

## 5 Diskussion

Epithelien bilden eine Barriere, die nach einem Defekt rasch repariert wird. Diese schnelle Reparatur von Defekten ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion, wie es z.B. im Kolon gezeigt wurde (Wilson und Gibson, 1997). Für größere Läsionen ist bekannt, daß dadurch in der mukosalen Oberfläche ein Leck eröffnet wird, das es potentiell toxischen Substanzen ermöglicht, einzudringen. Außerdem besteht die Gefahr, daß durch den Eintritt von Mikroorganismen in die Submukosa eine bakterielle Infektion verursacht wird, die sich dann zu einem Entzündungsgeschehen entwickeln kann. Im Unterschied zu größeren Defekten gibt es bis heute keine Untersuchung zur funktionellen Bedeutung von kleinen Defekten im Gastrointestinaltrakt. Im Rahmen dieser Arbeit werden anhand einer artifiziell gesetzten Läsion die Zeitachse der Restitution, sowie die Mechanismen, die diesen Prozeß steuern und letztendlich zu einer erneuten Abdichtung führen, untersucht. Im Zellmodell HT-29/B6 und vergleichend dazu im nativen Kolon der Maus ist es hiermit erstmalig gelungen, das Leck einer Einzelzell-Läsion zu quantifizieren.

### 5.1 Verschuß und Abdichtung des Lecks an HT-29/B6

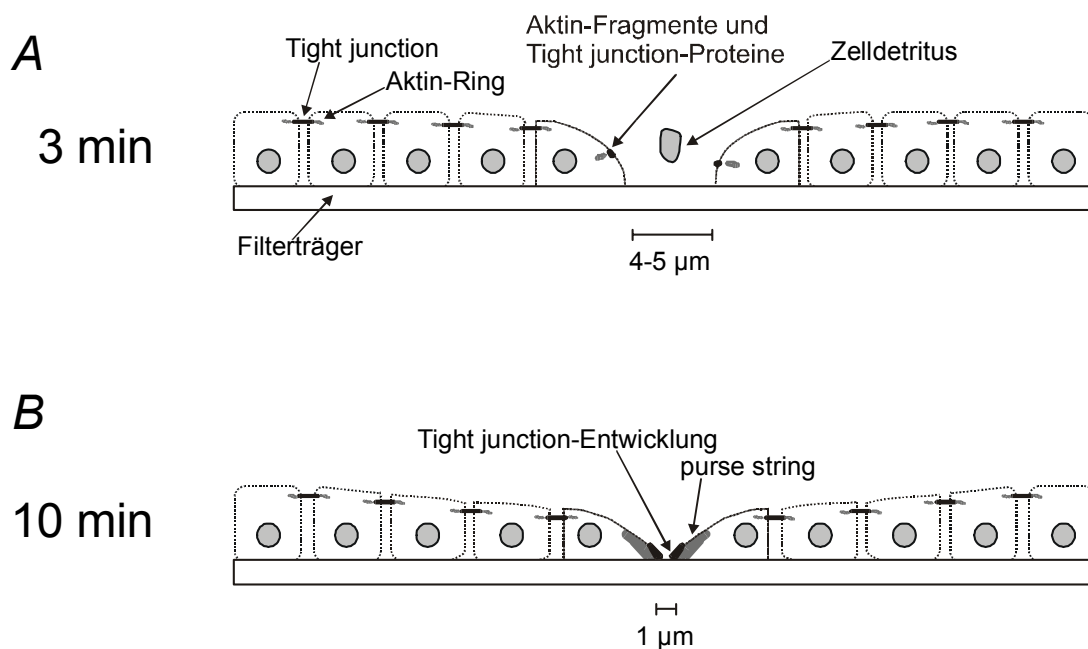
Das Zellmodell HT-29/B6 unterscheidet sich zwar von nativen Kolonkryptenzellen, ermöglicht aber die Untersuchung von epithelialen Reparaturprozessen ohne Beeinflussung durch nicht-epitheliale Strukturen. Sie sind an *in vitro*-Bedingung angepaßt und daher für die bei den elektrophysiologischen Untersuchungen auftretenden langen Meßzeiträume geeignet. Außerdem handelt es sich bei dieser transformierten Zelllinie um ein gut charakterisiertes Modell dessen funktionelle Eigenschaften, wie z.B. Mukus- und Chloridsekretion, gut untersucht sind und denen von Kryptenzellen entsprechen (Kreusel et al., 1991). Hinsichtlich der *Tight junctions* (Schmitz et al., 1999), konnte gezeigt werden, daß der parazelluläre Weg nur ein Fünftel der epithelialen Leitfähigkeit ausmacht (Gitter et al., 2000b). Dies beweist die effektive Abdichtung des parazellulären Weges durch *Tight junctions*.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Restitution von Einzelzelldefekten in einem intestinalen Epithel innerhalb weniger Minuten abläuft und demnach deutlich schneller ist, als bei größeren Defekten die meist Stunden bis zu Tagen benötigen (Scheppach et al., 1996; Lotz et al., 2000). Darüber hinaus fand die Wiederherstellung der morphologischen Integrität gleichzeitig mit der funktionellen Abdichtung statt. Für die Restitution

von größeren oberflächlichen Defekten wird diese Korrelation der Ereignisse kontrovers diskutiert. In humaner Kolonmukosa oder im Kaninchenkolon flachen sich die Zellen ab, und die Formation von sog. Lamellipodien wurde in humanem Gewebe 15 und beim Kaninchen 30 Minuten nach Setzen des Schadens beobachtet. Nach einer Stunde waren allerdings noch 61 % der Mukosa beim Kaninchen, beim humanen Gewebe nach zwei Stunden noch 86 % defekt. Die morphologische Restitution verlief somit deutlich schneller als die Wiederherstellung der transmuralen Potentialdifferenz, die sich innerhalb von fünf Stunden nicht erholte (Feil et al., 1989). In einem anderen Modell, in dem durch Migration von polymorphkernigen Leukozyten epitheliale Läsionen verursacht wurden, konnte gezeigt werden, daß die Restitution dieser Wunden in zwei Schritten verläuft (Nusrat et al., 1997). Die größeren Defekte ( $> 30 \mu\text{m}$ ) wurden dabei durch Abflachen der Zellen und Ausbildung von Lamellipodien geschlossen, ab einer Größe von  $< 30 \mu\text{m}$  durch einen *purse string*-Mechanismus. Insgesamt wurde die epitheliale Barriere in 12 - 20 Stunden wieder aufgebaut. In anderen Arbeiten hingegen konnte gezeigt werden, daß die Schädigung der Ileummukosa mit dem Detergenz Triton X-100 zu einer "schnellen" (60 min) morphologischen Restitution parallel zu einer Wiederherstellung der epithelialen Barrierefunktion führte (Moore et al., 1989).

## 5.2 Beteiligung des *purse string*-Mechanismus

In den von mir untersuchten intakten HT-29/B6-Epithelien war ein apikal lokalisierter Aktin-Ring in allen Zellen zu beobachten (Abb. 33A). Es fehlte allerdings eine ausgeprägte Aktinansammlung an den basalen Enden der Zellen, die in anderen Zellen gefunden wurde (Stevenson und Begg, 1994). Die Restitution lief nach einem bestimmten, im folgenden beschriebenen Muster, ab: Nach dem Verlust der einzelnen Zelle aus dem Epithel, flachten sich die basalen Enden der Nachbarzellen zunächst ab, und Aktinfragmente waren in der Nähe der Zellmembranen, die dem Defekt benachbart waren, nachzuweisen (Abb. 33A). Bis zu diesem Zeitpunkt schien die Bewegung der Zellen in den Defekt nur durch den Verlust der Nachbarzellen bedingt zu sein, denn eine Hemmung des Aktin-Myosin-Motors mittels der Pharmaka (Cytochalasin D, 2,3-Butandion Monoxim und ML-7) war nicht nachweisbar. Im weiteren Verlauf formte sich dann ein kontinuierlich um den Defekt verlaufendes Aktinband (Abb. 33B). Dieser sichtbare Verschuß des Defektes und die funktionelle Abdichtung, die mit Hilfe von Conductance scanning gemessen wurde, war mit Blockern der Zytoskelettdynamik (s.o.) hemmbar.



**Abb. 33: Schematisches Modell der Restitution von Einzelzell-Defekten im Epithel**

In einem intakten Epithel befindet sich auf der intrazellulären Seite entlang der apikalen Verbindungen zu den Nachbarzellen ein Aktin-Ring, der in Verbindung zur *Tight junction* steht. Zusammen mit Myosin II scheint dieser Aktin-Ring für die Kontrolle der *Tight junction* und somit für die parazelluläre Leitfähigkeit bedeutsam zu sein (Turner, 2000). Nach dem Verlust einer einzelnen Zelle, fehlt den benachbarten Zellen die Stützung durch diese Zelle (A). Dadurch flachen sich diese Zellen ab und verlängern ihre basalen Membrananteile in den Defekt hinein. Ein ringsherum verlaufender Aktin-Myosin-Ring (*purse string*) zieht im weiteren Verlauf die benachbarten Zellen weiter in den Defekt und bildet die Grundlage für die *Tight junction*-Neubildung, um den Defekt abzudichten (B). Die Neubildung verläuft sehr schnell und ist mit einem Reißverschlußmechanismus zwischen des Ausläufern der benachbarten Zellen vergleichbar (s. auch Abb. 34).

Hinsichtlich der Blockade von Zytoskelettelementen wurde Cytochalasin D als Pilztoxin, das die Zellmembranen permeiert und dann an die freien Enden des Aktinfilaments bindet, eingesetzt. Durch diese Bindung wird die Assoziation von kleineren Untereinheiten an dem jeweiligen Ende inhibiert und somit die Organisation des Aktinzytoskeletts verhindert (Cooper, 1987). Es ist außerdem bekannt, daß durch Cytochalasin die Migration von Epithelzellen reversibel gehemmt wird (Gipson et al., 1982) was somit die Restitution größerer Epitheldefekte im nativen intestinalen Epithel blockiert (Albers et al., 1996). In meinen Experimenten war keine Migration der Zellen zu

beobachten. Trotzdem wurde durch eine 2  $\mu$ M Cytochalasin D-Lösung die Restitution einer Einzelzell-Läsion im Zellmodell durch die Blockade des morphologischen Verschlusses fast vollständig inhibiert.

Die Restitution wurde durch 2,3-Butandion Monoxim, einem nicht-kompetitiven Inhibitor der Myosin-ATPasen, gebremst. Man vermutet, daß 2,3-Butandion Monoxim Myosin im Zustand vor der Kraftentfaltung (Aktin-Myosin-ADP-P<sub>i</sub>) stabilisiert und somit die Interaktion zum Aktin hemmt (Zhao et al., 1995). In früheren Arbeiten war Myosin II im Randbereich von epithelialen Wunden nachweisbar und eine wichtige funktionelle Rolle konnte bestätigt werden (Bement et al., 1993; Danjo und Gipson, 1998). Der im Rahmen dieser Arbeit beobachtete verlangsamende Effekt auf die Verlängerung von Nachbarzellen in den Defekt ist vergleichbar mit dem 2,3-Butandion Monoxim-Effekt auf die Verteilung von postmitotischen PtK2-Zellen<sup>5</sup> (Cramer und Mitchison, 1995) und der Formierung von Lamellipodien in elongierten Axonen (Ruchhoeft und Harris, 1997). Die inkomplette Hemmung der Restitution unter 2,3-Butandion Monoxim könnte auf die geringe Bindungsaffinität zurückzuführen sein (Ruchhoeft und Harris, 1997).

Obwohl die Substanz auch den Stromfluß durch spannungsaktivierte L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanäle reduziert (Ferreira et al., 1997), kann die Blockade des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms den hier beobachteten Effekt nicht erklären, denn in erniedrigter freier Calcium-Ringerlösung ist die Restitution nicht signifikant verlangsamt. Darüber hinaus interferiert 2,3-Butandion Monoxim nicht mit der Aktinpolymerisation (Cramer und Mitchison, 1995).

Zusätzlich wurde der Effekt eines spezifischeren Inhibitors der Myosin-leichte-Ketten-Kinase, ML-7, untersucht. Myosin-leichte-Ketten-Phosphorylierung reguliert die Kontraktion, Sekretion und Zellmotilität in glatten Muskel und Nicht-Muskelzellen (Matsumura et al., 1999; Kaneko et al., 2002). In einer Konzentration von 100  $\mu$ mol l<sup>-1</sup> blockierte ML-7 die Restitution von Einzelzell-Läsionen (Abb. 23B). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die durch Myosin II generierte Kraft nicht nur den Heilungsprozeß am Rand von größeren Epitheldefekten vorantreibt (Bement et al., 1993; Danjo und Gipson, 1998; Matsumura et al., 1998), sondern auch bei der schnellen Restitution von Einzelzelldefekten wirkt.

---

<sup>5</sup> Eine epitheliale Zelllinie aus den Nieren des Rattenkänguruhs.

Während in den hier gezeigten Experimenten ML-7 die epitheliale Leitfähigkeit reversibel erhöhte, konnten andere Arbeitsgruppen zeigen, daß ML-7 die epitheliale Leitfähigkeit in intestinalen epithelialen Zelllinien erniedrigt (Turner et al., 1997; Ma et al., 2000). Wahrscheinlich ist dies auf die hohe eingesetzte Konzentration von ML-7 ( $100 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) zurückzuführen. In dieser Konzentration werden andere Kinasen wahrscheinlich mit inhibiert, denn ML-7 inhibiert die MLCK mit einem  $K_i$ -Wert von  $300 \text{ nmol l}^{-1}$  und die Proteinkinase A mit einem  $K_i$  von  $21 \mu\text{mol l}^{-1}$  sowie die Proteinkinase C mit einem  $K_i$  von  $42 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Es ist möglich, daß die Proteinkinasen A oder C für die Inhibition der Restitution verantwortlich sind.

Die kleine GTPase RhoA ist ein Regulator der Zellmotilität, des perijunktionalen Aktinskeletts und der *Tight junction* (Hall, 1998; Wittmann und Waterman-Storer, 2001). Kommerziell erhältliche Substanzen, die seine Funktion blockieren (z.B. C3-Exotransferase), sind nicht membranpermeabel. Es gibt Experimente einer anderen Arbeitsgruppe mit temporär lecken Zellen, die sich am Rand eines Defekts befinden. Dabei drang die nicht permeable C3-Exotransferase durch Zellmembrandefekte ein. Die Hemmung der RhoA-Kaskade hemmte den epithelialen Wundverschluß von vielzelligen Hautwunden (Brock et al., 1996; Bement et al., 1999).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Rho-assoziierte Proteinkinase p160ROCK (*Rho associated coiled coil protein kinase*), ein weiter unten in der Kaskade von RhoA stehendes Zielprotein, die Myosin-Phosphorylierung stimuliert und somit zur Entwicklung von Kontraktionskraft beiträgt (Somlyo und Somlyo, 2000). Um den Effekt der Rho-assoziierten Proteinkinase auf den *purse string*-Mechanismus zu untersuchen, wurde der membranpermeable, selektive Inhibitor Y-27632 eingesetzt. In Nicht-Muskelzellen und Myofibroblasten des Kolons wurde durch Y-27632 die Endothelin-1 stimulierte Myosinphosphorylierung und damit der Aufbau von Kontraktionskraft gehemmt (Kernochan et al., 2002). Im Gegensatz dazu konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, daß die Restitution eines Einzellzell-Defektes nicht durch Y-27632 beeinflusst wurde. Daraus ist zu schließen, daß Rho-assoziierte Proteinkinasen nicht am *purse string*-Mechanismus beteiligt sind.

Die beschriebenen Beobachtungen deuten darauf hin, daß der schnelle Verschluß von Einzelzell-Läsionen durch einen kontraktilen *purse string*-Mechanismus vermittelt wird (Martin und Lewis, 1992). Dieser ist entlang der gesamten Membran, die den Defekt umgibt, ausgebildet und umfaßt einen

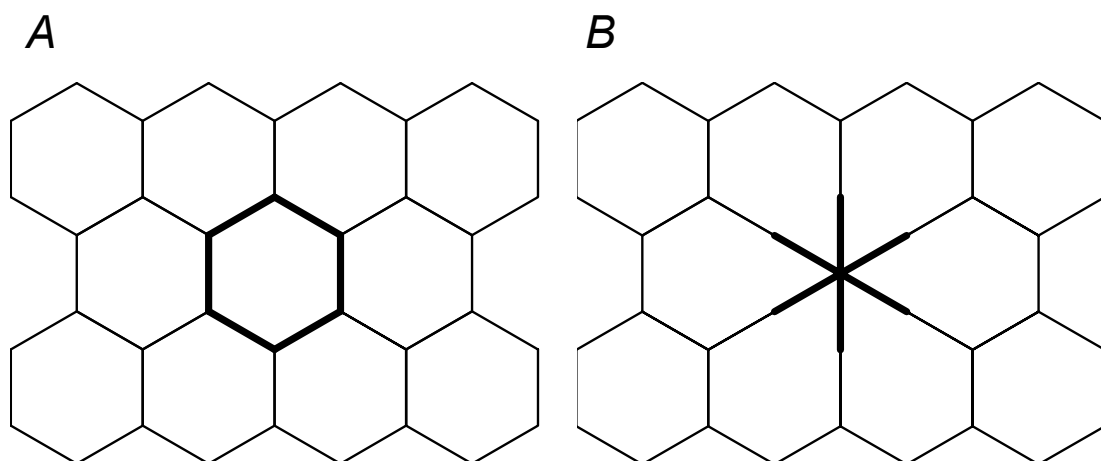
aktiven Mechanismus der durch eine Aktin-Myosin-Interaktion gekennzeichnet ist. Ein ähnlicher Mechanismus wurde kürzlich beschrieben bei dem Herausdrängen von apoptotischen Zellen aus einem UV-bestrahlten MDCK Monolayer (Rosenblatt et al., 2001). Die beteiligten Zellen zeigten dabei, ähnlich der Morphologie einer Einzelzell-Läsion, eine rosettenartige Struktur. Diese Rosettenformation ist bereits bekannt bei Epithelzellen, die eine Einzelzell-Apoptose umsäumen (Peralta Soler et al., 1996; Gitter et al., 2000a).

### 5.3 Simultane Ausbildung funktionsfähiger *Tight junctions*

Durch den Verschuß und die Abdichtung des reparierten Epithels entwickelte sich die gleiche Leitfähigkeit wie bei intaktem, weit entfernten Epithel. Dadurch wird deutlich, daß die Dichtheit der Verbindungen auf die zuvor gemessenen Werte zurück ging. Hierdurch wird ein Kontrollsystem für die Formierung von funktionsfähigen *Tight junctions* angedeutet. Nachdem der interzelluläre Kontakt durch Reduzierung der extrazellulären freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gelockert wurde, stieg die parazelluläre Leitfähigkeit an und das Epithel änderte sich von einem dichten zu einem lecken Epithel. Trotz dieser Veränderung entwickelte sich nach der Restitution des Defekts eine vergleichbar hohe Leitfähigkeit zu entfernt gelegenen intakten Epithelbereichen. Der oben erwähnte Kontrollmechanismus für die Neukonstruktion der *Tight junction* scheint demzufolge ein direkter oder indirekter Sensor für die parazelluläre Leitfähigkeit zu sein. Die Cadherine der *Adherens junction* spielen dabei vermutlich eine wichtige Rolle (Danjo und Gipson, 1998).

Epithelien, die in erniedrigter freier  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kultiviert werden, sind leck, und die *Tight junction*-Formierung und -Abdichtung findet statt, wenn die Zellen normaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ausgesetzt werden (Contreras et al., 1992b). Diese Beobachtung könnte so gedeutet werden, daß die *Tight junction*-Formierung in erniedrigter freier  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration behindert wird. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen allerdings, daß die Zeitachse der Restitution nicht signifikant verschieden ist unter erniedrigter freier  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Es läßt sich somit vermuten, daß die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wahrscheinlich über Cadherine die Struktur der *Tight junction* beeinflusst (Balda et al., 1993), allerdings keinen Effekt auf die Geschwindigkeit der Restitution hat. Dieser Zusammenhang könnte mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Adhäsionsaktivität der integralen Membranproteine der *Tight junction* erklärt werden (Kubota et al., 1999).

In Übereinstimmung mit vorherigen Studien (Turner, 2000), konnte gezeigt werden, daß in den ungestörten intestinalen Epithelabschnitten die *Tight junction* der Enterozyten mit einem apikalen Aktin-Ring kolokalisiert. Nach der Entfernung einer einzelnen Zellen aus dem Verband ist diese Verteilung der Proteine an den zum Defekt benachbarten Zellmembranen nicht mehr nachweisbar (Abb. 33A). Während der Restitution hingegen kommt es zur Ausbildung von ZO-1, einem peripheren Membranprotein (Stevenson et al., 1986), und von Occludin, einem integralen Membranprotein (Furuse et al., 1993), die sich um den Defekt herum anordnen und mit Aktin im basalen *purse string* kolokalisieren (Abb. 33B). Es kommt demnach zu einer *Tight junction* Proteinreorganisation, die einen kompletten Ring um den Defekt bildet, auch wenn im Zentrum des Defekts noch kein Gegenspieler zur benachbarten Zelle für die Abdichtung vorhanden ist. Es stellt sich somit die Frage, welche Bedeutung diese Proteine haben.



**Abb. 34: Geometrisches Modell der *Tight junction*-Verteilung während der Restitution einer Einzelzell-Läsion**

Die Summe der Zellbegrenzungen pro Epithelfläche in einem hexagonal-symmetrischen Epithel (A) ändert sich nicht, nachdem eine Zelle artifiziiell entfernt wurde (B). Dadurch, daß eine Verlängerung der benachbarten Zellen im Bereich ihrer sich verbindenden Anteile mit gleicher Länge stattfindet, wird der Verlust der Zelle kompensiert.

Aufgrund der Tatsache, daß die Wiederherstellung der Barrierefunktion parallel zur morphologischen Restitution verläuft, muß der funktionelle Verschuß und somit die Abdichtung des parazellulären Weges schnell ablaufen. Die Dauer der Restitution wird also eher durch den Verschuß des Lochs limitiert und nicht so sehr durch die Zusammenlagerung der *Tight*

*junction*-Proteine. Die Bildung der Barriere erfordert dabei eine Formierung von *Tight junctions* an den Verbindungen entlang der Zellen die in Kontakt zueinander stehen (Abb. 34). Während des Verschlusses des Defekts kommt es einerseits zu einer Entfernung der *Tight junction*-Proteine entlang des sich abflachenden Rings am Defekt und andererseits gleichzeitig zu einer Membranformierung und *Tight junction*-Proteinbildung zwischen den benachbarten Zellabschnitten der in den Defekt einwandernden Zellen. Diese Sequenz der Ereignisse läßt vermuten, daß ein Mechanismus der Abdichtung zu Grunde liegt, der ähnlich einem Reißverschluß die präformierten und mit dem *purse string* assoziierten *Tight junction*-Proteine aneinanderlagert.

Zusammenfassend bedeutet dies, daß die epitheliale Restitution von Einzelzelldefekten über einen schnellen Verschluß des Defekts durch einen Aktin-Myosin-abhängigen *purse string* vermittelt wird. Simultan findet die Zusammenlagerung von funktionsfähigen *Tight junction*-Elementen zwischen den sich ausbreitenden Zellen durch vorgeformte Proteine, die vermutlich an den *purse string* assoziieren, statt. Durch diese Mechanismen wird eine funktionsfähige Barriere innerhalb von Minuten gebildet.

#### 5.4 Schnelle Restitution im Oberflächenepithel des nativen Kolons

Die Messungen an nativem Gewebe des Kolons von der Maus bestätigen die Beobachtungen, die am Zellmodell HT-29/B6 gewonnen wurden. Allerdings vollzog sich die Restitution im Kolon der Maus um etwa das 10-fache schneller. In anderen Arbeiten wurde durch gezielte Präparation von Darmgewebe des Meerschweinchens eine multizelluläre Läsion im Oberflächenepithel gesetzt (Moore et al., 1989; Moore et al., 1992). Zu beobachten war eine "relativ schnelle" (60 min) Restitution der Defekte bei intakter Basalmembran die durch eine Ausbildung von Lamellipodien und einer Migration der Zellen gekennzeichnet war. Dies war vergesellschaftet mit der Ausbildung einer funktionsfähigen Barriere innerhalb der gleichen Zeit nach Setzen des Schadens. In anderen Arbeiten dauerte die Restitution von größeren, multizellulären Defekten meist einige Stunden (Feil et al., 1989).

Somit ist die in dieser Arbeit gemessene Restitution von Einzelzell-Läsionen durch einen deutlich schnelleren, nicht durch Migration oder Ausbildung von Lamellipodien gekennzeichneten Prozeß, charakterisiert.

Mit Hilfe der Messungen an dem HT-29/B6 Zellmodell wurde in dieser Arbeit ein Aktin-Myosin-abhängiger *purse string*-Mechanismus charakterisiert, der



für die Restitution von Einzelzell-Läsion bedeutsam zu sein scheint. Interessanterweise sind die beteiligten Mechanismen im nativen Gewebe deutlich effizienter als im Zellmodell. Dies spiegelt die Schwierigkeit wieder, Erkenntnisse aus Zellkulturuntersuchungen auf *in vivo*-Situationen 1:1 zu übertragen. Die Vielfalt der verschiedenen Faktoren innerhalb eines nativen Gewebes könnten in diesem Fall Ursache für die Unterschiede zwischen der Restitution eines Einzelzelldefektes im Zellmodell und im Kolon der Maus sein.

Dadurch, daß auch kleine Defekte Eintrittspforten für potentiell gefährliche Substanzen sein können, besitzen diese im Darm aus pathophysiologischer Sicht eine große Bedeutung. Nachdem Epithelzellen von der Basis der Krypte zur Oberfläche des Epithels gewandert sind, werden diese aus dem Verband in das Lumen des Darms abgegeben. Es konnte in anderen Arbeiten gezeigt werden, daß der Prozeß der Abschilferung im Darm einer apoptotischen Kontrolle unterliegt (Grossmann et al., 2002). Die Zellen werden nach 4-5 tägiger Lebensdauer (Turnover) aus dem epithelialen Verband gelöst und z.T. in das Darmlumen abgegeben (Shedding) oder durch Phagozytose entfernt. Das daraus resultierende Leck muß schnell geschlossen werden damit die epitheliale Barrierefunktion wieder hergestellt wird (Gitter et al., 2000a). Dies ist wichtig, um die Mukosa gegen toxische oder als Antigen wirksame Agenzien zu schützen.

Da es im Rahmen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (z.B. Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa) zu Alterationen im Turnover-Prozeß kommt, wurde der Einfluß von Zytokinen (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) untersucht, die im Rahmen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erhöht sind. Die in dem *in vitro*-System eingesetzten Konzentrationen entsprachen dabei Zytokinpiegeln, wie sie am Sekretionsort im entzündeten Gewebe von Patienten zu finden sind (Schmitz et al., 1996). In dem HT-29/B6-Zellmodell zeigten 100 ng/ml TNF- $\alpha$  einen deutlich hemmenden Einfluß auf die Restitution der Einzelzell-Läsion. Ein ähnlicher Effekt konnte in anderen Arbeiten an primär kultivierten Magenzellen in einer morphometrischen Studie beobachtet werden (Kato et al., 1999). Dort hatte TNF- $\alpha$  einen moderat hemmenden Effekt auf die Migration von Zellen innerhalb von 24 Stunden nach Setzen eines Schadens von 18 mm x 6-8 mm Ausdehnung im Vergleich zur Kontrolle. In anderen Arbeiten konnte allerdings kein Effekt von TNF- $\alpha$  auf die Restitution von größeren Defekten gezeigt werden (Dignass und

Podolsky, 1993). Trotz dieser Befunde ist es wichtig zu beachten, daß bei der Restitution von Einzelzell-Läsionen keine Ausbildung von Lamellipodien und keine Migration zu beobachten war. Somit sind die im Rahmen der Arbeit gemachten Beobachtungen nur schwer mit den aus der Literatur angegebenen Untersuchungen größerer Defekte vergleichbar.

Von Bedeutung ist weiterhin, daß der hemmende Einfluß von TNF- $\alpha$  auf die Restitution einer Einzelzell-Läsion am nativen Gewebe der Maus nur in Kombination mit IFN- $\gamma$  auslösbar war. Hierfür könnte ein synergistischer Effekt von IFN- $\gamma$  auf die Sekretion von TNF- $\alpha$  von eventuell in der Submukosa befindlichen Immunzellen oder eine synergistische Funktion von intrazellulären Signaltransduktionsprozessen durch IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  verantwortlich sein. Es ist bekannt, daß IFN- $\gamma$  die Rezeptorzahl für TNF- $\alpha$  erhöht und somit die Wirkungsvermittlung von TNF- $\alpha$  effizienter macht (Ruggiero et al., 1986). Weiterhin könnte oberhalb der Aktivierung der einzelnen Transkriptionsfaktoren eine Vernetzung der einzelnen Signalkaskaden zu einer synergistischen Wirkungsvermittlung führen (Überblick über Synergismus s. (Paludan, 2000)). Da keine funktionellen Messungen allein unter IFN- $\gamma$  durchgeführt wurden, läßt sich der in nativem Gewebe gemessene, hemmende Effekt auf die Restitution nicht eindeutig einem Synergismus beider Zytokine zuordnen.

Die Tatsache, daß TNF- $\alpha$  im Zellmodell HT-29/B6 allein und im nativen Gewebe zusammen mit IFN- $\gamma$  einen hemmenden Effekt auf die Restitution zeigt deutet darauf hin, daß die Zytokine einen direkten Effekt auf das Zytoskelett haben könnten. Dies wird durch andere Arbeiten unterstützt, in denen eine Regulation des transepithelialen Widerstandes, als Maß für die epitheliale Barriere, partiell durch TNF- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ -Einflüsse auf das perijunktionale Zytoskelett vermittelt war (Zolotarevsky et al., 2002). Weiterhin ist bekannt, daß die Zugabe von TNF- $\alpha$  das Aktin-Zytoskelett zerstört (Domnina et al., 2002). Trotz dieser Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Zytokinwirkung und dem sich bildenden *purse string* läßt sich im Rahmen dieser Arbeit die Frage auf welche Weise die Zytokine hemmend auf die Restitution von Einzelzell-Läsionen Einfluß nehmen nicht abschließend klären.

## 5.5 Einfluß des epidermalen Wachstumsfaktors auf die Restitution

Weil aus der Literatur vielfältig bekannt ist, welchen Einfluß Wachstumsfaktoren auf die Restitution von größeren Defekten haben (Tab. 1), wurde die Bedeutung des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) auf die Restitution von Einzelzell-Läsionen aufgeklärt. Bei der Untersuchung der Restitution eines Einzelzelldefektes konnte durch EGF keine Veränderung in der Restitutions-Geschwindigkeit gemessen werden. Andere Arbeiten konnten allerdings zeigen, daß EGF stabilisierend auf die epitheliale Barriere im Darm wirkt (Banan et al., 2000). Dieser Effekt war im wesentlichen auf eine Aktinstabilisierung zurückzuführen. Bei der Restitution der Einzelzell-Läsion war dieser Effekt des EGFs hinsichtlich einer Beschleunigung der Restitution nicht zu bestätigen. Wahrscheinlich ist die Interaktion von Myosin und Aktin im *purse string*-Mechanismus nicht durch die Wirkung von EGF beeinflusst. Die aus der Literatur bekannte Beschleunigung der Restitution von größeren Defekten durch EGF (s. Tab. 1) ist auf eine positive Beeinflussung der Migration oder der Proliferation (bei längeren Restitutionsprozessen) zurückzuführen. Der im Rahmen dieser Arbeit beobachtete *purse string*-Mechanismus läuft ohne Migration oder Proliferation ab.

## 5.6 Die pathophysiologische Bedeutung der Studie

Kommt es zu einer Beeinträchtigung der epithelialen Integrität, so muß diese rasch wieder hergestellt werden (Dignass, 2001) oder eine Entzündung könnte entstehen (Gitter et al., 2001). Bei größeren und tieferen Defekten wird bei der "Heilung" ein proliferativer Prozeß in Gang gesetzt. Prozesse dieser Art dauern mehrere Tage und sind meist vergesellschaftet mit einer Entzündungsreaktion. Oberflächliche Defekte hingegen sind überwiegend gekennzeichnet durch ein Abflachen und Migrieren der intakten Epithelzellen aus benachbarten Bereichen des Defekts.

In anderen Arbeiten (Gitter et al., 1997; Bendfeldt, 2000) konnte gezeigt werden, daß durch TNF- $\alpha$  eine Barrierestörung an Apoptosen im Kolonkryptenepithel einen Einfluß auf entzündliche Prozesse haben könnte. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sind für das Verständnis der Mechanismen, die dem Verschuß kleiner Läsionen zu Grunde liegen, auch im Hinblick auf die Entstehung von Entzündungen, von Bedeutung. Die Messungen unter TNF- $\alpha$ -Einfluß haben gezeigt, daß erhöhte Zytokinspiegel, wie sie bei Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung lokal auftreten, einen negativen Einfluß auf die Restitution kleinerer Defekte haben

können. Somit wäre zusätzlich zu der geschädigten epithelialen Barriere die verlangsamte Restitution ein weiterer Faktor, der eine Entzündung durch den zeitlich verlängerten Eintritt von toxischen Agenzien unterhält. Grundsätzlich können kleinere Defekte als Eintrittspforten für Toxine dienen und zur Genese einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung beitragen. Synergismen zwischen einzelnen Zytokinen, wie die durch IFN- $\gamma$  vermittelte erhöhte zelluläre TNF- $\alpha$ -Sensitivität, würden sich *in vivo* vermutlich deutlicher ausprägen als in dem untersuchten *in vitro*-Modell am Kolon der Maus.

Die in dieser Studie gemachten Befunde geben somit auch Hinweise darauf, daß eine Therapie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mit TNF- $\alpha$ -Antikörpern (Mouser und Hyams, 1999) einen positiven Effekt auf die Restitution kleiner Defekte haben könnte. Die z.T. kritisch diskutierte Therapie (Seegers et al., 2002) bekommt somit auch aus Sicht der epithelialen Barriereerhaltung Unterstützung.