

4 Ergebnisse

In den ersten Abschnitten werden die morphologischen Untersuchungen der Einzelzell-Läsion gezeigt (Abschnitt 4.1.1 bis 4.1.3 und 4.1.5). Im Anschluß daran werden die Ergebnisse zur elektrophysiologischen Charakterisierung des HT-29/B6-Zellmodells im Hinblick auf die Restitution des Einzelzelldefektes gezeigt (Abschnitt 4.1.6 bis 4.1.4). Hierbei wird die Rolle des Zytoskeletts in der Restitution, sowie der Einfluß von calciumabhängigen Cadherinen und der Einfluß von TNF- α und des Wachstumsfaktors EGF untersucht (Abschnitt 4.1.11). Schließlich wird gezeigt, wie artifiziell gesetzte Einzelzelldefekte die epitheliale Barrierefunktion im nativen Kolon der Maus beeinflussen und welchen Effekt Zytokine auf die Restitution haben (Abschnitt 4.2.1).

4.1 HT-29/B6

4.1.1 Morphologie der Restitution einer Einzelzell-Läsion

Mit Hilfe der intravitalen Videomikroskopie konnten die lebenden Epithelien, deren Zellen einen hexagonalen Aufbau aufweisen, während der Restitution abgebildet werden. Um eine Zelle zu zerstören, wurde eine Glaskapillare der Zelloberfläche angenähert, so daß sie die Oberfläche der Zelle berührte (Abb. 13A). Die durch die Berührung der Glaskapillare leicht abgeflachte Zelle wurde danach mit einem kurzen Strompuls zerstört. Unmittelbar nach dem Zerstören der Zelle wurde ein Loch, das mit Zelldetritus ausgefüllt war, sichtbar (Abb. 13B). Dieser Defekt wurde durch Elongation der benachbarten Zellen, die dabei eine rosettenartige Struktur formten, geschlossen. Während dieses Prozesses entstand ein trichterähnliches Gebilde, welches im weiteren Lakune genannt wird (Abb. 13C, D). Das Vorhandensein von Zelldetritus und die E nukleation wurde mit Immunfluoreszenzfärbungen mit dem Farbstoff DAPI nachgewiesen. Nach Setzen der Läsion wurden Kernfragmente an der Oberfläche des Monolayers (Abb. 14,2) und darüber (Abb. 14,1) nachgewiesen.

In der Videomikroskopie konnte durch Einstellen der entsprechenden Fokusebene festgestellt werden, daß sich zuerst die basalen Enden der Nachbarzellen in den Defekt ausweiten und sich dann mit zunehmender Zeit annähern. Allerdings ließ sich mittels Videomikroskopie nur ein zweidimensionales Bild des Defektes erzeugen. Der Durchmesser des Defektes, wie in Abb. 13B-D dargestellt, war somit nicht nur von der zeitlichen Entwicklung der

Restitution, sondern auch von der Fokusebene abhängig. Um eine dreidimensionale Vorstellung zu bekommen, wurden Immunfluoreszenzbilder angefertigt. Durch einen sog. z-Achsen-Scan im Konfokalmikroskop, der senkrecht zur Epitheloberfläche verläuft, konnte durch Computerberechnung die Struktur rekonstruiert werden. Gefärbt wurden hierfür das *Tight junction*-Molekül Occludin und das *Tight junction*-assoziierte Molekül ZO-1. Dadurch konnte gleichzeitig die Verteilung der *Tight junction* während der Restitution dokumentiert werden, da sich nur dann Zellgrenzen abbildeten, wenn entsprechende Proteine vorhanden waren.

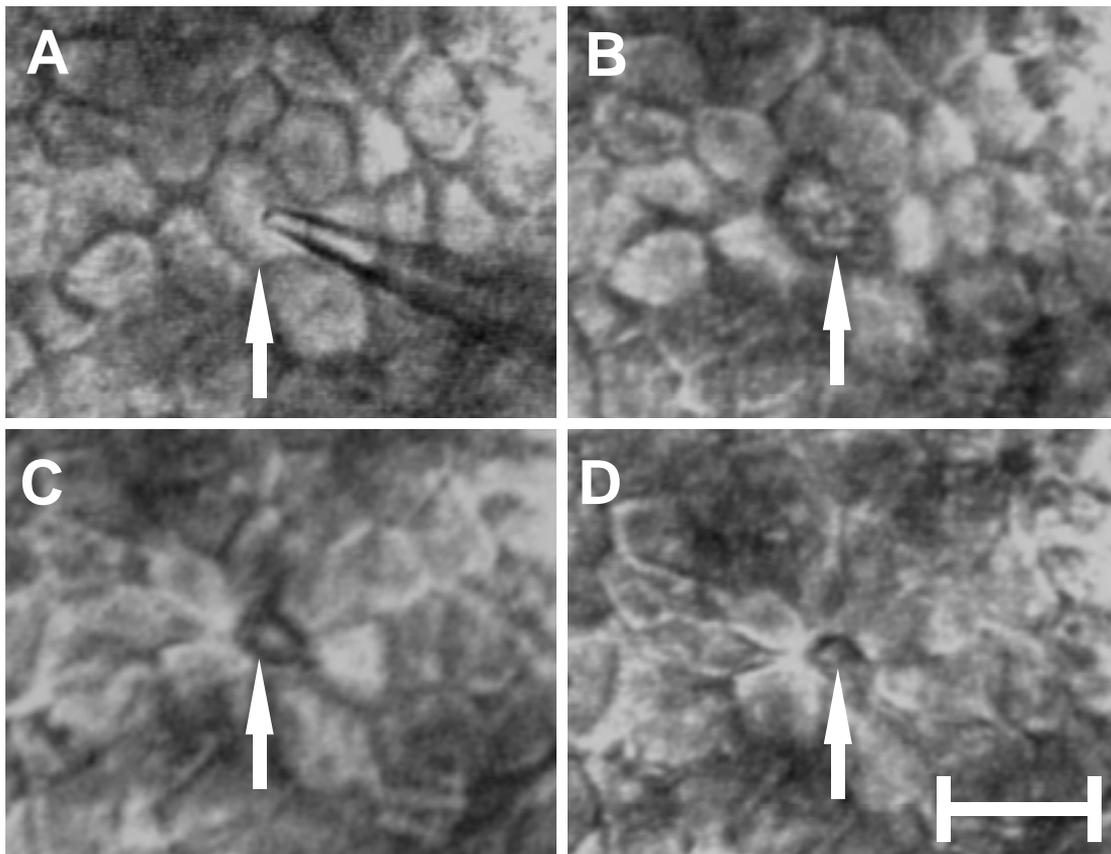


Abb. 13: Time-lapse Videomikroskopie der Restitution eines Einzelzelldefekts.

Morphologischer Verschluss der Einzelzell-Läsion unter Kontrollbedingungen betrachtet durch intravitale Videomikroskopie in der perfundierten miniaturisierten Ussing-Kammer. A) vor dem Setzen des Schadens, B) 1,5 min, C) 5 min, D) 15 min nach dem Setzen des Schadens (Balken: 10 μ m).

In Abb. 14 sind vier Defekte (1: Abb. 14,1 und -5; 2: Abb. 14,2 und -6; 3: Abb. 14,3 und -7; 4: Abb. 14,4 und -8) gezeigt, die zu bestimmten Zeitpunkten nach Setzen der Läsion für die Analyse im konfokalen Fluoreszenzmikroskop fixiert wurden. Dort wurden xy-Scans parallel zum Epithel (quadratisches Bild) durchgeführt und mit Hilfe des Computers xz-Projektionen entlang der grünen Linie (rechteckiges Bild oberhalb des quadratischen Bildes) und yz-Projektionen (rechteckiges Bild rechts des quadratischen Bildes) entlang der roten Linie generiert. Um eine Orientierungshilfe zu geben, wurde an jedem Defekt einerseits die Ebene mit *Tight junctions* des intakten Epithels um den Defekt (Abb. 14,1-4) und andererseits parallel dazu die Ebene, die den minimalen Defekt darstellt, fokussiert (Abb. 14,5-8). Die *Tight junctions* wurden mit Occludin-Antikörpern und die Kerne mittels DAPI gefärbt.

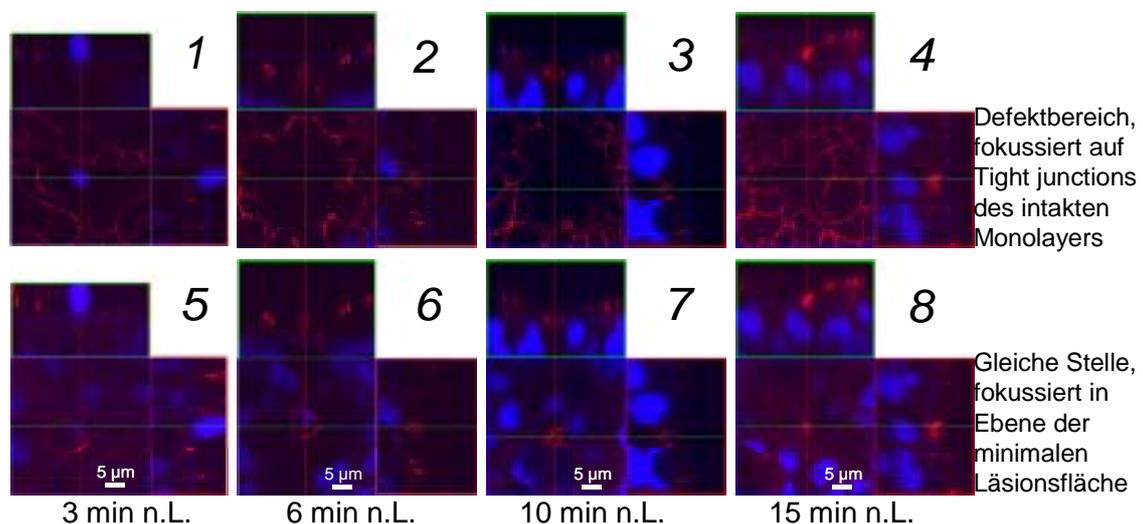


Abb. 14: Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie der Einzelzell-Läsion bei HT-29/B6. Färbung von Occludin und DAPI-Kernfärbung

Färbung des Tight junction Proteins Occludin (rot) und DAPI-Kernfärbung (blau) zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Setzen des Schadens (n.L.: nach Läsion). 1 und 5, 3 min n.L.; 2 und 6, 6 min n.L.; 3 und 7, 10 min n.L.; 4 und 8, 15 min n.L. Die quadratischen Teilbilder zeigen jeweils xy-Scans parallel zum Epithel. An den Positionen, die durch die grüne und rote Linie gekennzeichnet werden, wurden mittels eines Computers xz- und yz-Projektionen generiert (rechteckige Teilbilder oberhalb und rechts neben den quadratischen Teilbildern). In den xz- und yz-Teilbildern signalisiert die blaue Linie die Fokusebene der xy-Bilder. Es wurde einerseits die *Tight junction*-Ebene der intakten Epithelzellen (1 - 4) oder andererseits parallel dazu in einer zweiten Fokusebene, in welcher der Defekt minimal war (5 - 8), eine zweite Serie von Bildern eingestellt. In den Bildern 1 und 5 war der entlang der z-Achse gescannte Bereich aufgrund von geringerer Zelhöhe geringfügig kleiner als in den anderen Bildern.

In den xy-Scans, welche die Ebene der *Tight junctions* an den intakten Epithelzellen um den Defekt herum zeigen (Abb. 14,1-4), wird ein Netzwerk von *Tight junctions* mit einem Loch im Bereich der Läsion dargestellt. Das Areal ohne *Tight junction* erscheint 6 min nach Setzen der Läsion (n.L.: nach Läsion) größer als 3 min n.L. (Abb. 14,1 und 2). Zusätzlich zu den abgedruckten Bildern wurde in Filmsequenzen deutlich (*Movie 1* auf der beiliegenden CD-R und *Online supplements* zu (Florian et al., 2002)), daß der Effekt durch eine erniedrigte apikale Oberfläche der sich abflachenden Zellen um den Defekt herum verursacht wurde.

In der zweiten Serie von xy-Scans (Abb. 14,5-8) wurde versucht die Fokusebene so zu wählen, daß der Defekt in seiner minimalen Ausdehnung abgebildet wurde. Da nur Teile der Zellmembran, die dem Defekt zugewandt sind, *Tight junction*-Elemente mit einer Fluoreszenzmarkierung aufweisen, war dies nicht immer eindeutig einzustellen. Die Abb. 14,5-8 zeigt typische Defekte an der Basis zu den jeweiligen Zeitpunkten nach Setzen des Schadens. Drei Minuten nach Setzen der Läsion zeigten die meisten untersuchten Läsionen wenige, z.T. aber auch gar keine, Occludin-Fragmente (Abb. 14,5). Zu späteren Zeitpunkten war Occludin regelmäßig zu finden, allerdings mehr oder weniger beschränkt auf ein Band in den Membranen, die dem Defekt zugewandt waren, das einige μm unterhalb der epithelialen Oberfläche angeordnet war (Abb. 14,6-8). Daraus läßt sich ableiten, daß der sichtbare Defekt durch die Occludinfärbung weitgehend der Ebene des minimalen Defektes entsprach.

Die Fokussierung verschiedener xy-Ebenen ermöglichte nach der Bildverarbeitung die Rekonstruktion eines dreidimensionalen Bildes von dem trichterförmigen Defekt. Das in der Superposition dargestellte Profil wurde aus den xz- und yz-Projektionen, die an den entsprechend markierten Linien durchgeführt wurden, generiert (Abb. 14 und Abb. 15,7). Das Profil des Defekts war am geringsten ausgeprägt zu frühen Zeitpunkten, z.B. 3 min nach Läsion (Abb. 14,5), denn dann wurde an dem Defekt nur eine geringe Anzahl von *Tight junction*-Proteinen gebildet. Zu diesem Zeitpunkt war der Durchmesser des Defektes an den basalen Enden ca. 4 - 5 μm und nur die unmittelbar benachbarten Zellen um den Defekt erschienen abgeflacht. Das komplette trichterförmige Profil der Lakune konnte erst 6 min nach Läsion dargestellt werden (Abb. 14,2 und 6, *Movie 2* auf der beiliegenden CD-R und *Online Supplements* zu (Florian et al., 2002)) und war dann für die gesamte

Zeit der Messung ausgebildet. Mehrere Zellen um den Defekt herum (bis vier Zelldurchmesser Abstand) flachten sich zwischen der dritten und fünfzehnten Minute nach Setzen der Läsion ab, auch wenn deutlich wurde, daß die Abflachung mit Zunahme der Distanz geringer wurde. Der Durchmesser des Defekts war 6 min nach Setzen der Läsion 3 bis 4 μm groß. Weiter fortgeschritten, 10 min nach Läsion, war der Defekt fast geschlossen und an den basalen Enden war ein Durchmesser von ca. 1 μm feststellbar, der gekennzeichnet war durch eine kleine Öffnung im Zentrum der durch Occludin dargestellten Membranen von den benachbarten Zellen (Abb. 14,7, *Movie 3* auf der beiliegenden CD-R und *Online Supplements* zu (Florian et al., 2002)). Nach 15 min schließlich erschien der Defekt verschlossen (Abb. 14,8, *Movie 4* auf der beiliegenden CD-R und *Online Supplements* zu (Florian et al., 2002)). Der Verschuß des Defekts begann somit an den basalen Enden der umliegenden Zellen und die apikalen Enden folgten (Abb. 14,1 - 8, *Movies 3* und *4* auf der beiliegenden CD-R und *Online Supplements* zu (Florian et al., 2002)).

4.1.2 Nachweis von ZO-1 und Occludin

Mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie wurde die Verteilung von peripheren und integralen *Tight junction*-Proteinen, ZO-1 und Occludin, an den gleichen Defekten mit einem frischen Defekt (3 min nach Setzen der Läsion, Abb. 15,1-3) oder nach fortgeschrittener Restitution (10 min nach Läsion, Abb. 15, 4 - 7) untersucht. In den xy-Scans, die in Abb. 15,1-3 und Abb. 15,4-6 gezeigt werden, wurde wiederum versucht, die Ebene so zu fokussieren, daß der Defekt minimal abgebildet ist (s. auch Abb. 14,5-8). Wie bereits oben beschrieben (für Abb. 14), wurden xz-Projektionen an der eingezeichneten grünen Linie und yz-Projektionen an der eingezeichneten roten Linie (Abb. 15,1-3 und Abb. 15,4-6) durchgeführt. Um die Kolo-kalisation von ZO-1 (Abb. 15, 1 und 4) und Occludin (Abb. 15, 2 und 5) zu zeigen, wurden die Einzelbilder jeweils übereinander gelegt (Abb. 15, 3 und 6).

In dem frischen Defekt (3 min nach Setzen der Läsion) konnten nur wenige oder teilweise keine *Tight junction*-Proteine an den Membranen der benachbarten Zellen mittels Immunfluoreszenz detektiert werden (Abb. 14,1 und 5; Abb. 15,1-3). Um allerdings die Größe des Defekts eindeutig darzustellen, wurde in Abb. 15,1-3 eine Läsion nach 3 min gewählt, die mehr *Tight junction*-Proteine als typisch um den Defekt ausgebildet hatte. Mit Zunahme der Restitutionszeit (10 min nach Läsion) konnte regelmäßig ein

Tight junction-Proteinring festgestellt werden und ein typisches Beispiel wird in Abb. 15,4-6 dargestellt. In allen Läsionen (3 und 10 min nach Läsion) zeigt die Überlagerung von ZO-1 und Occludin die Kollokalisierung von peripheren und integralen *Tight junction*-Proteinen (Abb. 15,3,6 und 7).

Um die räumliche Verteilung des Defektes zu zeigen, wurde eine dreidimensionale Rekonstruktion durch Superposition von optischen Schnitten, die *Tight junction*-Proteine zeigen, hergestellt. Durch Rotation von xy-Ebenen um die y-Achse wurde das entsprechende Bild generiert. Diese dreidimensionale Rekonstruktion ist auf einer CD-R beigefügt (*Movies 2 bis 4*) und als *Online supplemented material* im Internet abrufbar (Florian et al., 2002). Gezeigt werden dort Filmsequenzen von überlagerten ZO-1- und Occludin-Färbungen 6 min, 10 min und 15 min nach Läsion. In der frischen Läsion (3 min nach Läsion) konnte der Defekt nicht gezeigt werden, da noch kein gefärbter Ring von *Tight junction*-Proteinen vorhanden war. Nach 6 min ist dieser Ring undeutlich an der Basis des Defektes sichtbar. Mit Zunahme der Restitutionszeit, 10 und 15 min nach Läsion, bildet sich der *Tight junction*-Ring allerdings immer stärker ab. Ebenso ist nach 10 min ein sichtbares Loch zu erkennen, welches nach 15 min verschlossen erscheint. Zusätzlich zu dem Ring um den Defekt, stellen die Bilder die *Tight junction* zwischen den intakten Zellen dar.

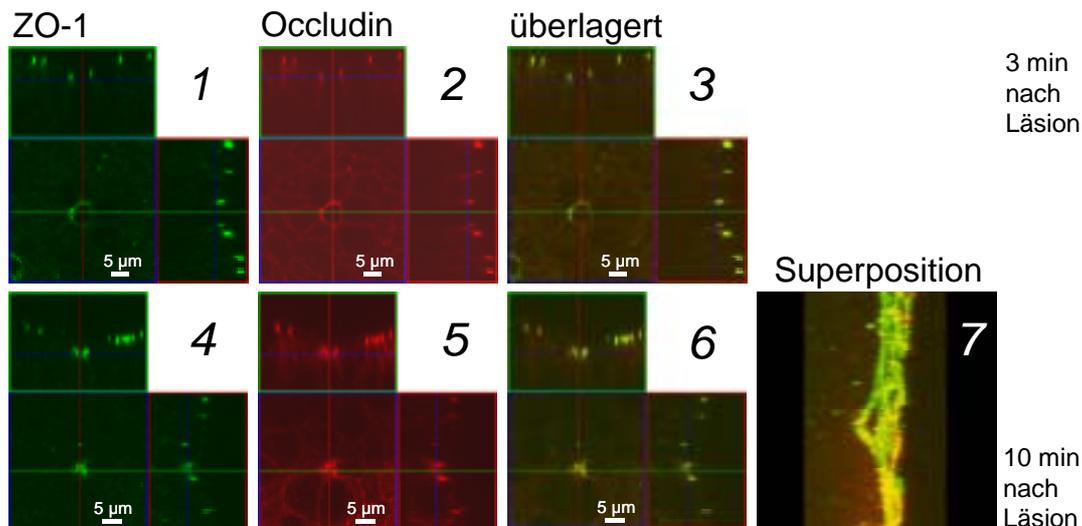


Abb. 15: Immunfluoreszenzfärbung der Einzelzell-Läsion mit ZO-1 und Occludin.

Dargestellt sind Färbungen mit ZO-1- und Occludin-Antikörpern, 3 (1 - 3) oder 10 min (4 - 7) min nach Setzen der Läsion. In Bild 1 - 6 entspricht die Anordnung der Einzelbilder den xy-Scans und xz- oder yz-Projektionen der Bilder in Abb. 14. Bild 1 und 4 zeigen ZO-1 (grün), 2 und 5 zeigen Occludin (rot) und 3 und 6 zeigen eine Überlagerung (gelb zeigt Kolokalisation an). Auch in diesen Bildern wurde diejenige Ebene fokussiert, in der der Defekt minimal erscheint. Bild 7 zeigt eine Superposition der Einzelbilder mit überlagertem ZO-1 und Occludin für den Defekt nach 10 min. Die Tight junction Proteine zeichnen den trichterförmigen Defekt nach.

4.1.3 Verteilung von ZO-1 und F-Aktin

Die Verteilung von F-Aktin im Vergleich zu ZO-1 wurde an Proben mit einem frischen Defekt (3 min nach Läsion, Abb. 16,1-3) oder nach fortgeschrittener Restitution (10 min nach Läsion, Abb. 16,4-6) untersucht. Die xy-Scans und xz- oder yz-Projektionen in Abb. 16,1-3 und Abb. 16,4-6 wurden nach dem gleichen Prinzip, wie oben für Abb. 15,1-3 und Abb. 15,4-6 erläutert, hergestellt. Im Bereich des intakten Epithels, das den Defekt umgibt, wurden ZO-1 und F-Aktin in Vertikalschnitten dort abgebildet, wo die *Tight junction* optisch geschnitten wurde (xz- und yz-Projektionen in Abb. 16,2 und 5). Auch wenn die intrazelluläre Verteilung von F-Aktin mehr oder weniger diffus war, konnte partiell eine Kolokalisation mit ZO-1 nachgewiesen werden (xz- und yz-Projektionen in Abb. 16, 3 und 6).

Ähnlich wie im Falle der *Tight junction*-Proteine (Abb. 14,5 und Abb. 15,1) konnten Fragmente von F-Aktin, wenn überhaupt, nur in den Zellmembranen, die den Defekt umschlossen, 3 min nach Läsion gefunden werden (Abb. 16,2). Im Gegensatz zu diesem frischen Defekt, konnte man 10 min nach Setzen der Läsion einen Ring von ZO-1 und ein breites F-Aktin-Band um den Defekt herum beobachten (Abb. 16,5, insbesondere in xz- und yz-Projektionen). Das periphere *Tight junction*-Protein ZO-1 ließ sich mit dem Aktin-Band kolokalisieren, auch wenn es deutlich schmaler als Ring ausgebildet war (Abb. 16,6, insbesondere in xz- und yz-Projektionen). Das Aktin-Band, das in allen benachbarten Zellen sichtbar war, erschien an den basalen Enden deutlich dichter als apikal (Abb. 16,5, xz-Projektion).

Aufgrund dieser ausgeprägten Zytoskelettverteilung und dem Fehlen von Lamellipodien läßt sich ein Aktin-abhängiger Mechanismus, der in der Literatur als *purse string* bezeichnet wird, annehmen. Er wurde beispielweise im Rahmen der Restitution größerer Defekte in Caco-2 Zellen, einer intestinalen Epithelzelllinie, nachgewiesen (Bement et al., 1993). Die funktionellen Analysen des Mechanismus sind im Abschnitt 4.1.6 beschrieben. Im Unterschied zu Bement et al. (Bement et al., 1993) war zu beobachten, daß die basalen Enden anstelle der apikalen Enden von den benachbarten Zellen zuerst in den Defekt ziehen.

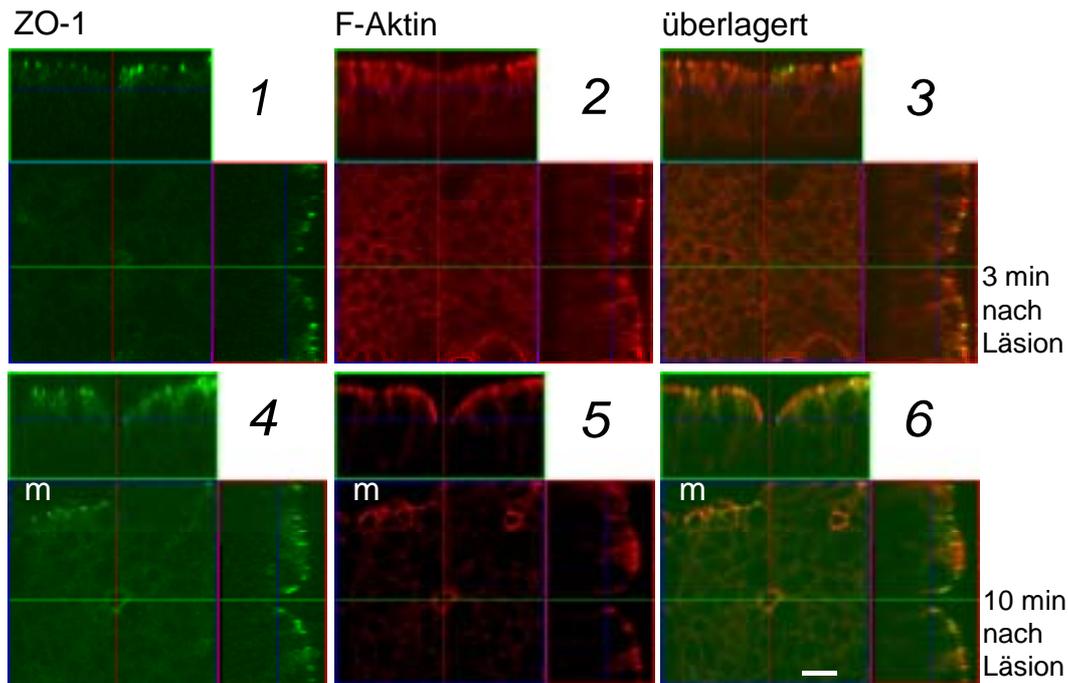


Abb. 16: Immunfluoreszenzfärbung von ZO-1 und F-Aktin

Die Zellen wurden mit ZO-1-Antikörpern (grün) und Alexa Fluor™ 594-phalloidin (rot) für F-Aktin zum Zeitpunkt $t = 3$ min (1 - 3) und $t = 10$ min (4 - 6) nach dem Setzen des Schadens analysiert. 1 und 4, ZO-1; 2 und 5, F-Aktin; 3 und 6, Überlagerung der Bilder von der ZO-1- und F-Aktin-Färbung. Die Anordnung der Bilder (xy-Scans und xz- und yz-Projektionen) ist die gleiche wie in Abb. 14 und Abb. 15. (m: Markierung, die beim Erzeugen des Koordinatensystems gesetzt wurde, um den zu untersuchenden Einzelzelldefekt im Monolayer wiederzufinden (s. Abb. 12))

4.1.4 Effekt von Zytoskelettmodulatoren und Rho-Kinase-Inhibitoren

Cytochalasin D

Cytochalasin D ist ein zellmembranpermeables Mykotoxin. Es bindet an die freien Enden von Aktinfilamenten und hemmt die Zusammenlagerung aber auch die Trennung von Aktinuntereinheiten. Es verursacht die Zerstörung von Aktinfilamenten und hemmt außerdem die Neupolymerisation von Aktinfilamenten. Cytochalasin D ist etwa 10-fach effektiver als Cytochalasin B. Weiterhin hemmt es nicht den transzellulären Transport von Monosacchariden wie z.B. Cytochalasin B.

2,3-Butandion Monoxim (BDM)

Das Oximderivat 2,3-Butandion Monoxim ist ein Inhibitor der Myosin-ATPasen in Muskelzellen und Nicht-Muskelzellen. BDM interagiert spezifisch mit dem Myosin.ADP.P_i-Komplex und ist ein nicht kompetitiver Hemmer dessen. BDM

bewirkt eine Reduzierung des "starken" Aktinbindungszustandes Myosin.ADP und steigert den "schwachen" Bindungszustand Myosin.ADP.P_i. Somit ist das Gleichgewicht zwischen beiden Aktinbindungszuständen zu Gunsten des "schwachen" verschoben und führt so zu einer Fehlregulation der Aktin-Myosin-Interaktion.

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

Um die Interaktion zwischen Myosin und Aktin spezifischer zu hemmen, wurde ML-7 eingesetzt. Dies ist ein Inhibitor der Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK), ein Ca²⁺/Calmodulin-abhängiges Enzym, welches den Transfer des γ -Phosphats von ATP auf die Myosin-leichte-Kette (MLC) in glatten Muskeln und Nicht-Muskelzellen katalysiert. Diese Reaktion ist Voraussetzung für die Aktin-Myosin Interaktion, was letztlich zur Kontraktion führt. Dadurch sollte die Beteiligung von MLCK am Mechanismus des *purse string* untersucht werden.

Y-27632

Y-27632 ist ein Blocker der Rho-assoziierten Proteinkinase, p160ROCK, eines der Zielproteine innerhalb der Rho-Kaskade. Rho-GTPasen spielen eine komplexe Rolle bei der Regulation von Zellmorphologie, Gentranskription, Zellzyklusentwicklung, Apoptose und Tumorentwicklung. Eine der Wirkungen von Rho-GTPasen wird somit über das Rho-Kinase-Familienmitglied p160ROCK vermittelt und induziert u.a. Streßfasern und die Zusammenlagerung von fokalen Adhärenzpunkten. Dies sind Prozesse, die die Kontraktilität des Aktin-Myosin-Systems regulieren. Durch die spezifische Hemmung sollte der Einfluß von Rho-Kinasen auf die Restitution von Einzelzell-Läsionen untersucht werden.

4.1.5 Morphologie unter Zytoskelettmodulatoren und erniedrigter freier [Ca²⁺]_a

Um die an der Restitution einer Einzelzell-Läsion beteiligten Mechanismen näher zu untersuchen, wurde die Analyse der Restitution nicht nur unter Kontrollbedingungen mittels Time lapse-Videomikroskopie untersucht (Abb. 13A-D), sondern auch unter verschiedenen Zytoskelettmodulatoren und niedriger freier Calciumkonzentration (Abb. 17). Der Prozeß wird in Abb. 17 gezeigt, bevor eine Läsion gesetzt wird (A, C, E, G) und 10 min danach (B, D, F, H).

Die mögliche Beteiligung einer Aktin-Myosin-Interaktion wurde mit spezifischen Inhibitoren untersucht. Nach der Hemmung der Aktinpolymerisation, durch Einsatz von $2 \mu\text{mol l}^{-1}$ Cytochalasin D auf der serosalen Seite (Abb. 17 C und D), war der Defekt 10 min nach Setzen der Läsion, was durch das dunkle Areal im Zentrum von Abb. 17 D gezeigt wird, immer noch offen. Nachdem die Myosin-ATPase-Aktivität durch den Einsatz von 20mmol l^{-1} BDM auf beiden Seiten des Epithels blockiert wurde (Abb. 17 E und F), war nur ein Teil des Defekt nach 10 min verschlossen (Abb. 17 F). Die morphologische Untersuchung lieferte dabei ein Ergebnis, das mit den in den folgenden Kapiteln beschriebenen funktionellen Untersuchungen übereinstimmt (Abb. 20B und C). Zusammengefaßt deuten diese Ergebnisse auf eine Aktin-Myosin-Interaktion während des Verschlusses hin.

Um die Bedeutung der Leckheit von Epithelien zu untersuchen, wurden die *Tight junctions* mit einem etablierten Verfahren, niedriger extrazellulärer Calcium-Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_a$), geöffnet. Außer am Einzelzelldefekt war die epitheliale Integrität, auch wenn das Epithel insgesamt undichter als unter Kontrollbedingungen geworden war, erhalten. In erniedrigter freier $[\text{Ca}^{2+}]_a$ Ringerlösung (Abb. 17 G und H) ist wiederum die typische Rosettenstruktur einer intakten Restitution nach 10 min sichtbar (Abb. 17 H). Die Restitution einer Einzelzell-Läsion zeigt die gleiche Morphologie wie unter Kontrollbedingungen (Abb. 17H).

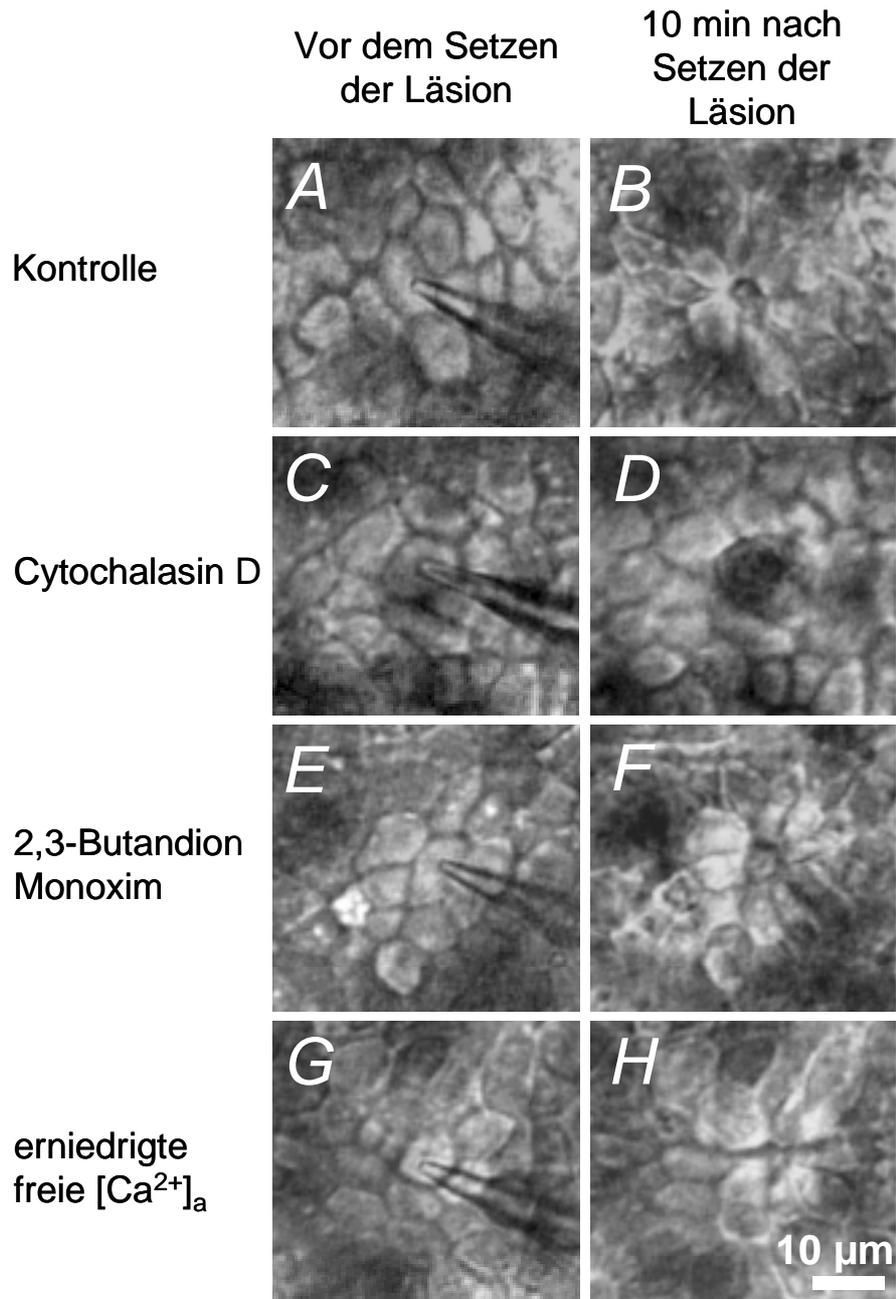


Abb. 17: Time lapse-Videomikroskopie der Restitution unter Zytoskelettmodulatoren und erniedrigtem freien Calcium

Gezeigt wird der intakte HT-29/B6-Monolayer unmittelbar vor dem Setzen der Läsion (A, C, E und G) und 10 min danach (B, D, F und H), wie er sich in der Conductance scanning-Meßapparatur zeigt. Dargestellt ist er unter Kontrollbedingungen (A und B), nach Inkubation mit Cytochalasin D (C und D), mit 2,3-Butandion Monoxim (E und F) und in erniedrigter extrazellulärer freier Calcium-Konzentration (G, H). Der Verschuß des Defektes startet unterhalb der Oberfläche (definiert durch die apikalen Zellmembranen). Die Schwierigkeit, die Fläche des minimalen Defekts mit Hilfe konventioneller Lichtmikroskopie abzubilden, wurde mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie umgangen (Abb. 14 und Abb. 16, *Movies* 1-4).

4.1.6 Funktionelle Charakterisierung der Restitution

Wurde die Leitfähigkeit in konventionellen Ussing-Kammern gemessen, ergab sich eine epitheliale Leitfähigkeit (G^{Ussing}) von $1,69 \pm 0,02 \text{ mS cm}^{-2}$ ($n = 19$), die über einen Zeitraum von 12 Stunden konstant blieb (Abb. 18A). Mit der Conductance scanning-Technik wurde in nicht apoptotischen und intakten Bereichen des Epithels eine Leitfähigkeit von $1,29 \pm 0,10 \text{ mS cm}^{-2}$ (Median: $1,38 \text{ mS cm}^{-2}$) ($n = 17$) gemessen. Die reduzierte Leitfähigkeit im Vergleich zur Ussing-Kammer Messung läßt sich vermutlich auf ein Fehlen der apoptotischen Einflüsse und der Randlecks in der Conductance scanning-Messung zurückführen.

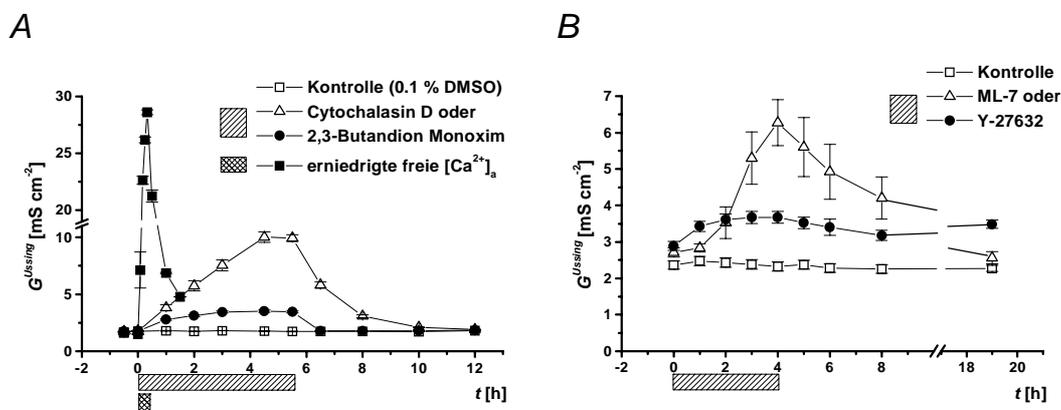


Abb. 18: Leitfähigkeit des HT-29/B6 Monolayers gemessen in einer konventionellen Ussing-Kammer als Funktion der Zeit

(A) Die zeitliche Veränderung der Leitfähigkeit (G^{Ussing}) wurde unter Kontrollbedingungen ($n = 19$) und hinsichtlich des Effekts von Zytoskelettmodulatoren, Cytochalasin D ($n = 10$) oder 2,3-Butandion Monoxim ($n = 10$) und erniedrigtem freien extrazellulären Calcium (250 nmol l^{-1} , $n = 8$) untersucht. Mit beiden Inhibitoren und unter erniedrigtem freien extrazellulären Calcium war der Anstieg von G^{Ussing} reversibel nach Auswaschen mit Kontroll-Elektrolytlösung. [Mittelwerte \pm SEM]

(B) Zellen einer anderen Passage (32.-33. Passage) wurden unter Kontrollbedingungen ($n = 14$) untersucht und der Effekt des Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) Inhibitors ML-7 ($n = 7$) und des Rho-assoziierten Kinaseinhibitors Y-27632 ($n = 6$) wurden untersucht. Unter dem Einfluß des Inhibitors ML-7 war der Anstieg von G^{Ussing} reversibel nach Auswaschen mit regulärer Kontroll-Elektrolytlösung. Der Anstieg durch Y-27632 war nicht reversibel. [Mittelwerte \pm SEM]

Die räumliche Verteilung der epithelialen Leitfähigkeit wurde grundsätzlich mit einem im Abstand von $25 \mu\text{m}$ über dem Epithel positionierten Elektrodenpaar

am Oberflächenepithel ohne Apoptosen und Schäden gemessen. Der konstante Abstand von 25 μm ist für die Integration (Abschnitt 3.5.1.1, Gleichung (1)) wichtig. Im Abstand von 25 μm ist davon auszugehen, daß sich die trans- und parazellulären Ströme überlagern (Gitter et al., 1997). Wurden die Elektroden parallel zur Oberfläche bewegt, war die Leitfähigkeitsverteilung im intakten Epithel gleichmäßig.

Um die Restitution des funktionellen Lecks, welches durch eine Einzelzell-Läsion artifiziiell gesetzt wurde, zu quantifizieren, wurde die Verteilung der Leitfähigkeit mehrfach nach dem Setzen des Schadens dokumentiert. Dabei bewegte sich der Meßsensor parallel zur Oberfläche entlang einer Linie (x-Achse) beginnend von dem Ort direkt über dem Schaden ($x = 0$) zu den einzelnen Meßpunkten bei $x = 10, 20, 40, 70, 100 \mu\text{m}$. Die apparente Leitfähigkeit, G_A , wurde mit Hilfe von Gleichung (1) aus den Rohdaten berechnet. Um die zeitliche Entwicklung des Leckstroms zu messen, wurde das Elektrodenpaar in einem Intervall von 1 – 1,5 min wiederholt über das Epithel geführt. Eine typische Datenaufnahme ist unter Kontrollbedingungen in Abb. 6 gezeigt. Mit Hilfe von Gleichung (2) wurde aus den Daten der Leitwert als Funktion der Zeit, $g^{Läsion}(t)$, berechnet. Dieser Wert gibt also direkt den Leitwert der Einzelzell-Läsion an. Erste Messungen waren nach 2 min möglich, weil zum Positionieren des Meßelektrodenpaares zunächst die Läsionselektrode aus dem Gesichtsfeld entfernt werden mußte, um Platz zu schaffen.

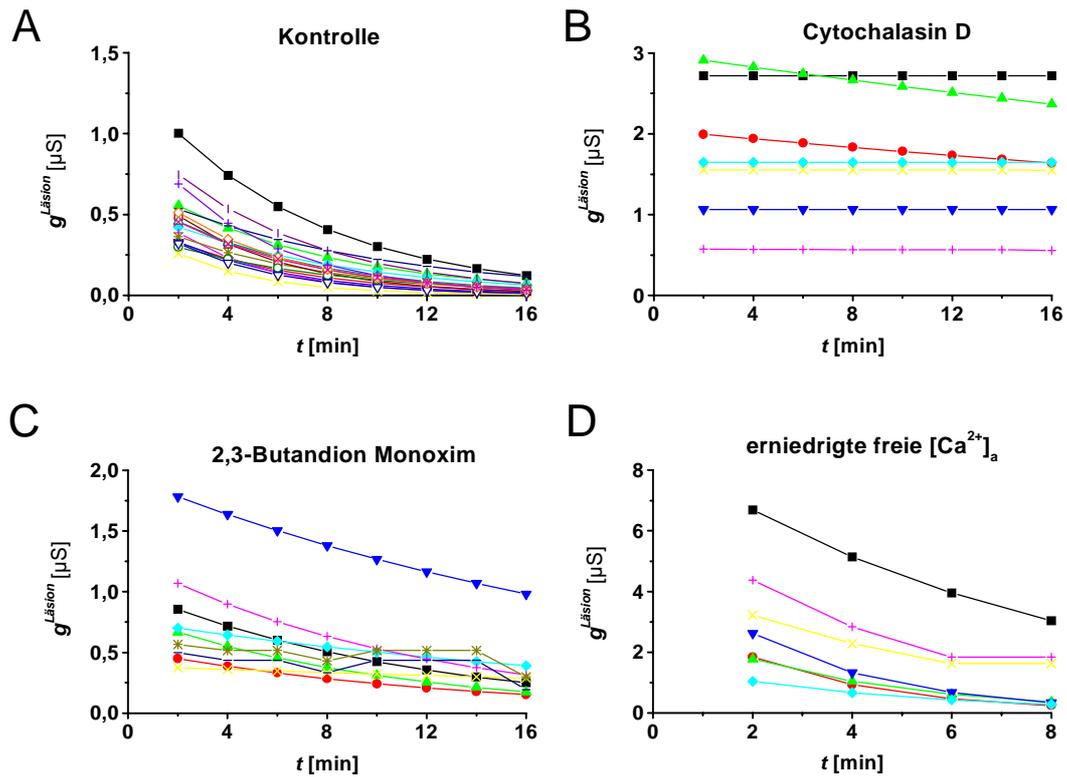


Abb. 19: Leitwert der Läsion, $g^{Läsion}$, als Funktion der Zeit nach Einzelzell-Läsion

Dargestellt sind die Einzelmessungen im Zeitverlauf der Restitution in HT-29/B6-Zellen (28.-31. Passage), (A) unter Kontrollbedingungen ($n = 17$), (B) nach Inkubation mit Cytochalasin D ($n = 7$), (C) mit 2,3-Butandion Monoxim ($n = 10$) und (D) in erniedrigter freier Calciumlösung ($n = 7$).

In Abb. 20 ist der Median der hier gezeigten Einzelmessungen zur besseren Übersicht dargestellt.

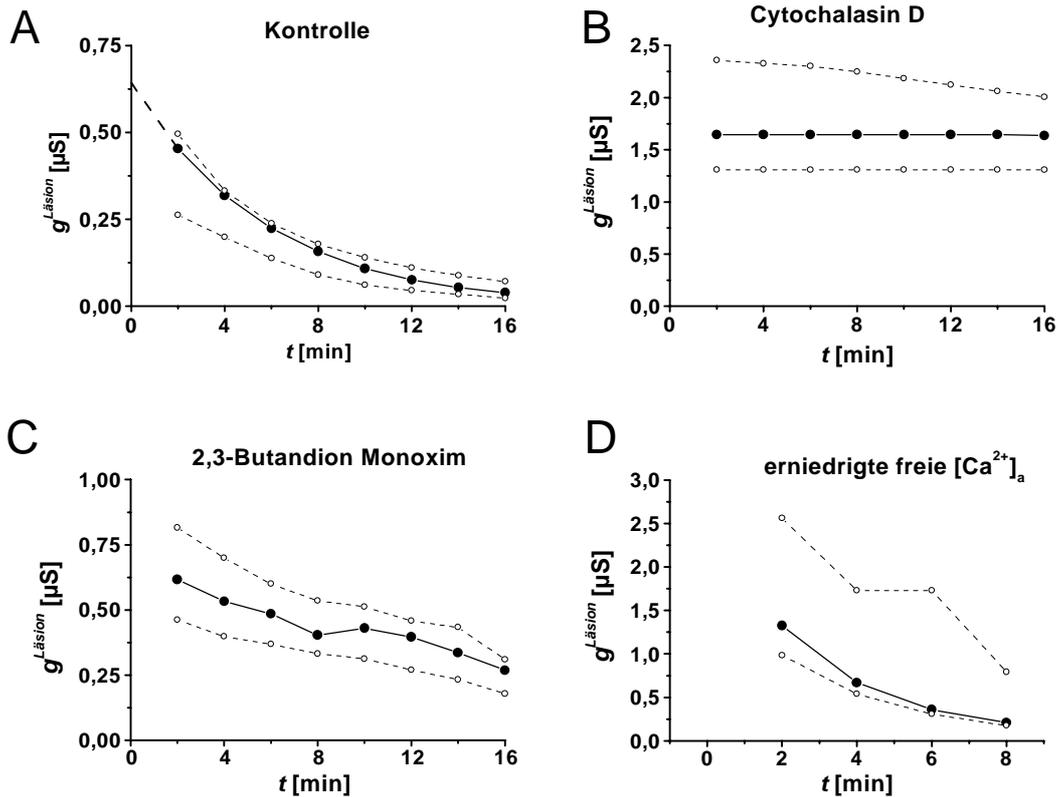


Abb. 20: Leitwert der Läsion, $g^{Läsion}$, als Funktion der Zeit nach Einzelzell-Läsion

Dargestellt ist der Zeitverlauf der Restitution in HT-29/B6-Zellen (28.-31. Passage), (A) unter Kontrollbedingungen ($n = 17$), (B) nach Inkubation mit Cytochalasin D ($n = 7$), (C) mit 2,3-Butandion Monoxim ($n = 10$) und (D) in erniedrigter freier Calciumlösung ($n = 7$). Unter Kontrollbedingungen (A), resultierte die Restitution in einem exponentiellen Abfall des Leitwertes $g^{Läsion}$, was es ermöglichte, das initiale Leck ($t = 0$) von $0,69 \pm 0,06 \mu\text{S}$ (Median: $0,64 \mu\text{S}$) abzuschätzen. Die Restitution des Lecks (angegeben durch $g^{Läsion}$) wurde blockiert durch die Hemmung der Aktinpolymerisation (B) und wurde verlangsamt durch Inhibition der Myosin ATPase-Aktivität (C). Eine erniedrigte freie Calcium-Konzentration in der Ringerlösung hatte keinen Einfluß auf die Restitutionsgeschwindigkeit (D). Meßtechnisch war es nicht möglich, länger als 8 min unter erniedrigter freier Calciumkonzentration zu messen. Dargestellt ist der Median (schwarze Kreise) mit dem 1. und 3. Quartil (offene Kreise).

Die Größe des Defektes, $g^{Läsion}$, nahm exponentiell mit der Zeit, t (Abb. 19A) ab. Von Beginn der Messung (2 min nach Setzen des Schadens) bis 8 min nach Schadenssetzung ($\Delta g^{Läsion}$) nahm der Leitwert um 66 % (von $0,48 \pm 0,05$ auf $0,17 \pm 0,02 \mu\text{S}$, $n = 17$; Median: 65 %, von $0,45$ auf $0,16$) in der ersten Serie von Experimenten (an Zellen der Passage 28 - 31) ab (Abb. 19

und Abb. 20). Durch einen einfachen exponentiellen Fit der Daten und einer Extrapolation bis zum Zeitpunkt $t = 0$ konnte eine Abschätzung des initialen Lecks von $0,69 \pm 0,06 \mu\text{S}$ (Median: $0,64 \mu\text{S}$; gestrichelte Linie in Abb. 20A) erfolgen.

In einer zweiten Serie von Experimenten (Zellen der Passage 32 und 33) kam es zur Abnahme des Lecks um $50 \% \pm 6 \%$ (Median: 50% ; $n = 7$) in der Zeit zwischen 2 min (erste Messung) und 8 min nach Setzen der Läsion (Abb. 22 und Abb. 23). Die gepoolten Ergebnisse aus den zwei Serien von Messungen sind Tab. 6 und Abb. 21 zu entnehmen.

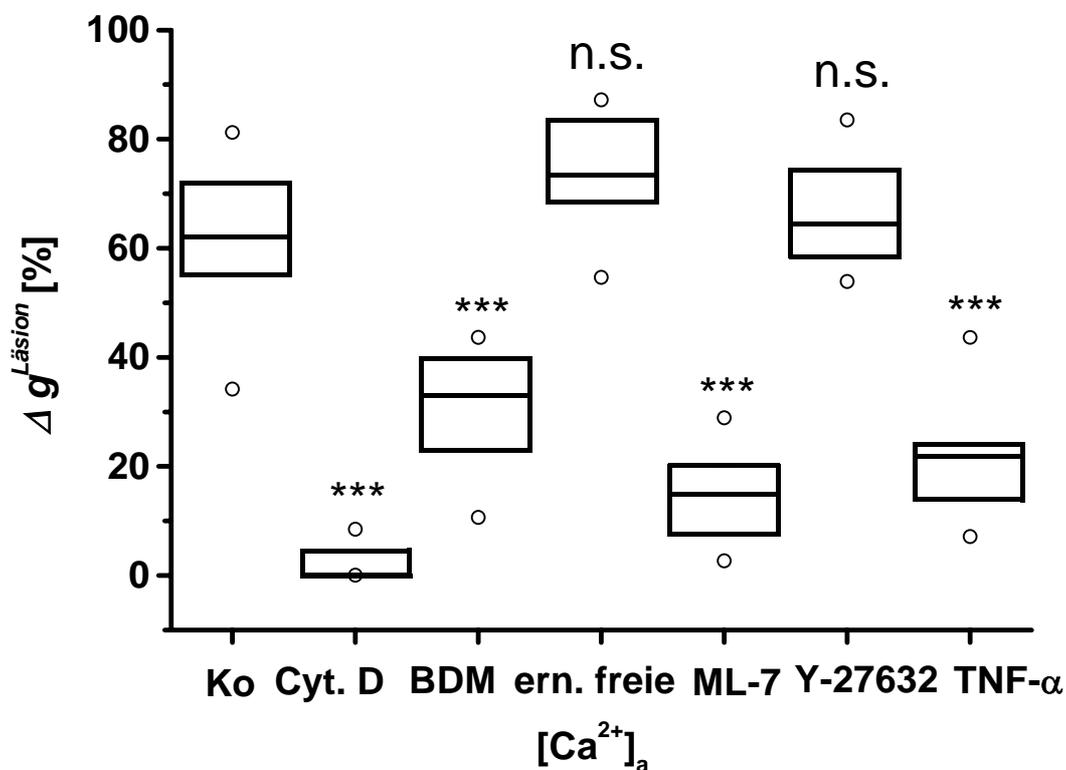


Abb. 21: Relative Abnahme des Leitwertes $g^{Läsion}$

Dargestellt ist die Abnahme des Leitwertes von Beginn der Messung (2 min nach Setzen des Schadens) bis 8 min nach Setzen des Schadens unter Kontrollbedingungen und unter den jeweiligen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Bedingungen (Ko, Kontrolle; Cyt. D, Cytochalasin D; BDM, 2,3-Butandion Monoxim; ern. freie $[Ca^{2+}]_a$, erniedrigte freie Calciumkonzentration; ML-7, Myosin-leichte-Ketten-Inhibitor; Y-27632, Rho-assoziierte Kinase-Inhibitor; TNF- α , Tumornekrosefaktor-alpha). Die relative Abnahme des Leitwertes von der zweiten bis zur achten Minute ist mit $\Delta g^{Läsion}$ bezeichnet. Die prozentuale Abnahme innerhalb der ersten 8 min ist in Tab. 6 als Mittelwert \pm SEM und Median mit 1. und 3. Quartil zusammengefaßt dargestellt. Hier stellen die horizontalen Linien in den Boxen von unten nach oben das 1. Quartil, den Median und das 3. Quartil dar. Minimum und

Maximum sind durch offene Kreise gekennzeichnet. (U-Test gegen Kontrolle nach Wilcoxon, Mann und Whitney mit Bonferroni-Korrektur für multiples Testen: n.s., $p > 0,05$; ***, $p < 0,002$)

Mit zunehmender Restitutionszeit ging der Leitwert ($g^{Läsion}$) zurück Richtung Null (Abb. 20A, Abb. 23A) und die Restitution des Epithels führte zum Erreichen einer Leitfähigkeit, die der des ungeschädigten Epithels annähernd entsprach. Dies deutet darauf hin, daß ein Kontrollmechanismus der Barrierefunktion existiert, der mindestens genauso schnell funktioniert wie der morphologische Verschuß. Eine perfekte Abdichtung des Lecks deutet weiterhin darauf hin, daß die neugebildeten *Tight junctions* vergleichbare Barriereigenschaften aufweisen, wie die in ungestörten Epithelbereichen anzutreffenden *Tight junctions*.

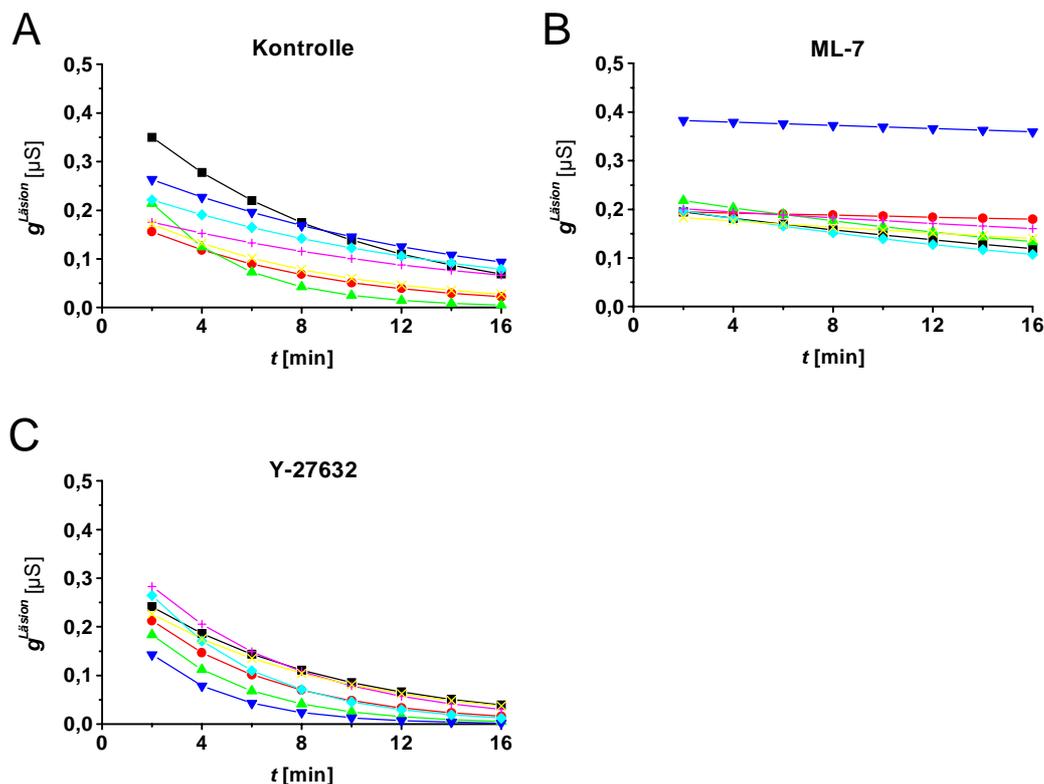


Abb. 22: Leitwert der Läsion, $g^{Läsion}$, als Funktion der Zeit nach Einzelzell-Läsion

Dargestellt sind die Einzelmessungen im Zeitverlauf der Restitution in HT-29/B6 Zellen der 32. und 33. Passage, (A) unter Kontrollbedingungen ($n = 7$), (B) nach Inkubation mit ML-7 ($n = 8$) und (C) nach Y-27632-Behandlung ($n = 8$). In Abb. 23 ist der Median der hier gezeigten Einzelmessungen zur besseren Übersicht dargestellt.

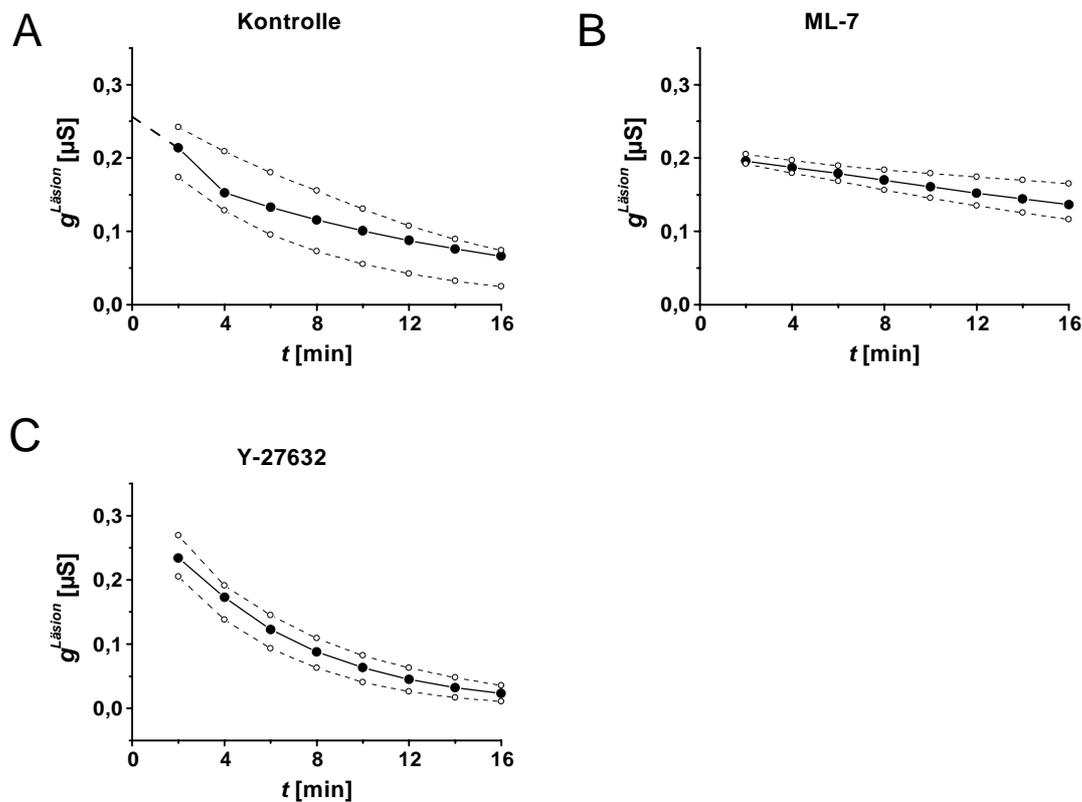


Abb. 23: Leitwert der Läsion, $g^{Läsion}$, als Funktion der Zeit nach Einzelzell-Läsion

Dargestellt ist der Zeitverlauf der Restitution in HT-29/B6 Zellen der 32. und 33. Passage, (A) unter Kontrollbedingungen, (B) nach Inkubation mit ML-7 und (C) nach Y-27632-Behandlung. Unter Kontrollbedingungen resultierte die Restitution in einem exponentiellen Abfall des Leitwertes $g^{Läsion}$ ($n = 7$). Die Restitution des Lecks wurde stark verlangsamt durch die Hemmung der Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) ($n = 8$), vollzog sich aber nach Y-27632-Behandlung mit vergleichbar schneller Geschwindigkeit wie unter Kontrollbedingungen ($n = 8$). Dargestellt ist der Median (schwarze Kreise) mit dem 1. und 3. Quartil (offene Kreise).

Vorstellbar wäre, daß die elongierten Zellen, die den Defekt umgeben, einen geringeren Gesamtumfang und damit eine geringere Schlußleistenlänge haben, als die intakten, hexagonalen Zellen des Monolayers. Mit Hilfe eines geometrischen Modells konnte aber gezeigt werden, daß die Gesamtlänge der Zellverbindungen sich nicht unterscheidet zwischen den Flächen der Zellen an einem reparierten Defekt und dem intakten Epithel (Abb. 34). Dies deutet darauf hin, daß durch den Vergleich der lokalen Leitfähigkeit von

intakten Epithelien vor dem Setzen des Schadens und 16 min danach von einem ähnlichen *Tight junction*-Typ an dem Zelldefekt auszugehen ist.

	Kontrolle	Cytochal. D	BDM	erniedrigte freie [Ca ²⁺] _a	ML-7	Y-27632	TNF-α
G^{intakt} [mS cm ⁻²]	1,38 ± 0,07	15,92 ± 4,55	3,02 ± 0,39	15,27 ± 2,74	1,66 ± 0,14	1,40 ± 0,09	8,38 ± 1,30
Median G^{intakt} [mS cm ⁻²]	1,38	25,82	3,08	25,03	1,60	0,97	9,00
1. Quartil	1,11	21,84	2,18	9,31	1,36	0,33	7,64
3. Quartil	1,58	34,29	4,28	28,03	1,88	2,00	9,50
Signifikanz		***	***	***	n.s.	n.s.	***
$\frac{g_{2min}^{Läsion} - g_{8min}^{Läsion}}{g_{2min}^{Läsion}}$	61 % ± 3 %	3% ± 2%	31% ± 3%	74% ± 5%	14% ± 3%	66% ± 4%	21% ± 4%
Median $\frac{g_{2min}^{Läsion} - g_{8min}^{Läsion}}{g_{2min}^{Läsion}}$	62 %	0,1 %	33 %	73 %	15 %	76 %	22 %
1. Quartil	55 %	0 %	23 %	69 %	8 %	66 %	14 %
3. Quartil	72 %	5 %	40 %	84 %	20 %	77 %	44 %
Signifikanz		***	***	n.s.	***	n.s.	***
n (m)	24 (23)	7 (5)	10 (6)	7 (5)	8 (8)	8 (7)	9 (9)

Tab. 6: Leitfähigkeit des intakten Epithels und Abnahme von $g^{Läsion}$ zwischen 2 und 8 min nach Läsion

Die Leitfähigkeit des intakten Epithels, G^{intakt} , wurde an intakten Epithelien entfernt von Apoptosen und Randlecks vor dem Setzen der Läsion gemessen. Die Abnahme des Lecks, $g^{Läsion}$, verursacht durch die Einzelzell-Läsion, wurde zwischen 2 und 8 min nach dem Setzen der Läsion gemessen. Folgende Kollektive wurden untersucht: Kontrolle, n = 24 an 23 Filtern; Cytochalasin D, n = 7 an 5 Filtern; 2,3-Butandion Monoxim, n = 10 an 6 Filtern, red. freies Calcium, n = 7 an 5 Filtern, ML-7, n = 8 an 8 Filtern, Y-27632, n = 8 an 7 Filtern und TNF-α, n = 9 an 6 Filtern. Es wurde sowohl der in den Darstellungen übliche Mittelwertes ± SEM, als auch der Median mit dem 1. und 3. Quartil angegeben. Diese Form der Darstellung wurde gewählt, um die Daten konsistent zu präsentieren und den U-Test anwenden zu können. (U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney mit Bonferroni Korrektur für multiples Testen: n.s., p > 0,05; ***, p < 0,002)

4.1.7 Läsionselektrodenfüllung und Restitution

Die Einzelzell-Läsion wurde routinemäßig mit 0,1 mol l⁻¹ CaCl₂-Lösung nach dem im Abschnitt 3.5.1.2 beschriebenen Verfahren gesetzt. Um ausschließen zu können, daß die Kapillarfüllung Einfluß auf die Restitution des Defektes nimmt, wurden Vergleichsmessungen mit 150 mmol l⁻¹ KCl durchgeführt. In Abb. 24 ist das Ergebnis von jeweils zwei Messungen am gleichen Zellfilter

einerseits mit CaCl_2 und andererseits mit KCl als Füllung der Läsions-
elektrode gegenübergestellt. In den Messungen nach Setzen der Läsion mit
 CaCl_2 wurde zwischen 2 und 8 min $49 \% \pm 8 \%$ (Median: 49 %; $n = 2$) des
Lecks repariert. Im Vergleich dazu mit KCl in der Läsionselektrode $37 \% \pm$
 3% (Median: 37 %; $n = 2$). Alle Messungen in dieser Arbeit wurden mit CaCl_2
durchgeführt.

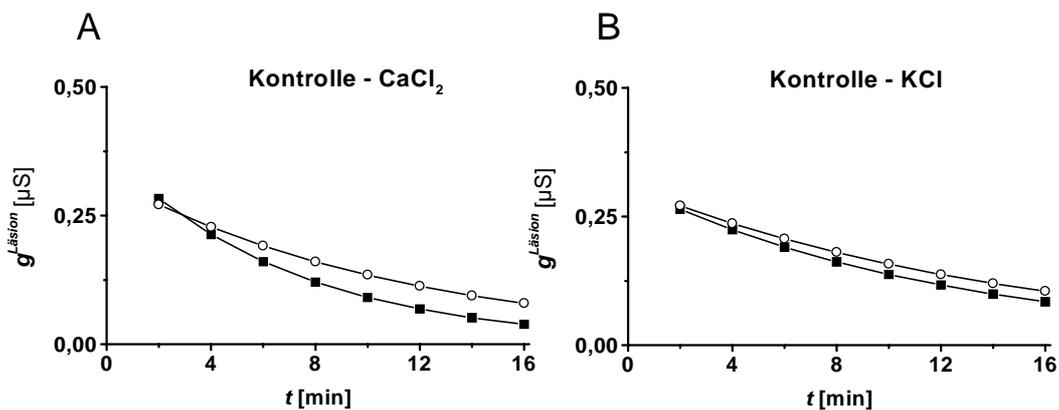


Abb. 24: Leitwert der Läsion, $g^{\text{Läsion}}$, als Funktion der Zeit einer Einzelzell-Läsion nach Setzen mit CaCl_2 oder KCl

Dargestellt ist der Zeitverlauf einer Restitution, (A) nach Setzen der Läsion mit $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ CaCl}_2$, (B) nach Setzen der Läsion mit $150 \text{ mmol l}^{-1} \text{ KCl}$ in der Läsionselektrode. Unabhängig von der Füllung der Läsionselektrode resultierte die Restitution in einem exponentiellen Abfall des Leitwertes $g^{\text{Läsion}}$. Alle Messungen dieser Arbeit wurden mit $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ CaCl}_2$ in der Läsionselektrode durchgeführt.

4.1.8 Restitution nach Blockade der Zytoskelett-Dynamik

Funktionelle Hinweise für die Beteiligung eines Aktin-abhängigen *purse string*-Mechanismus bei der Restitution von Einzelzell-Läsion wurden durch Einsatz von Inhibitoren der Zytoskelett-Dynamik gewonnen.

Die Bildung von filamentösem Aktin aus globulären Aktinmonomeren wird durch Cytochalasin D blockiert (Stevenson und Begg, 1994). Mit einer Konzentration von $2 \mu\text{mol l}^{-1}$ auf der serosalen Seite der Epithelien, wurde ein Anstieg der Leitfähigkeit von $1,80 \pm 0,02 \text{ mS cm}^{-2}$ auf $10,02 \pm 0,50 \text{ mS cm}^{-2}$ ($n = 10$) in konventionellen Ussing-Kammern gemessen. Innerhalb einer ca. 4 ½-stündigen Inkubation wurde dabei ein Plateau erreicht. Nach dem Auswaschen der Substanz mit Hilfe von Kontroll-Ringer-Lösung wurde die ursprüngliche Leitfähigkeit des Epithels erreicht (Abb. 18A).

In den Conductance scanning-Experimenten wurden die Monolayer 4 bis 4 ½ Stunden vorinkubiert und dann in den Meßstand gebracht. Hier wurde dann die Restitution des Einzelzelldefekts untersucht. Sowohl der morphologische Verschuß (verfolgt mittels intravitraler Videomikroskopie, s. Abb. 17C,D), als auch die funktionelle Abdichtung wurden durch Cytochalasin D inhibiert (Abb. 20B). Der Leitwert ($g^{Läsion}$) des Defektes, gemessen zum Zeitpunkt $t = 2$ nach Setzen des Schadens, war deutlich höher als unter Kontrollbedingungen und fiel nicht signifikant innerhalb der nächsten 16 min ab (Tab. 6).

Weiterhin wurde das Oximderivat 2,3-Butandion Monoxim, bekannt als genereller Inhibitor der Myosin-ATPasen in Muskelzellen und Nicht-Muskelzellen, eingesetzt (Herrmann et al., 1992; McKillop et al., 1994). In konventionellen Ussing-Kammern kam es durch 20 mmol l⁻¹ 2,3-Butandion Monoxim auf beiden Seiten des Epithels zu einem Anstieg der Leitfähigkeit von $1,80 \pm 0,03$ mS cm⁻² auf $3,52 \pm 0,10$ mS cm⁻² (n = 10). Auch hier wurde nach ca. 4 ½ Stunden ein Plateau erreicht. Mit nur 10 mmol l⁻¹ auf beiden Seiten des Epithels konnte ein ähnlicher, aber nicht so ausgeprägter Effekt, gemessen werden (hier nicht dargestellt). Die Leitfähigkeit (G^{Ussing}) stieg von $1,92 \pm 0,02$ mS cm⁻² auf $2,20 \pm 0,05$ mS cm⁻² an (n = 10). Dies spricht für eine geringe Bindungsaffinität der Substanz, die auch in der Literatur beschrieben ist (Herrmann et al., 1992). Bei den BDM-Versuchen kam es nach dem Auswaschen der Substanz zu einem Abfall der Leitfähigkeit auf Ausgangswerte (Abb. 18A).

Der Effekt von 2,3-Butandion Monoxim auf die Restitution von Einzelzelldefekten nach 4 – 4 ½ Stunden der Exposition mit der Substanz wurde wieder mit Hilfe von Conductance scanning untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß 4 bis 16 min nach Setzen des Schadens das Leck größer war als unter Kontrollbedingungen (Tab. 6). Sowohl der morphologische Verschuß des Defekts als auch die Abdichtung des leitenden Lecks wurde zwar nicht vollständig gehemmt, aber sie verliefen deutlich langsamer als unter Kontrollbedingungen (Abb. 17E,F; Abb. 20C; Tab. 6).

Zusätzlich wurde ein wesentlich spezifischerer Inhibitor der Aktin-Myosin-Interaktion durch die Blockade der Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK)-Aktivität mit ML-7 eingesetzt. Nach einer Präinkubationsphase von vier Stunden mit 100 µmol l⁻¹ ML-7 auf beiden Seiten des Epithels kam es zu einem Anstieg der Leitfähigkeit, gemessen in konventionellen Ussing-Kammern, von $2,71 \pm 0,13$ mS cm⁻² auf $6,27 \pm 0,63$ mS cm⁻² (n = 7) (Abb.

18B). Der Anstieg von G^{Ussing} war reversibel nach dem Auswaschen von ML-7 mit regulärer Ringer-Lösung (Abb. 18B). Mit Hilfe von Conductance scanning konnte 8 bis 16 min nach Setzen der Läsion ein größeres Signal als in der Kontrollgruppe gemessen werden. Die Restitution des Defektes war verzögert (Abb. 23B, Tab. 6)

Der Rho-assoziierte Proteinkinase-Inhibitor Y-27632 ($100 \mu\text{mol l}^{-1}$ auf beiden Seiten des Epithels) verursachte einen Anstieg der epithelialen Leitfähigkeit, gemessen in konventionellen Ussing-Kammern, von $2,89 \pm 0,13 \text{ mS cm}^{-2}$ auf $3,68 \pm 0,16 \text{ mS cm}^{-2}$ ($n = 6$) nach einer Inkubationszeit von vier Stunden (Abb. 18B). Der Anstieg von G^{Ussing} war in einem Zeitfenster von 19 Stunden durch Auswaschen mit regulärer Ringer-Lösung nicht reversibel (Abb. 18B). Die Abdichtung des Defektes, gemessen mittels Conductance scanning, war nicht verzögert nach Inhibition der Rho-assoziierten Proteinkinase (Abb. 23C, Tab. 6).

4.1.9 Effekt von lecken interzellulären Verbindungen

Der Zusammenhalt von benachbarten epithelialen Zellen und die Abdichtung des parazellulären Weges sind calciumabhängig. Calcium bindet extrazellulär an die Cadherine in den *Adherens junctions* (Collares-Buzato et al., 1994). In den Experimenten wurde die extrazelluläre freie Calciumkonzentration in der serosalen Badlösung von $1,2 \text{ mmol l}^{-1}$ auf $0,25 \mu\text{mol l}^{-1}$ reduziert. Dies führte zu einem Anstieg der epithelialen Leitfähigkeit, gemessen in konventionellen Ussing-Kammern, von $1,50 \pm 0,01 \text{ mS cm}^{-2}$ auf $28,60 \pm 0,20 \text{ mS cm}^{-2}$ ($n = 8$) innerhalb von 30 min. Der Anstieg der Leitfähigkeit war reversibel, wenn die reduzierte freie Calciumkonzentration innerhalb von einer Stunde gegen Kontroll-Ringer-Lösung ausgetauscht wurde (Abb. 18A).

Mit Hilfe der Conductance scanning-Technik wurde die Restitution des Einzelzell-Defektes zwischen 10 und 30 min nach Perfusion mit erniedrigter freier Ca^{2+} -Ringer-Lösung untersucht. Der dabei gemessene Wert der Leitfähigkeit des intakten Epithels ($15,27 \pm 2,74 \text{ mS cm}^{-2}$; Median: $25,03 \text{ mS cm}^{-2}$, $n = 7$) zeigte eine funktionelle Barriere durch *Tight junctions* hinsichtlich des parazellulären Weges, auch wenn dieser weniger dicht als unter Kontrollbedingungen war. Der Leitwert des Lecks, gemessen 2 min nach dem Setzen, war höher als unter Kontrollbedingungen (Tab. 6). Dies läßt sich wahrscheinlich darauf zurückführen, daß der zelluläre Detritus in der Läsion nach der Beeinflussung der interzellulären Verbindungen durch

Calciumdepletion weniger adhärenz war und sich somit schneller aus dem Defekt löste. Trotz dieser Beobachtung war die zeitliche Entwicklung der Restitution nicht signifikant verschieden von der Restitution unter Kontrollbedingungen (Abb. 20D, Tab. 6). Morphologisch bildete sich unter erniedrigter freier Calciumkonzentration ebenso wie unter Kontrollbedingungen ein vergleichbares, rosettenförmiges Bild des Einzelzelldefektes aus (Abb. 17G,H).

4.1.10 Einfluß von TNF- α auf die Restitution

Wie bereits in Kapitel 3.6.6 beschrieben wurden die Monolayer, die hinsichtlich des TNF- α -Effekts auf die Einzelzell-Läsion untersucht werden sollten, von der serosalen Seite mit dem Zytokin für ca. 7-8 Stunden vorinkubiert. Die während der Inkubation zunehmende Leitfähigkeit entsprach der, die aus vorherigen Arbeiten bekannt ist (Bendfeldt, 2000). Nach der Inkubation wurden die Filter für die Untersuchung der Restitution eines Einzelzelldefektes in den Conductance scanning-Meßstand gebracht. Der Leitwert des Lecks war in der Zeit zwischen 2 und 16 min nach Setzen des Schadens größer als unter Kontrollbedingungen (Tab. 6). Es konnte gezeigt werden, daß die Restitution des Defekts verlangsamt unter dem Einfluß des Zytokins TNF- α ablief (Tab. 6, Abb. 21, Abb. 26). Zu einer vollständigen Hemmung der Restitution kam es nicht.

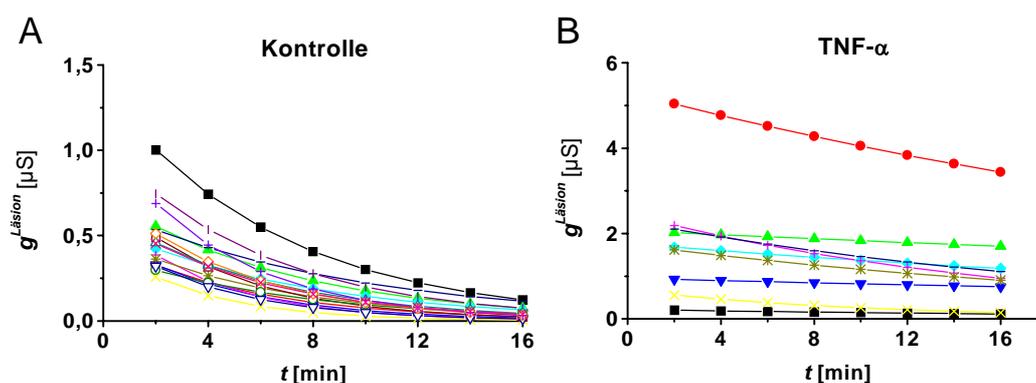


Abb. 25: Leitwert der Läsion, $g^{\text{Läsion}}$, als Funktion der Zeit nach Einzelzell-Läsion

Dargestellt sind die Einzelmessungen im Zeitverlauf der Restitution in HT-29/B6-Zellen der 28. bis 31. Passage, (A) unter Kontrollbedingungen ($n = 17$) (gleiche Messungen wie in Abb. 19 und Abb. 20), (B) nach Inkubation mit TNF- α ($n = 9$). In Abb. 26 ist der Median der hier gezeigten Einzelmessungen zur besseren Übersicht dargestellt.

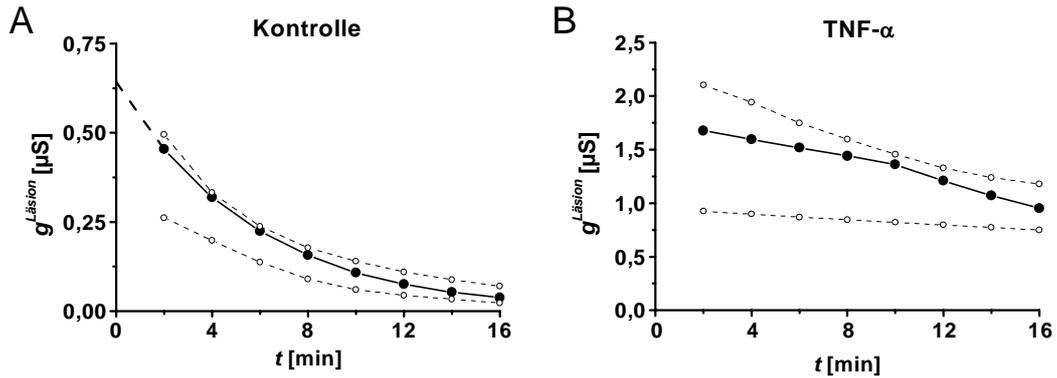


Abb. 26: Leitwert der Läsion, $g^{Läsion}$, als Funktion der Zeit nach TNF- α -Inkubation

Dargestellt ist der Zeitverlauf der Restitution, (A) unter Kontrollbedingungen (die Kontrollmessungen sind gleich mit denen aus Abb. 19 und Abb. 20), (B) nach Inkubation mit TNF- α ($n = 9$). Die Restitution des Lecks (angegeben durch $g^{Läsion}$) wurde durch TNF- α gehemmt. Dargestellt ist der Median (schwarze Kreise) mit dem 1. und 3. Quartil (offene Kreise).

4.1.11 Einfluß von EGF auf die epitheliale Restitution

Nach einer Inkubationsdauer von 24 h mit EGF wurden die Monolayer in den Conductance scanning Versuchsstand gebracht und nach dem bereits erwähnten Verfahren eine Einzelzell-Läsion gesetzt. Parallel zu den EGF-inkubierten Filtern wurden Kontrollfilter untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 28 zusammengefaßt dargestellt.

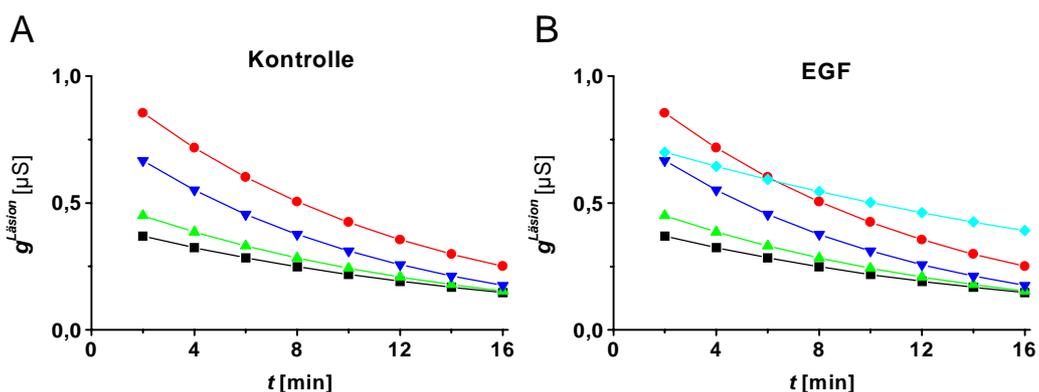


Abb. 27: Leitwert der Läsion, $g^{Läsion}$, als Funktion der Zeit nach Einzelzell-Läsion

Dargestellt sind die Einzelmessungen im Zeitverlauf der Restitution in HT-29/B6 Zellen der 32. Passage, (A) unter Kontrollbedingungen ($n = 4$), (B) nach Inkubation mit EGF ($n = 5$). In Abb. 28 ist der Median der hier gezeigten Einzelmessungen zur besseren Übersicht dargestellt.

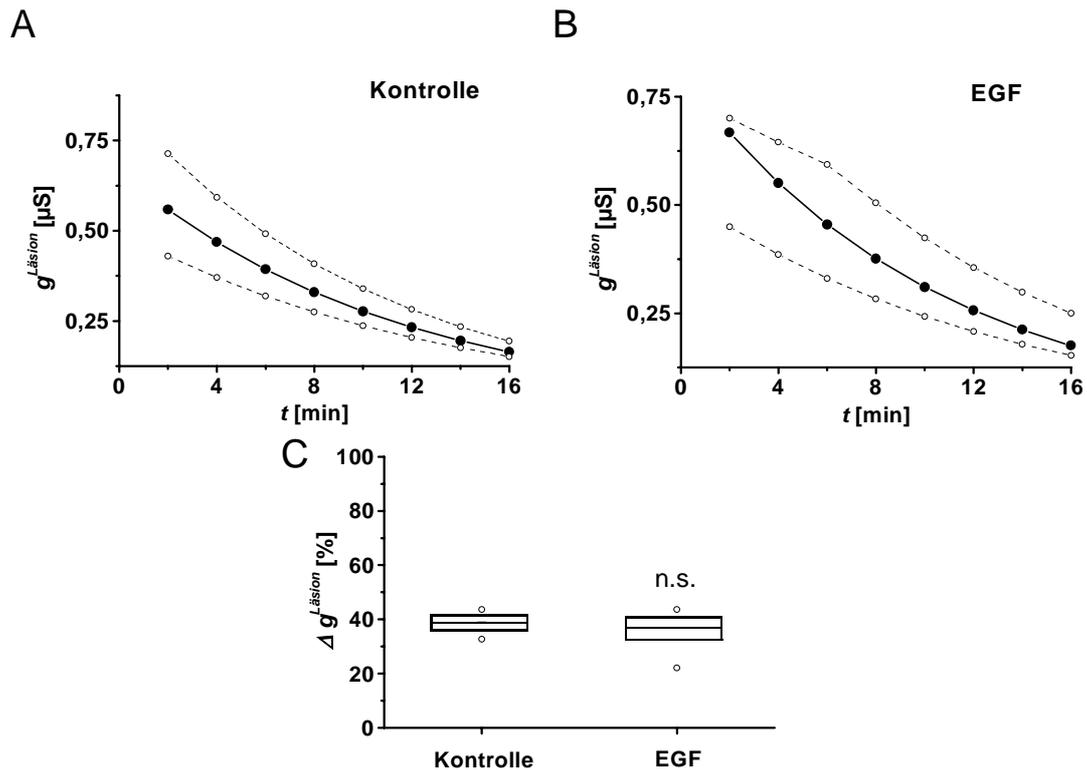


Abb. 28: Einfluß von EGF auf die Restitution der Einzelzell-Läsion

Dargestellt ist der Zeitverlauf der funktionellen Restitution (Abdichtung des Lecks), (A) unter Kontrollmessungen ($n = 4$), (B) Messungen nach EGF-Inkubation ($n = 5$). Dargestellt ist jeweils der Median (schwarze Kreise) mit dem 1. und 3. Quartil (offene Kreise). (C) Zusammenfassung der Ergebnisse (dargestellt als $\Delta g^{Läsion}$: prozentuale Änderung des Leitwerts von der 2. bis zur 8 min dar). Die horizontalen Linien der Boxen bezeichnen von unten nach oben das 1. Quartil, den Median und das 3. Quartil. Minimum und Maximum sind durch die offenen Kreise dargestellt. Nach EGF-Vorinkubation war die Restitution nicht signifikant verschieden zu den Kontrollmessungen. (U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney mit Bonferroni Korrektur für multiples Testen: n.s., $p > 0,05$)

Wie in Abb. 27 und Abb. 28 gezeigt wird, hatte EGF keinen Effekt auf die Restitution einer Einzelzell-Läsion.

4.2 natives Mauskolon

4.2.1 Restitution einer Einzelzell-Läsion

Nachdem die distalen Kolonabschnitte der Maus wie im Abschnitt 3.6.7 beschrieben in der Ussing-Kammer mit den jeweiligen Zytokinen (TNF- α oder TNF- α und IFN- γ) bzw. in Kontroll-Elektrolytlösung für 17 Stunden inkubiert waren, wurden die Gewebe in dem Container in den Conductance scanning-

Meßstand verbracht. Es wurde dabei der Widerstand in den Ussing-Kammern zu Beginn der Inkubation mit dem nach 17 Stunden verglichen. Für die Conductance scanning-Experimente wurden nur die Gewebe weiter genutzt, die nach Ablauf der Inkubation einen vergleichbar hohen Widerstand, als Maß für die Viabilität des Gewebes, wie zuvor hatten. Im Conductance scanning-Meßstand konnte mit Hilfe der Videomikroskopie an dem lebenden Gewebe zunächst in geringer Vergrößerung (20 x) die Morphologie des Gewebes beurteilt werden (Abb. 29A). Die mukosale Seite des Kolons zeigte dabei die für Kolongewebe typischen Kryptenwälle und Kryptenöffnungen, die sich zwischen den oberflächlichen Epithelbereichen vereinzelt und z.T. in Gruppen befanden (Abb. 29A). Bei maximaler Vergrößerung (40 x) (Abb. 29B) war es möglich, einzelne Zellen zu differenzieren. Nachdem ein elektrisch homogenes, von erhöhter Kryptenleitfähigkeit unbeeinflusstes Areal (Köckerling und Fromm, 1993) im Oberflächenepithel lokalisiert worden war, wurde nach dem gleichen Prinzip wie in Abschnitt 3.6.4 beschrieben, eine Einzelzell-Läsion gesetzt. Schematisch ist die Position der Meßelektroden am nativen Kolon in Abb. 11 gezeigt.

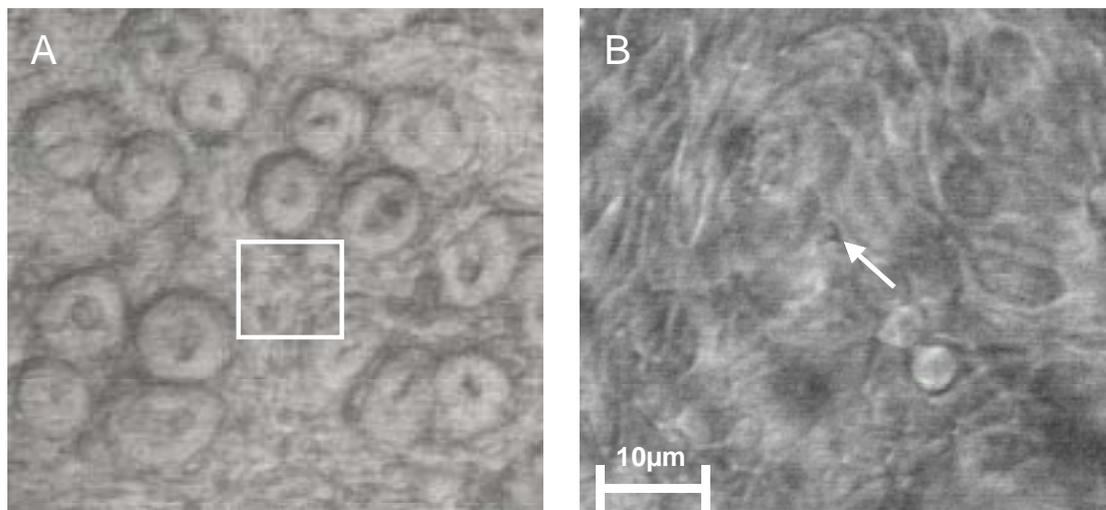


Abb. 29: Videomikroskopie des nativen Kolons im Conductance scanning-Meßstand

Beispiel des morphologischen Defekts nach Setzen einer Einzelzell-Läsion unter Kontrollbedingungen wie er mittels intravitale Videomikroskopie in der perfundierten, miniaturisierten Ussing-Kammer des Conductance scanning-meßstandes gezeigt wird. (A) Oberflächenepithel und Krypten des nativen Mauskolons von der mukosalen Seite betrachtet, (B) die Vergrößerung des Ausschnitts aus A (weißer Rahmen) zeigt eine Restitution der Einzelzell-Läsion (Pfeil, 5 min nach Setzen der Läsion).

Aufgrund des beim nativen Gewebe im Vergleich zu HT-29/B6 sehr raschen Restitutionsprozesses konnte keine zeitliche Entwicklung der Morphologie wie bei HT-29/B6-Monolayern (Abschnitt 4.1) dokumentiert werden. In Abb. 29B ist mit dem Pfeil eine Läsion nach 5 min exemplarisch gezeigt.

Die untersuchten Gewebe wurden anschließend routinemäßig für HE-Färbungen histologisch aufgearbeitet (Abschnitt 3.8). Die histologische Untersuchung wurde durchgeführt, um sicherzustellen, daß alle Gewebe "gestrippt" bis auf Reste der Lamina muscularis mucosae untersucht wurden und somit gleich behandelt wurden. Weiterhin wurde der potentielle Einfluß der Zytokine auf epitheliale und subepitheliale Abschnitte des Gewebes während der Inkubation morphologisch untersucht. In Abb. 30A-D sind die einzelnen HE-gefärbten Präparate mit den Zytokinen und Zytokin-kombinationen im Vergleich zur Kontrolle nach 17 Stunden zusammengefaßt dargestellt. Neben TNF- α allein (Abb. 30B) und TNF- α in Kombination mit IFN- γ (Abb. 30D) ist hier auch IFN- γ allein (Abb. 30C) dargestellt. Im Vergleich zur Morphologie unter Kontrollbedingungen (Abb. 30A) war kein Unterschied in den einzelnen Konditionen feststellbar.

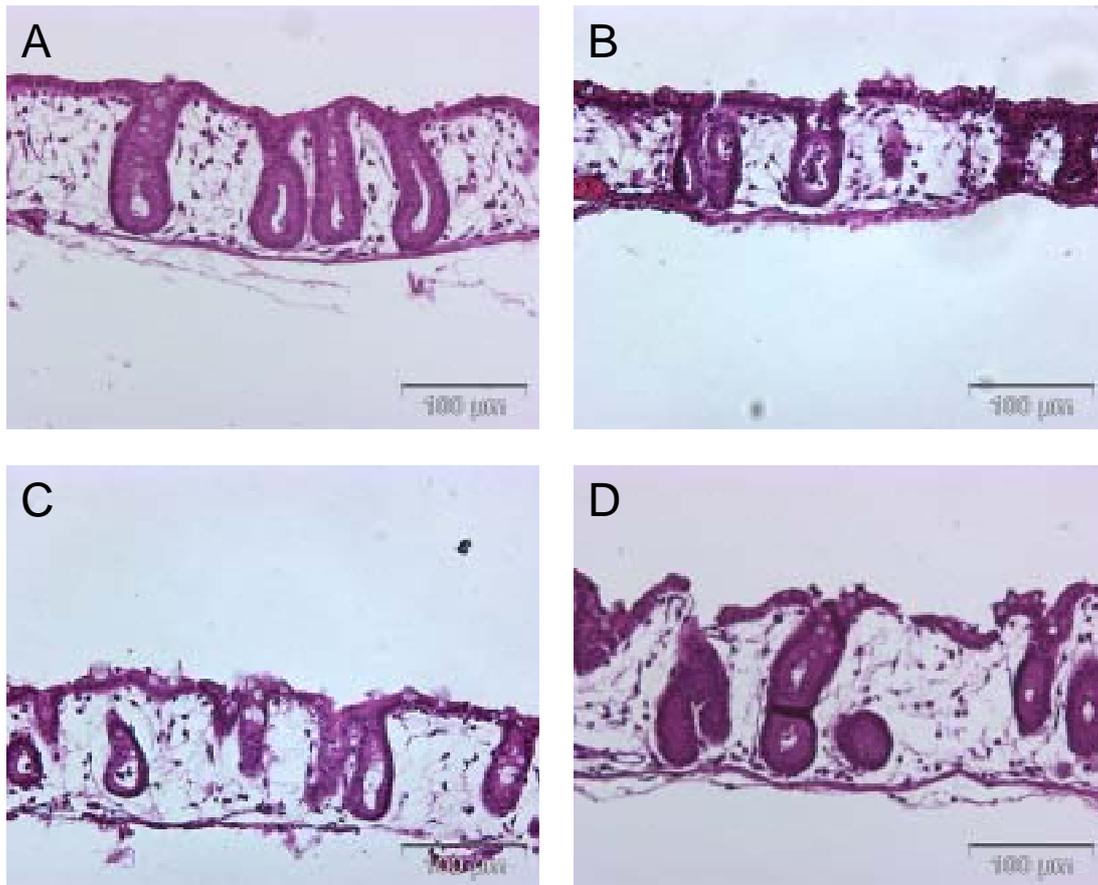


Abb. 30: HE-Färbung von Querschnitten der untersuchten Kolonabschnitte

Das Gewebe wurde routinemäßig mittels HE-Färbung nach der Inkubation von 17 Stunden in konventionellen Ussing-Kammern analysiert. Alle Gewebeabschnitte wurden dabei gleich behandelt. Bei der Präparation wurden die äußeren Schichten "gestrippt", so daß nur noch Reste der Lamina muscularis mucosae an dem Epithel und der Lamina propria mucosae verblieben (Schema s. Abb. 3). (A) zeigt Gewebe unter Kontrollbedingungen, (B) nach TNF- α Inkubation, (C) nach IFN- γ Inkubation und (D) nach TNF- α und IFN- γ Inkubation. Nach der Inkubation des Kolons mit den Zytokinen war keine auffällige Veränderung in der Morphologie feststellbar.

4.2.2 Funktionelle Charakterisierung der Restitution

Mit Hilfe von Conductance scanning wurde eine epitheliale Leitfähigkeit (G^{intakt}) von $4,10 \pm 0,33 \text{ mS cm}^{-2}$ (Median: $4,22 \text{ mS cm}^{-2}$) ($n = 13$), nach einer Inkubationszeit von 17 Stunden im Conductance scanning-Meßstand gemessen (Tab. 7). Die räumliche Verteilung der epithelialen Leitfähigkeit wurde dabei grundsätzlich mit einem im Abstand von $25 \mu\text{m}$ über dem Epithel positionierten Elektrodenpaar (Leitwertsensor in Abb. 11) am Oberflächenepithel ohne Schäden und ohne Einfluß von Kryptenleitfähigkeit gemessen. Nach Inkubation mit TNF- α über 17 Stunden änderte sich die Leitfähigkeit des

Epithels nicht wesentlich (Tab. 7). In Kombination mit IFN- γ nahm die Leitfähigkeit gering zu auf $5,99 \pm 0,83 \text{ mS cm}^{-2}$ (Median: $4,89 \text{ mS cm}^{-2}$) $n = 10$), erwies sich aber als nicht signifikant verschieden von der Kontrollleitfähigkeit im intakten Bereich (Tab. 7).

	G^{intakt} [mS cm ⁻²]	$g^{Läsion}$ [μS]			$\frac{Läsion_{g_{1,5min}} - Läsion_{g_{2,5min}}}{Läsion_{g_{1,5min}}}$	n (m)
		t = 1,5 min	t = 2,5 min	t = 3 min		
Kontrolle	4,10 ± 0,33	8,8 ± 1,5	0,9 ± 0,3	0,2 ± 0,1	92 % ± 1 %	
1. Quartil	3,04	4,94	0,22	0,06	91	
Median	4,22	7,84	0,73	0,13	92	
3. Quartil	4,82	9,25	0,91	0,28	98	
17 h TNF- α	4,02 ± 0,74 n.s.	10,6 ± 3,1 n.s.	2,3 ± 1,9 n.s.	0,6 ± 0,6 n.s.	90 % ± 7 % n.s.	13 (4)
1. Quartil	2,46	4,12	0,07	-0,01	93	
Median	2,77	7,75	0,47	0,10	95	
3. Quartil	5,97	15,79	1,02	0,11	98	
17 h TNF- α plus IFN- γ	5,99 ± 0,83 n.s.	11,7 ± 2,1 n.s.	3,0 ± 0,3 **	1,6 ± 0,2 ***	72 % ± 3 % ***	8 (4)
1. Quartil	4,03	8,37	2,03	1,28	67	
Median	4,89	9,83	2,96	1,56	74	
3. Quartil	8,48	11,70	3,85	1,94	76	
						10 (4)

Tab. 7: Leitfähigkeit des nativen intakten Kolons und Abnahme von $g^{Läsion}$ zwischen 1.5 und 3 min nach Läsion

Die Leitfähigkeit des intakten nativen Kolon, G^{intakt} , wurde an intakten Oberflächenepithelien entfernt von Apoptosen, Randlecks und erhöhter Kryptenleitfähigkeit vor dem Setzen der Läsion gemessen. Die Abnahme des Lecks, $g^{Läsion}$, verursacht durch die Einzelzell-Läsion, wurde zwischen 1,5 und 3 min nach dem Setzen der Läsion gemessen. Folgende Kollektive wurden untersucht: Kontrolle, $n = 13$ Einzelmessungen an 4 Kolonabschnitten; TNF- α , $n = 8$ Einzelmessungen an 4 Kolonabschnitten; TNF- α plus IFN- γ , $n = 10$ Einzelmessungen an 4 Kolonabschnitten. Es wurde sowohl der in den Darstellungen übliche Mittelwertes \pm SEM, als auch der Median mit dem 1. und 3. Quartil angegeben. Diese Form der Darstellung wurde gewählt, um die Daten konsistent zu präsentieren und den U-Test anwenden zu können. (U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney mit Bonferroni Korrektur für multiples Testen: n.s., $p > 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,002$)

Im Vergleich zu den Messungen an HT-29/B6-Monolayern wurde der Defekt am nativen Gewebe etwa 10-fach schneller repariert. Somit war es nicht möglich, die Leitfähigkeit des Einzelzelldefekts durch Scannen entlang der x-Achse räumlich aufzulösen und durch anschließende Integration der Meßwerte den Leitwert zu berechnen. Der Leitwertsensor wurde daher möglichst rasch (innerhalb von 1,5 min nach Setzen der Läsion) über dem Schaden positioniert und verweilte dort, bis sich die veränderte Leitfähigkeit wieder auf dem Ausgangswert befand. Der Abstand von 25 μm wurde dabei strikt eingehalten und während der Messung kontrolliert, damit ein Vergleich der Meßwerte mit der Verteilungsfunktion der HT-29/B6-Messungen möglich war. Der Leitwert des Defekts, $g^{\text{Läsion}}$, konnte somit über die Verteilungsfunktion aus den HT-29/B6-Messungen ermittelt werden. Die Größe des Defektes, $g^{\text{Läsion}}$, nahm auch beim nativen Gewebe exponentiell mit der Zeit, t (Abb. 32A) ab. Von Beginn der Messung (1,5 min nach Setzen des Schadens) bis 2,5 min nach Schadenssetzung, nahm der Leitwert um 92% (von $8,8 \pm 1,5$ auf $0,9 \pm 0,3 \mu\text{S}$; Median: 92% von 7,48 auf 0,73 μS , $n = 13$) ab (Tab. 7). Mit zunehmender Restitutionszeit ging der Leitwert ($g^{\text{Läsion}}$) zurück auf Null (Abb. 32A) und die Restitution des Epithels führte zum Erreichen einer Leitfähigkeit, die der des ungeschädigten Epithels annähernd entsprach. Die neu gebildeten *Tight junctions* weisen demnach auch im nativen Gewebe ähnliche Barriereigenschaften auf, wie die in ungestörten Epithelbereichen anzutreffenden *Tight junctions*.

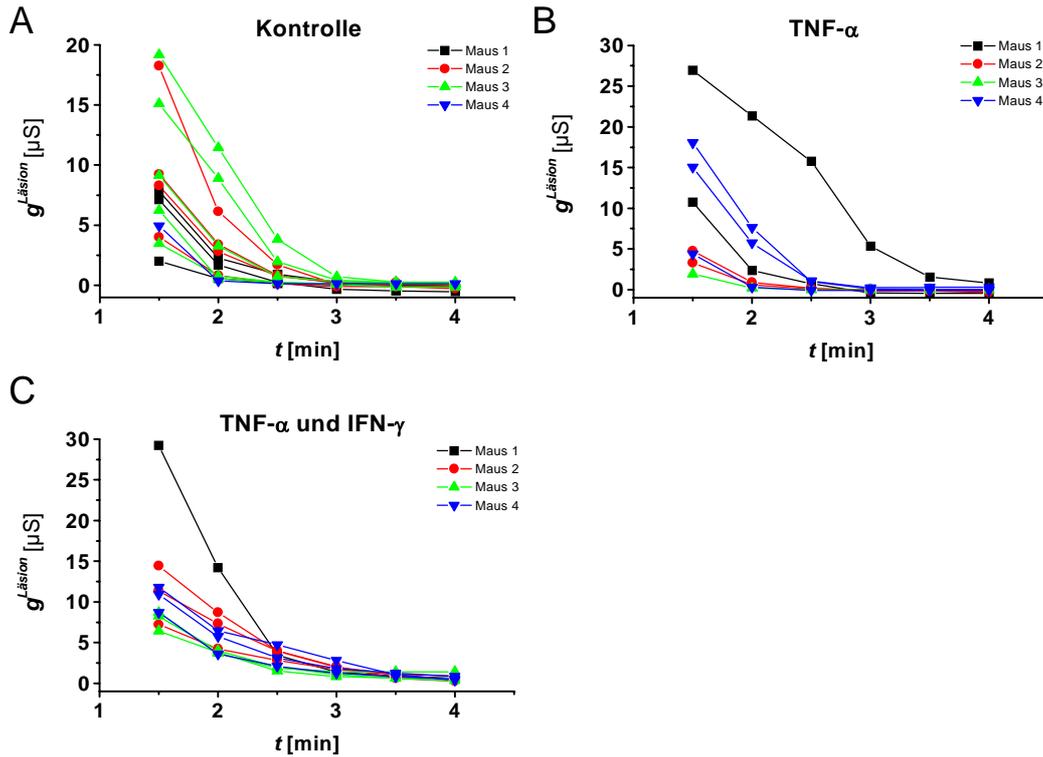


Abb. 31: Leitwert der Läsion, $g^{Läsion}$, als Funktion der Zeit einer Einzelzell-Läsion im Oberflächenepithel von nativem Kolon der Maus

Der Zeitverlauf der Einzelmessungen während der Restitution, (A) unter Kontrollbedingungen ($n = 13$), (B) nach Inkubation mit $TNF-\alpha$ ($n = 8$), (C) nach Inkubation mit $TNF-\alpha$ und $IFN-\gamma$ ($n = 10$) ist dargestellt. Die jeweiligen Messungen sind den jeweiligen Versuchstieren farblich zugeordnet (Maus 1 bis 4). In Abb. 32 ist der Median der hier gezeigten Einzelmessungen zur besseren Übersicht dargestellt.

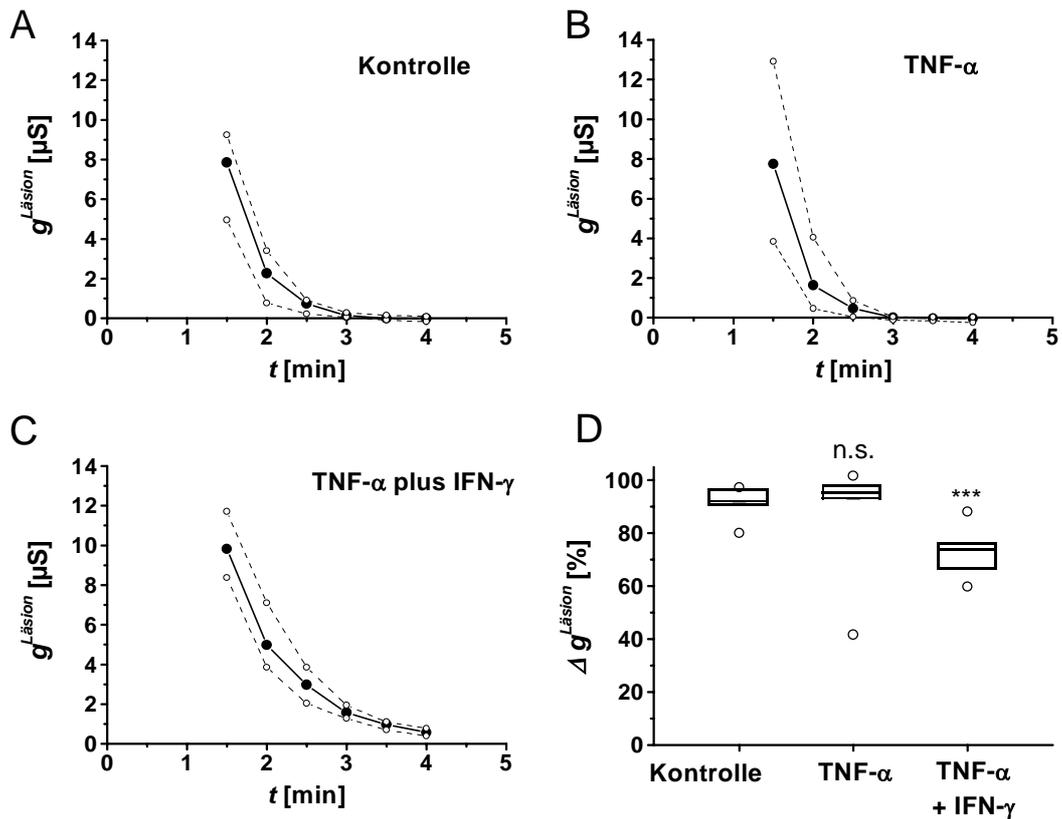


Abb. 32: Leitwert der Läsion, $g^{Läsion}$, als Funktion der Zeit einer Einzelzell-Läsion im Oberflächenepithel von nativem Kolon der Maus

Dargestellt ist der Zeitverlauf der funktionellen Restitution (Abdichtung des Lecks), (A) unter Kontrollbedingungen ($n = 13$), (B) nach Inkubation mit $TNF-\alpha$ ($n = 8$), (C) nach Inkubation mit $TNF-\alpha$ plus $IFN-\gamma$ ($n = 10$). Die Restitution verläuft deutlich schneller als in der Zelllinie HT-29/B6 (Abb. 20 und Abb. 23). Dargestellt ist der Median (schwarze Kreise) mit dem 1. und 3. Quartil (offene Kreise).

(D) Zusammenfassung der Ergebnisse (dargestellt durch $\Delta g^{Läsion} =$ relative Änderung von $g^{Läsion}$ von der ersten möglichen Messung nach 1,5 min bis zu 2,5 min). Die horizontalen Linien in den Boxen beschreiben von unten nach oben das 1. Quartil, den Median und das 3. Quartil. Minimum und Maximum sind durch offene Kreise dargestellt. Die Restitution des Defektes war nach Inkubation mit $TNF-\alpha$ plus $IFN-\gamma$, aber nicht nach Inkubation mit $TNF-\alpha$ allein, verlangsamt. (U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney mit Bonferroni Korrektur für multiples Testen: n.s., $p > 0,05$; ***, $p < 0,002$)

Nachdem das Kolon mit $TNF-\alpha$ vorinkubiert war, kam es bei der Restitution des artifiziell gesetzten Defektes zu keiner zeitlichen Veränderung innerhalb der ersten Minute nach Setzen des Schadens (Tab. 7 und Abb. 32B). Wie in Abb. 32D gezeigt wird, ist die Registrierung einer Restitution nach $TNF-\alpha$ -

Inkubation deutlich niedriger als die anderen gemessenen Werte. Der Grund dafür ist nicht eindeutig feststellbar. Da wir mit einem nicht-parametrischen Test gearbeitet haben, hatte dieser Meßwert keinen Einfluß auf die Interpretation der Daten.

Wurden die Gewebe mit TNF- α und IFN- γ vorinkubiert, war die Restitutionszeit signifikant höher als unter Kontrollbedingungen (Tab. 7 und Abb. 32D). Nur 72 % \pm 3 % des Defektes wurden innerhalb der ersten Minute nach Setzen des Schadens repariert (Tab. 7, Abb. 32D).