

## 3 Material und Methoden

### 3.1 HT-29/B6-Zellen

Der Klon B6 wurde in unserem Labor aus der Zelllinie HT-29 entwickelt (Kreusel et al., 1991). Er bildet hochdifferenzierte und polarisierte Monolayer und entwickelt einen apikalen Bürstensaum sowie interzelluläre *Tight junctions*. Funktionell betrachtet besitzt er die Eigenschaft, Mukus und Chlorid zu sezernieren. Mit Hilfe der hochauflösenden Conductance scanning-Technik, die es erlaubt zwischen trans- und parazellulären Leitfähigkeiten zu diskriminieren, konnte gezeigt werden, daß es sich um ein dichtes Epithel handelt (Gitter et al., 2000b). Da somit wichtige Eigenschaften von Enterozyten für den Klon B6 nachgewiesen sind, eignet sich dieses Zellmodell für die Untersuchung der epithelialen Barrierefunktion des distalen Kolons und der Wirkung von Zytokinen (Bendfeldt, 2000; Gitter et al., 2000a).

#### Kulturbedingungen

HT-29/B6-Zellen wurden in Kunststoffkulturflaschen mit Zellkulturmedium (RPMI 1640, Biochrom KG, Berlin, Germany) mit 10% fetalem Kälberserum, 100 Units/ml Penizillin, 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom), 2% stabilisiertem N-acetyl-L-Alanin-L-Glutamin und 2,0 g/l NaHCO<sub>3</sub> (FG 1215, Biochrom, Berlin, Germany) (im weiteren als Vollmedium bezeichnet) unter physiologischen Bedingungen bei 37 °C in einer Atmosphäre von 95% Luft und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zweimal pro Woche wurde das Vollmedium erneuert, die Trypsinierung sowie Neuaussaat der Zellen (Passagieren) erfolgte alle 10 Tage.

Für elektrophysiologische und morphologische Studien wurden die Zellen in der 28-sten bis 31-sten Passage und in einem zweiten Versuchsansatz in der 32-sten und 33-sten Passage auf Millicell<sup>®</sup>-PCF-Zellkulturfiltern ausgesät. Die Zellzahl betrug bei Aussaat  $7 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>. Die Zellen wurden anschließend 6 Tage in konventionellen Kulturschalen (Durchmesser: 6 cm) bis zur Konfluenz kultiviert. Der Zellkulturfilter und damit das apikale Kompartiment wurde dafür mit 500 µl, die Kulturschale und damit das basolaterale Kompartiment mit 10 ml Kulturmedium gefüllt.

Die durch Zählung im Lichtmikroskop ermittelte Zellzahl betrug bei Konfluenz  $4-5 \times 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup>. Die konfluenten Monolayer wurden mit neuem Vollmedium kultiviert und 12 Stunden später mit den Testsubstanzen (Abschnitt

3.3) inkubiert. Alle Experimente wurden am 7. Tag nach Aussaat durchgeführt.

Für alle Untersuchungen wurden Millicell<sup>®</sup>-PCF-Filter verwendet, denn die für die Kultivierung genutzten Filter wiesen eine ausreichende Durchlässigkeit (Porendurchmesser 3 µm) für das Kulturmedium und die Inkubations-substanzen auf. Weiterhin war eine gute Adhäsion der Zellen gewährleistet. Die Filter waren transparent und hatten einen geringen Eigenwiderstand (131 Ω bei einer Fläche von 0,6 cm<sup>2</sup>, Messung bei 37 °C). Da das Filtermaterial gut schneidbar war, ließ sich die Membran für die elektrophysiologischen Untersuchungen gut von der Ringhalterung trennen. Millicell<sup>®</sup>-PCF-Filter bestehen aus einer Polycarbonatmembran (Filterdurchmesser 12 mm) mit hoher Porendichte, die eine ausreichende Versorgung des Epithels mit dem Zellkulturmedium gewährleistete, wie Versuche mit längerer Kultivierung auf diesem Filtertyp zeigten. Die relativ gute mechanische Eigenstabilität der Millicell<sup>®</sup>-PCF-Zellkulturfilter gewährleistete während der Messungen einen konstanten Abstand der Mikroelektroden zur mukosalen Zelloberfläche. Durch eine leichte Erhöhung des Flüssigkeitsstandes auf der mukosalen Seite des Epithels wurde durch Andruck die horizontale Position des Filters in der horizontal montierten Ussing-Kammer des Conductance scanning-Versuchsstandes zusätzlich unterstützt.

### 3.2 Distales Kolon der Maus

Neben den Untersuchungen am Zellmodell HT-29/B6 bestand eine wesentliche Aufgabe dieser Arbeit darin, Messungen am nativen Gewebe zu etablieren. Aufgrund der Notwendigkeit, im Rahmen der Messung im Conductance scanning-Versuchsstand gute optische Verhältnisse zu gewährleisten, erwies sich "gestripptes", distales Mauskolon als geeignet.

Als Versuchstiere dienten männliche NMRI-Mäuse (Auszuchtstamm; Lieferant: Tierzucht Schönwalde GmbH, Hauptstr. 62, 16352 Schönwalde). Während der Zeit nach der Lieferung bis zum Versuchstag hatten die Tiere freien Zugang zu Leitungswasser und Standardfutter (Altromin<sup>®</sup>, Standarddiät 1320, Firma Altromin, Lage/Lippe). Das Körpergewicht lag am Versuchstag zwischen 30 und 35 g.

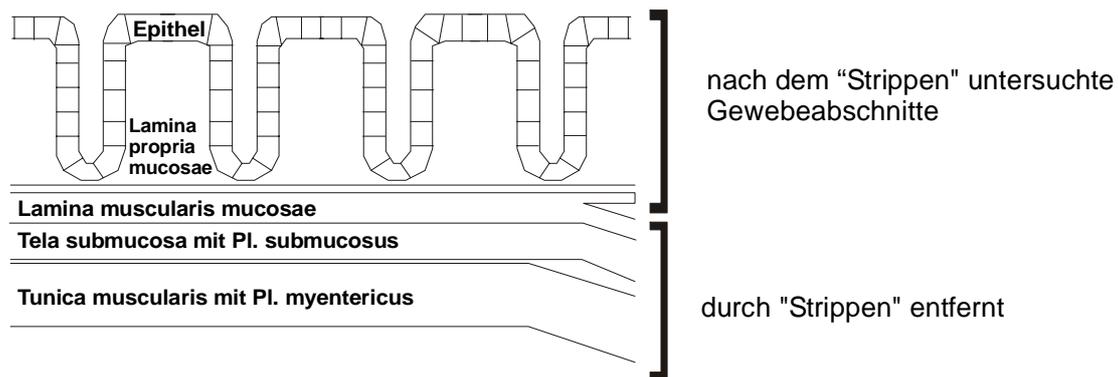
Die Mäuse wurden durch eine Begasung mit hundertprozentigem CO<sub>2</sub> in einer Glasglocke und unmittelbar danach durch Eröffnung des Herzens getötet. Dieses Vorgehen steht im Einklang mit den Richtlinien der *Society of*

*Laboratory Animal Science* (GV-SOLAS). Anschließend wurden die Tiere gewogen, dann der Bauchraum entlang der Linea alba vom Sternum bis zur Symphyse eröffnet. Nach Verlagerung des Dünndarmkonvolutes wurde ein Schambein seitlich des nun sichtbaren distalen Kolons durchtrennt und auseinandergedrückt. Das distale Kolon wurde in einer Höhe von ungefähr 3 cm ab ano vom proximal verlaufenden Kolon abgesetzt, freipräpariert und entnommen. Durch eine vorsichtige Spülung mit begaster Kontroll-Elektrolyt-lösung (Zusammensetzung, siehe 3.3) wurde der Darminhalt entfernt und danach das entnommene Darmstück entlang des Mesenterialansatzes aufgeschnitten. Die weitere Präparation ist im Abschnitt 3.2.1 beschrieben.

### **3.2.1 Präparation der nativen Epithelien**

Die Präparation des Mäusekolons erfolgte nach einer häufig als "Strippen" bezeichneten Technik.

Aufgrund des sehr dünnen Gewebes der Maus erwies sich ein "totales" Strippen (Schulzke et al., 1986) als nicht praktikabel, da es zu unnötigen präparatorischen Defekten führte. In den Versuchen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, wurde das sogenannte "partielle" Strippen (Frizzell et al., 1976) durchgeführt. Hierbei beschränkte sich die Präparation auf die Entfernung der Tunica muscularis die gleichzeitig mit der Lamina muscularis mucosae und der Tela submucosa entfernt wurden. Somit lag für die Untersuchungen Gewebe bestehend aus Epithel, Lamina propria mucosae und Resten der Lamina muscularis mucosae vor (Abb. 3). Dies konnte in routinemäßig durchgeführten histologischen Untersuchungen (Abb. 30) bestätigt werden, so daß sichergestellt war, daß in allen Experimenten gleiche Ausgangsbedingungen zu Grunde gelegt waren.



**Abb. 3: Schematische Darstellung der nach der Präparation untersuchten Gewebeschichten der Darmwand**

Bemerkung: Beim Strippen wurden die Tunica muscularis zusammen mit der Lamina muscularis mucosae und der Tela submucosa entfernt. Modifiziert nach Hegel (Hegel und Fromm, 1990).

Das aufgeschnittene Darmsegment wurde mit der mukosalen Seite nach unten flach auf eine schwarze Plastikfolie auf einer mit Silikon (Elastosil® RT 604, Wacker Chemie, München, Deutschland) ausgegossenen Plastikpetrischale (Nalge Nunc International, Dänemark) gelegt. Das distale Ende wurde mittels zweier Stahlnadeln auf der Unterlage durch schräges Einstechen fixiert und das Gewebe vorsichtig in Längsrichtung gespannt, indem das proximale Ende mit einem Objektträger fest auf die Unterlage gedrückt und ein leichter Zug ausgeübt wurde. Mit einem Skalpell wurde die Tunica muscularis entlang des Objektträgers über die ganze Breite des Darmstückes durchtrennt, ohne das Epithel zu verletzen. Die Schnittränder klafften aufgrund der Eigenelastizität der Muskelschichten deutlich auseinander, und ließen sich nun mit einer gebogenen Pinzette leicht gemeinsam mit der Tela submucosa und der Lamina muscularis mucosae von der Lamina propria mucosae abziehen. Während des ganzen, etwa 10 min dauernden Vorgangs, wurde das Epithel mit begaster Kontroll-Elektrolytlösung feucht gehalten.

### 3.2.2 Einspannen des Epithels

Das gestrippte Epithel wurde mit Hilfe von 8-10 Stahlnadeln unter leichter Dehnung auf der Silikonplatte festgesteckt. Danach wurde mittels Histoacryl® Gewebekleber (B. Braun Melsungen AG, Carl-Braun-Straße 1, 34212 Melsungen) ein speziell für die Container (s. Abschnitt 3.5.2) des jeweiligen Meßstandes (Ussing oder Conductance scanning) angefertigter Plexiglasring

auf die serosale Seite des Gewebes aufgeklebt. Die Benetzung des Ringes mit Kleber erfolgte auf einem Stück Filterpapier, das auf einem Objektträger liegend, zu diesem Zweck mit Gewebekleber getränkt worden war. Vor dem Aufsetzen auf das Gewebe war es wichtig, den Kleber etwas antrocknen zu lassen (ca. 3 sec), um ein Verlaufen innerhalb des Ringes über dem Gewebe zu vermeiden. Nachdem der Kleber auf dem Gewebe fest war, wurde das umliegende Gewebe vorsichtig mit einer Augenschere entfernt und der Ring in den jeweiligen Container gebracht. Der Container wurde bei den Ussingexperimenten in eine hierfür modifizierte Ussingkammer gelegt und durch die beiden Kammerhälften zentriert gehalten. Die Fixierung im Versuchsstand erfolgte mit Hilfe einer Schraubzwinde, mit der die beiden Kammerhälften zusammengedrückt wurden. Die konische Spitze der in einer Halterung verankerten Schraube paßte dabei genau in eine Vertiefung auf der Außenseite der Kammer und entsprach einem auf der Gegenseite fest angebrachten Dorn. Somit konnte ein exakt in der Längsrichtung der Kammer verlaufender Druck ausgeübt werden, der ausreichte, um die Kammer abzudichten (Abb. 4). Umgehend wurden nun die Reservoirs der Begasungsaufsätze und damit beide Kammerhälften mit je 10 ml der begasten Badlösung gefüllt.

Für die Conductance scanning-Experimente (Abschnitt 3) wurde der neu konstruierte Container (Abschnitt 3.5.2) entsprechend angepaßt, um den speziell angefertigten Ring genau aufzunehmen. Nachdem das durch den Ring gehaltene Gewebe von den beiden Containerhälften umschlossen war, wurde der Container nach dem oben beschriebenen Verfahren in einer konventionellen Ussing-Kammer eingespannt. Nach 17-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen wurde der Container geschlossen entnommen und umgehend in den Conductance scanning-Meßstand horizontal eingebracht und die Ussing-ähnliche Kammer des Meßstandes verschlossen. Während der sich anschließenden Experimente wurden beide Kompartimente (serosal und mukosal) mit einer Perfusionsrate von 1,6 ml/min von der 37 °C warmen Elektrolytlösung durchströmt und mit Carbogen (95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) begast.

### 3.3 Lösungen und Testsubstanzen

#### Kontroll<sup>4</sup>-Elektrolytlösung

Die Experimente wurden in folgender Badlösung durchgeführt (alle Angaben in mmol l<sup>-1</sup>):

NaCl	113,6
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,4
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6
NaHCO <sub>3</sub>	21
KCl	5,4
CaCl <sub>2</sub>	1,2
MgCl <sub>2</sub>	1,2

Durch Begasung der Lösung mit Carbogen wurde ein pH von 7,4 eingestellt. Die Osmolalität der Lösung wurde routinemäßig mit einem Dampfdruck-Osmometer (5100B Vapor Pressure Osmometer, Wescor, Inc., Utah, USA) bestimmt und betrug 285 mosmol kg<sup>-1</sup>. Die Leitfähigkeit betrug 18,62 mS cm<sup>-1</sup> bei 37 °C. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden der Lösung folgende Substrate zugesetzt (in mmol l<sup>-1</sup>):

D-β-Hydroxybuttersäure	0,5
L-Glutamin	2,5
D(+)-Mannose	10
D(+)-Glucose	10

---

<sup>4</sup> Mit Kontrollen sind in dieser Arbeit immer unbehandelte Epithelien (ohne Calciumentzug, TNF-α- oder IFN-γ, Cytochalasin D-, BDM-, ML-7- oder Y-27632-Präinkubation) gemeint.

### Niedrigkalzium-Elektrolytlösung

Für die Niedrigkalzium-Experimente (auch: serosaler Kalziumentzug) wurde eine  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  EGTA-Stammlösung (Serva, Heidelberg) in Wasser durch Titration des pH-Wert von 7,4 mittels  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  NaOH hergestellt. Diese wurde der Kontroll-Elektrolytlösung zugefügt, um eine Ringerlösung mit geringer freier  $[\text{Ca}^{2+}]_a$ -Konzentration herzustellen. Die daraus resultierenden Konzentrationen während der Conductance scanning-Experimente (Abschnitt 3.6.3) betragen serosal:  $1,55 \text{ mmol l}^{-1}$  EGTA und  $0,25 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$  freies  $\text{Ca}^{2+}$ .

### Tumornekrose Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ )

Humanes rekombinantes TNF- $\alpha$  (Biomol, Hamburg) wurde auf der serosalen Seite der HT-29/B6-Zellen dem Vollmedium zugegeben oder serosal in den Ussingexperimenten am Mauskolon eingesetzt. Um eine Endkonzentration von  $100 \text{ ng/ml}$  TNF- $\alpha$  zu erzielen, wurden dem basolateralen Kompartiment  $100 \text{ } \mu\text{l}$  TNF- $\alpha$  (Stammlösung:  $10 \text{ ng/} \mu\text{l}$ , haltbar mehrere Monate bei  $-20^\circ\text{C}$ ) zugesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Lösung entfernt, das basolaterale Kompartiment mehrfach mit Kontrollmedium gespült und die Epithelien den anschließenden Untersuchungen entsprechend weiterbehandelt (Abschnitte 3.6.6 und 3.6.8).

### Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )

Rekombinantes IFN- $\gamma$  aus der Ratte (Biotrend Chemikalien GmbH) wurde nur bei dem nativen Kolongewebe der Maus serosal in Kombination mit TNF- $\alpha$  angewendet. Hierfür wurde eine Stammlösung mit  $10000 \text{ Units/}100 \mu\text{l}$  angesetzt. Um eine Endkonzentration von  $1000 \text{ Units/ml}$  zu erreichen, wurden  $100 \text{ } \mu\text{l}$  in  $10 \text{ ml}$  Kontroll-Elektrolytlösung in die Ussingkammer gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde genauso verfahren wie unter TNF- $\alpha$  beschrieben (Abschnitt 3.6.8).

### Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)

Humanes rekombinantes EGF (Biosource International, Inc., USA) wurde zu den Versuchen zur Restitution der Einzelzell-Läsion bei den HT-29/B6 Monolayern eingesetzt. Die bis zur Konfluenz inkubierten Monolayer wurden am 4. Tag der Inkubation über 24 Stunden von serosal mit EGF vorinkubiert. Dafür wurde eine Stammlösung von  $2 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$  EGF hergestellt. Zum Erreichen der Endkonzentration von  $20 \text{ nmol l}^{-1}$  wurden  $100 \text{ } \mu\text{l}$  auf die im serosalen

Kompartiment vorhandenen 10 ml der Kulturschale gegeben. Nach der Inkubationszeit wurde ein Einzelzelldefekt vermessen (Abschnitt 3.6.7).

### Cytochalasin D

Cytochalasin D (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) wurde in einer Stammlösung mit  $2 \text{ mmol l}^{-1}$  Cytochalasin D in Dimethylsulfoxid (DMSO) angesetzt. Die Endkonzentration betrug  $2 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$  (serosal). Kontrollexperimente mit 0.1% DMSO zeigten, daß DMSO weder Einfluß auf den transepithelialen Widerstand noch auf die Restitution von Einzelzell-Läsionen hat.

### 2,3-Butandion Monoxim (BDM)

Da sich BDM relativ schwer lösen läßt, wurde zunächst eine  $0,5 \text{ mol l}^{-1}$  Stammlösung in Wasser durch relativ langes, starkes Schütteln (5 - 10 Minuten) mittels eines Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Inc., NY, USA) hergestellt. Die Experimente wurden mit einer Endkonzentration von  $20 \text{ mmol l}^{-1}$  durchgeführt. BDM wurde gleichzeitig mukosal und serosal eingesetzt.

### 1-(5-Iodonaphthalen-1-Sulfonyl)-1H-Hexahydro-1,4-Diazepin (ML-7)

ML-7 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) wurde für die Experimente direkt in Zellkulturmedium, das 0,1 % Rinderserum-Albumin (BSA) enthielt, in einer Konzentration von  $100 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$  eingesetzt. Die Zellen wurden für vier Stunden vorinkubiert bevor sie in den Conductance scanning-Meßstand verbracht wurden.

### Y-27632

Der Inhibitor Y-27632 (Tocis Cookson Ltd., Bristol, United Kingdom) wurde in einer Stammlösung mit  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  in Zellkulturmedium mit 0,1 % BSA angesetzt. Die Messungen wurden nach vierstündiger Vorinkubation bei einer Endkonzentration von  $100 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$  auf beiden Seiten des Epithels durchgeführt.

Alle Messungen zur Zytoskelettmodulation sind in den Abschnitten 3.6.2 bis 3.6.4 detailliert erläutert.

### 3.4 Elektrophysiologische Vorexperimente

#### 3.4.1 Messung des transepithelialen Widerstandes ( $R^t$ )

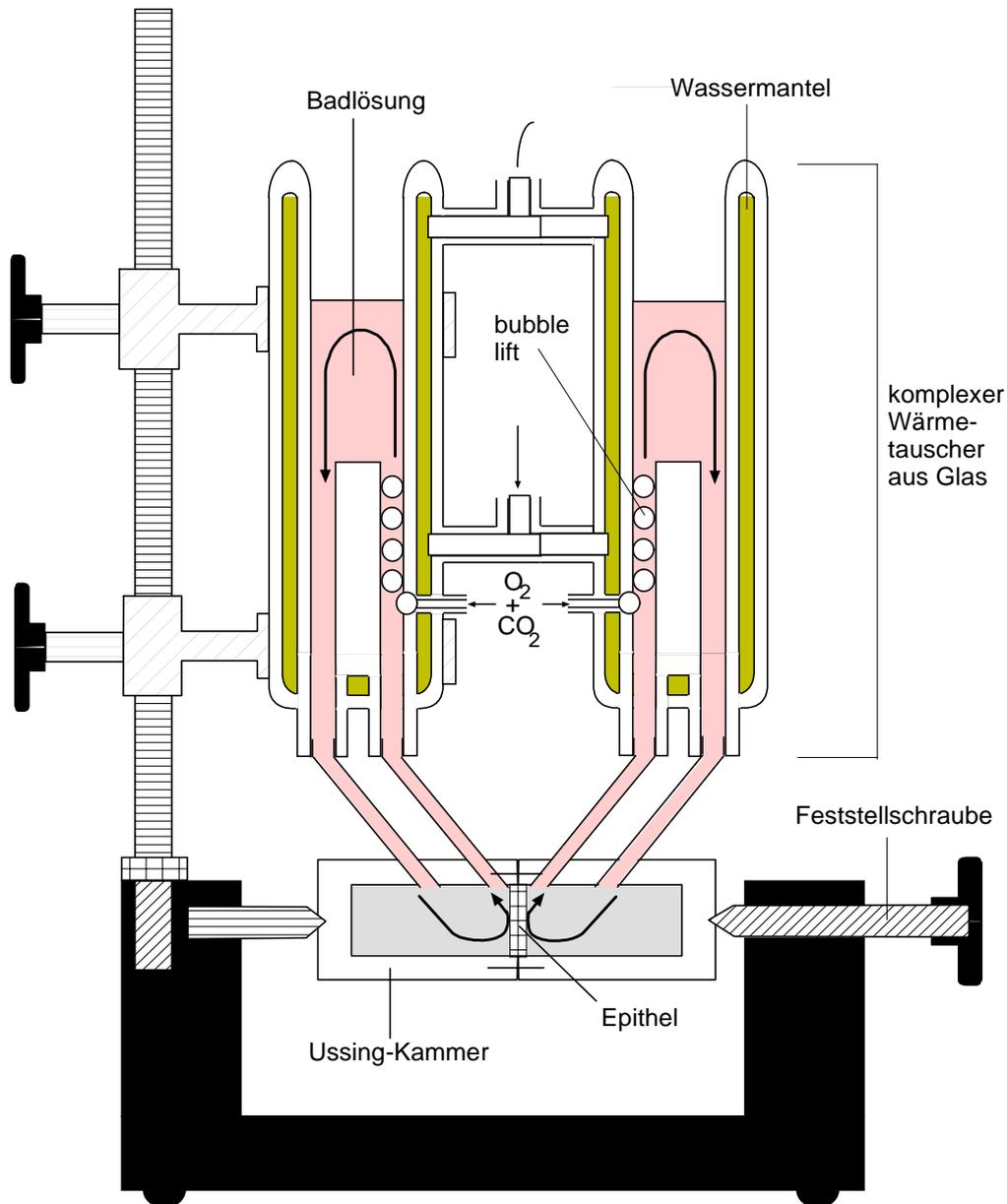
Zur Kontrolle von Viabilität und Konfluenz der Zellen während ihres Wachstums auf den Zellkulturfiltern war eine regelmäßige Messung des transepithelialen Widerstandes ( $R^t$ ) erforderlich. Diese erfolgte in den Kulturschalen mit Hilfe von zwei fixierten Elektrodenpaaren (STX-2, World Precision Instruments, USA), die mit einem Widerstandsmeßgerät (D. Sorgenfrei, Inst. für Klinische Physiologie) verbunden waren.

$R^t$  ergab sich aus den Spannungsänderungen, die durch einen Rechteckstrom ( $\pm 10 \mu\text{A}$ , 21 Hz) hervorgerufen wurden. Die Meßwerte wurden um den Widerstand des leeren Filters und der Badlösung, der sich durch Messung eines zellfreien Filters unter gleichen Bedingungen ergab, korrigiert. Voraussetzung waren die Standardisierung von Filterposition und Eintauchtiefe der Elektroden sowie das Konstanthalten der Temperatur ( $37^\circ\text{C}$ ). Die Zellen verblieben während der Widerstandsmessung im Kulturmedium und wurden zwischen den Einzelmessungen im Zellkultur-schrank unter Standardbedingungen weiterkultiviert.

#### 3.4.2 Ussing-Experimente

Mit Hilfe der 4-Elektroden-Technik nach Ussing und Zerahn (Ussing und Zerahn, 1951) lassen sich Gesamtleitfähigkeit und elektrogener Stofftransport eines Epithels bestimmen. Dabei werden der sogenannte "Kurzschlußstrom" ( $I_{sc}$ ), die transepitheliale Spannung und der transepitheliale Widerstand bzw. die Leitfähigkeit gemessen. Durch gezielte Gabe von Blockern oder Stimulatoren von Transportmolekülen oder Rezeptoren der Plasmamembran können diese Parameter verändert werden. Die elektrophysiologische Antwort des Epithels gibt Aufschluß über die Art der jeweils vorherrschenden Transportprozesse. Die Einzelheiten der Methode können früheren Arbeiten entnommen werden (Epple, 1993; Bode, 1997). In dieser Arbeit wurden Ussing-Experimente durchgeführt, wenn der  $R^t$  kontinuierlich über längere Zeiträume gemessen werden sollte (Abschnitte 3.6.2 und 3.6.3). Der im Institut entwickelte Kammeraufbau entsprach grundsätzlich der von Ussing vorgeschlagenen Anordnung, d.h. mit einem vertikal in die Kammer montierten Epithel (Abb. 4, (Ussing und Zerahn, 1951)). Die beiden durch das Epithel getrennten (mukosalen und serosalen) Flüssigkeitskompartimente enthielten in den Experimenten mit unbehandelten Epithelien Kontroll-

elektrolytlösung. Die physiologischen Druck-, Temperatur- und Begasungsverhältnisse in den beiden Hälften der Kammer waren äquivalent.



**Abb. 4: Ussing-Versuchsstand mit Wärmetauscher sowie integrierter Begasung und Umwälzung (*bubble lift*)**

Das Epithel ist zwischen den beiden Kammerhälften der Ussing-Kammer wie eine "Trennmembran" aufgespannt und wird von auf 37 °C erwärmter Badlösung umspült. Die Zirkulation der Lösung wird durch die über den *bubble lift* aufsteigenden Gasbläschen aus 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> aufrechterhalten. Die Erwärmung der Badlösung erfolgt über einen komplexen Wärmetauscher in dessen doppelter Wandung sich Wasser befindet, welches über ein temperiertes Wärmebad umgewälzt wird. (mit Erlaubnis aus: (Barmeyer, 2002))

### 3.5 Conductance scanning

Die konventionelle Ussing-Technik erlaubt zwar die Ermittlung der Ionenleitfähigkeit eines gesamten Gewebes, zeigt aber nicht ihre räumliche Verteilung. Insbesondere bei der Untersuchung von Epithelien bezüglich ihrer Transport- und Barriereigenschaften ist die elektrophysiologische Forschung jedoch an der Lokalisierung und Quantifizierung von Leitfähigkeiten im lebenden Epithel interessiert. Bereits 1972 gelang es Frömter (Frömter und Diamond, 1972), später auch Cereijido (Cereijido et al., 1980) mit der Voltage scanning-Methode qualitativ zwischen Schlußleisten- und Zelleitfähigkeiten zu unterscheiden. Ihre Methode erlaubte jedoch noch keine Quantifizierung der parazellulären Leitfähigkeit.

Köckerling et al. (Köckerling et al., 1993) und Köckerling und Fromm (Köckerling und Fromm, 1993) konnten dann in Weiterentwicklung der Technik am Rattendarm erstmals distinkte Epithelbereiche, wie z.B. Krypten und Oberflächen differenzieren. Die Quantifizierung der trans- und parazellulären epithelialen Leitfähigkeit gelang erstmals Gitter et al. (Gitter et al., 1997) an der Nierenzelllinie MDCK mit der als "hochauflösendes" Conductance scanning bezeichneten und zu einem quantitativen Verfahren entwickelten Methode.

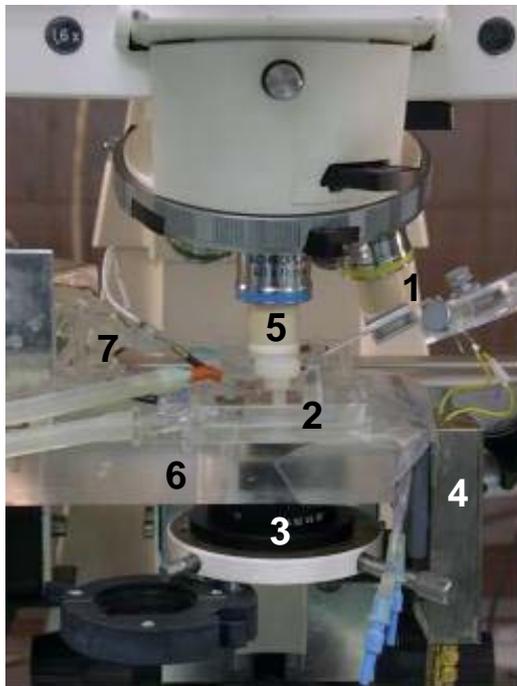
Neben diesem "hochauflösenden" Conductance scanning-Verfahren werden ein niedriges und mittleres Auflösungsverfahren unterschieden. Mit der niedrigen Auflösung ist es z.B. möglich, Leitfähigkeitszunahmen im Epithel bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu messen (Gitter et al., 2001). In der mittleren Auflösungsstufe hingegen wurden z.B. die Leitfähigkeiten von Einzel-Apoptosen untersucht und quantifiziert (Bendfeldt, 2000; Gitter et al., 2000a).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Conductance scanning-Methode in der mittleren Auflösungsstufe eingesetzt, um die Leitfähigkeit eines artifiziell gesetzten Einzelzellschadens zu messen.

Alle Conductance scanning-Experimente fanden unter lichtmikroskopischer Kontrolle statt. Die Präparation wurde per Videomikroskopie durch ein Wasserimmersionsobjektiv (Achromplan 40×, numerische Apertur 0,75, Arbeitsabstand 1,98 mm, Zeiss) und mit optischer Nachvergrößerung (Optovar ×1.0 - ×1.6, Zeiss) betrachtet. Mittels einer Videokamera (Sony Color Video Camera, CCD-IRIS-RGB, Sony) und einem digitalen Bild-

verarbeitungssystem (Screen machine II, Fast electronic GmbH) konnte das Bild aufgenommen und auf dem Monitor eines Computers gezeigt werden. Die Bilder wurden als Datei im TIF- oder JPG-Format gespeichert.

In Abb. 5 ist die Conductance scanning-Apparatur dargestellt.



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

### Abb. 5: Conductance scanning-Apparatur

In der Abbildung ist das neu konstruierte Mikroelektrodenpaar (1) kurz vor dem Eintritt in die miniaturisierte Ussing-Kammer (2) zu sehen. Die Versuche fanden unter optischer Kontrolle mit Hilfe des Wasserimmersionsobjektivs (5) statt. Der Objektisch (6) wurde dabei mit Hilfe eines computergesteuerten Mikromanipulators bewegt. Um das Gewebe bei 37 °C (HT-29/B6) bzw. bei 39 °C (Mauskolen) zu halten, fand kurz vor dem Eintritt der Carbogenbegasteten Elektrolytlösung eine Erwärmung der Lösung in dem vorgeschalteten Wärmetauscher (7) statt.

#### 3.5.1 Theoretische Grundlagen

Eine heterogene Leitfähigkeit des Gewebes ergibt sich unter anderem aus der unterschiedlichen Leitfähigkeit von trans- und parazellulären Wegen sowie aus der unterschiedlichen Leitfähigkeit von apoptotischen und nicht-apoptotischen Zellen oder, wie weiter unten gezeigt, aus der unterschiedlichen Leitfähigkeit eines Einzelzelldefektes im Vergleich zum intakten Epithel. Wie bereits erwähnt, knüpft Conductance scanning an das von Frömter entwickelte Meßprinzip "Voltage scanning" an. Die Methode beruht auf der Analyse von lokalen Unterschieden der Stromdichte, die in der

Badlösung über der apikalen Oberfläche der Epithelzellen mit einem Mikroelektrodenpaar aufgezeichnet werden, während ein bekannter Wechselstrom durch das Epithel fließt. Hierbei wird der Gradient des elektrischen Potentials, also das elektrische Feld, über der mukosalen Oberfläche eines flachen Epithels gemessen. Unterschiede der epithelialen Leitfähigkeit werden so aufgelöst und, nach Vergleich mit einem mathematischen Modell, quantifiziert (Gitter et al., 1997; Gitter et al., 2000a). Durch vorherige Kontrollexperimente (Gitter et al., 1997), konnte ausgeschlossen werden, daß die Messungen durch Amplitude oder Frequenz des applizierten Wechselstroms beeinflusst wurden.

### 3.5.1.1 Apparente Leitfähigkeit

Das in der mukosalen Badlösung generierte elektrische Feld ( $\Delta V/\Delta z$ ) wurde mit einem mobilen Sensor, dem Mikroelektrodenpaar, in einem konstanten Abstand  $z_0$  über der Oberfläche gemessen. Dieser Abstand wurde durch Annäherung an die Oberfläche an jeder Meßposition neu eingestellt. Dies geschah einerseits durch eine optische Einschätzung der Entfernung, andererseits wurde das Berühren der Oberfläche durch Unruhe des Signals auf dem Oszilloskop sichtbar. Mit Hilfe des Mikromanipulators konnte durch schrittweises Annähern (1  $\mu\text{m}$  pro Schritt) zunächst die Oberfläche ermittelt werden und dann ein Abstand von exakt  $z_0 = 25 \mu\text{m}$  durch die kontrollierte Vergrößerung des Abstandes des Elektrodenpaars eingestellt werden. Der vertikale Abstand ( $\Delta z$ ) der beiden Elektroden zueinander belief sich auf 20 bis 40  $\mu\text{m}$ . Für jedes Elektrodenpaar wurde  $\Delta z$  durch Messung des Widerstandes zwischen beiden Mikroelektroden im zylindrischen Container, der mit Kontroll-Elektrolytlösung mit einem bekannten spezifischen Widerstand  $\rho$  gefüllt war, errechnet (s. Abschnitt 3.5.3 Formel (3)). Um eine Vergleichbarkeit der Rohdaten (unabhängig vom transepithelialen Klemmstrom, usw.) zu erzielen, wurde der zwischen den Meßelektroden ( $\Delta z$ ) detektierte Spannungsabfall ( $\Delta V$ ) in die apparente Leitfähigkeit ( $G_A$ ) umgerechnet:

$$G_A = \frac{(\Delta V / \Delta z)}{\rho \cdot U}, \quad (1)$$

wobei

$\rho$	spezifischer Volumenwiderstand der Elektrolytlösung (53,7 $\Omega \cdot \text{cm}$ )
$U$	transepitheliale Spannung (mV)
$\Delta z$	Abstand der Mikroelektroden ( $\mu\text{m}$ )
$\Delta V$	Spannungsdifferenz zwischen Mikroelektroden ( $\mu\text{V}$ )

$U$  ist die transepitheliale Spannung, die durch den transepithelial angelegten Strom generiert wird und mit zusätzlichen Spannungselektroden in der serosalen und mukosalen Badlösung gemessen wurde. Die apparente Leitfähigkeit ist ein Maß für die Leitfähigkeit des darunter gelegenen Gewebes, wobei allerdings die Superposition der heterogen verteilten transepithelialen Ströme am Ort der Messung zu berücksichtigen ist. Das Scannen fand in allen Versuchen parallel zur Oberfläche statt. Hierfür wurde ein Gebiet von  $100 \times 100 \mu\text{m}$  mit gleichmäßig verteilter apparenter Leitfähigkeit ( $G_A$ ) gewählt. Der aus dem Signal berechnete Wert repräsentiert die basale epitheliale Leitfähigkeit des intakten Epithels,  $G^{intakt}$ . Während der Messung einer Einzelzell-Läsion wurde das Mikroelektrodenpaar entlang der x-Achsenlinie von einem Meßpunkt direkt über dem Schaden zu verschiedenen Meßpunkten in  $x = 10, 20, 40, 70, 100 \mu\text{m}$  Entfernung mittels Computersteuerung über einen Mikromanipulator (#5171, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bewegt (Abb. 10). Es wurden für jeden Meßpunkt Doppel- bzw. Dreifachbestimmungen durchgeführt. Messungen entlang der x- und y-Achse in beiden Richtungen unter Kontrollbedingungen zeigten eine symmetrische Verteilung des Leckstromes um den Schaden. Zusätzlich wurde die Meßstelle zufällig gewählt, und auch andere meßtechnisch bedingte Asymmetrien wurden in den Experimenten gemittelt. Die gemessenen Stromdichten sind somit einer Einzelzell-Läsion zuzuordnen und spiegeln das dadurch entstandene Leck wieder.

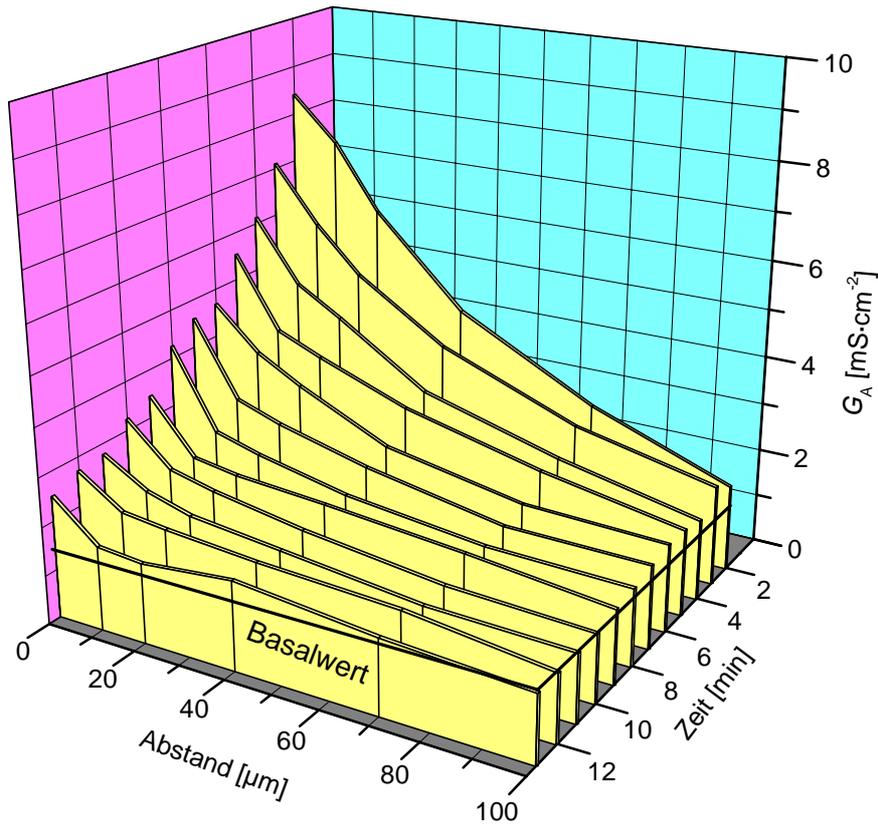
### 3.5.1.2 Setzen der Einzelzell-Läsion

Um eine einzelne Zelle im konfluenten Monolayer zu zerstören, wurde eine weitere Glasmikroelektrode in das System eingeführt. Diese wurde standardmäßig mit  $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ CaCl}_2$ -Lösung gefüllt. Um einen Effekt auf Nachbarzellen aufgrund des ausströmenden Calciums während der Zerstörung auszuschließen, wurden Vergleichsmessungen mit  $150 \text{ mmol l}^{-1} \text{ KCl}$  (Abschnitt 4.1.7) durchgeführt. Ebenso sollten Messungen nach mechanischer Schädigung einer Zelle, was sehr kompliziert ist und somit nicht routinemäßig eingesetzt wurde, Effekte durch ausströmende Elektrolytlösungen während der Schädigung ausschließen. Um eine Zelle zu zerstören, wurde die Glaselektrode, die über eine Ag/AgCl-Elektrode (chlorierter Silberdraht, Durchmesser:  $0,125 \text{ mm}$ ) mit einer Stromquelle verbunden war, der Zelloberfläche angenähert, bis sie die Oberfläche berührte. Die Gegenelektrode befand sich in der mukosalen Badlösung. Durch einen Strompuls ( $1,5 \text{ }\mu\text{A}$ ,  $0,5 \text{ s}$ ) wurde eine einzelne Zelle zerstört. Läsion und Restitution waren unabhängig von der Kapillarfüllung (Abschnitt 4.1.7). Nach dem Setzen der Schädigung wurde die Kapillare möglichst rasch aus dem Sehfeld entfernt und das Mikroelektrodenpaar zur Messung  $25 \text{ }\mu\text{m}$  über dem Schaden positioniert. Danach erfolgte die computergesteuerte Abtastung über einen Mikromanipulator entlang der x-Achse. Die Einzelzell-Läsion führte zu lokalen Lecks mit einer gesteigerten apparenten Leitfähigkeit in direkter Nachbarschaft. Um die zeitliche Entwicklung der Leckströme zu messen, wurde der x-Achsen-Scan der apparenten Leitfähigkeit alle  $1 - 1,5 \text{ min}$  wiederholt. Ausgehend von diesen Daten wurde der Einzelleitwert der Läsion durch Integration berechnet (Abschnitt 3.5.1.3 Formel (2) und Abb. 6).

### 3.5.1.3 Berechnung des Leitwertes einer Einzelzell-Läsion

Zur Berechnung des Leitwertes wurde sie sog. Integrationsmethode angewendet:

Durch Integration von  $G_A$  über das gescannte Areal ließ sich nach Abzug des basalen (im homogenen "Plateaubereich" ermittelten) Leitwertes ( $G^{\text{intakt}}$ ) der Leitwert einer Einzelzell-Läsion ( $g^{\text{Läsion}}$ ) bestimmen. Die Verteilung der Stromdichte im Bereich einer Einzellläsion ist (normiert als  $G_A$ ) schematisch in Abb. 6 dargestellt.



**Abb. 6: Verteilung des Meßsignals, dargestellt als apparente Leitfähigkeit ( $G_A$ ), als Funktion von Ort (horizontaler Abstand von der Läsion) und Zeit (nach Setzen der Läsion)**

Folgende Formel gibt das mathematische Modell wieder:

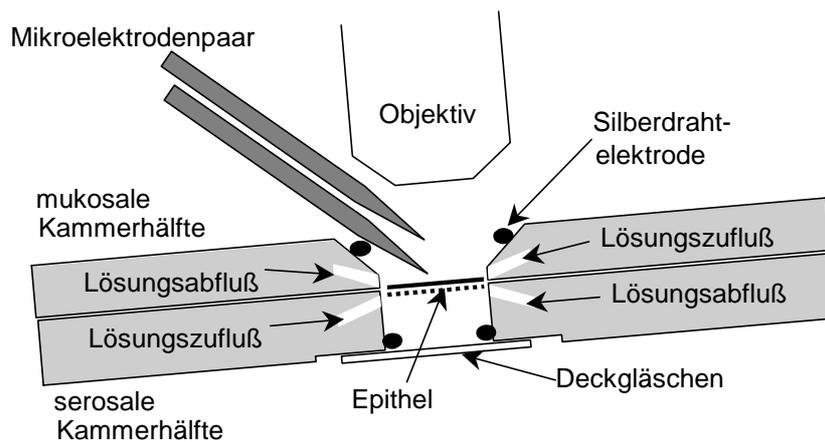
$$g(t) = \iint_{y \ x} (G_A(x, y, t) \cdot G^{intakt}) \cdot dx \cdot dy \quad (2)$$

Da nach dem Setzen der Läsion und dem Beginn der ersten Messung durchschnittlich 2 min verstrichen, wurden Meßwerte zwischen  $t = 2$  min und  $t = 20$  min aufgezeichnet. Die Größe des frischen Lecks,  $g^{Läsion}$  ( $t = 0$  min) wurde durch Extrapolation, indem eine Exponentialfunktion über die Daten gefittet wurde, geschätzt.

### 3.5.2 Versuchsaufbau

Der Träger mit den kultivierten Zellen oder dem aufgespannten Darmgewebe wurde horizontal, mit der mukosalen Seite nach oben, in eine spezielle, miniaturisierte 4-Elektroden-Ussingkammer eingesetzt. Abb. 7 zeigt ein

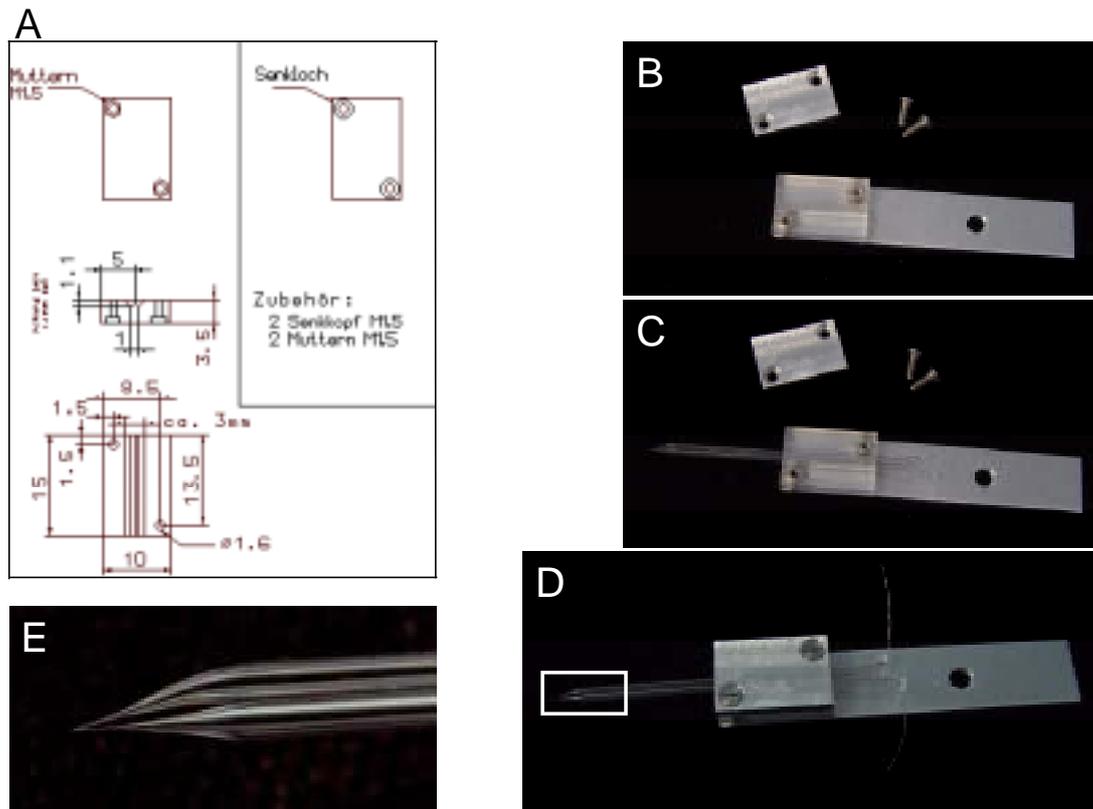
vereinfachtes (nicht maßstabsgetreues) Schema der Meßkammer. Der transepitheliale Strom wurde über Silberdrahtelektroden (Außendurchmesser 1 mm, mit AgCl überzogen) eingespeist, die an Boden und Deckel der Kammer angebracht waren. Die serosale Stromelektrode war kreisförmig (Innendurchmesser 4 mm), die mukosale jedoch U-förmig mit seitlicher Öffnung zur Einführung der Meßsonde. Die transepitheliale Spannung  $U$  wurde mit zusätzlichen Spannungselektroden in serosaler und mukosaler Badlösung gemessen.



**Abb. 7: Conductance scanning-Meßkammer**

Die Schrägstellung erleichtert den Abgang von Gasblasen aus der serosalen Kammerhälfte. Die transepithelialen Spannungselektroden sind in den Lösungsabflüssen eingebaut. Mit Erlaubnis aus: (Gitter, 2000).

Die Meßsonde bestand aus zwei ausgezogenen Glasmikroelektroden (Borosilikat-Glaskapillaren mit Filament, Firma Hilgenberg, 34323 Malsfeld, innerer/äußerer Durchmesser: 0,5 / 1,0 mm, Art. Nr. 11 032 10), welche mit  $3 \text{ mol l}^{-1}$  KCl-Lösung gefüllt waren. Die Meßsonde habe ich eigens für den Versuchstand zu Beginn meines Dissertationsprojektes neu konstruiert. Ziel sollte es sein, eine zuverlässige Halterung und eine mehrfache Einsatzmöglichkeit bei relativ einfacher und zeitsparender Herstellung zu garantieren. In Abb. 8 sind die einzelnen Produktionsschritte zusammengestellt und per Skizze die DIN-Maße angegeben. Es wurden Elektroden mit einem Eingangswiderstand von 0,5 - 0,7  $\text{M}\Omega$  eingesetzt.



**Abb. 8: Produktionsablauf zur Herstellung des Meßsensors, bestehend aus einem Paar Mikroelektroden, die über einen Plexiglasblock starr miteinander verbunden sind**

A: Technische Zeichnung des Elektrodenhalters (mit Erlaubnis von D. Sorgenfrei, Institut für Klinische Physiologie), B: Plexiglasblock mit parallel verlaufender Führung für die Mikroelektroden und verschraubbarem Deckel, C: Elektroden sind eingelegt, D: Nach genauer Positionierung der Elektroden Spitzen unter einem Lichtmikroskop wurden die Elektroden mit 3 M KCl-Lösung gefüllt und fixiert; chlorierte Silberdrähte sind in die Enden eingeführt und mittels Silikon ist das hintere Ende abgedichtet, E: Ausschnittsvergrößerung des in D mit einem weißen Rahmen gekennzeichneten Bereichs: Die zueinander angenäherten und im Abstand  $\Delta z$  positionierten Elektroden Spitzen sind dargestellt.

Die Kammer bestand aus zwei rechteckigen Acrylglashälften, wobei das Kammeroberteil mit einer seitlichen Aussparung am oberen Rand versehen war, die das Einbringen des Mikroelektrodenpaars erlaubte. Der innere Kammerdurchmesser von 1,6 cm war erforderlich, um das Wasserimmersionsobjektiv über dem Epithel zu positionieren. Die obere Kammerhälfte wurde mit zwei Nylonschrauben (Metallschrauben wurden nicht verwendet, da sie korrodieren würden) auf der fest installierten Unterhälfte fixiert. Zwischen die Kammerhälften wurde ein Plexiglascontainer montiert, in

den das Epithel mit dem Zellkultur-Filterträger oder das Kolon der Maus auf einem Plexiglasring aufgeklebt eingespannt wurde (Stockmann et al., 1999). Dieser wurde zusätzlich mit Parafilmscheiben gegen die Kammerhälften abgedichtet.

Der Container bestand aus einem scheibenförmigen Ober- und Unterteil mit einem äußeren Durchmesser von 1,8 cm für das Kammeroberteil und 2,08 cm für das Kammerunterteil mit einer inneren Aussparung von 1,8 cm zur Aufnahme des Oberteils. Im Containerunterteil war für das Epithel eine kreisförmige Aussparung von 0,6 cm Innendurchmesser, 0,8 cm Außendurchmesser zur Aufnahme des Zellfilters oder des Ringes mit dem nativen Gewebe vorgesehen. Die Unterseite des Containers war im Zentrum 1,3 mm dick. Das Containeroberteil war 0,7 mm dick und hatte die gleichen Lochdurchmesser wie das Unterteil, um mit diesem einen Zylinder zu bilden. In das Oberteil wurde eine 0,2 mm dicke Silikonscheibe mit einem 0,25 mm dicken Rand im Zentrum rings um das Loch gegossen, um somit Filter und Epithel bzw. das native Gewebe von oben schonend abzudichten und seitliche Leckströme zu verhindern.

Die Regulation der Lösungsmenge in der Kammer erfolgte über kleine seitliche Bohrungen, die je zur Hälfte der Lösungszufuhr und der -abfuhr dienten (Abb. 7). Die abführenden Kanäle dienten auch als elektrische Verbindung zu den für die transepitheliale Spannungsregistrierung verwendeten Elektroden. Sie lagen einander gegenüber, damit die elektrischen Eigenschaften der leeren Kammer (Kontrollmessungen) im gesamten Meßbereich erfaßt werden konnten.

Beim Ausschneiden des Epithels wurden nur die am Rand liegenden Zellen beschädigt. Da der Filter eine Fläche von  $0,6 \text{ cm}^2$  hatte und der Rand somit weit genug vom zentralen Meßort entfernt lag, wurde die lokale  $R^t$ -Messung nicht von Randschäden beeinflusst. Zusätzlich wurde durch den im Oberteil der Kammer sich befindenden Silikonwulst im Randbereich eine Abdichtung auf intakten Zellen erreicht.

### **3.5.3 Versuchsablauf**

Die beiden Kompartimente, die an die serosale und mukosale Epithelseite grenzen, wurden während der Experimente kontinuierlich mit Kontroll-Elektrolytlösung perfundiert. Die Temperatur in der Meßkammer wurde durch

ein aufwendiges Wärmetauschersystem auf 37 °C (HT-29/B6) bzw. 39 °C (Mauskolo) in der modifizierten Ussing-Kammer reguliert. Die Lösung wurde hierfür in doppelwandigen Vorratsbehältern vorgewärmt und über ein Schlauchsystem, doppelwandige Tropfenzähler und einen der Meßkammer unmittelbar vorgeschalteten Wärmetauscher zum Epithel geleitet. Hierdurch wurde ein Temperaturgradient vermieden.

Durch ein hydrostatisches Gefälle konnte ein kontinuierlicher Lösungsfluß erreicht werden. Die gleichmäßige Lösungstemperierung verhinderte eine Bildung von Gasblasen, die in Epithelnähe zu einer artifiziiellen Erhöhung des "epithelialen" Widerstandes hätten führen können. Zwischen Vorratsbehälter und Wärmetauscher befanden sich der mukosalen und serosalen Seite der Kammer zugeordnete Tropfenzähler, um eine optische Kontrolle der Durchflußmenge und das elektrische Entkoppeln der Kammerlösung von der Lösung in den Vorratsbehältern und dem restlichen Schlauchsystem zu ermöglichen. Da einige teure Testsubstanzen einen reversiblen Effekt auf die Zellen zeigten und daher in der Badlösung gebraucht wurden, wurden die Experimente unter ständiger Zirkulation mit der jeweiligen Substanz durchgeführt. Hierfür wurde eine Rollerpumpe (Typ MP-4, Ismatec, Zürich, Schweiz) an den Abfluß angeschlossen und somit eine kontinuierliche Rückführung der Lösung in das Vorratsgefäß ermöglicht.

Beide Kammerkompartimente wurden kontinuierlich mit einer Rate von 1,6 ml pro Minute mit Elektrolytlösung perfundiert. Mittels höhenverstellbarer Überlaufbehälter ließen sich Lösungsabfluß und hydrostatisches Druckgefälle über dem Epithel regulieren. Der Druck auf der mukosalen Epithelseite war gegenüber der serosalen Seite geringfügig angehoben (ca. 0,5 cm Höhendifferenz der Überlaufbehälter), damit sich die Zellen nicht vom Untergrund lösten und keine Höhenschwankungen auftraten. Die geringe Druckdifferenz hatte keinen Einfluß auf das Scanning-Signal (hier nicht dargestellt). Im Abflußsystem wurde die Elektrolytlösung durch zwei weitere Tropfenzähler elektrisch entkoppelt.

Über zwei auf der jeweiligen Kammerhälfte eingebaute Ag/AgCl-Elektroden aus chloriertem Silberdraht (Durchmesser: 1 mm) wurde Strom in das System eingespeist (Abb. 7). Im Meßbereich über dem Epithel und in der Epithelebene konnte durch die Anordnung der Elektroden ein homogenes elektrisches Feld erzeugt werden (Abschnitt 3.5.1). Transepithelial wurde ein

sinusförmiger Wechselstrom ("Klemmstrom") von 28,3  $\mu\text{A}$  mit einer Frequenz von 24 Hz appliziert.

Die Epithelfern in 0,5 mol  $\text{l}^{-1}$  KCl-Lösung eingetauchten, gesinterten Ag/AgCl-Elektroden ermöglichten eine Messung der transepithelialen Potentialdifferenz. Sie standen mit Elektrolytbrücken (gefüllt mit 0,5 mol  $\text{l}^{-1}$  KCl und 30 g/l Agar-Agar) mit den mukosalen und serosalen Badlösungsabflüssen in Verbindung (Abb. 7). Das transepitheliale Potential ( $V^t$ ) wurde während der Messung kontinuierlich registriert und mit Hilfe einer elektrischen Synchrondemodulation das zum eingespeisten Strom synchrone Meßsignal ( $V_{AC}^t$ ) extrahiert (Abb. 9). Der DC-Anteil des Potentials ( $V_{DC}^t$ , Abb. 9), hervorgerufen durch den aktiven Nettoladungstransport des Epithels, wurde ebenfalls extrahiert und diente der Ermittlung des Kurzschlußstromes (hier nicht dargestellt).

Wie bereits erwähnt wurde zu Beginn des Projektes der Conductance scanning-Stand durch die Konstruktion eines Elektrodenhalters verbessert. Zuvor wurden zwei einzelne Glas-Mikroelektroden über Elektrodenhalter, die aus gesinterten Ag/AgCl-Pellets bestanden, eingesetzt und für die Messungen über einen Sigellacktropfen miteinander fixiert (nähere Angaben s. (Bendfeldt, 2000)). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Elektrodenpaare wurden zu Beginn jeder Messung in ihrem vertikalen Abstand ( $\Delta z$ ) bestimmt und nur dann verwendet, wenn ein Abstand von 20 - 40  $\mu\text{m}$  erreicht wurde. Der in die rechnerische Auswertung einfließende Elektrodenabstand  $\Delta z$  ergab sich aus dem Quotienten des Produkts der zwischen den Mikroelektroden gemessenen Potentialdifferenz  $\Delta V$ , der spezifischen Leitfähigkeit der Badlösung  $k$  (18,62 mS/cm) und der stromexponierten Kammerfläche  $F^{Kammer}$  (0,283  $\text{mm}^2$ ), und der Amplitude des eingespeisten Stromes  $I^t$ :

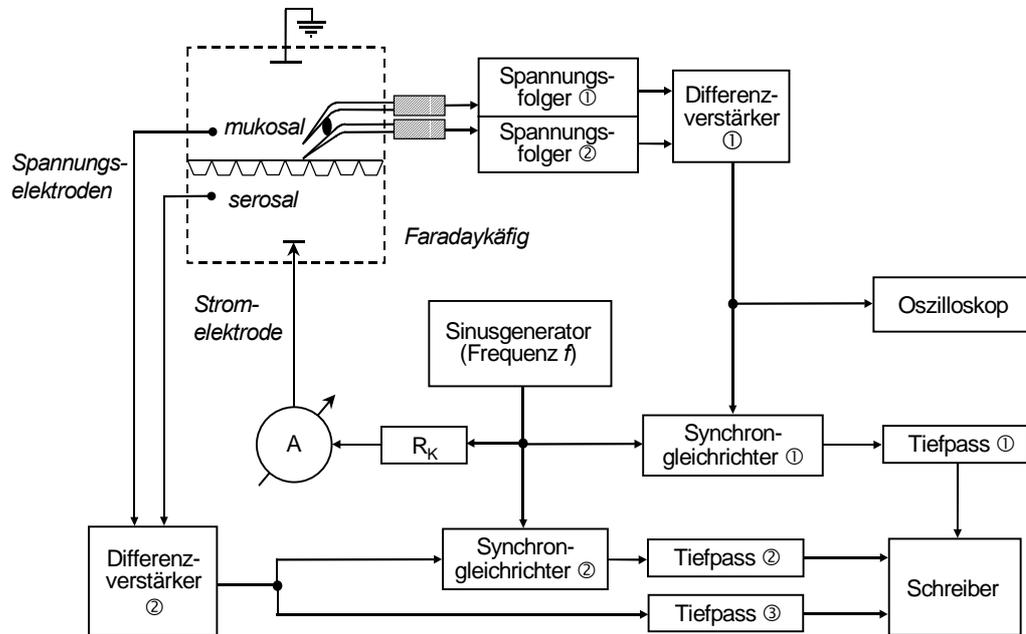
$$\Delta z = \Delta V \times k \times F^{Kammer} / I^t \quad (3)$$

Das Kammersystem war auf einem dreidimensional beweglichen und über ein externes Bedienteil manuell gesteuerten, elektrisch angetriebenen Mikromanipulator (#5171, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) montiert. Es wurde relativ zu den fixierten Scanning-Elektroden und dem Mikroskopobjektiv durch Bewegung der Kammer mit dem Epithel positioniert. Die neue Konstruktion eines Elektrodenpaares (Abb. 8) erlaubte eine Herstellung im Vorfeld eines Versuches und die Einführung einer dritten Glaskapillare für das Setzen der

Einzelzell-Läsion. Die Glas-Mikroelektroden wurden mit einem Mikroelektrodenpuller (DMZ-Universal-Puller, Zeitz Instrumente, Augsburg, Deutschland) aus filamenthaltigen Borosilikatglas (Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland) gezogen. Danach wurde eine Elektrode mittels einem umfunktionierten Elektrodenpuller Narishige Type PD-5 (Narishige Scientific Instrument Lab., Tokyo, Japan) im zuvor ausgezogenen Bereich mit Hilfe einer durch einen Manipulator (Leitz, Wetzlar, Deutschland) bewegten Stahlkanüle unter Hitzeeinwirkung des Heizfilamentes gebogen. Zur Orientierung diente ein Aluminiumstreifen, der der Glaskapillare untergelagert wurde, um die zweite Elektrode parallel zur gebogenen während des Vorgangs zu simulieren. Der Vorgang fand unter einem Operationsmikroskop statt. Um eine Stabilisierung der Elektrodenschäfte zu erreichen, wurden in einen Plexiglasblock zwei parallel zueinander verlaufende Rillen gefräst (s. Technische Zeichnung Abb. 8A). Bevor die Elektroden in den Block gelegt wurden, wurden unter einer kleinen Flamme die Enden der Glaskapillaren gebogen. Dies war nötig, da es nach dem Füllen der Elektroden mit  $3 \text{ mol l}^{-1}$  KCl und dem Einführen von chlorierten Silberdrähten bei Kontrollmessungen zu Kurzschlüssen gekommen war. Unter einem konventionellen Lichtmikroskop wurde dann der vertikale Abstand der Elektrodenspitzen zueinander im Elektrodenhalter eingestellt. Gehalten wurden die Elektroden durch den Aludeckel, der auf den Plexiglasblock geschraubt wurde (Abb. 8B-D). Die voneinander wegzeigenden, stumpfen Elektrodenenden wurden abschließend mit Silikon verklebt, um ein Austrocknen während der Lagerung zu vermeiden (Abb. 8D). Die fertigen Elektrodenpaare konnten mit den Spitzen in  $0,5 \text{ mol l}^{-1}$  KCl für 2-3 Wochen gelagert werden. Für die Messungen wurde der Alublock auf einem Alublechstreifen fixiert, der auf dem Manipulator am Meßstand aufgeschraubt wurde (Abb. 5). Neben dem Elektrodenpaar konnte nun am Manipulator eine Halterung für eine weitere Glaskapillare geschaffen werden, die gleichzeitig in die Kammer seitlich eingeführt werden konnte.

Der Blockschaltplan der Conductance scanning-Meßelektronik ist in Abb. 9 dargestellt. Ein Stromgenerator erzeugte den transepithelialen Klemmstrom, der über dem Epithel einen Spannungsabfall induzierte. Mittels zweier Ag/AgCl-Elektroden und einem Differenzverstärker wurde die transepitheliale Spannung gemessen. Das von den beiden Scanning-Elektroden detektierte supraepitheliale Potential wurde verstärkt und die Differenz aus den Einzelsignalen gebildet.

Mit einem Synchrongleichrichter wurde das dem eingespeisten Strom synchrone Meßsignal extrahiert und mittels eines Tiefpasses der Effektivwert gebildet (Tietze und Schenk, 1999). Hierdurch wurde bei einer Integrationszeit von 1 s ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis erzielt.



**Abb. 9: Blockschaltplan der Conductance scanning-Meßelektronik**

Mit Erlaubnis aus: (Gitter, 2000)

Folgende Eigenschaften wiesen die Bauelemente auf:

**I. Scanning Signalweg**

Spannungsfollower ① und ②  
Differenzverstärker ①  
Synchrongleichrichter ①  
Tiefpaß ①

Verstärkungsfaktor 1-fach  
Verstärkungsfaktor 500-fach  
Verstärkungsfaktor 100-fach  
Zeitkonstante von 1 s

**II. Transepithelialer Signalweg**

Differenzverstärker ②  
Synchrongleichrichter ②  
Tiefpaß ② ( $V_{AC}^t$ ) und ③ ( $V_{DC}^t$ )

Verstärkungsfaktor 10-fach  
Verstärkungsfaktor 1-fach  
Zeitkonstante von 0,16 s ( $f_g = 1$  Hz)

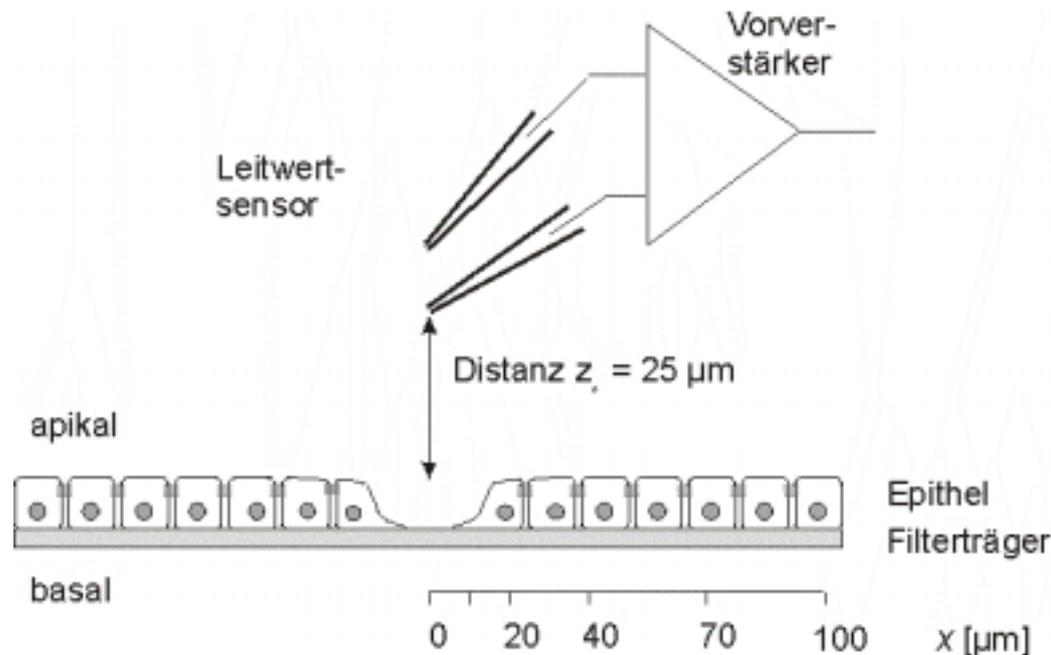
**III. weitere Bauteile**

Funktionsgenerator  
Vorwiderstand  $R_K$

24,0 Hz Sinus  
100 k $\Omega$

## Signalregistrierung

Mit Hilfe der Mikroelektroden (Leitwertsensor in Abb. 10) wurde das supra-epitheliale Potential in der Badflüssigkeit in definiertem Abstand zum Epithel gemessen (Abb. 10).

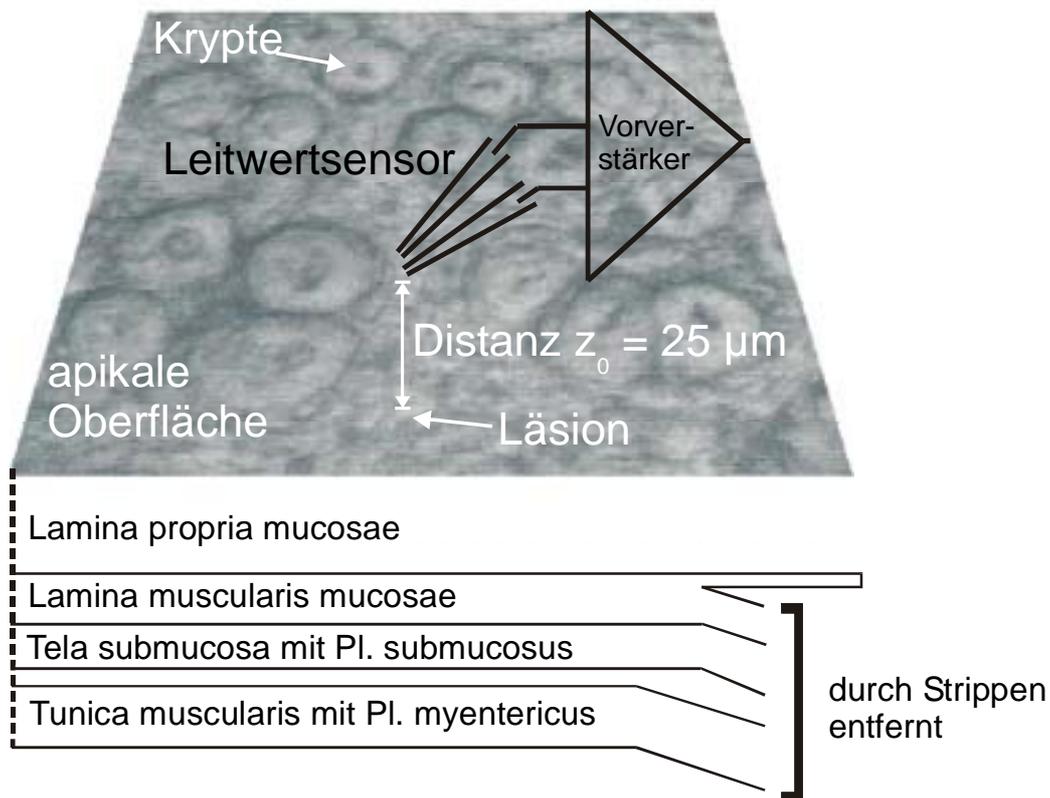


**Abb. 10: Schematische Darstellung des Conductance scanning-Prinzips bei der Messung einer Einzelzell-Läsion an HT-29/B6-Monolayern**

Die Abbildung zeigt schematisch den zu messenden Einzelzelldefekt (nicht maßstabsgetreu) und die mittels Computersteuerung durchgeführte räumliche Messung direkt über dem Defekt und im Abstand von 10 bis 100  $\mu\text{m}$ . Außerdem ist der konstante Elektrodenabstand zum Epithel von  $z_0 = 25 \mu\text{m}$  dargestellt.

Unter mikroskopischer Kontrolle wurden die Elektroden in der Badlösung durch schrittweises (160 nm oder 1  $\mu\text{m}$  Einzelschrittweite) Bewegen des Mikromanipulators dem jeweiligen Meßort genähert. Eine leichte Signalunruhe auf dem Oszilloskop zeigte das Berühren der Epitheloberfläche mit der unteren Elektrode an. Dann wurde das Elektrodenpaar in einen definierten Abstand zum Epithel gebracht. Dieser betrug für die hier dargestellten Messungen in mittlerer Auflösung 25  $\mu\text{m}$ . Die Integrationszeit des Meßsignals (Zeitkonstante des Tiefpasses) betrug 1 Sekunde.

Die Messungen am nativen Kolon der Maus fanden in einer vergleichbaren Anordnung wie in HT-29/B6-Monolayern statt. In Abb. 11 ist die Meßposition, relativ zum Oberflächenepithel des Kolons, halbschematisch dargestellt.



**Abb. 11: Schema zur Messung einer Läsion am nativen Kolon der Maus**

In dieser Abbildung wird das Oberflächenepithel der Maus in geringer Vergrößerung (20 x) gezeigt, um die Verhältnisse im Conductance scanning-Meßstand schematisch darzustellen. Es wird deutlich, daß sich zwischen den Gruppen von Krypten Areale mit Oberflächenepithel ausbilden, in denen die Messung stattfand (imaginär bezeichnete Läsion). Auch bei den Messungen am nativen Kolon wurde der Abstand von 25 µm zur Läsion strikt eingehalten. Zusätzlich sind in dem Schema, ergänzend zu Abb. 3, die subepithelialen Strukturen eingezeichnet, die während der Präparation ("Strippen") entfernt wurden. Nur noch die Lamina propria mucosae und Teile der Lamina muscularis mucosae waren Bestandteil der untersuchten Kolonabschnitte.

## 3.6 Versuchsabläufe

### 3.6.1 Übersicht

Im Rahmen der Dissertation wurde zunächst ein Conductance scanning-Versuchsstand aufgebaut. Anschließend wurden zur Untersuchung der Restitution von Einzelzell-Läsionen folgende Versuche durchgeführt:

- Konstruktion eines neuen Elektrodenhalters für einen mehrmaligen, zuverlässigen Gebrauch (Abschnitt 3.5.2).
- Etablierung eines Verfahrens zum Setzen von Einzelzell-Läsionen mittels Mikroelektroden.
- Etablierung der Messung von Einzelzell-Läsionen im Zellmodell HT-29/B6.
- Messung des Einflusses von Zytoskelettmodulatoren auf den  $R^t$  (Abschnitt 3.6.2) und auf die Restitution von Einzelzell-Läsionen (Abschnitt 3.6.4).
- Messung des Effekts einer extrazellulären  $[Ca^{2+}]_a$ -Reduzierung auf den  $R^t$  (Abschnitt 3.6.3) und auf die Restitution von Einzelzell-Läsionen (Abschnitt 3.6.5).
- Einfluß von Zytokinen ( $TNF-\alpha$ ) auf die Restitution von Einzelzell-Läsionen im Zellmodell HT-29/B6 (Abschnitt 3.6.6).
- Untersuchung des Einflusses von Wachstumsfaktoren am Beispiel von EGF auf die epitheliale Restitution von Einzelzell-Defekten (Abschnitt 3.6.7).
- Etablierung der Einzelzell-Läsion im nativen Kolon der Maus (Abschnitt 3.6.8).
- Messung von Zytokineffekten ( $TNF-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$ ) auf die Restitution von Einzelzell-Läsionen im nativen Kolon der Maus (Abschnitt 3.6.8).
- Untersuchung des Zytokin-Effekts auf die Morphologie des nativen Kolons mittels konventioneller H/E-Färbung.
- Entwicklung und Anwendung eines geeigneten Färbeprotokolls zum Anfärben von *Tight junction*-Elementen und F-Aktin während der Restitution (Abschnitt 3.8).
- Entwicklung eines Verfahrens zur räumlichen Darstellung der Einzelzell-Läsion mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Abschnitt 3.9).

### 3.6.2 Effekte von Zytoskelettmodulatoren auf den $R^t$

Zur Untersuchung des Aktin-abhängigen *purse string*-Mechanismus wurden Inhibitoren der zytoskelettalen Dynamik eingesetzt. Die Bildung von filamentösem Aktin (F-Aktin) aus den globulären Aktinmonomeren wurde durch Cytochalasin D inhibiert. In Ergänzung zu den Cytochalasin D Experimenten wurde der Einfluß von Myosin auf den *purse string*-Mechanismus untersucht. Zur Hemmung der Myosin ATPase Aktivität wurde hierfür das Oximderivat 2,3-Butandion Monoxim (BDM) eingesetzt. Die Endkonzentration betrug  $20 \text{ mmol l}^{-1}$  auf beiden Seiten des Epithels. Vor-experimente hatten gezeigt, daß  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  beidseits keinen deutlichen Effekt auf den  $R^t$  haben (Abschnitt 4.1.8). Um den Einfluß der MLCK auf die Myosin-Aktin-Interaktion zu untersuchen, wurden zusätzlich in einem weiteren Ansatz (Passage 32 und 33) der Inhibitor ML-7 eingesetzt. Weiterhin ist bekannt, daß Rho-GTPasen eine komplexe Rolle bei der Regulation der Zellmorphologie spielen. Eine der Wirkungen von Rho-GTPasen wird dabei über das Rho-Kinase-Familienmitglied p160ROCK vermittelt. Durch die spezifische Hemmung mit Y-27632 sollte der Einfluß von Rho-Kinasen auf die Restitution von Einzelzell-Läsionen untersucht werden.

### 3.6.3 Effekt einer Erniedrigung der extrazellulären $[Ca^{2+}]_a$ auf den $R^t$

In den Experimenten wurde ein bekannter Perturbator der *Tight junction*-Permeabilität, der serosale Kalziumentzug (Abschnitt 3.3), eingesetzt. Er verursachte einen Abfall des  $R^t$  und bewirkte, wahrscheinlich durch eine Beeinträchtigung der Schlußleisten, eine Erhöhung der parazellulären Ionenpermeabilität in der Hundenierenzelle MDCK und in intestinalen HT-29/B6-Zellen.

Es wurde eine Calciumkonzentration gewählt, bei denen in den Ussing-Experimenten der transepitheliale Widerstandsabfall nach Austausch der Lösung gegen Kontroll-Lösung (Abschnitt 3.3) reversibel war.

## Experimente

In den Ussing-Kammer-Experimenten wurde folgendes Versuchskollektiv untersucht:

1. unbehandelte Monolayer in Kontroll-Lösung (n = 19)
2. Cytochalasin D-inkubierte Monolayer (n = 10)
3. 2,3-Butandion Monoxim-inkubierte Monolayer (n = 10)
4. Monolayer in Niedrigcalcium-Lösung (250 nm freies Calcium) (n = 8)

## zweiter Ansatz von Experimenten

In Zellen der 31.-33. Passage wurden folgende Ussing-Kammer-Experimente durchgeführt:

1. unbehandelte Monolayer in Kontroll-Lösung (n = 14)
2. ML-7-inkubierte Monolayer (n = 7)
3. Y27632-inkubierte Monolayer (n = 6)

### **3.6.4 Einfluß von Zytoskelettmodulatoren auf die Restitution**

Wie in Abschnitt 3.6.2 beschrieben, wurden die zu untersuchenden Monolayer mit Cytochalasin D, BDM, ML-7 oder Y-27632 inkubiert und nach Erreichen des Plateaus in den Conductance scanning-Meßstand gebracht. Der Widerstandsverlauf wurde hierbei regelmäßig kontrolliert und nach etwa vier bis viereinhalb Stunden war das Plateau erreicht. Innerhalb des Conductance scanning-Meßstandes wurde wie oben beschrieben, eine Zirkulation mit der jeweiligen Substanz mit Hilfe einer Rollerpumpe erreicht. Nach einer kurzen Erholungsphase wurden innerhalb der nächsten Stunde die entsprechenden Messungen durchgeführt. Danach zeigte sich meist ein Abfall des Widerstandes, der als Zeichen der verminderten Viabilität des Epithels zur Beendigung der Experimente führte.

### **3.6.5 Restitution unter erniedrigter Calcium-Konzentration**

Zur Messung des Effekts von erniedrigter freier Calciumkonzentration auf die EinzelzellRestitution wurden in der Conductance scanning-Apparatur gleiche Konzentrationen für Calcium wie im Ussing-Experiment durch Zugabe von EGTA erreicht. Zuvor wurde am gleichen Monolayer unter Kontrollbedingungen eine Messung durchgeführt. Nach Zugabe von EGTA stellte sich innerhalb weniger Minuten (ca. bis 5 Minuten) ein Plateau des niedrigen Widerstandes ein. Nach Erreichen dieses Plateaus wurden die

Messungen innerhalb von 30-45 Minuten durchgeführt. Danach zeigte sich, daß die Zellen unter geringer freier Calciumkonzentration losgelöst wurden und somit der epitheliale Charakter verloren ging. Eine Messung wurde zu diesem Zeitpunkt nicht mehr durchgeführt.

### **3.6.6 Einfluß von TNF- $\alpha$ auf die Restitution in HT-29/B6-Zellen**

Der Zeitraum der TNF- $\alpha$ -Inkubation sollte möglichst kurz sein, da TNF- $\alpha$  eine Steigerung des Zellstoffwechsels verursacht. Diese könnte zu einem Verbrauch von Wachstumsfaktoren im Zellkulturmedium führen, wodurch das Gleichgewicht von Apoptose und Zellproliferation zugunsten der Apoptose artifiziell beeinflusst würde. Der günstige Inkubationszeitraum von 7-8 h wurde aus vorherigen Arbeiten übernommen. Wichtig war hierbei der erreichte transepitheliale Widerstand, als Maß für den TNF- $\alpha$ -Effekt.

Mittels Conductance scanning in mittlerer Auflösung wurden die Leitwerte von Einzelzell-Läsionen ermittelt. Weiterhin wurde die Gesamtleitfähigkeit des intakten Epithels gemessen.

Die Epithelien wurden mit Vollmedium oder mit Vollmedium plus 100 ng/ml TNF- $\alpha$  auf der serosalen Seite der Zellen präinkubiert. In diesem Zeitraum fiel der transepitheliale Widerstand ( $R^t$ ) der TNF- $\alpha$ -inkubierten Monolayer auf einen Plateauwert ab. Der Beginn des  $R^t$  - Abfalls lag bei etwa 4 Stunden, der Beginn des Plateaus bei 7 Stunden nach TNF- $\alpha$ -Zugabe. Aus vorherigen Arbeiten ist bekannt, daß zwischen 8 und 12 Stunden die Widerstände annähernd konstant bleiben, bis es zu einem endgültigen Widerstandsabfall auf etwa 20% des Ausgangswertes kommt (Bendfeldt, 2000). Der optimale Zeitpunkt für die Conductance scanning-Experimente lag im Bereich des Plateaus nach ca. 8 Stunden. Alle Experimente wurden zu Beginn der Plateauphase in symmetrischer Kontroll-Elektrolytlösung durchgeführt.

## Experimente

Folgende Versuchskollektive wurden gebildet:

### Erster Ansatz von Experimenten

1. unbehandelte Monolayer in Kontroll-Lösung  
(m = 17, n = 17 Einzelmessungen)
2. Cytochalasin D-inkubierte Monolayer (m = 5, n = 7 Einzelmessungen)
3. BDM-inkubierte Monolayer  
(m = 6, n = 10 Einzelmessungen)
4. Monolayer in reduzierter extrazellulärer Calcium-Konzentration  
(m = 5, n = 7 Einzelmessungen)
5. TNF- $\alpha$ -inkubierte Monolayer (m = 6, n = 9 Einzelmessungen)

### zweiter Ansatz von Experimenten

In Zellen der 31.-33. Passage wurden folgende Experimente durchgeführt:

1. unbehandelte Monolayer in Kontroll-Lösung (m = 6, n = 7 Einzelmessungen)
2. ML-7-inkubierte Monolayer (m = 8, n = 8 Einzelmessungen)
3. Y-27632-inkubierte Monolayer (m = 7, n = 8 Einzelmessungen)

### **3.6.7 Einfluß von EGF auf die epitheliale Restitution**

Neben der Zytoskelettbeteiligung an der epithelialen Restitution wurde die Bedeutung von Wachstumsfaktoren untersucht. Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) ist aus der Literatur hinsichtlich der Migrations- und Proliferationsbeschleunigung bei epithelialen Defekten bekannt (Dignass und Podolsky, 1993). An fünf Tage alten HT-29/B6 Monolayern wurde daher der Einfluß auf die Restitution von Einzelzell-Läsionen untersucht. Die Monolayer wurden am 4. Tag mit EGF für 24 Stunden von der serosalen Seite inkubiert. Der Einzelzelldefekt wurde nach dem bereits beschriebenen Verfahren gesetzt und vermessen (Abschnitt 3.5.1.2 und 3.5.1.3).

## Experimente

Die Einzelzell-Restitution wurde an folgendem Kollektiv untersucht:

1. unbehandelte Kontroll-Monolayer ( $m = 4$ ,  $n = 4$  Einzelmessungen)
2. EGF-inkubierte Monolayer ( $m = 5$ ,  $n = 5$  Einzelmessungen)

### **3.6.8 Messung der Einzelzell-Läsion im nativen Kolon der Maus**

Zusätzlich zu den im Zellsystem HT-29/B6 erhobenen Daten, war es aus physiologischer Sicht von großem Interesse, die Messungen auch im nativen Gewebe durchzuführen. Da für das Setzen der Einzelzell-Läsion eine gute Optik von Bedeutung war, konnte mit dem relativ dünnen Kolongewebe der Maus bessere Ergebnisse als z.B. mit Kolongewebe der Ratte erzielt werden. Das Kolon wurde vor der Untersuchung wie im Abschnitt 3.2.1 beschrieben vorbereitet und präpariert. Danach wurden die Gewebeabschnitte in das Containersystem gebracht und in der konventionellen Ussing-Kammer über Nacht für 17 h mit den jeweiligen Testsubstanzen ( $\text{TNF-}\alpha$  allein oder  $\text{TNF-}\alpha$  in Kombination mit  $\text{IFN-}\gamma$ ) inkubiert. Hierbei wurde der Widerstandsverlauf dokumentiert und nur die Gewebe im Conductance scanning-Meßstand weiter untersucht, die nach 17 h weiterhin einen vergleichbar hohen Widerstand wie zu Beginn der Experimente hatten. Dies war eine wichtige Orientierungsgrundlage für die Einschätzung der Viabilität des Gewebes. Nach der Inkubationszeit von 17 Stunden wurden die Gewebeabschnitte in den Conductance scanning-Meßstand überbracht und der Einzelzelldefekt wurde mit dem bekannten Verfahren gesetzt und gemessen (Abschnitt 3.5.1.2). Anschließend wurden die Gewebe mittels konventioneller H/E-Färbung histologisch aufgearbeitet und ihre Morphologie dokumentiert (Abb. 30).

## Experimente

Folgende Gewebe wurden in dem Kollektiv untersucht:

1. unbehandeltes Kolon in Kontroll-Lösung  
( $m = 5$  Mäuse:  $n = 13$  Einzelmessungen)
2.  $\text{TNF-}\alpha$ -inkubiertes Kolon ( $m = 4$  Mäuse:  $n = 8$  Einzelmessungen)
3.  $\text{TNF-}\alpha$ - und  $\text{IFN-}\gamma$ -inkubiertes Kolon ( $m = 4$  Mäuse:  $n = 10$  Einzelmessungen)

### 3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL. Die Grafiken wurden mit Origin 5.0 erstellt. Die Analysen erfolgten nach Absprache mit dem Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin (Leiter: Univ.-Prof. Dr. rer. pol. H. Weiß).

Da an den Zellkulturfiltern und an den nativen Gewebestücken der Maus jeweils mehrere Messungen durchgeführt wurden, wird die Anzahl der verwandten Zellkulturfilter oder Kolonabschnitte mit 'm', und die Zahl der Einzelmessungen (Läsionen) mit 'n' bezeichnet. Einzelmessungen am gleichen Filter oder Gewebeabschnitt sind stochastisch unabhängig, da die Meßstellen so weit auseinander lagen, daß keine gegenseitige Beeinflussung vorlag. Um einheitliches Untersuchungsmaterial zu gewährleisten, wurden Zellkulturen aus einer bestimmten Passagenummer ausgewählt, die vergleichbare elektrophysiologische Eigenschaften (bezogen auf Barriere und Transport) hatten. Bei den Untersuchungen an der Maus stammten alle Tiere aus einer einheitlichen Zucht. Für die Untersuchungen wurde immer das gleiche Stück Kolon (Entfernung ab ano) entnommen. Die Aufstellung eines Histogramms zeigte, daß eine eingipflige Verteilung vorlag. Standardisierung der Probennahme und Analyse der Verteilungsfunktion erlauben die Annahme einer einheitlichen Population von stochastisch unabhängigen Untersuchungsaspekten.

In den elektrophysiologischen Vorexperimenten, die in konventionellen Ussing-Kammern stattfanden, wurde der Zeitverlauf der epithelialen Leitfähigkeit ( $G^{Ussing}$  in  $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) als Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und der Stichprobengröße (n) angegeben. Man geht davon aus, daß die Grundgesamtheit der Epithelleitfähigkeit normalverteilt ist.

Im Interesse einer einheitlichen, übersichtlichen Darstellung wurde bei den Messungen mit der Conductance scanning-Technik der Zeitverlauf des Leitwertes ( $g^{Läsion}$  in  $\mu\text{S}$ ) ebenfalls als Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) zusammen mit dem Median, 1. und 3. Quartil in den Tabellen angegeben. Für die graphische Darstellung wurde der Median gewählt. In Ergänzung zu diesen Abbildungen sind die Original-einzelmessungen im Ergebnisteil dargestellt. Aufgrund von starker Streuung kann man zweifeln, ob eine allgemeingültige Aussage aus den vorliegenden Messungen ableitbar ist. Trotzdem wurde mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-

U-Test und bei Mehrfachtestung mit einer Bonferroni-Korrektur der p-Werte geprüft (Sachs, 1997, S. 184), ob signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen und modifizierten Gruppen vorlagen. Die Nullhypothese wurde auf dem 5%-Niveau ( $p < 0.05$ ) abgelehnt. In den Abbildungen und Tabellen sind die mit dem U-Test ermittelten Signifikanzen folgendermaßen dargestellt: n.s.: nicht signifikant verschieden, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,002$ . Da ich keine Normalverteilung unterstelle und entsprechend den U-Test angewendet habe, ist die Darstellung des Mittelwertes mit dem SEM nicht die adäquate statistische Beschreibungsweise. Dennoch gebe ich sie in Ergänzung zum Median und Quartilsabstand an, da die Angabe von Mittelwert und SEM bei ähnlichen Arbeiten in der Literatur üblich ist.

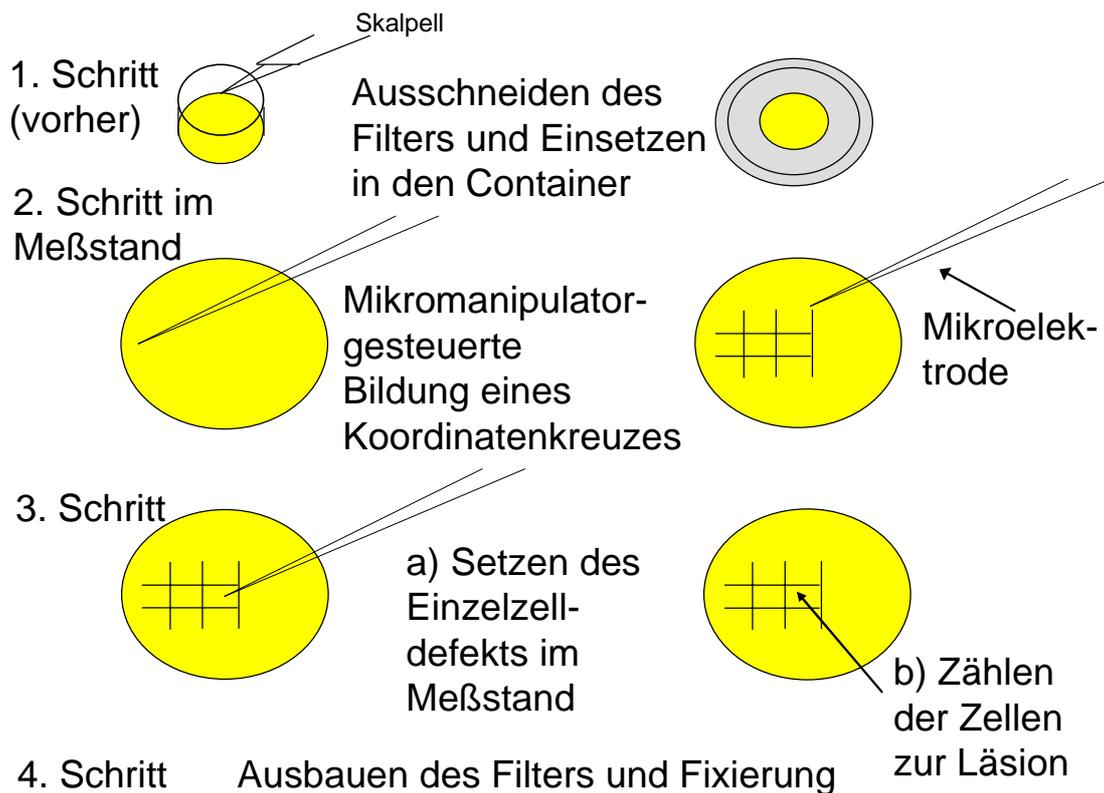
Zur Darstellung der Unterschiede zwischen den Restitutionszeiten wurde bei den Messungen im Zellmodell HT-29/B6 die relative Änderung des Leitwertes zwischen der 2. und 8. Minute in Prozent berechnet. Da bei den Messungen am Mauskolon die Restitution schneller verlief, wurde zwischen 1,5 und 2,5 min nach Setzen des Schadens die relative Änderung in Prozent berechnet. Mit einem Box-Plot wurden die prozentuale Abnahme innerhalb der ersten 8 min im Zellmodell und innerhalb der ersten 2,5 min im nativen Gewebe des Mauskolons vergleichend gegenübergestellt.

## 3.8 Histologie

Für alle histologischen Untersuchungen wurden 5 Tage alte, unbehandelte HT-29/B6-Monolayer bzw. Kolonpräparate der Maus verwendet.

### 3.8.1 Gewebepräparation

Die fixierten Gewebe wurden entweder in ein Einbettmedium (Paraffin) eingebettet oder sofort weiterverarbeitet. Von den eingebetteten Geweben wurden vertikale Serienschritte angefertigt, die gefärbt (HE) und somit für die Lichtmikroskopie vorbereitet wurden. Die sofort weiterverarbeiteten HT-29/B6-Epithelien wurden auf dem Zellkulturfilter als adhärente Monolayer direkt gefärbt (DAPI-, Occludin-, ZO-1- und F-Aktin-Färbung). Um den Einzelzelldefekt nach der Färbung lokalisieren zu können, wurden die Monolayer zunächst mit einem Koordinatenkreuz durch Ziehen einer Mikroelektrode über den Monolayer im Conductance scanning-Meßstand vor dem Setzen der Läsion und dem Fixieren markiert (Abb. 12). Dadurch konnte anschließend entsprechend der Zellzahl vom linienähnlichen Defekt bis zum Einzelzelldefekt eine Identifikation erfolgen. Die Vorbereitung der Filter ist in Abb. 12 schematisch dargestellt. Nach Fluoreszenzmarkierung der zellulären Strukturen konnte die Einbettung der Präparate für eine Dauer von etwa 6 Wochen erfolgen. Danach war die Fluoreszenz weitgehend ausgeblüht und es ließ sich keine Analyse der Strukturen mehr durchführen.



**Abb. 12: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte zur Vorbereitung eines Zellfilters für die Immunfluoreszenzfärbung**

### Fixierung

Das native Gewebe wurde standardmäßig in 10% neutral gepuffertem Formalin (Sigma, St.Louis, MO, USA) fixiert und der üblichen Aufbereitung für eine Paraffineinbettung zugeführt.

Wurden die Zellen ohne vorherige Paraffineinbettung direkt auf dem Filter gefärbt, wie bei der Occludin- und ZO-1-Markierung, wurde gereinigtes Methanol (Fa. Mallinckrodt Baker B.V., Holland) als Fixierungsmittel verwendet.

Zur Darstellung des Aktinzytoskeletts wurden die Monolayer mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Dies ist notwendig, um die Zytoskelettelemente nicht durch den Fixierungsprozeß zu zerstören und somit bereits sog. Streißfaser-Bildung zu induzieren. Gleichzeitig führt PFA zu einer geringen Permeabilisierung der Zellmembranen, was ergänzend zur Triton X-100 Standardpermeabilisierung zur Darstellung des intrazellulären Zytoskeletts ausgenutzt werden kann.

## Einbettung

Die Einbettung erfolgte für die vertikalen Serienschritte mit der üblichen Paraffinierungstechnik. Das native Gewebe der Maus wurde nach Formalin-Fixierung mit Paraffin durchtränkt und senkrecht in einen Paraffinblock eingebettet. Zuvor wurde es aus dem Plexiglasring herausgelöst, der das Gewebe in der Ussing-Kammer in einem entsprechenden Container gehalten hatte.

## Dünnschnitttechnik

Nach dem Aushärten der Paraffinblöcke wurden von dem nativen Gewebe der Maus 1 µm dünne Serienschritte angefertigt. Hierfür wurde ein Schlittenmikrotom (Microm, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Die angefertigten Serienschritte wurden auf einen Objektträger aufgezogen und mit der HE-Methode gefärbt.

### **3.8.2 Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Färbung**

#### Prinzip

Saure Zellbestandteile färben sich mit dem basischen Farbstoff Hämatoxylin, basische mit dem sauren Eosin.

#### Materialien und Geräte

- HT-29/B6-Paraffinschnitte (quer)
- HE-Färbereagenzien: Hämatoxylin nach Mayer, Eosin (1%)
- Differenzierungsmittel: 1% HCl-Alkohol
- Spüllösung: Aqua dest, Leitungswasser
- Alkoholreihe: 30%, 50%, 70%, 95%, 100% Ethanol
- Lösungsmittel: Xylol
- Eindeckmittel: Eukitt
- Objektträger, Deckgläser, Glas-Färbeküvetten, Lichtmikroskop

## Durchführung

<b>Substanz</b>	<b>Wirkdauer</b>	<b>Zweck</b>
Xylol	2×10 min	Entparaffinierung
100% Ethanol	2×10 min	
95, 80, 70, 50, 30% Ethanol	je 10 min	
Aqua dest.	2×5 min	Spülen
Hämatoxylin	1 min	Färbung
1% HCl-Alkohol	kurz	Differenzieren
warmes Leitungswasser	kurz	Kerne bläuen
Aqua dest.	1 min	Spülen
30-95% Ethanol	je 10 min	Entwässern
Eosin 1%	10 min	Färbung
1% HCl-Alkohol	kurz	Differenzieren
100% Ethanol	2×10 min	
Xylol	2×10 min	
Eukitt		Einbetten

**Tab. 2: Färbeprotokoll: HE am Paraffinschnitt**

### **3.8.3 Doppelfärbung: Occludin- und DAPI-Kernfärbung**

#### Occludinfärbung

Um den aus der Literatur bekannten *purse string*-Mechanismus im Zusammenhang mit der Abdichtung des Defektes zu untersuchen, wurden die Zellgrenzen durch Markierung der Schlußleisten sichtbar gemacht. Occludin ist ein transmembranöses *Tight junction*-Protein mit vier transmembranalen Domänen, das über zwei extrazelluläre Schleifen mit einem weiteren Molekül der Plasmamembran einer benachbarten Zelle in Verbindung steht. Da die Zellen zirkulär von *Tight junctions* umgeben sind, kann mittels Occludin-Markierung der Verlauf der Zellmembran in der Schlußleistenebene und auch die erneute Bildung von *Tight junctions* im Rahmen der Restitution von Einzelzell-Läsionen nachgewiesen werden.

#### Prinzip

Der kommerziell erhältliche polyklonale Antikörper Kaninchen-Anti-Occludin bindet an humanes Occludin. Die Immunfluoreszenzreaktion wurde mit Hilfe eines sekundären Fluoreszenzantikörpers, der Kaninchen-Anti-Occludin bindet, durchgeführt.

## DAPI-Färbung

### Prinzip

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid) bindet an DNA und bildet stark fluoreszierende DNA-DAPI-Komplexe. DAPI hat in wässriger Lösung ein Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 340$  nm und ein Emissionsmaximum von  $\lambda = 488$  nm. Es wird von der DNA rasch aufgenommen, wodurch stark fluoreszierende Zellkerne entstehen, während eine zytoplasmatische Fluoreszenz nicht nachweisbar ist. Die Färbung wurde im wesentlichen zur Darstellung der Kerne verwendet, um diese von den ebenfalls gefärbten *Tight junction*-Elementen abzugrenzen und somit eine eindeutige Membranständigkeit dieser nachzuweisen.

### Materialien und Geräte

- 1. Antikörper: Kaninchen-Anti-Occludin (ZYMED Lab., San Francisco, CA, USA) 1:50
- 2. Antikörper: Alexa Fluor™ 594 Anti-Kaninchen (Molecular Probes, Inc., Oregon, USA) 1:500
- Permeabilisierungslösung: 0,5% Triton X-100 in PBS
- Ziegenserum (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)
- Spül- und Blockierungslösung: 0.5% Ziegenserum in PBS
- DAPI (Stammlösung 1 mg/ml in Methanol, bei +4° C haltbar) (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Deutschland)
- DAPI-Gebrauchslösung: 1:1000 verdünnen in PBS
- PBS-Puffer: Tabletten (Life technologies, Schottland) in Aqua bidest., pH 7.2
- gereinigtes Methanol bei -20° C (Mallinckrodt Baker B.V., Holland)
- Eindeckmittel: ProTaq MountFluor (quartett Immundiagnostika und Biotechnologie GmbH, Berlin, Deutschland)
- Objektträger, Deckgläser
- Konfokalmikroskop Zeiss LSM 510 bei 340 und 594 nm Wellenlänge

## Durchführung

Die adhärennten HT-29/B6-Monolayern wurden nach der jeweiligen Zeit, 3, 6, 10 und 15 Minuten nach Setzen des Schadens, aus dem Conductance scanning-Meßstand direkt in die Fixierung gebracht. Der Zellkulturfilter färbte sich dabei nicht mit an und auch die Mukusschicht auf dem Epithel zeigte wenig Fluoreszenz. Verfahren wurde nach folgendem Protokoll:

<b>Substanz</b>	<b>Wirkdauer</b>	<b>Zweck</b>
PBS	2 × kurz	Spülen
-20 °C Methanol	10 min in Petrischale bei -20 °C	Fixierung
PBS	2 × kurz	Spülen
Permeabilisierungslösung	5 min	Permeabilisierung
PBS	2 × kurz	Spülen
Spül- und Blockierungslösung	30 min	Blockierung
1. Antikörper in Blockierungslösung (1:50)	30 min	Markierung des Occludins
Spül- und Blockierungslösung	2 × kurz	Spülen
2. Antikörper in Blockierungslösung (1:500)	30 min im Dunkeln	Fluoreszenzmarkierung
Spül- und Blockierungslösung	2 × kurz	Spülen
DAPI	15 min im Dunkeln	Kernfärbung
PBS	2 × kurz	Spülen
Aqua dest.	1 × kurz	Spülen
abs. Ethanol	1 × kurz	Spülen
ProTaq MountFluor		Einbetten

**Tab. 3: Protokoll der Occludin- und DAPI-Doppelfärbung an HT-29/B6-Monolayern**

### **3.8.4 Occludin- und ZO-1-Doppelfärbung**

Parallel zu der Occludinfärbung wurde bei den entsprechenden Monolayer zugleich das Protein ZO-1 gefärbt. ZO-1 ist ein intrazellulär liegendes Protein welches zusammen mit ZO-2 und ZO-3 und anderen Proteinen eine Verbindung von der *Tight junction* zum Zytoskelett (insbes. Aktin) herstellt (Abb. 2). Damit bei den Filtern beide Strukturen dargestellt werden konnten,

wurde für ZO-1 ein bei  $\lambda = 488$  nm anzuregender Sekundärantikörper benutzt (Alexa Fluor™ 488).

### Materialien und Geräte

- 1. Antikörper: Kaninchen-Anti-Occludin (ZYMED Lab., San Francisco, CA, USA) 1:50
- 2. Antikörper: Alexa Fluor™ 594 Anti-Kaninchen (Molecular Probes, Inc., Oregon, USA) 1:500
- 1. Antikörper: Maus-Anti-ZO-1 (Transduction Laboratories, San Francisco, CA, USA) 1:50
- 2. Antikörper: Alexa Fluor™ 488 Anti-Maus (Molecular Probes, Inc., Oregon, USA) 1:500
- Permeabilisierungslösung: 0,5% Triton X-100 in PBS
- Ziegenserum (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)
- Spül- und Blockierungslösung: 0.5% Ziegenserum in PBS
- PBS-Puffer: Tabletten (Life technologies, Schottland) in Aqua bidest., pH 7.2
- gereinigtes Methanol bei -20° C (Mallinckrodt Baker B.V., Holland)
- Eindeckmittel: ProTaq MountFluor (quartett Immundiagnostika und Biotechnologie GmbH, Berlin, Deutschland)
- Objektträger, Deckgläser
- Konfokalmikroskop Zeiss LSM 510 bei 488 und 594 nm Wellenlänge

## Durchführung

Um eine Verbindung zwischen *Tight junction*-Elementen (Occludin) und *Tight junction*-assoziierten Strukturen (ZO-1) zum Zytoskelett zu zeigen, wurden die Filter folgendermaßen gefärbt:

<b>Substanz</b>	<b>Wirkdauer</b>	<b>Zweck</b>
PBS	2 × kurz	Spülen
-20 °C Methanol	10 min in Petrischale bei -20 °C	Fixierung
PBS	2 × kurz	Spülen
Permeabilisierungslösung	5 min	Permeabilisierung
PBS	2 × kurz	Spülen
Spül- und Blockierungslösung	30 min	Blockierung
1. Antikörper in Blockierungslösung (1:50)	30 min	Markierung des Occludins
Spül- und Blockierungslösung	2 × kurz	Spülen
1. Antikörper in Blockierungslösung (1:50)	30 min	Markierung des ZO-1
2. Antikörper (Anti-Kaninchen) in Blockierungslösung (1:500)	30 min im Dunkeln	Fluoreszenzmarkierung
Spül- und Blockierungslösung	2 × kurz	Spülen
2. Antikörper (Anti-Maus) in Blockierungslösung (1:500)	30 min im Dunkeln	Fluoreszenzmarkierung
Spül- und Blockierungslösung	2 × kurz	Spülen
Aqua dest.	1 × kurz	Spülen
abs. Ethanol	1 × kurz	Spülen
ProTaq MountFluor		Einbetten

**Tab. 4: Protokoll der Occludin und ZO-1-Doppelfärbung**

### **3.8.5 F-Aktin-Färbung**

Wie bereits erwähnt, sollte der Mechanismus der *Tight junction*-Zytoskelett-Interaktion während der Restitution untersucht werden. Kombiniert wurde die Aktinfärbung hierfür mit einer Färbung von ZO-1.

## Prinzip

Ergänzend zu der oben beschriebenen Markierung von ZO-1 wurde filamentöses Aktin über Phalloidin, welches eine hohe Affinität zu Aktin zeigt, gefärbt. Dabei wurde eine Fluoreszenzmarkierung gewählt, die in einem anderen Wellenlängenbereich ( $\lambda = 594 \text{ nm}$ ) angeregt wurde und somit eine Doppelfärbung zum ZO-1 bei  $\lambda = 488 \text{ nm}$  ermöglichte.

## Materialien und Geräte

- 1. Antikörper: Maus-Anti-ZO-1 (Transduction Laboratories, San Francisco, CA, USA) 1:50
- 2. Antikörper: Alexa Fluor™ 488 Anti-Maus (Molecular Probes, Inc., Oregon, USA) 1:500
- Alexa Fluor™ 594 Phalloidin
- Permeabilisierungslösung: 0,5% Triton X-100 in PBS
- Blockierungspuffer: 25 mmol l<sup>-1</sup> Glyzin in PBS
- Ziegenserum (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)
- Spül- und Blockierungslösung: 0.5% Ziegenserum in PBS
- PBS-Puffer: Tabletten (Life technologies, Schottland) in Aqua bidest., pH 7.2
- gereinigtes Methanol bei -20° C (Mallinckrodt Baker B.V., Holland)
- Eindeckmittel: ProTaq MountFluor (quartett Immundiagnostika und Biotechnologie GmbH, Berlin, Deutschland)
- Objektträger, Deckgläser
- Konfokalmikroskop Zeiss LSM 510 bei 488 und 594 nm Wellenlänge

## Durchführung

Um einen wesentlichen Anteil des Zytoskeletts (F-Aktin) optisch darzustellen, wurden die HT-29/B6-Monolayer wie folgt behandelt:

<b>Substanz</b>	<b>Wirkdauer</b>	<b>Zweck</b>
37 °C vorgewärmtes PBS	2 × kurz	Spülen
1% Paraformaldehyd	15 min in Petrischale	Fixierung
Blockierungspuffer	5 min	Blockade der Kreuzreaktivität von PFA
PBS	2 × kurz	Spülen
0.3% Triton X-100	15 min	Permeabilisierung
PBS	2 × kurz	Spülen
Spül- und Blockierungslösung	30 min	Blockierung
1. Antikörper in Blockierungslösung (1:50)	30 min	Markierung des ZO-1
Spül- und Blockierungslösung	2 × kurz	Spülen
2. Antikörper (Anti-Maus) in Blockierungslösung (1:500)	30 min im Dunkeln	Fluoreszenzmarkierung
Spül- und Blockierungslösung	2 × kurz	Spülen
Alexa Fluor™ 594 Phalloidin	30 min im Dunkeln	Markierung des F-Aktin
Spül- und Blockierungslösung	2 × kurz	Spülen
Aqua dest.	1 × kurz	Spülen
abs. Ethanol	1 × kurz	Spülen
ProTaq MountFluor		Einbetten

**Tab. 5: Protokoll der ZO-1- und F-Aktin-Doppelfärbung**

Die einzelnen Schritte in den Färbeprotokollen wurden, wenn es nicht anders vermerkt ist, bei Raumtemperatur durchgeführt. Mit der Spül- und Blockierungslösung wurden die unspezifischen Bindungsstellen, die durch hydrophobe Bindung der Proteine ansonsten gebunden werden, abgesättigt. Somit war sichergestellt, daß der Antikörper jeweils spezifisch an sein jeweiliges Epitop bindet.

### 3.9 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Grundsätzlich funktioniert konfokale Fluoreszenzmikroskopie wie ein gewöhnliches Fluoreszenzmikroskop. Der Unterschied besteht allerdings darin, daß das Bild Pixel für Pixel von einem Bildverarbeitungsprogramm aufgebaut wird. Als Lichtquelle dienen Laser, die bestimmte Anregungswellenlängen (Blau, Grün, Rot) zur Verfügung haben und mit Hilfe zweier rotierender Spiegel die Oberfläche des Präparats Punkt für Punkt abtasten. Farbteiler und Sperrfilter unterscheiden sich nicht von denen in einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop.

Mit Hilfe einer sog. konfokalen Lochblende, die alles Licht, was nicht ganz genau aus der Brennebene stammt ausblendet, wird die diffuse Hintergrundfluoreszenz ausgefiltert, und es wird möglich, ein Präparat optisch "in Scheiben zu schneiden". Diese Scheiben können sehr dünn sein. Das ohnehin schwache Fluoreszenzlicht wird zwar weiter geschwächt aber man gewinnt eine weitere Ebene der Spezifität, nämlich die Auflösung in der z-Achse. Diese Auflösungsmöglichkeit wurde im Rahmen dieser Arbeit ausgenutzt, um einerseits die spezifisch gefärbten *Tight junction*-Proteine in ihrer Ebene abzubilden und andererseits einen dreidimensionalen Eindruck von dem Einzelzell-Defekt durch Superposition zu generieren (s. Abb. 15). Anstatt des menschlichen Auges wird das reflektierte Licht von einem Photomultiplikator aufgefangen, der dann für jeden Rasterpunkt das Signal mißt und hochverstärkt. Über eine Bildverarbeitungsmechanik wird das Bild dann punktweise zusammengesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurden Fluoreszenzaufnahmen mit einem Zeiss LSM510 Konfokalmikroskop bei 63-facher Vergrößerung bei folgenden Anregungswellenlängen erzeugt:  $\lambda = 364, 488$  und  $543$  nm.

### 3.10 Videomikroskopie der Einzelzell-Läsion im lebenden Monolayer

An lebenden Präparaten ließen sich morphologische Veränderungen der Einzelzellläsion, z.B. Größenveränderungen und die dynamische Bildung von einer rosettenartigen Struktur, während der Schließung des Defekts beobachten. Die Wasserimmersionsoptik des Conductance scanning-Mikroskops (Axioplan, Zeiss, Deutschland) ermöglichte es, mit Hilfe einer Videokamera (Sony Color Video Camera, CCD-IRIS-RGB, Sony) und einem digitalen Bildverarbeitungssystem (Screen machine II, Fast electronic GmbH)

den Zeitverlauf der Restitution an den lebenden Monolayern zu dokumentieren und mit den aus der Fluoreszenzmikroskopie erlangten Kenntnissen über die Morphologie während der Restitution zu vergleichen. Ebenso wurde die Restitution auch unter Zytoskelettmodulatoren (Cytochalasin D, BDM) und reduziertem freien  $[Ca^{2+}]_a$  dokumentiert (Abb. 17). Die Bilder wurden dabei auf dem Monitor eines Computers gezeigt und als Datei im TIF- oder JPG-Format gespeichert.