16
Abbildung 7: Färbung mit ZK-18 (Ileum der Maus)	19
Abbildung 8: Färbung mit Villin (Ileum der Maus)	20
Abbildung 9: Gelelektrophoretische Auftrennung der Probe.....	24
Abbildung 10: Schmelzkurvenanalyse.....	28
Abbildung 11: Amplifikationskurven einer Verdünnungsreihe.....	33
Abbildung 12: CT-Werte als Funktion der Plasmidkonzentration.....	33
Abbildung 13: Intestinale Genexpression der Haushaltsgene.....	37
Abbildung 14: Intestinale Genexpression von <i>beta</i> -Aktin.....	38
Abbildung 15: Intestinale Genexpression von Villin.....	39
Abbildung 16: Intestinale Genexpression von ZK-18.....	40
Abbildung 17: Intestinale Genexpression von DRA.....	41
Abbildung 18: Intestinale Genexpression von PAT1.....	42
Abbildung 19: Intestinale Genexpression von NHE3.....	43
Abbildung 20: Intestinale Genexpression von CFTR.....	44
Abbildung 21: Intestinale Genexpression von ANO1.....	45

Abbildung 22: Intestinale Genexpression von NHERF1.....	46
Abbildung 23: Intestinale Genexpression von NHERF2.....	47
Abbildung 24: Intestinale Genexpression von PDZK1.....	48
Abbildung 25: Intestinale Genexpression von IKEPP.....	49
Abbildung 26: Intestinale Genexpression von SNX27.....	50
Abbildung 27: Intestinale Genexpression vom IGF1-Rezeptor.....	51
Abbildung 28: Intestinale Genexpression von GLP2-Rezeptor.....	52
Abbildung 29: Intestinale Genexpression der Transportproteine.....	54
Abbildung 30: Intestinale Genexpression der Adapterproteine und Rezeptoren...	55

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des Agarosegels.....	24
Tabelle 2: Mastermix für die cDNA-Synthese.....	25
Tabelle 3: Temperaturprotokoll der cDNA-Synthese.....	25
Tabelle 4: PCR-Protokoll für SYBR® Green.....	27
Tabelle 5: PCR-Ansatz für SYBR® Green mit cDNA.....	28
Tabelle 6: Verwendete Primer, Schmelztemperaturen der Primer und der Amplifikate...	29
Tabelle 7: Schema zur Optimierung der Primerkonzentration.....	30
Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Klone.....	31
Tabelle 9: PCR-Ansatz für SYBR® Green mit Plasmid-DNA.....	31
Tabelle 10: Verwendete Primerkonzentration und Primereffizienz.....	34
Tabelle 11: Temperaturprotokoll für TaqMan®.....	35
Tabelle 12: PCR-Ansatz für TaqMan®.....	35
Tabelle 13: Verwendete TaqMan®-Sonden.....	35

8.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum	31.05.1990
Geburtsort	Henstedt-Ulzburg
Familienstand	ledig, keine Kinder

Schullaufbahn

08/1996 - 06/2000	Grundschule Rothestraße (Hamburg)
08/2000 - 06/2009	Gymnasium Christianeum (Hamburg)
06/2009	Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst und Tätigkeit als Pflegekraft

07/2009 - 04/2010	Zivildienst als Pflegekraft, Asklepios Klinik Altona (Hamburg)
06/2010 - 08/2010	Tätigkeit als Pflegekraft, Klinik Dr. Guth (Hamburg)

Studium

09/2010 - 06/2012	Studium der Humanmedizin an der Universität Pécs (Ungarn)
10/2012 - 11/2016	Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
12/2016	Approbation als Arzt

Publikationen

05/2015	The influence of NOD2 Gene Mutation on the Intestinal Adaptation and Peri-Operative Outcome in a Murine Model of Short Bowel Syndrome (Bodammer P., Witte M., Bannert K., Bastmeyer D., Bovensiepen K., Schaeffler H., Lamprecht G.) Fachjournal „Gastroenterology“ (Volume 148, Issue 4, Page S-330)
---------	--

Praktisches Jahr und klinische Tätigkeit als Arzt

11/2015 - 10/2016	Sana Hanse-Klinikum Wismar, Innere Medizin
03/2016 - 06/2016	Charite - Campus Benjamin Franklin, Chirurgie
06/2016 - 10/2016	Universitätsklinikum Rostock, Anästhesie
seit 09/2017	Assistenzarzt in der Abteilung für Innere Medizin, KH Reinbek

8.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich im Rahmen meiner Dissertation unterstützt haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Georg Lamprecht, der mir die Möglichkeit gegeben hat, eine Doktorarbeit im gastroenterologischen Labor der Universitätsmedizin anzufertigen. Insbesondere die ausführlichen und richtungsweisenden Gespräche haben wesentlich zum Erfolg dieser für mich hochinteressanten Arbeit beigetragen.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. rer. nat. Peggy Bodammer, die mich über die gesamte Zeit betreut hat. Von der praktischen Einarbeitung bis zur Fertigstellung der Dissertation war sie eine zuverlässige Ansprechpartnerin bei Fragen und Problemstellungen. Ihr Engagement und ihre fachliche Kompetenz haben maßgeblichen Anteil an dem Ergebnis dieser Arbeit.

Zudem möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen des gastroenterologischen Labors, Frau Dr. rer. hum. Karen Bannert, Frau Julia Glamann und Frau Katja Bovensiepen für ihre Unterstützung herzlich bedanken. Insbesondere bei Frau Bannert bedanke ich mich für die aufmerksame Hilfestellung bei speziellen Problemen und das Korrekturlesen.

Ein weiterer Dank geht an meinen Onkel Herrn Prof. Dr. rer. nat. Martin Bastmeyer für das Korrekturlesen und seine konstruktiven Ratschläge.

Nicht zuletzt möchte ich mich besonders bei meinen Eltern bedanken. Sie haben mich über das gesamte Medizinstudium hinweg finanziell und moralisch unterstützt. Darüber hinaus haben sie das Ergebnis der Dissertation durch Korrekturlesen und kritische Anmerkungen positiv beeinflusst.

Vielen Dank.

8.6 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt habe. Alle Informationen, die anderen Werken entnommen wurden, sind in der vorliegenden Arbeit durch eine Quellenangabe gekennzeichnet.

Hamburg, den 02.09.2019

Daniel Bastmeyer

9 THESEN

- (1) Der menschliche Darm nimmt durch Digestion und Resorption von Makronährstoffen, Elektrolyten und Wasser eine lebensnotwendige Funktion ein.
- (2) Intestinale Ionen-transportproteine spielen bei der Resorption von Elektrolyten und Wasser eine essentielle Bedeutung und werden durch Adapterproteine in ihrer Funktion reguliert.
- (3) Nach ausgedehnten Dünndarmresektionen kann es zu einem Kurzdarmsyndrom kommen, welches sich klinisch durch ausgeprägte Durchfälle, Fettstühle und spezifische Mangelerscheinungen präsentiert.
- (4) Eine Mutation des NOD2-Gens ist ein Risikofaktor für die Entstehung eines Kurzdarmsyndroms nach ausgedehnten Dünndarmresektionen.
- (5) Eine zentrale Rolle bei der strukturellen und funktionellen Adaptation der Darmmukosa nach Dünndarmresektionen besitzen die hormonellen Rezeptoren IGF1- und GLP2-Rezeptor.
- (6) In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Ionen-transportern und der hormonellen Rezeptoren IGF1- und GLP2-Rezeptor untersucht – bislang gibt es kaum detaillierte Expressionsstudien über intestinale Ionen-transporter und Adapterproteine sowie hormonelle Rezeptoren.
- (7) Die elektroneutrale Resorption von NaCl und Wasser findet durch eine Koppelung der Transportproteine DRA und NHE3 statt. DRA und NHE3 werden jeweils stark im Kolon exprimiert.
- (8) DRA war im Gegensatz zu NHE3 auch im Zökum lokalisiert. Die ungekoppelte Funktion von DRA im Zökum ist bislang noch ungeklärt.
- (9) Der IGF1- und der GLP2-Rezeptor zeigten ein homogenes Expressionsmuster auf der Darmlängsachse. Sie wurden ubiquitär exprimiert, wobei die Expression in den distalen Darmsegmenten zunahm.
- (10) In einigen Dünndarmabschnitten sowie im Bereich des Zökums wurde der GLP2-Rezeptor in WT-Mäusen signifikant stärker exprimiert als in NOD2-KO-Mäusen.
- (11) Der IGF1-Rezeptor wurde in WT-Mäusen tendenziell stärker exprimiert als in NOD2-KO-Mäusen.
- (12) Bei den Transport- und Adapterproteinen ergaben sich mit Ausnahme von NHE3 keine signifikanten Unterschiede bezüglich ihrer Expression in WT- und NOD2-Mäusen.