

Aus dem Institut für Klinische Physiologie
Campus Benjamin Franklin
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Fromm

Eingereicht über den Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

HIV-typische Zytokine beschleunigen die Restitution kultivierter Kolonepithelzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Melanie Christ
Tierärztin aus Zell

Berlin 2004

Journal-Nr.: 2804

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Leo Brunnberg

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Holger Martens

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. phil. nat. Alfred H. Gitter

Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Karl Dietrich Weyrauch

Tag der Promotion: 27.08.2004

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
2	Literatur.....	9
2.1	Epithelien als Barriere.....	9
2.2	Tight junction.....	9
2.3	Proteine der Tight junction.....	10
2.3.1	Occludin.....	11
2.3.2	Claudine.....	12
2.3.3	ZO-1.....	12
2.4	Epithelschäden und Wundheilung.....	13
2.4.1	Reparatur von Epitheldefekten in nicht-intestinalen Systemen.....	15
2.4.2	Reparatur von Epitheldefekten in intestinalen Systemen.....	17
2.5	Zytokine und Wundheilung.....	18
2.5.1	Zytokine / Wachstumsfaktoren und Restitution.....	22
2.6	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED).....	23
2.6.1	Zytokine und CED / Barriere des Darms.....	24
2.7	HIV-Infektion.....	26
2.7.1	Zytokine und HIV-Infektion.....	28
2.7.2	HIV-Enteropathie.....	29
2.7.3	Immundefizienz-Virus beim Tier.....	31
2.8	Ziel meiner Arbeit.....	33
3	Material und Methoden.....	34
3.1	HT-29/B6-Zellen.....	34
3.2	Kulturbedingungen.....	34
3.3	Zytokine.....	35
3.4	Elektrolytlösung.....	36
3.5	Versuchsablauf.....	37
3.6	Vitalitätskontrolle.....	37
3.7	Versuchsaufbau.....	38
3.7.1	Perfusion.....	38
3.7.2	Präparation des Epithels.....	39
3.7.3	Miniaturisierte Ussing-Kammer.....	40
3.7.4	Mikromanipulator.....	41
3.7.5	Mikroskop.....	42
3.8	Immunhistologie.....	43
3.8.1	ZO-1 Färbung.....	43
3.8.2	ZO-1 / Occludin-Doppelfärbung.....	45
3.9	Fluoreszenzmikroskopie.....	46
3.9.1	Konfokale Lasermikroskopie.....	47
3.10	Statistische Auswertung.....	48

4	Ergebnisse	50
4.1	Morphologie der epithelialen Restitution.....	51
4.2	EGF und TGF- β 1 als Positivkontrolle	54
4.3	TNF- α und IL-13 im Restitutionsmodell	56
4.4	Einfluss von HIV -typischen Zytokinen auf die epitheliale Restitution.....	58
4.4.1	Kombination von TNF- α und IFN- γ	59
4.4.2	IFN- γ	60
4.4.3	IFN- α	61
4.4.4	IL-1 β	62
4.4.5	Kombination von HIV -typischen Zytokinen.....	63
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	66
5	Diskussion	69
5.1	Einleitung	69
5.2	Methodik bisheriger Restitutionsversuche	70
5.3	Methodik dieser Arbeit und Methodenkritik	71
5.4	Morphologie der Restitution.....	72
5.5	EGF, TGF- β 1, TNF- α und IL -13 im Restitutionsmodell.....	76
5.6	HIV-typische Zytokine im Restitutionsmodell	79
5.6.1	Kombination von TNF- α und IFN- γ	79
5.6.2	IFN- γ	81
5.6.3	IFN- α	82
5.6.4	IL-1 β	82
5.6.5	Kombination von HIV -typischen Zytokinen.....	84
5.7	Bedeutung der Ergebnisse für das Krankheitsbild der HIV -Enteropathie	85
5.8	Ausblicke auf anzuschließende Studien	85
6	Zusammenfassung	88
7	Summary	90
8	Literaturverzeichnis	92
9	Anhang	106

Verzeichnis der Abkürzungen

AIDS	erworbenes Immundefizienz-Syndrom
ART	antiretrovirale Therapie
BIV	bovines Immundefizienz-Virus
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CTL	zytotoxische T-Zelle
ECM	extrazelluläre Matrix
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor
FIV	felines Immundefizienz-Virus
gp41, -120	virales Oberflächenglykoprotein-41, -120
HAART	hoch aktive antiretrovirale Therapie
HG-EGF	Heparin-bindender epidermaler Wachstumsfaktor
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
IFN- α , - γ	Interferon-alpha, -gamma
IGF-I	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-I
IL-1 β	Interleukin-1 beta
IL-1, -2, -6, -12, -13	Interleukin-1, -2, -6, -12, -13
KGF	Keratinocyten-Wachstumsfaktor
MDM	von Monozyten abstammende Makrophagen
n	Anzahl der Einzelmessungen
n.s.	nicht signifikant
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p55, -75	TNF-Rezeptor 1, -2
Pas.	Passage
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat-Puffer
PDGF	von Thrombozyten abgeleiteter Wachstumsfaktor
SD	Standardabweichung
SIV	Immundefizienz-Virus der Primaten
TGF- α , - β	Transformierender Wachstumsfaktor-alpha, -beta
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
v	mittlere Restitutionsgeschwindigkeit
VEGF	Wachstumsfaktor des Gefäßendothels
ZNS	zentrales Nervensystem
ZO-1 (-2, -3)	Zonula occludens-Protein-1 (-2, -3)

6 Zusammenfassung

Das mukosale Epithel des Intestinaltraktes stellt eine Barriere gegen Noxen und Antigene des Darmlumens dar. Kommt es bei entzündlichen Darmerkrankungen, bakteriellen Infektionen oder durch die tägliche Ingestapassage zu Epithelschäden, wird die epitheliale Barriere durch spezielle Reparaturmechanismen wieder hergestellt. Den ersten Schritt stellt hierbei die Restitution dar, bei der wundnahe Epithelzellen in den Zelldefekt einwandern, um die Wunde abzudecken. Zur vollständigen Regeneration des Gewebes setzt anschließend eine Zellproliferation und -differenzierung ein. Verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren nehmen Einfluss auf die Wundheilung von geschädigtem Darmepithel.

Die bei einer HIV-Infektion symptomatisch auftretende HIV-Enteropathie ist histologisch durch partielle Zottenatrophie, Kryptenhyperplasie und fokalen Zelldegenerationen der Darmschleimhaut gekennzeichnet. In Darmbiopsaten von HIV-infizierten Patienten werden erhöhte Zytokinkonzentrationen nachgewiesen, zum Beispiel von TNF- α , IL-1 β und IFN- γ . Es wurde auch bereits gezeigt, dass die im Überstand von HIV-infizierten Immunzellen detektierten Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IFN- α) die Barrierefunktion von intestinalen HT-29/B6-Zellen beeinträchtigen.

Offen bleibt die Frage, ob neben der Zytokin-bedingten Zellschädigung auch eine verlangsamte Restitution zum Barrieredefekt beiträgt. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Einfluss von HIV-typischen Zytokinen auf die Restitutionsgeschwindigkeit von intestinalen Epithelzellen untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die eine genauere Bestimmung der Restitutionsgeschwindigkeit erlaubt als frühere Verfahren. HT-29/B6-Monolayer wurden einen Tag mit Zytokinen vorinkubiert. Mit einem speziellen Versuchsaufbau wurde eine definierte Fläche aus dem Zellrasen geschnitten. Nach einer 2-stündigen Inkubation wurde fixiert und immunhistologisch gegen die Tight junction-Proteine ZO-1 und Occludin gefärbt. Dadurch konnte der erzeugte Zelldefekt mittels Epifluoreszenzmikroskopie dargestellt werden. Exemplarische Analysen mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops erlaubten eine dreidimensionale Darstellung der Läsion. Durch Ausmessung der Defektes vor und nach 2-stündiger Restitution konnte die Restitutionsgeschwindigkeit berechnet werden.

Im Verlauf der Zellrestitution flachten die defektnahen Zellen ab, bildeten Zell-
ausläufer (Lamellipodien) aus und migrierten in den Defektspalt. An der Zellmembran
der Randzellen konnte lediglich eine schwache bis fehlende Anfärbung der Tight
junction-Proteine nachgewiesen werden. Dies ließ vermuten, dass die Lamellipodien
der migrierenden Zellen während der Restitutionsphase im Bereich des Defektrandes
keine Tight junctions ausbilden. Ursache hierfür könnte das Fehlen von Nachbar-
zellen sein. Erst nach vollständig abgeschlossener Zellwanderung wurden neue Tight
junctions zwischen den dann aneinander grenzenden Zellen gebildet.

Es ist bekannt, dass EGF und TGF- β 1 die epitheliale Restitution positiv beeinflussen.
In der vorliegenden Arbeit konnte nach deren Applikation ebenfalls eine Erhöhung
der Migrationsgeschwindigkeit festgestellt werden. Das proinflammatorische Zytokin
TNF- α , das bei Immunreaktionen und Entzündungsprozessen eine zentrale Rolle
spielt, veränderte die Restitutionsgeschwindigkeit von HT-29/B6-Zellen dagegen
nicht.

Das proinflammatorisch wirkende IL-13 führte zu einer Abnahme der Restitutions-
geschwindigkeit. Dieses Ergebnis könnte im Hinblick auf die chronisch entzündliche
Darmerkrankung Colitis ulcerosa von zentraler Bedeutung sein, da bei einer
experimentellen, durch Oxazolone ausgelösten Colitis, die histologisch mit Colitis
ulcerosa vergleichbar ist, eine erhöhte Produktion von IL-13 stattfindet.

Bei HIV-Infektion typischerweise im Darm nachgewiesene Zytokine wurden im
Restitutionsexperiment zunächst einzeln getestet. Sowohl IFN- γ als auch IFN- α , das
erstmalig in einem Wundheilungsmodell getestet wurde, übte keinen Einfluss auf die
Geschwindigkeit der Restitution aus. Das zu den proinflammatorischen Zytokinen
zählende IL-1 β beschleunigte die Restitution, ebenso die Kombination von TNF- α
und IFN- γ . Abschließend wurden HIV-typische Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IFN- α)
in Kombination in der von HIV-infizierten Immunzellen erzeugten Konzentration
eingesetzt. Diese führten zu einer Erhöhung der Restitutionsgeschwindigkeit.

Es ließ sich somit feststellen, dass die HIV-typische Zytokinmischung die intestinale
epitheliale Restitution beschleunigt und so der gleichzeitig bewirkten Zellschädigung
entgegenwirkt.

7 Summary

HIV-typical cytokines accelerate restitution in cultivated colonic epithelial cells

The mucosal epithelium of the alimentary tract represents a barrier to noxious and immunogenic substances within the intestinal lumen. Damage of the epithelial surface which is seen both, under physiological condition and in certain pathophysiological changes, like inflammatory bowel disease or bacterial infections. Resealing of the mucosal epithelium is accomplished by epithelial cell migration, termed restitution, cell proliferation and differentiation. Repair of the intestinal surface epithelium is regulated by various cytokines and growth factors.

HIV enteropathy, which is often seen in HIV-infected patients, is histologically described by partial villous atrophy, crypt hyperplasia and focal cell degeneration. Increased levels of TNF- α , IL-1 β and IFN- γ are found in intestinal biopsies of HIV-infected patients. From previous studies it is known that HIV infection of immune cells leads to increased cytokine production (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IFN- α). Furthermore it is shown that this specific cytokine pattern alters barrier function in intestinal HT-29/B6 cells.

Apart from cytokine induced barrier defects nothing is known about the modulation of epithelial restitution. For the first time this work addressed the question which kind of effects HIV-typical cytokines have on epithelial restitution.

In the present study a new method was developed, which allows a more exact measurement of the velocity of restitution than previous methods. HT-29/B6 monolayers were incubated with cytokines for one day. Thereafter, a defined area of the monolayer was cut out. Two hours later the epithelium was fixed and stained using ZO-1 and occludin antibodies to visualize the tight junctions. The three-dimensional structure of the cell lesion was generated by confocal laser scanning microscopy. The extent to which the gap was closed was measured and from that the velocity of restitution was determined.

During restitution the epithelial cells adjacent to the lesion flatten, form lamellipodia and migrate into the wound to cover the denuded area. Absence of tight junction

staining in the marginal cells suggested that the lamellipodia do not form tight junction during restitution. That may be caused by the absence of neighboring cells. As soon as cell migration was completed, formation of tight junction strands between the neighboring cells was observed.

From several studies it is known that EGF and TGF- β 1 stimulate intestinal epithelial cell restitution. In the present report application of this cytokines promoted the velocity of restitution. TNF- α , a central mediator in immune response and inflammation, did not alter the restitution of HT-29/B6 cells.

The recently characterized pro-inflammatory cytokine IL-13, which is the key cytokine in an experimental model of ulcerative colitis, inhibited intestinal cell migration. This effect might contribute to the epithelial barrier dysfunction seen in ulcerative colitis.

The cytokine production in the intestinal mucosa of HIV patients is altered. These HIV-typical cytokines were tested in the restitution experiment. IFN- γ as well as IFN- α did not alter the velocity of cell migration. IL-1 β , a proinflammatory cytokine, stimulated the restitution, and the same did the combination of TNF- α and IFN- γ . Finally, the combination of HIV-typical cytokines (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IFN- α) was applied at a concentration found to be produced by HIV-infected immune cells. They enhanced the velocity of the epithelial restitution.

In summary, these results indicate that the combination of HIV-typical cytokines stimulate the intestinal epithelial restitution and thereby counteract their destructive effect on mucosal epithelium.

9 Anhang

Tests der Zwischensubjekteffekte

Abhängige Variable: GESCHWIN

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Korrigiertes Modell	436,818 ^a	3	145,606	24,021	,000
Konstanter Term	7255,028	1	7255,028	1196,880	,000
PASSAGE	312,422	1	312,422	51,541	,000
FILTER	136,994	1	136,994	22,600	,000
PASSAGE * FILTER	15,866	1	15,866	2,618	,110
Fehler	400,067	66	6,062		
Gesamt	8431,313	70			
Korrigierte Gesamtvariation	836,885	69			

a. R-Quadrat = ,522 (korrigiertes R-Quadrat = ,500)

Tab. 4: Varianzanalyse

Im Versuchsansatz „HIV-typische Zytokine in Kombination“ wurden aus labortechnischen Gründen zwei unterschiedliche Zellpassagen (29. bzw. 30.) verwendet. Da verschiedene Zellpassagen der Zelllinie HT-29/B6 unterschiedliche Restitutionsgeschwindigkeiten aufwiesen, was anhand der Ergebnisse der Kontrollfilter ersichtlich war, wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Die in dieser Modellvorstellung geprüften Faktoren waren Passage, Filter und Passage * Filter. In der Varianzanalyse ergaben sich Unterschiede bei Passage und Filter, jedoch gab es keinen Unterschied bei der Wechselwirkung beider Faktoren.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Physiologie für die herzliche Aufnahme in ihre Abteilung und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. phil. nat. Alfred H. Gitter und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Michael Fromm für die Vergabe des Dissertationsthemas, für die ausgezeichnete Betreuung und den stetigen Antrieb bei der Fertigstellung der Dissertation.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. Holger Martens danke ich für die Bereitschaft, meine Dissertation fachlich im Fachbereich Veterinärmedizin zu vertreten.

Herrn Dr. med. vet. Peter Florian und Herrn Ing. grad. Detlef Sorgenfrei danke ich ganz besonders für die fortwährende und geduldige Betreuung bei allen technischen Problemen, im Umgang mit dem Conductance scanning-Versuchsstand und bei allen Computerschwierigkeiten.

Den technischen Assistentinnen Frau Sieglinde Lüderitz und Frau Anja Fromm danke ich für beständigen Zelnachschub und für die umfassende Unterstützung meiner Arbeit.

Den Mitarbeiterinnen des Instituts für Biometrie und Informationsverarbeitung, besonders Frau PD Dr. rer. pol. Susanne Dahms, danke ich für die statistische Beratung.

Abschließend möchte ich mich besonders herzlich bei meinen Eltern, Rosemarie und Kurt Christ, bedanken, die mich jederzeit unterstützt und mir das Studium sowie die Promotion ermöglicht haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig
und nur mit den aufgeführten Hilfsmitteln erstellt habe.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit
erschienene Publikationen

Abstracts

M. Christ, P. Florian, J.D. Schulzke, M. Fromm, A.H. Gitter (2002)
HIV cytokines accelerate epithelial restitution of HT-29/B6 intestinal cells.
(European Intestinal Transport Group) *J. Physiol. Biochem.* 58(4): 268.

M. Christ, P. Florian, M. Fromm, J.D. Schulzke, A.H. Gitter (2002)
HIV-typical cytokines cause faster restitution of damaged colonic epithelium.
In: *Jahrbuch 2002 des Fachbereichs Humanmedizin der FU Berlin*, Hrsg.: M.
Fromm, Kommission des Fachbereichs, S. 346.

M. Christ, P. Florian, J.D. Schulzke, M. Fromm, A.H. Gitter (2003)
Epitheliale Barriere-defekte bei HIV-Enteropathie beruhen nicht auf
verminderter Restitution. 25. Kongress der DVG in Berlin.

P. Florian, M. Christ, I. Kimmritz, J.D. Schulzke, M. Fromm, A.H. Gitter (2003)
HIV-typical cytokines influence restitution and single-cell repair of colonic
epithelium in an adverse manner. (Deutsche Physiologische Gesellschaft)
Pflügers Arch. 445: S101.

F. Heller, P. Florian, C. Bojarski, M. Christ, J. Mankertz, M. Zeitz, M. Fromm,
J.D. Schulzke (2003)
Interleukin-13 als zentrales Agens bei Colitis ulcerosa: Schädigender Effekt
auf intestinale Barriere, Tight junctions, Apoptoserate und Wundheilung.
In: *Jahrbuch 2003 des Campus Benjamin Franklin, Charité – Universitätsmedizin
Berlin*, Hrsg.: M. Fromm, Kommission CBF, S. 408.

Originalarbeit eingereicht

F. Heller, P. Florian, C. Bojarski, M. Christ, J. Mankertz, A.H. Gitter, M. Fromm,
M. Zeitz, W. Strober & J.D. Schulzke
IL-13 as key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis affects epithelial tight
junction, apoptosis and restitution in HT-29/B6 cells
Gastroenterology