

6 Zusammenfassung

Die Restitution von Einzelzell-Läsionen, ein häufiges Ereignis in Epithelien mit hohem Turnover, ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Die morphologischen und funktionellen Veränderungen während der Restitution wurden mittels intravitaler Time lapse-Videomikroskopie, konfokaler Fluoreszenzmikroskopie und der Conductance scanning-Technik am Zellkulturmodell HT-29/B6 und am nativen Oberflächenepithel des Mauskolons untersucht.

Nach dem Setzen einer Einzelzell-Läsion an HT-29/B6-Monolayern erweiterten sich die basalen Enden der umliegenden Zellen und bildeten eine trichterförmige Lakune. Der lokale Leitwert des Defekts (initial: 0,64 μS ; Median, $n = 17$) wurde mit einem exponentiellen Zeitverlauf abgedichtet (von 0,45 μS , 2 min nach Läsion, bis 0,16 μS , 8 min nach Läsion). Parallel wurde die morphologische Integrität wiederhergestellt. Zwischen 3 und 10 min nach Setzen der Läsion bildete sich ein Aktin-Ring um den Defekt. Dessen Kolo-kalisation mit ZO-1 und Occludin deutet darauf hin, daß *Tight junction*-Proteine an Aktinfilamente, welche dem Defekt zugewandt sind, binden. Eine Rekrutierung der *Tight junction*-Proteine über die Aktinfilamente ermöglichte deren gezielten Transport zum Ort der Läsion. Die Formierung der *Tight junction* verlief zeitgleich mit der morphologischen Abdichtung.

Verschluß und Abdichtung wurden gehemmt, wenn die Aktinpolymerisation mittels Cytochalasin D unterbunden wurde. Die Hemmung der Myosin-ATPase-Aktivität mittels 2,3-Butandion Monoxim hatte eine Verringerung der Restitutionsgeschwindigkeit zur Folge. Wiederum fast vollständig blockiert wurde die Restitution durch Inhibition der Myosin-leichte-Ketten-Kinase mittels ML-7. Der Rho-assoziierte Proteinkinase-Inhibitor Y-27632 hatte keinen Einfluß auf die Restitution. Eine Reduzierung der extrazellulären freien Ca^{2+} -Konzentration hatte keinen signifikanten Einfluß auf den zeitlichen Verlauf der Restitution. Obwohl die epitheliale Leitfähigkeit unter reduziertem freien Calcium im Vergleich zur Kontrolle 12-fach erhöht war, erreichte die Leitfähigkeit unter beiden Bedingungen nach der Restitution die gleichen Werte wie intaktes, weit vom Schaden entferntes Epithel.

Als Schlußfolgerung ergibt sich, daß die epitheliale Restitution von Einzelzell-Läsionen schnell über einen Aktin-Myosin-abhängigen *purse string*-Mechanismus vermittelt wird. Simultan findet eine Ausbildung von funktionell kompetenten *Tight junction*-Strängen an den *purse string*-assoziierten Proteinen statt.

Es ist bekannt, daß Wachstumsfaktoren (z.B. EGF) einen oft beschleunigenden Einfluß auf die Restitution von großen Defekten haben. Hierbei spielen Migrations- und Proliferationsprozesse eine wichtige Rolle. Die Restitution einer Einzelzell-Läsion wurde durch EGF nicht beeinflusst. Die beim *purse string*-Mechanismus charakterisierte Aktin-Myosin-Interaktion wird demnach nicht durch EGF moduliert.

Erstmalig gelang es auch, Untersuchungen an nativen Kolonabschnitten der Maus hinsichtlich der Restitution von Einzelzell-Läsionen durchzuführen. Die Restitution am nativen Kolon der Maus verlief deutlich schneller als im Zellkulturmodell. Von Beginn der Messung (1,5 min nach Setzen des Schadens) bis 2,5 min nach Schadenssetzung, nahm der Leitwert um 92% ab (von 7,84 auf 0,73 μ S; n = 13). Messungen unter dem Einfluß von TNF- α , das bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erhöht ist, zeigten, daß dieses Zytokin einen hemmenden Einfluß auf die Restitution von Einzelzell-Läsionen im HT-29/B6-Zellkulturmodell hat. Bei den Messungen am nativen Kolon der Maus zeigte sich bei Inkubation mit TNF- α und IFN- γ in Kombination eine höhere Restitutionszeit als unter Kontrollbedingungen. Nur 74% (von 9,83 auf 1,56 μ S; n = 10) des Defekts waren zwischen 1,5 und 2,5 min nach Setzen des Schadens repariert. Nach alleiniger Inkubation mit TNF- α kam es dagegen zu keiner Änderung der Restitutionszeit im nativen Oberflächenepithel.

Es konnte somit gezeigt werden, daß TNF- α und IFN- γ gemeinsam den Verschuß des Defekts im nativen Kolon der Maus beeinträchtigen und TNF- α allein im Zellkulturmodell einen hemmenden Effekt zeigt. Durch Zytokine hervorgerufene Barrierestörungen durch Einzelzellverlust, wie bei der Apoptose, werden durch die langsamere Restitution unter Zytokineinfluß verlängert.

Weil Zytokine während chronisch entzündlicher Darmerkrankungen vermehrt gebildet werden, führt die verschlechterte Restitution von Einzelzell-Läsionen zur Prolongation der Leckfluß-Diarrhoen während dieser Erkrankungen. Eine Therapie mittels TNF- α -Antikörpern könnte die Restitution des entzündeten Gewebes beschleunigen.