

Aus der Medizinischen Klinik I für  
Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

**Mechanismen der Diarrhoe bei der lymphozytären Kolitis  
und therapeutischer Effekt von Budesonid**

DISSERTATION

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Irene Erko, geb. Meier  
aus Karaganda

Gutachter:           1. Prof. Dr. med. Jörg-Dieter Schulzke  
                          2. Prof. Dr. med. Dr. phil. Gerhard Rogler  
                          3. Prof. Dr. med. Andreas Stallmach

Datum der Promotion: 09.09.2011

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>10</b>
1.1	<b>Mechanismen der Diarrhoe.....</b>	<b>10</b>
1.2	<b>Lymphozytäre Kolitis .....</b>	<b>11</b>
1.2.1	Historie, Epidemiologie, Klinik, Diagnostik .....	11
1.2.2	Ätiologie und Pathogenese .....	12
1.2.3	Therapie .....	14
1.3	<b>Zytokinprofil bei der mikroskopischen Kolitis .....</b>	<b>16</b>
1.4	<b>Zielstellung der Arbeit .....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
2.1	<b>Material .....</b>	<b>19</b>
2.1.1	Materialien und Geräte .....	19
2.1.2	Chemikalien.....	20
2.1.3	Puffer und Lösungen.....	21
2.1.4	Sonden .....	25
2.1.5	Antikörper.....	25
2.1.6	Software.....	25
2.2	<b>Methoden.....</b>	<b>26</b>
2.2.1	Prinzip.....	26
2.2.2	Biopsien aus dem menschlichen Sigma.....	26
2.2.3	Transport und Einspannen der Biopsien.....	27
2.2.4	Spät-distales Kolon der Ratte .....	27
2.2.5	Präparation und Einspannen des Epithels.....	28
2.3	<b>Versuchsstand – Miniaturisierte Ussing-Kammer .....</b>	<b>29</b>
2.3.1	Messkammer und Wärmetauscher.....	29
2.3.2	Elektrische Messanordnung.....	30
2.4	<b>Wechselstrom-Impedanzspektroskopie .....</b>	<b>32</b>
2.4.1	Prinzip der Impedanzmessung.....	32
2.4.2	Impedanz-Versuchsstand.....	33
2.5	<b>Versuchsablauf .....</b>	<b>34</b>
2.5.1	Badkorrektur und Elektrodenasymmetrie.....	34

2.5.2	Messung des Kurzschlussstroms .....	34
2.5.3	Bestimmung des aktiven elektrogenen Natrium-Transports an humanen Sigmabiopsien .....	35
2.5.4	Bestimmung des aktiven elektrogenen Natrium-Transports am spät-distalen Kolon der Ratte .....	37
2.5.5	Untersuchung der Viabilität des Epithels .....	37
2.5.6	Bestimmung der elektrischen Impedanz des Epithels .....	38
2.5.7	Messung von Mannitofluxen.....	38
<b>2.6</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>40</b>
2.6.1	Protein-Extraktion aus humanen Colon sigmoideum-Biopsien .....	40
2.6.2	Proteinquantifizierung .....	40
2.6.3	Proteinauftrennung durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.....	41
2.6.4	Protein-Elektrotransfer .....	42
2.6.5	Immunodetektion.....	43
2.6.6	Polymerase-Kettenreaktion .....	44
2.6.7	Extraktion der Gesamt-RNA aus Gewebe.....	45
2.6.8	Quantitative Bestimmung der mRNA .....	46
<b>2.7</b>	<b>Färbeverfahren.....</b>	<b>47</b>
2.7.1	Fixierung, Einbettung und Schnittverfahren .....	47
2.7.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	48
2.7.3	TUNEL-Färbung .....	48
2.7.4	Caspase-3-Färbung .....	49
2.7.5	DAPI-Kernfärbung.....	50
<b>2.8</b>	<b>Immunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie .....</b>	<b>50</b>
2.8.1	Immunfluoreszenz .....	50
2.8.2	Konfokale Mikroskopie.....	51
<b>2.9</b>	<b>Morphologische Veränderungen .....</b>	<b>52</b>
<b>2.10</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>53</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>54</b>
<b>3.1</b>	<b>Versuche an menschlichen Epithelien.....</b>	<b>54</b>
3.1.1	Wirkung von Aldosteron und Amilorid auf den elektrogenen Natrium-Transport .....	54

3.1.2	Wirkung von Aldosteron auf die mRNA-Expression der $\alpha$ -, $\beta$ - und $\gamma$ -Untereinheit des ENaC .....	58
3.1.3	Wechselstrom-Impedanz-Analyse der epithelialen Barrierefunktion .....	60
3.1.4	Parazelluläre Permeabilität in Abhängigkeit vom transmuralen, epithelialen und subepithelialen Widerstand.....	64
3.1.5	Expressionsveränderungen der Tight Junction-Proteine bei lymphozytärer Kolitis .....	65
3.1.6	Immunhistochemische Lokalisation der Tight Junction-Proteine Claudin-5 und Claudin-8 .....	68
3.1.7	Apoptoserate bei der lymphozytären Kolitis .....	70
3.1.8	Morphologische Veränderungen .....	73
<b>3.2</b>	<b>Wirkung von Aldosteron und Amilorid auf den elektrogenen Natrium-Transport am spät-distalen Kolon der Ratte unter dem Einfluss von Zytokinen .....</b>	<b>77</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>80</b>
<b>4.1</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse bei Patienten mit lymphozytärer Kolitis .....</b>	<b>80</b>
4.1.1	Gestörter elektrogener Natrium-Transport bei der lymphozytären Kolitis .....	80
4.1.2	Epitheliale Barrierefunktionsstörung bei der lymphozytären Kolitis.....	82
4.1.3	Veränderungen der epithelialen Tight Junction bei der lymphozytären Kolitis....	84
4.1.4	Epitheliale Apoptose.....	85
4.1.5	Mukosale Oberfläche des Darmes bei lymphozytärer Kolitis.....	86
4.1.6	Effekt von Budesonid bei lymphozytärer Kolitis .....	87
4.1.7	Mechanismen der Diarrhoe bei der lymphozytären Kolitis.....	87
<b>4.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse am Rattenmodell.....</b>	<b>89</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>92</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>94</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>101</b>
	Erklärung der Selbstständigkeit .....	101
	Lebenslauf .....	102
	Danksagung .....	103

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Behandlungsalgorithmus der lymphozytären Kolitis .....	14
Abb. 2:	Ussing-Versuchsstand mit Wärmetauscher, integrierter Begasung und Umwälzung .....	30
Abb. 3:	Elektrische Messanordnung bei den Ussing-Versuchen .....	31
Abb. 4:	Elektrischer Ersatzschaltkreis der Darmwand.....	33
Abb. 5:	Elektrogener transzellulärer Natrium-Transport im Kolon.....	36
Abb. 6:	Zeitverlauf des Kurzschlussstroms ( $I_{sc}$ ) im Sigma bei Kontrollen und bei lymphozytärer Kolitis nach Stimulation mit $3 \cdot 10^{-9}$ mol/l Aldosteron.....	55
Abb. 7:	Zeitverlauf des Kurzschlussstroms ( $I_{sc}$ ) im Sigma bei lymphozytärer Kolitis ohne und mit Therapie nach Stimulation mit $3 \cdot 10^{-9}$ mol/l Aldosteron .....	56
Abb. 8:	Aktiver elektrogener Natrium-Transport ( $\Delta I_{sc}$ ) im Sigma bei Kontrollen und bei lymphozytärer Kolitis.....	56
Abb. 9:	Zeitverlauf des Kurzschlussstroms ( $I_{sc}$ ) im Sigma bei lymphozytärer und kollagener Kolitis nach Stimulation mit $3 \cdot 10^{-9}$ mol/l Aldosteron.....	57
Abb. 10:	mRNA-Expression der ENaC-Untereinheiten $\alpha$ , $\beta$ und $\gamma$ .....	59
Abb. 11:	Originale Impedanz-Ortskurven (Nyquist-Diagramme) .....	63
Abb. 12:	Darstellung der Expression von Tight Junction-Proteinen bei Kontrollen und lymphozytärer Kolitis .....	66
Abb. 13:	Expressionsanalyse von Tight Junction-Proteinen bei Kontrollen, lymphozytärer Kolitis und behandelter lymphozytärer Kolitis .....	67
Abb. 14:	Immunfluoreszenz-Analyse der Tight Junction-Proteine Claudin-5 und Claudin-8.....	69
Abb. 15:	TUNEL-Färbung .....	71
Abb. 16:	Caspase-3-Färbung als Apoptosehinweis.....	72
Abb. 17:	Ki-67-Färbung .....	75
Abb. 18:	Konventionelle Histologie aus dem humanen Sigma.....	76
Abb. 19:	Zeitverlauf des Kurzschlussstroms ( $I_{sc}$ ) im spät-distalen Kolon der Ratte nach Präinkubation mit Zytokinen und Stimulation mit $3 \cdot 10^{-9}$ mol/l Aldosteron .....	78
Abb. 20:	Aktiver elektrogener Natrium-Transport ( $\Delta I_{sc}$ ) im spät-distalen Kolon der Ratte nach Präinkubation mit Zytokinen .....	79

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Pipettierschema zur Bestimmung des Proteingehalts mit dem Tecan Spectra Mikrotiterplatten-Photometer .....	41
Tab. 2:	Protokoll der reversen Transkription.....	46
Tab. 3:	Protokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung an Paraffinschnitten.....	48
Tab. 4:	Elektrische Widerstände im menschlichen Sigma .....	61
Tab. 5:	Mannitol-Fluxe in Abhängigkeit vom transmuralen, epithelialen und subepithelialen Widerstand.....	64
Tab. 6:	Epitheliale Apoptoserate .....	70
Tab. 7:	Resorptive Oberfläche .....	73

## Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche (cm <sup>2</sup> )
ADP	zyklisches 3,5-Adenyldiphosphat
AK	Antikörper
ATP	zyklisches 3,5-Adenyltriphosphat
BSA	Bovines Serum-Albumin
$\beta_{1,2,3,\dots}$	beta-Aktivität der kalten Abnahmen
$\beta_{\text{heiß}}$	beta-Aktivität der Probe von der heißen Seite
$\beta_{\text{leer}}$	beta-Aktivität von 1 ml Lösung ohne Zusatz eines $\beta$ -Strahlers
C <sup>e</sup>	Kapazität des Epithels (mF/cm <sup>2</sup> )
Cld	Claudin
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENaC	epithelialer Natrium-Kanal
ERK	Extracellular Signal-regulated Kinase
F <sub>k</sub>	Kammerfläche (cm <sup>2</sup> )
FKS	Fötales Kälberserum
G <sup>t</sup>	transmurale Gewebeleitfähigkeit (mS·cm <sup>-2</sup> )
I	Stromstärke (A)
IFN $\gamma$	Interferon-gamma
IL-15	Interleukin-15
I <sub>sc</sub>	Kurzschlussstrom (in $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ bzw. $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ )
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
J <sub>Man</sub>	unidirektionaler Flux für Mannitol ( $\text{nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ )
M	Menge transportierter Ionen
MAP-Kinase	Mitogen-activated Protein Kinase
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor- $\kappa$ B
n.s.	nicht signifikant
NSAID	non steroidal anti-inflammatory drugs
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	Phosphate Buffered Saline/Tween



PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin-E <sub>2</sub>
R <sup>e</sup>	epithelialer Widerstand, bezogen auf serosale Fläche ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ )
R <sup>sub</sup>	subepithelialer Widerstand, bezogen auf serosale Fläche ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ )
R <sup>t</sup>	transmuraler Widerstand, bezogen auf serosale Fläche ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ )
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	Standard Error of Mean (Standardabweichung des Mittelwertes)
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
t	Zeit (min; h)
TJ	Tight Junction
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase [TdT]-mediated [dUTP] nick end labeling
V	Kammervolumen (l)
vgl.	vergleiche
V <sub>ms</sub>	Potentialdifferenz zwischen mukosaler und serosaler Seite des Gewebes (mV)
vs.	versus (gegen)

## **1 Einleitung**

Die lymphozytäre Kolitis ist eine chronisch entzündliche Dickdarmerkrankung mit bislang unklarer Ätiologie. Sie wird heute mit der kollagenen Kolitis zu dem Erkrankungsbild der mikroskopischen Kolitiden zusammengefasst. Beide Formen der mikroskopischen Kolitis gehen mit schweren wässrigen Diarrhoen bei zugleich unauffälligen endoskopischen Befunden einher. Anders als bei der kollagenen Kolitis zeichnet sich das histomorphologische Bild der lymphozytären Kolitis vor allem durch eine Vermehrung der intraepithelialen Lymphozyten und das Fehlen einer subepithelialen Kollagenplatte aus.

Die derzeitige Therapie der lymphozytären Kolitis besteht in einer symptomatischen Behandlung der Diarrhoe, denn bis heute sind die Pathomechanismen der Diarrhoe, die als Angriffspunkt für eine kausale Therapie dienen könnten, nicht vollständig bekannt.

Zum besseren Verständnis und zur anschließenden Übertragung auf die Mechanismen der Diarrhoe bei der lymphozytären Kolitis erfolgt zunächst eine Übersicht der verschiedenen Diarrhoeformen.

### **1.1 Mechanismen der Diarrhoe**

Eine Diarrhoe kann Symptom vieler Erkrankungen sein und ist oft ein Zusammenwirken von unterschiedlichen Pathomechanismen. Grundsätzlich gilt, dass alle Formen der Diarrhoe – mit Ausnahme der motilitätsbedingten Diarrhoeform – durch osmotische Wirkung verursacht werden. Eine erhöhte Konzentration von Soluten bewirkt durch unzureichende Resorption einerseits und durch vermehrte Sekretion der Solute andererseits eine vermehrte Ausscheidung des äquivalent gebundenen Wassers.

Diese vereinfachte Einteilung der Diarrhoemechanismen kann nach pathophysiologischen Merkmalen weiter charakterisiert werden [Fromm, 1994]:

1. Bei der osmotischen Diarrhoe im engeren Sinne kommt es zu einem erhöhten Wasserverlust ins Darmlumen infolge einer luminalen von Anreicherung nicht resorbierbarer Substanzen, für die kein spezieller Transportmechanismus existiert. Laktulose, Magnesiumsalze oder osmotische Abführmittel wie Natriumsulfat können Auslöser einer osmotischen Diarrhoe sein. Diese Diarrhoeform sistiert bei Nahrungskarenz.

2. Bei der malabsorptiven Diarrhoe werden resorbierbare Substanzen aufgrund von defekten Transportmechanismen nicht ausreichend resorbiert – wie beispielsweise bei der Galaktosemalabsorption oder bei der Zystischen Fibrose – oder aufgrund einer verminderten Resorptionsfläche wie z.B. bei der Zöliakie oder beim Kurzdarmsyndrom.

Bei einem Enzymmangel wie beispielsweise bei der exokrinen Pankreasinsuffizienz, werden die Nahrungsbestandteile unzureichend aufgespalten. Man spricht dann von einer maldigestiven Diarrhoe.

3. Die sekretorische Diarrhoe beruht auf einer vermehrten transepithelialen elektrogenen Anionensekretion – vor allem von  $\text{Cl}^-$  und Bikarbonat. Im Gegensatz zu der osmotischen Diarrhoe entsteht bei dieser Form der Diarrhoe jedoch keine charakteristische osmotische Lücke. Die sekretorische Diarrhoe kann durch enterotoxinbildende Bakterien wie bei der Cholera, durch die kongenitale Chloridorrhoe oder durch vermehrte Sekretion von Gallen- und Fettsäuren entstehen. Die sekretorische Diarrhoeform persistiert bei Nahrungskarenz.

4. Leckflux-Diarrhoen entstehen bei epithelialen Barrierefunktionsstörungen mit vermehrter Durchlässigkeit z.B. der Tight Junction und einer Verschiebung von osmotisch wirksamen Soluten in das Darmlumen wie z.B. bei Clostridium difficile-Infektionen.

5. Motilitätsbedingte Diarrhoen entstehen durch eine Hypermotilität des Darms wie z.B. bei der Hyperthyreose oder beim Karzinoidsyndrom sowie durch eine Hypomotilität des Darms mit folgender bakterieller Überwucherung, z.B. bei der Hypothyreose oder beim Diabetes mellitus.

## **1.2 Lymphozytäre Kolitis**

### **1.2.1 Historie, Epidemiologie, Klinik, Diagnostik**

Bereits 1976 wurde von Lindstrøm et al. eine mit schweren wässrigen Diarrhoen und unauffälligen endoskopischen Befunden einhergehende Kolitis beschrieben. Aufgrund einer spezifischen subepithelialen Kollagenplatte wurde diese Form der Kolitis als kollagene Kolitis bezeichnet [Lindstrøm et al., 1976]. In Abgrenzung dazu beschrieben Read et al. im Jahr 1980 eine Erkrankung mit schweren chronischen Diarrhoen unklarer Ursache und histologisch lediglich einer Vermehrung intraepithelialer Lymphozyten und eines entzündlichen Infiltrats in der Lamina propria [Read et al., 1980]. Diese Befundkonstellation mit Fehlen der subepithelialen kollagenen Schicht wurde zunächst unter dem Begriff der mikroskopischen Kolitis geprägt. 1989 wurde die von Read et al. beschriebene Kolitis zutreffender als lymphozytäre Kolitis bezeichnet,

## Einleitung

da diese sich vor allem durch die Vermehrung der intraepithelialen Lymphozyten auszeichnet [Lazenby et al., 1989].

Die mikroskopische Kolitis tritt typischerweise in der 5. bis 7. Dekade auf [Fernandez-Banares et al., 2003]. Die Inzidenz der lymphozytären Kolitis wird in Europa auf 3,1/100.000 jährlich und die Prävalenz auf 14,4/100.000 pro Jahr geschätzt. Die Inzidenz der kollagenen Kolitis wird mit 0,6-2,3/100.000 jährlich und die Prävalenz mit 10-15,7/100.000 pro Jahr angegeben [Raclot et al. 1994; Bohr et al., 1996; Fernandez-Banares et al., 1999].

Leitsymptom beider Formen ist eine chronische oder intermittierende wässrige Diarrhoe mit im Mittel 5-10 Stühlen und Stuhlvolumina bis zu fünf Litern pro Tag. Der Beginn der Erkrankung ist in der Regel schleichend, der Verlauf gutartig und durch ein chronisch rezidivierendes Muster charakterisiert.

Die endoskopische Untersuchung der mikroskopischen Kolitis ist definitionsgemäß makroskopisch unauffällig. Die Diagnose wird daher anhand der histologischen Bewertung von Biopsien der Kolonschleimhaut aus allen Bereichen des Dickdarms gestellt. Bei beiden Kolitisformen sind intraepitheliale Lymphozyten (IEL) dabei deutlich vermehrt [Jesserun et al., 1987]. Eine Anzahl von  $\geq 20$  IEL gegenüber normalerweise 4-5 pro 100 Epithelzellen ist ein histopathologisches Kriterium für die Diagnose einer mikroskopischen Kolitis. In der Lamina propria findet sich ein vornehmlich aus Lymphozyten und Plasmazellen bestehendes entzündliches Infiltrat. Zusätzlich bestehen bei beiden Kolitisformen epitheliale Läsionen in Form von Abflachung, Vakuolisierung und Ablösung der Epithelzellen. Bei der kollagenen Kolitis findet sich als weiteres diagnostisches Kriterium im gesamten Kolon eine diffuse, oft diskontinuierliche Verdickung der unter der Basalmembran gelegenen subepithelialen Kollagenschicht von mindestens 10  $\mu\text{m}$  [Lazenby et al., 1989].

### **1.2.2 Ätiologie und Pathogenese**

Über die Ätiologie der mikroskopischen Kolitis gibt es viele Theorien. Der Nachweis einer chronischen Entzündungsreaktion und die Vermehrung intraepithelialer Lymphozyten legt den Verdacht auf eine pathologische Immunreaktion auf ein bisher unbekanntes luminales Agens nahe. Eine Befundbesserung nach Umleitung des Fäkalstroms über eine Ileostomie und die günstigen Effekte einer Antibiotikatherapie unterstützten diese Theorie [Andersen et al., 1993; Järnerot et al., 1995]. Eine autoimmune Reaktion als Folge der Exposition mit einem noch nicht identifizierten Agens wäre für die Pathogenese beider Formen der mikroskopischen Kolitis ebenfalls denkbar. Für diese Theorie spricht die häufige Assoziation mit anderen Autoimmunerkrankungen wie z.B. Thyreoiditis, rheumatoide Arthritis und Psoriasis sowie das entzündliche

lymphozytäre Infiltrat und das gute Ansprechen auf eine Steroidtherapie.

Von besonderem Interesse ist eine Assoziation der mikroskopischen Kolitis mit der glutensensitiven Enteropathie. Etwa jeder dritte Patient mit einer diagnostizierten Zöliakie zeigt auch in der Kolonmukosa spezifische Veränderungen, die mit einer mikroskopischen Kolitis vereinbar sind. Außerdem weist die Zöliakie histomorphologische Ähnlichkeiten mit der mikroskopischen Kolitis auf. Eine Sonderform der Zöliakie, die sogenannte kollagene Zöliakie, wurde ebenfalls bereits beschrieben [Weinstein et al., 1970]. Andererseits können Patienten mit einer mikroskopischen Kolitis auch im Dünndarm zöliakieähnliche Veränderungen aufweisen. Zöliakietypische Antikörper werden jedoch nur in Ausnahmefällen beobachtet. Eine Verbesserung der Symptome bei glutenfreier Kost wurde nur beim Nachweis dieser Antikörper beschrieben [Breen et al., 1987; Wolber et al., 1990; Fine et al., 1997].

In einer weiteren Theorie wird der längerfristigen Einnahme (> 6 Monate) von nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAID) eine Rolle in der Pathogenese der mikroskopischen Kolitis zugeschrieben. Das Absetzen der NSAID führt zu einer Besserung und die Wiedereinnahme zu einer Verschlechterung der Symptomatik [Riddell et al., 1992]. Patienten mit vorausgegangener NSAID-Einnahme zeigen in der Regel einen schwereren Verlauf der Erkrankung und benötigen Steroide zur Remissionsinduktion [Abdo et al., 2003]. Neuere Arbeiten berichten über weitere Substanzen, die mit einer mikroskopischen Kolitis assoziiert sein können. Dazu zählen Antidepressiva der Gruppe der SSRI (Selective Serotonine Re-Uptake Inhibitors), Diuretika, Benzodiazepine, Omeprazol, ACE-Hemmer,  $\beta$ -Blocker und Statine [Fernandez-Banares et al., 2007].

Daneben beruht die Befundbesserung bei der mikroskopischen Kolitis, die häufig mit einer Gallensäure-Malabsorption einhergeht, auf der Bindung überschüssiger luminaler Gallensäuren durch Cholestyramin [Ung et al., 2000]. Die Ursache für die Gallensäure-Malabsorption ist jedoch unklar.

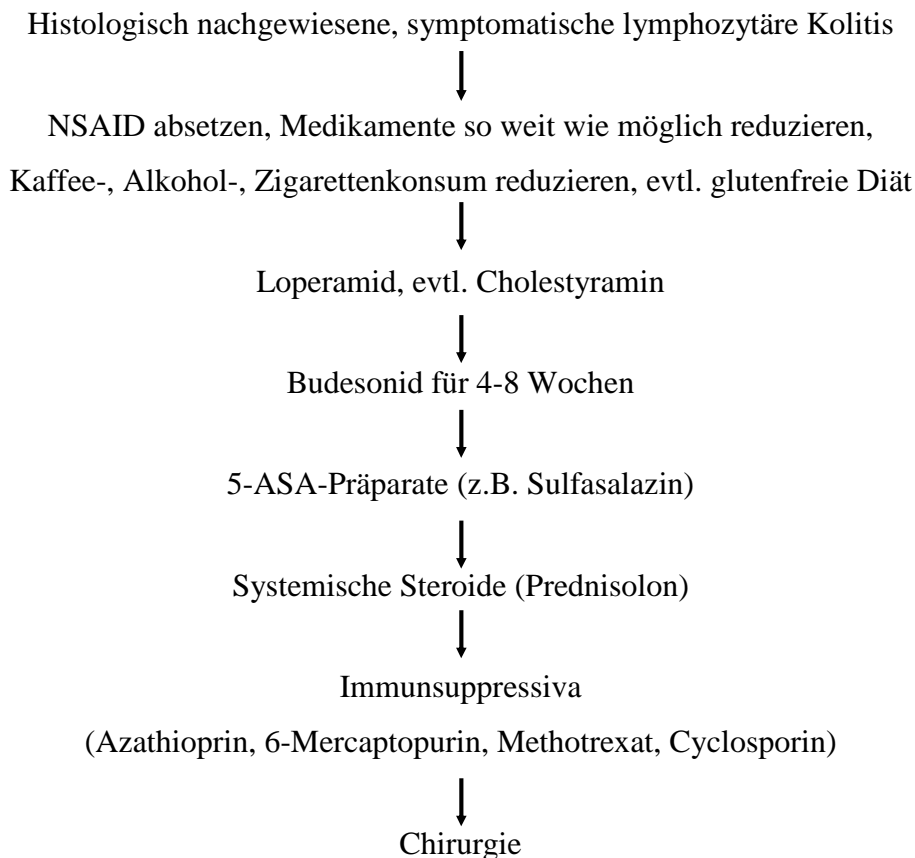
Die Pathomechanismen, die zur Entstehung der Diarrhoe bei der mikroskopischen Kolitis führen, sind bis heute ebenfalls noch nicht vollständig geklärt. Lindstrøm et al. vermuteten bereits 1976 eine gestörte Elektrolyt- und Wasserabsorption in der Kolonschleimhaut bei Patienten mit mikroskopischer Kolitis. Als ursächlicher Faktor für die Diarrhoe bei der kollagenen Kolitis wird eine verminderte Natrium-Absorption in Kombination mit einer erhöhten aktiven Chlorid-Sekretion diskutiert. Zusätzlich wurde bei der kollagenen Kolitis eine epitheliale Barrierestörung mit einer veränderten Zusammensetzung der Tight Junction-Moleküle als ein Diarrhoemechanismus im Sinne einer Leckflux-Diarrhoe beschrieben. Hier wurde insbesondere eine verminderte Expression der abdichtenden Tight Junction-Proteine Occludin und Claudin-4

## Einleitung

sowie eine tendenziell vermehrte Expression des porenbildenden Claudin-2 beobachtet [Bürigel et al., 2002]. Für die lymphozytäre Kolitis wurden diese Mechanismen bislang nicht untersucht.

### 1.2.3 Therapie

Aufgrund von fehlenden einheitlichen pathogenetischen Überlegungen, existiert für die mikroskopische Kolitis bisher keine kausale Therapie. In zahlreichen Studien mit kleinen Fallzahlen wird über den Einsatz von einer Reihe von Substanzen wie Antidiarrhoika, Spasmolytika, 5-Amino-salizylsäure (5-ASA), oralen und topischen Steroiden, Cholestyramin, Immunsuppressiva und Antibiotika für die Behandlung der kollagenen Kolitis berichtet [Bohr et al., 1996; Fine et al., 1999; Fernandez-Banares et al., 2003]. Speziell für die Behandlung der Diarrhoe bei lymphozytärer Kolitis existieren nur wenige Erkenntnisse [Pardi et al., 2002; Miehke et al., 2009]. Sie wird meist wie die kollagene Kolitis therapiert. Die Abfolge eines Therapiestufenplans kann jedoch variieren. Abbildung 1 fasst das anhand vorliegender Daten empfohlene Therapie-Schema für die Behandlung der lymphozytären Kolitis zusammen.



**Abb. 1:        Behandlungsalgorithmus der lymphozytären Kolitis**

Nach der Diagnosestellung einer lymphozytären Kolitis, dem Ausschluss anderer Durchfallerkrankungen, dem Absetzen von nicht-steroidalen Antiphlogistika und der Reduktion von eine Diarrhoe begünstigenden Substanzen sollte zunächst eine unspezifische antidiarrhoische Therapie mit motilitäts- und sekretionshemmenden Substanzen wie z.B. Loperamid begonnen werden. Diese Therapie wird vor allem von älteren Patienten gut toleriert und oft als Erstmedikation empfohlen [Bohr et al., 1996; Pardi et al., 2002].

Bei Ausbleiben einer Symptombesserung nach zwei bis vier Wochen, sollte als nächste Therapiestufe das topisch wirksame Glukokortikoid Budesonid zum Einsatz kommen. Budesonid ist eine lokal wirksame anti-inflammatorische Substanz mit geringer systemischer Bioverfügbarkeit und daher geringem Risiko für systemische Steroidnebenwirkungen. In einer Dosierung von 9 mg/Tag Budesonid (Budenofalk®) über vier bis acht Wochen kommt es bei Patienten mit lymphozytärer Kolitis zu einer klinischen (< 3 Stühle/Tag, fester Stuhlgang) und histologischen Befundbesserung [Feyen et al., 2004; Miehlke et al., 2009]. Bei Versagen einer Budesonid-Behandlung, kommen 5-ASA-Präparate wie Sulfasalazin oder systemisch wirksame Glukokortikoide wie Prednisolon zum Einsatz. Beide Substanzklassen bewirken eine Reduktion der Symptome und der Inflammation in der Histologie [Calabrese et al., 2007; Bohr et al., 1996]. Eine Alternative für Steroid-refraktäre oder Steroid-abhängige Patienten mit besonders schwerem Verlauf der Erkrankung stellt eine Therapie mit Immunsuppressiva wie Azathioprin, Methotrexat oder Cyclosporin dar, wobei hier Nebenwirkungen die Behandlung limitieren können [Pardi et al., 2002].

Aufgrund des oft spontan remittierenden Verlaufs der Erkrankung ist nach 6-12 Monaten eine Überprüfung der Behandlungsnotwendigkeit durchzuführen. In Anbetracht des insgesamt gutartigen Verlaufs mit häufigen Spontanremissionen sind eine immunsuppressive Therapie und eine Proktokolektomie nur den schwersten Fällen vorbehalten und Budesonid wegen seines relativ günstigen Nebenwirkungsprofils zu bevorzugen [Williams & Gelfand, 2000; Varghese et al., 2002].

### 1.3 Zytokinprofil bei der mikroskopischen Kolitis

Die mikroskopische Kolitis ist eine entzündliche Darmerkrankung mit einem spezifischen mukosalen Zytokinprofil, welches vor allem durch eine T-Helferzellen-Typ-1-(Th-1)-Immunantwort zustande kommt. Die bei dieser Immunantwort auf mRNA-Ebene hochregulierten Zytokine sind unter anderem Interleukin-15 (IL-15), Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNO-Synthase). Die mukosalen mRNA-Level für IL-15 und IFN $\gamma$  liegen dabei bei dem 100-fachen und für TNF $\alpha$  bei dem 60-fachen Wert im Vergleich zu Kontrollen. Die iNO-Synthase ist bei der mikroskopischen Kolitis 35-mal stärker exprimiert als bei Kontrollen [Tagkalidis et al., 2007]. Abgesehen von einer tendenziellen Erhöhung des mukosalen IL-10, sind die Level der anderen Th-2-Zytokine wie IL-2 und IL-4 bei der mikroskopischen Kolitis nicht erhöht. Beide Kolitisformen zeigen dabei das gleiche Zytokinprofil [Tagkalidis et al., 2007].

Im Folgenden soll auf die Zytokine TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  und IL-15 näher eingegangen werden. TNF $\alpha$  stellt den Prototyp eines proinflammatorischen Zytokins dar und wurde ursprünglich als ein Tumornekrosen verursachender Mediator beschrieben. Er wird hauptsächlich von Makrophagen, Monozyten und T-Lymphozyten in membrangebundener oder in seiner löslichen Form produziert. Die Bindung des Zytokins an zwei verschiedene Rezeptoren, TNF-Rezeptor-1 (p55) und TNF-Rezeptor-2 (p75), kann den nukleären Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktivieren und somit die Genexpression einer Vielzahl von an Entzündungsprozessen beteiligter Faktoren, wie die Cyclooxygenase-2, die Zytokine TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-2 sowie verschiedene Adhäsionsmoleküle induzieren. In Abwesenheit des TNF-Rezeptor-2 bildet TNF $\alpha$  einen intrazellulären apoptoseinduzierenden Komplex [Boehringer et al., 1999].

Durch TNF $\alpha$  werden außerdem verschiedene MAP-Kinase-Signalwege (mitogen-activated protein) aktiviert [Aggarwal, 2003]. Hier werden einerseits die klassischen MAP-Kinasen ERK 1/2 (extracellular-signal-regulated kinase) aktiviert, die bei der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung und bei der Regulation differenzierter Zellen eine wichtige Rolle spielen. Andererseits werden durch TNF $\alpha$  die MAP-Kinase p38 und JNK (c-Jun N-terminale Kinase) aktiviert. Sie sind unter anderem bei der Immunantwort, bei Entzündungs- und Differenzierungsprozessen beteiligt [Kyriakis & Avruch, 2001; Roux & Blenis, 2004].

Für chronisch entzündliche Darmerkrankungen konnte gezeigt werden, dass TNF $\alpha$  ein ausschlaggebendes Zytokin für eine epitheliale Barrierestörung darstellt. Hierbei kommt es insbesondere zu einer gesteigerten parazellulären Permeabilität infolge von Reduktion von abdichtenden Tight Junction-Proteinen sowie Induktion porenbildender Claudine [Heller et al.,



2005; Mankertz et al., 2009]. Daneben entsteht die Barrierestörung durch eine gesteigerte Apoptoserate der Enterozyten und eine damit verbundene gestörte Zellintegrität und erhöhte Durchlässigkeit des Epithels [Gitter et al., 2000]. Bergann und Mitarbeiter beschrieben zusätzlich einen Zusammenhang zwischen TNF $\alpha$  und einer gestörten Funktion des epithelialen Natrium-Kanals (ENaC) infolge verminderter Expression der  $\beta$ - und der  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC [Bergann et al., 2009].

IFN $\gamma$  ist ein typisches proinflammatorisches Zytokin der Th-1-Immunantwort und wird vorwiegend von Lymphozyten, NK-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen produziert. Es spielt eine wichtige Rolle bei der frühen Infektionsabwehr und der erworbenen Immunantwort. An seinen Zielzellen bewirkt es die Produktion weiterer Zytokine und die Expression von MHC-Klasse-I- und -II-Proteinen. Es moduliert die Effektorfunktion von Makrophagen, stimuliert B-Lymphozyten zur Immunglobulin-Sekretion und bewirkt die Differenzierung und Expansion von T-Lymphozyten. Die Interaktion mit seinem Rezeptor bewirkt eine Aktivierung der Rezeptor-assoziierten Januskinasen (JAK), welche nachfolgend die „signal transducer and activator of transcription“ STAT-Proteine aktivieren [Schroder et al., 2004].

IFN $\gamma$  war das erste Zytokin, für das ein Effekt auf die epitheliale Barrierefunktion nachgewiesen wurde [Madara & Stafford, 1989]. Zeit- und dosisabhängig mindert es den transepithelialen Widerstand und führt so zu einer erhöhten Epithelpermeabilität. Diese Effekte werden vor allem durch Pinozytose von Tight Junction-Proteinen (Occludin, JAM-A, Claudin-1) bewirkt [Bruewer et al., 2005]. Anders als unter TNF $\alpha$ , resultiert die Barrierestörung unter IFN $\gamma$  nicht durch Apoptose [Bruewer et al., 2003].

IL-15, strukturell und biologisch mit dem IL-2 verwandt, stimuliert die Zytokinproduktion sowie die Proliferation von T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, Monozyten und von NK-Zellen. Die mRNA des IL-15 wird in einer Vielzahl von Zelltypen des humanen Gewebes exprimiert. Die Effekte von IL-15 werden dabei über die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Einheit des IL-2-Rezeptors und über eine eigene  $\alpha$ -Einheit vermittelt [Doherty et al., 1996; Reinecker et al., 1996]. Nach Interaktion des Zytokins mit seinem Rezeptorkomplex werden unterschiedliche Signaltransduktionswege wie die Aktivierung der JAK/STAT-, der Ras/MAPK-Signaltransduktion und des NF- $\kappa$ B eingeschlagen [McDonald et al. 1998; Masuda et al., 2000]. Eine Aktivierung der ERK 1/2 und der PI3 (Phosphatidylinositol 3)-Kinase wurde ebenfalls beschrieben [Yano et al., 2003; Zhang et al., 2008].

Für einige entzündliche Erkrankungen, darunter rheumatoide Arthritis, Psoriasis, Zöliakie und chronisch entzündliche Darmerkrankungen, wurde bereits ein Zusammenhang mit erhöhten IL-15-Level beschrieben [Stevens et al., 1997; Maiuri et al., 2000; Zhang et al., 2008]. Im Kolon

## Einleitung

von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa bewirkt IL-15 eine Aktivierung von T-Zellen mit einer vermehrten Zytokinproduktion, unter anderem auch von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ . Immunhistochemisch kann es im entzündeten Kolon, jedoch nicht im gesunden Gewebe angefärbt werden [Liu et al., 2000]. In Keratinozyten von Psoriasispatienten wurde für IL-15 außerdem ein anti-apoptotischer Effekt mit vermehrter Expression von Ki-67 als Zeichen einer gesteigerten Proliferation beschrieben [Zhang et al., 2008]. In Enterozyten von Zöliakiepatienten wurde dagegen ein pro-apoptotischer Effekt beobachtet [Maiuri et al., 2000].

### **1.4 Zielstellung der Arbeit**

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die pathophysiologischen Mechanismen der Diarrhoe bei der lymphozytären Kolitis zu erforschen. An endoskopisch entnommenen Biopsien aus dem Colon sigmoideum von Patienten mit lymphozytärer Kolitis, und zwar mit und ohne einer laufenden Therapie mit Budesonid, wurden mit Hilfe von elektrophysiologischen Messverfahren die Transport- und Barriereeigenschaften des Darmgewebes untersucht. Hierbei wurde insbesondere der aktive elektrogene Natrium-Transport untersucht sowie mit Hilfe der Wechselstrom-Impedanzspektroskopie und dem Einsatz von Tritium-markiertem Mannitol die Eigenschaften der epithelialen Barriere charakterisiert. Es erfolgte eine ergänzende Analyse von Tight Junction-Veränderungen. Hierzu wurde neben einer Expressionsanalyse von Tight Junction-Proteinen eine fluoreszenzmikroskopische Lokalisierung dieser Proteine durchgeführt.

Zweites Ziel der Arbeit war die Untersuchung des Einflusses der bei der lymphozytären Kolitis erhöhten proinflammatorischen und immunmodulatorischen Zytokine IL-15, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  auf die Transporteigenschaften des Epithels an einem Rattenmodell mit Hilfe von elektrophysiologischen Messmethoden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Materialien und Geräte

Brutschrank Kelvitron T	Heraeus, Deutschland
Dako Pen	DAKO, Dänemark
Deckgläser	Menzel-Gläser, Deutschland
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Deutschland
Gene Quant RNA/DNA Calculator	Pharmacia Biotech, England
Heizblock	Grant, Deutschland
Kryostat Leica CM 1900	Leica Microsystems, Deutschland
Lösungsreservoir	Forschungswerkstatt der Charité Campus Benjamin Franklin
Magnetrührer	Ika-Combimag, Deutschland
Magnetrührstäbchen	Merck, Deutschland
Mini Zentrifuge	Labnet International, USA
Objektträger	Menzel-Glaeser, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Deutschland
Reaktionsgefäß	Plastibrand, Deutschland; Eppendorf, Deutschland
Real-Time PCR-System Fast 7500	Applied Biosystems, USA
Silikonscheibe	Forschungswerkstatt der Charité Campus Benjamin Franklin
Skalpelle	Feather Safety Razor Co., Japan
Spitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Deutschland
Sterilfilter	IBS INTEGRA Biosciences, Deutschland
Tecan Spectra Photometer	Tecan Group Ltd., Schweiz
Thermal Cycler 2720	Applied Biosystems, USA
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, USA
Wasserbad	Haake, Deutschland
Wippe WT12	Biometra, Deutschland
Zeiss LSM 510 META	Carl Zeiss AG, Deutschland

## Material und Methoden

Zentrifuge Z233MK

Hermle, Deutschland

Zentrifuge Avanti J25

Beckman, Deutschland

### 2.1.2 Chemikalien

Acrylamid

Merck, Deutschland

Aldosteron

Sigma-Aldrich Co., Deutschland

Amilorid

Sigma-Aldrich Co., Deutschland

Ammoniumpersulfat (APS)

Sigma-Aldrich Co., Deutschland

BCA Protein Assay Reagenz A+B

Pierce, USA

Bovines Serumalbumin (BSA)

AppliChem, Deutschland

Bumetanid

Sigma-Aldrich Co., Deutschland

Carbachol

Sigma-Aldrich Co., Deutschland

DAPI

Boehringer-Mannheim, Deutschland

Ethanol

J.T. Baker, Deventer, Niederlande

Fötiales Kalbsserum (FKS)

Biochrom, Deutschland

Formalin

Sigma-Aldrich Co., Deutschland

Glycin

Serva, Deutschland

IL-15

Sigma-Aldrich Co., Deutschland

INF $\gamma$

TEBU, Deutschland

Isopropanol

J.T. Baker, Deventer, Niederlande

Kohlendioxid

Linde, Deutschland

Limi-Light Western-Blotting Kit

Roche, Deutschland

- Blockierreagenz

- 10 x TBS-Tween

- Lumi-Light POD-Substratlösung

Mannitol

Sigma-Aldrich Co., Deutschland

[ $^3\text{H}$ -Mannitol]

American Radiolabeled Chemicals,  
USA

Methanol

Merck, Deutschland

2-Methylbutan

Carl ROTH GmbH, Deutschland

Natriumazid

Sigma-Aldrich Co., Deutschland

Natriumdodecylsulfat (SDS)

Sigma-Aldrich Co./Merck, Deutschland

Paraformaldehyd 16%

Elektron Microscopy Sciences, USA

PBS-Tabletten

Life Technologies, Deutschland

peqGOLD RNAPure	peqlab, Deutschland
Phosphatgepufferte saline Lösung (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Prostaglandin E <sub>2</sub> (PG E <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Co./Merck, Deutschland
Pro Tags Mount Fluor	Biocyc GmbH & Co. KG, Deutschland
RNAlater	Qiagen, Deutschland
Sab Simplex	PARKE-DAVIS GmbH, Deutschland
Schiffs-Reagenz	Merck, Deutschland
Sucrose	Serva, Deutschland
TaqMan Gene Expression Assay	Applied Biosystems, USA
TEMED	Life Technologies, Deutschland
Theophyllin	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
Tissue Tek	Sakura Finetek Europe, Niederlande
TNF $\alpha$	PeptoTech EC, England
Tris-HCl 1 M, pH 8,8	Serva, Deutschland
Triton X-100	Boehringer, Deutschland
TUNEL-Reagenz	Roche, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich Co., Deutschland
Wasser (ddH <sub>2</sub> O)	Fluka, Deutschland
Ziegen-Serum	Zymed, Deutschland

### 2.1.3 Puffer und Lösungen

#### Gebrauchslösung (Proteinquantifizierung) je Probe

196 $\mu$ l	Pierce BCA Protein Assay Reagenz A
4 $\mu$ l	Pierce BCA Protein Assay Reagenz B

#### Elektrophoresepuffer

100 ml	10 x Puffer Westcoast
10 ml	10% SDS
	ad 1 l Aqua bidest.

#### 10 x Puffer West

144 g	Glycin
30,4 g	Tris HCl
	ad 1 l Aqua bidest.

## Material und Methoden

### Transferpuffer

100 ml	10 x Puffer West
100 ml	Methanol
	ad 1 l Aqua bidest.

### 10 x TBS

80 g	1,37 M NaCl
12,1 g	Tris Base
	ad 1 l Aqua bidest.

### TBS/Tween

100 ml	10 x TBS
1 ml	Tween 20
	ad 1 l Aqua bidest.

### PBS/Tween

2 Tabl.	PBS
1 ml	Tween 20
	ad 1 l Aqua bidest.

### 5 x Laemmli Puffer

0,32 M	Tris pH 6,8
44%	Glyzerol
25%	ss-Mercaptoethanol
12,5%	SDS
0,001%	Bromphenolblau

### Gesamtlysepuffer

10 mM	Tris-Cl pH 7,5
150 mM	NaCl
0,5%	Triton X
0,1%	SDS
	1 Tablette Complete Mini ohne EDTA/10 ml Lysepuffer

Sammelgel-Stammlösung

85 ml	30% Acrylamid
125 ml	0,5 M Tris pH 6,8
	ad 500 ml Aqua bidest.

Sammelgel

4,9 ml	Sammelgel-Stammlösung
50 µl	10% SDS
50 µl	APS
5 µl	TEMED

Trenngel (12,5% - Claudine)

8,2 ml	Acrylamid
4,7 ml	Aqua bidest.
7 ml	1 M Tris pH 8,8
200 µl	10% SDS
200 µl	APS
10 µl	TEMED

Trenngel (8,5% - Occludin)

5,66 ml	Acrylamid
6,9 ml	Aqua bidest.
7 ml	1 M Tris pH 8,8
200 µl	10% SDS
200 µl	APS
10 µl	TEMED

BSA-Blockierungsreagenz (Western Blot)

25 g	BSA
5 ml	2% Natriumazid
	ad 500 ml PBS/Tween

## Material und Methoden

### Strip-Puffer

100 ml	10% SDS
61,8 ml	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
	ad 500 ml Aqua bidest.
	Pro Blot 50 ml Strip-Puffer mit 350 µl 2-Mercaptoethanol ergänzt

### Permeabilisierungslösung (Immunfluoreszenzfärbung Biopsie)

0,5%	Triton – X in PBS
------	-------------------

### Blockierungslösung (Immunfluoreszenzfärbung Biopsie)

6%	Ziegenserum
1%	BSA in PBS

### Badlösung für elektrophysiologische Experimente

140 mmol	Na <sup>+</sup>
123,8 mmol	Cl <sup>-</sup>
5,4 mmol	K <sup>+</sup>
1,2 mmol	Ca <sup>2+</sup>
1,2 mmol	Mg <sup>2+</sup>
2,4 mmol	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
0,6 mmol	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>
21 mmol	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
	ad 1 l Aqua bidest.

### Substrate für das Epithel

10 mmol	D(+)-Glukose
0,5 mmol	β-OH-Butyrat
2,5 mmol	Glutamin
10 mmol	D(+)-Mannose
	ad 1 l Aqua bidest.

### Clark'sche Lösung

200 ml	Methanol
100 ml	Eisessig



#### 2.1.4 Sonden

$\alpha$ -Untereinheit des ENaC	Alpha Diagnostics, USA
$\beta$ -Untereinheit des ENaC	Alpha Diagnostics, USA
$\gamma$ -Untereinheit des ENaC	Alpha Diagnostics, USA
GAPDH	Alpha Diagnostics, USA

#### 2.1.5 Antikörper

Alexa Fluor 488 Goat-Anti-Mouse	Invitrogen, USA
Alexa Fluor 594 Goat-Anti-Rabbit	Invitrogen, USA
Rabbit-Anti-Claudin-1	Zymed, USA
Rabbit-Anti-Claudin-2	Zymed, USA
Rabbit-Anti-Claudin-3	Zymed, USA
Rabbit-Anti-Claudin-5	Zymed, USA
Rabbit-Anti-Claudin-8	Zymed, USA
Rabbit-Anti-Occludin	Zymed, USA
Rabbit-Anti-ZO-1	BD Biosciences, USA
Mouse-Anti-Claudin-4	Zymed, USA
Mouse-Anti-ZO-1	Zymed, USA
Mouse-Anti- $\beta$ -Actin	Sigma-Aldrich Co., Deutschland

#### 2.1.6 Software

Aida	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Deutschland
Impedanz	Fiebig, Deutschland
Microsoft Office	Microsoft Corporation, USA
Microcal Origin	Microcal Software Inc., USA
LSM 510	Carl Zeiss, Deutschland
Taqman 7500 HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Prinzip

Als Methode wurde das von den Physiologen Ussing und Zehran [1951] erstmals beschriebene Kurzschlussexperiment, bei dem die Differenzierung zwischen aktiven und passiven Transportprozessen möglich ist, eingesetzt. Das zu vermessende Darmstück wird wie eine Trennmembran zwischen zwei gleich große Flüssigkeitskompartimente eingespannt. Durch Zugabe von identischen Volumina einer Lösung gleicher Elektrolytzusammensetzung in beide Kompartimente werden sowohl der Druckgradient, als auch der Konzentrationsgradient eliminiert. Damit wird der passive Transport ausgeschaltet. Durch aktiven Transport von geladenen Teilchen wie  $\text{Na}^+$  sowie  $\text{Cl}^-$  entsteht jedoch eine sich ständig ändernde transepitheliale Spannung (UE), die den passiven Transport anderer Ionen bewirkt. Diese über dem Epithel durch passive und aktive Transportprozesse entstehende Spannungsänderung kann durch Applikation eines sogenannten Kurzschlussstroms ( $I_{sc}$ ) über eine externe Spannungsquelle kurzgeschlossen werden, so dass die transepitheliale Spannung 0 mV beträgt. Das heißt durch Applikation entsprechenden Stroms gleicher Höhe jedoch entgegengesetzter Richtung zum Strom, der durch den elektrogenen Ionentransport bedingt ist, wird die elektrische Spannung eliminiert und die Höhe des applizierten Kurzschlussstroms spiegelt den aktiven Ionentransport durch das Epithel wider. In diesem Kurzschlussexperiment werden alle äußeren Gradienten ausgeschaltet, so dass die gemessenen Nettotransporte dem aktiven Transporten entsprechen.

Durch Applikation von Wechselströmen mit aufsteigenden Frequenzen ist an diesem System außerdem die Differenzierung zwischen dem epithelialen Anteil und dem subepithelialen Anteil des Gesamtwiderstandes des eingebauten Gewebes möglich (vgl. Kapitel 2.4). Die Epithelzellschicht repräsentiert dabei den epithelialen Widerstand und verhält sich elektrisch wie ein RC-Glied. Das subepitheliale Gewebe entspricht dagegen einem rein ohm'schen Widerstand.

### 2.2.2 Biopsien aus dem menschlichen Sigma

In der vorliegenden Arbeit wurden Patienten mit chronischen rezidivierenden bzw. chronisch persistierenden Diarrhoen unklarer Genese untersucht. Eine infektiöse Ursache, eine makroskopische Entzündung und eine Glukokortikoid-Therapie wurden ausgeschlossen. Die Diarrhoe bestand bei diesen Patienten bei Diagnosestellung im Durchschnitt bereits seit  $5,0 \pm 0,9$  Jahren und trat durchschnittlich  $5,7 \pm 0,7$  Mal am Tag auf. Als Kontrollpatienten dienten Patienten, die im Rahmen einer Vorsorgeuntersuchung koloskopiert wurden und sowohl makroskopisch, als auch mikroskopisch keine Entzündungszeichen aufwiesen.

In einer weiteren Gruppe wurden Patienten untersucht, bei denen eine lymphozytäre Kolitis bereits bekannt und mit dem topischen Glukokortikoid Budesonid therapiert war. Die Patienten dieses Kollektivs erhielten für vier Wochen 9 mg Budesonid pro Tag.

In ergänzenden Experimenten wurde eine kleine Gruppe von Patienten mit einer unbehandelten kollagenen Kolitis untersucht. Das Durchschnittsalter der Patienten mit lymphozytärer Kolitis lag bei 68 Jahren, das der therapierten Patienten bei 69 Jahren. Die Patienten mit kollagener Kolitis waren im Durchschnitt 64 Jahre und die Kontrollpatienten 49 Jahre alt. Das Verhältnis w:m betrug für die lymphozytäre Kolitis 3:4 und für die kollagene Kolitis 3:1. Alle Patienten wurden über die Entnahme von Biopsien zu Forschungszwecken informiert und willigten ein. Die Entnahme der Biopsien erfolgte beim Zurückziehen des Koloskops nach erfolgter Übersicht des gesamten Dickdarms 30 cm ab ano im Sigma.

### **2.2.3 Transport und Einspannen der Biopsien**

Nach der Entnahme wurden die Biopsien in einem Gläschen in physiologischer Natriumchlorid-Lösung in das Labor transportiert. Hier wurden diese umgehend in ein Schälchen mit zuvor mit 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> begaster Elektrolytlösung überführt und für entsprechende Untersuchungen weiterverarbeitet. Vier Biopsien wurden in die bereits vorbereiteten Ussing-Kammern montiert. Hierzu wurde die Biopsie mit der serosalen Seite nach oben ausgebreitet. Ein mit Gewebekleber benetzter Kunststoffring mit einem inneren Durchmesser von 2,5 mm wurde schließlich so auf die Tela submucosa geklebt, dass der Ring rings um das mittige Loch haftet und die Biopsie voll bedeckt. Der Kunststoffring wurde dann zusammen mit einem abdichtenden Silikonring in einen Epithelcontainer, der der Halterung des Epithels in der Ussing-Kammer diente, eingesetzt. Der Container bestand aus zwei runden Plexiglasscheiben mit einer sich in der Mitte befindenden runden Öffnung von 2,5 mm. Durch diese Öffnung wurde die exponierte Fläche in der Messkammer auf 0,049 cm<sup>2</sup> begrenzt. Der Epithelcontainer wurde anschließend zwischen die beiden Hälften der Ussing-Kammer eingesetzt. Die Zeit von der Entnahme bis zum Einspannen der Biopsie in die Ussing-Kammern betrug ca. 30 Minuten.

### **2.2.4 Spät-distales Kolon der Ratte**

Neben den Versuchen am menschlichen Sigma bestand ein Teil der Arbeit darin, an einem Rattenmodell den Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die Barriere- und die Transporteigenschaften zu untersuchen. Hierzu wurden Versuche am spät-distalen Kolon von männlichen Albino-Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 200-300 g durchgeführt. Die Tiere wurden mit Leitungswasser und einer Standarddiät versorgt. Die Tötung der Tiere erfolgte in

## Material und Methoden

einer Glasglocke unter Zufuhr von 95% CO<sub>2</sub> und 5% O<sub>2</sub>. Unmittelbar danach wurde zunächst das Herz und darauf das Abdomen entlang der Linea alba vom Sternum bis zur Symphyse eröffnet. Nach Verlagerung des Dünndarmpaketes und der Durchtrennung eines der Schambeine wurde das spät-distale Kolon in einer Höhe von ca. 5 cm ab ano vom früh-distalen Kolon abgesetzt. Das entnommene Darmstück wurde mit begaster Badlösung vom Darminhalt freigespült und entlang des Mesenterialansatzes aufgeschnitten. Die Tötung der Tiere wurde durch die Tierschutzkommission des Landesamtes für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt (T0225/05).

### 2.2.5 Präparation und Einspannen des Epithels

Bei der Präparation des Rattendarms wurde eine als “totales Strippen” bezeichnete Methode verwendet [Schulzke et al., 1989; Hegel & Fromm, 1990]. Hierbei wurde die Tunica muscularis, Muscularis propria, Tela submucosa und die äußere Schicht der Lamina muscularis mucosae entfernt. Das verwendete Darmstück bestand lediglich aus Epithel, Lamina propria und einem Teil der Lamina muscularis mucosae.

Zunächst wurde das aufgeschnittene Darmstück mit der Epithelzellschicht nach unten auf eine mit einer Plastikfolie überzogene Agarplatte gelegt. Anschließend wurde das distale Ende fixiert und das Gewebe vorsichtig in Längsrichtung gespannt. Nach einem Schnitt mit dem Skalpell über der gesamten Breite des Präparats, konnte die Tunica muscularis mit der Pinzette leicht von der Submukosa entfernt werden. Nach dem Entfernen der Muskelschicht, wurde das Gewebe umgedreht, erneut fixiert und gespannt. Die Mukosa zeigte nun nach oben. Es erfolgte ein zweiter Schnitt über der gesamten Breite des Präparats bis in die Tela submucosa. Durch vorsichtiges Verschieben mit einem angefeuchteten Finger wurde die Lamina epithelialis zusammen mit der Lamina propria von der Tela submucosa getrennt. Ein konstant vorhandener Lymphknoten zwischen dem früh-distalen und dem spät-distalen Kolon diente der Trennung beider Abschnitte. Mit Hilfe von Stahlnadeln wurde das Epithel unter leichtem Zug auf der Agarplatte befestigt. Danach wurde eine Hälfte einer hohlen zylindrischen Ussing-Kammer auf die mukosale Seite des Epithels aufgesetzt. Das passende Gegenstück der Kammer wurde nach Entfernen der Plastikfolie serosal aufgesetzt und das zwischen den beiden Hälften befindliche Epithel zusammengedrückt. Nach Fixierung der Ussing-Kammer im Versuchsstand, wurde diese mukosal und serosal mit je 9 ml Badlösung gefüllt und mit 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> begast. Die in der Messkammer exponierte Epithelfläche betrug 0,54 cm<sup>2</sup>. Nach 20 Minuten wurden auf jeder Seite 1 ml FKS zur Absättigung der Glasoberflächen und 10 µl Sab-Simplex zur Schaumreduktion zugegeben. Die Zytokinzugabe erfolgte dann nach einem Schema (vgl. Kapitel 2.5.4).

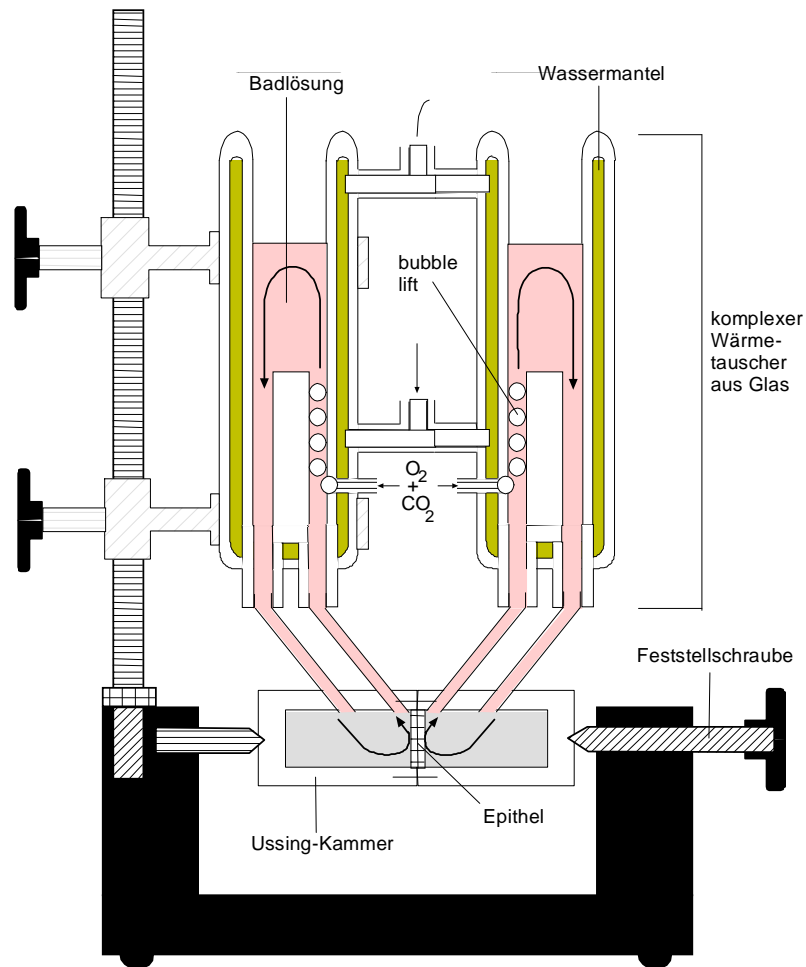
## 2.3 Versuchsstand – Miniaturisierte Ussing-Kammer

### 2.3.1 Messkammer und Wärmetauscher

Die in dieser Arbeit verwendeten Messkammern entsprechen in miniaturisierter Form dem klassischen Modell nach Ussing und Zehran von 1951. Die Messkammern bestanden aus zwei symmetrischen Hälften, die durch das eingespannte Epithel vollständig voneinander getrennt wurden. Sowohl der Stoff- und Flüssigkeitstransport, als auch der elektrische Strom erfolgten nur durch das intakte Epithel. Die Kammerhälften bestanden aus zylindrischen Acrylglaskonstruktionen, deren Innenraum konisch geformt war. Die offene Basis zeigte nach medial zum Epithel hin. Der Innenraum fasste ein Volumen von 0,5 ml und diente der Umspülung des Epithels mit der Badlösung.

Drei kleine Kanäle durchbohrten eine Kammerhälfte. Die zwei oberen Kanäle fassten Metallstifte mit einem Lumen und dienten der Verankerung von elastischen Verbindungsschläuchen zwischen der Kammer und dem Badlösungsreservoir. In dem seitlichen Kanal einer Kammerhälfte waren die Spannungs- und Stromelektroden eingelassen.

Eine doppelwandige Glaskonstruktion aus zwei nebeneinander liegenden Hohlzylindern diente als Badlösungsreservoir. Über vier elastische Schläuche war dieses mit der Messkammer verbunden. Die Zirkulation der Badlösung wurde durch die Begasung mit 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> aufrechterhalten. Die Sauerstoffanreicherung erfolgte durch vier epithelferne Zuleitungen über Silikonschläuche. Durch die Begasung wurde nicht nur eine Umwälzung der Badlösung erreicht, sondern auch die Konstanz des pH-Werts gewährleistet. Die Begasung ermöglichte somit eine dauerhafte Exposition mit Sauerstoff und in der Lösung enthaltenen Nährstoffen bei konstantem pH, wodurch eine frühzeitige trophische Schädigung des Epithels minimiert wurde. Die konstante Erwärmung der Badlösung auf 37°C erfolgte über einen komplexen Wärmetauscher, in dessen doppelter Wandung sich Wasser befand, und welches über ein Schlauch- und Pumpensystem verbunden war.



**Abb. 2: Ussing-Versuchsstand mit Wärmetauscher, integrierter Begasung und Umwälzung**

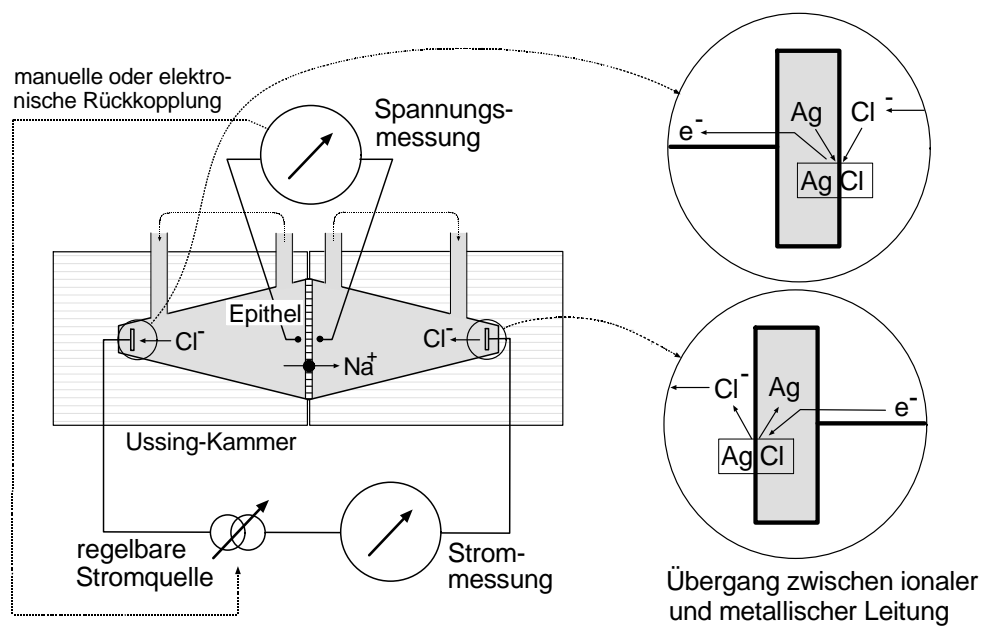
Das Epithel ist zwischen den beiden Kammerhälften der Ussing-Kammer wie eine "Trennmembran" aufgespannt und wird von 37°C warmer Badlösung umspült. Die Zirkulation der Lösung wird durch die über den "bubble lift" aufsteigenden Gasbläschen aus 95%  $O_2$  und 5%  $CO_2$  aufrechterhalten. Die Erwärmung der Badlösung erfolgt über einen komplexen Wärmetauscher, in dessen doppelter Wandung sich Wasser befindet, das über ein temperiertes Wärmebad umgewälzt wird [Barmeyer, 2002].

### 2.3.2 Elektrische Messanordnung

Die Anordnung der Messelektroden entsprach der 4-Elektroden-Technik nach Ussing und Zehran [1951].

Im Innenraum der Kammer befanden sich vier Elektroden. Ein Elektrodenpaar befand sich epithelnah (1-2 mm vom Epithel entfernt) und diente der Registrierung der transepithelialen

Potentialdifferenz. Durch die Nähe der Elektroden zum Epithel wurde die Dicke der Flüssigkeitsschicht und damit die im kurzgeschlossenen Zustand auftretenden Spannungsabfälle zwischen dem Epithel und der Elektrodenspitze so gering wie möglich gehalten. Jede Spannungselektrode bestand aus einer mit 3 g/dl Agar-Agar in 0,5 mol/l KCl gefüllten Glaskapillare. Der elektrische Kontakt wurde durch einen Mikroelektrodenhalter, der ebenfalls mit 0,5 mol/l KCl gefüllt war und zentral die Spannungselektrode fasste, sichergestellt. Die Abschirmung der Spannungselektroden erfolgte mittels eines kupfernen Schirms. Das zweite Elektrodenpaar, bestehend aus Silberdrahttringen an der lateralen Seite der Kammer, diente der Applikation des Kurzschlussstroms. Die epithelferne Lokalisation (ca. 20 mm vom Epithel entfernt) sicherte eine gleichmäßige Verteilung des elektrischen Feldes über der Epithelfläche. Die Stromimpulse aus der Kammer wurden in festen Zeitintervallen über eine hierfür speziell angefertigte computergesteuerte Spannungsklemmeinrichtung (Typ CVC6; Fiebig, Berlin) an einen PC geleitet. Hier wurden die Messungen aufgezeichnet und auf einem Bildschirm sichtbar gemacht. Bestimmt wurden der Gesamtwiderstand des Epithels, der Nettoionenflux und die transepitheliale Spannung. Die Applikation des Kurzschlussstroms erfolgte ebenfalls durch dieses Gerät.



**Abb. 3: Elektrische Messanordnung bei den Ussing-Versuchen**

Die Messung der transepithelialen Spannung erfolgt über die epithelnahen Spannungselektroden. Der Kurzschlussstrom wird über die epithelfernen Elektroden appliziert. Der Übergang zwischen ionaler und elektrischer Leitung erfolgt mittels Ag/AgCl-Elektroden [Fromm, 2004].

## 2.4 Wechselstrom-Impedanzspektroskopie

### 2.4.1 Prinzip der Impedanzmessung

Die Wechselstrom-Impedanzspektroskopie ist ein Verfahren, welches die Diskriminierung zwischen dem epithelialen und dem subepithelialen Anteil am Gesamtwiderstand der Darmwand ermöglicht. Der subepitheliale Widerstand entspricht dabei allen nicht-epithelialen Anteilen der Biopsie bzw. den nicht-epithelialen Anteilen des gestrippten Epithels bei der Ratte. Es gilt:

$$R^t = R^e + R^{\text{sub}}$$

$R^t$  Gesamtwiderstand des Epithels

$R^e$  Widerstand des Epithels

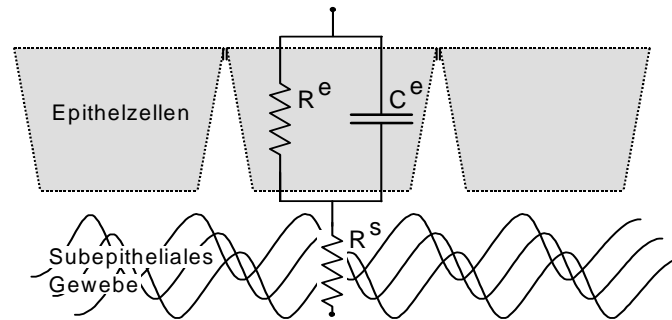
$R^{\text{sub}}$  Widerstand des Subepithels

Die Wechselstrom-Impedanzanalyse basiert auf einem 3-Parameter-Modell, mit dem das elektrische Verhalten der Darmwand dargestellt werden kann [Fromm et al., 1977; Schifferdecker & Frömter, 1978]. In diesem Modell wird die Darmwand als ein elektrischer Ersatzschaltkreis beschrieben. Der epitheliale Widerstand entspricht einem ohm'schen Widerstand, welcher parallel zu einem Kondensator (RC-Glied) und in Reihe zu einem dem subepithelialen Widerstand entsprechenden ohm'schen Widerstand geschaltet ist. Die kapazitiven Eigenschaften der apikalen und der basolateralen Zellmembranen werden hierbei als apparente Kapazität des Kondensator-Glieds repräsentiert [Cole, 1968].

Subepitheliale Zellen wie Fibroblasten, Lymphozyten, Makrophagen und andere sowie die extrazelluläre Matrix besitzen ebenfalls eine Kapazität. Diese sind jedoch nicht über Zellverbindungen miteinander verbunden, so dass der Strom durch den subepithelialen Raum – entlang des geringsten Widerstandes – fließen kann. Die subepitheliale Kapazität wird dadurch kurzgeschlossen und tritt elektrisch nicht in Erscheinung.

Appliziert man nun bei eingespanntem Darmstück Wechselströme unterschiedlicher Frequenzen, so misst man bei einer Frequenz von 0 einen unendlich großen kapazitiven Blindwiderstand. Der gesamte Strom fließt in diesem Zustand über den dem epithelialen Widerstand entsprechenden R-Teil des RC-Gliedes und den in Serie geschalteten Widerstand. Bei sehr großen Frequenzen des Wechselstroms dagegen – Extrapolation gegen die Messfrequenz  $\infty$  – tendiert der kapazitative Blindwiderstand gegen 0. Der gesamte Strom fließt in diesem Fall über den Kondensator am kurzgeschlossenen Parallelwiderstand vorbei durch den folgenden Serienwiderstand. Der dann gemessene Widerstand entspricht dem subepithelialen Anteil des Gesamtwiderstandes.





**Abb. 4:** Elektrischer Ersatzschaltkreis der Darmwand

Der epitheliale Widerstand  $R^e$  entspricht einem rein ohm'schen Widerstand parallel zu einem Kondensator  $C^e$  (RC-Glied), der folgende rein ohm'sche Widerstand entspricht dem subepithelialen Widerstand  $R^{\text{sub}}$ . Bei Frequenzen  $f \rightarrow 0$  blockt  $C^e$ . Es werden dann  $R^e + R^{\text{sub}}$  gemessen. Bei Frequenzen  $f \rightarrow \infty$  schließt  $C^e$  den Widerstand  $R^e$  kurz und es wird  $R^{\text{sub}}$  gemessen [Barmeyer, 2002].

Die Impedanzanalyse des Epithels kann man graphisch in einem sogenannten Nyquist-Diagramm darstellen [Cole & Cole, 1941]. Auf der x-Achse ist in diesem Diagramm der Realteil der komplexen Impedanz aufgetragen. Dieser entspricht dem ohm'schen Widerstand des Epithels. Der Imaginärteil der Impedanz, welcher den kapazitiven Eigenschaften des Epithels entspricht, ist dagegen auf der y-Achse aufgetragen. In dieser Arbeit wurde die Messung der Wechselströme bei den Frequenzen 0 bis 65 kHz durchgeführt. Die einzelnen Messpunkte wurden durch einen Teilkreis miteinander verbunden. Der Schnittpunkt dieses Teilkreises mit der x-Achse bei der Frequenz 0 Hz entspricht dem Gesamtwiderstand des Gewebes  $R^t$ , der Schnittpunkt bei 65 kHz ergibt den subepithelialen Widerstand  $R^{\text{sub}}$ .

Einfaltungen und Inhomogenitäten des eingespannten Gewebestücks bewirken Verformungen des im Nyquist-Diagramm dargestellten Teilkreises. Für die Bestimmung von  $R^e$  und  $R^{\text{sub}}$  spielen diese Verformungen jedoch keine Rolle, da hierfür lediglich die Schnittpunkte mit der x-Achse entscheidend sind [Fromm, 1986].

#### 2.4.2 Impedanz-Versuchsstand

Die Messkammer des Impedanz-Versuchsstandes unterschied sich lediglich in der Geometrie von den oben beschriebenen Kammern. Der Innenraum dieser ebenfalls symmetrischen Kammer war nicht konisch, sondern zylindrisch konstruiert. Auch der elektrische Aufbau der Impedanz-Kammer entsprach der 4-Elektroden-Technik nach Ussing und Zehran [1951]. Zwei Silberdrahtringe dienten als Stromelektroden und zwei mit 0,5 mol/l KCl gefüllte Glaskapillaren als Spannungselektroden.

## 2.5 Versuchsablauf

### 2.5.1 Badkorrektur und Elektrodenasymmetrie

Bei den Widerstandsmessungen in der Ussing-Kammer wird ein Spannungsabfall zwischen den Elektroden hervorgerufen. Durch eine dünne Flüssigkeitsschicht zwischen dem eingespannten Epithel und den Elektroden kam es bei den Messungen zu einem zusätzlichen unerwünschten Spannungsabfall. Daher wurde zur Korrektur des zu hohen Widerstandabfalls vor dem Einspannen des Epithels der ohm'sche Widerstand der Badlösung in der leeren Kammer bestimmt und von den Messwerten während des Versuches abgezogen.

Auch die durch die Asymmetrie der Elektroden hervorgerufene Potentialdifferenz wurde zur Korrektur gespeichert und während des Versuches von den gemessenen Spannungen abgezogen.

### 2.5.2 Messung des Kurzschlussstroms

Im Abstand von einer Minute wurden während der Messungen die transepitheliale Spannung, der elektrische Widerstand und der Kurzschlussstrom registriert. Um den elektrischen Gradienten über dem Epithel auszuschalten, wurde Strom einer Stromstärke, die die Potentialdifferenz auf 0 mV brachte, appliziert. Da durch gleiche Zusammensetzung der Badlösung und gleiche Füllhöhe der Kammern alle elektrochemischen und hydrostatischen Gradienten ausgeschaltet wurden, entsprach dieser Strom, der Kurzschlussstrom, dem durch aktiven elektrogenen Ionentransport bedingten Strom. Dieser kann sowohl als Strom pro Fläche in  $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  als auch als Teilchenflux pro Fläche in  $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  angegeben werden.

$$\text{Strom} \quad \frac{I}{A} [\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}] = \frac{96487}{3600} \cdot \frac{M}{t \cdot A} = 26,8 \cdot \frac{M}{t \cdot A}$$

$$\text{Flux} \quad \frac{M}{t \cdot A} [\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}] = \frac{3600}{96487} \cdot \frac{I}{A} = 0,037 \cdot \frac{I}{A}$$

I      Stromstärke

A      Fläche

M      Menge transportierter Ionen

t      Zeit

Faraday-Konstante  $F=96487$  Coulomb/mol

Die Registrierung des transepithelialen Widerstandes erfolgte durch kurze Überlagerung des aktuellen Kurzschlussstroms mit rechteckigen Stromimpulsen. Diese führten zu entsprechenden Spannungsänderungen. Nach dem Ohm'schen Gesetz wurde der transepitheliale Widerstand wie folgt errechnet:  $R_t = dV_{ms}/dI_{sc}$ .

### **2.5.3 Bestimmung des aktiven elektrogenen Natrium-Transports an humanen Sigmabiopsien**

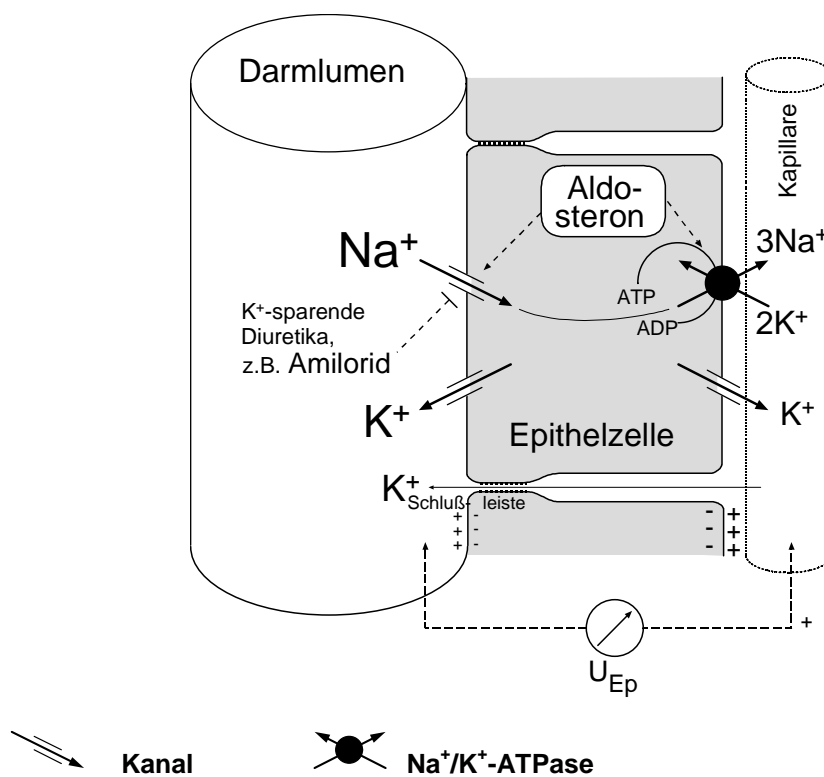
Bei dem elektrogenen Natrium-Transport handelt es sich um einen primär aktiven Ionentransport. Im distalen Kolon dient dieser der Konzentrierung des Stuhls und wird vor allem durch das Mineralokortikoid Aldosteron stimuliert. Die Wirkung des Aldosterons beruht auf der dosisabhängigen Zunahme der Zahl der epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanäle (ENaC). Durch eine basolateral lokalisierte  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase wird in der Zelle ein Konzentrationsgradient für Natrium erzeugt. Natrium wird daraufhin über den in der apikalen Membran lokalisierten ENaC in die Zelle aufgenommen. Es resultiert ein elektrogener transepithelialer Natrium-Transport, d.h. ein Teilchentransport mit einer Verschiebung von Nettoladung. Der Anstieg des Transports erfolgt mit einer Latenzzeit von ungefähr einer Stunde. Das Maximum war nach 6-8 Stunden erreicht [Epple et al., 1995].

Durch das  $\text{K}^+$ -sparende Diuretikum Amilorid lässt sich der ENaC hochselektiv hemmen [Benos, 1982]. Eine Konzentration von  $10^{-4}$  mol/l führt nahezu vollständig zum Erliegen des aktiven Natrium-Transports. Kurz nach dem Einspannen des Epithels wurde die elektrogene Chlorid-Sekretion durch Zugabe des Schleifendiuretikums Bumetanid in einer Konzentration von  $10^{-5}$  mol/l auf der serosalen Seite gehemmt.

In Versuchen am menschlichen Rektumepithel konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe von Bumetanid stabilhohe Kurzschlussströme um ca. 50% gesenkt werden konnten. Daraus wurde geschlossen, dass dieser Anteil des Kurzschlussstroms im unstimulierbaren Zustand einer spontanen elektrogenen Chlorid-Sekretion des Dickdarmes in der in vitro Anordnung entspricht [Sandle, 1989]. Bumetanid ist eine als Diuretikum verwendete Substanz, die den  $\text{Na}^+2\text{Cl}^-\text{K}^+$ -Symporter selektiv blockiert. Man findet diesen Kanal nicht nur im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife in der Niere, wo Bumetanid therapeutisch als Diuretikum angreift, sondern auch im Dünndarm und im gesamten Dickdarm. Durch Blockade des  $\text{Na}^+2\text{Cl}^-\text{K}^+$ -Symporters wird die basolaterale Aufnahme von Natrium-, Kalium- und Chlorid-Ionen in die Zelle gehemmt. Daraufhin sinkt die intrazelluläre Chloridkonzentration und damit die aktive elektrogene Chlorid-Sekretion.

## Material und Methoden

Ungefähr 5-10 Minuten nach dem Einspannen des Darmstücks in der Kammer wurde die elektrogene Natrium-Resorption durch Zugabe von Aldosteron in einer Konzentration von  $3 \cdot 10^{-9}$  mol/l auf der mukosalen und der serosalen Seite der Kammer stimuliert. Nach einer Laufzeit von 8 Stunden wurde durch die Gabe von Amilorid in einer Konzentration von  $10^{-4}$  mol/l ebenfalls auf beiden Seiten der Kammer der epitheliale Natrium-Kanal gehemmt. Es kam zu einem raschen Abfall des Kurzschlussstromes. Aus der Differenz des Kurzschlussstromes kurz vor und 20 Minuten nach der Zugabe von Amilorid lässt sich der aktive elektrische Natrium-Transport quantitativ bestimmen.



**Abb. 5:** Elektrogener transzellulärer Natrium-Transport im Kolon

Aldosteron führt zu einer Zunahme der Dichte der epithelialen Natrium-Kanäle in der apikalen Membran und fördert damit den Einstrom von Natrium in die Zelle. Das dazu notwendige Konzentrationsgefälle wird von der basolateral gelegenen, ebenfalls durch Aldosteron stimulierbaren,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase erzeugt. Dieser transzelluläre Transport lässt sich durch Amilorid fast vollständig hemmen [Fromm, 2004].

#### **2.5.4 Bestimmung des aktiven elektrogenen Natrium-Transports am spät-distalen Kolon der Ratte**

Bei den Versuchen am spät-distalen Kolon der Ratte wurde prinzipiell gleich verfahren wie bei der Bestimmung des aktiven elektrogenen Natrium-Transports an humanen Sigmabiopsien.

Vor der Aldosteron-Gabe erfolgte jedoch eine Inkubation mit den Zytokinen TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  und IL-15. Hierbei war eine Vorinkubation von einer Stunde mit IFN $\gamma$  und IL-15 notwendig, bevor das Gewebe für weitere 6 Stunden mit TNF $\alpha$  inkubiert wurde. Die Zugabe der Zytokine erfolgte für TNF $\alpha$  (10.000 U/l) und IFN $\gamma$  (1.000 U/l) auf der serosalen Seite. Für IL-15 ist jedoch bekannt, dass dieses Zytokin seine Effekte durch Zugabe auf der mukosalen Seite im Gegensatz zu TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  noch weiter verstärken kann [Stevens et al., 1997]. Daher erfolgte die Zugabe von IL-15 (10.000 U/l) sowohl auf der serosalen, als auch auf der mukosalen Seite der Kammer.

Nach der Phase der Inkubation mit den Zytokinen wurde schließlich Aldosteron in einer Konzentration von  $3 \cdot 10^{-9}$  mol/l beidseits zugegeben. Nach weiteren 8 Stunden wurde der elektrogene Natrium-Transport durch Amilorid gehemmt. Aus der Differenz des Kurzschlussstromes vor und nach Amilorid-Gabe wurde der elektrische Natrium-Transport bestimmt.

#### **2.5.5 Untersuchung der Viabilität des Epithels**

In den durchgeführten Ussing-Experimenten an humanen Sigmabiopsien wurde zunächst die Viabilität des untersuchten Epithels sichergestellt. Zu diesem Zweck bedienten wir uns der Stimulation und der Hemmung der aktiven elektrogenen Chlorid-Sekretion.

Die Stimulation der aktiven Chlorid-Sekretion des eingespannten Gewebes in der Ussing-Kammer erfolgte zunächst durch die Zugabe von PGE $_2$  ( $10^{-6}$  mol/l) auf der serosalen Seite und Theophyllin ( $10^{-2}$  mol/l) auf beiden Seiten der Kammer. Beide Substanzen bewirken über eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehaltes eine Stimulation der Chlorid-Sekretion. Anschließend wurde das Epithel durch die Zugabe von Carbachol ( $10^{-4}$  mol/l), einem direkten Parasympathomimetikum, auf der serosalen Seite der Kammer weiter stimuliert. Durch serosale Zugabe von Bumetanid wurde der elektrogene Chlorid-Transport schließlich gehemmt.

Ein Anstieg des Kurzschlussstroms nach Stimulation mit PGE $_2$ , Theophyllin und Carbachol sowie ein Absinken des Kurzschlussstroms nach Hemmung der Chlorid-Sekretion mit Bumetanid spiegelten die Viabilität des untersuchten Gewebes wider.

### **2.5.6 Bestimmung der elektrischen Impedanz des Epithels**

Wie bereits oben erläutert, wurden zur Diskriminierung zwischen dem epithelialen und dem subepithelialen Widerstand Wechselströme bei 48 Frequenzen im Bereich von 1,3 Hz und 65 kHz über Stromelektroden in der Kammer appliziert. Die Spannungsantworten über dem Epithel wurden mit einem Phasen-empfindlichen Verstärkersystem (Electrochemical Interface, Typ 1286; Frequency Response Analyser, Typ 1250, Fa. Schlumberger, Gräfelfing) registriert. Die Steuerung dieser Geräte, die Datenaufnahme und -speicherung sowie die Berechnung der Daten wurden von einem PC ausgeführt.

Unter Berücksichtigung der Phasenverschiebung von Strom und Spannung sowie unter Korrektur des Badwiderstandes und der Elektrodenasymmetrie wurde aus den einzelnen 48 Spannungsantworten die komplexe elektrische Impedanz berechnet. Anschließend wurden die gemessenen Impedanzwerte im Nyquist-Diagramm zu einem Teilkreis zusammengefügt. Aus den Schnittpunkten des Teilkreises mit der x-Achse wurden der transepitheliale und der subepitheliale Widerstand des Epithels bestimmt und daraus der epitheliale Widerstand errechnet. Pro Epithel wurden vier Messungen im Abstand von 15 Minuten durchgeführt.

### **2.5.7 Messung von Mannitolfluxen**

Mannitol ist ein hydrophiles Molekül mit einer Größe von 182 Da und einem Durchmesser von 0,67 nm, für das es keine spezifischen aktiven Transportmechanismen in Epithelien gibt. Mannitol überquert das Epithel größtenteils parazellulär über solvent drag und zu einem geringen Anteil durch passive Diffusion [Krugliak et al., 1994; Anderberg et al., 1992]. Es wird daher als Marker der intestinalen Durchlässigkeit eingesetzt. Mit der Messung von Mannitol-Fluxen kann somit die Größe des parazellulären Spaltes und damit der epithelialen Barriere charakterisiert werden.

Zunächst wurde der Badlösung Mannitol auf beiden Seiten der Ussing-Kammer in einer Konzentration von 10 mM zugesetzt, um osmotische Effekte durch einen Konzentrationsgradienten zu verhindern. Die Messungen der Mannitol-Fluxe erfolgten unidirektional von der mukosalen zur serosalen Seite des Darmstücks. Nach dem Einspannen der Biopsie in die Ussing-Kammer und einer Einlaufzeit von 10 Minuten wurde für den Nullwert 1 ml Badlösung aus dem serosalen Kompartiment in ein Glas-Vial abgenommen und die entsprechende Menge durch frische Badlösung ersetzt. Dadurch wurde der hydrostatische Gradient ausgeschaltet. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl [<sup>3</sup>H]-Mannitol (Finalkonzentration: 41,7 kBq/ml) auf der mukosalen Seite. Das Kompartiment mit [<sup>3</sup>H]-Mannitol wird im Folgenden als „heiße Seite“, das Kompartiment ohne die radioaktive Substanz

als „kalte Seite“ bezeichnet. Zur Bestimmung der Aktivität der heißen Seite der Ussing-Kammer wurden zwei Mal je 100 µl vom mukosalen Kompartiment entnommen und für die Messung 1:10 mit der Badlösung verdünnt. Der Mittelwert entsprach der heißen Probe. Nach 15, 30, 45 und 60 Minuten erfolgte die Probenentnahme von der serosalen Seite. Hierfür wurde je 1 ml entnommen und nach jeder Abnahme durch das gleiche Volumen ersetzt. Die entnommenen Proben wurden mit 4 ml Szintillationslösung versetzt und die Radioaktivität in einem Counter für β-Strahlen gemessen. Die Fluxrate von Mannitol wurde folgendermaßen berechnet:

$$J_{\text{Man}} = \frac{1.000.000 \cdot (V \cdot [\text{Man}] \cdot t \cdot F_k^{-1}) \cdot (10 \cdot (\beta_3 - \beta_{\text{leer}})) - (9 \cdot (\beta_2 - \beta_{\text{leer}}))}{99 \cdot (\beta_{\text{heiß}} - \beta_{\text{leer}}) - 10 \cdot (\beta_2 - \beta_{\text{leer}}) - 9 \cdot (\beta_1 - \beta_{\text{leer}})} \text{ nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$$

[Man]	Konzentration von Mannitol in der Badlösung (10 mmol/l)
$F_k$	Kammerfläche in $\text{cm}^2$
$J_{\text{Man}}$	unidirektionaler Flux für Mannitol
t	Zeitintervall zwischen zwei Probenabnahmen in Anteilen von 1 Stunde
V	Kammervolumen in Liter
$\beta_{\text{leer}}$	Leerwert, d.h. Aktivität von 1ml Lösung im β-Counter
$\beta_{\text{heiß}}$	β-Aktivität der Probe von der „heißen“ Seite
$\beta_{1,2,3,\dots}$	β-Aktivität der kalten Abnahmen

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

### 2.6.1 Protein-Extraktion aus humanen Colon sigmoideum-Biopsien

Mit Hilfe der Western Blot-Technik wurde die Expression von Occludin sowie von Claudin-1 bis Claudin-5 und Claudin-8 untersucht. Bei der im Folgenden beschriebenen Methode handelt es sich um die Gewinnung der membrangebundenen und zytosolischen Proteinfraction aus endoskopisch entnommenen Biopsien.

Die Biopsien wurden nach der Entnahme in 1,5 ml Reaktionsgefäßen zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Proteingewinnung wurden die Biopsien auf Eis gelagert. Je eine Biopsie wurde in ein Homogenisator-Röhrchen überführt und mit 300  $\mu\text{l}$  eines frisch hergestellten Gesamtlysepuffers versetzt. Mit Hilfe des Homogenisators wurden die Darmstückchen so lange mechanisch zerkleinert, bis kein Gewebe mehr erkennbar war. Die entstandene Zellsuspension wurde durch jeweils zehnmaliges Pressen durch eine 20 G-Kanüle sowie eine 26 G-Insulinkanüle weiter homogenisiert. Die Zelltrümmer wurden anschließend bei 200 x g und  $4^{\circ}\text{C}$  für fünf Minuten zentrifugiert. Der nach der Zentrifugation entstandene Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten erfolgte eine weitere Zentrifugation für 15 Minuten bei 15.000 x g und  $4^{\circ}\text{C}$ . Der nach dieser Zentrifugation entstandene Überstand, das Gesamtlysat, wurde abgenommen und der Proteingehalt der Proben bestimmt. Anschließend wurden die Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  asserviert.

### 2.6.2 Proteinquantifizierung

Die spektralphotometrische Bestimmung des Proteingehalts mit Hilfe des BCA-Reagenz (Bicinchoninsäure) beruht darauf, dass in Anwesenheit von Proteinen in einer alkalischen Lösung  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^{+}$ -Ionen reduziert werden. Diese bilden mit der Bicinchoninsäure einen stabilen Farbkomplex [Smith et al., 1987].

Die Proteinbestimmung erfolgte in Mikrotiterplatten. Anhand einer Eichgeraden von Proteinen des Rinderserumalbumins der Konzentrationen 0 mg BSA/ml, 0,2 mg/ml, 0,8 mg/ml und 1,2 mg/ml wurde photometrisch der Proteingehalt der Proben bestimmt. Pro Vertiefung wurden 10  $\mu\text{l}$  Probe bzw. der Standardreihe pipettiert und 190  $\mu\text{l}$  der BCA-Gebrauchslösung hinzugefügt. Als Kontrolle dienten 10  $\mu\text{l}$  Lysepuffer ebenfalls mit 190  $\mu\text{l}$  Gebrauchslösung versetzt. Für die Standardreihe, die Kontrolle und die Proben wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt (siehe Tab. 1). Nach dem Pipettieren wurde die Mikrotiterplatte für 30 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Extinktion bei 562 nm im Tecan



Spectra Mikrotiterplatten-Photometer. Von den Mittelwerten der Proben wurde der Extinktionswert des Lysepuffers abgezogen und mit Hilfe der Eichgeraden der Proteingehalt der Proben quantifiziert.

	1	2	3	4
<b>A</b>	0.0 mg/ml BSA	0.0 mg/ml BSA	Probe 1	Probe 1
<b>B</b>	0.2 mg/ml BSA	0.2 mg/ml BSA	Probe 2	Probe 2
<b>C</b>	0.8 mg/ml BSA	0.8 mg/ml BSA	Probe 3	Probe 3
<b>D</b>	1.2 mg/ml BSA	1.2 mg/ml BSA	Probe 4	Probe 4
<b>E</b>	Lysepuffer	Lysepuffer	Probe 5	Probe 5
<b>F</b>			Probe 6	Probe 6
<b>G</b>			Probe 7	Probe 7
<b>H</b>	Leer	Leer	Probe 8	Probe 8

**Tab. 1: Pipettierschema zur Bestimmung des Proteingehalts mit dem Tecan Spectra Mikrotiterplatten-Photometer**

### 2.6.3 Proteinauftrennung durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Trennung und Bestimmung von Proteingemischen erfolgte durch die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese, kurz SDS-PAGE, wobei Proteine aufgrund ihres Ladungs-Masseverhältnisses in einer definierten Gelmatrix aus Acryl- und Bisacrylamid in einem elektrischen Feld wandern. Das Acrylamid bildet in einer Kettenreaktion lange Polymere, die durch die Anwesenheit von freien Radikalen (Radikalbildner: Ammoniumpersulfat, kurz APS) und durch einen Katalysator (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, kurz TEMED) unterstützt wird. Das Natriumdodecylsulfat (SDS), das sich im Gel befindet, lagert sich an die Proteine an, denaturiert sie und lädt sie gleichmäßig negativ auf. Die Wanderung der Proteine im Gel ist dadurch nicht mehr von der Gesamtladung oder Konformation der Proteine abhängig. Die Proteine wandern durch die Gelmatrix umso schneller, je kleiner die Molekülgröße, je größer die angelegte Spannung und je niedrigprozentiger das Polyacrylamidgel ist. Zur Auftrennung von Occludin wird ein 8,5-prozentiges Gel benötigt, für die Claudine ein 12,5-prozentiges Gel, da die Molekularmasse des Occludins mit rund 64 kDa einem Mehrfachen der Molekularmasse der Claudine mit rund 22 kDa entspricht.

## Material und Methoden

Das Gießen des Gels erfolgte zwischen zwei Glasscheiben, die durch einen 1,5 mm dicken Abstandhalter voneinander getrennt in einer entsprechenden Halterung befestigt waren. Zunächst wurde die erste Gelfraktion, das Trenngel, luftblasenfrei zwischen die Glasscheiben bis etwa 1,5 cm unterhalb der oberen Kante der Glasplatte pipettiert und mit 1 ml absolutem Alkohol überschichtet, damit eine glatte Oberfläche entstehen konnte. Nach Polymerisation des Gels für 30 Minuten wurde der Alkohol abgegossen und die Reste mit Filterpapier entfernt. Die zweite Fraktion, das Sammelgel, wurde nun auf das Trenngel geschichtet und ein Kamm mit 10 Zacken eingesteckt. Dadurch erhält man später 10 Vertiefungen für die Aufnahme der Proben. Nach erneuter Polymerisation von 30 Minuten wurde der Kamm vorsichtig entfernt. Das Gel wurde nun in einer Elektrodenhalterung befestigt, in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und die Kammer mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Die entstandenen Vertiefungen im Sammelgel wurden mit Elektrophoresepuffer gespült, um Gelreste zu entfernen. Anschließend wurden die vorbereiteten Proben sowie 6 µl eines Protein Weight Markers in die Vertiefungen pipettiert. Für jede Vertiefung wurde dabei ein Proteingemisch von 15 µl, bestehend aus 3 µl 5x Laemmli-Puffer, einem Volumenanteil der Probe sowie Lysepuffer zum Auffüllen auf 15 µl, hergestellt. Der Proteingehalt pro Vertiefung betrug 10 µg. In einem Heizblock wurden die Proteine bei 95°C etwa 5 Minuten denaturiert. Nach dem Befüllen der Vertiefungen erfolgte die Elektrophorese bei konstanter Spannung von 100 V für etwa 90 Minuten, bis die am Bromphenolblau erkennbare Front bis zum unteren Rand der Gelkammer durchgelaufen war.

### **2.6.4 Protein-Elektrotransfer**

Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine kann man auf dem Gel mit Hilfe unspezifischer Proteinfärbung wie Comassie-Blau nachweisen. Um einzelne Proteine nachzuweisen, benutzt man Antikörper, die spezifisch an diese Proteine binden. Hierfür werden die Proteine in einem elektrischen Feld auf eine Nylonmembran (Poly Screen PVDF-Membran) übertragen. Die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf die Nylonmembran wurde im Tank-Blot-Verfahren durchgeführt.

Die auf die Gelgröße zugeschnittene PVDF-Membran wurde vor dem Blotvorgang für 5 Minuten in absolutem Alkohol angefeuchtet und anschließend zusammen mit zwei Schwämmen und zwei ebenfalls gelgroßen Filterpapieren für etwa 15 Minuten in Transferpuffer equilibriert. Zwischenzeitlich wurde das Polyacrylamidgel aus der Apparatur ausgebaut und das Sammelgel abgetrennt. Das Trenngel mit den aufgetrennten Proteinen wurde ebenfalls in Transferpuffer inkubiert.

Anschließend wurde eine Gelmembraneinheit luftblasenfrei wie folgt zusammengebaut:

Anode (+)  
 Weiße Platte  
 Schwamm  
 Filterpapier  
 Membran  
 Gel  
 Filterpapier  
 Schwamm  
 Schwarze Platte  
 Kathode (-)

Diese "Sandwich"-Konstruktion wurde zusammen mit einem Kühlakku und einem Magnetrührstäbchen in die Transfer-Apparatur eingebaut. Diese wurde mit Transferpuffer gefüllt. Der Magnetrührer sorgte für eine gleichmäßige Kühlung.

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten negativ geladenen Proteine wurden elektrophoretisch aus dem Gel auf die positiv geladene Nylonmembran übertragen. Der Blotvorgang erfolgte bei 100 V für 60 Minuten.

### 2.6.5 Immunodetektion

Als Immunodetektion bezeichnet man den spezifischen Nachweis der auf der Membran fixierten Proteine mit Hilfe monoklonaler (Claudin-4) bzw. polyklonaler (Occludin, Claudin-1, -2, -3, -5, -8) Antikörper. Das untersuchte Protein wird dabei von primären Occludin- oder Claudin-spezifischen Antikörpern gebunden. Durch einen Enzym-konjugierten sekundären Antikörper, der gegen den Fc-Teil der primären Antikörper gerichtet ist, kann das Protein schließlich nachgewiesen werden.

Nach erfolgtem Elektrotransfer wurde die Membran kurz in PBS/Tween gespült und anschließend in 50 ml PBS/Tween/5% BSA/0,02% NaAzid zwei Stunden bei RT auf einer Wippe schwenkend inkubiert. Durch diesen Blockierungsschritt werden unspezifische Antigen-Antikörperreaktionen durch freie Proteinbindungsstellen verhindert. Anschließend wurde die Membran in mindestens 12,5 ml Lösung mit dem primären Antikörper bei 4°C über Nacht ebenfalls schwenkend inkubiert. Die primären Antikörper sind in PBS/Tween/5% BSA/0,02% NaAzid verdünnt (Occludin 1:10.000, Claudin-1, -2, -3, -5, -8 1:2.000, Claudin-4 1:5.000). Am

## Material und Methoden

nächsten Tag wurde die Membran zwei Mal in PBS/Tween und ein Mal in TBS/Tween für je 10 Minuten gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Danach erfolgte die Inkubation der Membran für 90 Minuten bei RT mit dem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper (anti-Maus-Antikörper bzw. anti-Kaninchen-Antikörper). Diese wurden 1:10.000 in 15 ml TBS/Tween/1% Blockier-Reagenz verdünnt. Nach wiederholtem Waschen der Membran in PBS/Tween und TBS/Tween wurde die Membran in einer Glasküvette für 5 Minuten in 10 ml Lumi-Light-Reagenz abgedunkelt inkubiert und danach zwischen zwei Transparentfolien gelegt. Die Detektion erfolgte im Luminiszenz-Detektor LAS-1000 durch eine integrierte Kamera, die die Chemoluminiszenz der durch die Peroxidase umgesetzten Substrate der Lumi-Light-Lösung registrierte. Die Darstellung und Auswertung der Daten wurde mit der AIDA-Software durchgeführt.

In dieser Arbeit wurde die Expression von Occludin und Claudin-1 bis Claudin-5 und Claudin-8 an einem Patientenkollektiv mit unbehandelter und behandelter lymphozytärer Kolitis im Vergleich zu Kontrollpatienten analysiert. Die Signale für Occludin und für die jeweiligen Claudine wurden zunächst mit den Signalen für das  $\beta$ -Actin auf dem gleichen Blot verrechnet.  $\beta$ -Actin diente der Normierung der interessierenden Proteine bezogen auf den Gesamtproteingehalt auf einem Blot. Die mit  $\beta$ -Actin normierten Mittelwerte der auf einem Blot detektierten Signale für Occludin und für die jeweiligen Claudine von Kontrollpatienten wurden für die Auswertung als 100% gesetzt und mit den Signalen der erkrankten Patienten prozentual in Bezug zur Kontrolle verrechnet.

### **2.6.6 Polymerase-Kettenreaktion**

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaktion, kurz PCR) wird unter anderem zur Quantifizierung kleinster mRNA-Mengen, zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten sowie zum Nachweis von Mutationen verwendet. Bei diesem Verfahren werden DNA-Moleküle mittels einer thermostabilen Polymerase (z.B. Taq-Polymerase) exponentiell vervielfältigt. Weiterhin werden Oligonukleotide als Startermoleküle, sogenannte Primer, die sich an das 5'-Ende des zu vervielfältigten DNA-Fragments anlagern, benötigt.

Die PCR setzt sich aus mehreren Schritten zusammen. Im ersten Schritt erfolgt bei 95°C die Denaturierung der DNA-Doppelstränge. Diese werden dabei getrennt. Im nächsten Schritt, dem sogenannten Annealing, kommt es zu einer Anlagerung der Primer. Hierfür wird die Temperatur optimal gesenkt. Im dritten Schritt, der Extension, erfolgt mittels der Polymerase am 3'-Ende die Synthese der neuen DNA-Stränge. Diese sind komplementär und antiparallel zum abgelesenen DNA-Fragment. Im letzten Schritt wird zur Trennung der neu synthetisierten DNA-Stränge von

dem Matrizenstrang die Temperatur wieder auf 95°C erhöht. Damit endet ein Zyklus und es folgen 25 bis 45 weitere, bei denen neben den ursprünglichen auch die neu synthetisierten DNA-Stränge amplifiziert werden. Dadurch steigt die Zahl der DNA-Moleküle exponentiell. In der vorliegenden Arbeit erfolgte mittels der PCR eine quantitative Analyse der mRNA der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten des ENaC.

### **2.6.7 Extraktion der Gesamt-RNA aus Gewebe**

Die am weitesten verbreitete Methode der Extraktion von Gesamt-RNA beruht hauptsächlich auf der Wirkung von Guanidinthiocyanat, welches auch stärkste hydrophobe Wechselwirkungen stört und dadurch die Denaturierung und somit die Inaktivierung extrem stabiler Proteine, wie z.B. RNasen, gewährleistet [Chirgwin et al., 1979; Chomczynski et al., 1987].

Für die Extraktion der Gesamt-RNA wurde nach Beendigung der Ussing-Versuche die in der Kammer exponierte Fläche der humanen Sigmabiopsien aus der Scheibe herausgeschnitten und bis zur weiteren Verarbeitung in ein Reaktionsgefäß mit RNAlater, einem Gewebelagerungsreagenz, überführt. Schließlich wurde das Gewebestückchen in PBS<sup>+Ca/Mg</sup> gewaschen, anschließend in ein Homogenisator-Röhrchen überführt und mit 1 ml einer Phenol- und Guanidinthiocyanat-Lösung versetzt. Mit Hilfe des Homogenisators wurden die Darmstückchen dann so lange mechanisch zerkleinert, bis kein Gewebe mehr erkennbar war. Die entstandene Suspension wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten bei RT inkubiert, um eine bessere Dissoziation der einzelnen Bestandteile zu erzielen. Danach wurden dem Homogenisat 0,2 ml Chloroform zugegeben und dieses nach kräftigem Schütteln für weitere 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation mit 12.000 x g für 5 Minuten bei 4°C, um eine Phasenauffrennung zu erreichen. Hierbei bilden sich drei Phasen: eine untere gelbe Phenol-Chloroform-Phase, eine obere farblose wässrige Phase und eine dazwischenliegende Interphase. Die RNA ist ausschließlich in der wässrigen Phase angereichert, während sich die DNA und die Proteine in der Interphase und in der Phenolphase befinden. Die wässrige Phase nimmt dabei ca. 50% des Probenvolumens ein. Diese wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von 1 Vol (bezogen auf das Homogenisat) Isopropanol erfolgte dann die Fällung der RNA. Dazu wurde das Gemisch über Nacht bei -20°C gelagert. Am nächsten Tag erfolgte eine weitere Zentrifugation mit 12.000 x g für 10 Minuten bei 4°C. Hierbei entsteht am Grund des Gefäßes ein die RNA enthaltendes Pellet. Der Überstand wurde nun vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 1 ml 75% Ethanol zum Waschen nochmals zentrifugiert (10 Minuten, 12.000 x g, 4°C). Danach wurde der Überstand abgenommen und das RNA-Pellet kurz an der Luft getrocknet. Das Lösen der RNA erfolgte

## Material und Methoden

durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit der Pipette in 20 µl RNase-freiem Wasser. Durch das Erhitzen der RNA-Lösung auf 60°C für 5 Minuten wurde eine bessere Lösbarkeit erzielt. Die Konzentration der Gesamt-RNA wurde anschließend photometrisch mit Hilfe des Gene Quant II RNA/DNA Calculator bestimmt. Dabei wurden die Proben 1:100 verdünnt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

### 2.6.8 Quantitative Bestimmung der mRNA

Zur Quantifizierung der mRNA muss diese mittels der Reversen Transkriptase zunächst in die komplementäre cDNA umgeschrieben werden. Die Reverse Transkriptase dient dem Retrovirus der Replikation seines Genoms. In der Molekularbiologie dient es der Synthese von DNA-Kopien von RNA-Strängen. Diese RNA-abhängige DNA-Polymerase benötigt Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs) als Substrate und Energielieferanten und außerdem Primer-Moleküle, an denen die Synthese der komplementären DNA beginnen kann.

In dieser Arbeit wurden 2 µg cDNA mit Hilfe des High-Capacity cDNA Archive Kits aus der isolierten Gesamt-RNA hergestellt. Die reverse Transkription erfolgte schließlich mit dem Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems) für 10 Minuten bei 25°C und weitere 120 Minuten bei 37°C. Anschließend wurden die Proben bei -20°C asserviert.

<b>RT-Ansatz 1x</b>	
RT-buffer (10x)	2 µl
dNTPs (25x)	0,8 µl
Random Hexamer Primers (10x)	2 µl
RNase Out (Inhibitor)	0,5 µl
Reverse Transcriptase	1 µl
RNA	x µl Vol. entsprechend 2 µg
RNase free H <sub>2</sub> O	x µl auf 20 µl

**Tab. 2: Protokoll der reversen Transkription**

Mit Hilfe der real time PCR wurde schließlich der mRNA-Gehalt der ENaC-Untereinheiten bestimmt. Bei dieser Methode wird das gewünschte Gen durch spezifische, fluoreszierende Sonden mittels PCR quantitativ bestimmt. Es werden dabei spezielle Oligonukleotid-Sonden verwendet, die sich spezifisch an das zu untersuchende Gen binden. Am 5'-Ende tragen diese Sonden einen fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (VIC oder FAM), am 3'-Ende einen

Quencher-Farbstoff (TAMRA). Bei Bestrahlung der Sonde mit Licht einer bestimmten Wellenlänge kommt es zu einer Fluoreszenz, die von dem Quencher absorbiert wird. Durch die räumliche Nähe des Quenchers zu dem Reporter kommt es zu einem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET). In der Extension der PCR wird die Sonde schließlich durch die 3'-Endonuklease hydrolysiert und damit der Quencher vom Reporter räumlich getrennt. Bei weiterer Bestrahlung der Sonde mit Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert der Reporter ein Fluoreszenzlicht, was detektiert werden kann. Dabei steigt das Fluoreszenzsignal mit der Zahl der DNA an. Das Fluoreszenzsignal wurde mit dem Taqman 7500 HT Fast Real-Time PCR System registriert und mit der SDS 2.2.1 Software ausgewertet.

Die verwendeten Sonden für die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten des ENaC waren mit dem Reporter FAM markiert. Als endogene Kontrolle wurde eine Sonde für Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) eingesetzt. Diese Sonde war mit VIC markiert. Die endogene Kontrolle wurde zur Normierung der gemessenen Werte auf einen Schwellenzyklus verwendet.

Die real time PCR erfolgte in speziellen 96-Loch-Platten. Für einen Ansatz von 20  $\mu$ l wurden 2  $\mu$ l cDNA und 18  $\mu$ l eines Master Mixes in die Vertiefungen der 96-Loch-Platte pipettiert. Der Master Mix setzte sich aus einem Teil Sonde, 10 Teilen Taqman Universal PCR Master Mix und sieben Teilen Wasser (RNase-frei) zusammen. Die PCR wurde folgendermaßen durchgeführt: 1) 10 Minuten bei 95°C, 2) 15 Sekunden bei 95°C, 3) 1 Minute bei 60°C. Schritt 2 und 3 wurden je 45 Mal wiederholt.

## **2.7 Färbeverfahren**

### **2.7.1 Fixierung, Einbettung und Schnittverfahren**

Nach Transport der Biopsien in physiologischer NaCl-Lösung wurden diese nach spätestens 20 Minuten in Formalin fixiert. Die Einbettung wurde nach 24-stündiger Fixierung in laborüblicher Paraffintechnik durchgeführt. Die Biopsien wurden hierbei mit Paraffin durchtränkt und anschließend eben in einem Paraffinblock eingebettet. Nach Aushärten der Blöcke wurde aus diesen mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms 3-5  $\mu$ m dünne Schnitte angefertigt. Für die folgenden Färbeverfahren wurden nur Präparate verwendet, deren Schnittführung parallel zu den Dickdarmkrypten verlief. Dazu wurde jeder Schnitt mit der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung auf die Schnittführung überprüft.

### 2.7.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung handelt es sich um eine Routinefärbung der konventionellen Histologie. In dieser Färbung werden Gewebestrukturen durch den Kernfarbstoff Hämatoxylin (blau) und durch den Plasmafärbstoff Eosin (rot) dargestellt.

Substanz	Wirkdauer
Xylol und absteigende Alkoholreihe	40 min
PBS	5 min
Methanol	10 min
PBS	5 min
Hämatoxylin	8 sec
Leitungswasser 25°C	30 sec
Aqua bidest	30 sec
Aufsteigende Alkoholreihe (30%, 70%, 96%)	30 sec pro Lösung
Eosin 1%	3 sec
Ethanol 96%	10 sec
Ethanol 100%	30 sec

**Tab. 3: Protokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung an Paraffinschnitten**

### 2.7.3 TUNEL-Färbung

TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase [TdT]-mediated deoxyuridinetriphosphat [dUTP] nick end-labeling) ist eine Färbemethode zum Nachweis von Apoptosen in Gewebeschnitten.

Der programmierte Zelltod, die Apoptose, wird durch zahlreiche Noxen über mehrere Signalkaskaden induziert. Mit der Kondensation und Fragmentation des Zellkerns bzw. der Spaltung von Chromatin auf biochemischer Ebene gehen diese Induktionswege eine gemeinsame Endstrecke ein. Bei der Chromatinspaltung entstehen zunächst größere (50-300 Kilobasenpaare) und schließlich kleinere (180-200 Basenpaare) Fragmente. Dabei entstehen sowohl doppelsträngige niedermolekulare DNA-Fragmente, als auch Einzelstrangbrüche (“nicks”) in hochmolekularer DNA.

Mit Hilfe Fluorescein-markierter dUTP-Moleküle können freie DNA-Strangbrüche durch die terminale Deoxynukelotidyltransferase markiert werden. In einem Fluoreszenzmikroskop können diese schließlich sichtbar gemacht werden. Die TUNEL-Färbung wurde an Paraffinschnitten durchgeführt. Diese wurden zunächst durch Xylol und eine absteigende



Alkoholreihe entparaffiniert. Nach zweimaligem Spülen in PBS-Lösung für je 5 Minuten erfolgte die Permeabilisierung der Schnitte mit der 0,1%-igen Triton-Lösung (20 µg/ml Proteinase K in Tris-HCl) für 20 Minuten bei 37°C in einer Feuchtkammer. Die Schnitte wurden dann wieder zwei Mal mit PBS-Lösung gespült. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit einer Lösung aus 5% BSA und 20% FKS in PBS für 30 Minuten bei RT blockiert. Nach zwei weiteren Spülvorgängen in PBS-Lösung wurden die Schnitte mit etwa 50 µl TUNEL-Reagenz (Roche®) (Puffer/TUNEL-Reagenz 1:10) bedeckt und in einer abgedunkelten Feuchtkammer für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten wurden die Objektträger kurz in Aqua bidest. und dann in absolutem Alkohol geschwenkt und anschließend mit Pro Tags Mount Fluor eingedeckt.

Die Analyse der apoptotischen Epithelzellen wurde in 20.000-facher Vergrößerung durchgeführt. Als Apoptosen galten hochkondensierte, stark fluoreszierende und mehrfach segmentierte Kerne. Die Apoptoserate entspricht dem prozentualen Anteil apoptotischer Epithelzellen an allen im Gesichtsfeld (~150 Epithelzellen/Gesichtsfeld) erkennbaren Epithelzellen. Für jeden Patienten wurde die Apoptoserate als Mittelwert aus mindestens sechs verschiedenen Gesichtsfeldern bestimmt.

### **2.7.4 Caspase-3-Färbung**

Caspasen sind eine Gruppe von Proteasen mit einem Cystein im aktiven Zentrum, die Peptidbindungen C-Terminal von Aspartat spalten können (**cysteiny-l-aspartate specific protease**) und damit eine wichtige Rolle bei der Apoptose spielen. Zum Auslösen des programmierten Zelltods werden Initiator-Caspasen, z. B. Caspase-8 und -9, aktiviert. Diese wiederum spalten die Vorläufer-Form nachgeschalteter Effektor-Caspasen, unter anderem Caspase-3, -7 und -6, die zelleigene Proteine spalten können. Effektor-Caspasen aktivieren zusätzlich Nukleasen, die im Rahmen der Apoptose die nukleäre DNA spalten.

Die Caspase-3-Färbung ist eine weitere Färbemethode zum Nachweis von Apoptosen in Gewebeschnitten. Sie wurde in der vorliegenden Arbeit durch die hausinterne Pathologie durchgeführt. Die Untersuchung der Apoptoserate erfolgte in 20.000-facher Vergrößerung. Als Apoptosen galten rot gefärbte fragmentierte Zellkerne. Die Apoptoserate wurde durch Zählung der Caspase-3-positiven Zellen von 1000 Enterozyten und durch Verrechnung auf 100 Enterozyten bestimmt. Für jeden Patienten wurde die Apoptoserate als Mittelwert aus mindestens sechs verschiedenen Gesichtsfeldern bestimmt.

### **2.7.5 DAPI-Kernfärbung**

Die DAPI-Kernfärbung (DAPI: 4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid) dient wie die TUNEL-Färbung zur Bestimmung der Apoptose. Dabei handelt es sich um einen an die zelluläre DNA bindenden Fluoreszenzfarbstoff mit einem Absorptionsmaximum von  $\lambda=340$  nm und einem Emissionsmaximum von  $\lambda=405$  nm. Im Fluoreszenzmikroskop lassen sich mit DAPI die Zellkerne sehr gut darstellen. Die Kerne fluoreszieren dabei umso stärker, je kondensierter der Zustand des Kernchromatins ist. Daher werden sowohl Apoptosen, als auch Mitosen mit dieser Methode dargestellt. In der vorliegenden Arbeit wurde die DAPI-Kernfärbung nicht zur Bestimmung der Apoptoserate, sondern lediglich zur Erkennung der Epithelzellen im konfokalen Mikroskop verwendet.

## **2.8 Immunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie**

### **2.8.1 Immunfluoreszenz**

Die Immunfluoreszenz dient der genauen Darstellung von Strukturen in Geweben und Zellen mit Hilfe von Antikörpern. Durch spezifisch bindende primäre Antikörper werden dabei Proteine erkannt. Um die Bindung schließlich sichtbar zu machen, werden fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper verwendet, die spezifisch an die Fc-Teile der Primärantikörper binden (indirekte Immunfluoreszenz). Die strukturspezifischen Antikörper können auch selbst mit einem Fluorophor markiert sein (direkte Immunfluoreszenz). Durch die Anwendung von in verschiedenen Tierarten produzierten Primärantikörpern und Bindung durch farblich unterschiedlich markierte Sekundärantikörper bzw. Kombination mit direkt fluoreszenzmarkierten Stoffen können 2-3 Proteine gleichzeitig angefärbt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenz die Lokalisation der Tight Junction-Proteine im Colon sigmoideum dargestellt. Die Sigmabiopsien wurden zunächst für 60 Minuten bei RT in 1%-igem Paraformaldehyd fixiert, anschließend in  $\text{PBS}^{+\text{Ca/Mg}}$  gewaschen und für 5 Minuten in 25 mM Glycin inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift in  $\text{PBS}^{+\text{Ca/Mg}}$  erfolgte eine stufenweise Entwässerung der Biopsien durch eine ansteigende Sucrose-Reihe. Hierzu wurde das Gewebe für jeweils 60 Minuten zunächst in 10%-iger und dann in 20%-iger Sucroslösung bei RT inkubiert. Es folgte eine weitere Inkubation in 30%-iger Lösung über Nacht bei 4°C. Um die Kryoblöcke herzustellen, wurden die so vorbereiteten Biopsien in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Methylbutan gefroren, in TissueTek eingebettet und bei -80°C

gelagert. Mit Hilfe eines Kryostaten wurden 5 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt, die vor dem Färben auf beschichteten Objektträgern bei -20°C für 12-24 Stunden gefroren wurden.

Die aufgetauten Schnitte wurden mit dem DAKO-Fettstift umrandet und mit PBS<sup>+Ca/Mg</sup> gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe mit der Triton-X-Lösung 5 Minuten lang bei Raumtemperatur (RT) permeabilisiert. Danach folgte eine Blockierung unspezifischer Bindungen mit Blockierungslösung für 60 Minuten bei RT. Das Gewebe wurde schließlich zunächst mit dem primären Antikörper und dann mit dem sekundären fluoreszierenden Antikörper für jeweils 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach jeder Inkubation erfolgte dabei ein Waschschritt mit Blockierungslösung. Für jeden Antikörper wurde eine spezielle Verdünnung mit Blockierungslösung hergestellt (primäre Antikörper 1:50, sekundäre Antikörper 1:500). Zur Darstellung der Zellkerne wurden alle Gewebeschnitte anschließend an die oben genannten Färbeschritte mit DAPI für 10 Minuten bei RT gefärbt und danach in PBS<sup>+Ca/Mg</sup> gewaschen. DAPI ist ein direkt fluoreszierender Marker, so dass kein zusätzlicher sekundärer Antikörper notwendig war. Die im Fluoreszenzmikroskop erkennbare blaue Farbe der Nuklei entsteht direkt, ohne zusätzliche Kopplung an ein Fluorophor (siehe DAPI-Kernfärbung). Nach der Zellkernfärbung wurden die Gewebeschnitte mit Aqua bidest. und Ethanol gespült und schließlich mit Pro Tags Mount Fluor eingedeckt.

### **2.8.2 Konfokale Mikroskopie**

Die Lokalisation der Tight Junction-Proteine wurde mit Hilfe der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie an fluoreszenzgefärbten Gewebeschnitten untersucht. Hierzu wurde das Zeiss LSM 510 META Mikroskop verwendet. Die konfokale Mikroskopie erlaubt eine tomographische Darstellung der dreidimensionalen Präparate, d.h. Schnittbilder jeder fokussierten Ebene des Objektes. Mithilfe der konventionellen Lichtmikroskopie können durch Variieren des Fokus verschiedene Ebenen innerhalb des aufgelegten Präparates nicht scharf abgebildet werden, da sich die Lichtstrahlen mehrerer Ebenen überlagern. Lediglich der Blick durch die gesamte Dicke der Probe wird dabei ermöglicht. In einem konfokalen Lasermikroskop kann durch Verwendung einer punktförmigen Lichtquelle, dem Laser, und durch den Einsatz von Lochblenden das Streulicht so weit unterdrückt werden, dass eine scharfe Abbildung einzelner Punkte in einer Objektebene ermöglicht wird. Um mit diesem Prinzip einen größeren Ausschnitt einer Ebene darstellen zu können, muss der Laser diese Punkt für Punkt entlang der XY-Koordinaten abtasten. Die Photomultiplier-Detektoren wandeln die optischen in elektrische Signale um, die an einen Computer weitergegeben werden. Durch mehrfaches Scannen jedes Punktes und Mitteln der gewonnenen Information kann eine noch bessere Bildqualität erreicht werden.

## Material und Methoden

Der Laser sendet Licht einer bestimmten Wellenlänge auf das fluoreszenzgefärbte Präparat aus, wodurch die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt werden und ihrerseits Licht eines bestimmten Spektrums abgeben. Dies wird von den Photodetektoren so erfasst, dass lediglich die maximale Emission durch geeignet gewählte Farbteiler zugelassen wird. Auf diese Weise können Überlagerungen zwischen den einzelnen Laser-Kanälen weitestgehend verhindert werden. Auch bei der Färbung muss daher darauf geachtet werden, dass die Fluophore sich hinsichtlich des abgestrahlten Spektrums möglichst stark unterscheiden. Für die Untersuchung der Tight-junction-Proteine dienten drei Laser der Wellenlängen 405 nm, 488 nm und 543 nm der Fluoreszenzanregung. Die Emission wurde mit einem Bandpassfilter der Wellenlängenbereiche 420-480 nm für DAPI, 505-550 nm für den Alexa Fluor 488 Goat-Anti-Mouse-Antikörper sowie mit einem Nebenfärbteiler zur Erfassung der Wellenlängen über 545 nm für den Alexa Fluor 594 Goat-Anti-Rabbit-Antikörper detektiert. Die Aufnahmen wurden mit planaren XY-Scans mit einem 40x-Ölimmersionsobjektiv durchgeführt.

## 2.9 Morphologische Veränderungen

Bei entzündlichen Erkrankungen des Darmes ist häufig die Architektur der Schleimhaut verändert. So können die Krypten der Dickdarmschleimhaut wie z.B. bei der Colitis ulcerosa rarefiziert sein. Eine veränderte mukosale Oberfläche kann damit Auswirkungen auf die resorptiven und sekretorischen Eigenschaften sowie den Widerstand des Darmes haben. In dieser Arbeit wurde die mukosale Oberfläche der Krypten bei der lymphozytären Kolitis bestimmt. Zu diesem Zweck wurden Biopsien direkt nach der Entnahme in 10 ml Clark'scher Lösung über Nacht fixiert und anschließend in 70%-igem Ethanol gelagert. Die Biopsien wurden dann mit Schiff'schem Reagenz angefärbt und unter einem Lichtmikroskop die Krypten pro serosale Fläche ausgezählt. Danach erfolgte eine Mikrodissektion der Schleimhaut, wobei die einzelnen Krypten aus dem Verband gelöst wurden. Pro Patient wurde schließlich die innere Länge von 20 Krypten vermessen. An Formalin-fixierten und HE-gefärbten Schnitten wurde dann der innere Kryptendurchmesser bestimmt. Hierzu wurden ebenfalls 20 Krypten ausgemessen. Zur Berechnung der mukosalen Oberfläche  $A_m$  wurde folgende Formel verwendet:

$$A_m = \pi \cdot d_c \cdot l_c \cdot n_c + A_s,$$

wobei  $d_c$  den inneren Kryptendurchmesser,  $l_c$  die Kryptenlänge,  $n_c$  die Anzahl der Krypten pro  $\text{mm}^2$  serosale Fläche und  $A_s$  die mukosale Fläche ohne Krypten angibt.

Neben der mukosalen Oberfläche wurde auch die Anzahl der für die lymphozytäre Kolitis typischen intraepithelialen Lymphozyten (IEL) für die untersuchten Kollektive durch das Institut für Pathologie, Charité – Campus Benjamin Franklin, bestimmt. Dazu wurden die IEL auf eine Gesamtzellzahl von 100 Epithelzellen ausgezählt.

Eine Ki-67-Färbung zur Bestimmung der Proliferationsrate der Krypten bei der lymphozytären Kolitis erfolgte ebenfalls durch die hausinterne Pathologie. Die Proliferationsrate wurde durch Zählung der Ki-67-positiven, stark braun-rot gefärbten Zellkernen von drei Krypten und durch Verrechnung auf 100 Enterozyten bestimmt.

## **2.10 Statistik**

Alle Ergebnisse wurden als arithmetische Mittelwerte gemeinsam mit dem standard error of mean (SEM) angegeben. Die Anzahl der Versuche (Patienten bzw. Versuchstiere) wurde mit n angegeben. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des ungepaarten zweiseitigen t-Tests nach Student durchgeführt. Ein Wert  $P < 0,05$  galt als signifikant.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Versuche an menschlichen Epithelien

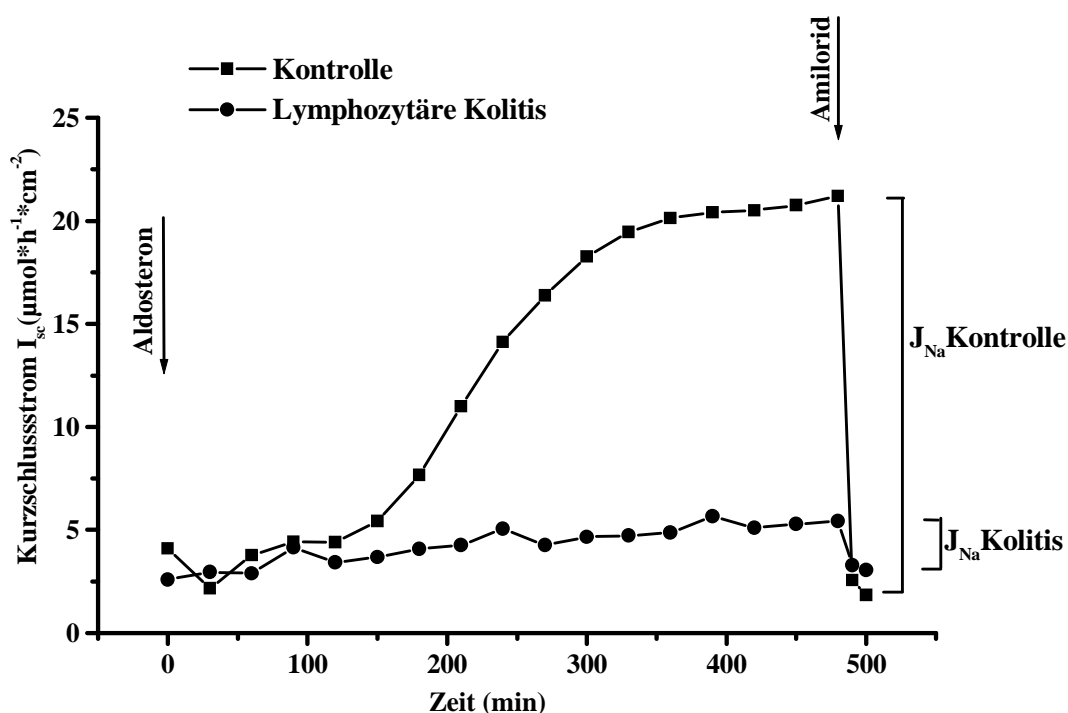
##### 3.1.1 Wirkung von Aldosteron und Amilorid auf den elektrogenen Natrium-Transport

In Ussing-Experimenten wurde die Aldosteron-stimulierte Resorption von  $\text{Na}^+$  an Biopsien aus dem Sigma von Patienten mit lymphozytärer Kolitis mit und ohne Therapie im Vergleich zu Kontrollpatienten untersucht. Hierbei konnte eine Malabsorption von  $\text{Na}^+$  durch den Amilorid-sensitiven epithelialen Natrium-Kanal als einer der Entstehungsmechanismen für die Diarrhoe bei lymphozytärer Kolitis belegt werden.

In der Abbildung 6 sind die Kurzschlussstromwerte ( $I_{sc}$ ) von exemplarischen Einzelversuchen von einer Kontrolle und einer Kolitis und in Abbildung 7 von einer Kolitis und einer therapierten Kolitis gegen die Zeit aufgetragen. In Abbildung 8 ist die statistische Auswertung des elektrogenen Natrium-Transports dargestellt.

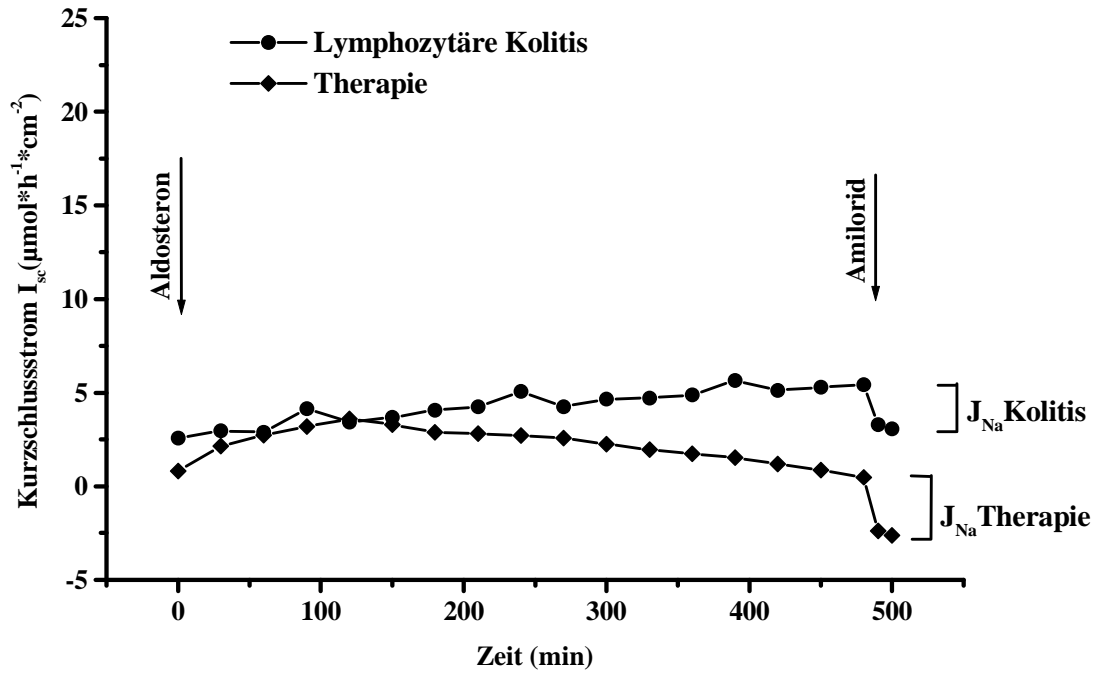
Zum Zeitpunkt der Aldosteron-Gabe betrug der  $I_{sc}$  bei der lymphozytären Kolitis ( $n=7$ )  $4,70 \pm 0,84 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  gegenüber  $3,48 \pm 0,89 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  bei Kontrollen ( $n=7$ ) und  $3,37 \pm 1,32 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  in der Gruppe der therapierten lymphozytären Kolitis ( $n=3$ ). Nach einer Latenzzeit von ca. einer Stunde kam es bei den Kontrollpatienten ausgehend von den Basalwerten zu einem Anstieg des Kurzschlussstroms auf  $16,25 \pm 3,34 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ . In der Kolitisgruppe kam es lediglich zu einem etwa halb so großen Anstieg des Kurzschlussstroms auf Werte von  $8,53 \pm 2,34 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Bei der therapierten Kolitis war kein Unterschied des Kurzschlussstroms im Vergleich zur Kolitis zu verzeichnen ( $8,26 \pm 6,58 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Nach 8 Stunden wurde der Kurzschlussstrom durch Gabe von  $10^{-4}$  mol/l Amilorid gehemmt und der elektrogene Natrium-Transport bestimmt. Dieser ergibt sich aus der Differenz  $\Delta I_{sc}$  der Kurzschlussstromwerte unmittelbar vor und 20 min. nach der Amilorid-Gabe. Hier wurde bei dem Kontrollkollektiv mit  $16,40 \pm 2,44 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ein deutlicher Effekt beobachtet, während bei der lymphozytären Kolitis lediglich ein geringer Effekt erzielt wurde. Der  $\Delta I_{sc}$  betrug hier nur  $5,33 \pm 2,29 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Hierbei handelt es sich um eine Reduktion des Kurzschlussstroms um rund 68% bei lymphozytärer Kolitis ( $P<0,01$ ). In der Gruppe der therapierten Koliden betrug der  $\Delta I_{sc}$   $8,23 \pm 5,48 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Nach der Therapie mit Budesonid lag der Kurzschlussstrom somit tendenziell höher als in der Kolitisgruppe. Eine statistische Signifikanz lässt sich aber nicht erzielen, da die n-Zahl in der Gruppe der therapierten Koliden zu niedrig ist ( $n=3$ ;  $P=0,66$ ).

Nach Amilorid-Gabe wurde bei der lymphozytären Kolitis ein Rest-Kurzschlussstrom (Kontrollen:  $-0,14 \pm 1,83 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; Kolitis:  $3,19 \pm 1,46 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; therapierte Kolitis:  $0,03 \pm 1,41 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) gemessen, der im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurde. Da die elektrogene Chlorid-Sekretion zu Beginn durch Bumetanid gehemmt wurde, muss es sich bei diesem – auch durch Amilorid nicht hemmbaren – Kurzschlussstrom um die Resorption eines Kations oder die Sekretion eines weiteren Anions handeln. Bei Berücksichtigung der Kenntnisse der Transporteigenschaften des Kolons erscheint hier die Bikarbonat-Sekretion am wahrscheinlichsten zu sein.



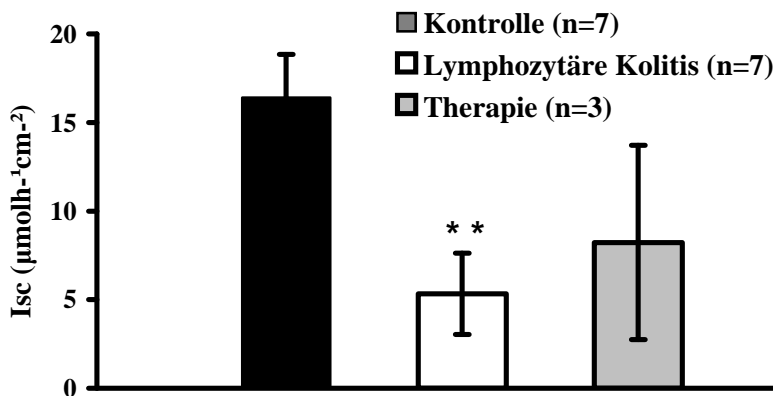
**Abb. 6:** Zeitverlauf des Kurzschlussstroms ( $I_{sc}$ ) im Sigma bei Kontrollen und bei lymphozytärer Kolitis nach Stimulation mit  $3 \cdot 10^{-9}$  mol/l Aldosteron

Der aktive elektrogene Natrium-Transport wurde 8 Stunden nach Stimulation mit  $3 \cdot 10^{-9}$  mol/l Aldosteron durch Hemmung des Kurzschlussstroms mit  $10^{-4}$  mol/l Amilorid gemessen. Dieser entspricht der Differenz der Kurzschlussstromwerte kurz vor und 20 min. nach Amilorid-Gabe. Dargestellt sind exemplarische Einzelversuche von je einer Kontrolle und einer Kolitis.



**Abb. 7:** Zeitverlauf des Kurzschlussstroms ( $I_{sc}$ ) im Sigma bei lymphozytärer Kolitis ohne und mit Therapie nach Stimulation mit  $3\cdot 10^{-9}$  mol/l Aldosteron

Dargestellt sind exemplarische Einzelversuche von je einem Patienten mit unbehandelter und einem Patienten mit therapierter lymphozytärer Kolitis.



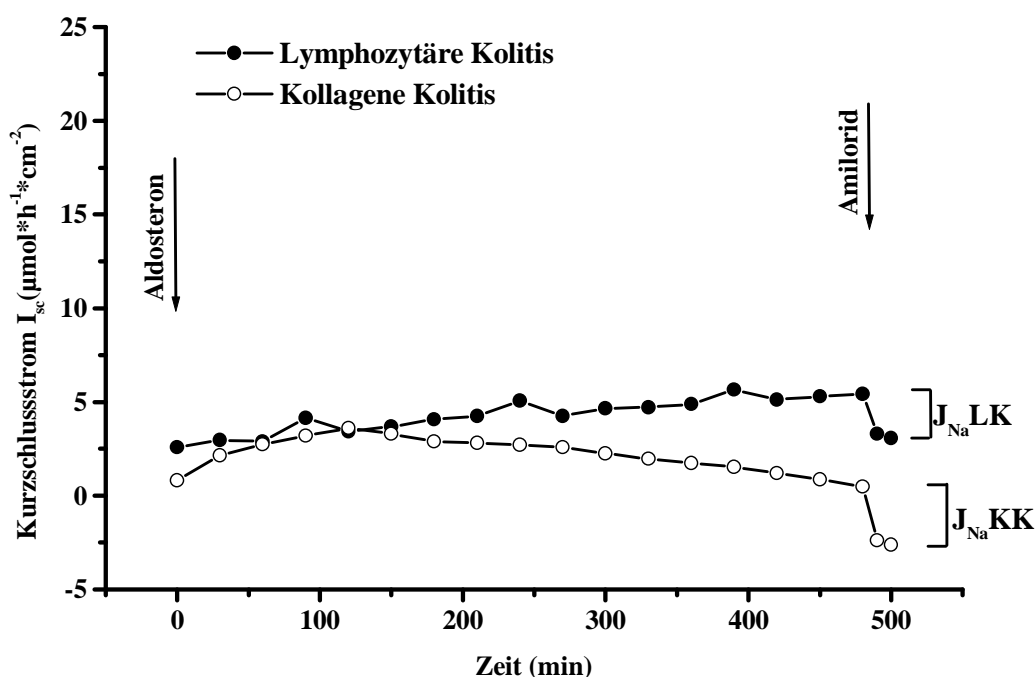
**Abb. 8:** Aktiver elektogener Natrium-Transport ( $\Delta I_{sc}$ ) im Sigma bei Kontrollen und bei lymphozytärer Kolitis

Der aktive elektogene Natrium-Transport entspricht der Differenz der Kurzschlussstromwerte kurz vor und 20 min. nach Amilorid-Gabe. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM korrigiert mit dem jeweiligen Quotienten aus  $R^t/R^c$ . \*\* $P < 0,01$  gegenüber Kontrollen.



In weiteren Versuchen wurde die Aldosteron-stimulierte Resorption von  $\text{Na}^+$  auch an Biopsien von Patienten mit kollagener Kolitis untersucht und die Ergebnisse mit denen der lymphozytären Kolitis verglichen.

Die Abbildung 9 zeigt die Kurzschlussstromwerte ( $I_{sc}$ ) von exemplarischen Einzelversuchen von je einer lymphozytären und einer kollagenen Kolitis gegen die Zeit aufgetragen.



**Abb. 9:** Zeitverlauf des Kurzschlussstroms ( $I_{sc}$ ) im Sigma bei lymphozytärer und kollagener Kolitis nach Stimulation mit  $3\cdot 10^{-9}$  mol/l Aldosteron

Dargestellt sind exemplarische Einzelversuche von je einer lymphozytären Kolitis (LK) und einer kollagenen Kolitis (KK).

Ausgehend von den Basalwerten von  $1,41 \pm 1,45 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  kam es bei der kollagenen Kolitis ( $n=4$ ) nach 8 Stunden zu einem Anstieg des Kurzschlussstroms auf  $5,55 \pm 1,96 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Nach erfolgter Hemmung des Kurzschlussstroms mit  $10^{-4}$  mol/l Amilorid betrug der Strom  $1,11 \pm 0,44 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Aus der Differenz  $\Delta I_{sc}$  der Kurzschlussstromwerte vor Amilorid-Gabe und 20 min. später wurde dann der elektrogene Natrium-Transport bestimmt. Dieser war mit  $4,44 \pm 2,12 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $P<0,01$ ) geringer als der bei der lymphozytären Kolitis ( $5,33 \pm 2,29 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Die von Bürgel et al. 2002 beschriebene NaCl-Resorptionsstörung bei der kollagenen Kolitis könnte somit auch eine Störung des epithelialen Natrium-Kanals ENaC umfassen.

### 3.1.2 Wirkung von Aldosteron auf die mRNA-Expression der $\alpha$ -, $\beta$ - und $\gamma$ -Untereinheit des ENaC

In den elektrophysiologischen Versuchen wurde sowohl in der Gruppe der lymphozytären Kolitis, als auch in der Gruppe der therapierten lymphozytären Kolitis im Vergleich zu Kontrollen ein erniedrigter elektrogener  $\text{Na}^+$ -Transport beobachtet. Um die zugrundeliegenden Mechanismen dieses erniedrigten elektrogenen Natrium-Transports zu untersuchen, wurde eine quantitative Untersuchung der mRNA der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC durchgeführt. Es ist bekannt, dass Aldosteron die Induktion der ENaC-abhängigen Natrium-Resorption durch eine vermehrte Expression der  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC-Untereinheit bewirkt, während die  $\alpha$ -Untereinheit konstitutionell exprimiert wird [Amasheh et al. 2004, Epple et al. 2000].

Ziel war es, zu überprüfen, ob der verminderte Natrium-Transport bei der lymphozytären Kolitis mit einer verminderten Expression der ENaC-Untereinheiten einhergeht. Dazu wurde nach Beendigung der elektrophysiologischen Versuche die Gesamt-RNA aus den Gewebeproben isoliert und die mRNA-Expression der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC unter dem Einfluss von Aldosteron untersucht.

Abbildung 10 entspricht einer repräsentativen Darstellung der Expression der drei Untereinheiten des ENaC. Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation des Epithels mit Aldosteron über 8 Stunden in der Kontrollgruppe zu einer deutlich gesteigerten mRNA-Expression der  $\gamma$ -Untereinheit führte ( $\gamma$ :  $341 \pm 82$ -fache der unstimulierten Kontrollprobe;  $P < 0,01$ ). Eine Steigerung der mRNA-Expression wurde ebenfalls bei der  $\beta$ -Untereinheit des ENaC beobachtet ( $\beta$ :  $6,1 \pm 1,9$ -fache der unstimulierten Kontrollprobe;  $P < 0,05$ ). Ein entsprechender Aldosteron-Effekt auf die  $\alpha$ -Untereinheit wurde nicht beobachtet ( $\alpha$ :  $1,6 \pm 0,5$ -fache der unstimulierten Kontrollprobe;  $P = \text{n.s.}$ ).

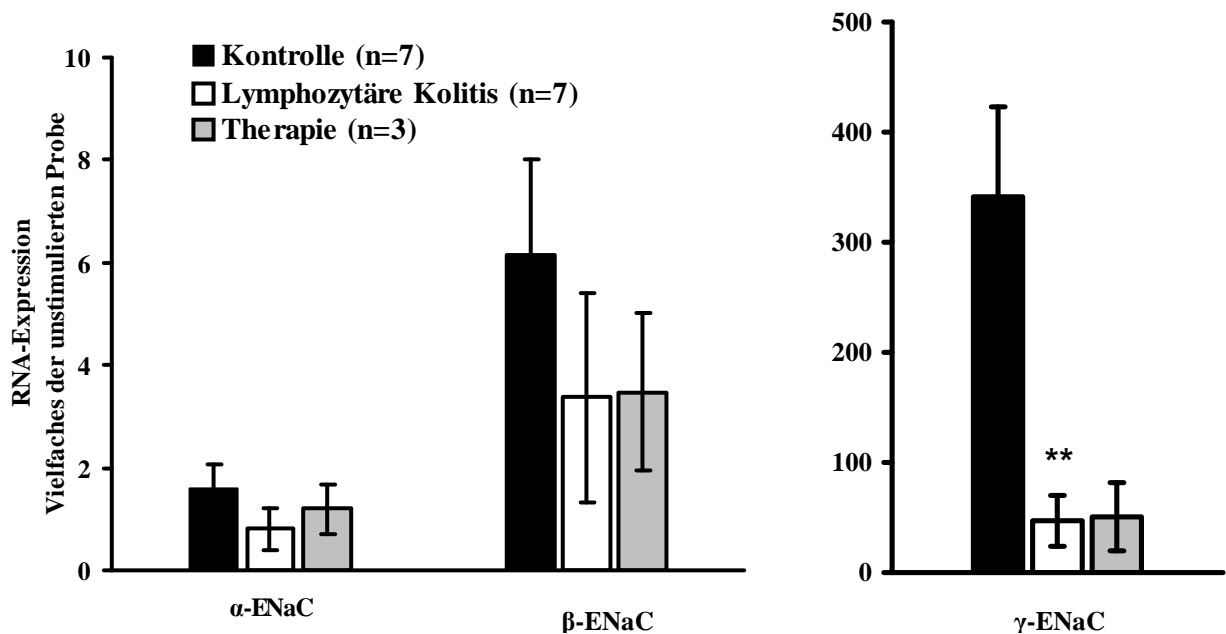
Bei der lymphozytären Kolitis war die Induktion der  $\gamma$ -ENaC-mRNA-Expression durch Aldosteron im Vergleich zur Kontrollgruppe stark reduziert ( $\gamma$ :  $47 \pm 23$ -fache der unstimulierten Kolitisprobe;  $P < 0,01$  vs. Kontrolle). Dies macht eine Reduktion um 86% im Vergleich zum Kontrollkollektiv aus. Die Expression der  $\beta$ -Untereinheit des ENaC war bei der lymphozytären Kolitis ebenfalls gering vermindert, jedoch erreichte die Verminderung keine Signifikanz ( $\beta$ :  $3,4 \pm 2,0$ -fache der unstimulierten Kolitisprobe;  $P = \text{n.s.}$ ). Die mRNA-Expression der  $\alpha$ -Untereinheit war bei der Kolitis verglichen mit der Kontrollgruppe nicht verändert ( $\alpha$ :  $0,8 \pm 0,4$ -fache der unstimulierten Kolitisprobe;  $P = \text{n.s.}$ ).

Ähnliche Ergebnisse wurden in der Gruppe der therapierten lymphozytären Kolitis beobachtet (Abb. 10). Eine vierwöchige Therapie mit Budesonid konnte keine Veränderungen der mRNA-Expression der drei ENaC-Untereinheiten bewirken ( $\alpha$ :  $1,2 \pm 0,5$ -fache,  $\beta$ :  $3,5 \pm 1,5$ -fache,  $\gamma$ : 51

$\pm 31$ -fache der unstimulierten Therapieprobe). Ähnlich wie beim elektrogenen Na-Transport zeigt sich auch hier eine Tendenz zu einer deutlichen Reduktion der Expression der  $\gamma$ -Untereinheit im Vergleich zu Kontrollen. Aber auch hier gilt, dass für eine statistische Signifikanz die Endzahl in der Gruppe der Therapierten zu niedrig für eine valide Aussage ist.

Die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalyse korrelieren für die Kontrolle und die lymphozytäre Kolitis eng mit dem  $\Delta I_{sc}$  für Natrium. Es konnte gezeigt werden, dass der geminderte elektrogene Natrium-Transport bei der lymphozytären Kolitis mit einer Herunterregulation vor allem der  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC einhergeht, während die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit unverändert bleiben. Eine Reduktion der mRNA-Expression der  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC um 86% im Vergleich zu den Kontrollen spiegelt sich in einer Verminderung der Natrium-Resorptionsrate um 68% wider.

In der Gruppe der behandelten lymphozytären Kolitis ist – trotz Therapie – sowohl der Natrium-Transport, als auch die mRNA-Expression der ENaC-Untereinheiten im Vergleich zu der unbehandelten Kolitis nicht signifikant verändert. Die mRNA-Expression der ENaC-Untereinheiten der therapierten lymphozytären Kolitiden ist sogar geringer als die der unbehandelten Kolitis. Die Anzahl der Patienten in dieser Gruppe ist, wie bereits erwähnt, jedoch so klein, dass eine statistisch vertretbare Aussage nicht möglich ist.



**Abb. 10:** mRNA-Expression der ENaC-Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$

Dargestellt ist die Expression der mRNA der ENaC-Untereinheiten nach Stimulation mit  $3 \cdot 10^{-9}$  mol/l Aldosteron als ein Vielfaches der unstimulierten Proben. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. \*\* $P < 0,01$  im Vergleich zu der Kontrolle.

## Ergebnisse

Auch für die kollagene Kolitis wurde die mRNA-Expression der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC unter dem Einfluss von Aldosteron untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Expression der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit sogar stärker als bei der lymphozytären Kolitis herunter reguliert war, ohne jedoch eine statistische Signifikanz zu erreichen ( $\alpha$ :  $0,49 \pm 0,18$ -fache,  $\beta$ :  $2,95 \pm 1,33$ -fache der unstimulierten Probe). Die  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC war bei der kollagenen Kolitis um rund 71% im Vergleich zu den Kontrollen reduziert. Durch die geringe Patientenzahl (n=4) wurde hier die statistische Signifikanz knapp verpasst (P=0,0570). Für die kollagene Kolitis konnte wie für die lymphozytäre Kolitis gezeigt werden, dass der geminderte elektrogene Natrium-Transport mit einer Herunterregulation vor allem der  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC einhergeht. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit bleiben weitgehend unverändert.

### **3.1.3 Wechselstrom-Impedanz-Analyse der epithelialen Barrierefunktion**

Zur Beurteilung der epithelialen Barriestörung bei der lymphozytären Kolitis wurden an humanen Sigmabiopsien mit Hilfe der Wechselstrom-Impedanz-Analyse der epitheliale und der subepitheliale Widerstand ermittelt.

Mittels dieser Methode konnte für die lymphozytäre Kolitis eine Abnahme des epithelialen und eine Zunahme des subepithelialen Widerstandes im Vergleich zu Kontrollen gezeigt werden. Die Abbildung 11 zeigt drei originale Impedanz-Ortskurven (Nyquist-Diagramme) jeweils eines Präparates einer Kontrolle, einer lymphozytären Kolitis und einer lymphozytären Kolitis unter Therapie mit Budesonid.

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse und die statistische Auswertung der Wechselstrom-Impedanz-Analyse dargestellt.

	$R^t$ ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ )	$R^e$ ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ )	$R^{\text{sub}}$ ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ )	$R^t/R^e$ ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ )	n
<b>Kontrolle</b>	$56 \pm 6$	$39 \pm 4$	$17 \pm 3$	$1.4 \pm 0.1$	7
<b>Lymphozytäre Kolitis</b>	$47 \pm 7$	$23 \pm 4^*$	$25 \pm 4$	$2.3 \pm 0.2^{**}$	7
<b>Therapie</b>	$58 \pm 8$	$26 \pm 4$	$32 \pm 5$	$2.3 \pm 0.2$	3

**Tab. 4: Elektrische Widerstände im menschlichen Sigma**

Gesamtwiderstand  $R^t$ , epithelialer Widerstand  $R^e$  und subepithelialer Widerstand  $R^{\text{sub}}$  bei Kontrollen, bei der unbehandelten und bei der therapierten lymphozytären Kolitis. \* $P < 0,05$  beim Vergleich Kontrolle vs. lymphozytäre Kolitis, \*\* $P < 0,01$  beim Vergleich Kontrolle vs. lymphozytäre Kolitis. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Bei den Kontrollen betrug der epitheliale Widerstand  $R^e$   $39 \pm 4 \Omega \cdot \text{cm}^2$  und der subepitheliale Widerstand  $R^{\text{sub}}$   $17 \pm 3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Der epitheliale Widerstand entspricht dabei rund 70% des Gesamtwiderstandes. Bei der untherapierten lymphozytären Kolitis konnte eine deutliche Abnahme des epithelialen Widerstandes auf  $23 \pm 4 \Omega \cdot \text{cm}^2$  beobachtet werden. Im Vergleich zu den Kontrollen entspricht dies einer Reduktion des epithelialen Widerstandes um 41%.

Ähnliche Ergebnisse wurden in der Gruppe der therapierten lymphozytären Kolitis registriert. Trotz einer vierwöchigen Therapie mit Budesonid betrug der epitheliale Widerstand bei diesem Kollektiv nur  $26 \pm 4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ .

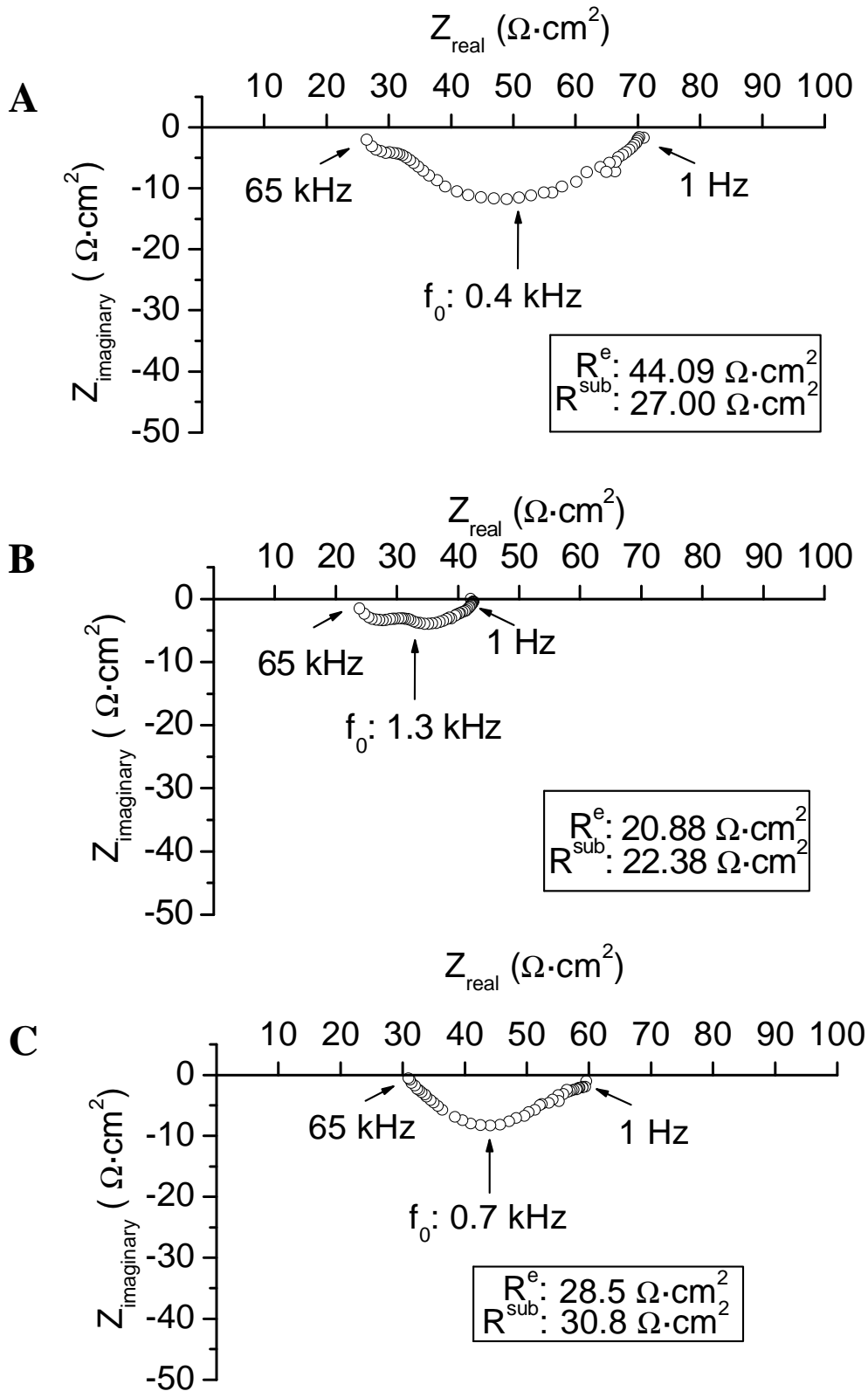
Begleitend zu der deutlichen Abnahme von  $R^e$  bei der untherapierten lymphozytären Kolitis wurde ein Anstieg von  $R^{\text{sub}}$  von  $17 \pm 3 \Omega \cdot \text{cm}^2$  bei dem Kontrollkollektiv auf  $25 \pm 4 \Omega \cdot \text{cm}^2$  bei der Kolitis beobachtet. Der erhöhte subepitheliale Widerstand kann in diesem Fall als das elektrophysiologische Korrelat der entzündlichen Veränderungen in der Lamina propria angesehen werden. Diese stellen ein wichtiges Kriterium der lymphozytären Kolitis dar. Interessanterweise wurde auch in der Gruppe der therapierten Kolitis ein starker Anstieg von  $R^{\text{sub}}$  verzeichnet. Dieser macht 52% des Gesamtwiderstandes aus und ist damit tendenziell sogar höher als  $R^{\text{sub}}$  in der Gruppe der unbehandelten lymphozytären Kolitis ( $32 \pm 5 \Omega \cdot \text{cm}^2$  vs.  $25 \pm 4$

## Ergebnisse

$\Omega \cdot \text{cm}^2$ ). Trotz eines deutlichen Rückgangs der Entzündung in der Lamina propria nach einer vierwöchigen Therapie mit Budesonid, wurden keine signifikanten Veränderungen des subepithelialen Widerstandes beobachtet. Aufgrund der sehr geringen Anzahl an Patienten in der Gruppe der therapierten lymphozytären Kolitiden müssen diese Ergebnisse jedoch kritisch betrachtet werden.

Für den exakten Vergleich der Kurzschlussströme der untersuchten Kollektive musste eine Korrektur der entsprechenden subepithelialen Widerstände erfolgen. Diese ist vor allem dann erforderlich, wenn außer den epithelialen Widerständen weitere, zu den Spannungselektroden in Serie geschaltete Widerstände, wie der subepitheliale Widerstand, vorhanden sind. Die gemessenen Kurzschlussstromwerte müssen um den Anteil dieser Widerstände korrigiert werden. Ohne diese Korrektur würden die wahren Transportraten unterschätzt werden. Der Korrekturfaktor errechnet sich aus dem Quotienten aus dem Gesamtwiderstand und dem epithelialen Widerstand  $R^t/R^e$  [Tay&Tay, 1981; Schulzke et al., 1986, 1987, 1992; Groot et al., 1988; Gitter et al., 1997].

Bei den Kontrollen (n=7) betrug der Korrekturfaktor  $1,4 \pm 0,1$ , für die unbehandelte (n=7) und die behandelte lymphozytäre Kolitis (n=3) je  $2,3 \pm 0,2$  und für die kollagene Kolitis  $1,7 \pm 0,2$  (n=4). Die gemessenen Kurzschlussströme sind somit bei den Kontrollen weniger unterschätzt als bei den anderen Gruppen. Da der Faktor  $R^t/R^e$  zumindest im Vergleich von Kontrollen und unbehandelten lymphozytären Kolitiden signifikant verschieden war, erfolge eine Korrektur der gemessenen Kurzschlussströme.



**Abb. 11: Originale Impedanz-Ortskurven (Nyquist-Diagramme)**

$Z_{\text{real}}$  stellt die ohm'sche,  $Z_{\text{imaginary}}$  die reaktive Komponente der elektrischen Impedanz dar. Die Schnittpunkte des Kreissegmentes mit der x-Achse bei niedrigen und hohen Frequenzen ergaben  $R^t$  und  $R^{\text{sub}}$ .  $R^e$  errechnet sich durch  $R^t - R^{\text{sub}}$ . A: Kontrolle, B: Kolitis, C: Therapie.

### 3.1.4 Parazelluläre Permeabilität in Abhängigkeit vom transmuralen, epithelialen und subepithelialen Widerstand

Mit Hilfe von [ $^3\text{H}$ ]-Mannitol-Fluxmessungen wurde an humanen Biopsien aus dem Colon sigmoideum von Patienten mit unbehandelter und mit Budesonid behandelter lymphozytärer Kolitis die parazelluläre Permeabilität des Epithels untersucht. Dabei zeigte sich sowohl bei der unbehandelten, als auch bei der behandelten Kolitis ein vermehrter Flux von Mannitol ( $J_{\text{Man}}$ ) in mukosal-serosaler Richtung im Vergleich zu Kontrollen. Während bei Kontrollen ein [ $^3\text{H}$ ]-Mannitol-Flux von  $175 \pm 22 \text{ nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  gemessen wurde, fand sich bei der lymphozytären Kolitis ein um 66% erhöhter Flux von  $291 \pm 42 \text{ nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Parallel hierzu wurde eine Verminderung des epithelialen und des Gesamtwiderstandes beobachtet. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der therapierten Kolitis verzeichnet. Hier zeigte sich ebenfalls ein erhöhter [ $^3\text{H}$ ]-Mannitol-Flux von  $284 \pm 89 \text{ nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  bei vermindertem epithelialen Widerstand. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der [ $^3\text{H}$ ]-Mannitol-Fluxmessungen zusammengefasst.

	$R^t$ ( $\Omega\cdot\text{cm}^2$ )	$R^e$ ( $\Omega\cdot\text{cm}^2$ )	$R^{\text{sub}}$ ( $\Omega\cdot\text{cm}^2$ )	$J_{\text{Mannitol}}$ ( $\text{nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	n
<b>Kontrolle</b>	$56 \pm 6$	$39 \pm 4$	$17 \pm 3$	$175 \pm 22$	7
<b>Lymphozytäre Kolitis</b>	$47 \pm 7$	$23 \pm 4^*$	$25 \pm 4$	$291 \pm 42^*$	7
<b>Therapie</b>	$58 \pm 8$	$26 \pm 4$	$32 \pm 5$	$284 \pm 89$	3

**Tab. 5: Mannitol-Fluxe in Abhängigkeit vom transmuralen, epithelialen und subepithelialen Widerstand**

Mukosal-serosaler Mannitol-Flux  $J_{\text{Mannitol}}$ , Gesamtwiderstand  $R^t$ , epithelialer Widerstand  $R^e$  und subepithelialer Widerstand  $R^{\text{sub}}$  bei Kontrollen, bei der unbehandelten und bei der therapierten lymphozytären Kolitis. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$  beim Vergleich Kontrolle vs. lymphozytäre Kolitis.



Mit Hilfe der Fluxmessungen konnte gezeigt werden, dass bei der lymphozytären Kolitis eine Störung der epithelialen Barrierefunktion mit einer vermehrten parazellulären Permeabilität vorliegt. Eine erhöhte parazelluläre Permeabilität bewirkt durch Solvent Drag einen vermehrten Verlust von Wasser und trägt so wesentlich zum Entstehen der Diarrhoe bei der lymphozytären Kolitis im Sinne einer Leckflux-Diarrhoe bei. Diese epitheliale Barriestörung konnte durch eine vierwöchige Therapie mit Budesonid nicht verbessert werden.

### **3.1.5 Expressionsveränderungen der Tight Junction-Proteine bei lymphozytärer Kolitis**

In elektrophysiologischen Experimenten konnte mit Hilfe der Impedanz-Analyse und der [<sup>3</sup>H]-Mannitol-Fluxmessungen eine gestörte epitheliale Barrierefunktion bei der lymphozytären Kolitis gezeigt werden.

Mit Hilfe der Western Blot-Technik wurde schließlich eine Expressionsanalyse von Occludin sowie von Claudin-1 bis Claudin-5 und Claudin-8 durchgeführt, um zu untersuchen, ob ein verändertes Expressionsmuster der betrachteten Tight Junction-Proteine zu einem erniedrigten epithelialen Widerstand bei der lymphozytären Kolitis beiträgt und ob dieses durch eine Therapie mit Budesonid beeinflussbar ist.

Die Abbildung 12 zeigt exemplarisch die Tight Junction-spezifischen Signale von zwei Kontrollen und von zwei Patienten mit lymphozytärer Kolitis. Die Gruppe der therapierten lymphozytären Kolitis ist nicht dargestellt.

Die mit  $\beta$ -Actin normierten Mittelwerte der auf einem Blot detektierten Signale für Occludin und für die jeweiligen Claudine von Kontrollpatienten wurden für die Auswertung als 100% gesetzt und mit den Signalen der erkrankten Patienten prozentual in Bezug zur Kontrolle verrechnet.

In Abbildung 13 ist die statistische Auswertung der Expressionsanalyse dargestellt. Die densitometrischen Ergebnisse zeigten bei der lymphozytären Kolitis eine verminderte Expression von Claudin-4 von rund  $71 \pm 8\%$  ( $P < 0,05$ ), Claudin-5 von rund  $72 \pm 4\%$  ( $P < 0,01$ ) und am stärksten von Claudin-8 rund  $27 \pm 10\%$  ( $P < 0,001$ ) im Vergleich zu Kontrollen.

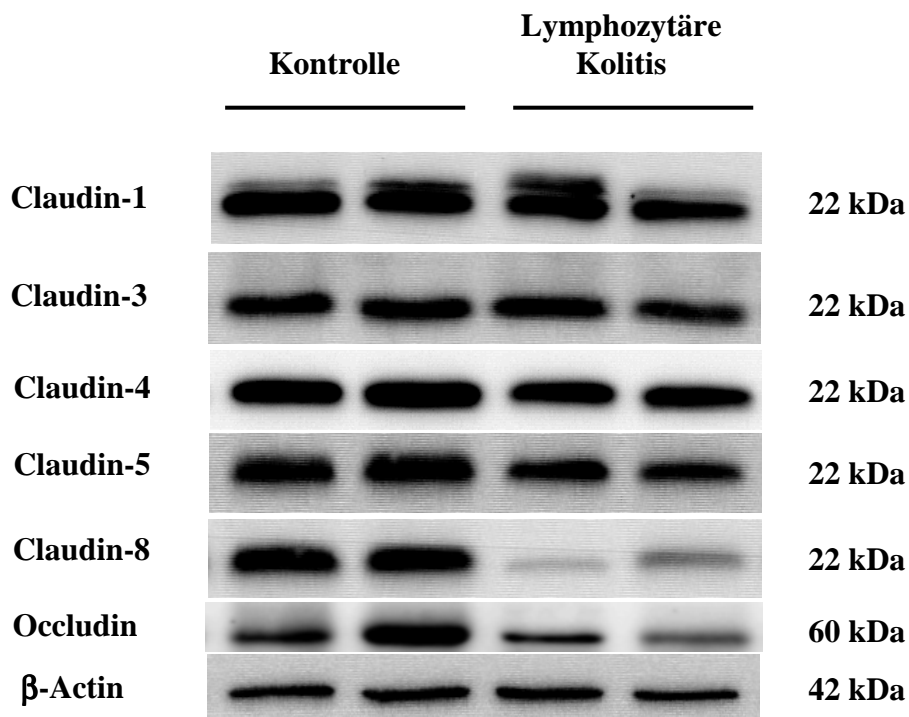
Die Tight Junction-Proteine Occludin ( $72 \pm 16\%$  der Kontrolle), Claudin-1 ( $82 \pm 14\%$ ) und Claudin-3 ( $88 \pm 10\%$ ) waren nicht signifikant verändert.

Sowohl bei dem Kontrollkollektiv, als auch bei der lymphozytären Kolitis konnte keine messbare Expression des porenbildenden Tight Junction-Proteins Claudin-2 detektiert werden.

Aus dem veränderten Expressionsmuster der Tight Junction-Proteine Claudin-4, Claudin-5 und speziell Claudin-8 kann darauf geschlossen werden, dass die epitheliale Barriere bei der lymphozytären Kolitis im Vergleich zu gesunden Kontrollen durchlässiger ist.

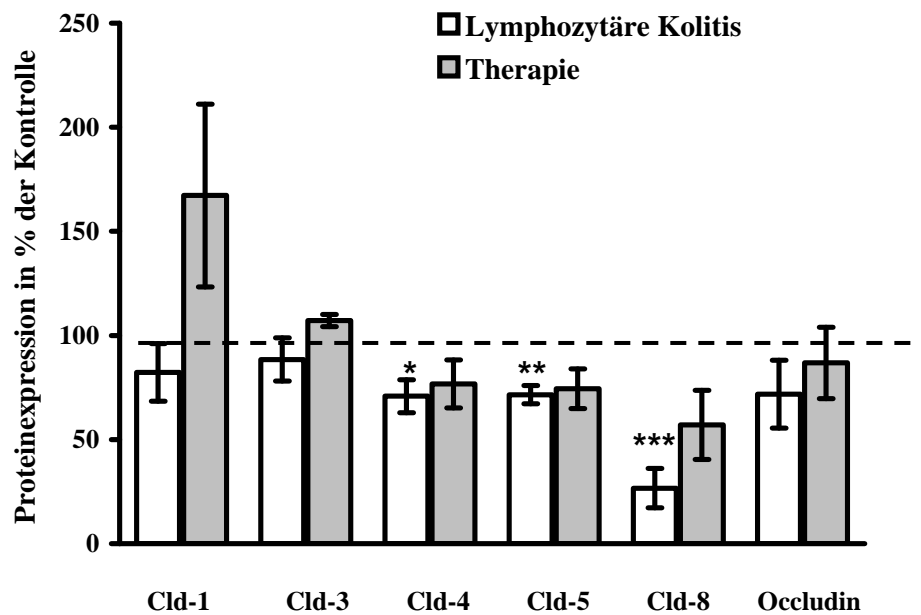
## Ergebnisse

Die Therapie mit Budesonid bewirkte eine Änderung der Expression von Claudin-1 ( $167 \pm 44\%$  vs. unbehandelter lymphozytärer Kolitis) und von Claudin-8 ( $57 \pm 17\%$  vs. unbehandelter lymphozytärer Kolitis). Die statistische Signifikanz wurde jedoch aufgrund der niedrigen n-Zahl von  $n=3$  in beiden Fällen nicht erreicht. Die weiteren untersuchten Tight Junction-Proteine der therapierten lymphozytären Kolitis wurden unverändert zur unbehandelten lymphozytären Kolitis exprimiert.



**Abb. 12:** Darstellung der Expression von Tight Junction-Proteinen bei Kontrollen und lymphozytärer Kolitis

Dargestellt sind repräsentative Western Blots für Claudin-1, -3, -4, -5, -8, Occludin und  $\beta$ -Actin von je zwei Kontrollen und zwei Patienten mit lymphozytärer Kolitis. Die Gruppe der therapierten Patienten mit lymphozytärer Kolitis ist nicht dargestellt.



**Abb. 13: Expressionsanalyse von Tight Junction-Proteinen bei Kontrollen, lymphozytärer Kolitis und behandelter lymphozytärer Kolitis**

Statistische Auswertung mittels Densitometrie. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der spezifischen Signale der Proteinexpression von Kontrollen (n=6), unbehandelter (n=6) und therapierter lymphozytären Kolitis (n=3). Die Proteinexpression der Kontrollen wurde als 100% gesetzt. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 beim Vergleich Kontrolle vs. Kolitis.

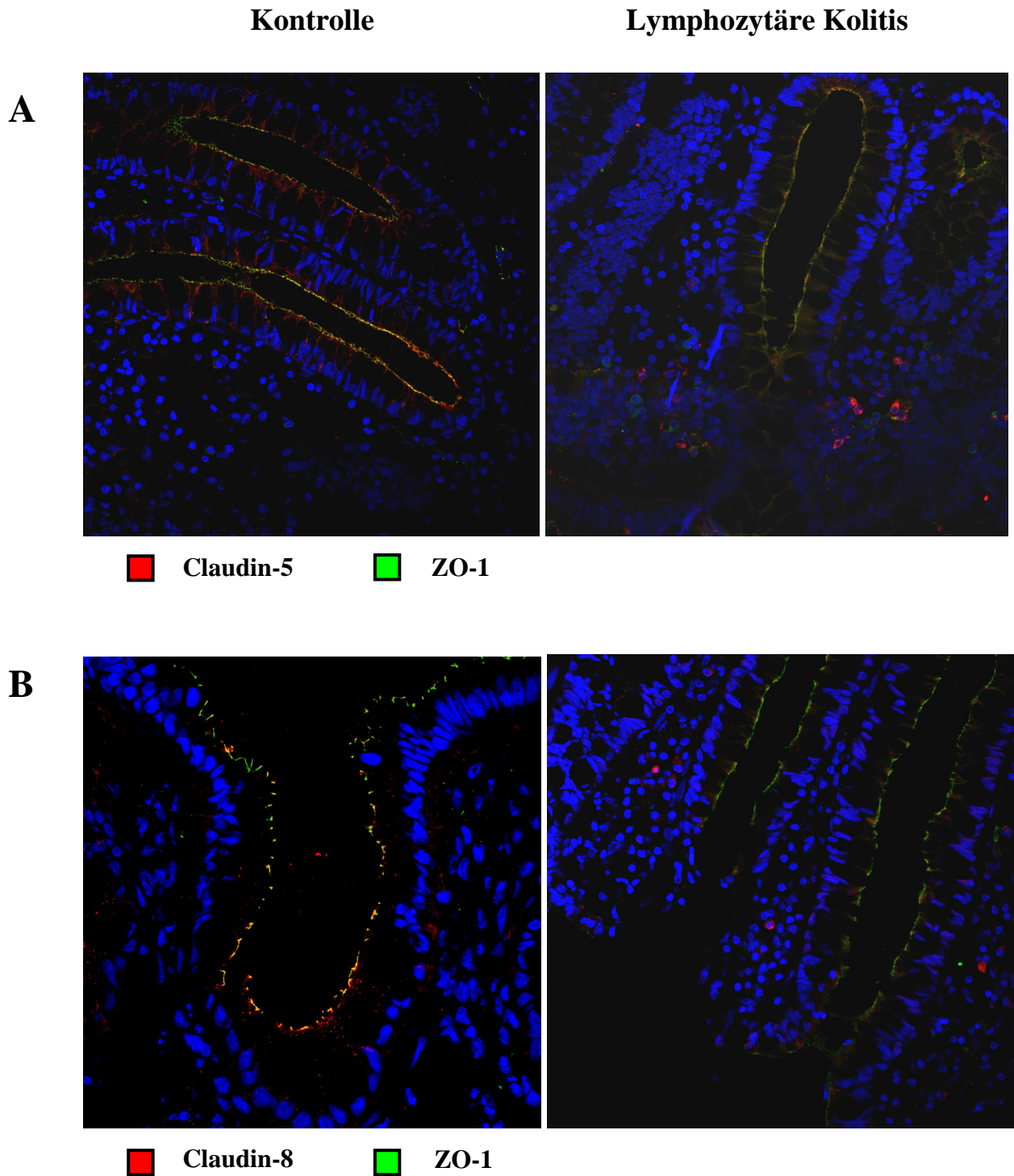
### **3.1.6 Immunhistochemische Lokalisation der Tight Junction-Proteine Claudin-5 und Claudin-8**

Die Tight Junction-Protein-Analyse mittels des Western Blottings bietet die Möglichkeit zur quantitativen Bestimmung der membrangebundenen und zytosolischen Proteinmenge. Unter der Annahme, dass nur die in der Membran eingebauten Proteine ihre Funktion als Transporter erfüllen, muss die Lokalisation der Tight Junction-Proteine auf zellulärer Ebene bestimmt werden. Die nicht membrangebundenen, zytosolischen Proteine dienen vermutlich als Reservoir und werden in Abhängigkeit stimulatorischer Signale in die Membran transportiert.

Die Lokalisation der Tight-junction-Proteine wurde mit Hilfe der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie an fluoreszenzgefärbten Gewebeschnitten von vier Kontrollpatienten und vier Patienten mit lymphozytärer Kolitis bestimmt. Aufgrund der Ergebnisse der Expressionsanalyse mittels der Western Blots wurden lediglich die Proteine Claudin-5 und Claudin-8 untersucht. Die Abbildung 14 gibt exemplarisch die Lokalisation der jeweiligen Claudine, des Tight Junction-spezifischen ZO-1 und die Kollokalisierung dieser Proteine wider.

Das Verteilungsmuster von Claudin-5 zeigte bei Kontrollen neben der Lokalisation in der Tight Junction eine zusätzliche Anfärbung der lateralen Zellmembran. Dieses Verteilungsmuster war vermehrt im Kryptenboden und weniger im Kryptenhals sowie im Oberflächenepithel nachweisbar. Die Verteilung nahm vom Kryptenboden zur Oberfläche hin ab. Claudin-5 konnte ebenfalls im apikalen Zytosol der Kryptenbodenepithelzellen angefärbt werden. Bei den Kolitispatienten konnte Claudin-5 lediglich in der apikalen Membran in den Tight Junctions der Kryptenbodenepithelzellen nachgewiesen werden, jedoch nicht an der Oberfläche und kaum im Kryptenhals. Eine Anfärbung für Claudin-5 in der lateralen Membran oder im Zytosol konnte nicht gezeigt werden.

Claudin-8 wies bei Kontrollen eine Lokalisation in den Tight Junctions der Oberflächen- und Kryptenhalsepithelzellen auf. Im Kryptenhals konnte Claudin-8 vereinzelt in der lateralen Membran nachgewiesen werden. Eine Anfärbung des Zytosols konnte nicht gezeigt werden, wohl aber eine deutliche Anfärbung der Zellkerne der gesamten Krypte. Bei der lymphozytären Kolitis konnte für Claudin-8 eine Lokalisation in den Tight Junctions im Kryptenhals nachgewiesen werden. Deutlich war hier die Anfärbung des Claudin-8 im apikalen Zytosol und, ebenfalls wie bei den Kontrollen, eine Anfärbung der Kerne in der gesamten Krypte.



**Abb. 14: Immunfluoreszenz-Analyse der Tight Junction-Proteine Claudin-5 und Claudin-8**

Abgebildet sind Krypten von je einer Kontrolle und einer lymphozytären Kolitis. A: Claudin-5, B: Claudin-8. Das jeweilige Claudin ist rot, ZO-1 grün und die Kolo-kalisation des Claudins und ZO-1 gelb dargestellt. DAPI-Kernfärbung (blau).

### 3.1.7 Apoptoserate bei der lymphozytären Kolitis

Die Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere kann bereits durch Einzelapoptosen und der damit verbundenen lokalen Erhöhung der Leitfähigkeit gestört werden [Gitter et al., 2000].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Apoptoserate von Kolonepithelzellen von gesunden Kontrollpatienten und von unbehandelten und behandelten lymphozytären Kolitiden mit Hilfe der TUNEL-Färbemethode (terminal deoxynucleotidyl transferase [TdT]-mediated deoxyuridinetriphosphat [dUTP] nick end-labeling) untersucht. Als Apoptosen galten hochkondensierte, stark fluoreszierende und mehrfach segmentierte Kerne (Abb. 15).

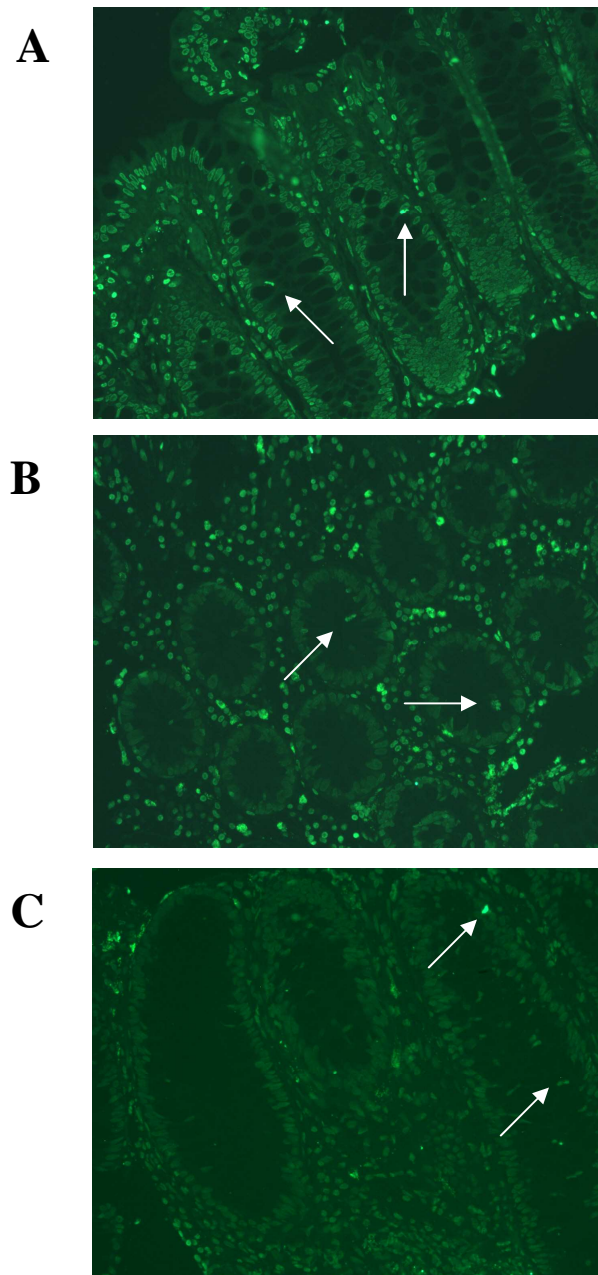
Die mittlere Apoptoserate betrug in der Kontrollgruppe  $1,0 \pm 0,05\%$  (n=6), in der Kolitisgruppe  $0,9 \pm 0,05\%$  (n=6) und in der Gruppe der behandelten Kolitiden  $0,8 \pm 0,1\%$  (n=3) (Tab. 6). Daraus resultiert eine im Vergleich zu gesunden Patienten unveränderte Apoptoserate bei Patienten mit lymphozytärer Kolitis mit und ohne Therapie.

Neben der TUNEL-Färbemethode wurde die Apoptoserate zusätzlich an Gewebeschnitten untersucht, die gegen Caspase-3 gefärbt wurden. Als Apoptosen galten rot gefärbte fragmentierte Zellkerne (Abb. 16). Hier betrug die mittlere Apoptoserate in der Kontrollgruppe  $0,9 \pm 0,07\%$  (n=8), in der Kolitisgruppe  $1,2 \pm 0,16\%$  (n=7) und in der Gruppe der therapierten Kolitiden  $1,4 \pm 0,55\%$  (n=3) (Tab. 6). Auch mittels der Caspase-3-Färbung zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Apoptoserate innerhalb der drei untersuchten Gruppen.

	<b>TUNEL</b>	<b>n</b>	<b>Caspase-3</b>	<b>n</b>
<b>Kontrolle</b>	$1.0 \pm 0.05 \%$	6	$0.9 \pm 0.07 \%$	8
<b>Lymphozytäre Kolitis</b>	$0.9 \pm 0.05 \%$	6	$1.2 \pm 0.16 \%$	7
<b>Therapie</b>	$0.8 \pm 0.10 \%$	3	$1.4 \pm 0.55 \%$	3

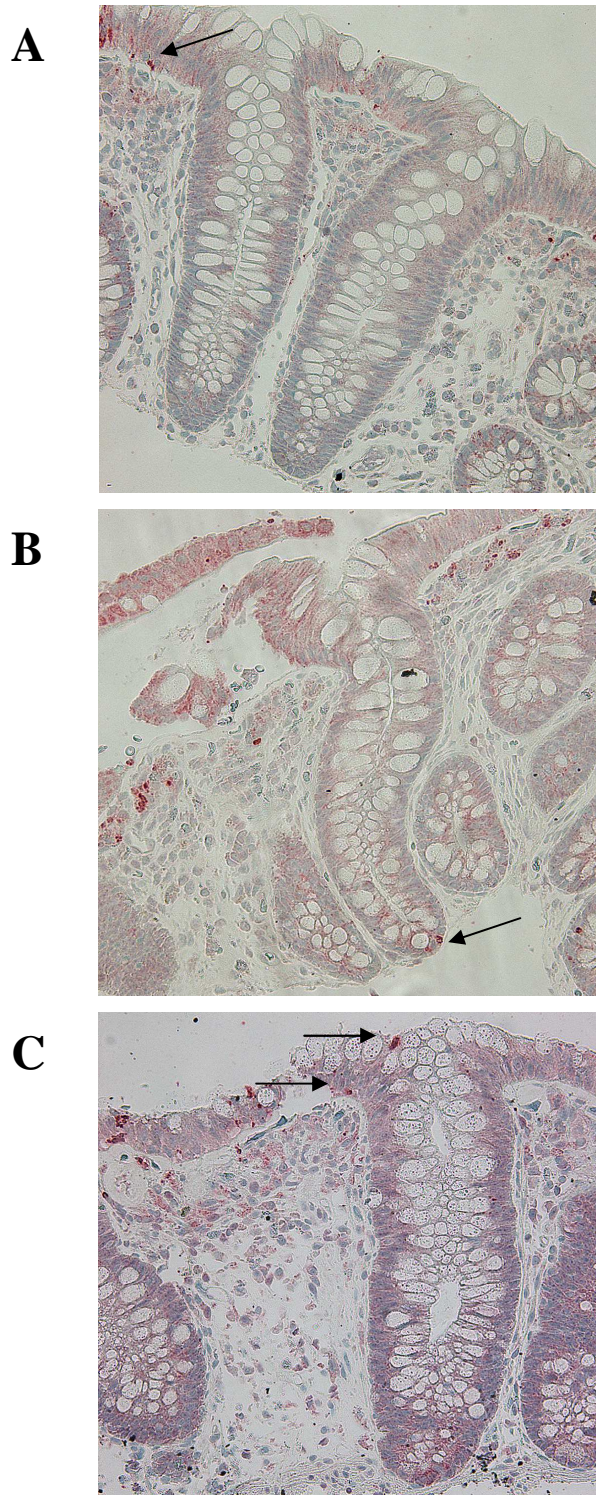
**Tab. 6: Epitheliale Apoptoserate**

Apoptose bei Kontrollen, bei der unbehandelten und bei der therapierten lymphozytären Kolitis als prozentualer Anteil apoptotischer Epithelzellen an allen im Gesichtsfeld (~150 Epithelzellen/Gesichtsfeld) erkennbaren Epithelzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.



**Abb. 15: TUNEL-Färbung**

TUNEL-Färbung von Colon sigmoideum-Biopsien von gesunden Patienten (A), Patienten mit lymphozytärer Kolitis ohne (B) und mit Therapie (C). Apoptosen stellen sich als kondensierte Chromatinfragmente und segmentierte Kerne dar (Pfeile).



**Abb. 16: Caspase-3-Färbung als Apoptosehinweis**

Caspase-3-Färbung von Colon sigmoideum-Biopsien von gesunden Patienten (A), Patienten mit lymphozytärer Kolitis ohne (B) und mit Therapie (C). Apoptosen stellen sich als rote kondensierte und fragmentierte Kerne dar (Pfeile).



### 3.1.8 Morphologische Veränderungen

In der vorliegenden Arbeit wurde die resorptive Oberfläche bei der lymphozytären Kolitis mit und ohne Therapie im Vergleich zu Kontrollen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt.

	<b>Krypten- länge (mm)</b>	<b>Krypten- durchmesser (mm)</b>	<b>Krypten pro serosale Fläche (mm<sup>-2</sup>)</b>	<b>Mukosale Fläche pro serosale Fläche (mm<sup>2</sup>·mm<sup>-2</sup>)</b>	<b>n</b>
<b>Kontrolle</b>	310 ± 16	21 ± 1	95 ± 4	2.9 ± 0.1	10
<b>Lymphozytäre Kolitis</b>	379 ± 27	21 ± 2	99 ± 6	3.4 ± 0.2	7
<b>Therapie</b>	403 ± 31	20 ± 1	100 ± 13	3.6 ± 0.6	3

**Tab. 7: Resorptive Oberfläche**

Resorptive Oberfläche bei Kontrollen, bei der unbehandelten und bei der therapierten lymphozytären Kolitis. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.

Nach erfolgter Mikrodissektion wurde die Länge der Krypten unter einem Lichtmikroskop vermessen. Es zeigte sich dabei tendenziell eine Verlängerung der Krypten bei der lymphozytären Kolitis im Vergleich zu dem Kontrollkollektiv. Diese war jedoch nicht signifikant ( $P=0,0562$ ). Eine ähnliche Beobachtung wurde auch in der Gruppe der behandelten lymphozytären Kolitis gemacht. Bei dem Kryptendurchmesser, als auch bei der Anzahl der Krypten pro serosale Fläche wurden bei diesem Kollektiv ebenfalls keine Unterschiede beobachtet. Aus den vermessenen Parametern konnte schließlich mit Hilfe einer Formel die Gesamtoberfläche des Epithels bezogen auf die darunter liegende serosale Fläche bestimmt werden. Auch diese war in den verschiedenen Gruppen nicht signifikant verändert.

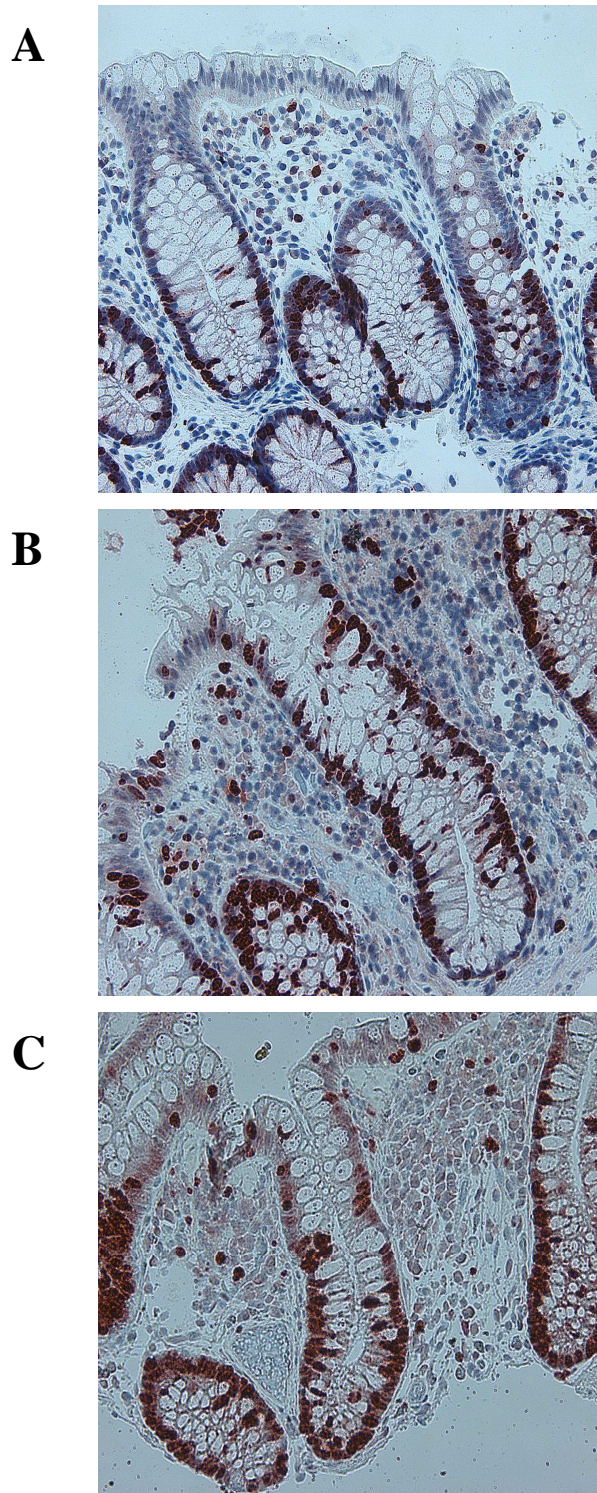
Grundsätzlich gilt, dass bei Beachtung der physikalischen Gesetze jede Vergrößerung der Oberfläche bei unveränderter Tight Junction zu einer Reduktion des Widerstandes führt. In den in dieser Arbeit durchgeführten elektrophysiologischen Experimenten konnte ein verminderter epithelialer Widerstand gezeigt werden. Um einen solchen Einfluss der resorptiven Oberfläche

## Ergebnisse

abschätzen zu können, war die Bestimmung derselben zwingend notwendig. Aufgrund fehlender Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen konnte jedoch auf eine Oberflächenkorrektur der elektrophysiologischen Daten verzichtet werden, so dass lediglich die Korrektur mittels des Quotienten  $R^t/R^e$  durchgeführt wurde.

Des Weiteren wurde die Proliferationsrate der Enterozyten mit Hilfe der Ki-67-Färbung bestimmt. Hierbei zeigte sich eine tendenzielle Vermehrung der proliferierenden Zellen bei der lymphozytären Kolitis im Vergleich zum Kontrollkollektiv (Abb. 17). Während bei den Kontrollen  $27 \pm 3$  proliferierende Zellen von 100 Enterozyten ( $n=7$ ) gezählt wurden, waren es bei der lymphozytären Kolitis  $34 \pm 6$  proliferierende Zellen von 100 Enterozyten ( $n=8$ ). Die Proliferationsrate bei der lymphozytären Kolitis erscheint somit tendentiell gesteigert, war statistisch jedoch nicht signifikant verschieden ( $P=0,32$ ).

In der Gruppe der therapierten Patienten mit lymphozytärer Kolitis wurden  $28 \pm 16$  Ki-67-positive Zellkerne auf 100 Enterozyten gezählt.

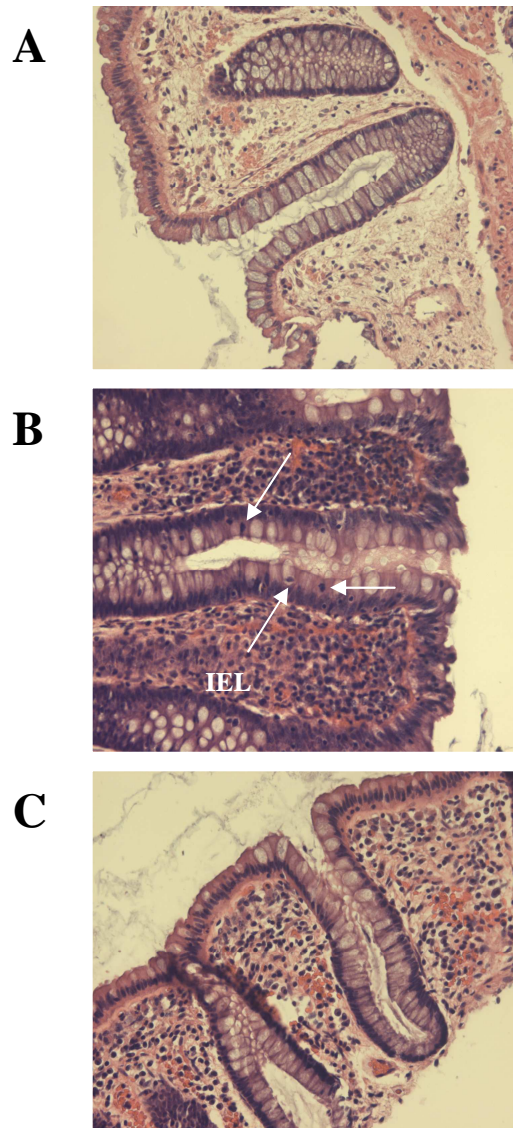


**Abb. 17: Ki-67-Färbung**

Dargestellt sind Gewebeschnitte von Krypten aus dem humanen Sigma, die gegen den Proliferationsmarker Ki-67 gefärbt wurden, von gesunden Patienten (A), Patienten mit lymphozytärer Kolitis ohne (B) und mit Therapie (C). Proliferierende Enterozyten stellen sich mit einem braun-roten Zellkern dar.

## Ergebnisse

Neben der resorptiven Oberfläche wurde auch die Anzahl der für die lymphozytäre Kolitis typischen intraepithelialen Lymphozyten (IEL) pro 100 Epithelzellen für die unbehandelte und die behandelte lymphozytäre Kolitis bestimmt. Die mittlere IEL-Anzahl lag bei der Kolitis bei  $54 \pm 8$  und war damit im Vergleich zu den Kontrollen, bei denen die Anzahl der IEL unter 20/100 Epithelzellen lag, deutlich vermehrt. Eine Therapie mit Budesonid bewirkte eine Verminderung der IEL auf  $30 \pm 10$ .



**Abb. 18: Konventionelle Histologie aus dem humanen Sigma**

Dargestellt sind HE-gefärbte Schnitte von Krypten aus dem humanen Sigma. Deutlich entzündliches Infiltrat in der Submukosa und intraepitheliale Lymphozyten (IEL) [Pfeile] bei der lymphozytären Kolitis. Leicht entzündliches Infiltrat und vereinzelt IEL bei der therapierten Kolitis. Kontrolle (A), lymphozytäre Kolitis ohne (B) und mit Therapie (C).

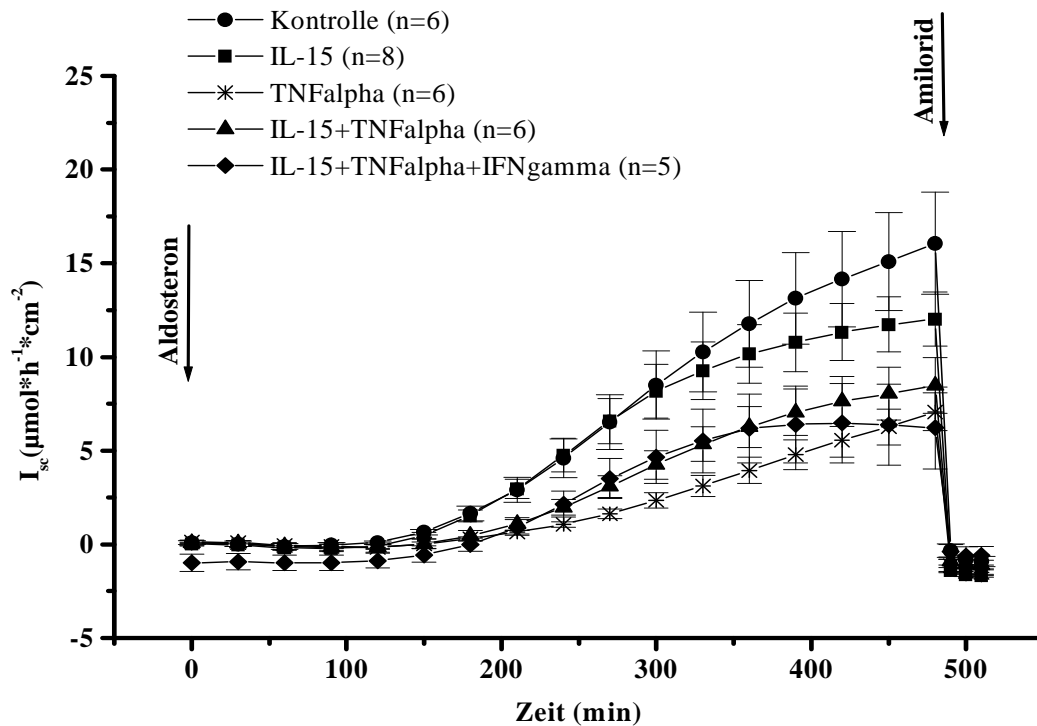
### 3.2 Wirkung von Aldosteron und Amilorid auf den elektrogenen Natrium-Transport am spät-distalen Kolon der Ratte unter dem Einfluss von Zytokinen

Ähnlich wie an menschlichen Colon sigmoideum-Biopsien wurde in Ussing-Experimenten die Aldosteron-stimulierte Resorption von Natrium am spät-distalen Kolon der Ratte unter dem Einfluss des proinflammatorischen Zytokins TNF $\alpha$  und der immunregulierenden Zytokine IFN $\gamma$  und IL-15 untersucht. Diese drei Zytokine sind in der Mukosa der mikroskopischen Kolitis auf mRNA-Ebene um ein Vielfaches erhöht [Tagkalidis et al., 2007]. In dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss diese Zytokine bei der Regulation des epithelialen Natrium-Kanals haben.

Abbildung 19 gibt den zeitlichen Verlauf der gemittelten Kurzschlussstromwerte ( $I_{sc}$ ) aus 5 bis 8 Einzelexperimenten mit verschieden behandelten Epithelien wieder. Die hierfür verwendeten Darmpräparate wurden sechs Stunden lang mit den Zytokinen inkubiert bevor der aktive elektrogene Natrium-Transport durch Zugabe von  $3 \cdot 10^{-9}$  mol/l Aldosteron stimuliert wurde.

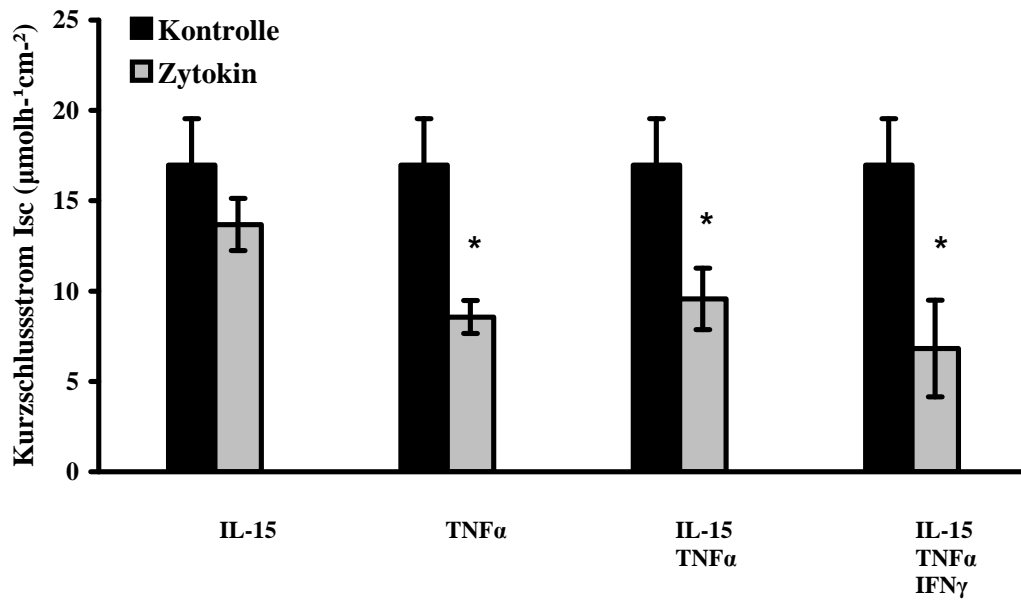
In der Kontrollgruppe wurde in Abwesenheit von Zytokinen ein deutlicher Anstieg des  $I_{sc}$  nach Stimulation durch Aldosteron verzeichnet. Nach Gabe von  $10^{-4}$  mol/l Amilorid wurde ein aktiver elektrogener Natrium-Transport ( $J_{Na}$ ) von  $17,0 \pm 2,6 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  (n=6) gemessen. In der Gruppe der mit IL-15 inkubierten Epithelien konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Der  $J_{Na}$  betrug hier  $13,7 \pm 1,4 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  (n=8, n.s.). Das Gewebe, das mit TNF $\alpha$  vorbehandelt wurde, zeigte einen im Vergleich zu der Kontrollgruppe um 51% verminderten aktiven elektrogenen Natrium-Transport von  $8,4 \pm 1,0 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  (n=6, P=0,02). Eine gemeinsame Präinkubation von IL-15 und TNF $\alpha$  jedoch ergab keinen Unterschied zu der alleinigen Präinkubation mit TNF $\alpha$ . Hier wurde ein  $J_{Na}$  von  $9,6 \pm 1,7 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  (n=6) gemessen. Eine Präinkubation von IL-15, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  senkte den aktiven elektrogenen Natrium-Transport auf 40% der Kontrollgruppe ( $6,8 \pm 2,7 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  (n=5, P=0,02)).

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Präinkubation mit TNF $\alpha$  der epitheliale Natrium-Kanal im spät-distalen Kolon der Ratte gehemmt werden kann, während die alleinige Inkubation mit IL-15 keinen Einfluss auf die Funktion des ENaC hat. Ein synergistischer Effekt von TNF $\alpha$  und IL-15 bzw. TNF $\alpha$ , IL-15 und IFN $\gamma$  konnte nicht gezeigt werden. In Abbildung 20 ist dieser Zusammenhang graphisch dargestellt.



**Abb. 19:** Zeitverlauf des Kurzschlussstroms ( $I_{sc}$ ) im spät-distalen Kolon der Ratte nach Präinkubation mit Zytokinen und Stimulation mit  $3 \cdot 10^{-9}$  mol/l Aldosteron

Nach 6-stündiger Inkubation mit den Zytokinen IL-15, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  erfolgte die Zugabe von  $3 \cdot 10^{-9}$  mol/l Aldosteron. Der aktive elektrogene Natrium-Transport wurde weitere 8 Stunden durch Hemmung des Kurzschlussstroms mit  $10^{-4}$  mol/l Amilorid gemessen. Dieser entspricht der Differenz der Kurzschlussstromwerte kurz vor und 20 min. nach Amilorid-Gabe. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.



**Abb. 20: Aktiver elektrogener Natrium-Transport ( $\Delta I_{sc}$ ) im spät-distalen Kolon der Ratte nach Präinkubation mit Zytokinen**

Aktiver elektrogener Natrium-Transport in Abhängigkeit von den Zytokinen IL-15, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ . Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* P<0,05 gegenüber Kontrollen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Ergebnisse bei Patienten mit lymphozytärer Kolitis

Die mikroskopische Kolitis ist eine eigenständige und von anderen entzündlichen Darmerkrankungen gut abgrenzbare Erkrankung, deren Ätiopathogenese noch weitgehend ungeklärt ist. Aufgrund der diagnosesichernden Histologie, sollte bei anhaltenden wässrigen Diarrhoen, insbesondere bei älteren Patienten, eine endoskopisch-bioptische Diagnostik durchgeführt werden und eine lymphozytäre oder kollagene Kolitis ausgeschlossen werden.

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die pathophysiologischen Mechanismen der Diarrhoe bei der lymphozytären Kolitis zu erforschen. An von endoskopisch entnommenen Biopsien aus dem Colon sigmoideum von Patienten mit lymphozytärer Kolitis, und zwar mit und ohne einer laufenden Therapie mit Budesonid, wurden die Transport- und Barriereigenschaften des Darmgewebes untersucht. Hierbei wurde insbesondere der aktive elektrogene Natrium-Transport untersucht sowie mit Hilfe der Wechselstrom-Impedanzspektroskopie und dem Einsatz von Tritium-markiertem Mannitol die Eigenschaften der epithelialen Barriere charakterisiert. Ergänzend erfolgte eine Analyse der Tight Junction-Protein-Expression sowie die immunhistochemische Charakterisierung der subzellulären Verteilung dieser Tight Junction-Proteine.

#### 4.1.1 Gestörter elektrogener Natrium-Transport bei der lymphozytären Kolitis

Der epitheliale Natrium-Kanal (ENaC) ist für die aktive elektrogene Natrium-Resorption in zahlreichen Geweben wie den Sammelrohren der Nieren, den Ausführungsgängen der Schweiß- und Speicheldrüsen sowie dem distalen Kolon zentraler Bestandteil des sekundär aktiven Transportsystems und führt dadurch zu einer Konzentrierung der Faeces. Die ENaC-Aktivität wird am Darm wie an der Niere von Mineralokortikoiden, vor allem Aldosteron, und Glukokortikoiden reguliert. Die Wirkung des Aldosterons beruht dabei auf der dosisabhängigen Zunahme der Zahl der epithelialen Natrium-Kanäle in der apikalen Enterozytenmembran, und zwar unter anderem durch eine gesteigerte mRNA-Synthese (transkriptionelle Regulation), die zu einer vermehrten Proteinsynthese und damit konsekutiv auch zu einem vermehrten Proteineinbau in die apikale Membran führt, wobei aber auch weitere spezielle Regulationsschritte an Einbau, Aktivierung und Hemmung der Ubiquitinierung beteiligt sind. Im Speziellen bewirkt Aldosteron eine erhöhte mRNA-Expression der  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC-Untereinheit im Kolon, während die  $\alpha$ -



Untereinheit unverändert exprimiert wird [Epple et al., 2000; Amasheh et al., 2004]. Der vermehrte Einbau des ENaC führt zu einer erhöhten Leitfähigkeit von Natrium an der apikalen Membran und initiiert so die luminale Natrium-Aufnahme des aktiven elektrogenen Natrium-Transports. Der Anstieg des Transports erfolgt jedoch nicht direkt, sondern mit einer Latenzzeit von ungefähr einer Stunde, was die Zeitschiene der daran beteiligten Prozesse wie Transkription, Translation und Einbau in die Plasmamembran der Zelle widerspiegelt. Das Maximum ist nach 6-8 Stunden erreicht [Epple et al., 1995].

Durch das  $K^+$ -sparende Diuretikum Amilorid lässt sich der epitheliale Natrium-Kanal hochselektiv hemmen [Benos, 1982]. Eine Konzentration von  $10^{-4}$  mol/l führt schnell und nahezu vollständig zu einem Sistieren des aktiven Natrium-Transports, was sich in einer Änderung des Kurzschlussstromes äußert.

Ein gestörter elektrogener Natrium-Transport z.B. infolge einer gestörten Proteinsynthese und -insertion des ENaC in die apikale Membran bedeutet einen vermehrten Verlust von Natrium-Ionen für den Organismus und als Folge von Solvent Drag auch Verlust von Wasser ins Darmlumen. Dieser malabsorptive Diarrhoemechanismus wurde bereits für die Colitis ulcerosa und für den Morbus Crohn beschrieben [Amasheh et al., 2004; Zeissig et al., 2008]. Amasheh et al. zeigten, dass der verminderte elektrogene Natrium-Transport bei der Colitis ulcerosa als Folge einer reduzierten Transkription der  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC entsteht und dieser Effekt durch das proinflammatorische Zytokin TNF $\alpha$  hervorgerufen wird. Um den Signaltransduktionsweg des Entzündungsgeschehens beim Morbus Crohn zu charakterisieren, führten Zeissig und Mitarbeiter an einem Rattenmodell Experimente mit TNF $\alpha$  und den Inhibitoren der MAP-Kinasen p38, JNK und ERK1/2 durch und zeigten, dass die Inhibition der MEK1/2, welche die ERK1/2 durch Phosphorylierung aktivieren kann, eine Disinhibition der durch TNF $\alpha$  verursachten verminderten Natrium-Resorption bewirkt.

Für die lymphozytäre Kolitis erfolgten bislang keine Untersuchungen des elektrogenen Natrium-Transportes und aufgrund der von Bürgel et al. beschriebenen Störung des Natrium-Transportes bei der kollagenen Kolitis war für uns die Funktion des ENaC bei der lymphozytären Kolitis von besonderem Interesse [Bürgel et al., 2002].

In unseren Experimenten konnten wir bei der lymphozytären Kolitis eine signifikante Reduktion des Amilorid-sensitiven Kurzschlussstroms um rund 68% im Vergleich zum Kontrollkollektiv zeigen. Daraus schlossen wir, dass bei der lymphozytären Kolitis eine Störung des ENaC vorliegen muss. Um die zugrunde liegenden Mechanismen des erniedrigten elektrogenen Natrium-Transportes zu untersuchen, führten wir eine quantitative Untersuchung der mRNA der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC durch. Wir konnten zeigen, dass die Inkubation des Epithels

## Diskussion

mit Aldosteron über 8 Stunden bei der lymphozytären Kolitis zu einer stark reduzierten Induktion der  $\gamma$ -ENaC-mRNA-Expression um 86% im Vergleich zur Kontrollgruppe führt, während die  $\beta$ - und  $\alpha$ -Untereinheit keine Expressionsveränderungen zeigten. Somit spiegelt sich eine Reduktion der mRNA-Expression der  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC um 86% im Vergleich zu Kontrollen in einer Verminderung der rheogenen Natrium-Resorptionsrate um 68% wider.

Aufgrund unserer Ergebnisse betrachten wir eine Malabsorption von Natrium durch den epithelialen Amilorid-sensitiven Natrium-Kanal infolge einer gestörten mRNA-Expression der  $\gamma$ -Untereinheit als einen, der für die Diarrhoe bei der lymphozytären Kolitis verantwortlichen Mechanismus.

An einem kleinen Kollektiv von Patienten mit kollagener Kolitis (n=4) führten wir vergleichend diese elektrophysiologischen Experimente in gleicher Weise durch und beobachteten ebenfalls einen erniedrigten Kurzschlussstrom als Zeichen eines gestörten ENaC. Die gestörte Natrium-Resorption ist bei der kollagenen Kolitis sogar stärker ausgeprägt als bei der lymphozytären Kolitis. Jedoch spiegelt sich diese ebenfalls in einer Expressionsreduktion der  $\gamma$ -ENaC-Untereinheit von rund 70% wider. Ein weiterer Mechanismus, die diese Diskrepanz erklärt, könnte somit noch in einer gestörten Aktivierung oder einem veränderten Ein- bzw. Abbau von ENaC-Untereinheiten bestehen, der aber hier in dieser Arbeit nicht weiter vergleichend untersucht worden ist. Allerdings ist insgesamt hier einschränkend zu bemerken, dass aufgrund der kleinen Patientenzahl in dieser Gruppe mit kollagener Kolitis keine statistische Signifikanz erreicht wurde, so dass die Diskrepanz von Transportaktivität und Expression der ENaC-Untereinheiten auch ganz einfach in einer zu hohen Streuung in der sehr kleinen Patientengruppe bestehen könnte.

### **4.1.2 Epitheliale Barrierefunktionsstörung bei der lymphozytären Kolitis**

Die intakte einschichtige Epithelzellschicht des Darmes repräsentiert eine sehr wirksame Barriere zwischen dem intestinalen Lumen und dem hochpermeablen Endothel der Blutkapillaren. Je nach Lokalisation übt diese Schicht unterschiedliche Eigenschaften aus. Im Dünndarm ist sie eher stark durchlässig und vermittelt eine isoosmotische Teilchenaufnahme und im Dickdarm als mitteldichtem Epithel garantiert es eher die Aufrechterhaltung von durch Resorption erzeugter Teilchengradienten.

Die Permeabilität des Epithels wird dabei insbesondere durch die die Epithelzellen verbindenden Schlussleisten bestimmt. Diese aus Tight Junction-Proteinen bestehenden abdichtenden Elemente bauen einen Widerstand zwischen den zwei zu trennenden Kompartimenten auf und verhindern dadurch den unkontrollierten Austausch von Elektrolyten, Wasser und anderen

Substanzen. Außerdem begrenzen sie natürlich prinzipiell auch den Einstrom von luminalen Antigenen. Strukturelle oder quantitative Veränderungen der Tight Junction-Proteine können zu einer Reduktion des transmuralen Widerstandes und somit zu einer gestörten epithelialen Barrierefunktion führen. Eine epitheliale Barriestörung wurde bereits für die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beschrieben. Für die Colitis ulcerosa wurde z.B. mit Hilfe konventioneller Ussing-Messverfahren unter Gleichstrom-Bedingungen eine Reduktion des Gesamtwiderstandes um ca. 50% gezeigt [Sandle et al., 1990]. Spätere Untersuchungen mittels der Wechselstrom-Impedanzspektroskopie zeigten dann sogar eine Reduktion des epithelialen Widerstandes um 78% bei der Colitis ulcerosa, was dadurch bedingt war, dass der entzündlich bedingte Anstieg des subepithelialen Widerstandes den starken Epithelwiderstandsabfall bei der konventionellen Messung mit Gleichstrom zum Teil maskiert [Schmitz et al., 1999]. Für den Morbus Crohn war die Barrierefunktion weniger stark beeinträchtigt. Es fand sich eine Reduktion des Epithelwiderstandes um ca. 40% [Zeissig et al., 2007].

In der hier vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Dichtigkeit der Schlussleisten mit Hilfe der Wechselstrom-Impedanzspektroskopie untersucht. Diese Methode ermöglicht die Diskriminierung des epithelialen und des subepithelialen Widerstandsanteils am Gesamtwiderstand des in der Ussing-Kammer untersuchten Darmgewebes.

Bei unseren Untersuchungen fanden wir eine Reduktion des epithelialen Widerstandes ( $R^e$ ) um 41% bei der lymphozytären Kolitis.

In weiteren Untersuchungen wurde mit Hilfe von [ $^3\text{H}$ ]-Mannitol-Fluxmessungen die parazelluläre Permeabilität des Epithels als Korrelat der Reduktion des epithelialen Widerstandes bzw. der Erhöhung der epithelialen Leitfähigkeit untersucht. Hierbei beobachteten wir bei der lymphozytären Kolitis einen um 66% höheren parazellulären Flux als bei Kontrollen.

Ähnliche Ergebnisse wurden bereits 2002 für die kollagene Kolitis gezeigt [Bürgel et al., 2002]. Hier wurde eine Reduktion des epithelialen Widerstandes um 30% beobachtet. Bürgel et al. zeigten neben der Verminderung des Epithelwiderstandes bei der kollagenen Kolitis auch eine Erhöhung des subepithelialen Widerstandes um ca. 150%, die das funktionelle Korrelat des verbreiterten kollagenen Bandes im Subepithel bei kollagener Kolitis darstellt. Trotz Fehlens eines subepithelialen Kollagenbandes bei der lymphozytären Kolitis beobachteten wir eine Steigerung des subepithelialen Widerstandes. Diese kann als das elektrophysiologische Korrelat der entzündlichen Veränderungen in der Lamina propria angesehen werden, welche ein wichtiges Kriterium der lymphozytären Kolitis darstellt. Bei der lymphozytären Kolitis liegt somit eine Störung der epithelialen Barriere mit vermindertem epithelialen Widerstand vor und

der durch diese Barrierestörung bedingte Leckflux kann als einer der Entstehungsmechanismen der Diarrhoe angesehen werden.

### **4.1.3 Veränderungen der epithelialen Tight Junction bei der lymphozytären Kolitis**

Das morphologische Korrelat der erhöhten Durchlässigkeit des Epithels bei der lymphozytären Kolitis wurde in einer veränderten Zusammensetzung der epithelialen Tight Junction-Proteine vermutet.

Tight Junction bilden eine Diffusionsbarriere für unterschiedliche Substrate zwischen Lumen und Körperinnerem (Gate Funktion) und grenzen die apikale Membran von der basolateralen Membran ab (Fence Funktion), was die laterale Membrandiffusion von Membranproteinen begrenzt. Die wichtigsten bisher bekannten Membranproteine der Tight Junction sind das Occludin und die als Claudine bezeichnete Familie von Proteinen, von denen bei Wirbeltieren lange 24 verschiedene unterschieden wurden, jüngst aber weitere identifiziert werden konnten. Die Funktion aller dieser Proteine ist jedoch bisher nicht in jedem Falle exakt bekannt. Einigen der Claudine wird eine abdichtende (Claudin-1, Claudin-3, Claudin-4, Claudin-5 und Claudin-8), anderen wiederum eine porenbildende Funktion (Claudin-2, Claudin-16) zugeschrieben [Sonoda et al., 1999; Van Itallie et al., 2001; Amasheh et al., 2002; Furuse et al., 2002; Wen et al., 2004]. Auch das Occludin besitzt wahrscheinlich eher abdichtende Eigenschaften, ist aber aufgrund einer substitutionellen Redundanz in seiner Funktion nicht essentiell, d.h. es findet sich in Occludin-defizienten Tieren keine messbare Barrierestörung [Matter & Balda, 1999].

Mit zunehmendem Verständnis der Bedeutung von Tight Junction-Veränderungen für die epitheliale Barrierefunktion wurden in den letzten Jahren vermehrt Expressionsanalysen der Tight Junction-Proteine im Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen durchgeführt. Hierbei wurde z.B. gezeigt, dass bei der kollagenen Kolitis eine verminderte Expression von Occludin und Claudin-4 vorliegt, während beim Morbus Crohn Claudin-5 und Claudin-8 vermindert und Claudin-2 hochreguliert sind [Bürgel et al., 2002; Zeissig et al., 2007]. Bei beiden Erkrankungen führen diese unterschiedlichen Expressionsmuster zu einer gestörten Barrierefunktion.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte daher zunächst eine quantitative Analyse der Membranproteine Occludin, Claudin-1 bis Claudin-5 sowie Claudin-8.

Wir konnten dabei ein komplexes Muster an Expressionsveränderungen finden. Während die Proteine Claudin-1, Claudin-3 und Occludin unverändert exprimiert wurden, zeigten die abdichtenden Tight Junction-Proteine Claudin-4, Claudin-5 und Claudin-8 eine verminderte

Expression im Vergleich zum Kontrollkollektiv. Eine messbare Expression des porenbildenden Proteins Claudin-2 wurde nicht detektiert.

Diese Ergebnisse für die lymphozytäre Kolitis unterscheiden sich somit von denen, die von Bürgel et al. für die kollagene Kolitis erhoben wurden. Jedoch führt die veränderte Tight Junction-Zusammensetzung bei beiden Erkrankungsformen zu einem funktionell ähnlichen Effekt, nämlich zu einer Reduktion des Epithelwiderstandes und in der Folge zu einem passiven Verlust von Teilchen und Wasser, also zu einer Leckflux-Diarrhoe-Komponente.

Ergänzend zu der Tight Junction-Protein-Expressionsanalyse bei der lymphozytären Kolitis führten wir eine immunhistochemische Untersuchung der Tight Junction-Veränderungen von Claudin-5 und Claudin-8 durch. Für Claudin-5 zeigte sich eine verminderte zytosolische Reserve bei der lymphozytären Kolitis, während eine Lokalisation in der Tight Junction weiterhin beobachtet werden konnte. Claudin-8 wurde bei der lymphozytären Kolitis als Zeichen eines verminderten Einbaus in die Membran vor allem im Zytosol, nicht aber in der Tight Junction-Domäne der Zellen nachgewiesen.

Als weitere wichtige Aussage dieser Arbeit fanden wir also bei der lymphozytären Kolitis eine veränderte Zusammensetzung der abdichtenden Tight Junction-Proteine Claudin-4, -5 und -8 und eine zelluläre Umverteilung der Claudine 5 und 8 aus der Tight Junction heraus. Dies sind in der Summe wesentliche Mechanismen, die zu einer gestörten Barrierefunktion und damit in der Folge zu einer Leckflux-Diarrhoe bei Patienten mit lymphozytärer Kolitis beitragen.

#### **4.1.4 Epitheliale Apoptose**

Eine erhöhte Apoptoserate kann einen weiteren Grund für eine strukturelle Barriestörung des Epithels darstellen. Neben makroskopisch sichtbaren Läsionen wie Erosionen und Ulzerationen, die bei der lymphozytären Kolitis in der Regel und auch definitionsgemäß nicht vorhanden sind, können nämlich bereits Einzelzellverluste durch den von pro-inflammatorischen Zytokinen aktivierten programmierten Zelltodmechanismus zu einer erhöhten Leitfähigkeit des Epithels führen [Gitter et al., 2000]. Dies wird insgesamt jedoch nach wie vor kontrovers diskutiert. Lange war man vielfach der Ansicht, dass Apoptosen keine Auswirkungen auf die epitheliale Integrität ausüben, da die apoptotischen Zellen bis zu ihrer Extrusion aus dem Zellverband mit den Tight Junctions in Kontakt zu ihren benachbarten Zellen verbleiben und die Zellfragmente am Ende ja sogar in geregelter Weise von den Nachbarzellen aufgenommen werden können. Gitter et al. konnten jedoch mit Hilfe der Conductance Scanning-Methode an einem Zellkulturmodell zeigen, dass auch apoptotische Einzelzellverluste zu einer passageren lokalen Erhöhung der Permeabilität im Sinne von Leaks führen können und dieser Effekt durch die

## Diskussion

Stimulation mit TNF $\alpha$  um ein Mehrfaches ansteigt, da dieses Zytokin wahrscheinlich die für die Abdichtung essentielle Tight Junction-Expression reduziert. Aufgrund von fehlenden makroskopischen Läsionen und der von Tagkalidis et al. beschriebenen erhöhten TNF $\alpha$ -Spiegel auf mRNA-Ebene bei der lymphozytären Kolitis war es also interessant zu schauen, ob die erhöhte Permeabilität des Epithels auch durch epitheliale Apoptosen mit verursacht wird [Tagkalidis et al., 2007].

In der vorliegenden Arbeit haben wir aber dann keine Unterschiede in der Apoptoserate zwischen Kontrollen und der lymphozytären Kolitis beobachtet. Die von uns erhobenen Ergebnisse sind somit gut mit der unveränderten Apoptoserate bei der kollagenen Kolitis vereinbar und unterscheiden sich diesbezüglich deutlich von der Colitis ulcerosa und vom Morbus Crohn, wo eine erhöhte Apoptoserate nachgewiesen werden konnte [Sträter et al., 1997; Bürgel et al., 2002; Zeissig et al., 2007]. Eine Permeabilitätserhöhung aufgrund einer vermehrten Apoptoserate scheint bei der Entstehung der Diarrhoe bei der lymphozytären Kolitis somit keine Rolle zu spielen.

### **4.1.5 Mukosale Oberfläche des Darmes bei lymphozytärer Kolitis**

Bei entzündlichen Erkrankungen des Darmes ist häufig die Architektur der Schleimhaut verändert, was durch Zytokine bedingt ist und sowohl über Änderungen in der subepithelialen Bindegewebsstruktur, als auch über Änderungen in Apoptoseraten und Zellproliferationsraten erklärt wird. So können die Krypten der Dickdarmschleimhaut wie z.B. bei der Colitis ulcerosa rarefiziert sein. Eine verminderte oder vergrößerte mukosale Oberfläche hat natürlich Auswirkungen auf die resorptiven und sekretorischen Eigenschaften sowie den Widerstand der Darmwand.

In dieser Arbeit wurde die mukosale Oberfläche der Krypten bei der lymphozytären Kolitis im Vergleich zu Kontrollen bestimmt. Hierbei fand sich in den Mittelwerten der beiden Gruppen eine geringe Tendenz zur Verlängerung der Krypten bei der lymphozytären Kolitis im Vergleich zu dem Kontrollkollektiv, die jedoch die statistische Signifikanz knapp verpasste ( $P=0,0562$ ). Die daraus errechnete Gesamtoberfläche der Mukosa zeigte als Folge dieser Verlängerung der Krypten ebenfalls eine Tendenz zur Zunahme, was aber ebenfalls statistisch nicht signifikant war. Zur näheren Charakterisierung der verlängerten Krypten und der vergrößerten Oberfläche wurde die Proliferationsrate der Enterozyten mit Hilfe der Ki-67-Färbung an Gewebsschnitten bestimmt. Hierbei zeigte sich eine tendenzielle Vermehrung der proliferierenden Zellen bei der lymphozytären Kolitis im Vergleich zum Kontrollkollektiv. Jedoch war auch diese nicht signifikant verändert.

Der Trend zu einer Verlängerung der Krypten und einer Vergrößerung der Oberfläche kann bei der lymphozytären Kolitis als ein Kompensationsmechanismus angesehen werden, welcher der verminderten Natrium-Resorption entgegenwirkt. Unterhalten wird dieser Effekt vermutlich durch das immunmodulatorische und proliferationssteigernde Zytokin IL-15, welches bei der lymphozytären Kolitis um das 100-fache vermehrt ist [Tagkalidis et al., 2007].

#### **4.1.6 Effekt von Budesonid bei lymphozytärer Kolitis**

Die Therapie der lymphozytären Kolitis beschränkt sich in der Regel zur Zeit eher auf die symptomatische Behandlung der Diarrhoe. Eine kausale Therapie existiert bisher nicht.

Nach Ausschluss anderer Durchfallerkrankungen besteht die Therapie in der Meidung potenzieller Noxen, wie NSAID und anderer Medikamente, einer symptomatischen antidiarrhoischen Therapie mit Loperamid und dem Einsatz von Budesonid bzw. Prednisolon. Besonders aufgrund seines günstigen Nebenwirkungsprofils eignet sich das topisch wirksame Budesonid zur Behandlung der lymphozytären Kolitis. Hiermit wurden bereits gute Ergebnisse mit klinischer und histologischer Remission erzielt [Miehlke et al., 2009].

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir den therapeutischen Effekt von Budesonid auf die Transport- und Barriereigenschaften des Epithels bei Patienten mit lymphozytärer Kolitis.

Zu unserem Bedauern stimmten nur drei Patienten mit einer therapierten lymphozytären Kolitis bei ihrer Kontrollkoloskopie einer Biopsieentnahme zu wissenschaftlichen Zwecken zu. Aus diesem Grund konnten wir bei allen Untersuchungen keine statistisch signifikanten Ergebnisse erzielen. Dennoch konnten wir parallel zu der klinischen Remission einen Trend zur Verbesserung der Expression der Tight Junction-Proteine Claudin-1 und Claudin-8 im Vergleich zu Patienten erkennen, die keine Therapie erhielten. Zusätzlich war die Anzahl der intraepithelialen Lymphozyten bei der therapierten Gruppe vermindert. Die Anzahl der Patienten in dieser Gruppe war jedoch so klein, dass eine statistisch untermauerte Aussage nicht möglich ist. Weitere Experimente in diese Richtung erscheinen aber lohnenswert.

#### **4.1.7 Mechanismen der Diarrhoe bei der lymphozytären Kolitis**

Wie bei anderen Durchfallerkrankungen, z.B. bei Colitis ulcerosa, Morbus Crohn oder kollagener Kolitis, entsteht die Diarrhoe bei der lymphozytären Kolitis durch das Zusammenwirken mehrerer Pathomechanismen. Im Vordergrund steht hier zum einen eine gestörte aktive elektrogene Natrium-Resorption im Sinne einer Malabsorption aufgrund einer verminderten Expression der  $\gamma$ -Untereinheit des epithelialen Natrium-Kanals, zum anderen liegt bei der lymphozytären Kolitis eine epitheliale Barriestörung mit verminderter Expression der

## Diskussion

abdichtenden Tight Junction-Proteine Claudin-4, Claudin-5 und Claudin-8 vor. Durch die erhöhte Permeabilität und den erniedrigten Epithelwiderstand kommt es zu einem vermehrten parazellulären Verlust von Soluten und Wasser und es resultiert eine Leckflux-Diarrhoe. Vermehrte Apoptosen als Ursache für eine erhöhte Leitfähigkeit des Epithels wurden bei der lymphozytären Kolitis nicht nachgewiesen.

Unsere Ergebnisse sind gut vereinbar mit den für die kollagene Kolitis beschriebenen Pathomechanismen der Diarrhoe. Dies wirft nun auch hier wieder die seit langem diskutierte Frage auf, ob es sich bei der lymphozytären und der kollagenen Kolitis wirklich um zwei verschiedene Krankheitsbilder oder einfach um unterschiedliche Enden eines Krankheitsspektrums handelt. Die Gemeinsamkeiten beider Erkrankungen sind neben den ähnlichen histologischen und klinischen Befunden ein gestörter Natrium-Transport, eine gestörte Barrierefunktion, keine Änderungen der Apoptoserate und das gleiche Zytokinprofil. Eine unterschiedliche Claudinexpression und das diskontinuierliche kollagene Band im Subepithel sind jedoch Merkmale, die vermuten lassen, dass es sich dabei doch um zwei verschiedene Entitäten handelt. Die beiden Kolitiden könnten jedoch natürlich auch zwei unterschiedlich schwere Stadien ein und derselben Durchfallerkrankung darstellen. Die veränderte Proteinexpression und die vermehrte Bildung einer subepithelialen Kollagenplatte sind in jedem Fall Ausdruck eines unterschiedlichen Gegenregulationsmechanismus. Die lymphozytäre Kolitis stellt somit eventuell die weniger schwere Form und die kollagene Kolitis die schwere Form ein und derselben Erkrankung dar.

Unsere Ergebnisse warfen natürlich dann auch die Frage auf, durch welche Prozesse die Diarrhoemechanismen bei der lymphozytären Kolitis gesteuert werden. Von großem Interesse ist dabei der Signaltransduktionsweg, über den der Entzündungsprozess unterhalten wird. Bei Morbus Crohn wurde für den TNF $\alpha$ -Effekt auf die ENaC-Aktivität eine Abhängigkeit von ERK 1/2 bzw. MEK beschrieben [Zeissig et al., 2008]. Für das IL-15 ist ebenfalls bekannt, dass die Effekte, zumindest an epidermalen Keratinozyten, durch ERK 1/2 vermittelt werden [Yano et al., 2003; Zhang et al. 2008]. Aufgrund des spezifischen Zytokinprofils mit Erhöhung von IL-15, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  bei der lymphozytären Kolitis vermuten wir deshalb auch hier einen Zusammenhang mit ERK 1/2-Aktivierung.



## 4.2 Diskussion der Ergebnisse am Rattenmodell

Tagkalidis et al. charakterisierten die Entzündungsreaktion bei der lymphozytären Kolitis als eine Th-1-Immunreaktion mit einem spezifisch veränderten Zytokinprofil. Sie zeigten auf mRNA-Ebene eine um das 100-fache gesteigerte Expression von IL-15 und IFN $\gamma$ , eine um das 60-fache gesteigerte Expression von TNF $\alpha$  und eine um das 35-fache gesteigerte Expression von der iNO-Synthase. Abgesehen von einer tendenziellen Erhöhung des mukosalen IL-10, sind die Level der anderen Th-2-Zytokine wie IL-2 und IL-4 bei der mikroskopischen Kolitis nicht erhöht. Dieses Zytokinprofil zeigt dabei keinen Unterschied im Vergleich zwischen der kollagenen und der lymphozytären Kolitis [Tagkalidis et al., 2007].

Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spielt TNF $\alpha$  eine entscheidende Rolle bei der epithelialen Barrierestörung. Man beobachtet hier insbesondere eine gesteigerte parazelluläre Permeabilität infolge von Reduktion der abdichtenden Tight Junction-Proteine Claudin-5 und Claudin-8 sowie Induktion porenbildender Claudine [Heller et al., 2005; Mankertz et al., 2009]. Durch eine gesteigerte Apoptoserate der Enterozyten wird diese Barrierestörung unterhalten [Gitter et al., 2000]. Auch ein Zusammenhang zwischen TNF $\alpha$  und einer gestörten Funktion des ENaC wurde beschrieben. TNF $\alpha$  verursacht eine verminderte Expression der  $\beta$ - und der  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC, die durch Dexamethason inhibierbar ist [Bergann et al., 2009].

Auch für IFN $\gamma$  wurde ein Effekt auf die epitheliale Barriere gezeigt [Madara et Stafford, 1989]. Durch Pinozytose von Tight Junction-Proteinen (Occludin, JAM-A, Claudin-1) infolge erhöhter IFN $\gamma$ -Level kommt es zu einer Reduktion des transepithelialen Widerstandes und einer erhöhten Permeabilität des Epithels. Diese Effekte sind jedoch nicht von der epithelialen Apoptose abhängig [Bruewer et al., 2005].

Dem IL-15 wurde bereits vielfach eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoide Arthritis, Psoriasis, Zöliakie und Colitis ulcerosa zugeschrieben [Stevens et al., 1997; Maiuri et al., 2000; Zhang et al., 2008]. Im Kolon wird IL-15 sowohl in den Epithelzellen, insbesondere im Oberflächenepithel, als auch in den mononukleären Zellen der Lamina propria auf mRNA-Ebene exprimiert. Auch einige epitheliale Tumorzelllinien wie HT-29, Caco-2, T-84 und LS174 exprimieren IL-15 und die dazugehörige IL-15- $\alpha$ -Rezeptor-Einheit. Die mRNA-Expression von IL-15 kann in diesen Zellen durch die Zugabe von IFN $\gamma$  innerhalb von vier Stunden auf das 10-fache hoch reguliert werden [Reinecker et al., 1996]. Immunhistochemisch kann IL-15 im entzündeten Kolon, z.B. bei der Colitis ulcerosa angefärbt werden, jedoch nicht im gesunden Gewebe [Liu et al., 2000]. Liu et al. konnten auch zeigen, dass bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn

## Diskussion

und Colitis ulcerosa die Aktivierung von humanen T-Zellen durch IL-15 in einer vermehrten Zytokinproduktion resultiert. Es wurde hierbei eine erhöhte Produktion von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  beobachtet.

Neben den stimulatorischen Effekten besitzt IL-15 z.B. in Keratinozyten bei der Psoriasis auch einen anti-apoptotischen Effekt, der als permissiver Faktor dieser Erkrankung angesehen wird [Zhang et al., 2008]. Bei der Zöliakie dagegen, einem intestinalen Substrat, wurde eine vermehrte Apoptoserate in den Enterozyten als Folge der erhöhten IL-15-Einwirkung beschrieben [Maiuri et al., 2000]. Bei beiden Erkrankungen fand sich als Zeichen einer gesteigerten Zellproliferation eine vermehrte Expression von Ki-67 [Zhang et al., 2008; Maiuri et al., 2000].

Stevens et al. zeigten außerdem, dass exogen zugeführtes IL-15 die Tight Junction-Formationen in T-84-Monolayer-Zellen dosisabhängig beeinflusst, allerdings nicht im Sinne eines Schädigungsmechanismus, sondern im Gegenteil eher protektiv bzw. kompensatorisch. Sechs Tage nach der Zellaussaat und fünf Tage nach der Applikation von IL-15 auf der apikalen Seite konnte eine Erhöhung des transepithelialen Widerstandes um fast 20% gezeigt werden. Bei Zugabe von IL-15 auf der basolateralen Seite kam es zu einer Steigerung des transepithelialen Widerstandes um nur fünf Prozent [Stevens et al., 1997].

IL-15 ist ein immunmodulatorisches Zytokin, das sowohl die Zytokinproduktion, als auch die Proliferation anderer immunmodulatorischer Zellen stimuliert und anti-apoptotische sowie pro-apoptotische Eigenschaften besitzt. Neben TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  scheint dieses Zytokin eine Rolle bei der Pathogenese von entzündlichen Darmerkrankungen und im Speziellen bei der Pathogenese der mikroskopischen Kolitis zu spielen.

Zweites Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses der bei der lymphozytären Kolitis erhöhten Zytokine auf die Transporteigenschaften des Epithels. Diese Untersuchung erfolgte an einem Rattenmodell mit Hilfe elektrophysiologischer Messmethoden.

Wir konnten zeigen, dass der epitheliale Natrium-Kanal im spät-distalen Kolon der Ratte durch die Präinkubation mit TNF $\alpha$  um rund 51% gehemmt werden kann, während die alleinige Inkubation mit IL-15 keinen Einfluss auf die Funktion des ENaC hatte. Ein synergistischer Effekt von TNF $\alpha$  und IL-15 bzw. TNF $\alpha$ , IL-15 und IFN $\gamma$  konnte jedoch ebenfalls nicht gezeigt werden.

Die Frage ist nun, welche Rolle das IL-15 im Entzündungsprozess der Darmwand und in Hinblick auf die Funktion des Darmepithels bei der lymphozytären Kolitis tatsächlich spielt. Induziert IL-15, ähnlich wie bei den chronisch entzündlichen Erkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, die Zytokinproduktion von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ , die wiederum einen negativen

Effekt auf die epitheliale Barriere und Funktion des ENaC ausüben, ohne selbst einen direkten Effekt zu erzeugen? Oder besteht ein Zusammenhang mit der Zöliakie, bei der das IL-15 als das immundominante Zytokin zusammen mit Gliadin die krankheitstypischen Merkmale verursacht? Die Zöliakie und die mikroskopische Kolitis zeigen einige Gemeinsamkeiten. Beide Erkrankungen zeigen das gleiche Zytokinprofil mit erhöhter Expression von IL-15, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  und ein ähnliches histologisches Bild mit verlängerten Krypten und vermehrten intraepithelialen Lymphozyten (IEL). Es wurde sogar ein Mischbild in Form der kollagenen Zöliakie beschrieben [Weinstein et al., 1970].

Handelt es sich bei der mikroskopischen Kolitis vielleicht um eine Zöliakie des Dickdarmes als Zeichen einer Immunreaktion auf ein lumenales Antigen? Dies erscheint insofern plausibel als bei einem Teil der Zöliakiepatienten eine lymphozytäre Kolitis oft milder Ausprägung gefunden werden kann, wenn man nur danach schaut. Gegen diese Hypothese sprechen allerdings die unterschiedlichen Apoptoseraten bei der Zöliakie und der mikroskopischen Kolitis. Auch findet sich bei der lymphozytären Kolitis nicht das für die Zöliakie typische HLA-Klasse-II-Muster (DQ2), so dass allenfalls für eine kleine Subgruppe der lymphozytären Kolitis-Patienten ein Bezug zur latenten bzw. potentiellen Zöliakie vermutet werden kann.

Eine rasche klinische und histologische Remission infolge einer Fäkalumleitung mittels einer Ileostomie und ein abnehmender Gradient der histologischen Veränderungen zwischen dem rechten und dem linken Kolon bekräftigen jedoch das Wirken eines bisher unbekanntes Antigens in der Entstehung der mikroskopischen Kolitis [Järnerot et al., 1995].

## 5 Zusammenfassung

Die lymphozytäre Kolitis ist eine chronisch entzündliche Dickdarmerkrankung, die mit der kollagenen Kolitis zu dem Erkrankungsbild der mikroskopischen Kolitiden zusammengefasst wird. Es handelt sich dabei um eine entzündliche Erkrankung, die mit chronischen wässrigen Diarrhoen bei unauffälligem endoskopischem Bild einhergeht. Die Diagnose wird durch das klinische Erscheinungsbild und die Histologie von Kolonbiopsien gestellt. Im Gegensatz zu der kollagenen Kolitis ist bei der lymphozytären Kolitis das kollagene Band im Subepithel jedoch nicht verbreitert und die Erkrankung zeichnet sich vor allem durch die Vermehrung der intraepithelialen Lymphozyten aus.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden an humanen Biopsien aus dem Colon sigmoideum die pathophysiologischen Mechanismen der Diarrhoe bei der lymphozytären Kolitis sowie der Einfluss von Budesonid auf die Diarrhoe untersucht. Ziel war es, die Transport- und Barriereigenschaften des Darmes näher zu erforschen. Dabei wurden insbesondere der aktive elektrogene Natrium-Transport und die epitheliale Barriere untersucht.

In einem Kurzschlussstromexperiment wurde die aktive elektrogene Natrium-Resorption des Dickdarmepithels als Ausdruck der elektrogenen Aktivität des Amilorid-sensitiven Natrium-Kanals (ENaC) bestimmt. Hierbei konnten wir eine Reduktion des Kurzschlussstroms um 68% bei lymphozytärer Kolitis im Vergleich zum Kontrollkollektiv zeigen. Die gestörte ENaC-Funktion mit verminderten Natrium-Resorptionsraten ist dabei Ausdruck einer veränderten Induktion der mRNA-Expression der Untereinheiten des ENaC, die mit einer Herabregulation vor allem der  $\gamma$ -Untereinheit einhergeht, während die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten unverändert bleiben. Eine Reduktion der mRNA-Expression der  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC um 86% im Vergleich zu den Kontrollen spiegelt sich in einer Verminderung der Natrium-Resorptionsrate um 68% wider. Eine Therapie mit Budesonid konnte weder eine signifikante Steigerung des Kurzschlussstroms noch eine Veränderung der mRNA-Expression der drei ENaC-Untereinheiten bewirken.

Für ein kleines Kollektiv an Patienten mit einer kollagenen Kolitis konnten wir zeigen, dass die bereits von Bürgel et. al. 2002 beschriebene Malabsorption von NaCl ebenfalls von einem gestörten ENaC begleitet wird. Der gestörte elektrogene Natrium-Transport geht auch bei der kollagenen Kolitis mit einer Herabregulation vor allem der  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC einher. Es wurde eine Expressionsreduktion von 71% erreicht. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheit blieben weitgehend unverändert.

Zur Untersuchung der epithelialen Barriere wurden mittels der Wechselstrom-Impedanzspektroskopie der epitheliale und der subepitheliale Anteil des Gesamtwiderstandes bestimmt. Hierbei fand sich bei der lymphozytären Kolitis eine Minderung des epithelialen Widerstandes um 41% von 39 auf 23  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ . Gleichzeitig wurde eine geringe Zunahme des subepithelialen Widerstandes beobachtet. In ergänzenden Untersuchungen wurde mit Hilfe von [ $^3\text{H}$ ]-Mannitol-Fluxmessungen die parazelluläre Permeabilität des Epithels als Korrelat der Reduktion des Epithelwiderstandes untersucht. Dabei sahen wir bei der Kolitis einen um 66% höheren parazellulären Flux als bei Kontrollen. Eine vierwöchige Budesonid-Therapie bewirkte weder eine Veränderung der epithelialen und subepithelialen Widerstände noch der epithelialen Permeabilität im Vergleich zu einer unbehandelten Kolitis.

Zur näheren Charakterisierung der epithelialen Barrierestörung wurde schließlich eine Expressionsanalyse der Tight Junction-Proteine Occludin sowie Claudin-1 bis Claudin-5 und Claudin-8 durchgeführt. Bei der unbehandelten Kolitis zeigte sich eine verminderte Expression von Claudin-4 ( $71 \pm 8\%$ ), Claudin-5 ( $72 \pm 4\%$ ) und am stärksten von Claudin-8 ( $27 \pm 10\%$ ) im Vergleich zu Kontrollen. Nach der Therapie mit Budesonid war eine tendenzielle Erhöhung der Expression von Claudin-1 und Claudin-8 im Vergleich zur Kolitis zu beobachten.

Die immunhistochemische Lokalisationsanalyse von Claudin-5 und Claudin-8 zeigte bei der lymphozytären Kolitis eine zelluläre Umverteilung dieser Tight Junction-Proteine. Für Claudin-5 zeigte sich eine verminderte zytosolische Reserve, während die Lokalisation in den Tight Junctions unverändert war. Das Claudin-8 wurde bei der Kolitis als Zeichen eines verminderten Einbaus in die Membran vor allem im Zytosol nachgewiesen.

Eine erhöhte Apoptoserate als einen weiteren Grund für eine strukturelle Barrierestörung des Epithels konnten wir bei der lymphozytären Kolitis nicht nachweisen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden an einem Rattenmodell die Transporteigenschaften des ENaC unter dem Einfluss der bei der lymphozytären Kolitis erhöhten Zytokine TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  und IL-15 untersucht. Wir konnten zeigen, dass der epitheliale Natrium-Kanal im spät-distalen Kolon der Ratte durch die Präinkubation mit TNF $\alpha$  um 51% gehemmt werden kann, während die alleinige Inkubation mit IL-15 keinen Einfluss auf die Funktion des ENaC hat. Ein synergistischer Effekt von TNF $\alpha$  und IL-15 bzw. TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  und IL-15 konnte nicht gezeigt werden.

Die Diarrhoe bei der lymphozytären Kolitis entsteht durch das Zusammenwirken mehrerer Pathomechanismen. Ein verminderter aktiver elektrogener Natrium-Transport, im Sinne einer Malabsorption mit einer gestörten ENaC-Funktion und eine epitheliale Barrierestörung mit verminderter Expression der abdichtenden Tight Junction-Proteine Claudin-4, -5 und -8 mit daraus resultierender Leckflux-Diarrhoe sind hierbei die entscheidenden Diarrhoemechanismen.

## 6 Literaturverzeichnis

Abdo AA, Urbanski SJ, Beck PJ. Lymphocytic and collagenous colitis-the emerging entity of microscopic colitis: An update on pathophysiology, diagnosis and management. *Can J Gastroenterol* 2003; 17:425-432.

Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:745-756.

Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schoneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci* 2002; 115:4969-4976.

Amasheh S, Barmeyer C, Koch CS, Tavalali S, Mankertz J, Epple HJ, Gehring MM, Florian P, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Cytokine-dependent transcriptional down-regulation of epithelial sodium channel in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2004; 126(7):1711-1720.

Andersen T, Andersen JR, Tvede M, Franzmann MB. Collagenous colitis: Are bacterial cytotoxins responsible? *Am J Gastroenterol* 1993; 88:375-377.

Barmeyer C. Diarrhoe und Malabsorption bei Colitis ulcerosa und zugrunde liegende Mechanismen in den Modellen der Interleukin-2-defizienten Maus und der Zytokin-exponierten Kolonmukosa der Ratte. *Shaker Verlag* 2002.

Benos DJ. Amiloride: A molecular probe of sodium transport in tissues and cells. *Am J Physiol* 1982; 242:C131-C145.

Bergann T, Zeissig S, Fromm A, Richter JF, Fromm M, Schulzke JD. Glucocorticoids and tumor necrosis factor- $\alpha$  synergize to induce absorption by the epithelial sodium channel in the colon. *Gastroenterology* 2009; 136:933-942.

Boehringer N, Hagens G, Songeon F, Isler P, Nicod LP. Differential regulation of tumor necrosing factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-10 (IL-10) secretion by protein kinase and phosphatase inhibitors in human alveolar macrophages. *Eur Cytokine Netw* 1999; 10:211-218.

Bohr J, Tysk C, Eriksson S, Abrahamsson H, Järnerot G. Collagenous colitis: A retrospective study of clinical presentation and treatment in 163 patients. *Gut* 1996; 39:846-851.

Breen EG, Coughlan G, Stevens F, Connolly CE, McCarthy CF. Coeliac proctitis. *Scand J Gastroenterol* 1987; 22:471-477.

Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, Nusrat A. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol* 2003; 171: 6164-6172.

- Bruewer M, Utech M, Ivanov AI, Hopkins AM, Parkos CA, Nusrat A. Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process. *Faseb J* 2005; 19:923-933.
- Bürigel N, Bojarski C, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Mechanisms of diarrhea in collagenous colitis. *Gastroenterology* 2002; 123:433-443.
- Calabrese C, Fabbri A, Areni A, Zahlane D, Scialpi C, Di Febo G. Mesalazin with or without cholestyramin in the treatment of microscopic colitis: Randomized controlled trial. *Gastroenterology* 2007; 22:809-814.
- Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979; 18:5294-5299.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-159.
- Cole KS, Cole RH. Dispersion and absorption in dielectrics. Alternating current characteristics. *J Chem Physics* 1941; 9:341-351.
- Cole KS. Membranes, ions and impulses. *University of California Press, Berkeley* 1968.
- Doherty TM, Seder RA, Sher A. Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. *J Immunol* 1996; 156:735-741.
- Epple HJ, Schulzke JD, Schmitz H, Fromm M. Enzyme- and mineralocorticoid receptor-controlled electrogenic Na<sup>+</sup> absorption in human rectum in vitro. *Am J Physiol* 1995; 269:G42-G48.
- Epple HJ, Amasheh S, Mankertz J, Goltz M, Schulzke JD, Fromm M. Early aldosterone effects in distal colon by transcriptional regulation of epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC) subunits. *Am J Physiol* 2000; 278:G718-G724.
- Fernandez-Banares F, Salas AS, Forne M, Esteve M, Espinos J, Viver JM. Incidence of collagenous and lymphocytic colitis: A 5 year population based study. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:418-42.
- Fernandez-Banares F, Esteve M, Salas A, Forne TM, Espinos J, Martin-Comin J, Viver JM. Bile acid malabsorption in microscopic colitis and in previously unexplained functional chronic diarrhea. *Dig Dis Sci* 2001; 46:2231-2238.
- Fernandez-Banares F, Salas AS, Esteve M, Espinos J, Forne M, Viver JM. Collagenous and lymphocytic colitis evaluation of clinical and histological features, response to treatment, and long-term follow-up. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:340-347.
- Fernandez-Banares F, Esteve M, Espinos J, Rosinach M, Forné M, Salas A, Viver JM. Drug consumption and the risk of microscopic colitis. *Am J Gastroenterol* 2007; 102:324-330.
- Feyen B, Wall GC, Finnerty EP, DeWitt JE, Reyes RS. Meta-analysis: Budesonid treatment for collagenous colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20:745.

## Literaturverzeichnis

Fine KD, Meyer RL, Lee EL. The prevalence and cause of chronic diarrhoea in patients with celiac sprue treated with a gluten-free diet. *Gastroenterology* 1997; 112:1830-1838.

Fine KD, Ogunji F, Lee EL, Lafon G, Tanzi M. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of bismuth subsalicylate for microscopic colitis (abstract). *Gastroenterology* 1999; 116:880.

Fromm M, Hegel U, Beck H, Weskamp P. Effects of trypsin on DC and AC parameters of necturus gallbladder epithelium. *Proc Int Union Physiol Sci* 1977; 13:244.

Fromm M. Die Zonula occludens als regelbare Barriere des epithelialen Transports: Die Wirkung von Protamin an der Gallenblase von Necturus. *Habilitationsschrift* 1986. Berlin.

Fromm M. Störungen der Verdauung und des epithelialen Transports. In: *Pathophysiologie des Menschen*, Hierholzer K, Schmidt RF eds., Weinheim Verlag Chemie 1994; Kapitel 6.5, 6.28-6.38.

Fromm M, Meinke M, Günzel D. Praktikum experimentelle Physiologie für Mediziner und Zahnmediziner – Skript zum Praktikum Epithelien/GI-Trakt. 28. Auflage 2004.

Furuse M, Hata M, Furuse S, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesion form claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 2002; 156:1099-1111.

Gitter AH, Schulzke JD, Sorgenfrei D, Fromm M. Ussing chamber for high-frequency transmural impedance analysis of epithelial tissues. *J Biochem Biophys Methods* 1997; 35:81-88.

Gitter AH, Bendfeldt K, Schmitz H, Schulzke JD, Bentzel CJ and Fromm M. Epithelial barrier defects in HT-29/B6 colonic cell monolayers induced by tumor necrosis factor-alpha. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 915:193-203.

Gitter AH, Bendfeld K, Schulzke JD, Fromm M. Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF $\alpha$ -induced single-cell apoptosis. *Faseb J* 2000; 14:1749-1753.

Groot JA, Bakker R. NaCl transport in the vertebrate intestine. In: *Advances in comparative and environmental physiology*. Berlin, Springer Verlag 1988; 103-152.

Hegel U, Fromm M. Electrical measurements in large intestine (including caecum, colon, rectum). In: Fleischer S, Fleischer B eds.. *Biomembranes*. New York: Academic Press. *Methods in Encymology* 1990; 192:459-484.

Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter JF, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Bürgel N, Fromm M. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 2005; 129:550-564.

Järnerot G, Tysk C, Bohr J, Eriksson S. Collagenous colitis and fecal stream diversion. *Gastroenterology* 1995; 109:449-455.

Jesserun J, Yardley JH, Giardiello FM. Chronic colitis with thickening of the subepithelial collagen layer (collagenous colitis). Histologic findings in 15 patients. *Human Pathol* 1987; 18:839-848.



- Krugliak P, Hollander D, Schlaepfer CC, Nguyen H, Ma TY. Mechanisms and sites of mannitol permeability of small and large intestine in the rat. *Digestive Diseases and Sciences* 1994; 39(4):796-801.
- Kyriakis JM and Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001; 81:807-869.
- Lazenby A, Yardley JH, Giardiello FM, Jessorun J, Bayless TM. Lymphocytic ("microscopic") colitis: a comparative histopathologic study with particular reference to collagenous colitis. *Hum Pathol* 1989; 20:18-28.
- Lindstrøm CG. "Collagenous colitis" with watery diarrhea. A new entity? *Path Eur* 1976; 11:87-89.
- Liu Z, Geboes K, Colpaert S, D'Haens GR, Rutgeerts P, Ceuppens JL. IL-15 is highly expressed in inflammatory bowel disease and regulates local T cell-dependent cytokine production. *The Journal of Immunology* 2000; 164:3608-3615.
- Madara JL & Stafford J. Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 1989; 83:724-727.
- Maiuri L, Ciacci C, Auricchio S, Brown V, Quarantino S, Londei M. Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology* 2000; 119:996-1006.
- Mankertz J, Amasheh M, Krug SM, Fromm A, Amasheh S, Hillenbrand B, Tavalali S, Fromm M, Schulzke JD. TNF $\alpha$  up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Cell Tissue Res*. 2009; 336:67-77.
- Masuda A, Matsuguchi T, Yamaki K, Hayakawa T, Kubo M, LaRochelle WJ, Yoshikai Y. Interleukin-15 induces rapid tyrosine-phosphorylation of STAT6 and the expression of interleukin-4 in mouse mast cells. *J Biol Chem* 2000; 275:29331-29337.
- Matter K and Balda MS. Occludin and the functions of tight junctions. *Int Rev Cytol* 1999; 186:117-146.
- McDonald PP, Russo MP, Ferrini S, Cassatella MA. Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils. *Blood* 1998; 92:4828-4835.
- Miehlke S, Madisch A, Karimi D, Wonschik S, Kuhlisch E, Beckmann R, Morgner A, Müller R, Greinwald R, Seitz G, Baretton G, Stolte M. Budesonid is effective in treating lymphocytic colitis: A randomized double-blind placebo-controlled study. *Gastroenterology* 2009; 136:2092-2100.
- Pardi DS, Ramnath VR, Loftus EV jr, Tremaine WJ, Sandborn WJ. Lymphocytic colitis: clinical features, treatment, and outcomes. *Am J Gastroenterol* 2002, 97:2829-2833.
- Raclot G, Queneau PE, Ottignon Y, Angonin R, Monnot B, Leroy M. Incidence of collagenous colitis: A retrospective study in the east of France. *Gastroenterology* 1994; 106:A23.
- Read NW, Kejs GJ, Read MG, Santa Ana CA, Morawski SG, Fordtran JS. Chronic diarrhea of unknown origin. *Gastroenterology* 1980; 78:264-271.

## Literaturverzeichnis

Reinecker HC, MacDermozz RP, Mirau S, Dignass A, Podolsky DK. Intestinal epithelial cells both express and respond to Interleukin 15. *Gastroenterology* 1996; 111:1706-1713.

Riddell RH, Tanaka M, Mazzoleni G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs as a possible cause of collagenous colitis: a case control study. *Gut* 1992; 33:683-686.

Roux PP and Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; 68:320-344.

Sandle GI. Segmental heterogeneity of basal and aldosterone-induced electrogenic Na transport in human colon. *Pflügers Arch* 1989; 414:706-712.

Sandle GI, Higgs N, Crowe P, Marsh MN, Venkatesan S, Peters TJ. Cellular basis for defective electrolyte transport in inflamed human colon. *Gastroenterology* 1990; 99:97-105.

Schifferdecker E, Frömter E. The AC impedance of necturus gallbladder epithelium. *Pflügers Arch* 1978; 377:125-133.

Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, Runkel N, Foss HD, Bentzel CJ, Riecken EO, Schulzke JD. Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1999; 116:301-309.

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*, 2004; 75:163-189.

Schulzke JD, Fromm M, Hegel U. Epithelial and subepithelial resistance of rat large intestine: segmental differences, effect of stripping, time course, and action of aldosterone. *Pflügers Arch* 1986; 407:632-637.

Schulzke JD, Fromm M, Menge H, Riecken EO. Impaired intestinal sodium and chloride transport in the blind loop syndrome of the rat. *Gastroenterology* 1987; 92:693-698.

Schulzke JD, Fromm M, Hegel U, Riecken EO. Ion transport and enteric nervous system in rat rectal colon: Mechanical stretch causes electrogenic chlorid secretion via Plexus Meissneri and amiloride-sensitive electrogenic sodium-absorption is not affected by intramural neurons. *Pflügers Arch* 1989; 414:216-221.

Schulzke JD, Fromm M, Bentzel CJ, Zeitz M, Menge H, Riecken EO. Ion transport in the experimental short bowel syndrome of the rat. *Gastroenterology* 1992; 102:497-504.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem* 1987; 150(1):76-85.

Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J, Horiguchi Y, Tsukita S. Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol* 1999; 147(1):195-204.

Stevens AC, Matthews J, Andres P, Baffis V, Zheng XX, Chae DW, Smith J, Strom TB, Maslinski W. Interleukin-15 signals T84 colonic epithelial cells in the absence of the interleukin-2 receptor  $\beta$ -chain. *American Physiological Society* 1997; G1201-G1208.

- Sträter J, Wellisch I, Riedl S, Walczak H, Koretz K, Tandara A, Krammer PH, Möller P. CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis in colon epithelial cells: a possible role in ulcerative colitis. *Gastroenterologie* 1997; 113:160-167.
- Tagkalidis PP, Gibson PR, Bhathal PS. Microscopic colitis demonstrates a T helper cell type 1 mucosal cytokine profile. *J Clin Pathol* 2007; 60:382-387.
- Tay YH, Tay CY. The conventional short-circuiting technique under-short-circuits most epithelia. *J Membr Biol* 1981; 59:173-177.
- Ung KA, Gillberg R, Kilander A, Abrahamsson H. Role of bile acid and bile acid binding agents in patients with collagenous colitis. *Gut* 2000; 46:170.
- Ussing HH, Zehran K. Active transport of sodium as the source of electrical current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 1951; 23:110-127.
- Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest* 2001; 107(10):1319-1327.
- Varghese L, Galandiuk S, Tremaine WJ, Burgart LJ. Lymphocytic colitis treated with proctocolectomy and ileal J-pouch anal anastomosis. *Dis Colon Rectum* 2002; 45:123-126.
- Wang N, Dumot JA, Achkar E, Easley KA, Petras RE, Goldblum JR. Colonic epithelial lymphocytosis without a thickened subepithelial collagen table: a clinicopathological study of 40 cases supporting a heterogeneous entity. *Am J Surg Pathol* 1999; 23:1068-1074.
- Weinstein WM, Saunders DR, Tytgat GN, Rubin CE. Collagenous sprue – an unrecognized type of malabsorption. *N Engl J Med* 1970; 10; 283:1297-1301.
- Wen H, Watry DD, Marcondes MC, Fox HS. Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: a role of the first extracellular domain of claudin-5. *Mol Cell Biol* 2004; 24:8408-8417.
- Williams RA, Gelfand DV. Total proctocolectomy and ileal pouch anal anastomosis to successfully treat a patient with collagenous colitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:2147.
- Wolber R, Owen D, Freeman H. Colonic lymphocytosis in patients with celiac sprue. *Hum Pathol* 1990; 21:1092-1096.
- Yano S, Komine M, Fujimoto M, Okochi H, Tamaki K. Interleukin 15 induces the signals of epidermal proliferation through ERK and PI 3-kinase in a human epidermal keratinocyte cell line, HaCaT. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 301:841-847.
- Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroessen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 2007; 56:61-72.

## Literaturverzeichnis

Zeissig S, Bergann T, Fromm A, Bojarski C, Heller F, Guenther U, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Altered ENaC expression leads to impaired sodium absorption in the noninflamed intestine in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2008; 134:1436-1447.

Zhang SQ, Luo X, Yang S, Liu JL, Yang CJ, Yin XY, Huang HL, Zhang XJ. Autoinhibition of IL-15 expression in KC cells is ERK1/2 and PI3K dependent. *Scandinavian Journal of Immunology* 2008; 68:397-404.

## **7 Anhang**

### **Erklärung der Selbstständigkeit**

„Ich, Irene Erko, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Mechanismen der Diarrhoe bei der lymphozytären Kolitis und therapeutischer Effekt von Budesonid“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 28.02.2011

Irene Erko

Anhang

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke, der mir die Möglichkeit gab, in seiner Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit anzufertigen. Ich danke ihm für die Vergabe des Themas, die ausgezeichnete Betreuung und für die immer vorhandene Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn Prof. Michael Fromm bedanke ich mich für seine ständige Unterstützung und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Dr. Christian Barmeyer möchte ich ganz herzlich für die sehr gute Betreuung und enge Zusammenarbeit danken. Ich danke ihm für die vielen Diskussionen und Anregungen sowie für seinen ansteckenden Optimismus und seine unerschöpfliche Geduld.

Ein sehr großer Dank geht an Anja Fromm, Claudia May, In-Fah Lee, Susanna Schön und Martin Voss für die Anleitung der Untersuchungsmethoden und die tatkräftige experimentelle Unterstützung bei dieser Arbeit. Sie trugen wesentlich zu dem Gelingen der Arbeit bei.

Bei Herrn Ing. grad. Detlef Sorgenfrei möchte ich mich ganz besonders für die Hilfe bei vielen kleineren oder größeren technischen Problemen bedanken.

Der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich für die überaus freundliche Aufnahme in ihrer Abteilung, das angenehme Arbeitsklima und die immer vorhandene Hilfsbereitschaft danken.

Meinen Eltern und Maxim danke ich für ihre Unterstützung, ihr großes Interesse am Progress der Arbeit sowie ihr Verständnis und ihre Motivation in anstrengenden Phasen.

Diese Arbeit wurde durch eine studienbegleitende Forschungsförderung der Charité – Universitätsmedizin Berlin und den Sonderforschungsbereich 633 „Induktion und Modulation T-zellvermittelter Immunreaktionen im Gastrointestinaltrakt“ gefördert.