

Aus dem Institut/der Klinik für klinische Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Einfluss von HIV-typischen Zytokinen auf die Reparatur
von
Einzelepithelzellläsionen in Kolonepithelzellen**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Inga Katharina Gollnick

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. D.Günzel

 2. Prof. Dr. phil. nat. habil. A. Gitter

 3. Prof. Dr. med. Dr. oec. troph. J. Stein

Datum der Promotion: 30.11.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Epithelien.....	3
1.1.1	Barriere.....	3
1.1.2	Lecke und dichte Epithelien.....	5
1.1.3	Zonula occludens, Zonula adherens und parazellulärer Transport.....	6
1.2	Diarrhoe.....	13
1.2.1	Diarrhoemechanismen.....	14
1.2.2	HIV und sein Einfluss auf die intestinale Barriere.....	15
1.2.3	HIV-assoziierte Enteropathie.....	20
1.3	Zytokine und Wundheilung.....	23
1.3.1	Immunregulatorische Prinzipien der Wundheilung.....	23
1.3.2	TNF- α	25
1.3.3	IL-1 β	26
1.3.4	IFN- α	26
1.3.5	IFN- γ	26
1.4	Zytokine und Barriere bei der HIV-Enteropathie.....	28
1.5	Conductance scanning.....	29
1.5.1	Einzelzell-Läsionen und ihr Effekt auf die gastrointestinale Mukosa.....	29
1.5.2	Der „purse string -Mechanismus“.....	30
1.6	Zielsetzung.....	31
2	Material und Methoden.....	34
2.1	HT-29/B6-Zellen.....	34
2.1.1	Kulturbedingungen.....	34
2.1.2	Verwendete Badlösung.....	35
2.2	Vorexperiment.....	36
2.2.1	Prüfung des transepithelialen Widerstandes.....	36
2.2.2	Die Ussing-Kammer.....	37
2.3	Conductance scanning.....	40
2.3.1	Theoretische Grundlagen.....	40
2.3.2	Apparente Leitfähigkeit-Leitwert.....	41
2.3.3	Versuchsaufbau.....	44
2.3.4	Versuchsabläufe.....	49
2.3.5	Statistik.....	50
2.4	Immunfluoreszenz.....	51
2.5	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie.....	52
2.6	Videomikroskopie.....	54

3	Ergebnisse	55
3.1	HT-29/B6-Monolayer	55
3.2	HIV-typische Zytokine	60
3.2.1	TNF- α	65
3.2.2	IL-1 β	67
3.2.3	IFN- α	68
3.2.4	IFN- γ	69
3.2.5	Zusammenfassende Darstellung von Leitfähigkeiten	70
4	Diskussion	71
4.1	Bisherige Untersuchungen zur Restitution von Einzelzellläsionen	73
4.2	Zellmodell HT-29/B6	74
4.2.1	Neuformierung der untersuchten Strukturen nach Einzelzellläsion	74
4.2.2	Verbindung Adherens Junction – Tight junction	77
4.2.3	Verschluss durch Restitution nach Schädigung des Monolayers HT-29/B6	79
4.3	Relevanz des "purse string-Mechanismus"	81
4.4	HIV-typische Zytokine im Einzelzellrestitutionsmodell	85
4.5	Einzelne Zytokine im Restitutionsmodell	85
4.5.1	TNF- α	86
4.5.2	IL-1 β	87
4.5.3	IFN- γ	88
4.5.4	IFN- α	89
4.6	Untersuchung verschiedener Restitutionsmodelle	90
4.6.1	(Synergistische) Wirkung von Zytokinkombinationen an HT-29/B6 und nativem Mauscolon	90
4.6.2	„Große“ Epitheldefekte an HT-29/B6	91
4.6.3	EGF	94
4.7	Vergleich der HIV-Enteropathie mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	94

5	Empfehlungen für weiterführende Studien	97
6	Zusammenfassung	98
7	Literaturverzeichnis	101
	Danksagung.....	117
	Lebenslauf	118
	Eidesstattliche Erklärung	122

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung der Ionentransportverhältnisse in lecken Epithelien	5
Abb. 2:	Schematische Darstellung der transmembranären Tight junction Proteine	9
Abb. 3:	Gefrierbruchbild einer Kapillare und ihrer interzellulären (zwischen Endothelzellen) Tight junctions	10
Abb. 4:	Proteine der Tight junction und ihre Beziehung zum Zytoskelett.....	11
Abb. 5:	Schematische Darstellung einer Zell-Zellverbindung unter der Beteiligung von E-Cadherinen und seinen assoziierten Proteinen	13
Abb. 6:	Schematische Darstellung des Replikationszyklus des HI-Virus mithilfe der Reversen Transkriptase.....	16
Abb. 7:	schematische Darstellung des Krankheitsverlaufes bei HIV-Infektion.....	17
Abb. 8:	vereinfachte schematische Darstellung vom Aufbau eines HI-Virus	20
Abb. 9:	Immunzellen in verletzten Geweben in Abhängigkeit von der Zeit	24
Abb. 10:	Schematische Darstellung der epithelialen (oberflächlichen) Wundheilung.....	25
Abb. 11:	schematische Darstellung des Versuchsaufbaus einer Ussing-Kammer	39
Abb. 12:	Schematische Verdeutlichung der Abhängigkeit der Stromdichte vom Abstand zum Zentrum der Läsion zur Ermittlung des Einzelleitwertes.....	42
Abb. 13:	Apparente Leitfähigkeit (Stromdichteverteilung) als Funktion der Zeit und des Ortes	43
Abb. 14:	spezieller Container zum Fixieren des Epithels.....	44
Abb. 15:	Schematische Darstellung der Meßkammer des Conductance-scanning-Standes	45
Abb. 16:	Arbeitsschritte zur Herstellung einer Messelektrode	47
Abb. 17:	Schematische Darstellung der Signalerfassung des supraepithelialen Potentials durch das Mikroelektrodenpaar dicht über dem Epithel.....	48
Abb. 18:	schematische Darstellung des Prinzips der konfokalen Mikroskopie	53
Abb. 19:	Videomikroskopie, zur Darstellung kommt die zunehmende Restitution einer Einzelzellläsion nach Vorinkubation mit HIV-typischen Zytokinen in Abhängigkeit von der Zeit	56

Abbildungsverzeichnis

Abb. 20:	Time-laps Videomikroskopie Restitution einer Einzelzellläsion am Monolayer HT-29/B6 unter Kontrollbedingungen	57
Abb. 21:	Immunfluoreszenzfärbung von Occludin und E-Cadherin	59
Abb. 22:	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie.....	60
Abb. 23:	Schematische Darstellung zur Ermittlung der Ergebniskurven.....	62
Abb. 24:	Darstellung der τ -Werte einer Kontrollmessreihe	63
Abb. 25:	Einzelleitwertmessungen nach Einzelzellläsion, als Funktionen der Zeit unter Kontrollbedingungen (links) und nach Vorinkubation mit den HIV-typischen Zytokinen (rechts) am Monolayer HT-29/B6.....	64
Abb. 26:	Leitwert der Läsion (dargestellt als Mittelwert \pm SEM) des HT-29/B6 Monolayers als Funktion der Zeit nach Setzen einer Einzelzellläsion	64
Abb. 27:	Leitwert, einzeln und gemittelt nach Einzelzellläsion.....	66
Abb. 28:	Leitwerte g , als Funktion der Zeit, Einzelzellläsionen nach 24-stündiger Vorinkubation mit Interleukin-1 β	67
Abb. 29:	Leitwerte der Kontrollmessungen und mit IFN- α vorinkubierten HT-29/B6-Zellen nach Setzen einer Einzelzellläsion.....	68
Abb. 30:	Leitwerte, $g_{Läsion}$, im Zeitverlauf nach dem Setzen einer Einzelzellläsion nach Vorinkubation mit IFN- γ	69
Abb. 31:	Neuformierung der Tight junction nach Ruptur.....	75
Abb. 32:	Schematische Darstellung der Zonula adherens.....	77
Abb. 33:	Immunfluoreszenzfärbungen von ZO-1 und F-Aktin.....	79
Abb. 34:	Schematische Darstellung der Restitution einer Einzelzellläsion am einschichtigen Epithel	82
Abb. 35:	Immunfluoreszenzbilder: Restitution unter HIV-typischen Zytokinen.....	92

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Übersicht über Zellkontakte	4
Tab. 2:	Die wesentlichen Diarrhoemechanismen	14
Tab. 3:	unterschiedliche Wachstumsfaktoren und Zytokine und deren Effekt auf die epitheliale Defektreparatur	27
Tab. 4:	Zusammensetzung der Standardelektrolytlösung	35
Tab. 5:	Substrate, die der Standardelektrolytlösung zugefügt wurden	36
Tab. 6:	Überblick über verwendete Zytokine	61
Tab. 7:	Leitfähigkeit des intakten Epithels Gintakt und die reduzierten Leitfähigkeitswerte gLäsion für den Zeitraum von 2 bis 16 Minuten nach Läsion.	70

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	- Acquired Immune Deficiency Syndrome
ATPase	- Adenosintriphosphatase (spaltet ATP in ADP und Phosphat)
CDC	- Gesundheitsorganisation
CD4+	- T-Helferzellen
CD8+	- Zytotoxische Lymphozyten
CED	- chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CSF	- Kolonie stabilisierender Faktor
CMV	- Zytomegalievirus
CTL	- Zytotoxischische Leukozyt
DAPI	- 4, 6 Diamidin-2 Phenylindol-Dihydrochlorid
DNA	- Desoxyribonukleinsäure
ELISA	- Enzym Linked Immunosorbent Assay (antikörperbasiertes Nachweisverfahren)
GA	- apparente Leitfähigkeit
g Läsion	- Leitwert
G intakt	- (Grund)-Leitfähigkeit intakter Epithelbereiche
G Ussing	- epitheliale Gesamtleitfähigkeit
Gp 41; 120	- virales Oberflächenglykoproteine des HI Virus
HAART	- hochaktive antiretrovirale Therapie
HIV	- Humanes Immundefizienzvirus
HLA-B27	- Human Leukozyten Antigen-B
HTLV I und II	- Humanes T-Lymphotropes Virus I und II
HT-29/B6	- Kolon-Krebszellklon (Zelllinie)

Abkürzungsverzeichnis

EGF	- epidermaler Wachstumsfaktor
FGF	- Fibroblasten Wachstumsfaktor
F-Aktin	- filamentäres Aktin
Ionen	
(-verbindungen)	
	- Na ⁺
	- Ca ²⁺
	- CaCl ₂
	- K ⁻
	- Cl ⁻
	- HPO ₄
	- H ₂ PO ₄
	- HCO ₃
IFN - α; γ	- Interferon α und γ
IL-1 β	- Interleukin 1 beta
JAM	- junctionales Adhäsionsmolekül
KdM	- Zellkultur
LAF	- lymphozytenaktivierender Faktor
n.s.	- nicht signifikant
NF-κB	- nukleärer Faktor Kappa B
MHC I und II	- Major Histocompatibility Complex
MLCK	- Myosin-Leichte-Ketten-Kinase
MDCK	- Madin Darby Canine Kidney (Zelllinie)
MDM	- Monocytes derived Makrophages
p	- Irrtumswahrscheinlichkeit
PMN	- polymorphkernige Neutrophile (Leukozyten)
PBMC	- mononukleäre Zellen des periferen Blutes
PBS	- Phosphat Puffer

Abkürzungsverzeichnis

PCR	- Polymerase Kettenreaktion (Methode, um DNA zu vervielfältigen)
PGE2	- Prostaglandin 2
RNA	- Ribonukleinsäure
Rk	- Vorwiderstand der Meßapparatur
Rt	- transepithelialer Widerstand von Epithelien
SD	- Standardabweichung
SEM	- Standardfehler des arithmetischen Mittelwertes
ρ	- spezifischer Volumenwiderstand der Elektrolytlösung
Ue	- transepitheliale Spannung
ΔV	- Spannungsabfall zwischen Mikroelektroden
Vt	- transepitheliales Potential
Vt AC	- transepitheliale Wechselfspannung
Δz	- Abstand der Mikroelektroden
zo	- konstanter Abstand (25 μm) des Elektrodenpaares vom Epithel
RNA	- Ribonukleinsäure
TNF - α	- Tumornekrosefaktor alpha
TGF – α ; β	- Transformierender Wachstumsfaktor alpha und beta
WHO	- Weltgesundheitsorganisation
ZO-1(2und3)	- Zonula Occludins Protein 1 (2 und 3)

MEINEN FREUNDEN

1 Einleitung

Gastrointestinale Beschwerden, wie Diarrhoe, sind eine bekannte und häufige Komplikation der HIV-Infektion. 50 bis 90% der mit dem Immundefizienzvirus infizierten Patienten klagen über diese Symptome (Malebranche et al., 1983; Quinn et al., 1986). Entstehende infektiöse Enteritiden können zur Degeneration der oberflächlichen Darmschleimhaut führen (Orenstein und Kotler, 1995).

1987 wurde die Definition AIDS von der CDC um die Einbeziehung des "wasting syndroms" erweitert. Es ist definiert als ein Gewichtsverlust von mehr als 10% des Körpergewichtes und durch das Bestehen von Diarrhoe für mehr als einen Monat. Diese Definition wurde von der WHO übernommen. Da das HI-Virus zentrale Zellen der Immunabwehr angreift, können nach einem symptomfreien Intervall verschiedenste Erreger den geschwächten Organismus infizieren. Bei Infektion mit der erworbenen Immunschwäche stellt der Magen-Darm-Trakt einen zentralen Angriffspunkt dar. Die Barriere zwischen Lumen des Magen-Darmtrakts und Blut bildet ein einschichtig, hochprismatisches Epithel. Diese Barriere dient sowohl dem HI-Virus, als auch opportunistischen Keimen als Eintrittspforte. Zu den opportunistischen Krankheitserregern bei HIV-Patienten zählen: Protozoen (z.B. Cryptosporidien und Mikrosporidien), Bakterien (z.B. Mykobakterium avium complex) und Viren (z.B. Adenovirus, Rotavirus oder CMV). Auch die Entwicklung einer Diarrhoe ohne opportunistische Erkrankung bzw. der Einfluss von anderen pathogenen Keimen wurde untersucht. Smith et al. (1988) und Colebunders et al. (1988) gaben die Größe dieser Gruppe von HIV-Patienten mit 15 bis 50% an. Die Diagnostik hinsichtlich Magen-Darmkeimen bei HIV-infizierten Patienten mit Diarrhoe und Wasting-Syndrom ergibt häufig ein negatives Ergebnis, was zu der Hypothese führte, dass HIV per se eine HIV-assoziierte Enteropathie auslöst (Kotler et al., 1984). Das histologische Erscheinungsbild dieser Komplikation der HIV-Infektion sind Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie (Batman et al., 1989; Kotler et al., 1984). Diese pathologisch veränderte Dünndarmoberfläche steht nur noch eingeschränkt für

die Resorption von lebenswichtigen Nahrungsbestandteilen (fettlösliche Vitamine (K, E, D, A), Eiweiße, Kohlenhydrate, Vitamin B₁₂, Eisen, Folsäure Wasser, Elektrolyte) zur Verfügung, es kommt zur Malabsorption. Bei einer beachtlichen Anzahl von HIV-Patienten mit den üblichen intestinalen Beschwerden konnten keine Mikroorganismen als Urheber gefunden werden, jedoch HIV-infizierte mononukleäre Zellen des Darms (Schneider et al., 1994). Unterstützt durch die Ergebnisse von Ullrich (1992) konnte die Verbesserung des klinischen Zustandes der HIV-Kranken durch antiretrovirale Therapie nachgewiesen werden.

Die HIV-Enteropathie und entzündliche Darmerkrankungen gehen mit der Erhöhung bestimmter Zytokine einher (Sartor, 1994; Schmitz et al., 2002).

Die Arbeitsgruppe Schmitz et al. (2002) ermittelten den „Zytokinüberstand“, den HIV-infizierte Immunzellen sezernieren und wiesen ihren Angriff auf die Barrierefunktion der Kolonzelllinie HT-29/B6 nach. Der Überstand beinhaltet: TNF- α , IL-1 β , IFN- α und IFN- γ .

Die Schleimhaut des Darms ist ständigen mechanischen Verletzungen, Noxen und Apoptosen (programmierter Zelltod) ausgesetzt. Kleinste Schleimhautwunden beeinträchtigen die epitheliale Integrität. Zur Abwendung unterschiedlichster infektiöser Darmerkrankungen müssen diese schnell repariert werden (Dignass, 2001; Gitter et al., 2001). Schmitz et al. (2002) zeigten, dass die epitheliale Integrität durch die genannten Zytokine beeinträchtigt wird und es zu einer erhöhten apoptotischen Rate kommt. Entstandene kleinste Barrirelücken werden durch Einzelzellrestitution repariert, wodurch die Zellintegrität wiederhergestellt und die Barrierefunktion wieder vollständig erfüllt wird (Florian, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die Restitution von Einzelzellläsionen nach Inkubation mit HIV-typischen Zytokinen (HIV-Überstand) am Kolonzellmodel HT-29/B6 untersucht.

1.1 Epithelien

„Epithel“ stammt aus dem Griechischen, wobei „Epi“ darauf, daran, bzw. dazu und „thele“ – wachsen, blühen bedeutet.

Epithelien befinden sich auf Grenzflächen zwischen extrakorporal und dem Interstitium (äußeres Epithel) und zwischen dem Interstitium und intrakorporalen Höhlen (inneres Epithel). Dadurch erfüllen Epithelien vor allem zwei Funktionen: die Abgrenzung gegenüber der Umwelt – Barriere, Schutz und den im Sinne einer ausgeglichenen Homöostase wirkenden aktiven und passiven Transport.

Ein Beispiel ist das einschichtig hochprismatische Epithel, welches das Darmlumen vom Interstitium des Darms abgrenzt.

1.1.1 Barriere

Eine Basisfunktion der Epithelien ist die Bildung einer Barriere, d.h. eine Passage wird nur unter bestimmten Bedingungen für bestimmte Stoffe möglich. Dadurch ist der Organismus in der Lage sich vor Bakterien und Viren zu schützen. Gleichzeitig wird durch spezifische und unspezifische Transportsysteme dafür gesorgt, dass im Körper bestimmte Elektrolytverhältnisse eingehalten werden, indem die Barriere für Nährstoffe und Wasser permeabel ist.

Epitheliale Zellverbände üben somit als Barriere den wichtigen Zweck der Aufrechterhaltung der Homöostase aus (Potten, 1997). In diesem Zusammenhang ist die Konstanterhaltung wichtiger physiologischer Größen gemeint, ein bestimmter elektrochemischer Gradient dient gewissermaßen als Motor für Transportsysteme über die epitheliale Barriere.

Diese Transportsysteme werden in transzelluläre und parazelluläre unterteilt.

Zu den transzellulären Transportsystemen gehören die Kanäle, Carrier und Pumpen. In den Kanälen bewegen sich geladene Teilchen (z.B. Na^+ oder K^+ -Ionen). In den substanzspezifischen Carrier-Proteinen geschieht der Stofftransport durch

„erleichterte Diffusion“. Die Transportrichtung beider Systeme erfolgt entlang eines Konzentrationsgradienten, im Gegensatz zu den Pumpen. Sie stellen ATPasen dar, die unter Energieverbrauch Ionen entgegen dem Konzentrationsgradienten transportieren (aktiver Transport). Parazellulärer Transport erfolgt immer passiv durch Diffusion, Osmose oder „solvent drag“ (dem Mitführen von Wasser über die Barriere) (Schmidt, Thews, Lang, 2000). Die Regulation des parazellulären Transportes bzw. die unterschiedlichen Permeabilitäten von Epithelien werden durch Tight junctions bestimmt. Zwei benachbarte (z.B. epitheliale, intestinalen) Zellen weisen Tight junctions an ihrem apikalen Umfang auf. Vor allem der Transport der lecken Epithelien kann durch Permeabilitätsänderungen der Schlußleisten bewerkstelligt werden (Madara und Mariscal, 1984).

Zwischen den einzelnen Zellen des Dünndarmepithels (Enterozyten) gibt es zudem interzelluläre Verbindungen, die dem mechanischen Zusammenhalt und einem gewissen intrazellulären Stoffaustausch dienen.

Man unterscheidet:

Tab. 1: Übersicht über Zellkontakte

Einzelne Zellkontakte	Funktionen
- Desmosomen = Macula Adhaerens	- mechanischer Kontakt
- Adhaerens junction = gürtelförmiges Desmosom	- mechanischer Kontakt
- Tight junction = Zonula occludens	- intramembranäre Barriere - transepitheliale Barriere - parazelluläre Kanäle - mechanischer Kontakt - Transport von Immunzellen
- Gap junction = Nexus	Interzelluläre Permeabilität, elektrische Kopplung

Als Schlussleistenkomplex (= Junctional Komplex) bezeichnet man den Komplex aus Tight junction und Adhaerens junction (Hierholzer und Schmidt, 1994).

1.1.2 Lecke und dichte Epithelien

Die „Leckheit“ eines Epithels wird durch die Permeabilität der Schlussleisten und die der Zellmembranen reguliert. Elektrophysiologisch können Epithelien mittels ihrer elektrischen Leitfähigkeit unterschieden werden (Frömter und Diamond, 1972).

Man unterscheidet lecke, mitteldichte und dichte Epithelien. Diese Einteilung gelingt aufgrund der Relation von para- und transzellulärer Ionenleitfähigkeiten. Bei lecken Epithelien ist die parazelluläre Leitfähigkeit größer als die transzelluläre, sodass gilt:

$$G_{\text{trans}} / G_{\text{para}} < 1$$

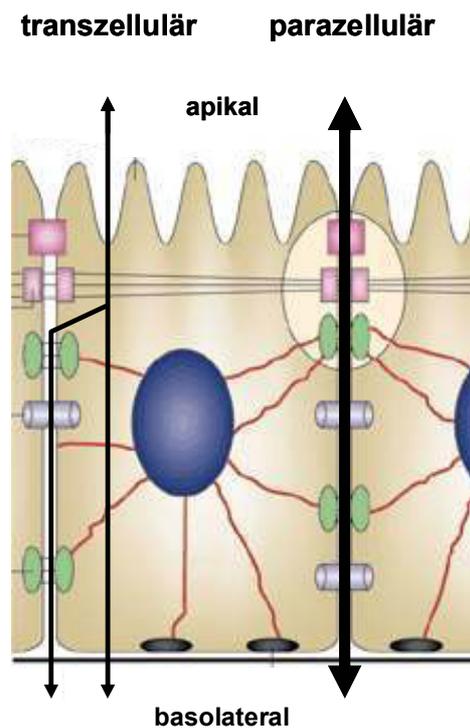


Abb. 1: Schematische Darstellung der Ionentransportverhältnisse in lecken Epithelien
modifiziert nach: Tsukita et al., 2001

Lecke Epithelien befinden sich im menschlichen Organismus beispielsweise im proximalen Nierentubulus, Dünndarm, Gallenblase und Teilen des Pankreas.

Die Schlußleisten mitteldichter Epithelien sind durch ihre geringere elektrische

Leitfähigkeit gegenüber den Zellmembranen charakterisiert, d.h. $G_{\text{trans}} / G_{\text{para}} \geq 1$. Beispiele für diese Epithelien findet man im distalen Nierentubulus, im Sammelrohr (der Niere) und im distalen Kolon.

In dichten Oberflächenzellverbänden, die es nur in wenigen Geweben wie der Harnblase und der Epidermis gibt, sind die Schlußleisten für Ionen mehr als 100 x weniger permeabler als die Zellmembranen ($G_{\text{trans}} / G_{\text{para}} > 100$).

1.1.3 Zonula occludens, Zonula adherens und parazellulärer Transport

Für die Zell-Zellverbindungen sind im Wesentlichen die Zonula occludens (= Tight junction) und die Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle (= Zonula adherens) verantwortlich, beide wirken unter Einbeziehung des Zytoskelettes.

Tight junction (= Zonula occludens) bilden als wesentliche parazelluläre Struktur einen wichtigen Teil der epithelialen Barriere.

Farquar und Palade (1963) beschrieben die Tight junction erstmals als Struktur benachbarter Zellmembranen, die einen Adhäsionsring bilden.

Die Tight junction erfüllt die Funktion eines Tors (gate) und eines Zaunes (fence) (Diamond, 1977):

Die „gate“-Funktion bezeichnet die Unterschiede der Epithelien hinsichtlich ihrer Permeabilität. Die parazelluläre Durchlässigkeit des Zellverbandes wird durch die Dichtheit der Tight junction bestimmt. Als „fence“-Funktion beschrieb Diamond die Polarität von epithelialen Zellen, welche durch das Vorhandensein der Tight junction im intraepithelialen Raum geschieht. Oberhalb der Tight junction befindet sich der apikale Abschnitt eines Epithels, unterhalb der basolaterale. Bestimmte Enzyme (z.B. zum Spalten der Kohlenhydrate) finden sich nur an der apikalen Seite des Dünndarms, die Na^+/K^+ -ATPase befindet sich stets basolateral. Folglich ergeben sich auf beiden Seiten unterschiedliche biochemische Milieus, wodurch der gerichtete Transport ermöglicht wird.

Cereijido et al. (1981) beschrieben die Tight junction als maschenartige Struktur, teils formiert aus Anteilen des Zytoskeletts. Tight junctions bestehen zwischen emporwachsenden benachbarten Zellen, dadurch ändert die Tight junction ständig ihre Struktur, um keine transepithelialen Lecks entstehen zu lassen (Madara, 1990).

Der parazelluläre Transport von Wasser, Soluten und Immunzellen wird durch die Permeabilität der Tight junction reguliert (Cereijido et al., 1981; Anderson und Van Itallie, 1995; González-Mariscal et al., 2003).

Die Tight junction besteht aus vielen Proteinen und Filamenten, es ist ein dynamisches Gebilde, seine Untergruppen sind fähig, Signalkaskaden auszulösen (Gonzalez-Mariscal, 2003).

Zu den transmembranären Bestandteilen der Tight junctions gehören Occludin, die Claudine, Tricellulin und JAM.

Furuse et al. (1993) veröffentlichten die Identifizierung eines neuen, großen Tight junction-Proteins, welches sie Occludin nannten. Es ist etwa 65 kD groß und verfügt über vier transmembranäre Domänen und zwei extrazellulär gelegene „Loops“, über die der Kontakt zu den benachbarten Zellen hergestellt wird (Abb. 2, links, Abb. 5) (Furuse et al., 1993; Furuse et al., 1998). Auf der zytoplasmatischen Seite gibt es einen langen C-Terminus und einen verhältnismäßig kürzeren N-Terminus. Occludin ist über seinen langen C-Terminus mit den Proteinen ZO-1, ZO-2 und ZO-3 und dem F-Aktin assoziiert (Haskin et al., 1998; Furuse et al., 1994). Es bilden sich zwei Proteinkomplexe, ZO-1 mit ZO-2 und ZO-1 mit ZO-3, die jeweils mit dem C-Terminus des Occludin und mit F-Aktin interagieren (Abb. 5) (Wittchen et al., 1999). Im Vergleich dazu wiesen Bamforth et al. (1999) auf die Bedeutung des N-Terminus des Occludin für die Integrität und das Bestehen der epithelialen Barrierefunktion hin. Da Occludin an das Protein ZO-1 assoziiert ist, kommt es auch nach Verlust der Zell-Zellverbindung und bei Fehlen der Tight junction zu einem Anhäufen von Occludin, was eine Grundlage für die Wiederherstellung von Zellverbindungen ist. Die zweite extrazelluläre Schleife des Occludin stellte sich als Voraussetzung für eine regelrechte Anordnung und folglich einer Herstellung einer suffizienten Tight junction heraus (Medina et al., 2000).

Derzeit sind 24 unterschiedliche Claudine bekannt. Die Proteine Claudin-1 und Claudin-2 konnten als Bestandteile der Zonula occludens mit etwa je 22 kD durch Immunfluoreszenz und Immunelektronenmikroskopie nachgewiesen werden (Furuse et al., 1998, Tsukita und Furuse, 2000b). Abbildung 2 zeigt, dass diese Claudine jeweils etwa ein Molekulargewicht von 22 kD, vier transmembranäre Domänen und 2 extrazelluläre Schleifen, sowie intrazelluläre N- und C- Termini aufweisen. Sie sind für die Barrierefunktion und die Permeabilität von Epithelien verantwortlich. Claudin-1-defiziente Mäuse zeigten nach der Geburt eine stark erhöhte Letalität, homozygote Träger des Merkmals starben alle innerhalb eines Tages, makroskopisch war eine besonders faltige Haut auffällig (Furuse et al., 2002). Der Angriff der epithelialen Barriere zwischen extrakorporal und intrakorporal führte zur Dehydratation, ausserdem zeigten sie einen kontinuierlichen Gewichtsverlust, folglich starben die Mäuse.

Weiterhin sind für das Abdichten der parazellulären Barriere die Claudine 4 (gegenüber Na^+) und 5 (Van Itallie et al., 2001; Amasheh et al., 2005) verantwortlich. Dabei kann das Vorhandensein von Claudinen auch den parazellulären Transport erhöhen, da sie parazelluläre Kanäle bilden können. So stellt z.B. Claudin 2 einen natriumselektiven Kanals dar (Amasheh et al., 2002). Claudin- 16 (Paracellin-1) ist ein weiteres Tight junction Protein durch dessen Expression im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife der Niere eine erhöhte Durchlässigkeit der parazellulären Barriere, in diesem Fall jedoch für Magnesium und Calcium, nachzuweisen ist (Simon et al., 1999; Kausalya et al., 2006).

JAM (Junction Adhesion Molecule) gehören zur Immunglobulin-Superfamilie, sie können die transmembranäre Migration von Immunzellen beeinflussen.

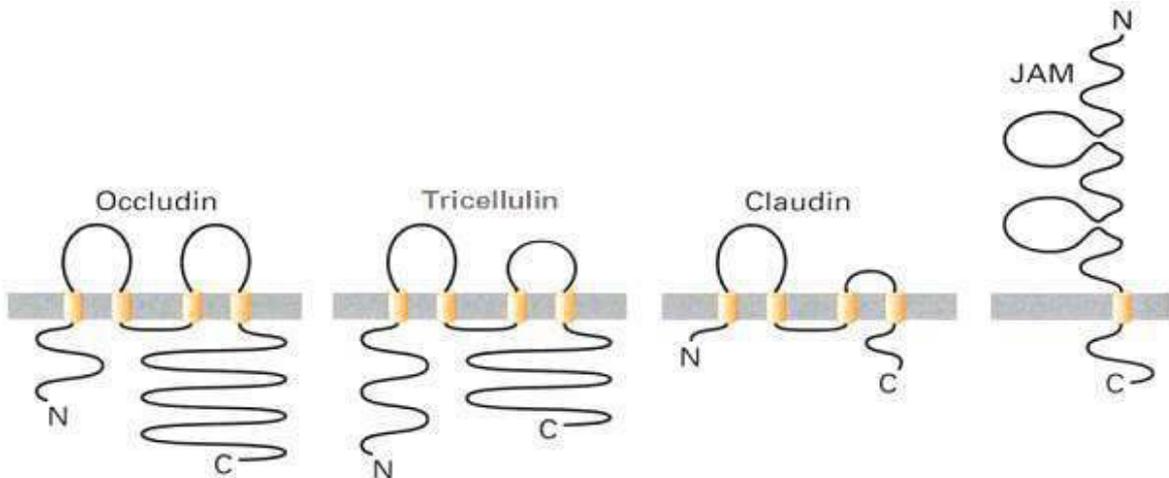


Abb. 2: Schematische Darstellung der transmembranären Tight junction Proteine

Dargestellt sind die vier integralen Tight junction-Proteine: Occludin, Claudin(e), und die „Junctional Adhesion Molecule“ (JAM). Occludin, Tricellulin und Claudine verfügen je über vier transmembranäre Domänen, die einen Kontakt zwischen benachbarten Zellen herstellen. JAM weist nur eine transmembranäre Domäne auf. Extrazellulär fallen Disulfidbrücken auf, die Schlaufen entstehen lassen. Alle aufgezählten Proteine haben Bedeutung bei der Bildung von interzellulärer Haftung. Modifiziert nach Tsukita et al., 2001 und Modifikation nach Ikenouchi, 2005

Native, epitheliale Zellen und epitheliale Zellen des Monolayers HT-29/B6 wachsen polygonal, sodass auch drei benachbarte epitheliale Zellen an einem Punkt miteinander Kontakt bekommen können. In diesem Fall konnte ein weiteres transmembranäres Tight junction Protein identifiziert werden (Ikenouchi et al., 2005). Sie nannten es Tricellulin. Man unterscheidet tricellär und bicellulär lokalisiertes Tricellulin. Für die epitheliale Integrität trägt es eine entscheidene Bedeutung, da das Fehlen von Tricellulin durch RNA-Interference zu einer beschädigten epithelialen Barriere führt.



Abb. 3: Gefrierbruchbild einer Kapillare und ihrer interzellulären (zwischen Endothelzellen) Tight junctions

In dieser Aufnahme erkennt man punktförmige Membranproteine und längliche Strukturen, welche die Kontaktpunkte benachbarter Zellen darstellen.

Entnommen aus: P. Köpf-Maier, H.-J. Merker: Atlas der Elektronenmikroskopie, Ueberreuter Wissenschaft, Wien, Berlin, 1989

Occludin ist über seinen langen C-Terminus mit den Proteinen ZO-1, ZO-2 und ZO-3 und dem F-Aktin assoziiert (Haskin et al., 1998; Furuse et al., 1994). Es bilden sich zwei Proteinkomplexe, ZO-1 mit ZO-2 und ZO-1 mit ZO-3, die jeweils mit dem C-Terminus des Occludin und mit F-Aktin interagieren (Abb. 5) (Wittchen et al., 1999). Durch die Assoziation des Occludin an ZO-1, kommt es auch nach Verlust der Zell-Zellverbindung und bei Fehlen der Tight junction zu einem Anhäufen von Occludin, was eine Grundlage für die Wiederherstellung von Zellverbindungen ist. Die zweite extrazelluläre Schleife des Occludin stellte sich als Voraussetzung für eine regelrechte Anordnung und folglich einer Herstellung einer suffizienten Tight junction heraus (Medina et al., 2000).

Durch Beeinflussung der Signaltransduktion verändern Aktinfilamente in Kontaktknotenpunkten ihre Assoziation und regulieren die parazelluläre Durchlässigkeit (Fanning, 1999; Anderson und Van Itallie, 1995).

Folgende Tight-junction-assoziierten Proteine haben auf diesen Vorgang Einfluß:

ZO-1 (Zonula occludens-1), ein 225 kD großes Polypeptid konnte durch Stevenson et al. (1986/88) identifiziert werden. Gumbiner et al. (1991) konnten ZO-2, ein 160 kD großes Polypeptid, das an ZO-1 bindet nachweisen. ZO-3 ist ein weiteres Tight junction assoziiertes Protein, es interagiert mit ZO-1 und Occludin, aber nicht mit ZO-2 (Haskin et al., 1998). Als weitere Tight-junction-Komponente hat Cingulin durch Kontakt zu ZO-1, ZO-2, ZO-3 und Myosin Anteil an der Dynamik der Struktur (Cordenonsi et al., 1999).

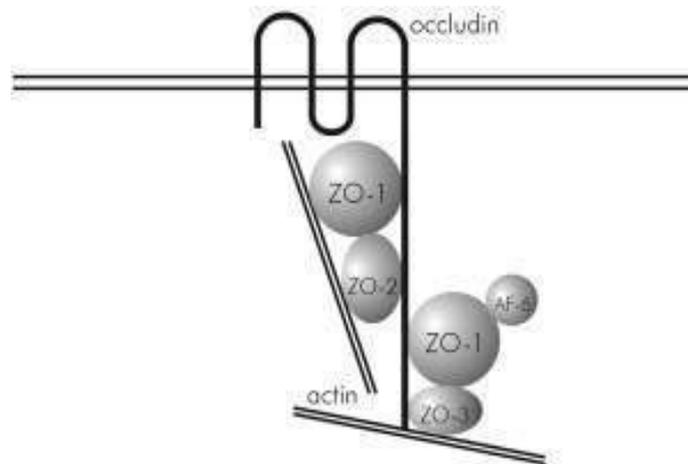


Abb. 4: Proteine der Tight junction und ihre Beziehung zum Zytoskelett

Die Darstellung zeigt das intramembranär gelegene Occludin, dessen innerzellulärer Ausläufer an die Proteine ZO-1, ZO-2, ZO-3 der Tight junction bindet. Diese Proteine und Occludin sind an das Aktinzytoskelett assoziiert, wobei jeweils ZO-1 und ZO-2 und ZO-1 und ZO-3 einen Bindungskomplex an das Zytoskelett bilden. (Bildmaterial aus: Wittchen et al., 1999)

Zonula adhaerens und E-Cadherine:

Unter Einbeziehung des Zytoskelettes wird zwischen benachbarten Zellen eine mechanisch stabile Verbindung geschaffen. Sind bei diesen Zell-Zellverbindungen außerdem Aktinfilamente beteiligt, spricht man von Zonula adhaerens.

An Zonula adhaerens sind die integralen Membranproteine Cadherine beteiligt. Die Familie der Cadherine verfügt über eine große N-terminale extrazelluläre Domäne.

Cadherine, die zwischen epithelialen Zellen auftreten heißen E-Cadherin.

Eine zentrale Funktion der Cadherine ist die Aufrechterhaltung der calciumabhängigen Zelladhäsion. Bei physiologischen Calciumkonzentrationsverhältnissen, entlang der epithelialen Barriere, kommt es zur Bewegung des Tight-junction-Proteins ZO-1 durch das Zytosol zur lateralen Zelloberfläche, sodass sich E-Cadherin-Plaques bilden können. Hier konnte eine Assoziation mit α -, β und γ -Cateninen, aber nicht mit E-Cadherin nachgewiesen werden. Die Bindung von ZO-1 an Catenin behindert den Aufbau von Tight-junctions (Rajasekaran et al., 1996).

Der Zellkontakt kommt wie folgt zustande: Es interagieren je zwei Cadherine benachbarter Zellen. Es bildet sich dabei eine homophile Bindung (Abb. 4) aus. Am Zellmodell konnte mit rekombinantem E-Cadherin von Maus und Ratte nachgewiesen werden, dass die extrazelluläre Domäne starke assoziierende Kräfte gegenüber weiteren E-Cadherinen aufweist. Dadurch entsteht eine starke ringartige Formation. Diese kombinierten Paare interagieren wiederum mit gepaarten Cadherinen benachbarter Zellen. Das Zusammenlagern von C-Termini vermittelt die E-Cadherin Zell-Zell-Adhäsion (Tomschy et al., 1996).

Der C-Terminus der Cadherine befindet sich intrazellulär, er ist für die Verknüpfung mit den Aktinfilamenten des Zytoskelettes verantwortlich. Diese Bindung wird über eine weitere Familie von Proteinen vermittelt, die Catenine.

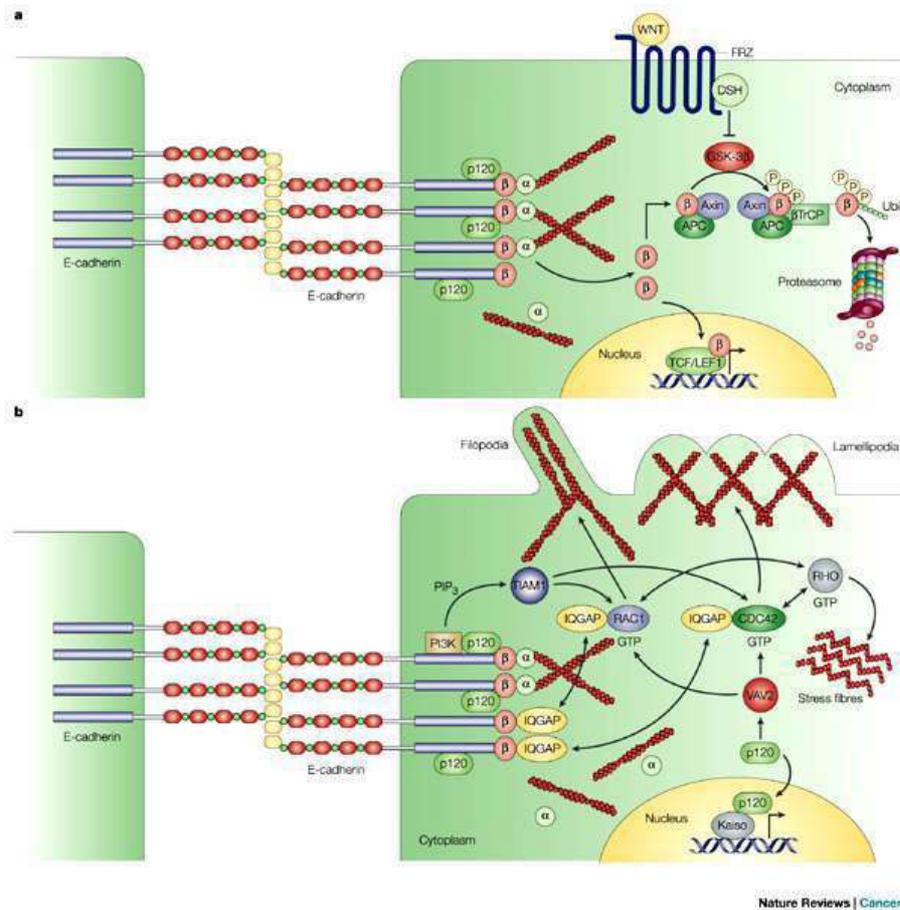


Abb. 5: Schematische Darstellung einer Zell-Zellverbindung unter der Beteiligung von E-Cadherinen und seinen assoziierten Proteinen

Diese Darstellung zeigt wie Signaltransduktionswege über die E-Cadherine vermittelt werden können. Das Aktinzytoskelett hat über die α - und β -Catenine Kontakt zu den intrazellulären Bestandteilen der E-Cadherine. Die homophilen extrazellulären Domänen benachbarter epithelialer Zellen interagieren miteinander.

http://www.nature.com/nrc/journal/v4/n2/fig_tab/nrc1276_F3.html am 3.03.2011

Cadherin/Catenin und Catenin-Komplexe spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von Funktion und Struktur von epithelialen Zellverbänden (Näthke et al., 1994).

1.2 Diarrhoe

Da die HIV-Enteropathie durch Diarrhoen, Gewichtsverlust und das Wasting-Syndrom gekennzeichnet ist und die veränderten Zytokinmuster bei HIV-Infektion die epitheliale, gastrointestinale Barriere angreifen, möchte ich im Folgenden auf

verschiedene Diarrhoemechanismen eingehen. Ein Ansatz der vorliegenden Arbeit ist den entsprechenden Mechanismus der HIV-Enteropathie zu verifizieren.

1.2.1 Diarrhoemechanismen

Die einzelnen Diarrhoemechanismen werden gemäß ihrer Pathogenese wie folgt klassifiziert:

Tab. 2: Die wesentlichen Diarrhoemechanismen

Art der Diarrhoe	Mechanismus
resorptionsbedingte Formen:	
Osmotische Diarrhoe	eingeschränkte bzw. aufgehobene Resorptions- und Digestionsfähigkeit durch nichtresorbierbare Solute im Lumen
Malabsorptive Diarrhoe	Fehlen resorptiver Transportmechanismen, resorptive Transportfläche vermindert
Diarrhoe bei Motilitätsstörungen	Hypermotilität, verkürzte Kontaktzeit bei den Erkrankungen: Hyperthyreose, Karzinoid oder Gastrinom kommt es auf dem Boden einer hormonellen Hypersekretion zu übersteigter propulsiver Aktivität; Hypomotilität: Vorbeifluß an einem Bolus, bakterielle Überwucherung
sekretionsbedingte Formen:	
sekretorische Diarrhoe	pathologisch aktiviertes Sezernieren von Ionen (z.B. bakteriell, hormonell oder durch Gallensäuren bedingt)
Diarrhoe bei Leckflux	entzündliche Diarrhoe infolge von Mukosaschäden; es gehen Solute, die Wasser osmotisch wirksam binden, verloren Beispiele: Salmonellen-, Shigelleninfektion, chron. entzündliche Darmerkrankungen

Der zutreffende Diarrhöemechanismus der HIV-Enteropathie ist nicht vollständig geklärt. Beispielsweise zeigten Gillin et al. (1985), dass untersuchte HIV-Patienten eine verminderte Glucoseresorption aufwiesen (Malabsorption). In vielen Biopsien wurde eine veränderte Villus- und Kryptenbeschaffenheit (hyperregeneratorische mukosale Transformation) aufgefunden (Ullrich et al., 1989; Zeitz et al., 1990; Greenson et al., 1991).

1.2.2 HIV und sein Einfluss auf die intestinale Barriere

Das HI-Virus konnte erstmals 1983 aus einer Lymphknotenbiopsie eines Patienten mit Verdacht auf die Diagnose AIDS isoliert werden (Barre-Sinoussi et al., 1983).

Zuvor waren nur die beiden humanpathogenen Retroviren: HTLV 1 und 2 (Human-T-cell Leukemia (oder lymphotropic) Virus) bekannt (Kalyanaraman et al., 1982). Durch die Infektion von T-Lymphozyten werden maligne Erkrankungen oder schwere chronische Immundefekte hervorgerufen.

Beim Menschen unterscheidet man die Subtypen: HIV-1 und HIV-2, wobei HIV-1 weltweit nachgewiesen werden konnte, HIV-2 aber vor allem in Westafrika vorkommt (Gallo et al., 1983, Clavel et al., 1986).

Das HI-Virus zählt zu der Familie der "Retroviridae", die betreffende Untergruppe heißt: Lentiviren. Die Bezeichnung Retroviren entstammt dem Vermehrungszyklus der betroffenen Viren. Sie bedeutet, dass entsprechende Viren über eine "Reverse Transcriptase" verfügen. Die Rolle dieses Enzyms wird in folgender Abbildung deutlich:

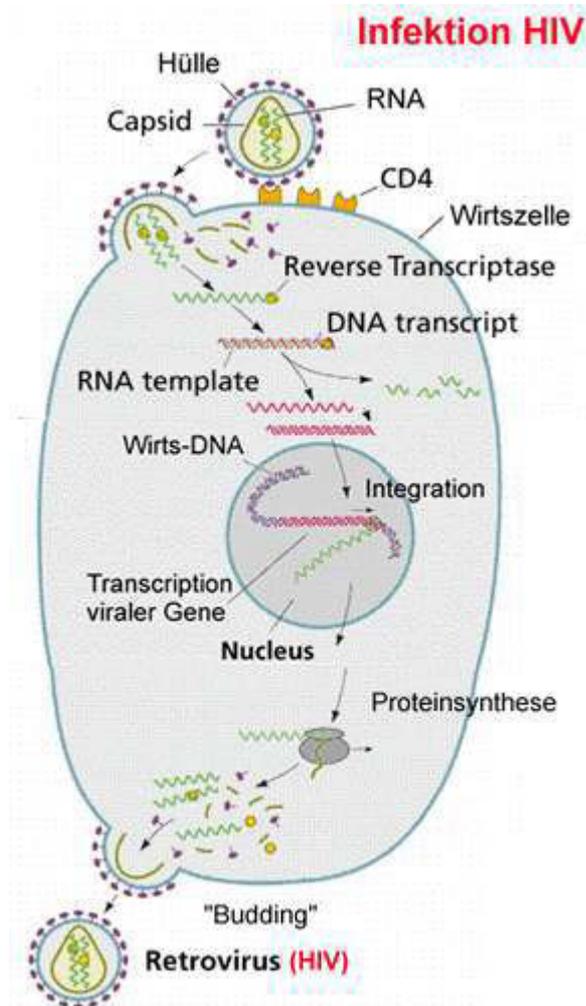


Abb. 6: Schematische Darstellung des Replikationszyklus des HI-Virus mithilfe der Reversen Transkriptase

Das HI-Virus bindet an die T4 Rezeptoren von CD_4^+ -Zellen, daraufhin verschmilzt seine Hülle mit der Membran der Zielzelle. Sein virales Genom, die zwei ssRNA-Stücke (beide Pluspolarität), wird frei. Mittels der Reversen Transkriptase wird es in virale komplementäre DNA (dsDNA) umgeschrieben. So wird es möglich, dass das virale Genom in das Wirtsgenom (ebenfalls DNA im Zellkern) eingebaut werden kann. Wie andere Zellbestandteile auch werden das Virus und seine Proteine nun repliziert. Im Folgenden können sich auf dieser Grundlage "neue" Viren abknospen und weitere CD_4^+ -Zellen infizieren. Nach Replikation des HI-Virus durch die Wirtszelle kommt es zu ihrer Zerstörung, das Virus hat einen zytopathischen Effekt. Entnommen aus: <http://www.zum.de/Faecher/Materialien/beck/12/bs12-57.htm>, am 9.11.2010

Zu den CD₄⁺-Zellen zählen: Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen, Langerhansche Zellen der Haut, Mikroglia (Dalglish et al., 1984 und Klatzmann et al., 1984). Mit dem Einbau des viralen Genoms in das der Zielzellen wird die zellvermittelte Immunität umschifft. Klinisch zeigt sich die Erstmanifestation, die nach 1 - 3 Wochen nach Infektion einstellt, meist stumm oder es besteht ein der "Mononukleose" ähnliches Beschwerdebild mit Fieber, Gefühl der Abgeschlagenheit und Lymphadenopathie. Der oben beschriebene Replikationszyklus macht weiterhin verständlich, daß es Inkubationszeiten (Zeit bis zum Ausbruch des Vollbildes AIDS) von über 10 Jahren gibt, denn durch seinen Einbau in das Wirtsgenom kann es vom infizierten Organismus nicht als Antigen erkannt werden und umgeht auf diesem Weg die zelluläre und die humorale Immunantwort.

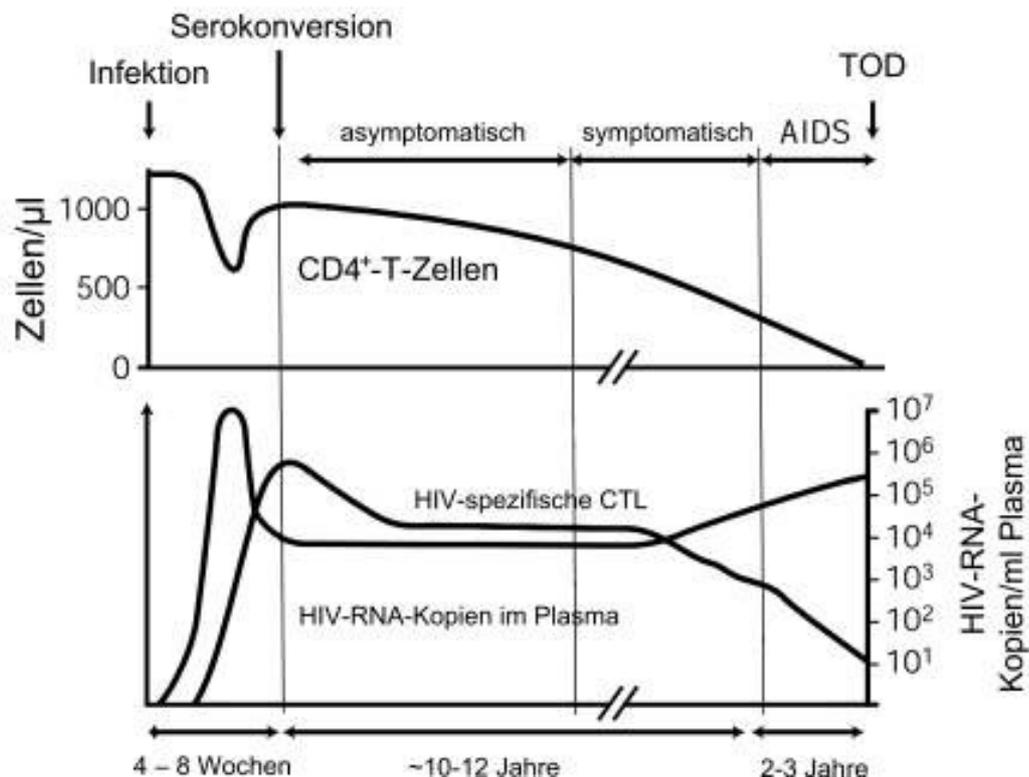


Abb. 7: schematische Darstellung des Krankheitsverlaufes bei HIV-Infektion

Modifiziert nach: Feinberg, 1996

Schon einige Wochen nach der Infektion nimmt die Kurve der CD_4^+ -T-Lymphozyten einen einbrechenden Verlauf. Dieser Effekt erklärt sich durch die zytotoxische Wirkung der CD_8^+ -T-Lymphozyten. Es entwickelt sich ein Missverhältnis zwischen T-Helferzellen (CD_4^+) zu CD_8^+ -Zellen. Im Laufe der Erkrankung wird der Quotient $CD_4^+ : CD_8^+ < 0,7$ (normal: rund 1,7). Die Anzahl an CD_4^+ -Zellen gilt als prognostischer Faktor (Jurriaans et al., 1994). Infizierte CD_4^+ -T-Lymphozyten selbst produzieren Interleukin-2, welches wiederum die Proliferation zytotoxischer T-Lymphozyten anregt. Mit dem Einbruch der Konzentration der CD_4^+ -T-Lymphozyten nimmt die Viruslast, also die Menge an Viren, die sich in einem bestimmten Volumen Blut befinden, zu. Ebenso verhält es sich mit der Konzentration an zytotoxischen-T-Zellen (CTL), denn sie sind für das Lysieren der CD_4^+ -T-Lymphozyten und das Freiwerden des replizierten RNA-Virus verantwortlich.

Wenige Wochen nach Infektion kommt es zur Serokonversion, das heißt, zum ersten Auftreten von Antikörpern und einer positiven Antigen-Antikörper-Reaktion.

Einige Wochen nach Serokonversion und Anstieg der CD_8^+ -T-Lymphozyten stellt sich ein Gleichgewicht der Viruslast ein. Feinberg (1996) teilt den Krankheitsverlauf in mehrere Stadien ein:

I. Während der akuten HIV-Infektion (nach etwa ein bis drei Wochen) entwickeln sich zunächst grippeartige Symptome, wie Lymphadenopathie (Differentialdiagnose: Mononukleose, siehe auch oben), Fieberschüben, Kopf- und Gliederschmerzen, Nachtschweiß und Abgeschlagenheit, Erbrechen und Durchfälle mit darauffolgendem Gewichtsverlust schließen sich an. Dieses erste Stadium klingt nach etwa ein bis zwei Wochen ab. Typisch für diesen ersten Krankheitsabschritt ist, dass bei Verdacht der HIV-Test (noch) negativ ausfällt.

Beim HIV-Test werden mittels ELISA oder Western-Blot-Technik spezifische Antikörper gegen HIV nachgewiesen. Das Virus selbst kann auch mittels PCR nachgewiesen werden. Antikörper sind jedoch erst etwa drei Monate nach Infektion im Serum eines Patienten nachweisbar.

II. In dem darauffolgenden Stadium kommen typische Erkrankungen als Folge einer

geschwächten zellulären Immunabwehr vor: Die Rede ist beispielsweise von bazillärer Angiomatose, Kandidosen, Herpes zoster, Listerose, Entzündungen des kleinen Beckens oder oraler Leukoplakie. Ausserdem zeigen sich hier die ersten HIV-typischen gastrointestinalen Störungen, die zum Wasting-Syndrom führen (siehe Kapitel: 1.2.3. „HIV-assoziierte Enteropathie“).

III. Dieses Stadium ist durch AIDS-definierende Erkrankungen charakterisiert. Es treten opportunistische Infektionen auf, zum Beispiel: Toxoplasmose, oesophageale Kandidiasis, atypische Mykobakteriosen, Salmonellensepsis, CMV- und Herpes simplex-Infektionen, Kryptosporidose, Tuberkulose.

Im späteren Verlauf treten Malignome auf: Karposi-Sarkome und Lymphome des ZNS und es kommt zur AIDS-Enzephalopathie. (Greten, Schettler, 2001).

Therapeutisch steht das HAART-Konzept (hochaktive antiretrovirale Therapie) zur Verfügung. Folgende Substanzklassen werden unter dieser Bezeichnung zusammengefaßt: Nukleosidische und Nukleotidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren, Non-Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren, Protease-Inhibitoren, Fusionsinhibitoren. Es ist üblich, drei Virusreplikationshemmer aus mindestens zwei der oben genannten Wirkstoffklassen zu kombinieren. Die zweite therapeutische Säule stellt die Prävention von opportunistischen Infektionen dar: Hier kommen Antibiotika, Antimykotika und antivirale Medikamente zum Einsatz. Ein Maß für den Erfolg der Therapie sind die Viruslast, die Anzahl der CD₄⁺-Lymphozyten und der klinische Zustand des Patienten.

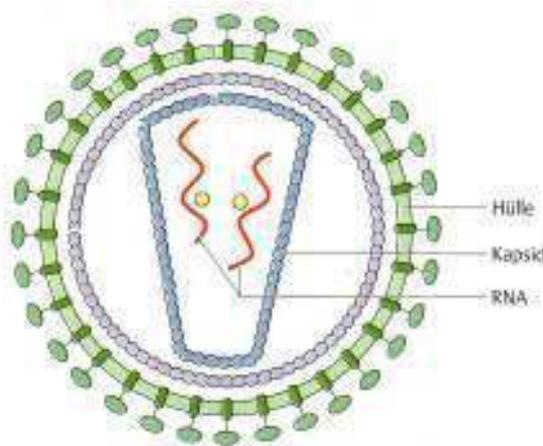


Abb. 8: vereinfachte schematische Darstellung vom Aufbau eines HI-Virus

Die Strukturproteine der Oberfläche entsprechen Glykoproteinen (Gp 120 und Gp 41), sie agieren auch als Rezeptoren. Modifiziert nach: Kayser, Bienz, Eckert, et al., 1998

Die beiden Oberflächenglykoproteine Gp 120 und Gp 41 bewerkstelligen die Bindung an die Zielzellen und vermitteln die Virusaufnahme in den Wirt. Als Zielzellen für Gp 120 fungieren CD_4^+ -Körperzellen, wie T-Lymphozyten, Makrophagen, Langerhanszellen der Haut, dendritische Zellen und Mikrogliazellen des zentralen Nervensystems (Dalglish et al., 1984 und Klatzmann et al., 1984). Die Fusion von HIV-1 mit CD_4^+ -Zellen geschieht unter Mithilfe der Co-faktoren: CC-CKR-5, CKR-3, CKR-2b, welche ursprünglich Chemokinrezeptoren darstellen (Deng et al., 1996, Doranz et al., 1996, Dragic et al., 1996, Feng et al., 1996).

1.2.3 HIV-assoziierte Enteropathie

Der Begriff HIV-Enteropathie wurde erstmalig von Kotler et al. (1984) geprägt: Sie wiesen bei allen untersuchten HIV-Infizierten mit symptomatischer Diarrhoe veränderte jejunale und rektale Schleimhautbezirke wie Villus-Atrophie, Kryptenhyperplasie und eine erhöhte Anzahl intraepithelialer Lymphozyten nach. Rektale Schleimhautabweichungen (12 homosexuelle Männer wurden untersucht) umfassten den intranukleären Virusnachweis, Mastzellinfiltration der Lamina propria und lokale Zelldegeneration auf dem Grund der Krypten.

Im Vergleich zu Gesunden zeigten AIDS-Patienten eine signifikant erhöhte intestinale Permeation, gemessen durch eine erhöhte Laktulose und Rhamnose-Ratio (Ott et al., 1991). Kapembwa et al. (1991) ermittelten eine erhöhte Permeabilität der intestinalen Mukosa von HIV-infizierten Patienten in Abhängigkeit vom Stadium der Erkrankung (unter Verwendung der Zucker: Laktulose und Mannitol). Die veränderte Permeabilität ist mit symptomatischer Diarrhoe bei HIV-Patienten assoziiert.

Stockmann (2000) machte HIV per se für die Beeinträchtigung der intestinalen Barriere bei HIV verantwortlich. Infizierte Immunzellen in der Mukosa sezernieren abhängig vom Stadium der Erkrankung Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IFN- α und IFN- γ), welche die epitheliale Barriere angreifen (gemessen an nativer Duodenalschleimhaut von HIV-Patienten und an der humanen Kolonzelllinie HT-29/B6). Dadurch kommt es zum Zurückfließen von Wasser und Elektrolyten entlang des elektrochemischen Gradienten ins Darmlumen. Solute gehen auf dem parazellulären Weg verloren. Der Pathomechanismus wird in diesem Fall als Leck-Flux-Diarrhoe bezeichnet. Mikroskopisch konnte die Schleimhaut des Darms von Patienten mit nachgewiesener mukosalen HIV-Infektion als Ursache für atrophische, hyporegeneratorische Bezirke und eine gestörte Enterozytenreifung charakterisiert werden (Ullrich et al., 1992).

Das HI-Virus konnte in der intestinalen Mukosa (in Lymphozyten und Makrophagen der Lamina propria) bei allen untersuchten Patienten in verschiedenen klinischen Studien nachgewiesen werden (Nelson et al., 1988; Fox et al., 1989; Ullrich et al., 1989).

Andererseits gab es Studien an Biopsien von AIDS-Patienten mit Diarrhoe, in denen das HI-Virus in der gesamten epithelialen Barriere überhaupt nicht nachzuweisen war (Jarry et al., 1990; Fox et al., 1989).

Bei Patienten, die ebenfalls keine intestinale Infektion mit dem HI-Virus aufwiesen, konnte eine Villus-Atrophie mit hyporegeneratorischen Arealen, eine normale Kryptentiefe und eine herabgesetzte Mitosezellzahl bewiesen werden (Ullrich et al., 1989; Zeitz et al., 1990). Schmitz et al. (2002) machten die proinflammatorischen Zytokine: TNF- α , IL-1 β , IFN- α und IFN- γ für die Entstehung einer Barrierestörung am Darm und die daraus resultierende Leck-Flux-Diarrhoe verantwortlich. TNF- α und IFN-

γ haben einen direkt schädigenden Effekt auf die intestinale Barrierefunktion bei T 84-Zellen bzw. HT-29/B6-Zellen (Madara und Stafford, 1989; Schmitz et al., 1999). Für IL-1 β und TNF- α konnte ein sekretorischer Effekt an humanem, distalem Kolon beobachtet werden (Bode et al., 1998). Von Sydow et al. (1991) und Thea et al. (1996) fanden im Serum von HIV-infizierten Patienten erhöhte Konzentrationen der Zytokine IFN- α und TNF- α , wobei IFN- α mit fortschreitendem Krankheitsstadium ebenfalls anstieg. In der intestinalen Mukosa von HIV 1-positiven Patienten zeigten sich erhöhte Konzentrationen für IFN- γ , TNF- α und IL-1 β (McGowan et al., 2004). Ferner konnten bei in vitro Untersuchungen durch HIV-1-infizierte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) die Produktion der HIV-typischen Zytokine TNF- α und IFN- γ angeregt werden, was eine Förderung der HIV-1 Virusreplikation zur Folge hatte (Vyakarnam et al., 1991). Da Enteritiden zunächst kleine Erosionen und Läsionen entstehen lassen, ergibt sich die Fragestellung der Beeinflussung von HIV-typischen Zytokinen hinsichtlich der Reparatur (Restitution) von Einzelzellläsionen. In der vorliegenden Arbeit wurden nun die Auswirkungen der „HIV-typischen Zytokine“ TNF- α , IFN- α , IFN- γ und IL-1 β auf die epitheliale Barriere vor und nach dem Setzen einer Einzelzellläsion, am Zellmodell HT-29/B6, untersucht.

1.3 Zytokine und Wundheilung

Zytokine (auch Lymphokine) sind eine Funktionsgruppe, die die Immunantwort durch Signalübertragung zwischen verschiedenen Immunzellen modulieren. Alle Faktoren bestehen aus Aminosäuren (100-350). Die meisten Peptide sind glykosiliert (ausser TNF- α und IFN- α) (Schmidt, Thews et al., 2000).

Man unterscheidet folgende 6 Gruppen:

Interleukine,

Interferone,

Tumor-Nekrose-Faktoren,

Wachstumsfaktoren,

Koloniestimulierende Faktoren (CSF),

Chemokine.

1.3.1 Immunregulatorische Prinzipien der Wundheilung

Die Wundheilung unterliegt einer kaskadenartigen Stimulation von immunkompetenten Zellen. Im Zuge ihrer Aktivierung werden Wachstumsfaktoren und Zytokine frei. Immunsuppressive Substanzen können eine regelrechte Wundheilung beeinträchtigen.

Wie Abbildung 9 und 10 verdeutlichen, findet die normale Wundheilung in den Phasen Entzündung, Proliferation und Modulation bzw. Reifung statt.

In der Inflammationsphase:

Bereits 6 Stunden nach einer Verletzung besiedeln die ersten Immunzellen, die Polymorphkernigen Leukozyten (PMN's), die Wunde. Ihre maximale Konzentration am Wirkungsort erreichen sie nach 24 - 48 Stunden. Sie erfüllen vor allem die Funktion der Phagozytose von Bakterien, was insbesondere an der intestinalen Barriere einen protektiven Effekt hat (Ross und Benditt, 1961).

Die ersten Makrophagen erreichen die Wunde nach etwa 48 - 96 Stunden. Sie

erreichen ihre maximale Konzentration nach etwa 3 Tagen nach Verletzung. Etwa einen Tag nach Verletzung besiedeln Fibroblasten die Wunde. Ihre höchste Konzentration erreichen sie nach sechs Tagen. Es folgt die Aktivierung der Lymphozyten, die am siebten Tag nach Wundentstehung ihre maximale Konzentration erreichen. Aktivierte Lymphozyten sezernieren verschiedene Zytokine, wie: IL-1, IFN- γ oder TNF- α .

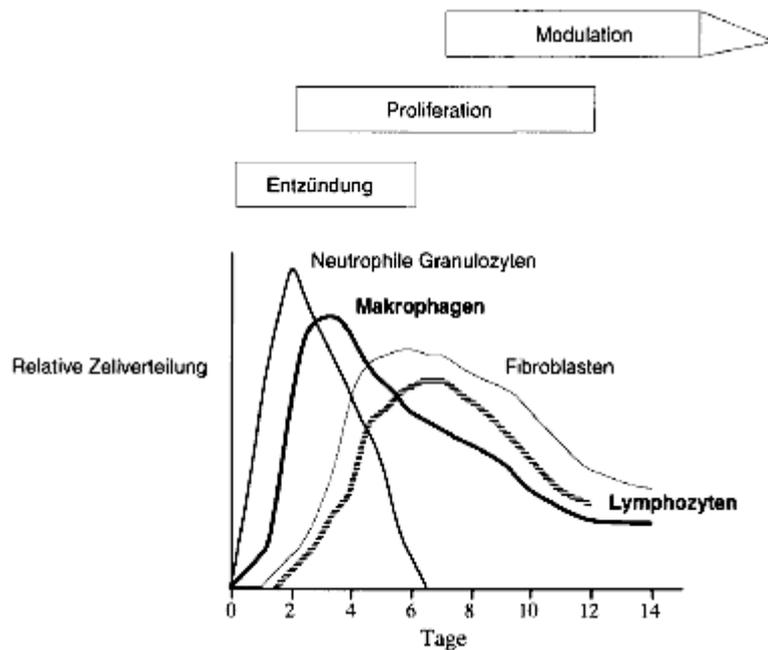


Abb. 9: Immunzellen in verletzten Geweben in Abhängigkeit von der Zeit

Entnommen aus: Der Chirurg, 1999: Schäffer und Becker (Immunregulation der Wundheilung)

Für eine schnelle und suffiziente Wundheilung sind die Existenz bzw. die Aktivierung von Makrophagen und Lymphozyten von großer Bedeutung (Leibovich und Ross, 1975; Barbul et al., 1989a, 1989b). Diese Autoren wiesen nach der Applikation von monoklonalen Antimakrophagen-Antikörpern eine Hemmung der Wundheilung von Hautwunden nach.

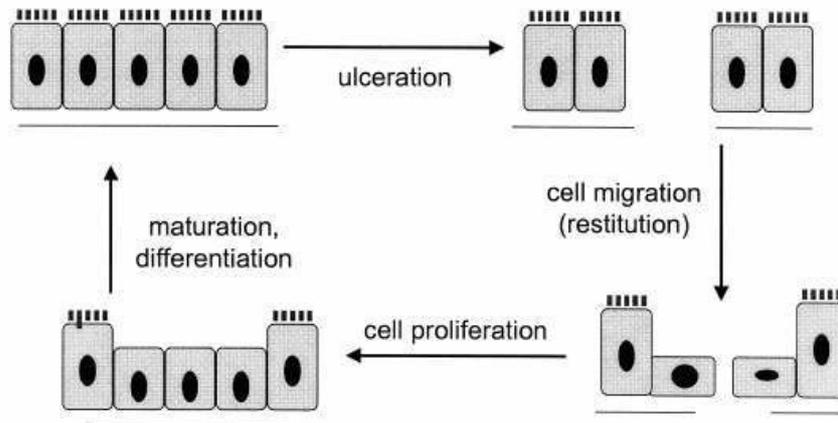


Abb. 10: Schematische Darstellung der epithelialen (oberflächlichen) Wundheilung

Die Darstellung zeigt vereinfacht die oberflächliche Wundheilung am Dünndarm. Nach der Entstehung einer epithelialen Verletzung beginnen benachbarte Zellen in die entstandene Lücke zu migrieren, indem sie sich pseudopodienartig in den epithelialen Defekt schieben. Man spricht von epithelialer Restitution. In einem zweiten Schritt proliferieren die eingewanderten Zellen. Als letztes entsteht durch Reifung und Differenzierung wieder ein intaktes, seine Funktionen erfüllendes, Epithel. Entnommen aus: Dignass (2001)

1.3.2 TNF- α

TNF- α ist ein Protein, das in manchen Tumoren hämorrhagische Nekrose herbeiführen kann, jedoch in normalem Gewebe keinerlei beeinträchtigende Wirkung zeigen muss. In vitro ließ sich eine zytostatische Wirkung auf Tumorzellen nachweisen (Wang et al., 1985).

TNF- α wird von Makrophagen und Lymphozyten gebildet. Dieses Zytokin aktiviert Makrophagen, neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen. TNF- α stimuliert dosisabhängig (10 - 500 ng/ml) die Fibroblastenproliferation und hemmt gleichzeitig die Kollagensynthese (Thornton et al., 1990). In Konzentrationen von > 500 ng/ml verursacht es das Absterben von Fibroblasten. TNF- α wirkt synergistisch mit IFN- α (Darzynkiewicz et al., 1984). Es induziert das Sezernieren von IL-1 (Dinarello et al., 1986).

Bei Tumorpatienten konnte beobachtet werden, dass eine starke Zunahme des Proteins zu Abmagerung und Kräfteverfall (Kachexie) führt. TNF- α ist dem Protein

Kachektin identisch, sodass bei Behandlung mit TNF- α Störungen des Fettstoffwechsels auftreten können (Beutler et al., 1985).

1.3.3 IL-1 β

Interleukin 1- β wird von Makrophagen und B-Lymphozyten gebildet. Es kann fast alle Leukozytenarten stimulieren, es steigert die Endotheldurchlässigkeit und führt zur Leukozytenadhäsion am Endothel. IL-1 ist an der Generierung von T-Helferzellen beteiligt. Es wirkt als Mediator für alle T-Zell-vermittelten Immunreaktionen.

Die Kombination einer Antigenexposition und das Signal von IL-1 führen zu einer Lymphozytenproliferation. Seine frühere Bezeichnung lautet daher auch Lymphozyten-aktivierender Faktor (LAF).

1.3.4 IFN- α

IFN- α wird von virusbefallenen Leukozyten produziert. Es hat eine antivirale Wirkung, sodass es umliegende Zellen vor Infektionen schützt.

Es wird therapeutisch bei vielen Erkrankungen eingesetzt: z.B. bei der Haarzelleukämie, es ist aber auch bei den viral erworbenen Hepatitiden: B, C und D wirksam.

1.3.5 IFN- γ

IFN- γ ist ein proinflammatorisches Zytokin. Es kann von aktivierten T-Zellen und natürlichen Killerzellen produziert werden. Eine maßgebliche Funktion ist die Förderung der Antigenpräsentation durch Makrophagen. Interferone sind antivirale Glykoproteine. Sie stören die Virusreplikation von infizierten Zellen, indem sie die Transkription der viralen DNA in mRNA behindern. IFN- γ aktiviert außerdem eine Endonuklease, welche den Abbau der mRNA auslöst. Es aktiviert Makrophagen, ist aber gleichzeitig in der Lage die Fibroblastenproliferation und die Kollagensynthese (für eine suffiziente Wundheilung) zu hemmen (Duncan und Berman, 1985).

Einleitung

Die folgende Tabelle demonstriert eine Auswahl an Wachstumsfaktoren und Zytokinen, deren Einflußnahme auf den Verschuß epithelialer Lecks durch verschiedene Mechanismen untersucht wurde.

Tab. 3: unterschiedliche Wachstumsfaktoren und Zytokine und deren Effekt auf die epitheliale Defektreparatur

Substanz	Effekt	Quelle
Wachstumsfaktoren		
HGF/SF	Fördert Migration (auch einige Zellreihen von Wunde entfernt) und Proliferation	Nusrat et al., 1994 Watanabe et al., 1994 Yasunga et al., 1996
EGF/TGF- α /IGF-1	Migration, Direkte Regulation der Proliferation von Fundusmukosazellen, Migrationssteigerung	Kato et al., 1999 Chen et al., 1991 Dignass und Podolsky, 1993
TGF- β	Kein Einfluß auf die Migration (an Magenschleimhautzellen COM-Zellen), Migrationsstimulierung (IEC-6-Zellen) hemmt T-Makrophagen-aktivierung, hemmt Endothelzellproliferation, aktiviert neutr. Granulozyten, stimuliert Fibroblastenproliferation, stimuliert Kollagensynthese	Kato et al., 1999 Ciacci et al., 1993 Schäffer und Becker, 1999
β -FGF	Migration, Proliferation	Kato et al., 1999 Paimela et al., 1993
PDGF	Kein Effekt auf die Zellmigration, verbesserte Wundheilung durch Migrationsstimulation (in CEC) pos. Effekt auf Wundheilung durch Chemotaxis von Neutrophilen, Makrophagen, & Fibroblasten	Dignass und Podolsky, 1993 Kamiyama et al., 1998 Schäffer und Becker, 1999
Zytokine		
IL-1- β	Migration, Proliferation, stim. Makrophagen und Fibroblastenproliferation, Chemotaxis von Leukozyten	Kato et al., 1999 Dignass und Podolsky, 1993 Yasunga et al., 1996 Varilek et al., 1994 Schäffer und Becker, 1999
IL-4	Wachstumshemmung	Moriskari et al., 1992

IL-6	Kein Effekt auf die Zellmigration	Dignass und Podolsky, 1993
TNF- β	Pos. Effekt auf Wundheilung durch Stimulation der Fibroblastenproliferation	Schäffer und Becker, 1999
IFN- γ /	Stimulation d. Zellmigration Stimulation von Makropagen und Fibroblastenproliferation, hemmt Endithelzell und Fibroblastenproliferation	Dignass und Podolsky, 1993 Schäffer und Becker, 1999
TNF- α	Kein Effekt auf die Zellmigration, kein Effekt auf die Restitution (HT-29/B6, KdM) hemmt Endothelzellprolieration und Kollagensynthese, stim. Neutrophile, Makrophagen und Fibroblastenproliferation	Dignass und Podolsky, 1993 Florian, 2002 Schäffer und Becker, 1999

1.4 Zytokine und Barriere bei der HIV-Enteropathie

Schmitz et al. (2000) infizierten Immunzellen mit HIV-Stämmen und quantifizierten anschließend die veränderte Produktion an Zytokinen. Es wurde ein Anstieg der Gewebsmediatoren TNF- α , IL-1 β , IFN- α und IFN- γ , sowie ein Abfall des transepithelialen Widerstandes am Kolonzellklon HT-29/B6 gemessen. Damit wurde bewiesen, dass oben genannte Zytokine die epitheliale Barrierefunktion verändern. Der Haupteffekt wurde TNF- α zugewiesen, welches einen Leckflux als Ursache der Diarrhoe verursacht.

Bendfeldt (2000) wies erstmals den apoptoseinduzierenden Effekt und die steigernde Wirkung auf den Leitwert von TNF- α an dem Monolayer HT-29/B6 nach.

Der Beweis für den direkten Angriff eines intestinalen, humanen Monolayers durch IFN- γ gelang Madara und Stafford, 1989. Nach 72-stündiger Inkubation mit IFN- γ (10-1000 U/ml) von T84-Zellen (humane intestinale epitheliale Zelllinie) konnte ein Abfall des transepithelialen Widerstands als Maß für einen Barriereverlust beobachtet werden.

Am humanen distalen Kolon zeigte IL-1 β einen erhöhten Kurzschlußstrom in der Ussingtechnik, welcher auf den indirekten barriereschädigenden Effekt der elektrogenen Bikarbonatsekretion des Zytokins zurückzuführen ist. Eine additive Wirkung konnte für TNF- α gezeigt werden (Bode et al., 1998).

Anhand von humanen, distalen Kolonbiopsieproben konnte nach der Inkubation mit TNF- α ein Anstieg von PGE-₂ (von subepithelialen Zellen produziert) untersucht werden. Über Prostaglandin E-₂ vermittelt bewirkt TNF- α eine Cl⁻ und K⁺-Sekretion. Somit wurde der Ansatz der sekretorischen Diarrhoe als Ursache der intestinalen Beschwerden von HIV-Kranken und Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung dargelegt (Schmitz et al., 1996, Chang et al., 1990).

1.5 Conductance scanning

1.5.1 Einzelzell-Läsionen und ihr Effekt auf die gastrointestinale Mukosa

Die intestinale Mukosa steht in kontinuierlichem Kontakt mit Antigenen, die durch die Nahrung aufgenommen werden. Der hohe Zellumsatz der Darmschleimhaut fördert das Absondern von Enterozyten, die durch Toxine angegriffen wurden (Kraehenbuhl et al., 1997).

Die Beschädigung der epithelialen Darmzellintegrität führt erwiesenermaßen zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder zu Darminfektionen, sodass die epitheliale Funktion bei großem regenerativen Potential schnell wiederhergestellt wird (Dignass et al., 2001). Gitter et al. (2001) wiesen auf eine stark erhöhte Leitfähigkeit bei ulcerierten Erosionen (Colitis ulcerosa) hin. Ein weiterer „Abwehrmechanismus“ der intestinalen Inflammation und Infektion besteht in der Restitution von oberflächlichen, epithelialen Defekten (Feil et al., 1989a). Restitution der kleinen Läsionen wird durch das Einwandern benachbarter noch unversehrter Zellen erlangt (Migration). Bei oberflächlichen Schleimhautverletzungen des Magen(-Darmtrakts) bedarf es einer schnellen Restitution, da dieser Bereich ständig unter dem Einfluß von Nahrungsmitteln steht (Silen und Ito, 1985). Für einen vollständigen Verschluss einer Läsion im Duodenum von Kaninchen konnte gezeigt werden, dass für diesen Prozess

mindestens sechzig Minuten und bis zu sieben Stunden nötig sind (Feil et al., 1989b). Die Untersuchung der Einflussnahme von Zytokinen auf die epitheliale Restitution konnte die zentrale Bedeutung von TGF- β herausstellen (Dignass und Podolsky, 1993). Es konnte gezeigt werden, dass restitutionsfördernde Zytokine wie TGF- α , EGF, IL-1 α und IFN- γ einen Anstieg des bioaktiven Peptids TGF- β in lädierten IEC-6-Zellen hervorrufen.

Hudspeth (1975, 1982) konnte anhand einer Voltage-scanning Messmethode an dem *Necturus* Gallenblasenepithel die Restitution einer Einzelzellläsion (angrenzende Zellen migrieren und flachen ab) innerhalb von 15 - 30 Minuten demonstrieren. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass sich Tight junctions innerhalb von 15 Minuten neu bilden können und so das ursprüngliche Zellmuster nach Einzelzellläsion wiederherstellen.

1.5.2 Der „purse string -Mechanismus“

Der „purse string“ – Mechanismus bedeutet soviel wie „einen Beutel mit einer Schnur zusammenzuziehen“.

Es ist ein zentraler Vorgang bei der Reparatur von epithelialen Defekten. Diese Definition wurde im Zusammenhang mit epithelialen Wunden erstmals durch Bauer, Parks und Hudson (1984) konstatiert. Sie teilten den purse string Mechanismus in eine kontraktile frühe Phase der Epidermis und eine spätere der Dermis ein. Der Begriff wurde weiterhin durch Martin und Lewis (1992) geprägt. Sie beobachteten die Reparatur von embryonalen Hautwunden, die sich schnell verschlossen und im Gegensatz zu verletzten adulten Zellen keine Lamellipodien (Fortläufer der Zellen, die der Wunde benachbart sind, zum Verschluss des Defekts) bildeten. Anstattdessen konnte gezeigt werden, dass sich Aktinfilamente organisieren und sich ringartig um die Wunde formieren, um im Anschluss zu kontrahieren und auf diese Weise, wie durch den Zug an einer Schnur eines Beutels, die Läsion verschließen. Auch am Monolayer der Zelllinie Caco-2BBE wurde eine neue Zytoskelettstruktur am Rand der Wunde nachgewiesen, der purse string Effekt wird hier ebenfalls als Bewegung

benachbarter Zellen in die Wunde verstanden, jedoch auch zur Aufrechterhaltung der Polarität von migrierenden Zellen (Bement et al., 1993). Jacinto et al. (2001) demonstrierten und beschrieben die Reparatur von epithelialen Wunden ebenfalls an der Zelllinie Caco-2BBE. Sie zeigten die Reparatur von epithelialen Läsionen durch eine Kombination aus den in eine Wunde hineinziehenden Lamellipodien und die Verkleinerung des Defektes durch den purse string-Mechanismus.

McCluskey et al. (1993) zeigten durch das Setzen einer größeren epithelialen Verletzung an embryonalen Mauszellen die Reparatur innerhalb von 24 Stunden.

Eine Dokumentation von adulten Zellen (in vitro) hinsichtlich des purse string Mechanismus gelang Heath (1996). Danjo und Gipson (1998) konnten einen entsprechenden Nachweis anhand von adulten Zellen der Hornhaut von Mäusen erbringen. Dabei wurden intrazelluläre Signalkaskaden zur Bewegung des Zytoskelettes identifiziert. Florian (2002) zeigte eine signifikante Hemmung des epithelialen Verschlusses von Wunden durch die Inkubation mit Cytochalasin D (Inhibitor der Aktinpolymerisierung). Eine beinahe komplette Hemmung der Restitution konnte auch durch ML-7 (einem Inhibitor der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase) erzielt werden. Beide Untersuchungen gelten für die Kolonepithelzelllinie HT-29/B6.

Für die vorliegende Arbeit ergab sich daraus die Fragestellung, ob bei der Restitution von Einzelzellläsionen an HT-29/B6-Zellen der purse string-Mechanismus maßgeblich ist.

1.6 Zielsetzung

Eine wichtige Eigenschaft des menschlichen Dünndarmepithels ist seine Charakterisierung durch einen hohen Turnover. Andauernd stattfindende Apoptosen (physiologischerweise) und die Invasion von Noxen und Karzinogenen (pathophysiologische Effekte) hinterlassen (Einzel-)Zellläsionen. Bei der HIV-Enteropathie ist das mukosale Dünndarmepithel mit dem Virus infiziert und führt zur Hemmung der Enterozytenreifung und entsprechend zu hyporegeneratorischen Prozessen in der Darmschleimhaut (Ullrich, 1992). Das Setzen einer Einzelzellläsion an einem Monolayer einer Kolonzelllinie ahmt diesen Prozess nach.

Der Gastrointestinaltrakt kann als Eintrittspforte für das HI-Virus dienen. Von entscheidender Bedeutung für die Erhaltung eines gesunden Organismus ist die Restitution und die Geschwindigkeit der Behebung des Defekts. Die Veränderung von vorherrschenden Zytokinmustern zeigt eine beeinträchtigende Wirkung auf die intestinale Barriere (siehe Kap.1.2.2). Zytokine können Mikrofilamente und Bestandteile der Tight junctions zerstören (Bentzel et al., 1976). Somit wird auch der purse string Mechanismus unter Zytokinbehandlung gestört. Schmitz (2002) zeigte den Angriff von HIV-typischen Zytokinen (TNF- α , IL-1 β , IFN- α und IFN- γ) auf die epitheliale Barriere anhand des Monolayers HT-29/B6.

Durch die vorliegende Arbeit wurde nun erstmals die Restitution einer Einzelzellläsion unter HIV-typischen Zytokinen am Zellmodell HT-29/B6 untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die

- Darstellung der Morphologie einer Einzelzellläsion am etablierten Monolayer der Kolonzelllinie HT-29/B6 unter Kontrollbedingungen und nach vierundzwanzigstündiger Vorinkubation mit HIV-typischen Zytokinen mittels Videomikroskopie und Konfokalmikroskopie.
- Beobachtung und Dokumentation des Verschlusses von Einzelzellläsionen an HT-29/B6 (elektrophysiologischer Beleg für den purse string-Mechanismus)
- Beurteilung der Größe des entstandenen Schadens und der Restitutionsgeschwindigkeit durch wiederholte Messungen der Leitfähigkeit im Zeitraum von 2 bis 16 Minuten nach Setzen der Läsion.
- Untersuchung der einzelnen HIV-typischen Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IFN- α und IFN- γ). Identifikation eines einzelnen Zytokins mit Wirkung auf das Zellmodell hinsichtlich eines möglichen Effekts bzw. eruieren eines möglichen synergistischen Effekts aller aufgeführten Zytokine.

- Schlussfolgerung auf die Verteilung und Neuorganisation der Tight junctions nach Einzelzellläsion und des Verhaltens benachbarter Zellen bei Unterbrechung der epithelialen Integrität durch die Darstellung des integralen Tight junction-Proteins Occludin und des Zonula adherens-Proteins E-Cadherin mittels Immunfluoreszenz am Konfokalmikroskop.

- Beurteilung der Effizienz einer antizytokinen Therapie als Behandlung der HIV-assoziierten Enteropathie.

Ziel der Arbeit war es weiterhin den zutreffenden Mechanismus der Diarrhoe bei HIV-Patienten zu definieren. Die Beschädigung eines epithelialen Verbandes am Darm kann es zur Entwicklung einer Leck-Fluxdiarrhoe kommen. Additiv wirken einige HIV-typische Zytokine (IL-1 β , TNF- α) sekretorisch, sodass Elektrolyte ins Darmlumen sezerniert werden, Wasser binden und zu einer beschleunigten Darmpassage führen (Bode et al., 1998).

2 Material und Methoden

2.1 HT-29/B6-Zellen

Die Zelllinie HT-29/B6 wurde am Institut für Klinische Physiologie der Charité Universitätsmedizin Berlin entwickelt und charakterisiert. Kreusel et al. (1991) kultivierten diesen Klon aus der humanen Kolonzelllinie HT-29. Auf Filtermembranen ausgesät wachsen diese Zellen innerhalb von sieben bzw. acht Tagen zu einem konfluenten Monolayer aus. Zellen dieser Linie weisen eine Polarität auf, denn apikal befindet sich ein Bürstensaum und zwischen den Zellen lassen sich Tight junctions nachweisen (Schmitz et al., 1999). Ausserdem konnte gezeigt werden, dass dieser Kolonzellklon Mukus und Chlorid sezerniert. Dabei war eine Reaktion auf das Choleratoxin zu beobachten (Epple et al., 1997). Die Zelllinie zeigt Eigenschaften einer epithelialen Barriere (Gitter et al., 2000a). Camptothecin (Zytostatikum: Topoisomerase 1 Inhibitor) kann die Provokation von Apoptosen in der Kolonzelllinie bewirken (Bojarski et al., 2001).

2.1.1 Kulturbedingungen

Die HT-29/B6-Zellen wurden in einem Zellkulturmedium (RPMI 1640, Biochrom, KG; Berlin, Deutschland) kultiviert, welches folgende Zusatzstoffe beinhaltet: 10 % fetales Rinderserum, 100 Units/ml Penizillin, 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom), 2% N-Acetyl-L-Alanin-L-Glutamin und 2,0 g/l NaHCO₃ (FG 1215, Biochrom, Berlin, Deutschland). Die Temperatur während der Kultivierung betrug: 37°C, die Zusammensetzung der Atmosphäre: 95% Luft und 5% CO₂. Eine Erneuerung des Kulturmediums fand zweimal in der Woche, die Trypsinierung mit anschließender Aussaat von neuen Zellen alle 10 Tage statt. Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden HT-29/B6-Zellen mit einer Zelldichte von 7×10^5 Zellen/cm² auf Millicell[®]-PCF Zellkulturfiltern (Millipore, Eschborn, Deutschland, Fläche: 0,6 cm², Porendurchmesser: 3 µm) ausgesät. Dieser Filter war insbesondere durch seine Permeabilität und Adhäsion der Zellen für die Experimente der vorliegenden Arbeit

geeignet. Nach Aussaat wurden die Zellen sechs Tage lang bis zur Konfluenz kultiviert. Jeweils drei Zellkulturfilter wurden in eine herkömmliche Kulturschale mit 6 cm Durchmesser (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) gebracht. In jedem einzelnen Filter befanden sich 500 µl (apikal der Zellen) und in den einzelnen Kulturschalen 10 ml (basolateral der Zellen) Kulturmedium. Nach sechs bis sieben Tagen Kultivierung bildete sich ein Monolayer. Am siebten bzw. achten Tag nach Aussaat wurde der transepitheliale Widerstand ermittelt (Siehe Kapitel: 2.2.1). Direkt im Anschluss erfolgte die Zugabe der Zytokine in die Kulturschale auf die basolaterale Seite des Monolayers. Anschließend wurden die Zellen erneut 24 bis 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach diesem Zeitraum konnten die Experimente zur Messung der Einzeldefekt-Restitution erfolgen.

2.1.2 Verwendete Badlösung

Sämtliche Experimente dieser Arbeit wurden mit einer Elektrolytlösung nach Schulzke et al. (1986) durchgeführt:

Tab. 4: Zusammensetzung der Standardelektrolytlösung

Elektrolyt	Konzentration in mmol/l
Na ⁺	140
Cl ⁻	123,8
Kalium	5,4
Calcium	1,2
Magnesium	1,2
HPO ₄	2,4
H ₂ PO ₄	0,6
HCO ₃	21

Durch Zugabe der folgenden Substrate nach Windmüller und Späth (1978) entstand die vollkommene „Badlösung“:

Tab. 5: Substrate, die der Standardelektrolytlösung zugefügt wurden

Substrat	Konzentration in mmol/l
D(+)-Glucose	10
D-β-Hydroxybutyrat	0,5
L-Glutamin	2,5
D(+)-Mannose	10

Nach Einfüllen der Elektrolyt-Substrat-Lösung in die dafür vorgesehenen Glasbehälter wurde sie auf 37°C erwärmt und mit Carbogen begast, sodass danach ein pH von 7,4 messbar war. Mit einem Dampfdruckosmometer (5100B Vapor Pressur Osmometer, Wescor, Inc., Utah, USA) wurde die Osmolalität bestimmt, sie ergab etwa 290 mosmol/l. Folgende Antibiotika verhinderten eine bakterielle Überwucherung an dem „offenen System“: 50 mg/l Piperacillin (Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland) und 4,43 mg/l Imipenem und 4,43 mg/l Cilastatin (Zienam 500, MSD GmbH, Haar, Deutschland).

2.2 Vorexperiment

2.2.1 Prüfung des transepithelialen Widerstandes

Zur Prüfung von Viabilität und Konfluenz der verwendeten Monolayer wurde in ihrer Wachstumsphase und nach Zugabe von Zytokinen vor jedem Experiment in regelmäßigen Abständen der transepitheliale Widerstand (Rt) bestimmt. Durch zwei fixierte Elektroden (STX-2, World Precision Instruments, USA) konnte die Widerstandsermittlung über dem Epithel im Schälchen mit Kulturmedium erfolgen (Eigenbau durch Detlef Sorgenfrei, Institut für Klinische Physiologie). Das Anlegen eines Wechselstroms (+/-10 µA, 21 Hz) erzeugte einen Spannungsabfall über dem Epithel. Dieser wurde über ein Voltmeter gemessen und so verstärkt, dass die

Anzeige des Geräts direkt als Widerstandswert (wahlweise in Ohm oder kOhm) abgelesen werden konnte. Die Absolutwerte des Widerstandes von Badlösung und leerem Filter (Messung ohne kultivierte Zellen) wurden vom Gesamtwert abgezogen. Die Filter und der Badwiderstand wiesen zusammen einen Eigenwiderstand von 131 Ω auf. Um nach Korrektur des Widerstandes weiterhin mit validen Werten arbeiten zu können wurden die Filterposition, die Eintauchtiefe der Elektroden und eine konstante Temperatur (Körpertemperatur) standardisiert.

Zwischen den Einzelmessungen wurden die Zellen im Kulturschrank unter Standardbedingungen aufbewahrt.

2.2.2 Die Ussing-Kammer

Der Entwicklung der Methode des Conductance scanning gingen einige andere elektrophysiologische Methoden und Techniken voraus. Eine wesentliche Grundlage bildet die Ussing-Technik.

Ussing-Technik:

Epithelien verfügen über verschiedene aktive und passive Transportmechanismen. Über diese Transporter werden beim aktiven Transport Solute gegen einen Konzentrations und/oder Druckgradienten verschoben. Passive Transporter können nicht gegen äußere Gradienten arbeiten, sondern entlang bestehender Gradienten Ionenfluss zulassen. Diese physiologischen Verschiebungen unterbricht man mit dem von Ussing und Zerahn (1951) erstmals beschriebenen Kurzschlussstromexperiment. Druck und Konzentrationsgradienten werden über die Zugabe einer Lösung identischer Elektrolytanteile und jeweils gleicher Menge in beiden Schenkeln der Ussing-Kammer eliminiert. Durch den aktiven Transport baut sich über dem Epithel permanent eine transepitheliale Spannung (U_e) auf. Dieser Wert wird registriert. Anschließend wird ein dem aktiven Transport entgegengerichteter Kurzschlussstrom (I_{sc}) appliziert, der über ein Rückkopplungssystem so eingestellt wird, dass die transepitheliale Spannung Null beträgt. Aus der transepithelialen Spannung und dem Kurzschlussstrom kann nach dem Ohmschen Gesetz der transepitheliale Widerstand bzw. die Leitfähigkeit errechnet werden. In einer Ussingkammer kann der

Ionen transport über einem intakten nativen Epithel oder einer Zellkultur durch Bestimmung der Leitfähigkeit verifiziert werden. Ein Nachteil dieser Technik besteht in der Ermittlung eines Summenstromes, sodass man keine Aussage zur Lokalisierung von quantitativen Leitfähigkeitsunterschieden in „heterogenen“ Geweben treffen kann. In Weiterentwicklungen der Ussing-Technik bewiesen Frömter und Diamond (1972) und Cereijido et al. (1980) die funktionelle und morphologische Heterogenität von epithelialen Zellen mit der Methode des Voltage-scanning. Dadurch konnten Schlussleisten von lecken Regionen unterschieden werden. Die Quantifizierung und Unterscheidung der lokalen Leitfähigkeiten am Oberflächenepithel und den Krypten gelangen Köckerling et al., (1993) anhand der Natriumabsorption und Köckerling und Fromm (1993) an Krypten und Oberflächen und Villi von Rattenkolon und Ileum mit einer verbesserten Voltage-scanning Methode. Erstmals gelang es Gitter (1997) trans- und parazelluläre Leitfähigkeiten lokal zu unterscheiden und zu quantifizieren, indem die Ionen transporte an der Hundenierenzelllinie MDCK, Klon 11 mittels Conductance scanning in seiner „höchsten Auflösung“ untersucht wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die mittlere Auflösungsstufe gewählt, womit die einzelnen Leitfähigkeiten von kleinen Regionen, wie Einzelzellläsionen, bestimmt werden konnten. Bendfeldt (2000) nutzte in der oben bereits erwähnten Arbeit unter anderem die mittlere Auflösungsstufe, wodurch es gelang Apoptosen von nicht-apoptotischen Epithelbereichen zu unterscheiden. Gitter et al. (2001) konnten mit der Conductance scanning Methode in niedriger Auflösung die Leitfähigkeitszunahme am Darmepithel bei Colitis ulcerosa nachweisen.

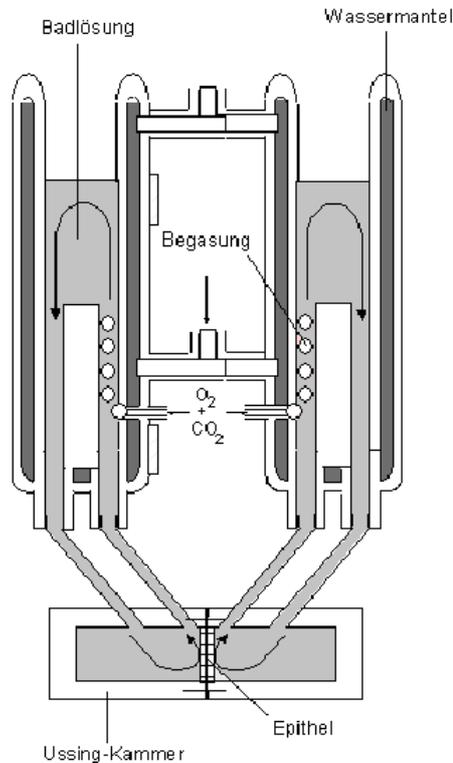
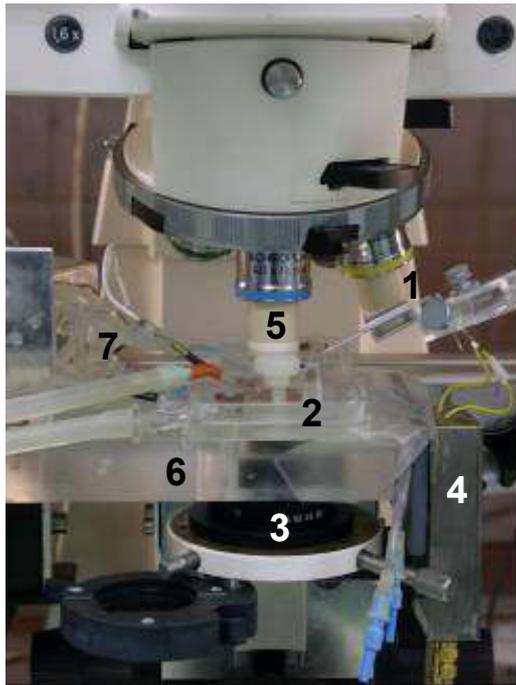


Abb. 11: schematische Darstellung des Versuchsaufbaus einer Ussing-Kammer

Diese Abbildung zeigt einen Ussingversuchsstand mit Wärmetauscher, angepaßter Begasung und Umwälzung. Das Epithel ist zwischen beiden Schenkeln der Ussing-Kammer eingespannt und fungiert als semipermeable Membran. Hier sollen physiologische Bedingungen herrschen, sodass die das Epithel umspülende Badlösung auf konstant 37°C erwärmt wird, indem die Ussing-Kammer über Gummiröhren mit einem Wärmetauscher verbunden wird, der die Schenkel der Kammer umschließt und so für die gewünschte Temperatur sorgt. Die Umwälzung, auch "bubble lift" der Lösung geschieht durch aufsteigende Bläschen (bestehend aus: 95% O_2 und 5% CO_2 (siehe Begasung)). Entnommen aus: C. Barmeyer (2002)

2.3 Conductance scanning



- 1 Mikroelektrodenpaar
- 2 Meßkammer
- 3 Kondensator
- 4 Spannungsfolger
- 5 Wasserimmersionsobjektiv (40x)
- 6 beweglicher Objektisch
- 7 Wärmetauscher

Abb.12: Conductance scanning-Stand

Dargestellt ist ein neu montiertes Elektrodenpaar (1), die Messkammer, welche einer Miniatur-Ussingkammer entspricht (2). Der Kondensator (3) diente der Bündelung des Lichtes, dass das Epithel durchdrang. Der Spannungsfolger (4) entkoppelt den Messkreis vom Datenverarbeitungssystem und gibt damit das Messsignal potentialfrei weiter. (5) zeigt das Wasserimmersionsobjektiv, wodurch es möglich wurde unter lichtmikroskopischer Kontrolle im μm -Bereich über dem Epithel zu arbeiten. (6) Der Objektisch konnte durch einen PC-gesteuerten Mikromanipulator bewegt werden.

2.3.1 Theoretische Grundlagen

Hinsichtlich der Leitfähigkeit sind Epithelien heterogen. Im Dünndarmbereich befinden sich vor allem lecke Epithelien. Ihre Permeabilität wird vorwiegend durch den Ionentransport auf dem parazellulären Weg bestimmt, entsprechend weniger Solute werden auf dem transzellulären Weg transportiert. Wie bereits erwähnt haben auch Apoptosen einen steigernden Einfluss auf die Leitfähigkeit. Florian (2002) untersuchte die Auswirkungen von Einzelzellläsionen auf die Leitfähigkeitsänderung im Vergleich

zum intakten Epithel. Um den Ionentransport auf dem parazellulären Weg elektrophysiologisch quantifizieren zu können, wurde seine Messung (über die Ermittlung der Leitfähigkeit) durch die Entwicklung der Conductance scanning Technik bewerkstelligt (Gitter et al., 1997). Somit gelang die funktionelle Charakterisierung der Tight junction.

2.3.2 Apparente Leitfähigkeit-Leitwert

Transepithelial wurde ein konstanter Wechselstrom („Klemmstrom“) appliziert, der aufgrund des Widerstandes von Epithel, Filter und Badlösung eine bestimmte Stromdichteverteilung zufolge hat. Da eine Proportionalität zwischen Stromdichte und Spannungsabfall über dem Epithel besteht, kann eine Spannungsmessung mittels Mikromesselektroden erfolgen. Die Stromdichteverteilung wurde mit zwei Mikroelektroden mit dem Spitzenabstand Δx in Form des Spannungsabfalls ΔV gemessen. Das Verhältnis von ΔV zu Δx entsprach dem erzeugten elektrischen Feld. Um eine Vergleichbarkeit der erzielten Daten zu erreichen, wurde in einem definierten Abstand von 25 μm von der mukosalen Epithelseite gemessen. Zur Erstellung fuhr der Meßsensor entlang der Horizontalen (x-Achse), parallel zur Oberfläche zu folgenden Messpunkten: $x = 0$ (direkt über der Läsion), $x = 10, 20, 40, 70, 100 \mu\text{m}$. Ausgehend von dem oben bereits angewandten Ohmschen Gesetz :

$$U = R \times I$$

ergibt sich für die Berechnung der apparenten Leitfähigkeit: Transepitheliale Spannung $U = (R_{\text{transepithelial}} - R_{\text{Badlösung und Filter}}) \times I_{\text{transepithelial}}$

$$G_A = \frac{(\Delta V / \Delta x) k}{U} \quad (1)$$

G_A apparente Leitfähigkeit

ΔV Spannungsdifferenz zwischen Mikroelektroden (in μV)

Δx Abstand der Mikroelektroden voneinander

k konstante Leitfähigkeit der Badlösung

U transepitheliale Spannung

Aus statistischen Gründen (Vergleichbarkeit der Daten) wurden aus den Werten der apparenten Leitfähigkeit mithilfe der „Integrationsmethode“ (Gitter, 1997) Leitwerte bestimmt (2). Dafür wurde G_A , als Funktion des Raums, über dem defekten Epithel, und der Zeit integriert. Zunächst wurde der gescannte Bereich integriert (Abb. 13). Von diesem Wert wurde der basale Leitwert (G^{Intakt} (2) gemessen über homogenen, unversehrten Bereichen des Epithels) subtrahiert, sodass der Leitwert der Einzelzellläsionen ermittelt werden konnte.

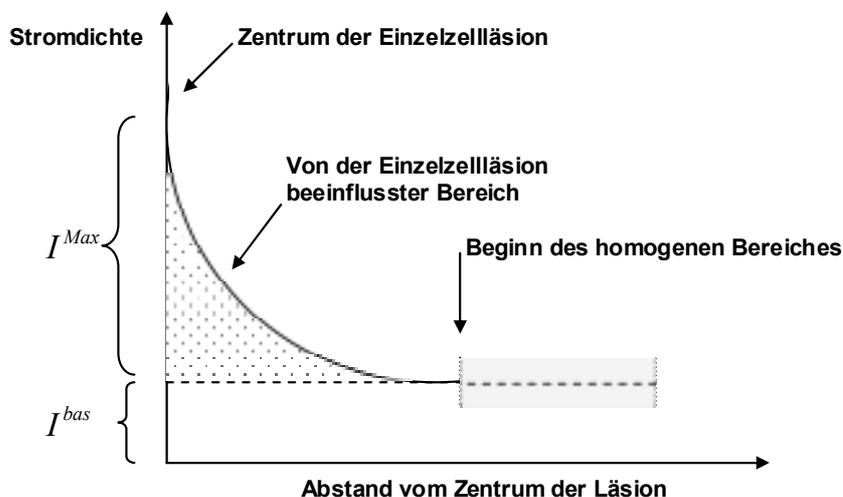


Abb. 12: Schematische Verdeutlichung der Abhängigkeit der Stromdichte vom Abstand zum Zentrum der Läsion zur Ermittlung des Einzelleitwertes

Die lokale Stromdichte nimmt exponentiell mit dem Abstand vom Zentrum einer Einzelzellläsion ab. Durch Integration (siehe Gl. 2) erhält man die Gesamtleitfähigkeit der erzeugten Läsion zu einem bestimmten Zeitpunkt t . Entnommen aus Florian (2002)

Der Leitwert wurde durch die folgende Integrationsformel ermittelt:

$$g(t) = \iint_{y \ x} (G_A(x, y, t) - G^{\text{intact}}) \cdot dx \cdot dy \quad (2)$$

Nach Setzen einer Einzelzellläsion wurden Messungen der Leitwerte in dem Zeitraum von $t = 2$ min bis $t = 16$ min ausgeführt um eine Integration über die Zeit möglich zu machen. Da nach dem Setzen einer Läsion die Manipulationselektrode zunächst aus dem Sichtfeld gezogen werden musste, um anschließend die Meßelektroden in $25 \mu\text{m}$ über dem Schaden zu platzieren, vergingen durchschnittlich 2 min. Der Messwert für $t = 0$ min ($g^{\text{läsion}}$ eines frischen Schadens) wurde durch das Anlegen einer Exponentialfunktion über die bekannten, gemessenen Werte extrapoliert.

Abb. 13 stellt die Stromdichteverteilung (G_A) im Bereich einer Einzelzellläsion dar.

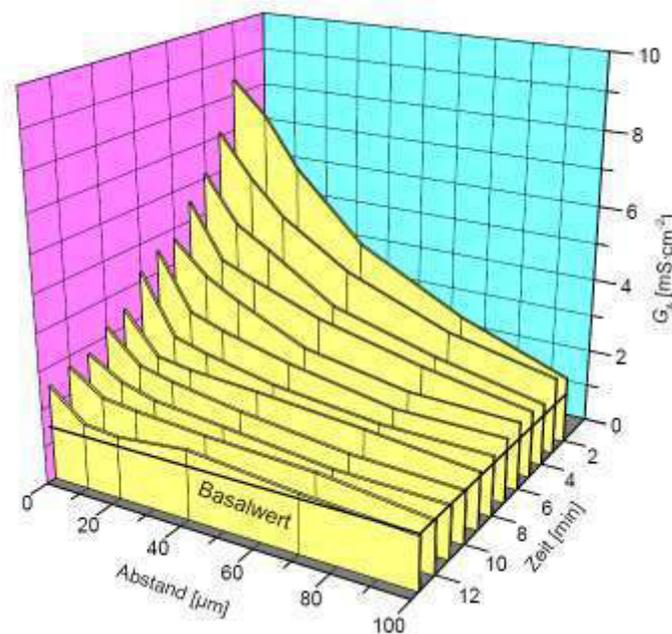


Abb. 13: Apparente Leitfähigkeit (Stromdichteverteilung) als Funktion der Zeit und des Ortes

Dargestellt wird G_A als Funktion der Zeit (Zeitpunkt in min nach Setzen einer Läsion) und des Ortes (Abstand in μm von Läsion), Entnommen aus: Florian, 2002

2.3.3 Versuchsaufbau

Container:

Am achten bzw. neunten Tag nach der Inkubation der Zellen wurde der Filter mit dem Epithel mit einem Skalpell aus der Halterung gelöst. Danach wurde es behutsam in einen speziell dafür konzipierten Container eingelegt, welcher in die Meßkammer eingebracht wurde, die von Badlösung umspült wurde und mit zwei Ringelektroden bestückt war.

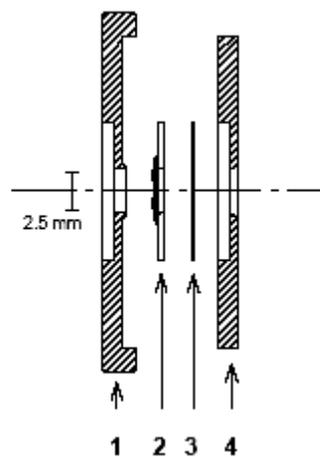


Abb. 14: spezieller Container zum Fixieren des Epithels

Erkennbar sind die zwei scheibenförmigen Teile des Containers, wobei der untere Teil (1) den oberen (2) durch seine kleinen vertikalen Ausläufer teilweise umschließt und so das Epithel (3) zwischen den Teilen befestigt. Der untere Teil ist ausserdem mit Silikon beschichtet, um die Eventualität eines seitlich fließenden Leckstroms zu verhindern. In der Mitte sieht man eine Aussparung von 2,5 mm, die für das ungehinderte Umspülen und Manipulieren des Epithels dient. Entnommen aus: Gitter (2000)

Messkammer:

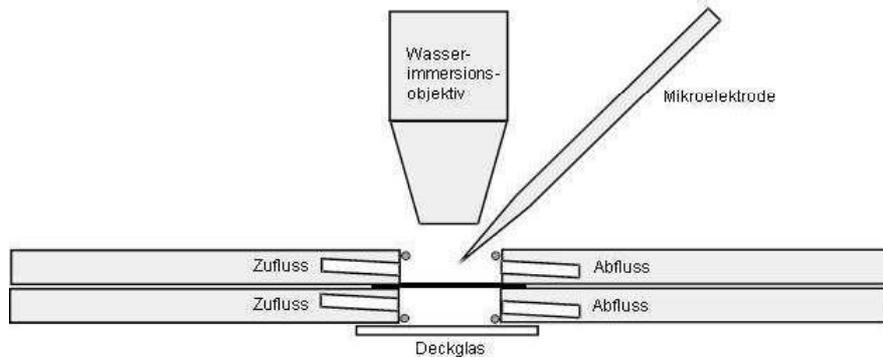


Abb. 15: Schematische Darstellung der Messkammer des Conductance-scanning-Standes

Diese Messkammer zeigt eine modifizierte Vier-Kammer Miniatur-Ussingkammer. Das eingespannte Epithel trennt ein apikales von einem basolateralen Kompartiment der Kammer. Die Zu- und Abflusssysteme garantierten eine ständige Umspülung des Epithels in beiden Kompartimenten, demzufolge konnte am vitalen Monolayer gearbeitet werden. Auf mukosaler und serosaler Kammerhälfte sind Silberdrahtelektroden im Querschnitt eingezeichnet. Über sie wurde Strom in das System eingespeist und somit ein homogenes, transepitheliales, elektrisches Feld erzeugt. Es wurde ein sinusförmiger „Klemmstrom“ ($23,8 \mu\text{A}$, 24 Hz) angelegt. Das Material der Messkammer war Acrylglas. Die obere Kammer war mit einer seitlichen Aussparung versehen, um eine entsprechende Platzreserve für die Messelektroden entstehen zu lassen. Am oberen Bildrand der schematischen Abbildung erkennt man ein Objektiv, dass zu einem Lichtmikroskop gehörte. Dieses Wasserimmersionsobjektiv ermöglichte ein Eintauchen in die das Epithel umspülende Elektrolytlösung. Es war weiterhin durch den geringen oberen Kammerdurchmesser (von 1,6 cm) unentbehrlich. In die Messkammer wurde der bereits oben beschriebene Plexiglascontainer, in den das Epithel hereingelegt wurde, eingespannt.

Perfusion:

Für die Perfusion des Epithels wurden zwei doppelwandige Glasbehälter mit Elektrolytlösung (Tab.: 4 und 5) befüllt. Diese wurden mit Carbogen begast. Beide Glasbehälter wurden durch einen Wärmetauscher auf 37°C vorgewärmt und mittels eines Schlauchsystems mit den beiden Kompartimenten der Messkammer verbunden. Zwischen Glasbehälter und Wärmetauscher befanden sich auf mukosaler und serosaler Seite jeweils Tropfenzähler. Sie fungierten als optische Kontrolle über den kontinuierlichen Durchfluss, wobei eine Rate von 1,5 bis 4 ml/min angestrebt wurde. Das Ziel der gleichmäßigen, kontinuierlichen Perfusion wurde auch durch ein hydrostatisches Gefälle erreicht (Anordnung der Glasbehälter etwa 1 m über der Messkammer). Der zwischengeschaltete Tropfenzähler hatte weiterhin den Zweck der

elektrischen Entkopplung der Lösung der Messkammer von der Lösung der Glasbehälter und dem restlichen Schlauchsystem. Am Tropfenzähler war es möglich entstandene Gasbläschen zu entfernen, die bei vollständigem Durchdringen des Schlauchsystems und Erreichen des Epithels zu einer Verschattung des lichtmikroskopischen Bildes und einer starken Erhöhung des transepithelialen Widerstandes führten. Der Abfluss wurde über höhenverstellbare Überlaufbehälter reguliert. Der Höhenunterschied des Überlaufbehälters der mukosalen Seite von 0,5 cm gegenüber dem der serosalen Seite verhinderte das Ablösen des epithelialen Zellverbandes vom Filter durch leicht erhöhten Druck auf der mukosalen Seite.

Messelektroden und Manipulator:

Die Mikroglaselektroden wurden mit einem Mikroelektrodenpuller (DMU-Universal-Puller, Zeitz Instrumente, Augsburg) gezogen. Sie bestanden aus Borosilikatglas (Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland). Jeweils zwei Glasmikroelektroden wurden in einer kleinen Metall-Schraubkonstruktion fixiert und eine Elektrode des Paares an einem weiteren Elektrodenpuller (Narishige Scientific Instrument Laboratories, Tokyo, Japan) mittels Hitzeeinwirkung so gebogen, dass der vertikale Abstand zwischen beiden Elektrodenspitzen 20-40 μm betrug. Die Elektroden wurden mit 3 mol/l KCl befüllt und mit je einem chlorierten Silberdraht versehen, der mit Silikon am hinteren Ende die Elektroden verklebt wurde.

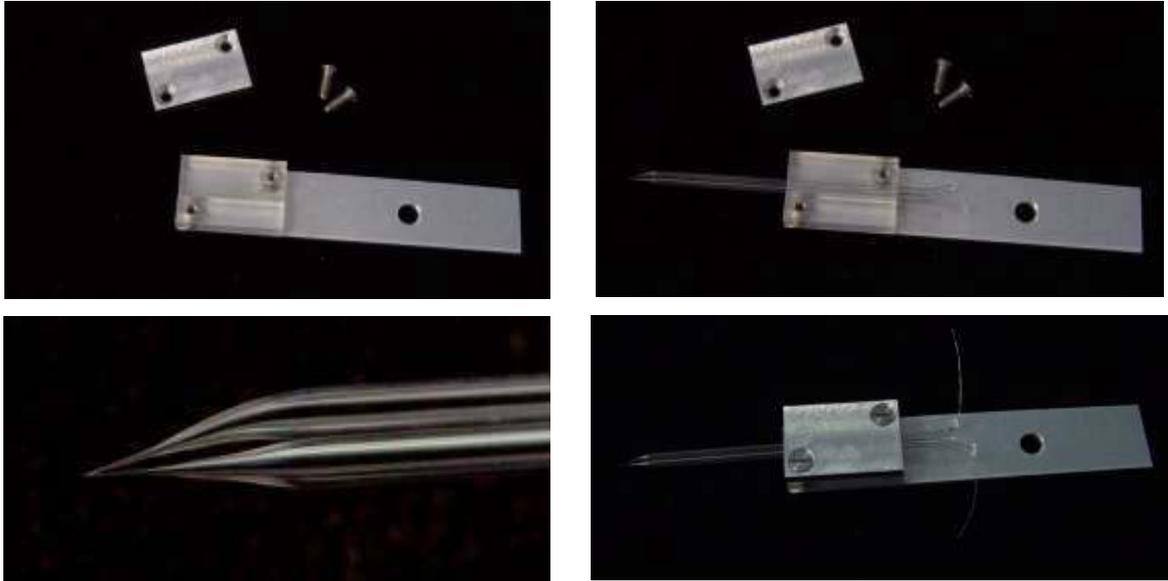


Abb. 16: Arbeitsschritte zur Herstellung einer Messelektrode

Diese vier Abbildungen verdeutlichen die einzelnen Produktionsschritte zur Herstellung einer Meßelektrode. Bild (1) zeigt die Einzelteile, wesentlich ist vor allem die parallele Führung für das Elektrodenpaar im Plexiglasblock. Nach dem Einlegen der Elektroden entstand Bild (2). Unter lichtmikroskopischer Kontrolle wurden die Elektroden genau positioniert mit KCl befüllt und mit dem Metalldeckel durch Verschraubung fixiert. Nach dem Einführen der Silberdrähte wurden die Enden mit Silikon verschlossen: (3) zeigt eine komplette, meßbereite Meßelektrode. (4) lässt die Abwinklung der oberen Mikroelektrode gegenüber der unteren erkennen.

Signalaufzeichnung:

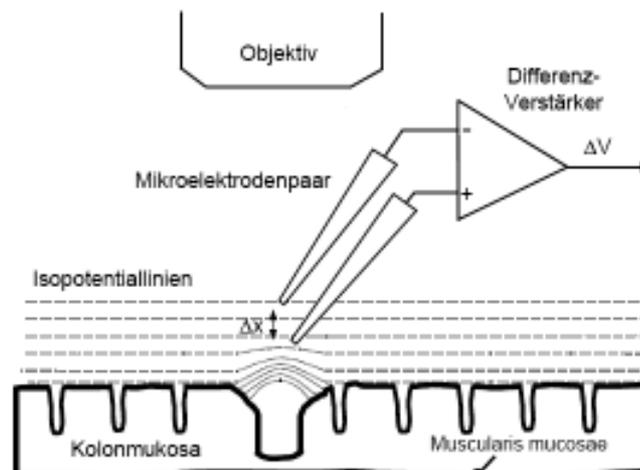


Abb. 17: Schematische Darstellung der Signalerfassung des supraepithelialen Potentials durch das Mikroelektrodenpaar dicht über dem Epithel

Abgebildet sind die oben beschriebenen Messelektroden, die sich in dem definierten Abstand von 25 μm vom Epithel befinden. Daneben ersichtlich der einzuhaltende vertikale Abstand zwischen beiden Elektroden (Δx 20-40 μm). In gewissem Abstand von der apikalen Membran sieht man einen homogenen Verlauf der Potentiallinien. In der Nähe von größerer Leitfähigkeit, über Tight junctions im Interzellularspalt oder nach Setzen einer Einzelläsion, verändert sich der Verlauf der Potentiallinien: Sie verlaufen dichter und nicht mehr parallel, sodass vereinfacht ausgedrückt, die Verschiebung der Potentiallinien als Signal genutzt wurde, um die Größe des Defektes und dessen Reparatur zu messen.

Lichtmikroskop:

Unter lichtmikroskopischer Kontrolle (Universalmikroskop Axioplan, Zeiss, Deutschland) wurden mithilfe eines Wasserimmersionsobjektivs (Achromplan 40x, numerische Apertur 0,75, Arbeitsabstand 1,98 mm, Zeiss) durch Annähern mit sehr kleinen Schritten (μm -Bereich) die Elektroden über dem Epithel platziert. Zunächst berührten die Elektroden leicht das Epithel, was durch Unregelmäßigkeiten der Amplitude des Oszilloskops zu beobachten war, um dann die Messhöhe mikrometergenau durch den computergesteuerten Arbeitstisch einstellen zu können. Über eine Videokamera (Hamamatsu Mikroskope Video Camera, Photonic Microscope System C2400, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH) konnten Bilder der Defektsetzung angezeigt werden.

2.3.4 Versuchsabläufe

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden nach folgendem, festem Konzept durchgeführt:

Aussäen der HT-29/B6-Zellen auf einem speziellen Filter, Bildung eines konfluenten Monolayers.

- Kultivieren der Zellen für sieben bis acht Tage und Zugabe von Zytokinen (entweder alle HIV-typischen Zytokine oder jeweils jedes Zytokin einzeln)

- Inkubation für 24 bzw. 48 Stunden

- Widerstandsmessung am Handmessgerät

- Herausschneiden des Epithels (mit Filter) aus Filterhalterung, Einlegen in den Container, welcher in die Messkammer eingepasst wird.

- Positionieren der Messelektroden zunächst direkt auf dem Epithel, um dann 25 µm Abstand einstellen zu können.

- Einsetzen der Manipulationselektrode, Anschluss der Wechselspannung.

Setzen einer Einzelzellläsion durch Applizieren eines Rechteckstroms, der durch das Einbringen einer weiteren mit CaCl₂ und Silberdraht gefüllten Elektrode auf eine einzelne Zelle positioniert werden konnte.

- Dokumentation der Leitfähigkeit am Schreiber in verschiedenen Abständen von der Läsion (10, 20, 40, 70 und 100 µm), wiederholte Messungen nach 2 min, 4 min, 8 min und 16 min

- Dokumentation der Morphologie der Einzelzellrestitution durch Videomikroskopie.

Immunfluoreszenzbehandlung von mit HIV-typischen Zytokinen vorinkubierten Zellen 10 min nach Setzen einer Einzelzellläsion mit Anti-Occludin und Anti-E-Cadherin spezifischen Antikörpern und Darstellung im konfokalen Fluoreszenzmikroskop nach Detektion der Antikörper mit einem fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sekundärantikörper.

2.3.5 Statistik

Die statistische Auswertung der gemessenen Werte wurde mit dem Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL erstellt. Die Grafiken wurden mit Origin 5.0 angefertigt.

Die Ergebnisse der epithelialen Leitfähigkeit (in Abhängigkeit von der Zeit) werden als arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und Stichprobengröße (n) angegeben.

Wie bei Florian (2002) beschrieben, wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test bzw. der U-Test angewandt, um mögliche Unterschiede zwischen den Ergebnissen von Kontrollzellen und behandelten Zellen aufzudecken, da diese Tests keine Normalverteilung voraussetzen. Ausserdem wurde der p-Wert bei Mehrfachtestung mittels Bonferroni-Korrektur korrigiert (Rudolf, Kuhlisch, 2008). Als signifikant wurden Unterschiede angenommen, wenn $p < 0,05$, also die Irrtumswahrscheinlich bei weniger als 5% liegt. Die Signifikanzen wurden folgendermaßen gekennzeichnet: n.s.: nicht signifikant unterschiedlich, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,002$.

Wie in Abb. 24 verdeutlicht, waren die Zeitkonstanten τ der Restitutionsverläufe nicht normalverteilt, so dass hier nicht arithmetische Mittelwerte sondern Mediane angegeben werden. Um Unterschiede der Restitutionszeiten herauszuarbeiten, wurde zudem die relative Änderung des Leitwertes zwischen der 2. und 8. Minute in Prozent errechnet.

Tab. 6: Überblick über die Anzahl der durchgeführten Messungen

HIV – typische Zytokine	Anzahl der inkubierten Filter	Anzahl der Kontroll-Filter
IFN- α	11	5
IFN- γ	10	5
IL-1 β	10	10
TNF- α	10	10
Kombination aller HIV-typischen Zytokine	10	12

2.4 Immunfluoreszenz

Um Bestandteile der Tight junctions oder allgemein der Zellzwischenräume sichtbar zu machen inkubiert man den Monolayer mit

1. Antikörpern gegen entsprechende Proteine (Zymed, Invitrogen)
2. markierten Antikörpern, enthalten fluoreszierenden Farbstoff (Zymed, Invitrogen)

Protokoll der E-Cadherin, Occludin - DAPI – Färbung
(für HT-29/B6 auf Filter (ohne support))

Fixierung des Monolayers mittels Methanol für 10 Minuten bei -20 °C

einmal Spülen mit PBS

in Permeabilisierungslösung (Triton-X 100 0,5% in PBS) geben für 12 min bei Raumtemperatur (RT)

kurzes Spülen mit PBS

Blockierung und Spülen mit 0,5% Ziegen Serum für 40 Minuten bei Raumtemperatur

Färbungen anti-E-cadherin (monoclonal) & anti-Occludin (polyclonal) (Mix AK)

Über Nacht bei 4°C 50 µl Antikörperlösung mit anti- Occludin Antikörper bei 1:50 und anti E-Cadherin Antikörper bei 1:50 Verdünnung

4 x Waschen mit der Blockierlösung (2, 10, 20, 25 min)

Sekundärantikörperlösung bestehend aus einer Mischung der folgenden Antikörper für eine Inkubation über 3 Stunden bei Raumtemperatur; die verwendete Menge betrug

50 µl als Mischung in 0,1% Triton:

Occludin: Alexa 488 Ziege anti-Kaninchen bei einer Verdünnung von 1:500 und für E-

Cadherin: Alexa 594 Ziege anti-Maus ebenfalls in einer Verdünnung von 1:500

Danach erfolgt ein 2-maliges Waschen mit der Blockierlösung (2; 5 min).

DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) ist ein Fluoreszenzfarbstoff zur Darstellung der Zellkerne. Eine Stammlösung wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in Methanol angesetzt und für 15 min bei Raumtemperatur in einer Verdünnung von 1:1000 auf die Zellen aufgebracht.

Danach wurde zweimal gespült mit PBS (5 min, 10 min) und abschließend mit destilliertem Wasser (5 min) gespült.

Schließlich erfolgte das Einbetten in Pro Taqs MountFluor.

2.5 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopie:

Das Prinzip beruht auf der Eigenschaft einiger Moleküle Energie (hier in Form von Licht) zu absorbieren. Diese Fluorophore emittieren nachfolgend Licht höherer Wellenlänge und es besteht die Möglichkeit diese mit Hilfe entsprechender Filtersets selektiv zu detektieren. Bei der angewandten Immunfluoreszenz werden durch die indirekte Färbung markierte Antikörper (sekundäre Antikörper) nach Bindung an nicht-markierte Antikörper zur Fluoreszenz angeregt. Dafür tragen diese Sekundärantikörper ein entsprechendes Label, das in der Bezeichnung des Antikörpers durch eine Zahl mit dem jeweiligen Excitationsmaximum dargestellt wird. Licht dieser Wellenlänge erzeugt das oben beschriebene Phänomen am effektivsten.

Konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie:

Bei der konfokalen Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie wird das Objekt mit einem Laserstrahl bestimmter Wellenlänge angeregt. Der Laserstrahl ermöglicht die punktuell fokussierte Anregung. Der Anregungsfokus wird über die Probe bewegt, „gescannt“ und aus diesen Bildpunkten nachfolgend das Bild rekonstruiert.

Das konfokale Mikroskop registriert Bildpunkte, die genau einem Punkt aus der Brennebene des Objektivs entsprechen, d.h. Licht aus Ebenen außerhalb des Objektivfokus (blaue und grüne Linien in unten gezeigter Abbildung 18) wird nicht detektiert. So erzeugt man einen sogenannten „optischen Schnitt“ durch ein Objekt und erhält folglich einen höheren Kontrast.

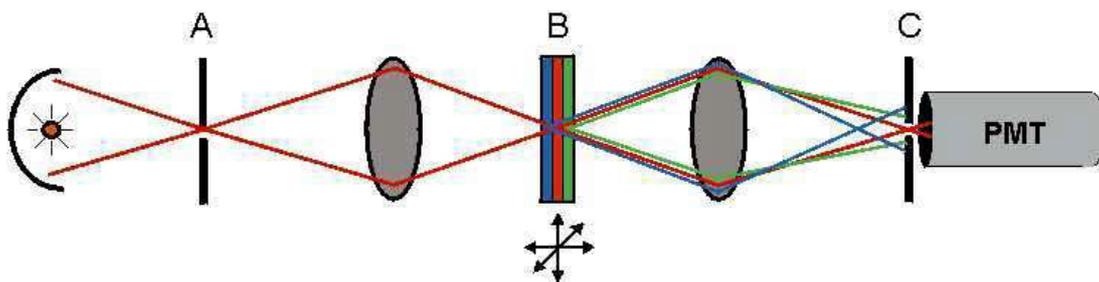


Abb. 18: schematische Darstellung des Prinzips der konfokalen Mikroskopie

A und C - Lochblenden

PMT - Photomultiplier

Da es bei der konventionellen Lichtmikroskopie zur Überschneidung von fokussiertem und unfokussiertem Licht kommt, wird bei der konfokalen Mikroskopie Licht, das nicht aus der Brennebene des Objektes stammt (grün und blau) durch Lochblenden herausgefiltert.

Der Aufbau des konfokalen Mikroskops ist symmetrisch, sodass beide Blenden und ein Punkt des Objekts in der Brennebene der Linsen konfokal sind. Rotes Licht wird vom Photomultiplier registriert, da es in der Fokusebene liegt.

Entnommen aus: <http://www.zoologie-skript.de/methoden/fluo/confocl.htm>, 31.01.2011

Nach dem Scannen einzelner Ebenen („stacks“) kann durch Superposition ein 3-dimensionales Bild generiert werden.

2.6 Videomikroskopie

Um die Veränderungen nach einer Einzelzellläsion morphologisch sichtbar machen und festhalten zu können, wurden mittels einer Videokamera (Sony Color Videokamera, CCD-IRIS-RGB, Sony, Deutschland) und einem digitalen Bildverarbeitungssystem (Screenmachine 2, Fast electronic, GmbH) Bilder aufgenommen. Die Bilder wurden im JPG-Format gespeichert. Es wurde so möglich die Restitution der Läsion abhängig von der Zeit auch visuell zu beurteilen.

Die Videomikroskopie gibt die Möglichkeit der Beobachtung und Dokumentation der sich verändernden Morphologie nach Manipulation in vitalem Gewebe. Hiermit konnte die Restitution einer Einzelzellläsion optisch verfolgt werden.

3 Ergebnisse

Im Folgenden wird die Restitution von Einzelzellläsionen (unter HIV-typischen Zytokinen und unter Kontrollbedingungen) an der Zelllinie HT-29/B6 zunächst optisch anhand der Videomikroskopie, der Immunfluoreszenz und der fokalen Fluoreszenzmikroskopie beurteilt. Im Anschluß werden die elektrophysiologisch ermittelten Leitwerte des verursachten Lecks jeweils graphisch dargestellt. Zusammenfassende Graphiken verdeutlichen die stärksten Effekte.

3.1 HT-29/B6-Monolayer

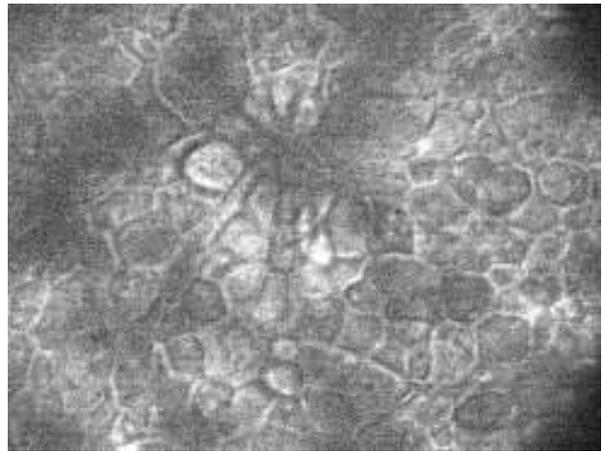
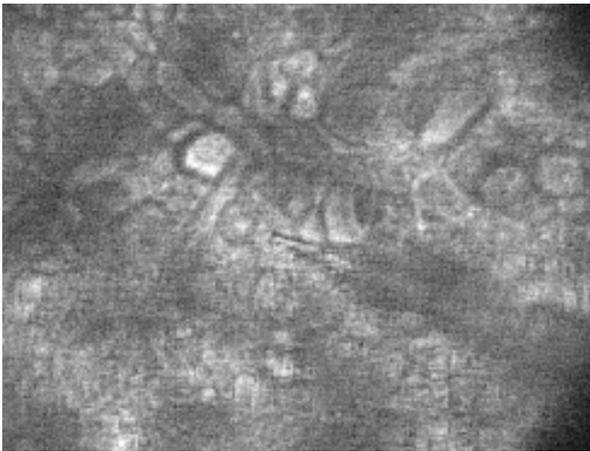
Zum Setzen einer Läsion wurde jeweils eine kleine Glaskapillare mit $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ CaCl}_2$ -Lösung befüllt, ein Silberdraht eingeführt, eine Spannung angelegt und durch einen Rechteckimpuls ein Schaden in einer einzelnen Zelle erzeugt.

Der zurückbleibende Zelldetritus wurde sichtbar und eine sich über Minuten verkleinernde Lakune zeigte makroskopisch den einsetzenden purse string-Mechanismus.

Dabei war es nötig, durch das Einstellen der zu betrachtenden Ebene den Fokus entsprechend nachzujustieren. Somit wurde der scheinbare Durchmesser der Läsion einerseits von der vergangenen Zeit nach Entstehung des Defekts, andererseits von der gewählten Fokusebene im Mikroskop bestimmt.

vorher (30070302.jpg)

3 min (30070307.jpg)



10 min (30070311.jpg)

18 min (30070318.jpg)

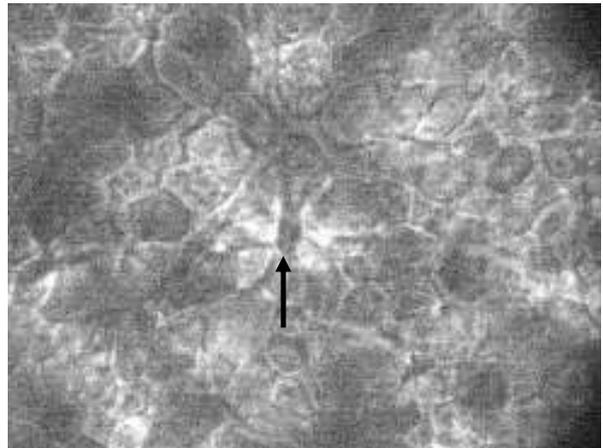
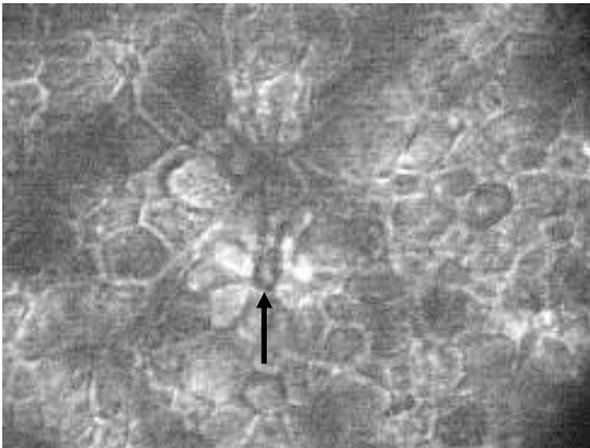


Abb. 19: Videomikroskopie, zur Darstellung kommt die zunehmende Restitution einer Einzelzellläsion nach Vorinkubation mit HIV-typischen Zytokinen in Abhängigkeit von der Zeit

Die Abbildungen oben gezeigten Bilder geben die Morphologie einer Einzelzellläsion nach 24-stündiger Vorinkubation der HT-29/B6 Zellen mit HIV-typischen Zytokinen durch die Videomikroskopie wieder. In Bild 1 ist die für die Manipulation verwendete Glaskapillare kurz vor Setzen des Defektes noch sichtbar. Bild 2 stellt die Einzelzellläsion 3 Minuten nach Setzen des Schadens dar, Bild 3 nach 10 Minuten und Bild 4 nach 18 Minuten. Rein optisch kann man mittels Videomikroskopie keinen erheblichen Unterschied in Größe und Modifizierung der Einzelzellläsion zwischen den einzelnen Bildern (unter Berücksichtigung der Zeit) feststellen.

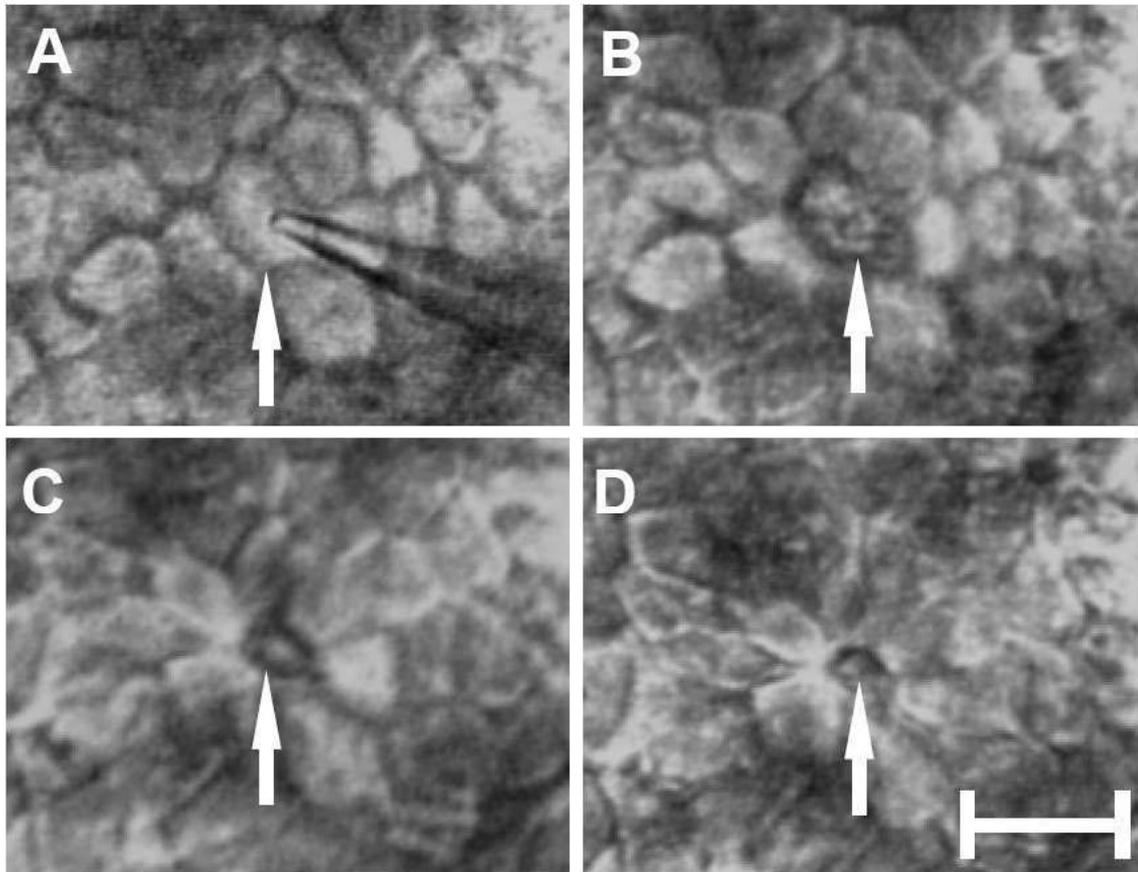


Abb. 20: Time-laps Videomikroskopie Restitution einer Einzelzellläsion am Monolayer HT-29/B6 unter Kontrollbedingungen

Intravitale Videomikroskopie an Conductance-scanning Stand, morphologischer Verschluss A) vor Setzen des Schadens, B) 1,5 min, C) 5 min, D) 15 min nach Setzen eines Schadens (Balken 10 μ m). Entnommen aus: Florian, 2002

Wie die Abbildungen 19 und 20 zeigen, kann rein morphologisch kein signifikanter Unterschied zwischen der Restitution einer Einzelzellläsion nach Vorinkubation mit HIV-typischen Zytokinen im Vergleich zu einer Einzelzellläsion unter Kontrollbedingungen gemacht werden.

Die veränderte Restitution einer Einzelzellläsion unter HIV-typischen Zytokinen konnte jedoch deutlich elektrophysiologisch nachgewiesen werden, die hohe Auflösung der Conductance-scanning Technik ermöglichte es, den vorhandenen Effekt zu dokumentieren. Die Daten dazu werden im Folgenden detailliert dargestellt.

Dreidimensionale Bilder konnten mit Hilfe des konfokalen Mikroskops erzielt werden. Die z-Achse entspricht der Sicht auf die vertikal zum Epithel verlaufende Achse. Vor der Betrachtung im konfokalen Mikroskop wurden E-Cadherin und Occludin über immunhistochemische Färbetechniken fluoreszenzmarkiert. Die Färbungen wurden kombiniert mit einer DAPI Kernfärbung. Mithilfe der Kerndarstellung sollte die nach der Schadenssetzung stattfindende E nukleation und teilweise darstellbarer Zelldetritus kenntlich gemacht werden. Da E-Cadherin und Occludin ohne Darstellung der Kerne zur besseren Darstellung kommen, werden in der vorliegenden Arbeit keine DAPI-Kernfärbungen dieser Proteine gezeigt. Zur Beurteilung des Verhaltens der Interzellularstrukturen und damit der veränderten Bedingungen bei Zellverlust wurden das Tight junction-Molekül: Occludin und Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin, wie oben beschrieben, angefärbt.

In der nachfolgenden Abbildung sind die Immunfluoreszenzfärbungen des Tight junction Proteins Occludin und des Adhärensmoleküls E-Cadherin im intakten HT-29/B6 Zelllayer dargestellt.

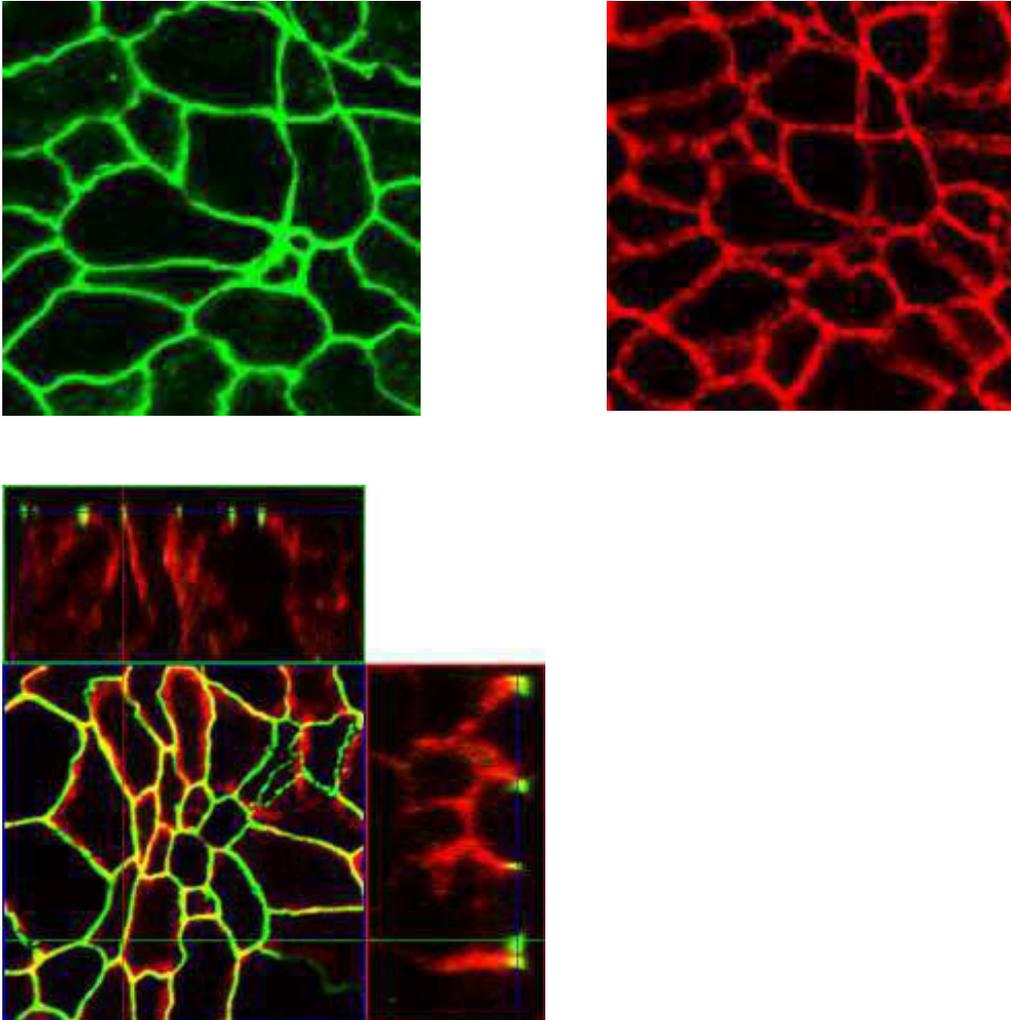


Abb. 21: Immunfluoreszenzfärbung von Occludin und E-Cadherin

Zur Darstellung kommen das Tight junction Protein Occludin (oben links, grün fluoreszierend) und das Adherens junction Protein E-Cadherin (oben rechts, rot fluoreszierend) in der Kolonepithelzelllinie HT-29/B6. Die untere Abbildung zeigt einen anderen Bildausschnitt des Monolayers, wo sich die fluoreszierenden Farbstoffe überlagern, sodass die Farbwiedergabe gelb ist.

Die nachfolgende Abbildung zeigt beide Tight junction-assoziierten Proteine 10 Minuten nach Setzen einer Läsion. Dargestellt wird eine Kontrollmessung.

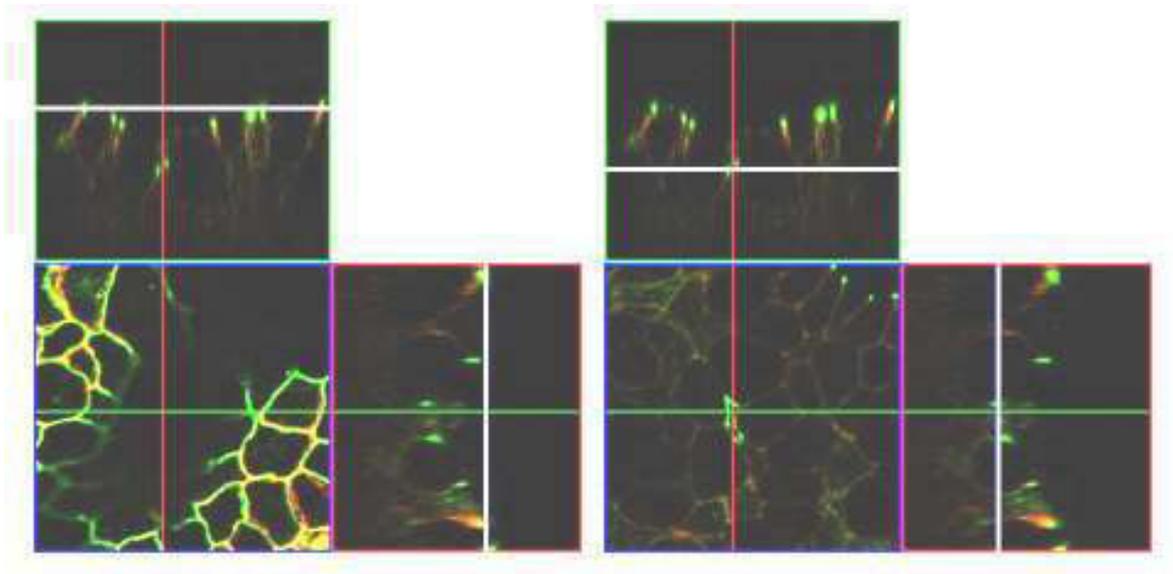


Abb. 22: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Das Tight junction Protein Occludin (grün fluoreszierend) und das Adhärensmolekül E-Cadherin (rot fluoreszierend) in dem Kolonepithelzellmonolayer HT-29/B6 10 Minuten nach Setzen einer Einzelzellläsion.

In der linken Abbildung erkennt man eine Einzelzellläsion an ihrem apikalen Umfang, die von intakten Zellen umgeben ist. Die rechte Abbildung zeigt den basalen Abschnitt des Monolayers, es konnte nur noch Occludin nachgewiesen werden. In vorherigen Arbeiten konnte in ähnlicher Weise der Verschluss einer Einzelzellläsion mit der typischen Morphologie und dem Stattfinden eines purse-string Mechanismus beschrieben werden (Florian, 2002).

3.2 HIV-typische Zytokine

Schmitz et al., 2002 identifizierten den HIV-Überstand, indem sie von Monozyten abgeleitete Makrophagen (MDM) mit verschiedenen (SF 162 und IIB) HIV-1-Stämmen infizierten und mit mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) kokultivierten. Nach 24 Stunden Inkubation konnten die als Überstand angefallenen Zytokine per ELISA quantifiziert werden. Folgende Konzentrationen wurden auf diese Weise ermittelt:

Tab. 6: Überblick über verwendete Zytokine

Einzelne Zytokine	Konzentration im Überstand
TNF- α	3×10^2 U/ml
IL-1 β	$1,5 \times 10^2$ U/ml
IFN- α	75 U/ml
IFN- γ	6 U/ml

Zunächst wurde die Kombination aller Zytokine untersucht. Nachfolgend wurden Messungen mit den einzelnen Zytokinen durchgeführt, um die Verantwortlichkeit eines einzigen Zytokins bzw. den synergistischen Effekt einer Kombination aus allen zu belegen. Mit der Conductance Scanning Technik wurden die Leitfähigkeiten einzelner Einzelzellläsionen bestimmt. Es war erforderlich, die Läsion in einem Areal funktioneller Unversehrtheit bzw. in nicht-apoptotischen Bereichen durchzuführen. Ausserdem wurde in einem standardisierten Abstand von 25 μ m ausgehend von der Oberfläche des Epithels gemessen. Gitter et al. (1997) beschrieben, dass sich in dieser Höhe trans- und parazelluläre Ströme überlagern.

Wie in Abb. 23 dargestellt, nimmt die Leitfähigkeit g^{leak} einer erzeugten Läsion über die Zeit exponentiell ab. Im Ergebnisteil sind im weiteren Verlauf nur noch diese errechneten e-Funktionen dargestellt. Die Zeitkonstante τ beschreibt die Zeitspanne, in der g^{leak} jeweils auf das 1/e-fache (etwa 37%) abfällt, sodass man daraus die Halbwertszeit der Restitution einer Einzelzellläsion berechnen bzw. ableiten kann. Sie gibt dann aber an, innerhalb welcher Zeitspanne die Meßgröße immer auf die Hälfte abnimmt.

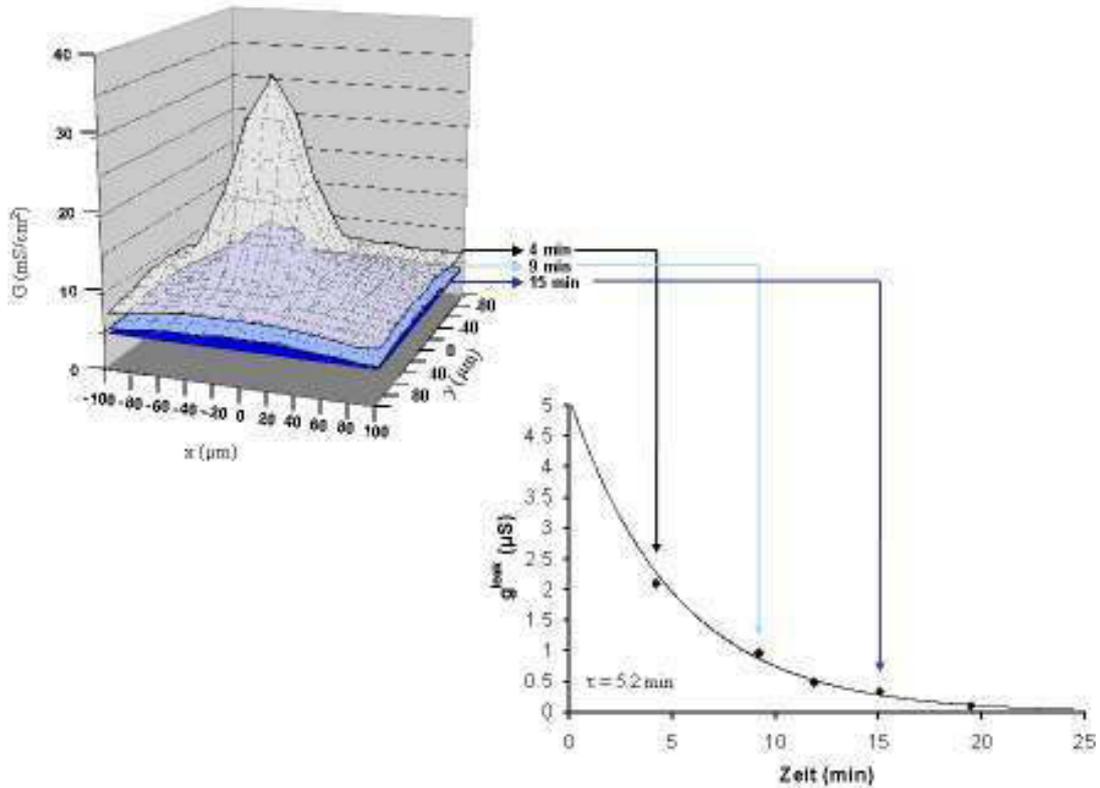


Abb. 23: Schematische Darstellung zur Ermittlung der Ergebniskurven

Bei dieser Kontrollmessreihe wurde zum Zeitpunkt $t=0$ eine Läsion erzeugt. Anschließend wurde zu 5 verschiedenen Zeitpunkten (4, 9, 12, 15 und 19 min) die lokale Epithelleitfähigkeit G in verschiedenen Abständen (0, 10, 20, 40, 70, 100 μm) von der erzeugten Läsion gemessen (gescannt). Drei dieser fünf Messungen sind im linken Teil der Abb. graphisch dargestellt. Die Gesamtleitfähigkeit (Leckleitfähigkeit g^{leak}) der Läsion wurden aus dem Integral ($\int G dx dy$) dieser lokalen Epithelleitfähigkeiten bestimmt. Im linken Teil der Abb. sind die errechneten Leckleitfähigkeiten g^{leak} zu den verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Die exponentielle Abnahme von g^{leak} über die Zeit spiegelt den Verlauf der Restitution wieder.

Wie in Abb. 24 verdeutlicht, sind die Zeitkonstanten der Restitution nicht normalverteilt, so dass keine Mittelwerte von τ angegeben werden können. Stattdessen kann man beispielsweise den Median heranziehen (Rudolph, Kuhlisch, 2008). Hierfür werden zunächst werden die Messwerte nach der Größe geordnet. Der Median bezeichnet den mittleren Wert. Liegt eine Messreihe mit einer geraden Anzahl von Messwerten vor, bildet der Median einen Durchschnittswert aus den beiden mittleren Werten.

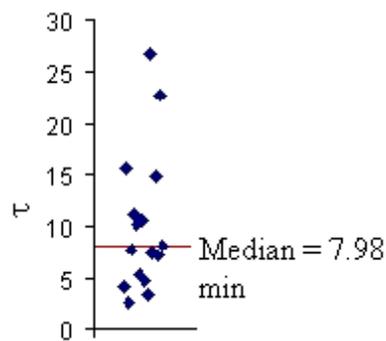


Abb. 24: Darstellung der τ-Werte einer Kontrollmessreihe

Aufgetragen sind die τ-Werte (in min) der unbehandelten Kontroll-Zelllayer. Die Werte sind nicht normalverteilt, so dass keine Mittelwerte gebildet werden können. Die rote Linie stellt den Median dar, der bei 7,98 min liegt.

Die folgende Formel beschreibt die Reparaturrate zwischen der zweiten und der achten Minute nach Einzelzellläsion.

$$\text{relative Reparaturrate} = \frac{g_{2m}^{\text{leak}} - g_{8m}^{\text{leak}}}{g_{2m}^{\text{leak}}} \cdot 100\%$$

Die für die verschiedenen Versuchsbedingungen (Kontrollbedingung, Inkubation mit einzelnen Zytokinen, Inkubation mit HIV-typischen Zytokinen) errechneten Werte konnten so direkt miteinander verglichen werden. Tabelle 7 zeigt die entsprechenden Werte.

Das Ergebnis aus den funktionellen Messungen der Einzelzellreparatur ist in den folgenden Abbildungen dargestellt.

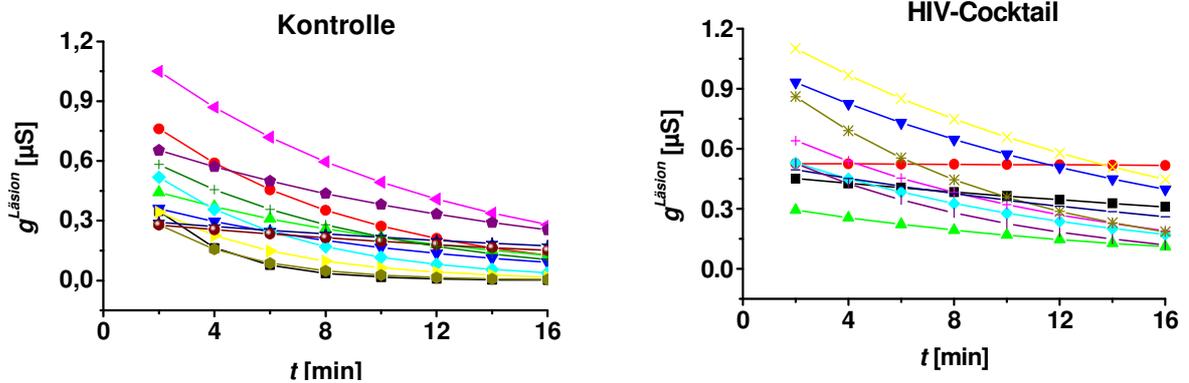


Abb. 25: Einzelleitwertmessungen nach Einzelzellläsion, als Funktionen der Zeit unter Kontrollbedingungen (links) und nach Vorinkubation mit den HIV-typischen Zytokinen (rechts) am Monolayer HT-29/B6

Zur Darstellung kommen Einzelmessungen der Leitwerte nach Einzelzellläsion unter Kontrollbedingungen (n=11) und nach Behandlung mit HIV-typischen Zytokinen (n=10) im Zeitverlauf der Restitution.

Funktionell wurde die Einzelzellläsion quantifiziert, indem die Verteilung der Leitfähigkeiten über dem entstandenen Schaden in gewissen zeitlichen Abständen mehrfach wiederholt und dokumentiert wurde. Mithilfe der Integrationsmethode (Kapitel 2.3.2) wurden die ermittelten Leitfähigkeiten G^A integriert und zu jedem Messpunkt ein Leitwert definiert.

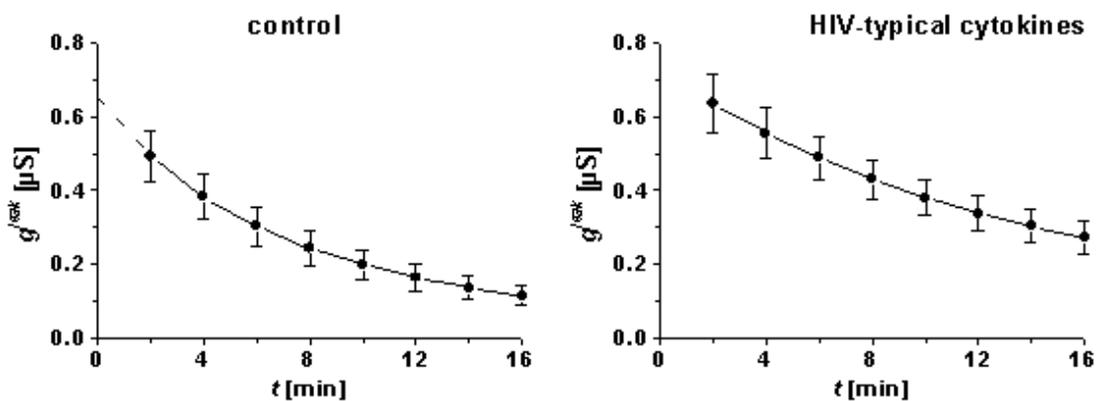


Abb. 26: Leitwert der Läsion (dargestellt als Mittelwert \pm SEM) des HT-29/B6 Monolayers als Funktion der Zeit nach Setzen einer Einzelzellläsion

Dargestellt sind der Leitwert der Läsion, g^{leak} , im Zeitverlauf t als Mittelwert \pm SEM. Nach Setzen

einer Einzelzellläsion wurden die Leitwerte unter Kontrollbedingungen, links, und nach Vorinkubation mit HIV-typischen Zytokinen für 24 Stunden, rechts, dokumentiert. Abgebildet sind jeweils gemittelte Funktionen der Einzelmessungen. Einzelzellläsionen bewirkten etwa ein 0,5 μ S erzeugendes Leck. Unter HIV-typischen Zytokinen ist die Restitution verzögert, die Größe des initialen Lecks aber vergleichbar groß. In den ersten 8 Minuten wurden 50% der Läsionen unter Kontrollbedingungen repariert, im Vergleich zu den Messungen unter HIV-typischen Zytokinen konnten nur 30% repariert werden.

Nach 24-stündiger Vorinkubation mit HIV-typischen Zytokinen wurde die Restitution der anschließend erzeugten Einzelzellläsion um 21% verzögert. Diese Tendenz setzt sich auch während der verbleibenden Messung jenseits der acht Minuten fort.

3.2.1 TNF- α

Für die weiterführende Identifizierung der für den gemessenen Effekt verantwortlichen Zytokine wurden diese einzeln untersucht. Der Monolayer wurde mit der weiter oben angegebenen Konzentration des Zytokins TNF- α für 24 Stunden vorinkubiert. Das Epithel wurde wie im Abschnitt Versuchsaufbau beschrieben in den Conductance scanning-Stand eingebracht und eine Einzelzellläsion gesetzt. Parallel zu den Messungen für TNF- α wurden Kontrollmessungen angefertigt. Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis der Kontrollmessungen im Vergleich zu TNF- α inkubierten Zellkulturfiltern.

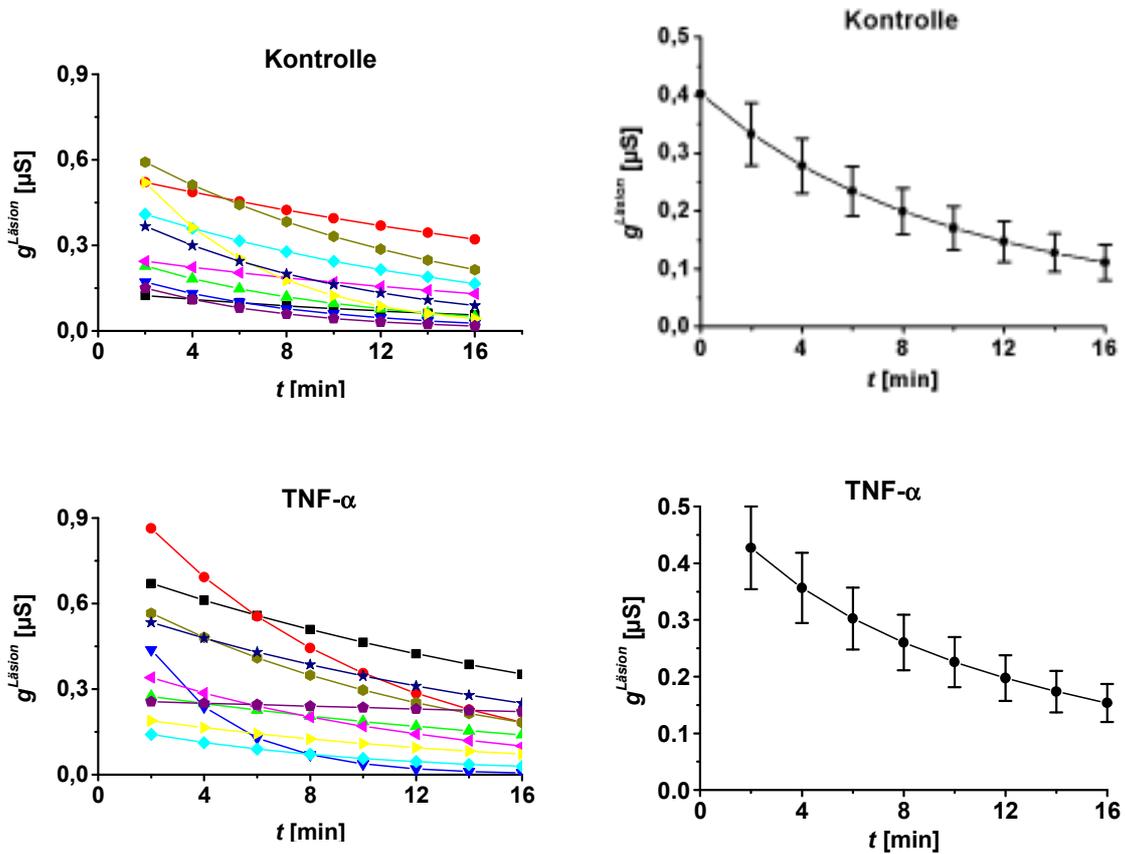


Abb. 27: Leitwert, einzeln und gemittelt nach Einzelzellläsion

Es sind Leitwerte, $g^{Läsion}$, als Funktion über die Zeit nach Einzelzellläsion in HT-29/B6-Zellen unter Kontrollbedingungen und nach 24-stündiger Vorinkubation mit TNF- α dargestellt. In der oberen Zeile sind die Kontrollmessungen abgebildet und in der unteren die Messungen unter Behandlung mit TNF- α . Die linke Spalte zeigt jeweils die Einzelmessungen, in der rechten wurden jeweils gemittelte Werte der Einzelmessungen als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Wie Abbildung 27, vor allem in der Darstellung der gemittelten Einzelmessungen, belegt, hat TNF- α allein unter den verwendeten HIV-typischen Zytokinen einen großen Anteil an der verzögerten Restitution von Einzelzellläsionen am Monolayer HT-29/B6. Durch die 24-stündige Vorinkubation mit TNF- α konnte eine Verzögerung der Restitution von 14 % verzeichnet werden.

3.2.2 IL-1 β

In der folgenden Versuchsreihe wurden die Monolayer für 24 Stunden mit $1,5 \times 10^2$ U/ml konzentriertem Interleukin-1 β vorinkubiert und Einzelzellläsionen am Conductance-scanning Meßstand erzeugt. Es wurde eine Verzögerung der Restitution, analog der unter TNF- α -Vorinkubation, von 14 % gemessen. Parallel wurden auch an Kontrollen die Auswirkungen von Einzelzellläsionen gesetzt und dokumentiert (Abbildung 28).

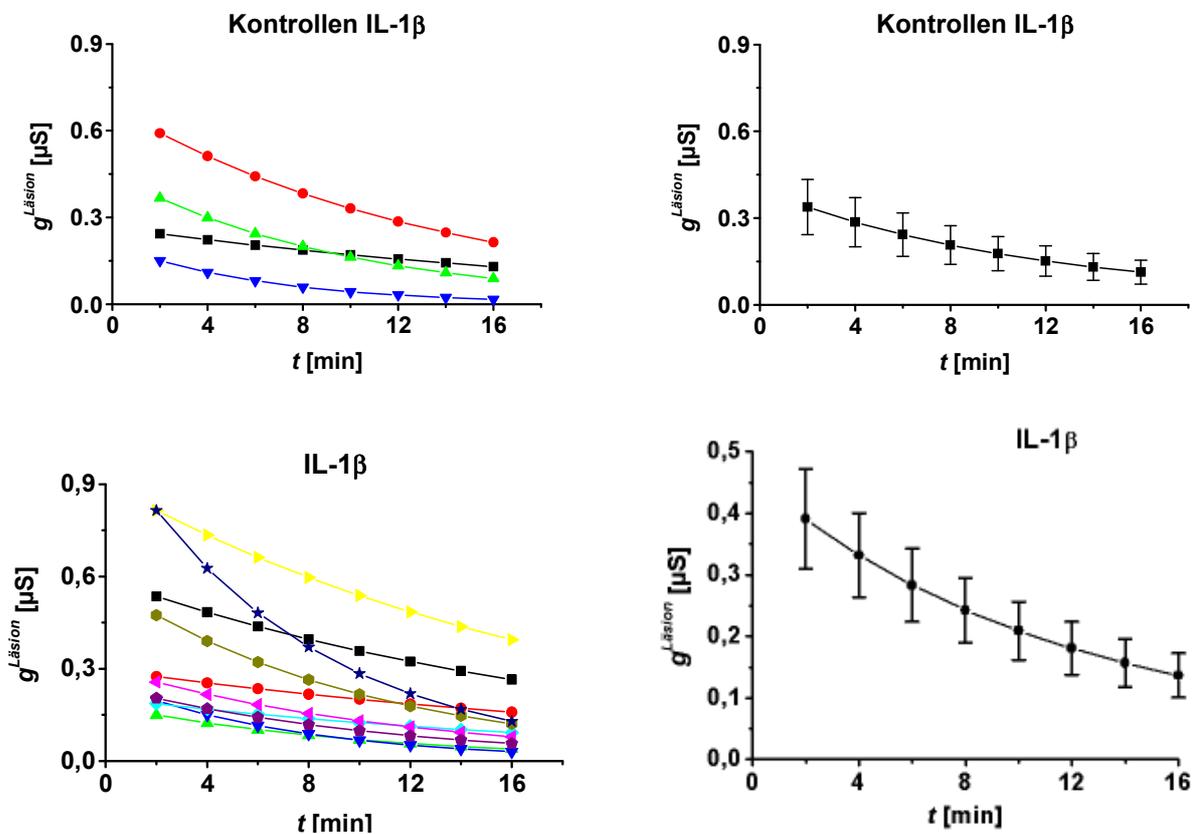


Abb. 28: Leitwerte g , als Funktion der Zeit, Einzelzellläsionen nach 24-stündiger Vorinkubation mit Interleukin-1 β

Es sind die einzelnen Leitwerte, $g_{\text{Läsion}}$, im Verlauf der Zeit (linke Abbildung), und die gemittelte Funktion als Mittelwert \pm SEM (rechte Abbildung) aus den einzelnen Messpunkten dargestellt. Analog zu den vorherigen Messungen wurden auch hier im Monolayer HT-29/B6 Einzelzellläsionen gesetzt und die Restitution gemessen.

3.2.3 IFN- α

Die vierte Messreihe umfasste die Vorinkubation (für 24 Stunden) des Monolayers mit Interferon- α , welches bei einer Konzentration von 75 U/ml eingesetzt wurde. Es wurde die Verzögerung der Restitution einer Einzelzellläsion um 9 % ermittelt. Außerdem wurden parallel weiterhin Kontrolluntersuchungen durchgeführt. Bei beiden Messreihen wurden in der beschriebenen Weise Einzelzellläsionen erzeugt. Abbildung 29 zeigt die einzelnen Verteilungen.

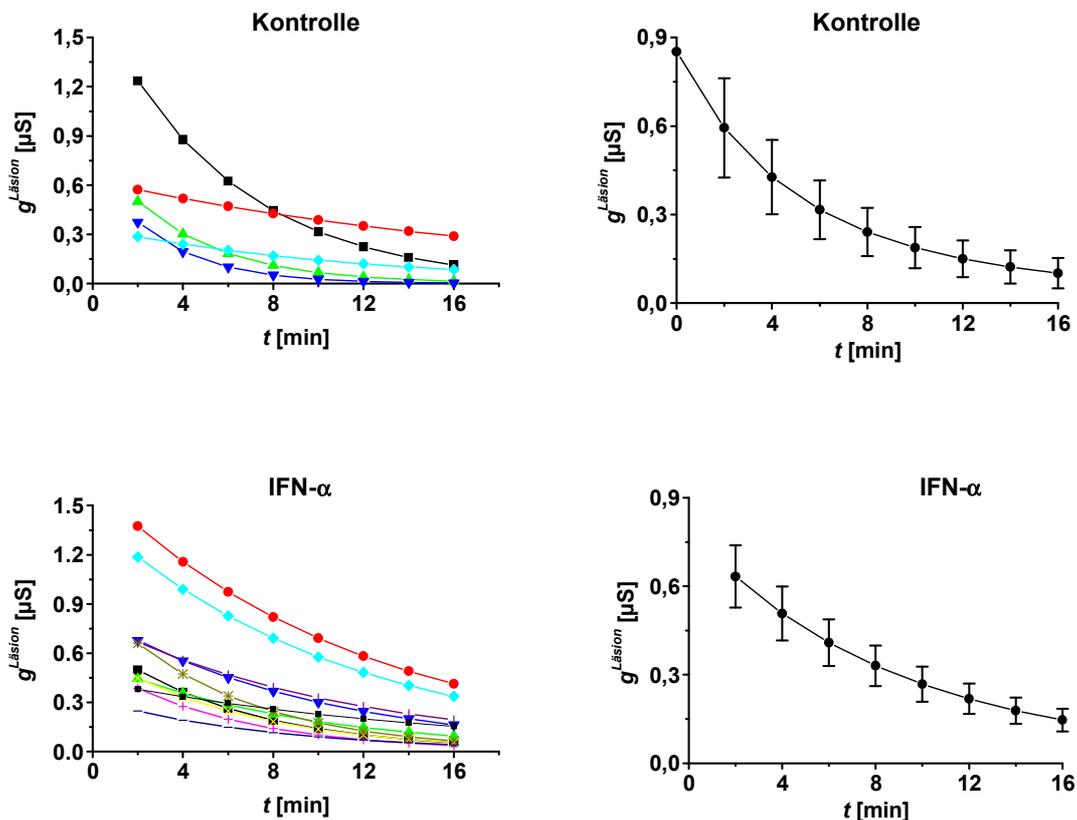


Abb. 29: Leitwerte der Kontrollmessungen und mit IFN- α vorinkubierten HT-29/B6-Zellen nach Setzen einer Einzelzellläsion

Dargestellt sind links jeweils die Einzelmessungen der Leitwerte, $g^{Läsion}$ der Kontrollmessungen (oben) und der mit IFN- α vorinkubierten Monolayer (unten) nach Einzelzellläsion in dem Zeitrahmen von 2 bis 16 Minuten. Rechts sieht man gemittelte Werte der Einzelmessungen (der Kontrollen). Unten rechts sind gemittelte Einzelmessungen der mit einer Einzelzellläsion versehenen und mit IFN- α vorinkubierten Monolayer dargestellt. Die zusammenfassende Abbildung auf der rechten Seite bildet Mittelwerte \pm SEM ab.

3.2.4 IFN- γ

Für die letzte Messreihe wurden die HT-29/B6 Monolayer mit IFN- γ (in einer Konzentration von 6 U/ml) für 24 Stunden vorinkubiert. Für die Messungen unter Vorinkubation mit IFN- γ konnte eine Verzögerung der Restitution um 18 % verzeichnet werden. Parallel wurden Zellen für Kontrollmessungen kultiviert und in analoger Weise durch Einzelzellläsionen beschädigt. Die Leitwerte sind Abbildung 30 zu entnehmen.

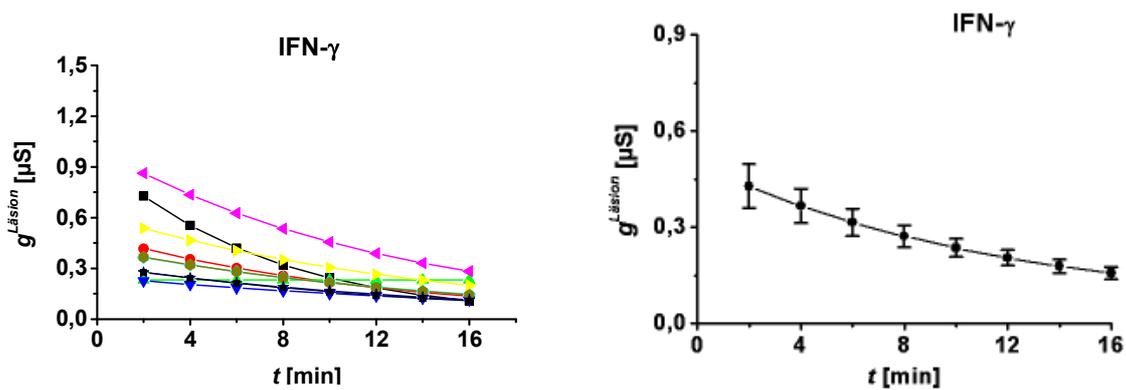


Abb. 30: Leitwerte, $g^{\text{Läsion}}$, im Zeitverlauf nach dem Setzen einer Einzelzellläsion nach Vorinkubation mit IFN- γ

Dargestellt sind (links) Einzelmessungen der Leitwerte nach Einzelzellläsion am Monolayer HT-29/B6, der für 24 Stunden mit IFN- γ vorinkubiert wurde. Es wurde über einen Zeitraum von 16 Minuten gemessen. Rechts wurden für die jeweiligen Messzeitpunkte Mittelwerte \pm SEM gebildet.

3.2.5 Zusammenfassende Darstellung von Leitfähigkeiten

Tab. 7: Leitfähigkeit des intakten Epithels G^{intakt} und die reduzierten Leitfähigkeitswerte $g^{\text{Läsion}}$ für den Zeitraum von 2 bis 16 Minuten nach Läsion.

Dargestellt sind die einzelnen Leitfähigkeiten von intaktem Epithel G^{intakt} , gemessen außerhalb apoptotischer Bereiche und in nötigem Abstand vom Rand des Monolayers. Die Leitfähigkeiten von artifiziell lädierten Bezirken werden als $g^{\text{Läsion}}$ bezeichnet. Durch Restitution der Einzelzellläsionen verkleinert sich das Leck über die Zeit. Die funktionelle Abnahme des Lecks wurde für den Zeitraum 2 bis 16 Minuten nach Setzen der Läsion als reduzierende Leitfähigkeit gemessen.

	G^{intakt} [mScm-2]	g^{leak} [μS]				$\frac{g_{2m}^{\text{leak}} - g_{8m}^{\text{leak}}}{g_{2m}^{\text{leak}}}$	n (m)
		t = 2 min	t = 4 min	t = 8 min	t = 16 min		
control	2.46 ± 0.59	0.49 ± 0.07	0.38 ± 0.06	0.24 ± 0.05	0.14 ± 0.03	52% ± 6%	12 (12)
HIV-cocktail	2.92 ± 0.87 n.s.	0.64 ± 0.08 n.s.	0.56 ± 0.07 n.s.	0.43 ± 0.05 *	0.27 ± 0.04 *	31% ± 5% *	10 (10)
control	1.48 ± 0.38	0.33 ± 0.05	0.28 ± 0.05	0.20 ± 0.04	0.11 ± 0.03	41% ± 5%	10 (10)
IL-1β	0.90 ± 0.24 n.s.	0.39 ± 0.08 n.s.	0.33 ± 0.07 n.s.	0.24 ± 0.05 n.s.	0.14 ± 0.04 n.s.	38% ± 4% n.s.	10 (10)
TNF-α	2.69 ± 0.58 n.s.	0.43 ± 0.07 n.s.	0.36 ± 0.06 n.s.	0.26 ± 0.05 n.s.	0.15 ± 0.03 n.s.	38% ± 7% n.s.	10 (10)
control	3.00 ± 0.85	0.59 ± 0.17	0.43 ± 0.13	0.24 ± 0.08	0.10 ± 0.05	59% ± 11%	5 (5)
IFN-α	2.91 ± 0.41 n.s.	0.63 ± 0.11 n.s.	0.51 ± 0.09 n.s.	0.33 ± 0.07 n.s.	0.15 ± 0.04 n.s.	50% ± 3% n.s.	11 (11)
IFN-γ	2.37 ± 0.47 n.s.	0.43 ± 0.07 n.s.	0.37 ± 0.05 n.s.	0.27 ± 0.03 n.s.	0.16 ± 0.02 n.s.	32% ± 4% n.s.	10 (10)

Folgende Zytokine wurden untersucht: Kontrollen für HIV-typische Zytokine, n= 12 an 12 Filtern; HIV-typische Zytokine, n= 10 an 10 Filtern ; Kontrollmessungen für IL-1β und TNF-α, n= 10 an 10 Filtern; IL-1β, n= 10 an 10 Filtern; TNF-α, n= 10 an 10 Filtern; Kontrollmessungen für IFN-α und IFN-γ, n= 5 an 5 Filtern; IFN-α, n= 11 an 11 Filtern; IFN-γ, n= 10 an 10 Filtern.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass nur der HIV-Cocktail einen signifikanten Effekt auf die Restitution der Einzelzellläsion zeigte und einzelne Zytokine keinen signifikanten Effekt hatten.

4 Diskussion

Das Darmlumen des Menschen wird lediglich durch ein einschichtiges, hochprismatisches Epithel vom Interstitium getrennt. Um das Eindringen von pathogenen Keimen über diese Barriere verhindern zu können, muss dieses Epithel über intakte Zell-Zell-Verbindungen verfügen. Physiologischerweise kommt es am Dünndarm regelmäßig zu Apoptosen, darüber hinaus kann es durch mechanische Einflüsse oder Pathogene zum Verlust einzelner Zellen des epithelialen Verbandes kommen (Rosenblatt et al., 2001). Diese Ereignisse ermöglichen Pathogenen die Barriere zu permeieren und zu inflammatorischen Reaktionen zu führen (Nusrat et al., 1997). Es ergibt sich die Fragestellung mittels welcher Mechanismen der Organismus entstehende Lecks repariert, um entzündliche Erkrankungen abzuwenden.

Bei der HIV-Infektion und bei der HIV-Enteropathie sind bestimmte Zytokine (IFN- γ ; IL-1 β , TNF- α , IL-4,6, und 10) in der intestinalen Mucosa (McGowan et al., 2004; Schulbin et al., 2008) und im Blut (unter anderem IL-1, IFN- γ , TNF- α , TNF- β , und TGF- β (Alonso et al., 1997) erhöht. Schmitz et al. (2002) identifizierten die HIV-typischen Zytokine, indem sie von Monozyten abstammende Makrophagen mit HIV-1 Stämmen ISF 162 und IIIb infizierten und mit PBMC (peripheral blood mononuclear cells) für 24 Stunden kokultivierten. Das von Schmitz et al., 2002 verwendete Zellkultursystem wurde bereits früher eingesetzt (Rokos und Pauli, 1991). Auf ähnliche Weise wurde in dieser Arbeit das Sezernieren von HIV-typischen Zytokinen von Immunzellen in der Lamina propria des Darms durch die Zugabe von rekombinanten humanen Zytokinen in der gleichen Konzentration nachempfunden. Die über ELISA Messungen aus dem Überstand der Zellkultur quantifizierten HIV-typischen Zytokine enthielten: TNF- α , IL-1 β , IFN- α und IFN- γ . Die eingesetzte Konzentration ist im Ergebnisteil dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass diese HIV-typischen Zytokine die Barriere von HT-29/B6 Zellkultursystemen beeinträchtigen, da sie hier einen Abfall des transepithelialen Widerstandes bewirken (Schmitz et al., 2000). Dieser Effekt war bei IFN- γ bei alleiniger Exposition am ausgeprägtesten. Es wurde geschlussfolgert, dass der beobachtete Leck-Flux unter IFN- γ zur HIV-

typischen Enteropathie beitragen kann (Schmitz et al., 2002).

Bendfeldt et al. (2000) konnten zeigen, dass die Barriere von Monolayern der Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29/B6 durch die Inkubation mit TNF- α in zweierlei Hinsicht geschädigt wird. Zum Einen nimmt die Anzahl von Bestandteilen der Tight junctions ab, zum Anderen die Zahl der Apoptosen zu, sodass die parazelluläre Ionenpermeabilität unter dem Einfluss von TNF- α steigt. Ebenfalls anhand von Monolayern der Zelllinie HT-29/B6 wurden in folgenden Arbeiten artifizielle Läsionen untersucht: TNF- α hatte auf die Restitution einer Einzelzellläsionen in der Zellkultur HT-29/B6 einen hemmenden Effekt (Florian et al., 2002). Die Reparatur der Einzelzellläsionen an nativem Mauscolon war durch die kombinierte Zugabe von TNF- α und IFN- γ beeinträchtigt (Florian et al., 2002, Günzel et al., 2006).

Christ et al. (2004) entfernten aus HT-29/B6-Zelllayern Streifen von 200 μ m Breite und 2 mm Länge. Im Gegensatz zu den Befunden bei Einzelzellläsionen beobachteten sie unter diesen Bedingungen eine erhöhte Restitutionsgeschwindigkeit unter HIV-typischen Zytokinen.

Primärer Fokus der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluß der HIV-typischen Zytokine auf die Restitution einer Einzelzellläsion an der Kolonepithelzelllinie HT-29/B6 zu untersuchen.

Dabei bot die in der Arbeitsgruppe bereits etablierte Methode der Conductance-scanning Technik die Möglichkeit unter in vitro-Bedingungen eine ständige Perfusion und Temperierung des Monolayers zu gewährleisten. Über eine spitz ausgezogene, CaCl₂-gefüllte Glaskapillare wurde ein Strom appliziert, der zur Zerstörung einer einzigen Zelle im Epithelverband führte. Über die nun veränderten Leitwerte wurde die Größe des Lecks und dessen Restitution dokumentiert. Weiterhin wurden das entstandene Leck und seine Reparatur durch Immunfluoreszenzfärbungen und mittels der konfokalen Mikroskopie visualisiert. Dabei wurden Antikörper gegen Tight-junction und Tight-junction assoziierte Proteine eingesetzt.

4.1 Bisherige Untersuchungen zur Restitution von Einzelzellläsionen

A.J. Hudspeth (1975) beschrieb an dem nativen Gewebe der *Necturus* Gallenblase erstmalig die Läsion einer einzelnen Zelle im Epithelverband. Dabei wurde der Defekt sowohl elektrophysiologisch als auch morphologisch dokumentiert. Er konnte zeigen, dass Zellen kontinuierlich in den Defekt migrieren und ihn innerhalb von 30 min ausfüllen. Die elektrophysiologische Messung zeigte, dass das entstandene Leck ebenfalls in der gleichen Zeit verschlossen war. Mittels elektronenmikroskopischer Verfahren wurde gezeigt, dass neue Tight junctions gleichzeitig gebildet wurden. Es wurde somit ein schneller Reparaturprozess nach dem Verlust einer Einzelzelle mit Wiederherstellen des epithelialen Verbands gezeigt.

Die Restitution einer Einzelzellläsion am intestinalen Zellmodell HT-29/B6 wurde bereits von Florian et al., 2002 untersucht. Nach dem Setzen eines Einzelzelldefektes konnte beobachtet werden, dass sich die angrenzenden Zellen abflachten und sich mit ihren basalen Zellanteilen in Richtung Lücke verschoben. Weiterhin war 3 bis 10 Minuten nach Setzen des Defektes ein Aktinband rund um die Lücke nachweisbar, woran Tight junction-Proteine assoziiert waren. Somit zeigten sie eine schnelle Reparatur, die durch den Aktin-und Myosin-Interaktion vermittelten „purse-string-Mechanismus“ und sich gleichzeitig ausbildender Tight junction gekennzeichnet war. Günzel et al., 2006 wiesen darauf hin, dass sich die Restitution von Einzelzellläsionen am Zellmodell (ebenfalls HT-29/B6) von der an nativem Kolonepithel der Maus unterscheidet. Es konnte eine schnelle Restitution dokumentiert werden ($\tau = 0,28$ min statt $\tau = 5,73$ min in der Zellkultur), außerdem zeigte sich eine höhere Sensitivität gegenüber den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α und IFN- γ .

4.2 Zellmodell HT-29/B6

Das Zellmodell HT-29/B6 ist für die Dokumentation von Restitutionsprozessen dahingehend gut geeignet, dass es die bei elektrophysiologischen Experimenten auftretenden längeren Messzeiten gut toleriert. Bei der Durchführung der Versuche wurde ein Zeitfenster von etwa einer halben Stunde bis zu zwei Stunden pro Monolayer benötigt. Grundsätzlich unterscheidet es sich zwar von nativen Kolonkryptenzellen, weist aber wie Kryptenzellen die typische Mukus- und Chloridsekretion auf (Kreusel et al., 1991). Weiterhin zeigte sich von Vorteil, dass die Zellkultur flach ist und kein Subepithel aufweist, daher ergibt sich eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

4.2.1 Neuformierung der untersuchten Strukturen nach Einzelzellläsion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden das integrale Tight junction-Protein Occludin und das zu den Zell-Zell-Verbindungen (Adherens junction) zählende E-Cadherin in HT-29/B6-Zellen nach Einzelzellläsion morphologisch mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik dargestellt. Durch Abdichtung und Verschluss des Schadens wurde die gleiche Leitfähigkeit wie in intaktem Epithel erreicht. Bei der Beurteilung der Restitution von Einzelzellläsionen genügt die Dokumentation eines Zeitintervalls, das wenige Minuten umfasst. Das unterscheidet den Messvorgang von der Betrachtung größerer Läsionen, die über Stunden bis zu Tagen repariert werden. Der parazelluläre Weg wird effektiv durch Tight junction verschlossen, dabei macht der parazelluläre Weg bei HT-29/B6-Zellen nur ein Fünftel der epithelialen Gesamtleitfähigkeit aus (Schmitz et al., 1999; Gitter et al., 2000b). Durch Neuformierung der Tight junction kann die parazelluläre Leitfähigkeit eines intakten Epithels wiederhergestellt werden. Diese Tatsache gibt einen Hinweis darauf, dass sich Tight junction nach Verletzung neu formieren können. Die Cadherine spielen dabei eine zentrale Rolle: Danjo & Gipson (1998) untersuchten den Wundschluss an epithelialen Wunden unter Zugabe eines Antikörpers gegen E-Cadherin. Unter diesen Bedingungen beobachteten sie das Auseinanderreißen von Aktinfilamenten,

ausgezogene Lamellipodien und das Entstehen von unregelmäßigen Defekträndern.

Neuformierung der Tight junctions

Im Rahmen der Wundheilung können sich Tight junctions neu formieren. Rajasekaran & Rajasekaran (2003) veröffentlichten folgendes Zwei-Phasen-Modell:

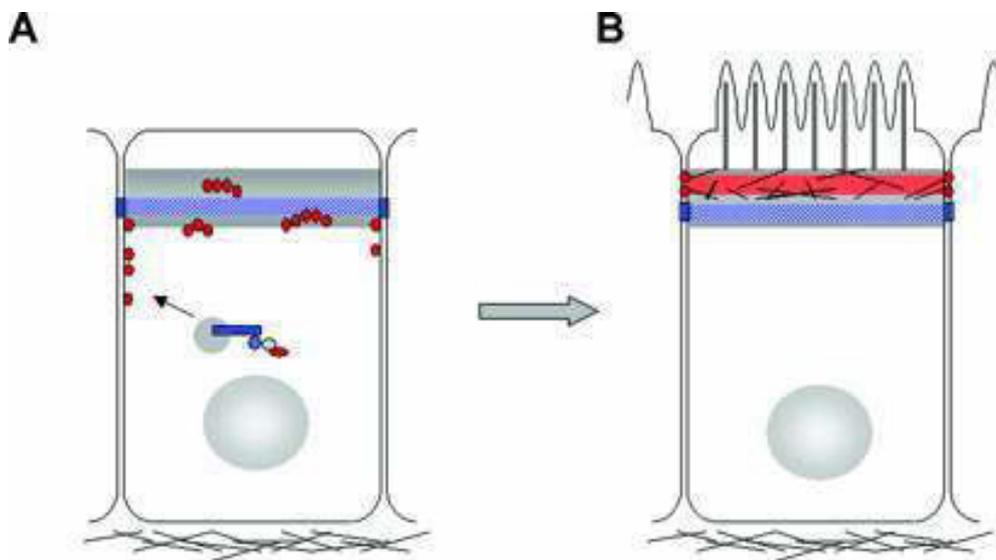


Abb. 31: Neuformierung der Tight junction nach Ruptur

Schematische Darstellung der im Wesentlichen in zwei Schritten ablaufenden Formierung der Tight junction.

Schritt 1 (linkes Bild): Die Tight junction Proteine werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) der Zellen synthetisiert und in Vesikeln zum Golgi-Apparat und weiter zur Membranoberfläche transportiert. Hier bilden sie partielle Tight junction-Stränge. Die an Tight junction-Proteine assoziierten Aktinfilamente formieren an der apikalen Zellmembran einen Aktinring. Das indirekt mit ZO-1 assoziierte E-Cadherin gelangt ebenfalls in Vesikeln zur Membranoberfläche (Rajasekaran et al., 1996) und bildet hier die Grundlage für die Entstehung der Adherens junction. An der Zellmembran bilden ZO-1, das an das Zytoskelett assoziiert ist, Occludin und Claudin diskontinuierliche Tight junction-Stränge.

Schritt 2 (rechtes Bild): Durch die Polymerisierung von langen Bündeln von Aktinfasern, stress fibers genannt, kommt es zur Stabilisierung und Ausrichtung der zunächst diskontinuierlich angeordneten Tight junction. Somit erhalten sie ihre gürtelförmige Struktur. Diese kompletten Tight junction regulieren den parazellulären Transport und ordnen sich an der apikolateralen Membranoberfläche an.

Entnommen aus: Rajasekaran & Rajasekaran (2003)

Einen Beleg für den Ablauf der Tight junction-Neubildung in Abhängigkeit von der E-Cadherin erbrachten Gumbiner et al. (1988) indem sie MDCK-Zellen mit Antikörpern gegen Uvomorulin/E-cadherin inkubierten und eine Behinderung der Zell-Zellkontakte und Blockierung des Transports von ZO-1 zur Oberfläche der Membran beobachteten. Nach Setzen einer Einzelzellläsion werden sämtliche Zellkontakte benachbarter Zellen beschädigt, sämtliche Zell-Zell-Adhäsionen und Tight junction der kontaktgebenden Zellen gehen unter. Für die folgenden Reparaturprozesse beschrieben Adams et al., 1998 drei Sequenzen, die durch die Umformung von E-Cadherinen und Aktinsträngen zu kondensierten Plaques durchlaufen werden und Zell-Zell-Adhäsionen entstehen lassen.

Neuformierung des E-Cadherins nach Ruptur

Der enge Kontakt zwischen benachbarten, jedoch nun mobilen Zellen um den Defekt herum, bewirken eine Verschmelzung von E-Cadherin-Molekülen zu punktuellen Aggregaten, entlang ihrer Kontaktmembran. An diesen einzelnen E-Cadherin-Aggregaten kommt es an der intrazellulären Seite zu dem Abzweigen von Aktinfilamenten vom Aktinring, über den jede Zelle verfügt. Die abgezweigten Aktinfilamente sondern sich ab, sodass zwei Enden des Aktinstranges entstehen, die sich zum äußeren Umfang des Kontaktes bewegen. Auch E-Cadherin bewegt sich zum Rand der Zelle, wo sich die Moleküle zu großen E-Cadherin-Plaques vereinigen. So entsteht ein Aktinring, der beide an dem Kontakt beteiligte Zellen umschließt und an jedem Kontaktpunkt in E-Cadherin-Plaques eingebettet ist. In diesem Stadium spricht man von Verdichtung (maximaler Kontakt). Diese Mechanismen wiederholen sich, wenn sich einzelne Zellen an Gruppen von Zellen anheften.

Dieser Schritt tritt auf, wenn weitere Zellen zu einer Gruppe von mehr als drei benachbarten Zellen hinzukommen. Der Aktinring (an Kontaktstellen mit E-Cadherin-Plaques verbunden) beginnt sich durch den *purse string-Mechanismus* zu verdichten. Es entstehen weitere Verschmelzungen neuer Plaques an den neu entstandenen Kontaktpunkten. Diese Reorganisation von E-Cadherin und Aktin führt zu einer Kondensation von Zellen zu Kolonien.

Diese Mechanismen werden bei der Restitution von Einzelzellläsionen an epithelialen, polygonalen Zellen vollzogen. Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit 10 min nach Setzen einer Einzelzellläsion nur Occludin, nicht aber E-Cadherin beobachtet werden. Vermutlich kam es zu einem späteren Zeitpunkt zum Wiedereinbau von E-Cadherin. Diese Ergebnisse widersprechen den oben beschriebenen Mechanismen zur Neuformierung. Eine Verifizierung der Zusammenhänge könnten entsprechende konfokale Immunfluoreszenzbilder des E-Cadherins zu späteren Zeitpunkten nach Läsion erbringen.

4.2.2 Verbindung Adherens Junction – Tight junction

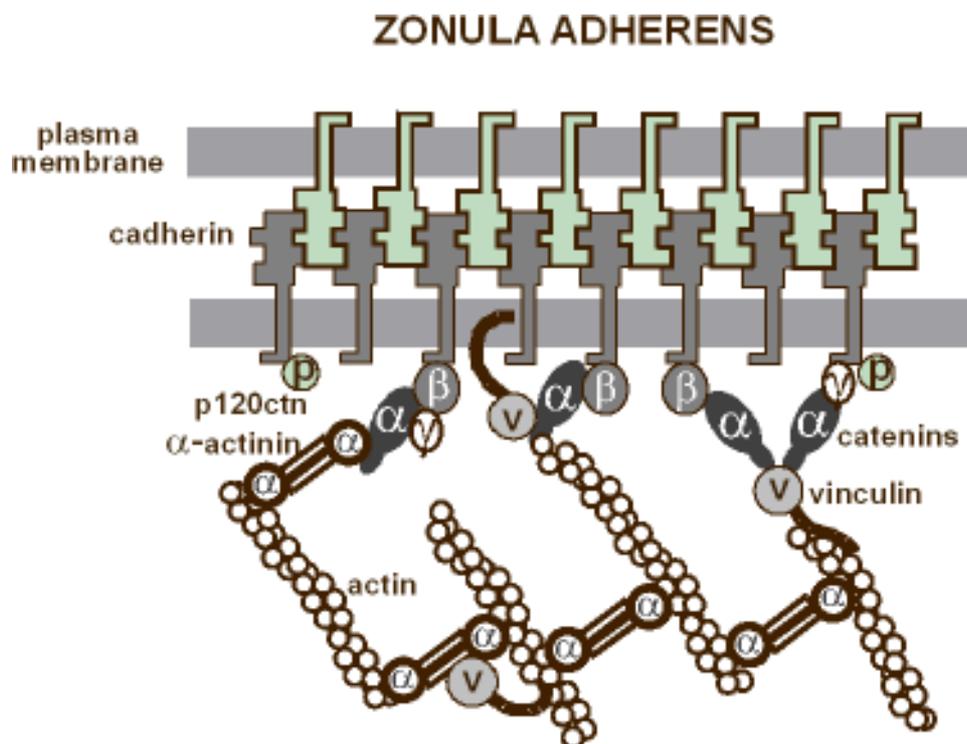


Abb. 32: Schematische Darstellung der Zonula adherens.

Den unmittelbaren Zell-Zell-Kontakt schliessen die Cadherine (weisen eine extra, eine intrazelluläre und eine transmembranäre Domäne auf). Die jeweils intrazellulär gelegenen Aktinfilamente finden über die Gruppe der Catenine und Vinculin Kontakt zu den Cadherinen. Entnommen aus: <http://herkules.oulu.fi/isbn9514269306/html/x477.html>, 13.02.2011

E-Cadherine vermitteln die Zell-Zell Adhäsion, sie sind Ca^{2+} -abhängig. Bei

ansteigendem extrazellulärem Ca^{2+} -Spiegel zeigen die E-Cadherine eine veränderte Anordnung und Löslichkeit in Keratinozyten. Unter anderem beginnen sich Cadherine, Integrine, α -Catenin, β -Catenin, Vinculin und α -Actin unter diesen Bedingungen an den Zellränder zu akkumulieren (Braga et al., 1995). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Anordnung und Schichtung von humanen Keratinozyten der Interaktion von E-Cadherinen und Integrinen mit dem Aktin-Zytoskelett bedürfen. Rimm et al., 1995 demonstrierten die direkte Bindung von α -(E) Catenin an F-Aktin und eine Bindung β -Catenin an den α -Catenin-Aktin-Komplex, nicht aber direkt an die Aktinfilamente. Insofern nimmt α -Catenin Einfluß auf die Organisation und die Stabilität der Aktinfilamente an den Zell-Zellkontakten.

Das extrazelluläre Calcium beeinflusst über die Cadherine die Formierung der Tight junction. Bei normalen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen formiert sich die Tight junction und bildet einen festen Verband (Contreras et al., 1992). Anscheinend schädigt die Erniedrigung des extrazellulären Calciums die Barrierefunktion der Tight junctions, denn unter diesen Bedingungen entsteht aus einem zuvor dichten Epithel ein leckes Epithel, gemessen am parazellulären Widerstand. Jedoch ist die Dauer der Restitution einer Einzelzellläsion unter Calciumentzug (Konzentration) nicht signifikant verlängert (Florian, 2002), sodass die Vermutung nahe liegt, dass Calcium indirekt auf die Tight junction einwirkt.

Bei einer extrazellulär erniedrigten Calciumkonzentration wird die Anordnung der Tight junction über Diacylglycerol (second messenger Substanz) vermittelt. Eine Neuorganisation der calciumabhängigen E-Cadherine ist allerdings nicht zu beobachten (Balda et al., 1993). Somit veranlasst anscheinend die Änderung der Calciumkonzentration die (Neu)-Formierung der Tight junctions über die Cadherine.

Quinlan und Hyatt, 1999 zeigten an epithelialen Zellen, dass für die Neuorganisation von Cadherin-Catenin-Komplexen ein etabliertes, rings um eine Zelle (bzw. einen Defekt) entstandenes Aktinfilamentgeflecht Bedingung ist. Durch ZO-1 und ZO-2 entsteht eine Verknüpfung zwischen den transmembranären Bestandteilen der Tight junction und den zytosolischen Aktinfilamenten (González-Mariscal 2003).

4.2.3 Verschluss durch Restitution nach Schädigung des Monolayers HT-29/B6

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden dreidimensionale Bilder mithilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops erstellt. Die dafür angefertigten immunhistologischen Färbungen dienten der eindeutigeren Darstellung der jeweiligen Proteine im Zellverband. Man sieht in den apikalen Aufnahmen Einzelzellläsionen umgeben von intakten Zellen 10 Minuten nach Setzen eines Schadens. Bilder, die die Basis der Zellen darstellen, lassen einen sich schließenden Defekt erkennen. Es zeigte sich eine für den zuvor beschriebenen purse string-Mechanismus typische Morphologie der Defektrestitution. Zur Verdeutlichung des purse string-Mechanismus kommen in der folgenden Abbildung Immunfluoreszenzfärbungen von ZO-1 und F-Aktin zur Darstellung (Florian, 2002).

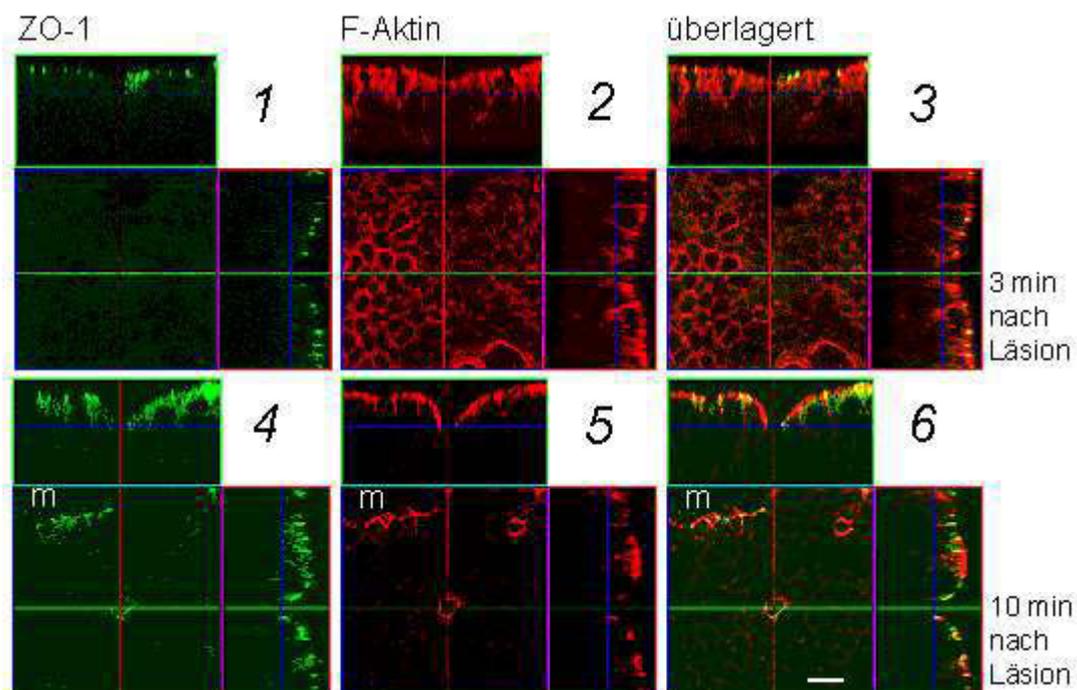


Abb. 33: Immunfluoreszenzfärbungen von ZO-1 und F-Aktin

HT-29/B6-Zellen wurden jeweils mit ZO-1-Antikörpern (grün fluoreszierend, Bilder 1 und 4) und Alexa Fluor 594-phalloidin (rot fluoreszierend, Bilder 2 und 5) behandelt. Die Bilder 3 und 6 zeigen Überlagerungen der Bilder der ZO-1 und F-Aktinfärbungen. Alexa Fluor 594-phalloidin ist ein spezifisches Pilzzellgift, das F-Aktin bindet und das Gleichgewicht

zwischen freien Monomeren und Aktin-Polymeren zugunsten der Polymere verschiebt, indem es die Depolymerisation behindert. In der oberen Zeile kommen die Zellen 3 Minuten nach Setzen einer Einzelzellläsion zur Darstellung, in der unteren sieht man die Restitution des Schadens nach 10 Minuten. Entnommen aus: Florian, 2002

Die sich überlagernden Bilder 3 und 6 lassen eine Aussage zur Assoziation beider angefärbten Proteine zu. Es konnte eine partielle Kolo-kalisation von ZO-1 und F-Aktin nachgewiesen werden (Gelbfärbungen in Bild 6). Im Bild 2 (3 Minuten nach Läsion) liessen sich Fragmente von F-Aktin in den den Defekt umrandenden Zellmembranen beobachten.

10 Minuten nach Setzen des Defekts konnte ein Ring von ZO-1 und ein breites F-Aktinband um den Defekt herum dokumentiert werden (Bild 5). Das periphere Tight junction-Protein ZO-1 konnte in der „späteren“ Restitutionsphase (nach 10 min) als assoziierter, schmaler Ring um das dichte Aktinband abgebildet werden (Bild 6). Eine weitere wichtige Beobachtung war, dass das Erscheinen des Aktinbandes am basalen Umfang benachbarter Zellen viel ausgeprägter war als apikal. Für den Reparaturmechanismus war entscheidend, dass keine Lamellipodien nachweisbar waren. Daher und wegen des breiten Aktinbandes wurde von dem aktinabhängigen purse string-Mechanismus ausgegangen.

Die im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Immunfluoreszenzfärbungen des integralen Tight junction-Proteins Occludin und des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin nach ebenfalls 10 Minuten nach Lädieren einer Zelle zeigten, dass sich nur Occludin, nicht aber E-Cadherin nachweisen ließen. Da E-Cadherin über die Gruppe der Catenine an Zweige der Aktinfilamente assoziiert ist, bildet auch E-Cadherin hier ein Aggregat. Es entstehen neue Zell-Zell-Kontakte. Occludin könnte sich als integrales Tight junction-Protein nach 10 Minuten schon wieder in die apikolateralen Zellmembranen eingebracht haben (Furuse et al., 1993). Occludin organisiert sich neu um den Defekt herum und findet über die peripheren Tight junction-Proteine ZO-1 und ZO-2 bzw. ZO-1 und ZO-3 Kontakt zum intrazellulären Aktin, dass den zur Restitution beitragenden purse string-Mechanismus vermittelt.

Das Fehlen von E-Cadherin nach Läsion könnte damit zusammenhängen, dass es

nicht an der frühen Restitution eines Einzelzelldefektes beteiligt ist und zeitlich verzögert organisiert wird.

Intakte intestinale Zellen weisen am apikalen Zellumfang einen Aktinring auf. Nach Setzen einer Einzelzellläsion am Monolayer HT-29/B6 war dieses Aktinband in den dem Defekt benachbarten Zellen nicht mehr nachweisbar (Florian, 2002). Im Rahmen der Restitution formieren sich ZO-1 (Stevenson et al., 1986) und Occludin (Furuse et al. 1993) um den Defekt und kolokalisieren mit Aktin im basalen purse-string (Florian, 2002). Durch die auch oben beschriebene Tight junction-Neuformierung kommt es zur Ausbildung eines vollständigen Ringes um den Defekt, welchem jedoch die stabilisierenden Gegenspieler fehlen. Diese Lücke wird durch die Rolle des (E)-Cadherins erklärt (Danjo und Gipson et al., 1998). ECCD-1, ein Antikörper gegen E-Cadherin, ließ bei epithelialen Verbänden unregelmäßige Defekte entstehen. Dabei bildeten dem Defekt benachbarte Zellen Ausläufer (Lamellipodien) aus. E-Cadherin findet über Catenine (siehe Abbildung 32) Kontakt zu den Aktinfilamenten. Die Funktionseinheit einer Adherens junction entsteht. Die Ausbildung von Lamellipodien weist darauf hin, dass „große“ epitheliale Defekte entstanden sind. Dabei weist jede epitheliale Zelle Cadherine auf. Somit ist die Übertragbarkeit auf die Experimente und Ergebnisse der vorliegenden Arbeit insofern bedingt, als dass die Reparatur von Einzelzellläsionen nicht über Migration und die Ausbildung von Lamellipodien geschieht, sondern über den purse string-Mechanismus und die simultane Ausbildung von Tight junction-Proteinen vermittelt wird.

4.3 Relevanz des "purse string-Mechanismus"

Florian, 2002 beschrieb den purse-string Mechanismus einer Einzelzellläsion im Detail:

Zunächst flachten sich die dem Defekt benachbarten Zellen an ihrem basalen Ende ab. Aktinfilamente waren in der Nähe der Zellmembran, an der Seite des Defektes, nachweisbar. Hierbei handelte es sich um einen Prozess der scheinbar nur durch die fehlende Stabilität nach Lösen einer Zelle aus dem epithelialen Verband entstand, da

die spezifische Hemmung einzelner Bestandteile des Aktin-Myosin-Motors (Cytochalasin D; 2,3-Butandion Monoxim und ML-7) in dieser Phase keinen Effekt erzielten. Im Einzelnen wird das Zytoskelett durch diese Inhibitoren moduliert: Cytochalasin D 2,3-Butandion Monoxim (nicht-kompetetiver Hemmstoff der Myosin ATPase) und ML-7 (Inhibitor der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase). Durch die Phosphorylierung der Myosin-Leichte-Ketten wird Kontraktion, Sekretion und Zellmotilität reguliert (Matsumura et al., 1999, Kaneko et al., 2002).

Abbildung 34 zeigt die Bildung eines Aktinbandes der angrenzenden Zellen. Es kam zum sichtbaren Verschluss des Lecks. In dieser Phase mit organisierten Aktinfilamenten, die sich zu einem kontinuierlichen Band formierten wurde die Hemmung der Zytoskelettdynamik möglich.

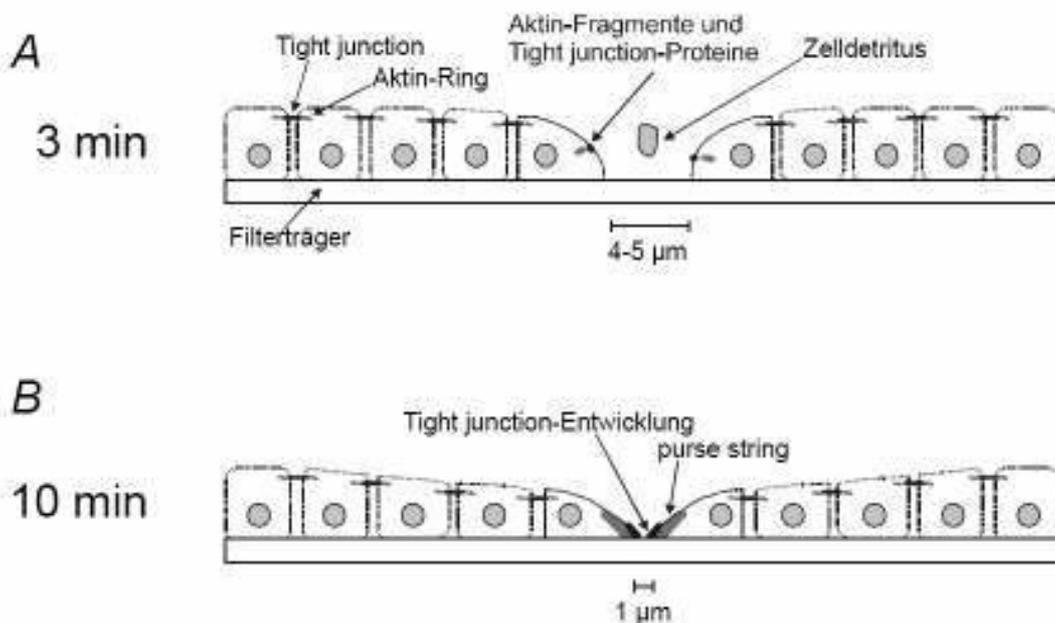


Abb. 34: Schematische Darstellung der Restitution einer Einzelzellläsion am einschichtigen Epithel

Wie bereits oben beschrieben bilden Zellen eines intakten Epithels an ihrem apikalen Pol einen Aktinring, dieser befindet sich jeweils zwischen benachbarten Zellen und steht mit Tight junction-Proteinen in Verbindung. Gemeinsam mit Myosin ist der Aktinring für die Regulation der parazellulären Permeabilität der Tight junctions wesentlich.

In der oberen Abbildung sieht man einen nach Einzelzellläsion entstandenen Zelldetritus. Die benachbarten Zellen haben den Kontakt über ihren Aktinring zur zerstörten Zelle verloren. Durch

fehlende Stabilität flachen diese Zellen ab, sie verlagern ihre basalen Zellanteile in den Defekt hinein. Die untere Abbildung zeigt einen Aktin-Myosin-Ring (purse-string), der sich durch die dem Defekt angrenzenden Zellen zieht und die Grundlage für die Neuformierung der Tight junctions ist. Entnommen aus: Florian, 2002

Da Bestandteile des Zytoskeletts mit den Tight junction-Proteinen assoziiert sind, wird durch die Bildung eines kontinuierlichen Aktinbandes in den Defekt angrenzenden Zellen die Voraussetzung dafür geschaffen, dass sich auch Tight junction-Proteine neu ordnen.

Der „purse string“-Mechanismus wurde zuvor in der Literatur beispielsweise durch Bement et al., 1993 beschrieben. In dieser Arbeit wurde anhand der intestinalen, epithelialen Zelllinie CaCo 2-BBe die Reparatur einer schlitzförmigen Wunde untersucht. Es konnten zwei Schritte beschrieben werden: Zuerst bildeten sich Lamellipodien, die in den Defekt hineinragten. Anschließend war ein Verschließen der Wunde durch den purse-string Mechanismus zu verzeichnen, dabei bildeten sich deutliche Bogen und Ringe (neue Zytoskelettstruktur) in den Defekt zugewandten Zellen. Immunfluoreszenzanalysen konnten die Existenz von Ansammlungen von Aktinfilamenten, Myosin-II, Villin, und Tropomyosin in den neuen Zytoskelettstrukturen bekräftigen. Weiterhin gelang die Quantifizierung von Aktin, Myosin II, and ZO-1 und zeigte den Beginn der Akkumulation nach etwa 5 Minuten nach Defektsetzen und erreichte ein Maximum innerhalb von 30 bis 60 Minuten. Durch die neu gebildete Zytoskelettstruktur wird die Polarität (apikal/basolateral) der Zellen aufrecht erhalten.

Eine weitere wichtige Arbeit in diesem Zusammenhang stellen die Untersuchungen von Russo et al., 2005 dar. Hier konnte dargelegt werden, wie die Kontraktion des Aktinomyosinrings reguliert wird. Dafür wurden kleine Wunden (oligozelluläre- und Einzelzell-Defekte) in intestinalen, epithelialen Monolayern und in humanen Biopsien gesetzt. Zwei Minuten nach Setzen des Defektes konnte eine rasche Anordnung von Aktin als Ring verzeichnet werden. Dieser Schritt ist Rho-Kinase-abhängig. Innerhalb von acht Minuten (nach Setzen des Defektes) entwickelt sich aus den ringförmigen Anordnungen ein sich um den Defekt ringsum verlaufendes Aktinband (Phase der Ringkontraktion). Diese Phase konnte durch das Inhibieren der Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) verlangsamt und gestoppt werden. Weiter wurde gezeigt, dass der

purse string-Mechanismus auch in vivo stattfindet, denn die phospholylierte MLC reicherte sich auch um oligozelluläre Wunden in humanen Biopsieproben an.

Bei der Kontraktion von Aktin und Myosinfilamenten schieben sich die Myosinköpfe durch Phosphorylierung der MLCK entlang der Aktinfilamente. Die Rho-Kinase kann diese Phosphorylierung hemmen. Unter anderem regulieren diese beiden Mechanismen die Kontraktion und Relaxation an Muskelfilamenten.

In Bezug auf Einzelzellläsionen am Monolayer HT-29/B6 konnte eine fast vollständige Blockierung der Restitution durch Inhibition der Myosin-leichte-Ketten-Kinase mittels ML-7 verzeichnet werden, im Gegensatz zum Rho-assoziierten Proteinkinase-Inhibitor Y-27632, der keine Einflussnahme auf die Restitution hatte (Florian, 2002).

Untersuchungen von Einzelzellschäden an nativem Kolonepithel der Maus zeigten, dass die Restitution der kleinen Wunde vor allem über den purse string-Mechanismus und weniger über Migrationsmechanismen bewältigt werden (Florian et al., 2001; Florian, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wird von einer Beteiligung des "purse-string-Mechanismus" an der Restitution von künstlich erzeugten Einzelzellläsionen am Monolayer HT-29/B6 ausgegangen. Die typischen Mechanismen des purse-string werden anhand der Bilder der konfokalen Immunfluoreszenzmikroskopie (Florian, 2002) deutlich (Kap 4.2.3.). Auch die Durchlässigkeit der Tight junction wird durch die Beeinflussung des Zytoskeletts, genauer der beteiligten Aktinfilamente, reguliert. Substanzen, wie Zytokine können Aktinfilamente in ihrer Organisation behindern (Montesano et al., 1976; Bentzel et al., 1976). Cytochalasin D (ein Pilzgift, das an freie Aktinfilamentenden binden kann) hat ebenfalls die Potenz deren Organisation zu hemmen (Cooper, 1987). Es ließen sich Aktinansammlungen im apikalen Bereich von HT-29/B6-Zellen und an apikalen und basalen Enden von MDCK-Zellen nachweisen (Florian, 2002; Stevenson und Begg, 1994).

4.4 HIV-typische Zytokine im Einzelzellrestitutionsmodell

Unter HIV-typischen Zytokinen wurde eine Verzögerung der Restitution von Einzelzellläsionen beobachtet, die über die Effekte der einzelnen Zytokine deutlich hinausging. Es zeigt sich somit ein synergistischer Effekt der einzelnen im Rahmen der Arbeit untersuchten HIV-typischen Zytokine. Es ist zu vermuten, dass dieser größtenteils auf dem Synergismus von TNF- α und IFN- γ beruht. Diese Kombination wurde zwar im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, jedoch liegen Ergebnisse für die Kombination am Zellmodell und nativem Gewebe vor (siehe Kap. 4.6.1.). Weiterhin kommt IL-1 β beim Zustandekommen des oben genannten Ergebnisses ebenfalls eine größere Bedeutung zu, denn es wurde in einer relativ hohen Konzentration verwendet.

Da alle vier HIV-typischen Zytokine in Kombination eine signifikante Verzögerung der Restitution bewirkten, kann man daraus den Schluß ziehen, dass diese Zytokine einen direkt schädigenden Effekt am Zytoskelett der umliegenden Zellen hervorrufen. So wurde TNF- α ein Auseinanderreißen des Aktin-Zytoskeletts, des Vinculins, der Keratinfilamente und der Mikrotubulis zugeschrieben (Domnina et al., 2002). Über Vinculin und die α -Catenine finden die Aktinfilamente Kontakt zur Zellmembran. Somit kann die direkte Schädigung des Zytokins eine mögliche Ursache für die verzögerte Restitution sein.

4.5 Einzelne Zytokine im Restitutionsmodell

Stockmann et al., 2000 zeigten, dass bei der HIV Infektion von humanen Immunzellen ein Anstieg von bestimmten Zytokinen induziert wird, dazu gehören z.B.: TNF- α , IL-1 β , IFN- α , and IFN- γ . Diese Zytokine haben das Potential die epitheliale Barrierefunktion der Zelllinie HT-29/B6 herabzusetzen.

Kelly et al. (1996) machten verschiedene Zytokine, wie TNF- α , IL-1, IL-6 und IFN- α , als Zeichen einer systemischen Immunaktivierung für den körperlichen Verfall (wasting syndrome) von AIDS-Patienten verantwortlich.

4.5.1 TNF- α

In der Kolonepithelzelllinie HT-29/B6 war die Restitutionsgeschwindigkeit der Zellen durch die Vorinkubation mit TNF- α um 14% verzögert. Somit ruft TNF- α einen schädigenden Effekt an der Kolonzelllinie HT-29/B6 hervor. Gitter et al., 2000a beschrieben ebenfalls den destruierenden Effekt dieses Zytokines, indem sie (auch an HT-29/B6) nachwiesen, dass TNF- α die Anzahl der Tight junction-formierenden Stränge dezimiert und vermehrt Apoptosen induziert. In der Folge sank der transepitheliale Widerstand, weil die parazelluläre Ionenpermeabilität anstieg.

Ma et al., 2005 machten nach Vorinkubation von CaCo 2-Zellen mit TNF- α (10 ng/ml) eine signifikante Zunahme der Expression der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK) für die ansteigende Tight junction-Permeabilität verantwortlich.

In einer früheren Arbeit dieser Arbeitsgruppe konnte der Nuclear Factor-kappa B (NF- κ B) als wichtiger Transkriptionsfaktor bei der Aktivierung von bestimmten Genen, unter anderem die von proinflammatorischen Zytokinen, unter Behandlung von CaCo 2-Zellen mit TNF- α , nachgewiesen werden (Ma et al., 2004).

Rodriguez et al., 1995 untersuchten die Wirkung von TNF- α auf die Kolonkarzinomzelllinie HT-29cl.19A (eine humane, intestinale Zelllinie). Sie kombinierten TNF- α (10 ng/ml) and IFN- γ (5 U/ml), da IFN- γ TNF- α -Rezeptoren induziert und man annimmt, dass eine so geringe Konzentration des Interferons auf den Monolayer nicht toxisch wirkt. Durch Gefrierbruchlektonenmikroskopie und Mannitol-Flux-Messungen an Ussingkammern konnte eine angegriffene Tight-junction-Struktur in apiko-basaler Richtung und der Tight junction-Tiefe dokumentiert werden.

Sharpstone et al. (1996) untersuchten das TNF- α im Stuhl (fekaler FTNF- α) von HIV-Patienten mit Diarrhoe, die bakteriell, CMV-bedingt oder durch Mikrosporidien verursacht war. In allen Fällen konnte eine signifikant erhöhte Konzentration von FTNF- α festgestellt werden im Vergleich mit Patienten, deren Diarrhoe nicht durch pathogene Erreger verursacht war.

Die Häufigkeit epithelialer Apoptosen wird durch Zytokine der TNF-Familie erhöht. Zusammenfassend betrachtet wird damit die zentrale Rolle von TNF- α in Bezug auf

die intestinale Epithelbarriere deutlich (Demetter et al., 2000 ; Levine et al., 2000).

4.5.2 IL-1 β

Als zweites wurde die Wirkung des Zytokins Interleukin-1 β mit einer Konzentration von 150 U/ml (entspricht 15 ng/ml) auf die Zelllinie HT-29/B6 untersucht.

Interleukin-1 β ist in intestinalen Biopsien von HIV-Patienten erhöht (Kotler et al., 1993; McGowan et al., 1994).

Al-Sadi, Ma 2007 wiesen darauf hin, dass Interleukin 1- β (bis 100 ng/ml) ebenfalls eine Permeabilitätserhöhung an intestinalen Zellen (anhand des Modells CaCo 2) hervorruft, teilweise vermittelt über die Aktivierung von NF- κ B.

In dem Restitutionsmodell von Dignass, Podolsky, 1993 wurde der intestinalen Zelllinie IEC-6-Zellen ein „oberflächlicher“ Schaden zugefügt, um die sich anschließende Migration in Hinblick auf die Wirkung bestimmter Zytokine (TGF- α , EGF, IL-1 β , IFN- γ und IL-6, TNF- α , PDGF) und den Effekt ohne Beisein der Zytokine zu beurteilen. Die Auswertung der Ergebnisse machte deutlich, dass die Restitution der Wunde durch manche Zytokine (darunter IL-1 β) beschleunigt war, was auf die Produktion des bioaktiven Peptids TGF-1 β in der Zelllinie IEC-6 zurückzuführen war. Diese Annahme konnte dadurch bestätigt werden, dass der Einsatz eines spezifischen Antikörpers (Anti-TGF-1) gegen das Peptid auch die zuvor hervorgerufene Unterstützung der Restitution aufhob.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte weder geklärt noch ausgeschlossen werden, ob TGF-1 β in der Zelllinie HT-29/B6 durch die Zytokine IL-1 β oder IFN- γ gebildet wurde. In einer nachfolgenden Studie könnte eine mögliche Kausalität geklärt werden.

Es muss in diesem Zusammenhang aber angeführt werden, dass es sich in dieser Arbeit um die Untersuchung von Einzelzellläsionen handelt und nicht um die von mehreren 100 μ m Größe. Diese Läsionen werden durch Proliferation und Migration repariert, hier greifen andere Mechanismen als bei der Restitution von Einzelzellläsionen (Kap. 4.6.2.).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Restitution einer Einzelzellläsion durch die Behandlung mit Interleukin-1 β , analog der Vorinkubation mit TNF- α , um 14% verzögert. Das heißt, dass durch die Wirkung von Interleukin-1 β eine potentielle Eintrittspforte an der Zelllinie HT-29/B6 (bzw. am Darm) länger als unter physiologischen Bedingungen bestehen bleibt und somit auch Toxine, enterogene Bakterien und Viren begünstigte Voraussetzungen zum Permeieren haben.

Bode et al. (1998) wiederum stellten fest, dass nur IL-1 β und TNF- α , nicht aber IFN- α , IFN- γ , IL-6 und IL-8 durch einen sekretorischen Effekt die Diarrhoe bei entzündlichen Darmerkrankungen und bei AIDS beeinflussen. Hier wird also von einem anderen Diarrhoemechanismus ausgegangen. Jedoch können HIV-typische Zytokine die Restitution von Einzelzellläsionen verzögern und somit zur Diarrhoe bedingt durch Flux begünstigen und IL-1 β und TNF- α können ausserdem eine sekretorische Diarrhoe auslösen, sodass sich die zytokinvermittelten pathologischen Diarrhoemechanismen addierten.

4.5.3 IFN- γ

Interferon- γ wurde im Rahmen dieser Arbeit in einer Konzentration von 6 U/ml (entspricht 3 ng/ml) verwendet, indem der HT-29/B6 Monolayer für 24 Stunden vorinkubiert wurde. Dieses Zytokin zeigte mit 18 % die stärkste Hemmung der Restitution durch ein einzelnes Zytokin.

Madara und Stafford (1989) untersuchten den Effekt von IFN- γ auf die Zelllinie T84 (eine humane, intestinale, epitheliale Zelllinie). Es konnte eine beträchtliche Abnahme des epithelialen Widerstandes dokumentiert werden.

Andererseits zeigten Dignass und Podolsky (1993) anhand der intestinalen Zelllinie IEC-6, dass unter anderem IFN- γ über die Synthese von TGF-1 β die Restitution von epithelialen Läsionen begünstigt. Untersucht wurden in dieser Arbeit jedoch keine Einzelzellläsionen, sondern größere Wunden. Keine Veränderung der Restitutionsgeschwindigkeit nach Behandlung mit IFN- γ in derselben Konzentration (6 U/ml) und anhand dergleichen Zelllinie (HT-29/B6) zeigte Christ (2004), wofür möglicherweise die relativ geringe Konzentration verantwortlich war.

4.5.4 IFN- α

In der vorliegenden Arbeit wurde IFN- α im Rahmen von Einzelzellrestitutionsmodellen erstmalig untersucht. Dabei wurde eine Konzentration von 75 U/ml gewählt, analog dem von Schmitz et al. ermittelten HIV-Überstand (Schmitz et al., 2000). Die Auswertung der gemittelten Leitwerte zwischen der zweiten und der achten Minute nach Setzen einer Läsion ergab für IFN- α eine Restitutionsverzögerung von 9%, der geringste Effekt unter den einzelnen Zytokinen.

Interferon- α ist im Zuge einer HIV-Infektion im Blut und in der intestinalen Mukosa erhöht. Reka et al., 1994 untersuchten rektale Mucosabiopsate und wiesen darauf hin, dass IFN- α vor allem in der frühen Phase der Infektion erhöht ist. Es kann jedoch auch als potentielles Therapeutikum fungieren, denn Fan et al., 1993 zeigten, dass „natürliches“ IFN- α n3 gegenüber einer rekombinanten Form in Hinblick auf die Inhibierung der Replikation von HIV-1 effizienter war. IFN- α hemmt die Ausschleusung der Reversen Transkriptase und viralen Antigenen aus chronisch infizierten Zellen, außerdem wurde nachweislich die Abgabe ganzer HIV-Virionen aus entsprechenden Zellen in den Kulturüberstand unterdrückt (Poli et al., 1989). Diese widersprüchlichen Ergebnisse für den potentiellen Einsatz von IFN- α bzw. die Schädigung des Gewebes durch IFN- α spiegelt auch die Tatsache wieder, dass bei HIV-Patienten IFN- α sowohl erhöht (Grunfeld et al., 1991, bei 84% von AIDS-Patienten im Serum nachweisbar), als auch erniedrigt (Voth et al., 1990) sein kann.

4.6 Untersuchung verschiedener Restitutionsmodelle

4.6.1 (Synergistische) Wirkung von Zytokinkombinationen an HT-29/B6 und nativem Mauskolon

In früheren Arbeiten wurde die Auswirkung einer Kombination der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ bereits untersucht. Unter erhöhter IFN- γ -Konzentration kommt es zu einer vermehrten Expression des TNF- α -Rezeptors (Tsujiimoto et al. 1986). Florian (2002) inkubierte natives Mauskolon mit der Zytokinkombination und zeigte eine verlangsamte Restitution von Einzelzellläsionen, ein Effekt, der für TNF- α allein nicht nachweisbar war. Ein synergistischer Effekt wurde ebenfalls am Monolayer HT-29/B6 untersucht (Christ, 2004). Es wurden TNF- α (3×10^2 U/ml) und IFN- γ (6 U/ml) über 24 Stunden vorinkubiert und eine verringerte Restitutionsgeschwindigkeit von 16 % von großen Läsionen gegenüber Kontrollmessungen nachgewiesen.

Zunächst beobachtet man bei den Epithelzellen von nativem Mauskolon gegenüber HT-29/B6-Zellen allgemein eine erheblich beschleunigte Restitution.

Im Vergleich von vorinkubierten Zellen (TNF- α und IFN- γ) mit Kontrollzellen erkennt man eine deutlich eingeschränkte Restitution. Die Auswertung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergab ebenfalls einen synergistisch (hemmenden) Effekt, allerdings hier bezogen auf die Kombination aller HIV-typischen Zytokine. Die Restitution zwischen der 2. und der 8. Minute nach Setzen einer Einzelzellläsion wurde um 21 % gehemmt. Dieses Ergebnis könnte im Wesentlichen durch den oben beschriebenen Synergismus bedingt sein, denn IFN- α zeigte (einzeln) gegenüber Kontrollen nur eine verhältnismäßig geringe Restitionshemmung von 9 %. Um diese Behauptung zu verifizieren müssten nachfolgende Experimente mit TNF- α und IFN- γ in Kombination durchgeführt werden. Ebenfalls ist denkbar, dass die HIV-typischen Zytokine untereinander einen bestimmten Pfad von Signaltransduktionswegen hervorrufen, die einen Restitionseinfluss haben. Um diese Hypothese zu bestätigen, müssten weitere Studien angestrebt werden.

In früheren Arbeiten wurde der Einfluß der Zytokine TNF- α und IFN- γ (in Kombination)

auf die intestinale Barriere anhand von entsprechenden Experimenten an der epithelialen Zelllinie T-84 (Madara und Stafford, 1989) und anhand des Monolayers HT-29/B6 (Schmitz et al. 1999), beschrieben. Sie zeigten eine Verminderung des transepithelialen Widerstandes.

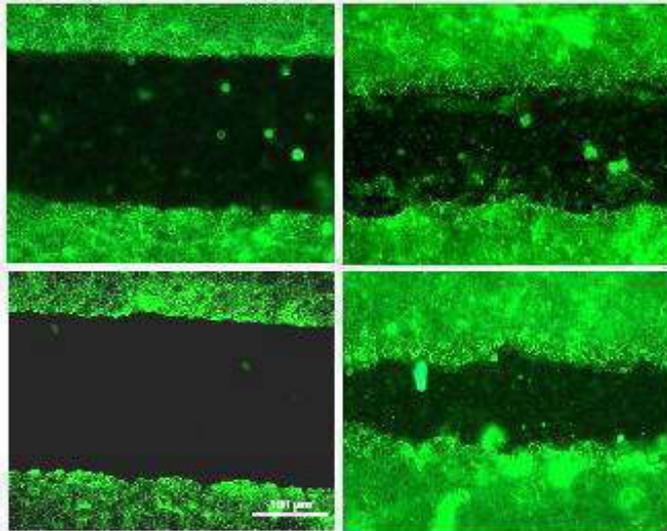
4.6.2 „Große“ Epitheldefekte an HT-29/B6

Die Restitution eines vielzelligen Epitheldefektes am HT-29/B6 Monolayer unter HIV-typischen Zytokinen ist bereits untersucht (Christ, 2004). Ein rechteckiger Epithelstreifen definierter Größe (200 x 2000 µm) wurde mit einer Glaskapillare aus dem Epithelbett herausgeschnitten. Darauf folgend wurden die defekten Monolayer entweder sofort fixiert und gefärbt oder erst nach zwei Stunden Vorinkubation. Nach Vorinkubation setzte bereits die Restitution ein.

Im Folgenden ist beispielhaft ein mit einem Defekt versehener Monolayer abgebildet (aus: Christ, 2004).

direkt nach Heraus-
preparieren des Mono-
layerstreifens

nach 2 h Inkubation



Kontrollen

nach 24-stündiger Vorinkubation
mit HIV-typischen Zytokinen

Abb. 35: Immunfluoreszenzbilder: Restitution unter HIV-typischen Zytokinen

obere Reihe: Kontrollen

untere Reihe: mit HIV-typischen Zytokinen inkubiert

linke Spalte: direkt nach Setzen des Defektes

rechte Spalte: nach zwei Stunden nach Defektsetzen

Zur Darstellung kommen die Zellgrenzen eines Monolayers von HT-29/B6-Zellen, aus dem ein Teil der Zellen entfernt worden war. In der linken Spalte sieht man den Defekt direkt nach dem Herauspreparieren aus dem Epithelverband. Die Schnittkante ist nahezu glatt. In der rechten Spalte kommen diese Monolayer nach zwei Stunden Inkubation unter Kontrollbedingungen (oben) und nach Inkubation mit HIV-typischen Zytokinen (unten) zur Darstellung. Deutlich sichtbar wird die beschleunigte Restitution unter HIV-typischen Zytokinen in Relation zum Kontrollmonolayer. Die rechte Spalte zeigt die Zellen nach zweistündiger Vorinkubation mit HIV-typischen Zytokinen. Nach 2 Stunden hat die Migration bereits eingesetzt, deutlich ist zu erkennen, wie sich die Zellen des Defektrandes über Lamellipodien ausstrecken. (Christ, 2004)

Unter Ausbildung von Lamellipodien wandern angrenzende Zellen ein und flachen ab. Weiterhin konnte eine Umverteilung der genannten Tight junction-Proteine beschrieben werden. Beim Fokussieren bis auf die Zellmembran konnte kaum noch angefärbtes Occludin bzw. ZO-1 nachgewiesen werden (Christ, 2004).

Die vergleichenden Bilder der Abbildung 35 geben einen deutlichen, visuellen Beleg dafür, dass die Restitution von epithelialen Wunden unter HIV-typischen Zytokinen

beschleunigt ist (Christ, 2004).

Am menschlichen Darm kann ein derartiger Defekt (200 x 2000 µm groß) zum Beispiel nach mechanischer Verletzung durch Nahrungsbestandteile entstehen. Die oben aufgezeigten Ergebnisse konnten belegen, dass unter der zusätzlichen Bedingung der HIV-Infektion die Reparaturgeschwindigkeit einer derartigen Wunde beschleunigt ist. Dieses Untersuchungsergebnis scheint für die Prognose „großer“ epithelialer Defekte am Darm von Vorteil zu sein. Hat die Wundheilung bereits eingesetzt und nimmt die Wunde das Stadium und die Größe einer Einzelzellläsion an, konnten die Ergebnisse dieser Arbeit einem gegenteiligen Effekt zugrunde gelegt werden. Dies führt zu der Fragestellung, wie solch diskrepante Resultate bei der Vorinkubation mit den gleichen HIV-typischen Zytokinen, in derselben Konzentration, am gleichen Monolayer entstehen. Für die greifenden Reparaturmechanismen von epithelialen Wunden am Darm ist die Tiefe der Läsion entscheidend und ob die Basalmembran in Mitleidenschaft gezogen wurde. Größere, tiefere Wunden benötigen Tage bis Wochen für die Heilung. Benachbarte Zellen migrieren in den Defekt. Die fehlenden Zellen müssen durch Zellproliferation ersetzt werden. Weiterhin bilden benachbarte Zellen von größeren Lecks Lamellipodien, also Ausläufer, die sich wie Füßchen in den Defekt vorschieben (Abb. 35). Daher wird auch verständlich, dass in diesem Fall die gleichen Zytokine einen anderen Effekt erzielen können. TNF- α steigert die Immunantwort und fördert die Wundheilung (Tracey und Cerami, 1989). Bei kleinen, oberflächlichen intestinalen Wunden wie Einzelzellläsionen, wird der Defekt durch Restitution und den purse string-Mechanismus repariert. Durch eine verzögerte Restitution von Einzelzellläsionen bleiben entstandene Lecks länger bestehen, was den Verlust von Soluten, die Entstehung von Leck-Flux Diarrhö und die Besiedelung der Wunde mit opportunistischen Keimen begünstigt.

Ob diese verzögernde Wirkung auf die Restitution von Einzelzellläsionen im Rahmen von HIV-Infektionen klinisch relevant ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden. In diesem Zusammenhang ist es von Bedeutung zu untersuchen, wie bzw. ob sich eine „große“ Läsion an HT-29/B6-Zellen unter HIV-typischen Zytokinen vollständig restituiert (siehe Kapitel 5).

4.6.3 EGF

EGF (Epidermal Growth Factor) und die Familie der TGF (Transforming Growth Factor) stellen wichtige Wachstumsfaktoren dar, die positiven Einfluß auf die Restitution von Mikrowunden an HGE-17-Zellen (Tetreault et al., 2008) und die von großen Defekten (200 x 2000 µm) an HT-29/B-Zellen (Christ, 2004) nehmen. Jedoch zeigte die EGF-Applikation keinen Effekt auf die Restitution von Einzelzellläsionen am HT-29/B6-Monolayer. Es wurde geschlussfolgert, dass EGF auf die Aktin-Myosin-Interaktion beim purse string-Mechanismus keine Auswirkungen hat (Florian, 2002).

4.7 Vergleich der HIV-Enteropathie mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Die HIV-Enteropathie und chronisch entzündliche Darmerkrankungen weisen Analogien in ihrer Pathogenese auf. Ihnen ist die erhöhte Konzentration bestimmter Zytokine, die teils schädigenden Einfluss auf die intestinale Barriere ausüben, gemein. Das in dieser Arbeit beschriebene Zytokinmuster ähnelt dem von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Insofern haben die Ergebnisse dieser Arbeit auch eine Relevanz für das Verständnis von Zytokineinflüssen auf die intestinale Barriere, welche bei diesen Erkrankungen durch Lecks beeinträchtigt sind.

Zu den klinisch relevanten Formen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zählen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn.

Colitis ulcerosa hat eine Prävalenz von 50-80, Morbus Crohn zeigt sich bei 20-100/100000 Einwohner. Teilweise über Jahrzehnte berücksichtigte Zahlen über die Neuerkrankungen an chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zeigen eine steigende Prävalenz in verschiedenen Gebieten ganz Europas (Gunesh Set al., 2008, Arin Letamendia et al., 2008, Pavlovic-Calic et al., 2008). Bei Colitis ulcerosa ist vorwiegend das Colon beteiligt, beim Morbus Crohn zumeist der Dünndarm, insgesamt sind jedoch alle Darmabschnitte betroffen. Bei Morbus Crohn zeigt sich im Gegensatz zur Colitis ulcerosa eher ein diskontinuierlicher Verlauf. Beide Erkrankungen führen in ihrem Befallsgebiet gelegentlich zur Entstehung von

Malignomen. Ätiologisch fällt auf, dass eine hohe Inzidenz in der weißen Bevölkerung besteht. Anscheinend gibt es eine genetische Disposition. Der überwiegende Teil dieser Patienten weisen das Protein HLA-B27 (Human Leukozyt Antigen) auf. Dieses Protein ist wiederum Bestandteil des MHC I (Major Histocompatibility Complex I), welches auf der Oberfläche der meisten Körperzellen exprimiert wird. Sie dienen der Antigenpräsentation gegenüber den Leukozyten. HLA-B27 liess sich bei 53% - 75% der Patienten mit Morbus Crohn und ankylosierender Spondylitis positiv dokumentieren (Gravallese et al., 1988).

Beide Krankheiten (Morbus Crohn und Colitis ulcerosa) gehen klinisch häufig mit Gewichtsverlust, Schmerzen und Durchfällen einher. Beim Morbus Crohn kommt es typischerweise zu krampfartigen Schmerzen im rechten Unterbauch, unblutigen Durchfällen und teilweise zu Fieber. Typische Komplikationen des Morbus Crohn sind Fistelbildungen (zunächst transmuraler Befall) und Stenosen.

Patienten, die an Colitis ulcerosa leiden, zeigen meist zunächst einen Befall des Rektums, wobei die Ausbreitung in die Tiefe nicht über die Submukosa hinaus geht. Die entzündlichen Veränderungen breiten sich dann nach proximal aus. Symptomatisch stehen Tenesmen und blutig-schleimige Durchfälle im Vordergrund. Bei der fulminant-toxischen Verlaufsform kann sich ein toxisches Megakolon entwickeln (Dilatation des Kolons mit hoher Perforationsgefahr).

Durch die weitestgehend ungeklärte Ätiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) stehen therapeutisch vor allem unspezifisch wirkende Antiphlogistika zur Verfügung: Nicht-steroidale Antiphlogistika, Sulfasalazine, Azathioprin.

Auf immunologischer Ebene unterscheiden sich die beiden Krankheiten durch das Auslösen teilweise ungleicher Immunantworten.

Wichtige Grundlagenkenntnisse der Immunologie sind die Unterteilung der T-Lymphozyten aufgrund ihrer antigenen Wirkung: CD_8^+ -T-Lymphozyten entwickeln sich nur zu zytotoxischen T-Lymphozyten, CD_4^+ -T-Lymphozyten können sich zu inflammatorischen T-Lymphozyten und zu T-Helferzellen differenzieren.

Eine geläufige Einteilung der T-Helferzellen wurden von Mosmann et al. (1986) eingeführt, wonach die T-Helferzellen in TH-1-Zellen und TH-2-Zellen gegliedert werden.

Diese Einteilung gelang aufgrund von typischen Zytokinmustern. Die beiden T-Helfer Zellen (TH-1 bzw. TH-2) sezernieren jeweils Zytokine eines jeweils bestimmten Musters. Das Immunsystem des Menschen reagiert auf Morbus Crohn mit einer Differenzierung von CD_4^+ -T-Lymphozyten zu TH-1-Helferzellen, das heißt, dass im Zuge der Aktivierung Interleukin-2, Interleukin-3, GM-CSF und Interferon- γ freigesetzt werden. Das typisches Zytokinmuster einer TH-1 Zelle umfasst weiterhin: TNF- α und TNF- β .

Bei Erkrankung an Colitis ulcerosa reagiert das Immunsystem mit der Differenzierung von CD_4^+ -Lymphozyten zu TH-2-Helferzellen. TH-2-Helferzellen sezernieren nach Aktivierung Interleukin-3, BSF-1 und einen Mastzellen Wachstumsfaktor (Mosmann et al., 1986). Außerdem gehören zum Zytokinmuster einer TH-2-Zelle: Interleukin-4, Interleukin-5, Interleukin-10 und Interleukin-13. Beiden Formen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist die Aktivierung von Makrophagen gemein. Aktivierte Makrophagen sezernieren hauptsächlich die Zytokine TNF- α , Interleukin-1, Interleukin-6. Die Kenntnis zu gewissen Zytokinmustern wird bei der antiinflammatorischen Therapie der CED angewandt. Für die medikamentöse Therapie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen stehen unspezifische Entzündungshemmer wie nichtsteroidale Antiphlogistika und steroidale Antiphlogistika (Kortison) zur Verfügung. Auch die Anwendung von Biologika zeigen großen therapeutischen Nutzen (z. B. Antikörper gegen TNF- α). Delboy beschrieb 1992 die Wirkungsweise von Sulfasalazin und seinem Derivat 5-ASA bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (u.a. Eingreifen in den Prostaglandinstoffwechsel). Da TNF- α in der Pathogenese der CEDs eine zentrale Rolle spielt kommt auch der spezifischen Bindung des inflammatorischen Zytokins durch entsprechende Antikörper eine besondere therapeutische Bedeutung zu. Eingesetzt wird hier Infliximab, ein anti-TNF- α -Antikörper, der durch die Bindung an TNF- α dessen biologische Wirkung inhibiert. Als unspezifisches Immunsuppressivum steht Azathioprin zur Verfügung (Bessard et al., 2004).

5 Empfehlungen für weiterführende Studien

Große Relevanz hat ebenfalls die Untersuchung des Restitutionsverhaltens von Einzelzellläsionen nach Inkubation mit HIV-typischen Zytokinen an nativem Darmepithel (z.B. von der Maus). Diese Ergebnisse könnten mit Biopsien von Patienten mit HIV-Enteropathie verglichen werden, um die vorliegenden in vitro-Daten an nativem Gewebe zu verifizieren.

Weitere Studien könnten die Einflußnahme von opportunistischen Durchfallerkrankungen bei kleinsten Verletzungen und HIV-Infektion am nativen Darm untersuchen.

Da es möglich ist, dass sich TGF-1 β in der Zelllinie HT-29/B6 durch die Zytokine IL-1 β oder IFN- γ bildet, könnte man in einer folgenden Studie durch Neutralisation mit dem spezifischen Antikörper eine Verifizierung dieser These erwirken.

Eine wichtige Aufgabenstellung im Rahmen der gezeigten Ergebnisse stellt die Fragestellung der gesamten Restitution von „großen“ Läsionen (die über Migration und Proliferation restituieren) zu „kleinen“ (oligozelluläre, Einzelzell-)Läsionen (Restitution über den purse string-Mechanismus) bis zur Regeneration des Gewebes dar.

6 Zusammenfassung

Der Gastrointestinaltrakt ist ein begünstigtes Ziel des HI-Virus, daher leiden viele HIV-positive Patienten unter Diarrhoe und Enteritis, die durch Veränderung der intestinalen Mukosa (Kryptenhyperplasie und Zottenatrophie) hervorgerufen wird. Durch die veränderte und beschädigte Mukosa kommt es zum Angriff der epithelialen Barrierefunktion. Für die Entstehung der Diarrhoe bei HIV-Patienten gibt es multifaktorielle ätiologische Bedingungen: opportunistische Erkrankungen, Malabsorption, autonome Dysfunktion des Nervensystem des Darms bzw. HIV-per se. Bei der HIV-Enteropathie geht man davon aus, dass keine darmpathogenen Keime für die Entstehung des Durchfalls verantwortlich sind, denn der Defekt der intestinalen Barriere ist zytokinvermittelt. Die erhöhte Konzentration bestimmter Zytokine entsteht durch ihre Sekretion aus HIV-infizierten Immunzellen. Somit wird HIV per se für die gastrointestinalen Beschwerden der HIV-Patienten verantwortlich gemacht. Da die Enteritis an kleinen Defekten des Epithels im Darm beginnt, bzw. der menschliche Darm einem hohen Turnover unterliegt, wurden kleinste Läsionen untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig der Effekt von HIV-typischen Zytokinen auf die Restitution von Einzelzellläsionen am Monolayer HT-29/B6 untersucht.

Zunächst wurde die funktionelle Reparatur mithilfe der Conductance Scanning-Technik untersucht, die morphologischen Veränderungen konnten mittels Videomikroskopie, Immunfluoreszenzfärbungen und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert werden. Die HIV-typischen Zytokine wurden auf ihre synergistische Wirkung und einzeln auf die Restitution der Einzelzellläsion untersucht. Dafür wurden die Monolayer je 24 Stunden vorinkubiert, bevor über die manuelle Manipulation einer Mikrogaskanüle am Conductance Scanning-Stand ein Stromimpuls appliziert wurde und eine Zelle zerstört wurde. Anschließend konnte über die sich ändernden Leitwerte, während der Restitution der Läsion, eine Dokumentation des Läsionsverschlusses gelingen. Der synergistische Effekt der HIV-typischen Zytokine auf die Kolonepithelzelllinie HT-29/B6 verzögerte die Reparatur einer Einzelzellläsion im Vergleich zu Kontrollmessungen um 21%. Alle einzeln

angewandten Zytokine zeigten ebenfalls einen Restitutionsverzögernden Effekt: TNF- α =14%; IFN- γ =18%; IL-1 β =14% und IFN- α =9%. In früheren Arbeiten konnten nach Setzen einer Einzelzellläsion an HT-29/B6-Zellen in der frühen Restitutionsphase (3-10 Minuten) die typischen Charakteristika des purse string-Mechanismus dargestellt werden. Da nach Durchlaufen des Restitutionsprozesses wieder die gleichen Ausgangsleitwerte wie bei einem intakten Epithelverband erhoben werden konnte, wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls vom purse string-Mechanismus als Reparaturmechanismus von Einzelzellläsionen an HT-29/B6-Zellen ausgegangen.

Um die morphologischen Veränderungen am Zellmodell belegen zu können, wurden Immunfluoreszenzbilder angefertigt und die 3D-konfokale Fluoreszenzmikroskopie angewandt. Dafür wurden 10 Minuten nach Setzen einer Einzelzellläsion Immunfluoreszenzfärbungen gegen das integrale Tight junction-Protein Occludin und gegen das Adherens junction-Protein E-Cadherin angefertigt. Die Immunfluoreszenzbilder zeigen einen sich restituierenden Defekt, in den Bildern der konfokalen Immunfluoreszenz fällt auf, dass sich nur Occludin, nicht aber E-Cadherin anfärben werden konnten. Folglich ist die Neuformierung der E-Cadherine bzw. der Neueinbau der Adherens junction in die Zellmembran kein Bestandteil der frühen Restitution. Funktionell konnte demzufolge die Wiederherstellung der intestinalen Barrierefunktion durch die Neuformierung von Occludin in die Zellmembran (als Bestandteil der TJ) erfolgen. Ein mechanischer Kontakt (Adherens junction-vermittelt) konnte zu diesem Zeitpunkt nicht nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse belegen die Prolongation von Einzelzellläsionen an der Kolonepithelzelllinie HT-29/B6. Dies könnten am menschlichen Darm die pathologischen Voraussetzungen für Leckflux-Diarhoe sein. Somit geben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit Hinweis auf die Entstehung der HIV-Enteropathie durch HIV-per se. Das proinflammatorische Zytokin TNF- α verzögert die Restitution von Einzelzellläsionen in HT29/B6-Zellen um 14 %. Im Rahmen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spielt es eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Entzündungsprozessen. Hier kommt bereits der TNF- α -Antikörper (Infliximab) therapeutisch zum Einsatz. Dadas Zytokinmuster der CED und die HIV-typischen-Zytokine Ähnlichkeiten aufweisen, könnte eine Therapie mit entsprechenden

Antikörpern von therapeutischen Nutzen sein. Interferon- γ zeigte am HT-29/B6-Monolayer einzeln die größte Potenz die Restitution einer Einzelzellläsion zu verzögern, sodass die spezifische Neutralisierung dieses Zytokins eine neue therapeutische Option darstellt.

7 Literaturverzeichnis

- Adams CL, Chen YT, Smith SJ, et al. Mechanisms of epithelial cell-cell adhesion and cell compaction revealed by high-resolution tracking of E-cadherin-green fluorescent protein. *J Cell Biol.* 1998 Aug 24;142(4):1105-19.
- Alonso K, Pontiggia P, Medenica R, et al., Cytokine patterns in adults with AIDS. *Immunol Invest.* 1997 Apr;26(3):341-50.
- Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, et al., Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci.* 2002, 115, 4969-4976.
- Amasheh S, Schmidt T, Mahn M, et al., Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell Tissue Res.* 2005, 321, 89-96.
- Anderson JM, Van Itallie CM. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol.* 1995. 269(4 Pt 1): G467-G475.
- Balda MS, Gonzalez-Mariscal L, Matter K, et al., Assembly of the tight junction: the role of diacylglycerol. *J Cell Biol.* 1993.123(2): 293-302.
- Bamforth SD, Kniesel U, Wolburg H, et al., A dominant mutant of occludin disrupts tight junction structure and function. *J Cell Sci,* 1999, 112 (Pt 12), 1879-1888.
- Barbul A, Breslin RJ, Woodyard JP et al., The effect of in vivo T helper and T suppressor lymphocyte depletion on wound healing. *Ann Surg,* 1989a, 209, 479-483.
- Barbul A, Shawe T, Rotter SM et al., Wound healing in nude mice: a study on the regulatory role of lymphocytes in fibroplasia. *Surgery.* 1989b, 105, 764-769.
- Barmeyer C. Diarrhoe und Malabsorption bei Colitis ulcerosa und zugrunde liegende Mechanismen in den Modellen der Interleukin-2- defizienten Maus und der Zytokin-exponierten Kolonmucosa der Ratte. 2002 FU – Berlin Dissertation.
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F et al., Montagnier L Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). 1983, 220(4599): 868-871.

- Batman PA, Miller AR, Forster SM et al., Jejunal enteropathy associated with human immunodeficiency virus infection: quantitative histology. *J Clin Pathol* 1989, 42(3): 275-281.
- Baur PS, Parks DH, Hudson JD. Epithelial mediated wound contraction in experimental wounds--the purse-string effect. *J Trauma*, 1984, 24, 713-720.
- Bement WM, Forscher P, Mooseker MS. A novel cytoskeletal structure involved in purse string wound closure and cell polarity maintenance. *J Cell Biol.* 1993, 121(3): 565-578.
- Bendfeldt K. Tumornekrosefaktor (TNF)- α -induzierte Barrierestörung an menschlichen Colonzellen (HT-29/B6): Lokalisierung mittels Conductance Scanning, 2000, Dissertation, Freie Universität Berlin.
- Bentzel CJ, Hainau B, Edelman A. Anagnostopoulos, T. & Benedetti, E. L. Effect of plant cytokinins on microfilaments and tight junction permeability. *Nature*, 1976, 264, 666-668.
- Bessard G, Hardy G, Chartier A, et al., Genetic polymorphism and treatment of chronic bowel inflammatory diseases: the example of azathioprine Therapie. 2004, Jan-Feb;59(1):71-5.
- Beutler B, Mahoney J, Trang, NL. A.Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J Exp Med*, 1985, 161, 984-995.
- Bode H, Schmitz H, Fromm M, Scholz P, et al., IL-1beta and TNF-alpha, but not IFN-alpha, IFN-gamma, IL-6 or IL-8, are secretory mediators in human distal colon. *Cytokine*. 1998 Jun;10(6):457-65.
- Bojarski C, Bendfeldt K, Gitter A H, et al., Apoptosis and intestinal barrier function. *Ann N Y Acad Sci*. 2000, 915, 270-274.
- Braga VM, Hodivala KJ, Watt FM. Calcium-induced changes in distribution and solubility of cadherins, integrins and their associated cytoplasmic proteins in human keratinocytes. *Cell Adhes Commun*. 1995 Aug;3(3):201-15.
- Cereijido M, Meza I, Martínez-Palomo A. Occluding junctions in cultured epithelial monolayers. *Am J Physiol*. 1981, 240: C96-C102.
- Cereijido M, Stefani E, Matínez Palomo A. Occluding Junctions in a Cultured Transporting Epithelium: Structural and Functional Heterogeneity. *J Membrane Biol*. 1980,53: 19-32.

- Chang, E. B.; Musch, M. W. & Mayer, L. Interleukins 1 and 3 stimulate anion secretion in chicken intestine. *Gastroenterology*, 1990, 98, 1518-1524.
- Chen SC, Chou CK, Wong FH, et al.,
Overexpression of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I receptors and autocrine stimulation in human esophageal carcinoma cells. *Cancer Res*, 1991, 51, 1898-1903.
- Christ M. HIV-typische Zytokine beschleunigen die Restitution kultivierter Kolonepithelzellen, 2004, Dissertation, Charité, Campus Benjamin Franklin.
- Ciacci C, Lind SE, Podolsky DK. Transforming growth factor beta regulation of migration in wounded rat intestinal epithelial monolayers. *Gastroenterology* 1993,105(1): 93-101.
- Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F et al., Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*, 1986, 233, 343-346.
- Colebunders R, Lusakumuni K, Nelson AM, et al., Persistent diarrhoea in Zairian AIDS patients: an endoscopic and histological study. *Gut* 1988, 29(12): 1687-1691.
- Contreras RG, Miller JH, Zamora M, et al., Interaction of calcium with plasma membrane of epithelial (MDCK) cells during junction formation. *Am J Physiol*. 1992, 263: C313-C318.
- Cooper JA. Effect of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol*. 1987, 105: 1473-1478.
- Cordenonsi M, D'Atri F, Hammar E et al., Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *J Cell Biol*, 1999, 147, 1569-1582.
- Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, et al., The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984, 312(5996): 763-767.
- Danjo Y, Gipson IK. Actin 'purse string' filaments are anchored by Ecadherin-mediated adherens junctions at the leading edge of the epithelial wound, providing coordinated cell movement. *J Cell Sci*. 1998, 111: 3323-3332.
- Darzynkiewicz Z, Williamson B, Carswell et al., Cell cycle-specific effects of tumor necrosis factor. *Cancer Res*, 1984, 44, 83-90.
- Delboy H. Mode of action of sulfasalazine in chronic inflammatory enterocolonic diseases, *Service de Médecine Interne*, 1992, 47, 157-159.

- Demetter P, Vos MD, Damme NV et al., Focal up-regulation of E-cadherin-catenin complex in inflamed bowel mucosa but reduced expression in ulcer-associated cell lineage. *Am J Clin Pathol.* 2000, 114, 364-370.
- Deng H, Liu R, Ellmeier W, et al., Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996, 381(6584): 661-666.
- Diamond JM. The epithelial junction: bridge, gate, and fence. *Physiologist*, 1977, 20: 10-18.
- Dignass AU. Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair. *Inflamm Bowel Dis.* 2001, 7(1): 68-77.
- Dignass AU, Podolsky DK. Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor beta. *Gastroenterology* 1993, 105(5): 1323-1332.
- Dinarello CA, Cannon JG, Wolff et al., Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med.* 1986, 163, 1433-1450.
- Domnina LV, Ivanova OY, Cherniak BV, et al., Effects of the inhibitors of dynamics of cytoskeletal structures on the development of apoptosis induced by the tumor necrosis factor. *Biochemistry (Mosc)* 2002, 67(7): 737-746.
- Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, et al., A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 1996, 85(7): 1149-1158.
- Dragic T, Litwin V, Allaway GP. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* , 1996, 381(6584): 667-673.
- Duncan, Berman B. Gamma interferon is the lymphokine and beta interferon the monokine responsible for inhibition of fibroblast collagen production and late but not early fibroblast proliferation. *J Exp Med*, 1985, 162, 516-527.
- Epple HJ, Kreusel KM, Hanski C, et al., Differential stimulation of intestinal mucin secretion by cholera toxin and carbachol. *Pflugers Arch*, 1997, 433, 638-647.
- Fan SX, Skillman DR, Liao MJ, et al., Increased efficacy of human natural interferon- α (IFN- α n3) versus human recombinant IFN- α 2 for inhibition of HIV-1 replication in primary human monocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1993 Nov;9(11):1115-22.

- Fanning AS, Mitic LL, Anderson JL. Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J Am Soc Nephrol.* 1999, 10: 1337-1345.
- Farquhar MG, Palade GE, Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol.* 1963, 17: 375-412.
- Feil W, Klimesch S, Karner P et al., Importance of an alkaline microenvironment for rapid restitution of the rabbit duodenal mucosa in vitro. *Gastroenterol.* 1989a 97(1): 112-122.
- Feil W, Lacy ER, Wong YM et al., Rapid epithelial restitution of human and rabbit colonic mucosa. *Gastroenterology*, 1989b, 97(3): 685-701.
- Feinberg MB, Changing the natural history of HIV disease. *Lancet*, 1996, 348(9022): 239-246.
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, et al., HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 1996, 272(5263): 872-877.
- Florian P, Restitution von Einzelzell-Läsionen im Kolonepithel. Dissertation 2002, Freie Universität Berlin.
- Florian P, Gitter AH, Schulzke JD, et al., Recovery of colon epithelial barrier after single-cell lesion. *Pflügers Arch Suppl*, 2001, 441(6): R 208.
- Florian P, Schöneberg T, Schulzke JD, et al., Single-cell epithelial defects close rapidly by an actinomyosin purse string mechanism with functional tight junctions. *J Physiol* , 2002, 545(2): 485-499.
- Fox, C. H.; Kotler, D.; Tierney, A.; et al., Detection of HIV-1 RNA in the lamina propria of patients with AIDS and gastrointestinal disease. *J Infect Dis, Laboratory of Immunoregulation*, 1989, 159, 467-471.
- Frömter E, Diamond J. Route of passive ion permeation in epithelia. *Nature*, 1972, 235: 9-13.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, et al., Occludin: a novel integral membrane protein at tight junctions. *J Cell Biol.* 1993, 123: 1777-1788.
- Furuse, M.; Itoh, M.; Hirase, T, et al., Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol.* 1994, 127, 1617-1626.

- Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*, 1998, 141: 1539-1550.
- Furuse, M.; Hata, M.; Furuse, K. et al., Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol*. 2002, 156, 1099-1111.
- Gallo, R. C.; Sarin, P. S.; Gelmann, E. P. et al., Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS), *Science*, 1983, 220, 865-867.
- Gillin, J. S.; Shike, M.; Alcock, N, Malabsorption and mucosal abnormalities of the small intestine in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med*, 1985, 102, 619-622.
- Gitter AH, Die Barrierefunktion des Kolonepithels unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen. Habilitationsschrift, 2000, Freie Universität Berlin.
- Gitter AH, Bendfeldt K, Schulzke JD, et al., Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF- α -induced single-cell apoptosis. *FASEB J* 2000a, 14: 1749-1753.
- Gitter AH, Bendfeldt K, Schulzke JD, et al., Trans/paracellular, surface/crypt, and epithelial/subepithelial resistances of mammalian colonic epithelia. *Pflügers Arch*. 2000b, 439: 477-482.
- Gitter AH, Bertog M, Schulzke JD, et al., Measurement of paracellular epithelial conductivity by conductance scanning. *Pflügers Arch*, 1997, 434: 830-840.
- Gitter AH, Wullstein F, Fromm M, et al. Epithelial barrier defects in ulcerative colitis: characterization and quantification by electrophysiological imaging. *Gastroenterology*, 2001, 121: 1320-1328.
- Gonzalez-Mariscal L, Chavez de Ramirez B, Cereijido M. Tight junction formation in cultured epithelial cells (MDCK). *J Membr Biol*, 1985, 86(2): 113-125.
- Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, et al., Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 2003, 81(1): 1-44.
- Gumbiner B, Stevenson B, Grimaldi A, The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *J Cell Biol*, 1988, 107(4): 1575-1587.

- Gumbiner B, Lowenkopf T, Apatira D, Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88(8): 3460-3464.
- Gunesh S, Thomas GAO, Williams GT et al., The incidence of Crohn's disease in Cardiff over the last 75 years: an update for 1996-2005. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008, 27, 211-219.
- Günzel D, Florian P, Richter JF, Troeger H et al., Restitution of single-cell defects in the mouse colon epithelium differs from that of cultured cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006 Jun;290(6): R1496-507.
- Gravallese, E. M. & Kantrowitz, F. G. Arthritic manifestations of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*, 1988, 83, 703-709
- Greenson, J. K.; Belitsos, P. C.; Yardley, J. H et al., AIDS enteropathy: occult enteric infections and duodenal mucosal alterations in chronic diarrhea, *Ann Intern Med* 1991, 114, 366-372.
- Greten, Schettler, *Innere Medizin*, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, New York, 2001.
- Grunfeld C, Kotler DP, Shigenaga JK, et al., Circulating interferon- α levels and hypertriglyceridemia in the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med*. 1991 Feb;90(2):154-62.
- Gunesh, S.; Thomas, G. A. O.; Williams, G. T.; et al., The incidence of Crohn's disease in Cardiff over the last 75 years: an update for 1996-2005. *Aliment Pharmacol Ther*, 2008, 27, 211-219.
- Haskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J et al., ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interact with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol*, 1998, 141: 199-208
- Heath JP, Epithelial cell migration in the intestine. *Cell Biol Int*, 1996, 20(2): 139-146
- Hierholzer K, Schmidt R, *Pathophysiologie des Menschen*, Chapman und Hall, London, Glasgow, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, 1994
- Hudspeth AJ, Establishment of tight junctions between epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975, 72(7): 2711-2713.
- Hudspeth AJ (1982). The recovery of local transepithelial resistance following single-cell lesions. *Exp Cell Res* 138: 331-342.

- Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, et al., Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol*, 2005, 171, 939-945.
- Jacinto A, Martinez-Arias A, Martin P, Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(5): E117-E123.
- Jarry, A.; Cortez, A.; René, E, et al., Infected cells and immune cells in the gastrointestinal tract of AIDS patients. An immunohistochemical study of 127 cases. *Histopathology*, 1990, 16, 133-140.
- Jurriaans S, Van Gemen B, Weverling GJ, The natural history of HIV-1 infection: virus load and virus phenotype independent determinants of clinical course? *Virology*, 1994, 204(1): 223-233.
- Kalyanaraman, V. S.; Sarngadharan, M. G.; Robert-Guroff, et al., A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science*, 1982, 218, 571-573.
- Kamiyama, K.; Iguchi, I.; Wang, X. et al., Effects of PDGF on the migration of rabbit corneal fibroblasts and epithelial cells. *Cornea*, 1998, 17, 315-325.
- Kaneko K, Satoh K, Masamune A, et al., Myosin light chain kinase inhibitors can block invasion and adhesion of human pancreatic cancer cell lines. *Pancreas* 2002, 24(1): 34-41.
- Kapembwa MS, Fleming SC, Sewankambo N, Altered small-intestinal permeability associated with diarrhoea in human-immunodeficiency-virus-infected Caucasian and African subjects. *Clin Sci*, 1991, 81(3): 327-334.
- Kausalya PJ, Amasheh S, Günzel D, et al., Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg²⁺ transport function of Claudin-16. *J Clin Invest*, 2006, 116, 878-891.
- Kato K, Chen MC, Nguyen M, Lehmann FS, et al., Effects of growth factors and trefoil peptides on migration and replication in primary oxyntic cultures. *Am J Physiol*, 1999, 276(5 Pt 1): G1105-1116.
- Kayser, Bienz, Eckert, Zickernagel *Medizinische Mikrobiologie*, Thieme Verlag, Stuttgart, 1998.
- Kelly P, Summerbell C, Ngwenya B, et al., Systemic immune activation as a potential determinant of wasting in Zambians with HIV-related diarrhoea. *QJM*. 1996 Nov;89(11):831-7.

- Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S et al., T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV, *Nature*, 1984, 312, 767-768.
- Köckerling A, Fromm M, Origin of cAMP dependent Cl⁻ secretion from both crypts and surface epithelia of rat intestine. *Am J Physiol*. 1999, 264: C1294-C1301.
- Köckerling A, Sorgenfrei D, Fromm M. Electrogenic Na⁺ absorption of rat distal colon is confined to surface epithelium. A voltage scanning study. *Am J Physiol*, 1993, 264: C1285-C1293.
- Köpf-Maier, Merker, Atlas der Elektronenmikroskopie, Ueberreuter Wissenschaft, 1989.
- Kotler DP, Gaetz HP, Lange M, et al., Enteropathy associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med*, 1984, 101(4): 421-428.
- Kotler DP, Reka S, Clayton F, Intestinal mucosal inflammation associated with human immunodeficiency virus infection. *Dig Dis Sci* 1993, 38(6): 1119-1127.
- Kraehenbuhl JP, Pringault, E, Neutra MR. Intestinal epithelia and barrier functions. *Aliment Pharmacol Ther*. 1997, 11 Suppl 3, 3-8.
- Kreusel KM, Fromm M, Schulzke JD, et al., Cl⁻ secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cell (HT-29/B6). *Am J Physiol*. 1991, 261: C574-C582.
- Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol*, 1975, 78, 71-100.
- Letamendia AA, Celaya, FB.; Paternain, et al., High incidence rates of inflammatory bowel disease in Navarra (Spain). Results of a prospective, population-based study, *Gastroenterol Hepatol*, 2008, 31, 111-116.
- Levine, AD. Apoptosis: implications for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 2000, 6, 191-205.
- Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT, et al., TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004 Mar;286(3):G367-76.

- Ma TY, Boivin MA, Ye D, et al., Mechanism of TNF- α modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005 Mar;288(3):G422-30.
- Madara JL, Maintenance of the macromolecular barrier at cell extrusion sites in intestinal epithelium: physiological rearrangement of tight junctions. *J Membr Biol* 1990, 116(2): 177-184.
- Madara, J. L. & Marcial, M. A, Structural correlates of intestinal tight-junction permeability, *Kroc Found Ser*, 1984, 17, 77-100.
- Madara JL, Stafford J, Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 1989, 83: 724-727.
- Malebranche, R.; Arnoux, E.; Guérin, J. M.; Acquired immunodeficiency syndrome with severe gastrointestinal manifestations in Haiti, *Lancet*, 1983, 2, 873-878.
- Martin P, Lewis J, Actin cables and epidermal movement in embryonic wound healing. *Nature* 1992, 360(6400): 179-183.
- Matsumura C, Kuwashima H, Kimura T, Myosin light chain kinase inhibitors and calmodulin antagonist inhibit Ca(2+)- and ATPdependent catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells. *J Auton Pharmacol* 1999, 19(2): 115-121.
- McCluskey J, Hopkinson-Woolley J, Luke B, Martin P, A study of wound healing in the E11.5 mouse embryo by light and electron microscopy. *Tissue Cell* 1993, 25(2): 173-181.
- McGowan, I.; Elliott, J.; Fuerst, M.; et al., Increased HIV-1 mucosal replication is associated with generalized mucosal cytokine activation. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2004, 37, 1228-1236.
- McGowan I, Radford-Smith G, Jewell DP, Cytokine gene expression in HIV-infected intestinal mucosa. *AIDS* 1994, 8(11): 1569-1575.
- Mosmann, T. R.; Cherwinski, H.; Bond, M. W, et al., Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986, 136, 2348-2357.
- Medina R, Rahner C, Mitic LL, et al., Occludin localization at the tight junction requires the second extracellular loop. *J Membr Biol.* 2000, 178(3): 235-247.

- Morisaki T, Yuzuki DH, Lin RT, et al., Interleukin 4 receptor expression and growth inhibition of gastric carcinoma cells by interleukin 4. *Cancer Res.* 1992, 52(21): 6059-6065.
- Näthke IS, Hinck L., Swedlow, et al., Defining interactions and distributions of cadherin and catenin complexes in polarized epithelial cells, *J Cell Biol.* 1994, 125, 1341-1352.
- Nelson JA, Wiley CA, Reynolds-Kohler, et al., Human immunodeficiency virus detected in bowel epithelium from patients with gastrointestinal symptoms. *Lancet*, 1988, 1, 259-262.
- Nusrat A, Parkos CA, Bacarra AE, et al., Hepatocyte growth factor/scatter factor effects on epithelia. *J Clin Invest.* 1994, 93, 2056-2065.
- Nusrat A, Parkos CA, Liang TW, et al., Neutrophil migration across model intestinal epithelia: monolayer disruption and subsequent events in epithelial repair. *Gastroenterology* 1997, 113(5): 1489- 1500.
- Orenstein JM, Kotler DP. Diarrheogenic bacterial enteritis in acquired immune deficiency syndrome: a light and electron microscopy study of 52 cases. *Hum Pathol.* 1995, 26(5): 481-492.
- Ott M, Lembcke B, Staszewski S, et al., Intestinal permeability in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) *Klin Wochenschr*, 1991, 69, 715-721.
- Paimela H, Goddard PJ, Carter K et al., Restitution of frog gastric mucosa in vitro: effect of basic fibroblast growth factor. *Gastroenterology*, 1993, 104, 1337-1345.
- Pavlovic-Calic N, Salkic NN, Gegic A et al., Crohn's disease in Tuzla region of Bosnia and Herzegovina: a 12-year study (1995-2006). *Int J Colorectal Dis*, 2008, 23, 957-964.
- Podolsky DK, Lynch-Devaney K, Stow JL, et al., Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion. *J Biol Chem.* 1993, 268(9): 6694-6702.
- Poli G, Orenstein JM, Kinter A, et al., Interferon-alpha but not AZT suppresses HIV expression in chronically infected cell lines. *Science* 1989, 244(4904): 575-577.

- Potten CS, Epithelial cell growth and differentiation II. intestinal apoptosis. *Am J Physiol.* 1997, 273: G253-G257.
- Quinlan MP, Hyatt JL. Establishment of the circumferential actin filament network is a prerequisite for localization of the cadherin-catenin complex in epithelial cells. *Cell Growth Differ.* 1999 Dec;10(12):839-54.
- Quinn TC, Mann JM, Curran, et al., AIDS in Africa: an epidemiologic paradigm. *Science*, 1986, 234, 955-963.
- Rajasekaran AK, Hojo M, Huima T, et al., Catenins and zonula occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions. *J Cell Biol.* 1996, 132(3): 451-463.
- Rajasekaran AK, Rajasekaran SA, Role of Na-K-ATPase in the assembly of tight junctions. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003, 285(3): F388-F396.
- Reka S, Garro ML, Kotler DP. Variation in the expression of human immunodeficiency virus RNA and cytokine mRNA in rectal mucosa during the progression of infection. *Lymphokine Cytokine Res.* 1994 Dec;13(6):391-8.
- Rimm DL, Koslov ER, Kebriaei P, et al., Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995 Sep 12;92(19):8813-7.
- Rodriguez P, Heyman M, Candalh C, et al., Tumour necrosis factor- α induces morphological and functional alterations of intestinal HT29 cl.19A cell monolayers. *Cytokine* 1995, 7: 441-448.
- Ross R, Benditt EP. Wound healing and collagen formation. I. Sequential changes in components of guinea pig skin wounds observed in the electron microscope. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961, 11, 677-700.
- Rosenblatt J, Raff MC, Cramer LP, An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-independent mechanism. *Curr Biol* 2001, 11: 1847-1857.
- Rokos K, Pauli G Interferon induction by cell-cell interaction of HIV-infected monocytes/ macrophages with lymphocytes. *Res Virol.* 1991 Mar-Jun;142(2-3):221-5.
- Russo JM, Florian P, Shen L, et al., Distinct temporal-spatial roles for rho kinase and myosin light chain kinase in epithelial purse-string wound closure. *Gastroenterology* 2005 Apr;128(4):987-1001.

- Rudolf M, Kuhlisch W. Biostatistik, Pearson Studium, München, Boston, San Francisco, England, Ontario, Sydney, Mexiko-City, Madrid, Amsterdam, 2008,
- Sartor RB Cyclosporine therapy for inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 1994, 330(26): 1897-1898.
- Sharpstone DR, Rowbottom AW, Nelson MR, et al., Faecal tumour necrosis factor-alpha in individuals with HIV-related diarrhoea. *AIDS.* 1996 Aug;10(9):989-94.
- Schäfer M, Becker HD, Immunregulation der Wundheilung, *Der Chirurg,* 1999; 70:897-908.
- Schmidt RF, Thews G, Lang F. Physiologie des Menschen. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Singapur, Tokio. 2000.
- Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ, et al., Tumor necrosis-factor-alpha regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci.* 1999, 112: 137-146.
- Schmitz H, Fromm M, Bode H, et al., Tumor necrosis factor-alpha induces Cl- and K+ secretion in human distal colon driven by prostaglandin E2. *Am J Physiol.* 1996, 271: G669-G674.
- Schmitz H, Rokos K, Florian P, et al., Supernatants of HIV-infected immune cells affect the barrier function of human HT-29/B6 intestinal epithelial cells. *AIDS* 2002, 16(7): 983-991.
- Schneider T, Ullrich R, Zeitz M. Gastrointestinal manifestations of HIV infection, *Z Gastroenterol.* 1994, 32, 174-181.
- Schulbin H, Bode H, Stocker H, et al., Cytokine expression in the colonic mucosa of human immunodeficiency virus-infected individuals before and during 9 months of antiretroviral therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Sep;52(9):3377-84.
- 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.
- Silen W, Ito S, Mechanisms for rapid re-epithelialization of the gastric mucosal surface. *Annu Rev Physiol* 1985, 47: 217-229.

- Simon DB, Lu Y, Choate KA. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption, *Science*. 1999, 285, 103-106.
- Smith T, Jakobsen J, Gaub et al., Clinical and electrophysiological studies of human immunodeficiency virus-seropositive men without AIDS. *Ann Neurol*, 1988, 23, 295-297.
- Stevenson BR, Anderspn JM, Bullivant S. The epithelial tight junction: structure, function and preliminary biochemical characterization. *Mol Cell Biochem* 1988, 83: 129-145.
- Stevenson BR, Begg DA. Concentration-dependent effects of cytochalasin D on tight junctions and actin filaments in MDCK epithelial cells. *J Cell Science* 1994, 107: 367-375.
- Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS et al., Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 1986,103(3): 755-766.
- Stockmann M, Schmitz H, Fromm M, et al., Mechanisms of epithelial barrier impairment in HIV infection, *Ann N Y Acad Sci*. 2000;915:293-303.
- Tétreault MP, Chailier P, Beaulieu JF, et al., Specific signaling cascades involved in cell spreading during healing of micro-wounded gastric epithelial monolayers. *J Cell Biochem*. 2008 Dec 1;105(5):1240-9.
- Thea DM, Porat R, Nagimbi K et al., Plasma cytokines, cytokine antagonists, and disease progression in African women infected with HIV-1. *Ann Intern Med*. 1996, 124, 757-762.
- Thornton SC, Por SB, Walsh BJ. Interaction of immune and connective tissue cells: I. The effect of lymphokines and monokines on fibroblast growth. *J Leukoc Biol*. 1990, 47, 312-320.
- Tomschy A, Fauser C, Landwehr R et al., Homophilic adhesion of E-cadherin occurs by a co-operative two-step interaction of N-terminal domains. *EMBO J*, 1996, 15, 3507-3514.
- Tracey KJ, Cerami A. The role of cachectin/tumor necrosis factor in AIDS. *Cancer Cells*. 1989 Oct;1(2):62-3.
- Tsukita S, Furuse M. Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol* 2000a, 149(1): 13-16.
- Tsukita S, Furuse M. The structure and function of claudins, cell adhesion molecules at tight junctions. *Ann N Y Acad Sci*. 2000b, 915: 129-135.

- Tsukita S, Furuse M, Itoh M, Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001, 2, 285-293.
- Tsujimoto M, Yip YK, Vilcek J. Interferon-gamma enhances expression of cellular receptors for tumor necrosis factor. *J Immunol.* 1986 Apr 1;136(7):2441-4.
- Ullrich R, Zeitz M, Heise W, et al., Small intestinal structure and function in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV): evidence for HIV-induced enteropathy. *Ann Intern Med.* 1989, 111(1): 15-21.
- Ullrich R, Heise W, Bergs C et al., Effects of zidovudine treatment on the small intestinal mucosa in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Gastroenterology,* 1992, 102, 1483-1492.
- Ussing HH, Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 1951, 23: 110-127.
- Van Itallie C, Rahner C, Anderson J, Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest.* 2001, 107(10): 1319-1327.
- Von Sydow M, Sonnerborg A, Gaines H, et al., Interferon-alpha and tumor necrosis factor-alpha in serum of patients in various stages of HIV-1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1991, 7: 375-380.
- Varilek GW, Neil GA, Bishop WP. Caco-2 cells express type I interleukin-1 receptors: ligand binding enhances proliferation. *Am J Physiol.* 1994, 267, G1101-G1107.
- Voth R, Rossol S, Klein K, et al., Differential gene expression of IFN-alpha and tumor necrosis factor-alpha in peripheral blood mononuclear cells from patients with AIDS related complex and AIDS. *J Immunol.* 1990 Feb 1;144(3):970-5.
- Windmueller HG, Spaeth AE. Identification of ketone bodies and glutamine as the major respiratory fuels in vivo for postabsorptive rat small intestine. *J Biol Chem.* 1978, 253, 69-76.
- Wittchen ES, Haskins J, Stevenson BR, Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J Biol Chem* 1999, 274(49): 35179-35185.

- Vyakarnam A, Matear P, Meager A, et al., Altered production of tumour necrosis factors alpha and beta and interferon gamma by HIV-infected individuals. Clin Exp Immunol 1991, 84(1): 109-115.
- Wang AM, Creasey AA, Ladner MB et al., Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor. Science, 1985, 228, 149-154.
- Watanabe S, Hirose M, Wang XE et al., Hepatocyte growth factor accelerates the wound repair of cultured gastric mucosal cells. Biochem Biophys Res Commun. 1994, 199, 1453-1460.
- Yasunaga Y, Shinomura Y, Kanayama S et al., Increased production of interleukin 1 beta and hepatocyte growth factor may contribute to foveolar hyperplasia in enlarged fold gastritis. Gut, 1996, 39, 787-794.
- Zeitz M, Ullrich R, Lage, et al., Current status of the topic of HIV enteropathy Z Gastroenterol Verh. 1990, 25, 82-84.

Webseiten:

- <http://www.zum.de/Faecher/Materialien/beck/12/bs12-57.htm>, 09.11.2010
- <http://herkules.oulu.fi/isbn9514269306/html/x477.html>, 13.02.2011
- <http://www.zoologie-skript.de/methoden/fluo/confocl.htm>, 31.01.2011
- http://www.nature.com/nrc/journal/v4/n2/fig_tab/nrc1276_F3.html, 03.03.2011

Danksagung

Als erstes bedanke ich mich bei Prof. Alfred H. Gitter und Prof. Michael Fromm für die Vergabe des Themas und die stete Diskussionsbereitschaft.

Für die direkte Betreuung der experimentellen Phase meiner Arbeit danke ich insbesondere Dr. Peter Florian. Er sowie Dr. Melanie Christ gaben mir jede Hilfestellung beim Erlernen der experimentellen und handwerklich erforderlichen Prinzipien und Feinheiten.

Nach dem Weggang von Prof. Gitter und später von Dr. Florian hat Priv.-Doz. Dr. Dorothee Günzel die verantwortliche Betreuung meiner Arbeit übernommen, wofür ich ihr außerordentlich danke. Ihre ständige Diskussionsbereitschaft, ihr Korrekturlesen, ihre Kritik und für Ihr Verständnis haben diese Arbeit wesentlich geprägt.

Ein besonderer Dank gilt Ing. grad. Detlef Sorgenfrei für die Unterstützung und Geduld bei allen technischen Problemen. Ausserdem danke ich Dr. rer.medic. Jan F. Richter für seine spontane und unkomplizierte Hilfestellung.

Weiterhin danke ich meinem Mann Dipl. Ing. Mario Gollnick, der mich persönlich und fachlich unterstützt hat.

Bei Azadeh Razban und Christian Braun möchte ich mich für die schöne gemeinsame Studienzeit bedanken.

Schließlich danke ich Anja Fromm, Sieglinde Lüderitz, Sonja Dullat, Dr. Sebastian Zeissig, Dr. Beibei Oelrich und allen weiteren Mitgliedern des Instituts für Klinische Physiologie, die zum Gelingen dieser Arbeit direkt oder indirekt beigetragen haben.

Lebenslauf

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

Lebenslauf

Lebenslauf

Lebenslauf

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Inga Katharina Gollnick, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Einfluss von HIV-typischen Zytokinen auf die Reparatur von Einzelepithelzellläsionen in Kolonepithelzellen“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift