

Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

aus dem Institut für Klinische Physiologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Fromm

**Analyse der gestörten Regulation
des epithelialen Na⁺-Kanals (ENaC)
bei der chronisch entzündlichen Darmerkrankung
Colitis ulcerosa**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von
Corinna Swanette Koch
aus Lemgo

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. M. Fromm
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. R. Duchmann

Gedruckt mit Genehmigung der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 07.12.2007

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	4
1.1	Epithelien und Transportvorgänge	4
1.2	Der epitheliale Natriumkanal (ENaC)	5
1.3	Colitis ulcerosa	8
1.4	Tumornekrosefaktor α und Interferon γ	10
1.5	Gestörte Natrium-Resorption bei Colitis ulcerosa	10
1.6	Ziel dieser Arbeit	11
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Elektrophysiologische Methoden: Prinzip	13
2.2	Präparate	13
2.2.1	Humanes Colon sigmoideum	13
2.2.2	Präparation und Einspannen der Epithelien	14
2.3	Versuchsstand	16
2.3.1	Messkammer und Wärmetauscher	16
2.3.2	Elektrische Messanordnung	19
2.4	Versuchsablauf	20
2.4.1	Messung des Kurzschlussstroms	20
2.4.2	Bestimmung des elektrogenen Na^+ -Transports	21
2.5	Lösungen und Testsubstanzen der elektrophysiologischen Experimente	24
2.5.1	Badlösung	24
2.5.2	Aldosteron	25
2.5.3	Amilorid	26
2.5.4	Bumetanid	26
2.5.5	TNF- α und IFN- γ	27
2.6	Molekularbiologische Methoden	27
2.6.1	Proteinextraktion aus humanem Colon sigmoideum	27
2.6.2	Proteinquantifizierung	28
2.6.3	Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)	28
2.6.4	Western-Blot	29
2.6.5	Extraktion von Gesamt-RNA aus Gewebestücken	31
2.6.6	Denaturierende RNA Gelelektrophorese	32
2.6.7	Northern Blot	32
2.6.8	Sondenherstellung für Northern Blots mittels DIG-PCR	35
2.7	Molekularbiologische Methoden: Geräte, Chemikalien, Puffer und Lösungen	36

2.7.1	Geräte	36
2.7.2	Materialien	36
2.7.3	Chemikalien	37
2.7.4	Puffer und Lösungen	38
2.8	Histologische Methoden	39
2.8.1	Morphometrie	39
2.8.2	Cryoschnitte	40
2.8.3	Immunfluoreszenz	40
2.9	Statistik	41
3	ERGEBNISSE	42
3.1	Elektrogener Natrium-Transport in Colitis ulcerosa-Präparaten	42
3.2	Festlegung eines Korrekturfaktors hinsichtlich unterschiedlicher Gewebsdicke des entzündeten Colonepithels für molekularbiologische Quantifizierung	45
3.3	Histologie und Morphometrie von Colitis ulcerosa-Präparaten	46
3.4	ENaC mRNA-Expression in Colitis ulcerosa-Präparaten	48
3.5	ENaC-Protein-Expression in Colitis ulcerosa-Präparaten	49
3.6	Immunhistochemie	50
3.7	Expression des Mineralocorticoid-Rezeptors in Colitis ulcerosa-Präparaten	50
3.8	Effekte von TNF- α und IFN- γ auf humanes Colon sigmoideum	53
4	DISKUSSION	56
4.1	Störung des Natriumstroms J_{Na} bei Colitis ulcerosa-Präparaten	56
4.2	Spezifität der funktionellen Veränderungen in entzündeter Colitis-Mucosa	57
4.3	Korrektur-Algorithmen der Northern- und Western-Blots für die entzündlichen Veränderungen bei Colitis ulcerosa-Präparaten	58
4.4	Regulation des Aldosteron-induzierten Natrium-Transports auf Transkriptions- und Translationsebene	59
4.5	Effekte der Zytokine auf die Induktion des ENaC bei Colitis ulcerosa-Präparaten	60
4.6	Expression und Regulation der β - und γ -Untereinheiten des ENaC	61
4.7	Ausblick	62
5	ZUSAMMENFASSUNG	63
6	VERZEICHNISSE	65
6.1	Abkürzungsverzeichnis	65
6.2	Abbildungsverzeichnis	67

7	LITERATURVERZEICHNIS	68
8	Anhang	75
8.1	Curriculum vitae	75
8.2	Danksagung	76
8.3	Publikationsliste	77
8.4	Erklärung an Eides statt	78

1 EINLEITUNG

1.1 Epithelien und Transportvorgänge

Epithelien sind Zellverbände, welche innere und äußere Oberflächen von Organen bedecken. Auf diese Weise stellen sie eine Grenzfläche zwischen der Innen- und der Außenwelt auf Organebene dar. Die einzelnen Epithelzellen werden dabei durch spezielle Zell-Zellverbindungen zusammengehalten, so dass sie funktionell eine Einheit bilden. Sie tragen zur Erhaltung des sog. „Inneren Milieus“ bei und ermöglichen eine Konstanzhaltung wichtiger Parameter in der Zelle, wie z.B. pH-Wert, osmotischer Druck und Ionenkonzentrationen. Ihre beiden Hauptaufgaben sind daher einerseits die Barrierefunktion, andererseits aber der transepitheliale Transport von Soluten und Wasser. Die Transportvorgänge über die Zellmembran erfolgen durch Transportproteine wie Carrier und Kanäle. Ein Beispiel für einen solchen Transport ist die primär aktive elektrogene Na^+ -Resorption. Bei aktivem Transport kann der Transport des Stoffes transzellulär und entgegen seinem elektrochemischen Gradienten erfolgen. Der direkte Antrieb durch den Energielieferanten ATP charakterisiert den primär aktiven Transport. Ein Transport ist elektrogen, wenn Nettoladungsverschiebungen erfolgen.

Die primär aktive Natriumresorption mit Beteiligung des epithelialen Na^+ -Kanals und der Na^+/K^+ -ATPase als Carrier findet sich z.B. im distalen Nephron und Sammelrohr der Nieren, in den Ausführungsgängen exkretorischer Drüsen, wie Speichel- und Schweißdrüsen, und im distalen Colon. Die physiologische Funktion dieses Transports ist die Resorption von Natrium, gefolgt von weiteren Soluten und Wasser und damit die Feineinstellung des Salz-Wasser-Haushalts im Organismus. Der epitheliale Natrium-Kanal (ENaC) im distalen Colonepithel des Menschen transportiert Natrium zunächst passiv auf der luminalen Seite in die Zelle, es folgt der primär aktive Natriumaustritt auf der serosalen Seite. Diese Natriumresorption wird durch das Nebennierenrindenhormon Aldosteron reguliert, welches am Mineralocorticoidezeptor bindet und den elektrogenen Natriumtransport stimuliert. Aldosteron induziert die Synthese und den Einbau von epithelialen Natrium-Kanälen (ENaC) in die luminalen Zellmembran und wirkt aktivierend auf die Na^+/K^+ -ATPase und weitere Transporter [Verrey et al., 1996].

1.2 Der epitheliale Natriumkanal (ENaC)

Der epitheliale Natriumkanal (ENaC) gehört als Amilorid-sensitiver Natrium-Kanal der ENaC-Deg-Familie der Ionenkanäle an. Die Kanäle dieser Familie weisen eine starke Homologie auf, unterscheiden sich aber in ihrer Ionenselektivität, in der Affinität für die Blocker-Substanz Amilorid und in ihrem „Gating“-Mechanismus. Die Natrium-Kanäle finden sich in vielen Organismen und erfüllen dabei verschiedenste Funktionen von der epithelialen Natrium-Resorption bis zur Rezeptorfunktion für Neurotransmitter im Nervensystem [Alvarez de la Rosa et al., 2000].

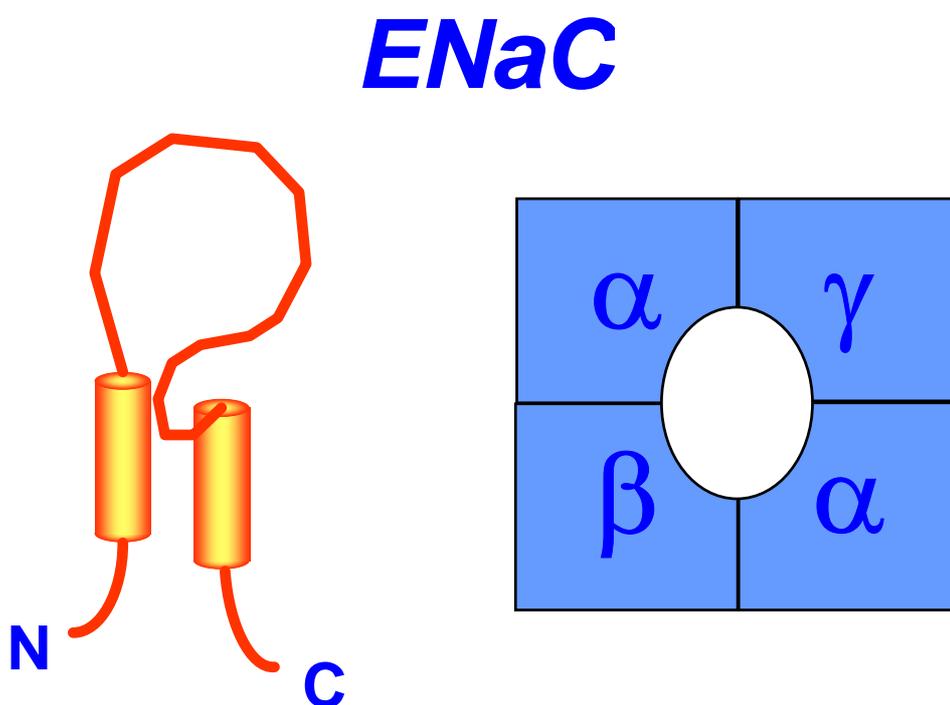


Abb. 1: Schematische Darstellung der ENaC-Untereinheiten (links) und der Kanalproteine des ENaC in der Stöchiometrie 2:1:1 (rechts) nach Firsov et al., [1998]

An der Aldosteron-abhängigen epithelialen Natriumresorption wird schon seit Jahrzehnten intensiv geforscht. Aldosteron ist das Schlüsselhormon im Natrium-Haushalt und bewirkt vor allem im sog. Aldosteron-sensitiven distalen Nephron (ASDN) sowie im distalen Colon eine Natrium-Resorption und eine Kalium-Sekretion, [Schild, 2004]. Das Hormon wird über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System bei niedrigem Volumen, hoher K^+ - oder niedriger Na^+ -Konzentration, sowie in Stresssituationen durch

erhöhte ACTH-Freisetzung vermehrt aus der Zonula glomerulosa der Nebennierenrinde ausgeschüttet. Die Regulation der ENaC-Aktivität durch Aldosteron wurde zunächst mit Hilfe elektrophysiologischer und biochemischer Versuche in Epithelien von Amphibien und Säugetieren untersucht. Am Darm untersuchten Fromm & Hegel [1978] die Effekte von Aldosteron auf die aktive Natriumresorption an narkotisierten Ratten und fanden im spät-distalen Colon – nicht jedoch im proximalen Colon – eine Zunahme der Na^+ -Resorption und des transepithelialen Potentials, die durch einen Narkose- und OP-Stress-bedingten Anstieg der Plasmakonzentrationen von Aldosteron und Corticosteron verursacht wurde [Fromm et al., 1983]. Desweiteren wurden Versuche zur Natrium-Resorption in Colon und Rektum durchgeführt. Hier zeigte sich ein minimaler Na^+ -Gradient im Rektum unter Aldosteron ($2,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) [Fromm & Hegel, 1987]. Schließlich konnte von Fromm et al. [1993] der Zeitverlauf des Natrium-Transports am spät-distalen Colon der Ratte mit Hilfe der Kurzschlussstrommessung nach Ussing [Ussing, 1956] gezeigt werden. Nach achtstündiger Inkubation mit nanomolaren Konzentrationen von Aldosteron wurde ein maximaler Natriumflux erreicht. Mit Hilfe des spezifischen Inhibitors Amilorid wurde die Aldosteron-induzierte elektrogene Natrium-Resorption bestimmt.

Die ENaC-Aktivität im distalen Colon von Säugetieren wird durch den Mineralocorticoid-Rezeptor (MR) vermittelt [Barbry & Hofman, 1997; Garty & Palmer, 1997]. Daher wurden viele funktionelle Experimente zur Aktion der Mineralocorticoide durchgeführt [Epple et al., 1995; Fromm et al., 1990]. Es ließ sich zeigen, dass die Wirkung des Aldosterons auf die Natrium-Resorption von den Abläufen auf Transkriptions- und Translationsebene abhängig ist [Garty, 1994]. Dennoch konnten zu diesem Zeitpunkt die Aldosteron-induzierten Proteine, die verantwortlich für die akute Induktion der Natrium-Resorption sind, nicht identifiziert werden [Spindler et al., 1997].

Die Klonierung des ENaC ermöglichte die Analyse des Zusammenhangs von Struktur und Funktion und lieferte neue Erkenntnisse über die Regulation des Kanals. Die Kanalpore besteht aus drei Untereinheiten, α , β und γ [Canessa et al, 1993; Lingueglia et al., 1994; Canessa et al., 1994]. Eine Stöchiometrie von 2:1:1 der Untereinheiten wurde von unterschiedlichen Arbeitsgruppen beschrieben (Abb. 1) [Kosari et al., 1998; Firsov et al., 1998; Eskandari et al., 1999]. Mit der Klonierung wurden

die ENaC-Untereinheiten als SCNN1A, B und C der SCNN-Familie zugeordnet [Meisler et al., 1994].

Es konnte gezeigt werden, dass die Pathophysiologie der hereditären Krankheiten Little-Syndrom und Pseudohyperaldosteronismus [Renard et al., 1995; Garty et al., 1997; Hummler et al., 1999; Alvarez de la Rosa et al., 2000] auf Zunahme bzw. Verlust der normalen ENaC-Funktion beruht. Diese Befunde bewiesen, wie wichtig die adäquate Regulation des ENaC im Colon ist und dass Störungen in der ENaC-Regulation drastische Auswirkungen haben können.

Die Identifikation der drei Untereinheiten der ENaC-Kanalpore eröffnete auch ein neues Feld auf der Suche nach dem molekularen Mechanismus der Aldosteronwirkung. Zwei unabhängige molekularbiologische Untersuchungen ergaben, dass endogene Aldosteron-Stimulation die Expression der β - und γ -ENaC-mRNA im distalen Rattencolon steigert [Lingueglia et al., 1994; Renard et al., 1995]. Die Annahme, dass also die ENaC-Aktivität durch die Aldosteron-abhängige transkriptionelle Kontrolle der β - und γ -Untereinheit reguliert sein könnte, wurde überprüft durch Experimente zum zeitlichen Verlauf der ENaC-mRNA-Expression in distalem Rattencolon [Asher et al., 1996]. Hierbei fand sich eine Hochregulation der β - und γ -ENaC-mRNA *in vivo* erst 3 Stunden nach Aldosteronzugabe. In Kombination mit Literaturdaten zum zeitlichen Verlauf der Natriumflux-Induktion durch Aldosteron wurde geschlossen, dass die Induktion der frühen Antwort auf Aldosteron unabhängig von der β - und γ -ENaC-mRNA-Expression sein muss. Obwohl dieser Vergleich von Daten aus unterschiedlichen Laboren und verschiedenen experimentellen Bedingungen methodisch schwierig war, wurden diese Erkenntnisse allgemein akzeptiert [Verrey, 1999]. Auch wurde in diesen Studien noch nicht weiter zwischen den Abschnitten des distalen Colons differenziert. Der distale Abschnitt des Colons hatte sich als äußerst sensibel für nanomolare Konzentrationen von Aldosteron erwiesen, während der proximale Anteil nur geringe Sensibilität für Aldosteron aufwies.

Epple et al. [2000] analysierten daraufhin die elektrogene Natrium-Resorption im früh- (EDC, 6-7 cm ab ano) und spät-distalen Colon (LDC, zwischen Anus und Beckenkamm) der Ratte. Es zeigte sich in den elektrophysiologischen Versuchen nach achtstündiger Inkubation mit Aldosteron im spät-distalen Colon ein 10 mal höherer Natriumflux als im früh-distalen Abschnitt *in vitro*. Danach wurde die mRNA-

Expression der ENaC-Untereinheiten in EDC und LDC aus den Ussingkammer-Präparaten untersucht. In LDC wurde die β - und γ -ENaC-mRNA eine Stunde nach Zugabe von Aldosteron induziert. Die zeitliche Korrelation der β - und γ -ENaC-Induktion wies also daraufhin, dass der frühe Aldosteron-Effekt auf die Natrium-Resorption im distalen Colon der Ratte auf die transkriptionelle Hochregulation der β - und γ -ENaC-Expression zurückzuführen ist, da sich dies unter standardisierten *in vitro*-Bedingungen, mit einer ähnlichen Aldosteron-Konzentration wie *in vivo* vorhanden, deutlich zeigen ließ. Dennoch konnte hier die Beteiligung anderer Mechanismen an der Regulation der ENaC-Funktion nicht ausgeschlossen werden.

Für das distale Nephron wurde zudem eine zentrale Bedeutung der Regulation durch die Aldosteron-induzierte Serum- und Glucocorticoid-induzierte Kinase 1 (SGK1) nachgewiesen. Es zeigte sich, dass C-terminale PY-Motive der Untereinheiten mit WW-Domänen der Nedd4-Ubiquitin-Protein-Ligase-Familie interagieren und so die Expression an der Membranoberfläche gesteuert wird [Staub & Verrey, 2005]. Dieser Regulationsmechanismus erwies sich aber für das Colon als nicht relevant, da keine Änderung von SGK1 im distalen Colon nach Na^+ -Depletion oder Aldosterongabe nachgewiesen werden konnte [Coric et al., 2004, Lang et al., 2006].

1.3 Colitis ulcerosa

Die Colitis ulcerosa ist eine Erkrankung aus dem Kreis der entzündlichen Darmerkrankungen und weist eine Inzidenz von 4/100000 pro Jahr auf. Die entzündlichen Veränderungen mit Ulzerationen der oberflächlichen Schleimhautschichten befinden sich zunächst im Rektum und breiten sich bei der Hälfte der Patienten kontinuierlich nach proximal aus. Die Colitis ulcerosa befällt ausschließlich das Colon und greift nur sehr selten auf den Dünndarm über. Leitsymptome sind blutig-schleimige Durchfälle sowie krampfartige Abdominalschmerzen vor der Defäkation (Tenesmen). Weitere klinische Erscheinungsformen sind Appetitverlust, Gewichtsverlust und Fieber. Extraintestinale Symptome manifestieren sich z.B. in Form von Aphten, Erythema nodosum, Iritis, Uveitis, Arthritis, ankylosierender Spondylitis und auch primär sklerosierender Cholangitis. Als Komplikation kann sich ein toxisches Megacolon mit septischen Temperaturen, Peritonitis und Perforationsgefahr entwickeln. Aus der chronischen

schen Entzündung von Mucosa und Submucosa resultiert eine Verkürzung und Stenosierung der betroffenen Darmabschnitte mit Verlust des Schleimhautreliefs und der Haustrierung. Das Risiko einer karzinomatösen Entartung korreliert bei der Colitis ulcerosa mit dem Ausmaß der Colonbeteiligung und der Dauer der Erkrankung. Das kumulative Karzinomrisiko liegt nach 20 Jahren bei 8 %, nach 30 Jahren bei 18 %. Patienten mit isolierter Proktosigmoiditis haben insgesamt eine gute Prognose mit normaler Lebenserwartung. Die 20-Jahres-Überlebensrate der Patienten mit Pancolitis beträgt > 80 %. Empfehlenswert sind regelmäßige Kontrollcoloskopien und die Therapie mit Mesalazin als Prävention karzinomatöser Entartung. Die Colitis ulcerosa ist durch Proktocolektomie heilbar.

Dank neuerer Therapieschemata mit Mesalazin, Corticosteroiden und Immunsuppressiva konnte die Behandlung der Erkrankung in den letzten Jahren effektiver gestaltet werden. [Regueiro et al., 2006]. Dennoch bleibt die Therapie bislang nur symptomatisch, da bis heute die Pathomechanismen dieser chronisch-entzündlichen Darmerkrankung nicht bis ins Letzte verstanden werden.

Die Ätiologie der Colitis ulcerosa ist bis dato ungeklärt, es werden verschiedene Hypothesen, wie eine Autoimmunerkrankung, eine Störung der Immunregulation aufgrund genetischer Disposition oder die Auslösung durch Infektionen diskutiert. Die Entzündung ist durch drei pathogenetische Phasen gekennzeichnet:

1. Unbekannte Auslöser aktivieren lymphatische Zellen der Darmwand (bei Colitis ulcerosa vorwiegend TH2-Lymphozyten)
2. Bildung von Entzündungsmediatoren, z.B. Zytokine wie Tumornekrosefaktor α , Interferon γ und Interleukine
3. Ausbildung lokaler Gewebeschädigungen mit Erosionen, Nekrosen, Ulzerationen

Zur Zeit wird intensiv daran geforscht, die genaueren Pathomechanismen der Colitis ulcerosa zu verstehen, insbesondere im Hinblick auf Barrierestörungen im Bereich der Tight Junctions und ihrer Proteinbestandteile sowie bezüglich der Veränderungen spezifischer Transportsysteme in chronisch entzündlichem Gewebe.

1.4 Tumornekrosefaktor α und Interferon γ

TNF- α zählt als Botenstoff zu der Gruppe der Zytokine und wirkt bei akuten Entzündungsreaktionen zusammen mit den Akute-Phase-Proteinen im Organismus. Interleukin-1 steuert seine Freisetzung aus Makrophagen, Lymphozyten und Mastzellen. Im Hypothalamus stimuliert TNF- α die Freisetzung von Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH), in der Leber setzt es das C-reaktive Protein (CRP) frei. Mit den Antikörpern Infliximab und Etanercept kann die Freisetzung von TNF- α unterdrückt werden.

IFN- γ wird von zytotoxischen und Th1-T-Zellen sezerniert. Seine Hauptfunktion besteht in der Aktivierung von Makrophagen und in der Steigerung der Expression von MHC-Klasse-II-Proteinen in Akute-Phase-Zellen. Desweiteren hat IFN- γ eine komplexe Regulationsaufgabe in der Th2-Funktion. Insgesamt spielt das Zytokin in vielen verschiedenen Arten der Immunantwort eine Rolle, so in der Hypersensibilitätsantwort vom verzögerten Typ, in Entzündung, Antikörperproduktion und bei viralen Infektionen. In entzündlichen Darmkrankheiten wird es als erhöht nachgewiesen.

1.5 Gestörte Natrium-Resorption bei Colitis ulcerosa

Die entzündliche Darmerkrankung Colitis ulcerosa geht mit starken wässrigen, auch blutig-schleimigen Diarrhoen einher. Ein wesentliches Charakteristikum der durch Colitis ulcerosa geschädigten Mucosa ist das Fehlen oder die deutliche Reduktion der Resorption von Natrium- und Chloridionen und Wasser [Hawker et al., 1980; Rampton et al., 1984; Sandle et al., 1986], welches zur Ausscheidung eines erhöhten Stuhlvolumens führt. Mögliche Ursachen für dieses Phänomen sind der Leckflux-Mechanismus durch epitheliale Barrierestörung [Schmitz et al., 1999] und die gestörte aktive Resorption von Ionen [Sandle et al., 1990]. Die Aktivierung der Sekretion von Ionen scheint hingegen weniger entscheidend zu sein, wenn auch die Konzentrationen von Prostaglandinen und pro-inflammatorischen Zytokinen typischerweise bei Colitis erhöht sind [Sandle et al., 1990].

Die Netto-Resorption von Ionen im Dickdarm setzt sich aus verschiedenen Transport-Systemen, welche parallel arbeiten, zusammen. Zum einen erfolgt eine elektro-neutrale NaCl-Resorption über den Natrium/Protonen-Austauscher 3 (NHE3) und den Chlorid/Bicarbonat-Antiporter (DRA) [Hoogerwerf et al., 1996; Yang et al., 1998]. Zum anderen erfolgt die Natrium-Resorption über die gekoppelte Aufnahme mit kurz-kettigen Fettsäuren und schließlich über den epithelialen Natrium-Kanal, der den be-grenzenden Faktor für aktive Natrium-Resorption im distalen Colon ausmacht [Garty et al., 1997].

In der Pathogenese der Colitis ulcerosa wurde die Störung des elektrogenen Natri-um-Transports (J_{Na}) nachgewiesen. Vorherige Untersuchungen wiesen darauf hin, dass die apikale ENaC β - und γ -Untereinheit und die $\alpha 1$ -Isoform der Na^+/K^+ -ATPase in Colitis ulcersosa-Präparaten herunterreguliert werden [Greig et al., 2000]. Eine Erklärung für diese Veränderungen ist, dass subepitheliale Immunzellen inflammato-rische Mediatorsubstanzen freisetzen, die die epitheliale Transportfunktion ein-schränken. Kürzlich wurde gezeigt, dass pro-inflammatorische Zytokine bei entzünd-lichen Darmerkrankungen den Chlorid/Bikarbonat-Antiporter (DRA) herunterregulie-ren [Yang et al., 1998]. Damit war der Nachweis erbracht, dass Zytokine direkten Einfluss auf Transportsysteme nehmen können. Inwiefern auch andere Transportsys-teme spezifisch durch Zytokine beeinflusst werden, wird in der Zukunft noch zu klä-ren sein.

1.6 Ziel dieser Arbeit

Der limitierende Faktor für Natrium-Resorption im distalen Colon ist der Amilorid-sensitive epitheliale Natrium-Kanal. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Mechanis-men, welche an der Dysregulation der ENaC-Expression bei Colitis ulcerosa beteiligt sind, näher zu charakterisieren und die Funktionseinschränkung des ENaC bei Coli-tis ulcerosa zu prüfen. Bei Colitis ulcerosa lassen sich erhöhte Konzentrationen von Entzündungsmediatoren wie den pro-inflammatorischen Zytokinen nachweisen. Die Hypothese, dass pro-inflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor α und Inter-feron γ Einfluss auf die Aldosteron-bedingte ENaC-Expression nehmen, sollte in Kon-trollgewebe und Colitisgewebe näher analysiert werden. Insbesondere war die Frage

zu klären, ob Zytokine direkte Auswirkungen auf spezielle Transportsysteme nehmen können, und nicht etwa nur unspezifisch zu einer Barrierestörung führen.

Als Material wurde hierfür präpariertes Epithel von chirurgisch entferntem entzündeten Colon sigmoideum und von Kontroll-Sigmoid herangezogen. Elektrophysiologisch wurde nun der aktive elektrogene Natrium-Transport (J_{Na}) nach achtstündiger Inkubation mit Aldosteron gemessen und für die durch Entzündung veränderte und erhöhte sub-/epitheliale Widerstands-Ratio korrigiert. Zudem wurde humanes Gewebe mit den Zytokinen TNF- α und IFN- γ in der Ussing-Kammer inkubiert und später Aldosteron hinzugegeben, um die Effekte von erhöhten Zytokinkonzentrationen in Kontrollgewebe auf die ENaC Funktion separat zu prüfen.

Weiterhin wurde in Northern Blots für die Kontroll- und Colitispräparate die mRNA-Expression der drei Untereinheiten des ENaC untersucht. In Western-Blots konnten die einzelnen Veränderungen auf Proteinebene analysiert werden. Beide Ergebnisse wurden entsprechend der Erhöhung des subepithelialen Proteingehalts in entzündeter Mucosa durch einen Korrekturfaktor standardisiert. In der Immunhistochemie der Präparate wurde mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen die α -, β - und γ -Untereinheit des ENaC die Induzierbarkeit durch Aldosteron in der mucosalen Oberfläche nachgewiesen. In der Morphometrie wurden die Anzahl, die Länge und der Durchmesser der Krypten in Kontroll- und Colitisgewebe bestimmt. Zur Untersuchung der Zytokineffekte auf den ENaC wurden die in der Ussingkammer präinkubierten humanen Präparate schließlich in Northern Blots analysiert.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Elektrophysiologische Methoden: Prinzip

Im Kurzschlussstromexperiment nach Ussing kann aktiver Transport von passivem elektrogenem Transport in Epithelien abgegrenzt werden [Ussing et al., 1956]. In die Ussing-Kammer wird ein Darmstück wie eine trennende Membran zwischen zwei Flüssigkeitskompartimente eingespannt, welche eine Lösung gleicher Zusammensetzung enthalten. Alle äußeren Gradienten für passiven Transport wie z.B. Temperatur- und Ionenkonzentrationsunterschiede und der hydrostatische Druck werden eliminiert, der messbare Transport kann daher nur aktiv sein. Durch Applikation eines Kurzschlussstromes (I_{sc}) über eine externe Spannungsquelle wird die über dem Epithel durch aktive und passive Transportprozesse entstehende Potentialdifferenz kurzgeschlossen, also auf 0 mV justiert. Damit wird der elektrochemische Gradient, der die treibende Kraft für passive Transportprozesse darstellt, ausgeschaltet. So erfolgt kein passiver Netto-Teilchentransfer zwischen den beiden Kompartimenten, die Nettotransporte sind aktiv. Der gemessene Strom entspricht der Summe aller aktiven elektrogenen Ionenverschiebungen.

2.2 Präparate

2.2.1 Humanes Colon sigmoideum

Die Gewebestücke von humanem Sigmaepithel stammten aus Operationsresektaten von Patienten mit Colitis ulcerosa (engl.: Ulcerative Colitis, UC), die sich einer Colektomie mit Pouch-Anal-Anastomose unterzogen hatten. Die als Kontrollen dienenden Sigmaepithelien wurden aus Operationen von Sigma- und Rektumkarzinomen gewonnen und aus dem nicht befallenen Tumorrand entnommen. Weder die Colitis- noch die Karzinompatienten nahmen zum Zeitpunkt der Operation exogene Steroide ein. Im Durchschnitt betrug das Alter der Colitis-Patienten 43 Jahre, das der Karzinompatienten 64 Jahre.

Bei den Patienten wurden die in der Anästhesie der Charité – Campus Benjamin Franklin üblichen Narkotikakombinationen eingesetzt. Von der Einleitung der Anästhesie bis zur Entnahme des Operationsresektats vergingen 1,5 – 2 Stunden. Das

entnommene Resektat wurde in einem Plastischälchen zur Pathologie transportiert, wo der zuständige Pathologe nach sorgfältiger Inspektion ein Stück des Resektats herausschnitt. Dieses Gewebestückchen wurde dann in ein Schälchen mit oxygenierter Ringerlösung überführt und auf Eis ins Labor transportiert. Dort wurde mit der Präparation zügig begonnen.

Die Untersuchungen wurden nur an Gewebsteilen durchgeführt, die makroskopisch eine milde bis moderate Aktivität der Colitis aufwiesen (Truelove I-II), ulzerierte Gebiete wurden ganz vermieden. Bei den Karzinompatienten wurden die Gewebsteile aus dem Sicherheitsabstand entnommen. Von der Entnahme des Resektats aus dem Operationsgebiet bis zum Einspannen des Epithels in die Ussingkammer vergingen insgesamt ca. 45 Minuten.

2.2.2 Präparation und Einspannen der Epithelien

Bei Ankunft der humanen Gewebestücke im Labor folgte umgehend die Präparation. Es wurde eine Technik verwendet, die in der Literatur als sogenanntes „partielles Strippen“ bekannt ist.

Dabei wurde die Tunica muscularis propria entfernt, wie bei Nellans et al. [1974] beschrieben. Histologisch setzte sich somit das Präparat aus Lamina epithelialis, Lamina propria mucosae, Lamina muscularis mucosae und Tela submucosa mit dem enthaltenen Plexus submucosus (Meissner) zusammen (Abb. 2). Hierfür wurde das Gewebe mit der Epithelzellschicht nach unten, also serosale Seite nach oben, auf eine mit einer Plastikfolie bedeckte Silikonplatte gelegt und mit Stahlnadeln fixiert, die schräg vom Rand her unterhalb der Tunica muscularis durch die gut sichtbare Submucosa und Mucosa in die weiche Unterlage gesteckt wurden. Die Fixierung der Stahlnadeln geschah so, dass das Gewebe leicht gespannt war (Dehnungsfaktor ca. 1,5 in beide Richtungen). Es folgte nun die Abpräparation der Tunica muscularis von der Tela submucosa, die vorsichtig vom Rand her begonnen wurde. Mit einer Pinzette wurde die Tunica muscularis unter leichtem Zug angehoben und schließlich die beiden Schichten mit dem Skalpell voneinander getrennt. Bei Colitis-entzündetem Gewebe war dies zum Teil schwierig, da die einzelnen Schichten durch Fibrosierung bereits miteinander verbacken waren; die richtige Ebene ließ sich daher nicht immer auf Anhieb finden. Mit einem Gewebekleber (Histoacrylkleber, Braun Melsungen AG,

Melungen) wurde nun nach Entfernen der Muscularis propria ein Kunststoffring (innerer Durchmesser von 8,8 mm) auf die frei liegende Tela submucosa geklebt und dieser dann in den Epithelcontainer eingesetzt.

Als Halterung des Epithels in der Messkammer diente ein Epithelcontainer, der sich aus zwei runden Plexiglasscheiben zusammensetzte. In der Mitte befand sich jeweils eine rundliche Öffnung mit einem Durchmesser von 6 mm. In einer der beiden Scheiben wurde der Rand der Öffnung durch einen Silikonring (Wacker Silicone RTV-E 604 A, Härter RTV-E 604 B, Mischungsverhältnis 9:1, Wacker Chemie GmbH, München) begrenzt, über den der Kunststoffring mitsamt der aufgeklebten serosalen Seite des Epithels gelegt wurde. Die andere Hälfte des Epithelcontainers wurde dann über die mucosale Seite gelegt, wobei die beiden Plexiglashälften genau ineinander passten. Dadurch konnte gewährleistet werden, dass der Kleberand zwischen Epithel und Kunststoffring außerhalb des Silikonrings lag und die Messergebnisse durch hierdurch verursachte Schäden nicht beeinflusst werden konnten. Die exponierte Epithelfläche in der Messkammer betrug $0,28 \text{ cm}^2$. Der mit distalem Colon des Menschen bestückte Epithelcontainer wurde dann in die Messkammer (Aufbau siehe Abbildung 3) eingesetzt. Es vergingen vom Beginn der Präparation bis zum Einsetzen der Epithelien etwa 15 bis 20 min.

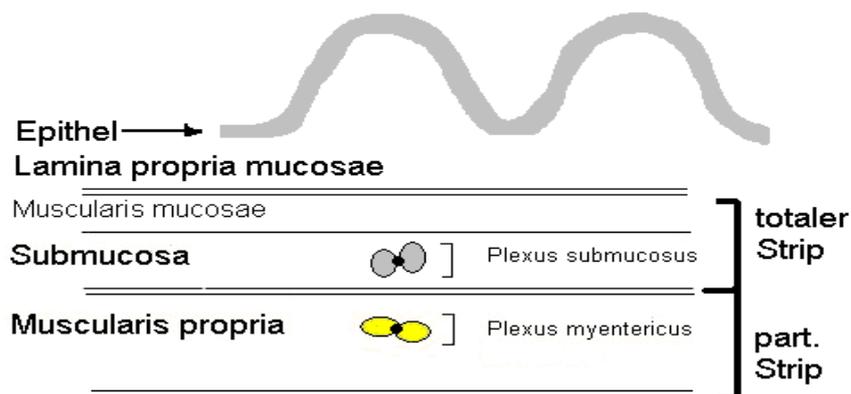


Abb. 2: Schematische Darstellung der Darmwand und der bei der Präparation entfernten Gewebeschichten

Partieller Strip: Entfernung nur der Muscularis propria bei Erhaltung der Submucosa. Totaler Strip: Entfernung auch der Submucosa und der äußeren Längsmuskelschicht der Muscularis mucosae. Modifiziert nach Hegel et al. [1991].

2.3 Versuchsstand

2.3.1 Messkammer und Wärmetauscher

Die Messkammer mit ihren zwei symmetrischen Hälften wurde durch das eingespante Epithel getrennt und war das zentrale Element des Versuchsstandes. In der Messkammer wurde das Epithel mit einer Badlösung umspült, der Kurzschlussstrom appliziert und die elektrischen Parameter gemessen.

Zylinderförmige Konstruktionen aus Acrylglas (Konstruktion der Forschungswerkstatt der Charité – Berlin, Campus Benjamin Franklin) wurden hierbei als Kammerhälften benutzt. Ihr Innenraum war konisch und die offene „Kegelbasis“ zeigte zum Epithel hin. Vier kleine Kanäle durchkreuzten jede Kammerhälfte. Durch die zwei Kanäle im Dach der Kammerhälfte bestand über elastische Kunststoffschläuche Verbindung zum Badlösungsreservoir und zum Wärmetauscher. Die seitlichen Kanäle nahmen die Spannungs- bzw. Stromelektroden auf. Die beiden Kammerhälften ließen sich exakt zusammenfügen, da auf der einen Seite der Kammer zwei Stahlstifte eingelassen waren, denen auf der anderen Seite zwei Bohrungen entsprachen.

Bei dem Wärmetauscher, der als Badlösungsreservoir diente, handelte es sich um eine doppelwandige Glaskonstruktion, die zwei nebeneinander liegende Hohlzylinder bildete. Die beiden Hohlzylinder liefen in dünnlumigen Kanälen zu, die dann über die schon erwähnten Kunststoffschläuche mit der jeweiligen Messkammerhälfte verbunden waren. In den epithelnahen dünnlumigen Kanälen befanden sich zwei Öffnungen, die der Begasung der Badlösung mit 95 % O₂ und 5 % CO₂ dienten. Außerdem wurde hiermit eine Umwälzung der Badlösung erreicht. Die Fließrichtung verlief dabei vom epithelfernen zum epithelnahen Kanal, von dort dann zum Lösungsreservoir und schließlich wieder über den epithelfernen Kanal in die Messkammer. Ein konstanter Gehalt an O₂ und CO₂ war dadurch in der Badlösung gegeben und auch die hiervon abhängige Konstanz des pH-Wertes gewährleistet. Außerdem bewirkte dieser Versuchsaufbau eine Minimierung der Dicke gering oxygenierter unbewegter Schichten der Badlösung. Diese hätten sonst zu frühzeitigen trophischen Schädigungen des Epithels während des *in vitro* Versuchs führen können.

Durch den kontinuierlichen Umwälzungsfluss der Badlösung wurde daher eine dauerhafte Exposition mit Sauerstoff und den in der Badlösung enthaltenen Nährstoffen ermöglicht. Die Badlösung selbst wurde von einer Flüssigkeit umspült, die während des gesamten Versuchs auf konstante 37 °C erwärmt wurde. Diese befand sich in einem Hohlraumssystem innerhalb des doppelwandigen Wärmetauschers und war über ein Schlauch- und Pumpensystem mit einem Wärmebad (Fa. Haake, Berlin) verbunden.

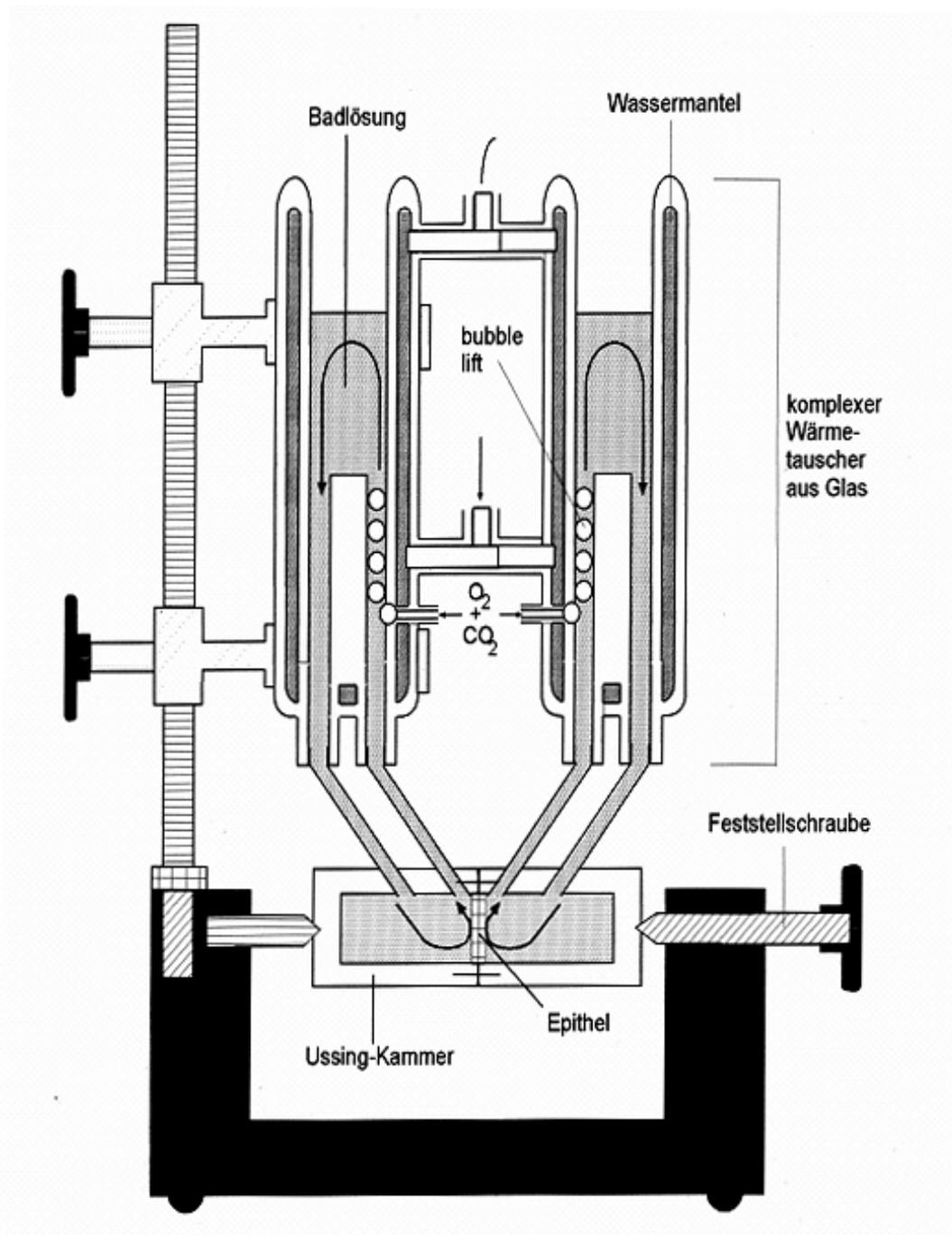


Abb. 3: Versuchsstand mit Wärmetauscher, Begasung und Umwälzung (sog. bubble lift)

Wie eine „Trennmembran“ ist das Epithel zwischen den beiden Kammerhälften der Ussing-Kammer eingespannt und wird von 37 °C warmer Badlösung umspült. Die Erwärmung der Badlösung erfolgt über einen komplexen Wärmetauscher, wobei sich in der doppelten Wandung des Hohlzylinders Wasser befindet, das über ein temperiertes Wärmebad umgewälzt wird. Die Zirkulation der Badlösung wird durch die aufsteigenden Gasbläschen aus 95 % O₂ und 5 % CO₂ (bubble lift) aufrechterhalten.

2.3.2 Elektrische Messanordnung

Die von Ussing und Zerahn 1951 beschriebene 4-Elektroden-Technik war Vorlage für die Anordnung der Messelektroden. Die Spannungselektroden wurden zur Messung der transepithelialen Potentialdifferenz benutzt und waren so epithelnah wie möglich positioniert. Die Dicke der Flüssigkeitsschicht zwischen Epithel und Elektrodenspitze konnte so sehr gering gehalten werden (Abstand < 2 mm). Die Stromelektroden hingegen waren so weit wie möglich in der Kammer vom Epithel entfernt und dienten der Einspeisung des Klemmstroms. Der Abstand zum Epithel betrug hier ca. 20 mm. Durch die große Entfernung konnte weitgehend ein homogenes elektrisches Feld im Bereich des Epithels erreicht werden.

Als Spannungselektroden wurden KCl-Kalomelektroden verwendet (363 7S/120 Bezugs elektrode, Fa. Ingold, Steinbach), als Stromelektroden dienten hingegen gesinterte ringförmige Ag/AgCl-Elektroden. Als stromleitende Lösung wurde KCl-Lösung benutzt. Um eine Verbindung von der stromleitenden Lösung zum Inneren der Messkammer zu schaffen, wurden Verbindungsstücke in Form von Agarbrücken (Zusammensetzung: Agar-Agar 30 g% und NaCl 1,8 g/dl) eingesetzt. Das eine Ende der Brücken wurde durch die seitlichen Kanäle in die Messkammer vorgeschoben, das andere Ende wurde während des Versuchs in die gesättigte KCl-Lösung getaucht.

In vorgewählten Zeitintervallen wurden die Stromimpulse aus der Messkammer an einen PC über eine computergesteuerte Spannungsklemmeinrichtung weitergeleitet (CVC 6, CVC 8, Fa. Fiebig, Berlin). Die Messungen wurden hier registriert und auf dem Bildschirm sichtbar gemacht. Der Nettoionenflux, die transepitheliale Spannung und der Gesamtwiderstand des Epithels wurden bestimmt. Desweiteren wurde auch der Kurzschlussstrom über diese Apparatur appliziert. Herr Ing. grad. Detlef Sorgenfrei vom Institut für Klinische Physiologie der Charité – Campus Benjamin Franklin hat die Software dazu entwickelt.

Die Messanordnung stellt sich wie folgt dar (Abb. 4):

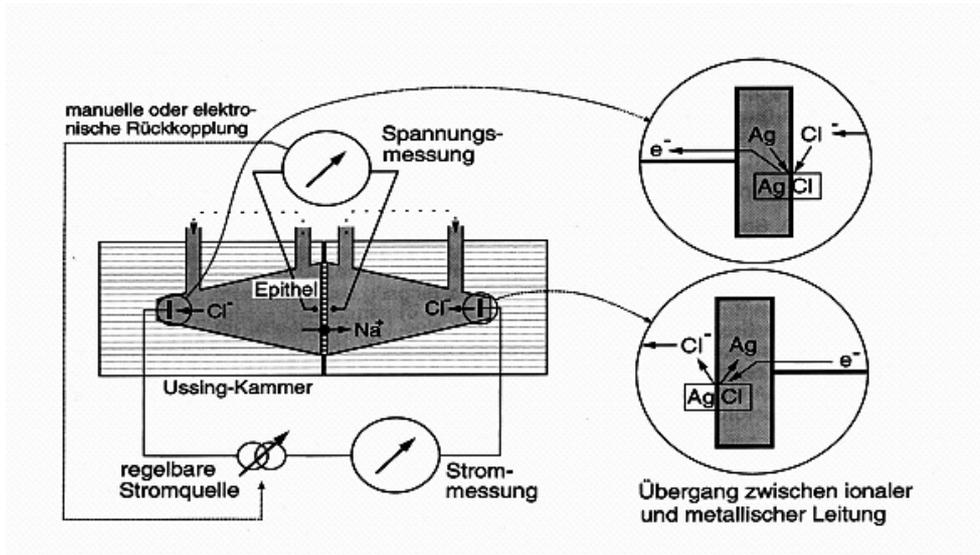


Abb. 4: Elektrische Messanordnung der Kurzschlussstromversuche nach Ussing

Die epithelnah gelegenen Spannungselektroden messen die transepitheliale Spannung, während über die epithelfernen Elektroden der Kurzschlussstrom appliziert wird. Es entsteht ein homogenes Feld über dem Epithel. Mit Hilfe der Ag/AgCl -Elektroden erfolgt der Übergang zwischen elektrischer und ionaler Leitung. Modifiziert nach Hegel et al. [1993].

2.4 Versuchsablauf

2.4.1 Messung des Kurzschlussstroms

Die computergesteuerte Spannungsklemmeinrichtung bestimmte während der Experimente jede Minute den Kurzschlussstrom, die transepitheliale Spannung und den elektrischen Widerstand. Die Potentialdifferenz wurde hierzu auf 0 mV gebracht, indem ein Strom entsprechender Größe nach einem Regelalgorithmus appliziert und im selben Moment registriert wurde. Zur Bestimmung des transepithelialen ohm'schen Widerstands wurden dem aktuellen Klemmstrom kurze rechteckige Stromimpulse überlagert, die die Spannung über dem Epithel änderten. Diese Änderung wurde dokumentiert und der Widerstand nach dem Ohmschen Gesetz $R = U/I$ errechnet:

$$R^t = dV_{ms} / dI_{sc}$$

Der gemessene Kurzschlussstrom entsprach dem Anteil der aktiv elektrogen transportierten Teilchen, da alle elektrochemischen und hydrostatischen Gradienten für passiven Transport ausgeschaltet waren (gleiche Zusammensetzung und Füllhöhe der Badlösung auf beiden Seiten des Epithels). Der Kurzschlussstrom kann

der Badlösung auf beiden Seiten des Epithels). Der Kurzschlussstrom kann als Strom pro Flächeneinheit in $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ oder als Teilchenflux monovalenter Kationen pro Flächeneinheit in $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ angegeben werden. Aus der Faraday-Konstanten ($F=96487$ Coulomb/mol) ergeben sich die Umrechnungsfaktoren:

$$\text{Flux: } \frac{M}{t \cdot A} \left[\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2} \right] = \frac{3600}{96487} \cdot \frac{I}{A} = 0,037 \cdot \frac{I}{A}$$

$$\text{Strom: } \frac{I}{A} \left[\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2} \right] = \frac{96487}{3600} \cdot \frac{M}{t \cdot A} = 26,8 \cdot \frac{M}{t \cdot A}$$

A Fläche

I Stromstärke

M Menge der transportierten Ionen

t Zeit

Zwischen den einzelnen Messungen wurde keine externe Spannung angelegt, es lagen also sog. open-circuit-Bedingungen vor.

2.4.2 Bestimmung des elektrogenen Na^+ -Transports

Es handelt sich hierbei um einen primär aktiven Transport, der hormonell reguliert wird und im distalen Colon entscheidend zur Konzentration der Faeces beiträgt. An den hormonellen Regulationsmechnismen sind hauptsächlich die Mineralocorticoide beteiligt, unter ihnen hat besonders das Aldosteron größte Bedeutung. Aldosteron bewirkt am Rektum und Sigma des Menschen bzw. am spät-distalen Colon von Nagetieren eine dosisabhängige Dichte-Zunahme der Na^+ -Kanäle in der apikalen Membran und ebenso eine Induktion der Na^+/K^+ -ATPase auf der basolateralen Seite. Natrium wird dabei durch den apikal lokalisierten Na^+ -Kanal in die Epithelzelle aufgenommen. Dieser Einstrom geschieht durch das Konzentrationsgefälle für Natrium, welches durch die Na^+/K^+ -ATPase auf der basolateralen Seite aufrechterhalten wird. Das Konzentrationsgefälle fungiert hier als treibende Kraft. Insgesamt resultiert aus diesen Teilkomponenten ein transepithelialer Natriumtransport, der unter Nettoladungsverschiebung verläuft und daher auch als elektrogen bezeichnet wird (Abb. 5).

Die elektrogene Cl^- -Sekretion wurde kurz nach Einspannen des Epithels durch Zugabe des Schleifendiuretikums Bumetanid in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l auf der serosalen Seite gehemmt, da sie bei der Bestimmung des elektrogenen Natrium-Transports ohnehin nicht von Interesse war. Dieses Vorgehen wurde aufgrund vorliegender Ergebnisse einer Arbeit von Sandle [1989] gewählt. Er hatte gezeigt, dass durch das Ersetzen von Cl^- -Ionen in der Badlösung durch Sulfationen der basale Kurzschlussstrom um 50 % reduziert werden konnte und sich der elektrogene Natrium-Transport *in vitro* erheblich gesteigert hatte. Auch in früher durchgeführten Versuchen bei uns zeigten sich am humanen Rektumepithel über Stunden stabil hohe Kurzschlussstromwerte, die bei Bumetanid-Zugabe um mehr als 50 % gesenkt werden konnten. Es ließ sich folgern, dass es bei der Anordnung *in vitro* zu einer spontanen elektrogenen Cl^- -Sekretion im unstimulierten Zustand kommt, die etwa 50 % des Kurzschlussstroms ausmacht.

Zur Stimulation des elektrogenen Natrium-Transports wurde ca. 10 – 15 min nach Einspannen des Epithels das Hormon Aldosteron in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-9}$ mol/l sowohl auf der mucosalen als auch auf der serosalen Seite der Badlösung zugeführt. Nach 8 Stunden erfolgte dann die Zugabe von 10^{-4} mol·l⁻¹ des K^+ -sparenden Diuretikums Amilorid in beide Kammerkompartimente, welches einen spontanen Abfall des Kurzschlussstroms nach sich zog. Die Differenz des Kurzschlussstroms kurz vor und 10 min nach der Amilorid-Gabe ergab den aktiven elektrogenen Natriumtransport, da nur der Na^+ -Transport durch Amilorid hemmbar war.

Für die Versuche mit pro-inflammatorischen Zytokinen wurden ähnliche Abläufe praktiziert. Zunächst wurde das humane Epithel 2 Stunden lang mit $\text{IFN-}\gamma$ (1000 U/ml) inkubiert. Es folgte die 6-stündige Inkubation mit $\text{TNF-}\alpha$ (100 ng·ml⁻¹). Die Gabe von $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ (Geschenk der Fa. Schering, Berlin + 20 μl BSA jeweils) erfolgte dabei grundsätzlich serosal. Nach dieser 8-stündigen Inkubationsphase wurden schließlich $3 \cdot 10^{-9}$ mol·l⁻¹ Aldosteron zugegeben und wie oben beschrieben nach weiteren 8 Stunden durch die Gabe von Amilorid der elektrogene Na^+ -Transport bestimmt.

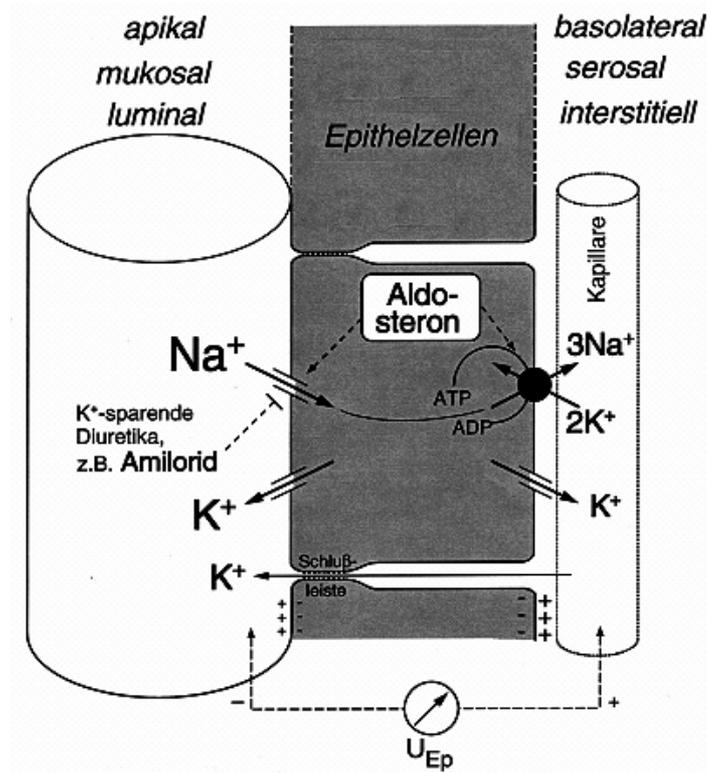


Abb. 5: Modell des elektrogenen Na^+ -Transports im Colon

Aldosteron bewirkt eine Zunahme der Dichte der epithelialen Na^+ -Kanäle, so dass Na^+ vermehrt in die Zelle einströmt. Die hierfür notwendige treibende Kraft, ein Konzentrationsgefälle, wird durch die basolateral lokalisierte Na^+/K^+ -ATPase realisiert. Es entsteht ein transzellulärer, elektrogener Na^+ -Transport. Unter Gabe von 10^{-4} mol/l Amilorid kommt es zu einer nahezu vollständigen Blockade der epithelialen Na^+ -Kanäle.

2.5 Lösungen und Testsubstanzen der elektrophysiologischen Experimente

2.5.1 Badlösung

Die als Badlösung verwendete Standard-Ringer-Lösung [Schulzke et. al., 1986] bestand aus folgender Zusammensetzung:

Elektrolytkonzentrationen (in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$):

Na^+	140,5
Cl^-	123,8
K^+	5,4
Ca^{2+}	1,2
Mg^{2+}	1,2
HPO_4	2,4
H_2PO_4	0,6
HCO_3	21,0

Substrate für das Epithel in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ nach Windmüller und Späth [1978]:

D(+)-Glukose	10,0
β -OH-Butyrat	0,5
Glutamin	2,5
D(+)-Mannose	10,0

Durch die Begasung der Lösung mit 95 % O_2 und 5 % CO_2 betrug der pH-Wert 7,4 bei 37 °C. Die Osmolalität der Lösung lag bei $290 \text{ mosmol}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Zur Vermeidung von Bakterienwachstum während der 8 und mehr Stunden dauernden Versuche wurde der Badlösung 50 mg/l Azlocillin (SecuroopenTM, Fa. Bayer, Leverkusen) zugesetzt. Einflüsse des Antibiotikums auf den Kurzschlussstrom wurden in Vorversuchen ausgeschlossen.

Die folgenden Substanzen wurden benutzt und charakterisierten die Transport- und Barriereigenschaften des Epithels:

2.5.2 Aldosteron

Aldosteron führt nach dem Andocken am intrazellulären Steroidrezeptor zur Steigerung der Transkription und Translation des ENaC. Damit werden die Na^+ -Kanäle in der apikalen Membran vermehrt eingebaut, was zu einem gesteigerten Einstrom von Na^+ in die Zelle führt. Die Na^+/K^+ -ATPase auf der basolateralen Seite gewährleistet das nötige Konzentrationsgefälle für Na^+ in die Zelle hinein. Es resultiert daher ein verstärkter aktiver elektrogener Na^+ -Transport über das Epithel. Nach einer Stunde Latenz ist bereits ein Anstieg des Transports sichtbar, nach 6-8 h ist das Maximum erreicht.

Aldosteron wurde ca. 15 min nach Beginn der Messung in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-9}$ mol/l serosal und mucosal zugefügt.

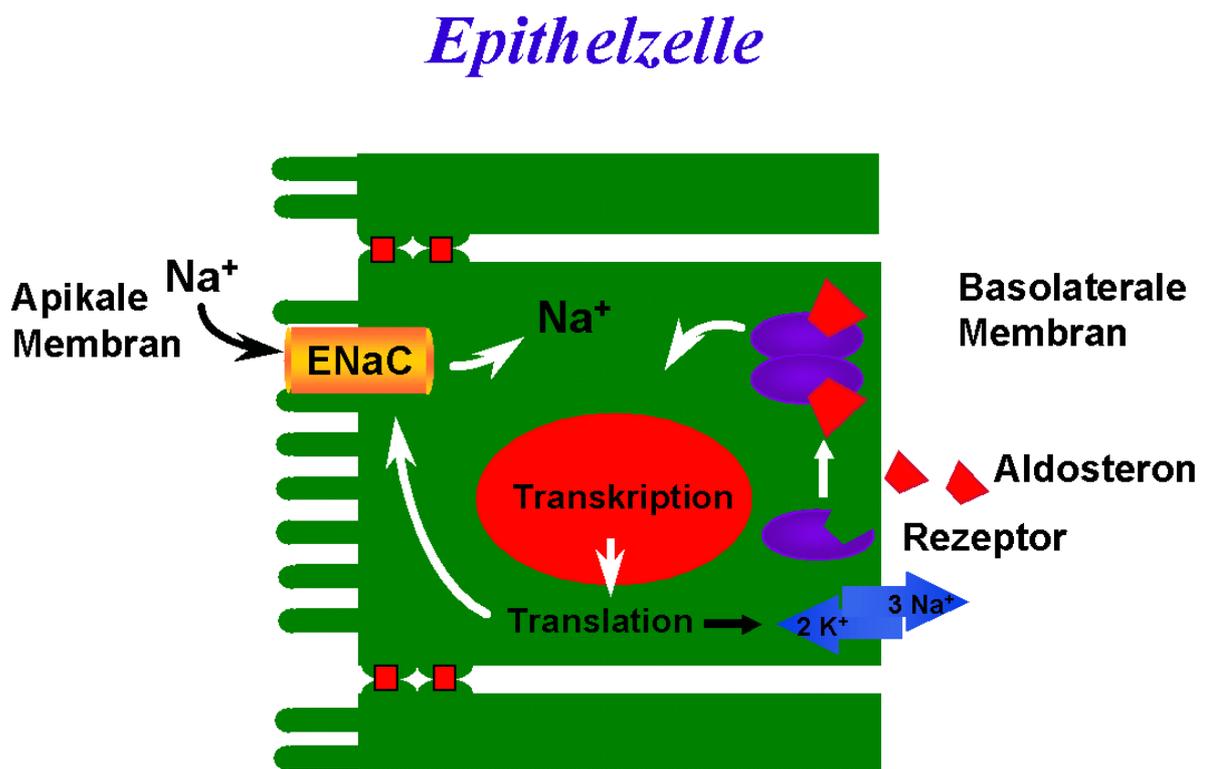


Abb. 6: Aldosteron, Wirkung am Rezeptor, Induktion Transkription und Translation

2.5.3 Amilorid

Dieser Stoff aus der Klasse der K^+ -sparenden Diuretika hemmt hochselektiv die epithelialen Na^+ -Kanäle in der Zellmembran. Die aktive elektrogene Na^+ -Resorption, die sich aus dem passiven Na^+ -Einstrom apikal und dem aktiven Transport aus der Zelle serosal durch die Na^+/K^+ -ATPase zusammensetzt, kommt durch Amilorid zum Erliegen.

Es kam eine 10^{-3} molare Lösung Amilorid-Hydrochlorid (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen) zum Einsatz. Zunächst wurde 1 ml der Badlösung abpipettiert, um ihn durch 1 ml Amilorid-Lösung zu ersetzen. Von der Endkonzentration in der Badlösung von $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ist bekannt, dass sie zu einer nahezu vollständigen Hemmung des aktiven Na^+ -Transports führt [Benos, 1982].

2.5.4 Bumetanid

Diese Substanz blockiert selektiv den $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Carrier [Geck, 1986]. Hierbei handelt es sich um einen sekundär-aktiven Transporter, der entscheidend an der Cl^- -Sekretion beteiligt ist, da er im Darm auf der basolateralen Seite neben einem Na^+ - und einem K^+ -Ion zwei Cl^- -Ionen entlang eines mäßigen chemischen Gradienten in die Zelle aufnimmt. Auf der apikalen Seite gelangen die Cl^- -Ionen nach luminal durch einen Kanal, dessen Regulation durch intrazelluläre second messenger wie cAMP, cGMP und Calcium vermittelt ist. Man findet $Na^+K^+2Cl^-$ -Carrier in vielen Geweben [Binder & Sandle, 1987], so z.B. als NKCC1 im gesamten Dün- und Dickdarm und als NKCC2 im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife, wo er jedoch apikal lokalisiert ist. Die Chloridsekretion im Darm spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Diarrhoen, da eine vermehrte luminale Chloridkonzentration osmotisch wirksam ist und Wasser mitzieht.

Bumetanid (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen) wurde in einer Konzentration von 10^{-3} mol/l in Standardlösung ohne Substratzusatz gelöst. Zum Erreichen einer Konzentration von 10^{-5} mol/l in der Badlösung wurden $100 \mu\text{l}$ auf der serosalen Seite appliziert, da der Transporter im Colon basolateral lokalisiert ist. Durch diese Konzentration konnte eine mehr als 95 %ige Hemmung des Chlorid-Transports erreicht werden [Schlatter, 1983].

2.5.5 TNF- α und IFN- γ

Die pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ werden bei Colitis ulcerosa in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen. Sie sind an komplexen Mechanismen im Entzündungsablauf beteiligt. Neuere Therapieansätze bei Colitis ulcerosa mit TNF- α -Antikörpern wie Infliximab zeigten erste Erfolge. In den Versuchen wurde IFN- γ in der Konzentration 1000 U/ml und TNF- α in 100 ng·ml⁻¹ (beides Fa. Schering, Berlin) eingesetzt. Die Zugaben erfolgten auf der serosalen Seite.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Proteinextraktion aus humanem Colon sigmoideum

Hierbei handelt es sich um die gesamte Präparation von drei unterschiedlichen Proteinfractionen aus humanem Sigma, das zuvor im Ussing-Kammer-Experiment mit Aldosteron und je nach Versuchsansatz mit den Zytokinen inkubiert worden war. Mit der gesamten Präparation sind sowohl die gesamten Proteine sowie auch die membranständigen und zytosolischen Proteinfractionen gemeint. Das Gewebe wurde hierzu mit Hilfe von Potttern in 900 μ l Lysepuffer zerkleinert und zu einer möglichst homogenen Flüssigkeit verarbeitet. Anschließend wurden die Proben in Eppendorfröhrchen überführt und 3 mal gefroren und wieder aufgetaut. Zum Frieren wurde Stickstoff benutzt und zum Auftauen ein Heizblock bei 37 °C. Zur weiteren Zerkleinerung des Gewebes wurde die Flüssigkeit jeweils 10 mal in eine 20 G-Kanüle sowie in eine 26 G-Insulinkanüle aufgesaugt und wieder abgelassen. Es folgte ein erster Zentrifugationsschritt der Proben, 5 min bei 200 g und Raumtemperatur. Der abzunehmende Überstand nach der Zentrifugation ergab das Gesamtlysat und wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nun wurde das Lysat für 30 min nochmals zentrifugiert, jetzt bei 43000 g und bei einer Temperatur von 4 °C. Der jetzt deutliche Überstand ergab die gelöste Fraktion und wurde vorsichtig abpipettiert. Dem zurückbleibenden Pellet wurden 75 μ l eiskalter Lysepuffer zugefügt, so dass es sich wieder löste und nun die sogenannte cold membrane fraction vorlag (membranständiges Protein). Die Proben konnten bei -80°C asserviert werden oder direkt im Anschluss zur Proteinbestimmung verwendet werden.

2.6.2 Proteinquantifizierung

Zur Proteinquantifizierung wurden Mikrotiterplatten benutzt. Zu den jeweils 10 μl Probe (2,5 μl Probe + 7,5 μl Lysepuffer) wurden 190 μl Gebrauchslösung pipettiert. Lysepuffer und eine Standardreihe mit vier verschiedenen konzentrierten BSA-Lösungen: 0,0–0,2–0,8–1,2 mg BSA/ml dienten als Kontrolle. Für die Proben und die Kontrollen wurden Doppelwerte angesetzt.

In jeder Vertiefung befanden sich insgesamt 200 μl

	1	2	3	4
A	0,0 mg/ml BSA	0,0 mg/ml BSA	Probe 1	Probe 1
B	0,2 mg/ml BSA	0,2 mg/ml BSA	Probe 2	Probe 2
C	0,8 mg/ml BSA	0,8 mg/ml BSA	Probe 3	Probe 3
D	1,2 mg/ml BSA	1,2 mg/ml BSA	Probe 4	Probe 4
E	Lysepuffer	Lysepuffer	Lysepuffer	Lysepuffer

Die gesamte Mikrotiterplatte wurde dann für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und danach auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur Proteinquantifizierung erfolgte nun die Messung der Extinktion bei 562 nm mit dem Plattenlesegerät Spectra Classic (Fa. Tecan, Crailsheim). Aus dem Mittel der Probenwerte wurde schließlich die Konzentration der Proteine in den Proben ermittelt, allerdings mussten hierbei die Lysepuffer-Werte noch abgezogen werden. Aus den Standardwerten ließ sich durch lineare Regression eine Eichkurve bilden.

2.6.3 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)

In der PAGE werden Proteine in einem elektrischen Feld anhand ihrer Molekülgröße und Ladung aufgetrennt. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine durch das Polyacrylamidgel abhängig von der angelegten Spannung, den Pufferbedingungen sowie von der Prozentigkeit des Polyacrylamidgels. Will man sehr große Proteine auftrennen, verwendet man niedrigprozentige Gele, für kleinere Proteine nimmt man entsprechend höherprozentige Gele.

Um die Gele zu gießen, wurden zwei Mini-Protean-Apparaturen (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) vorbereitet. Die Gelkammern bestanden aus je zwei Glas-

scheiben, die durch zwei 1,5 mm dicke Abstandhalter getrennt waren, und wurden in die Apparaturen eingespannt. Das Trenngel wurde zur gewünschten Prozentigkeit des Gels aus den verschiedenen Inhaltsstoffen zusammengemischt und dann zügig ohne Luftblasen in die Gelkammern pipettiert. Durch die Beschichtung der Trenngel mit 1 ml absolutem Alkohol konnte eine saubere Linie zwischen Sammel- und Trenngel gewährleistet werden. Nach 30 min Polymerisationszeit erfolgte das Abgießen des Alkohols, das Sammelgel konnte nun vorsichtig bis zur Oberkante der kleinen Glasplatte aufgeschichtet werden. Um die Vertiefungen für die Aufnahme der Proben zu schaffen, wurde luftblasenfrei ein Kamm eingesetzt. Nach 30 min Polymerisation wurde der Kamm vorsichtig wieder gezogen und die Probenaschen jetzt mit reichlich Elektrophoresepuffer gespült, so gelang es, eventuelle Gelreste aus den Taschen zu entfernen. Die Gele konnten dann in die Elektrodenhalterung eingespannt und in die Elektrophoresekammern eingesetzt werden, wobei die Kammer mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt wurde.

Die Proteinproben wurden mit $\frac{1}{4}$ Vol. 5 x Laemmli-Puffer gemischt, anschließend zur Denaturierung für 5 min bei 95 °C inkubiert und schließlich in die Probenaschen des Polyacrylamidgels gegeben. Die Elektrophorese wurde nun gestartet bei konstanter Spannung von 70–100 Volt und lief mindestens eine Stunde. (Zeit variabel je nach Proteingröße und gewünschter Auftrennung der einzelnen Banden). Das Fortschreiten der Elektrophorese konnte durch die Wanderung des Bromphenolblau-Farbstoffs kontrolliert werden.

2.6.4 Western-Blot

a) Elektrotransfer

Mit dem Western-Blot kann man Proteine, die mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese entsprechend ihrer Größe und Lage aufgetrennt wurden, auf einer Nylonmembran fixieren, um anschließend spezifische Proteine mit dafür geeigneten Antikörpern nachzuweisen. Der Transfer der Proteine aus der Gelmatrix auf diese Nylonmembran erfolgte im elektrischen Feld. Zunächst wurde eine Membran (Poly Screen PVDF) passend zur Größe des Polyacrylamidgels zurechtgeschnitten und diese dann 5 min. lang mit absolutem Alkohol benetzt. Nun wurden die Membran, das Polyacrylamidgel, 2 Schwämme und zwei Whatman 3MM Filterpapiere für 5 min zur Equilibrierung in Transferpuffer gegeben. Das sog. „Sandwich“ in der Transferkammer setzte sich nun wie folgt zusammen:

Klares Panel (klare Plastikscheibe mit Löchern)

Schwamm

Whatman-Filter

Nylonmembran (NC)

Gel

Whatman-Filter

Schwamm

Schwarzes Panel (schwarze Plastikscheibe mit Löchern)

Das Sandwich wurde in die Elektrodenkammer eingesetzt, mit dem schwarzen Panel zur Kathode. Beim Einsetzen der Elektrodenkammer in die Transferkammer wurden noch ein Kühlakku und ein Rührstäbchen dazugegeben und das Ganze schließlich mit Transferpuffer angegossen. Die komplette Apparatur wurde danach auf einen Magnetrührer gestellt und an den Strom angeschlossen. Der Transfer der negativ geladenen Proteine auf die positiv geladene Nylonmembran erfolgte für eine Stunde bei 100 Volt (konstant, Strom = 0,2 – 0,4 A).

b) Immundetektion

Bei der Immundetektion weist man spezifische Proteine, die auf einer Nylonmembran fixiert sind, mit Hilfe von Antikörpern nach. Zunächst wurde die Nylonmembran dazu kurz in PBS/Tween gespült und dann in einer Glasküvette mit 50 ml PBS/Tween/5 % Magermilchpulver zwei Stunden bei Raumtemperatur zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen inkubiert. Nach den zwei Stunden wurde erneut mit PBS/Tween gespült und anschließend über Nacht in einer neuen Küvette mit 50 ml PBS/Tween/5 % BSA/0,02 % NaAzid bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Vormittag wurde die Membran dann mit dem ersten Antikörper (50 ml polyklonaler Kaninchen-anti-human-Occludin-Antikörper, 1:10.000 in PBS/Tween/5 % BSA/0,02 % NaAzid) inkubiert und zwei Stunden bei Raumtemperatur langsam geschüttelt. Es folgte zweimal 10 min Waschen in PBS/Tween und einmal 10 min Waschen in TBS/Tween bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran in eine neue Küvette überführt und mit 10 µl des mit Peroxidase konjugierten zweiten Antikörper in 10 ml TBST/1 % Blockierreagenz versehen. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper betrug anderthalb Stunden bei Raumtemperatur. Die drei Waschschritte mit PBS/Tween bzw. TBS/Tween wurden wiederholt. Die Membran wurde dann für exakt

5 min in einer frischen Küvette mit 10 ml Lumi-Light-Lösung im Dunkeln inkubiert und als nächstes zwischen zwei Transparentfolien platziert. Im LAS 1000 wurde schließlich das Licht, das bei der Spaltung des Lumi-Light-Substrats emittiert wurde, detektiert und ein Röntgenfilm exponiert. Die Membran mit den zwei Transparentfolien konnte im Dunkeln in einer Filmkassette aufbewahrt werden.

2.6.5 Extraktion von Gesamt-RNA aus Gewebestücken

Ribonukleinsäuren (RNA's) sind lediglich einzelsträngig und weisen eine zusätzliche 2'-Hydroxylgruppe im Ribosering auf, weshalb sie für hydrolytischen Abbau besonders anfällig sind. Ribonukleasen (RNasen) brauchen im Unterschied zu Desoxyribonukleasen (DNAsen) keine zweiwertigen Metallionen als Kofaktoren, um eine Denaturierung herbeizuführen. Aus diesen Gründen sind RNA-Verarbeitungen äußerst anfällig für endo- und exonucleolytischen Abbau und ist die Präparation von RNA mit äußerster Sorgfalt vorzunehmen. Neben einer sauberen Arbeitsweise muss daher auch die Inaktivierung von RNasen gewährleistet sein. Eine Denaturierung auch extrem stabiler Proteine, wie z.B. RNasen, wird durch Guanidinthiocyanat (GCT) erreicht.

Nachdem die Ussing-Versuche beendet waren, wurden die verwendeten Gewebestücke in ein steriles 12 ml-Polypropylen-Greiner-Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) überführt und 6 ml einer Phenol-Guanidinthiocyanat-Lösung (RNAzol™, Wak-Chemie Medical GmbH, Bad Soden) hinzugegeben. Es folgte die Homogenisierung der Gewebestücke mittels eines Dispergiergerätes (Ultra Turrax, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen). Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurde dem Homogenat 1,2 ml CHCl_3 zugeführt und erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Als nächstes folgte eine Zentrifugation mit 11872 g über 30 min. Die obere wässrige Phase enthielt jetzt die RNA und wurde in ein weiteres Greiner-Röhrchen überführt. Nach der Gabe von 1 Vol Isopropanol auf das Homogenat wurde das Gemisch bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht gelagert, was die Fällung der RNA bewirkte. Am nächsten Tag folgte dann ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 11872 g über 30 min. Am Grund des Röhrchens bildete sich hier ein RNA enthaltendes Pellet. Nach dem vorsichtigen Abgießen des Überstands wurde dem Pellet zum Waschen 5 ml einer 70 %igen ETOH-Lösung zugegeben gefolgt von erneutem Zentrifugieren, diesmal über 15 min mit 11872 g zur Sedimentation der Pellets. Wiederum wurde der Überstand abgegossen,

das Pellet dann bei Raumtemperatur kurz getrocknet und schließlich in 50-75 μl H_2O resuspendiert. Die Menge der Gesamt-RNA wurde anschließend photometrisch bestimmt (Gene Quant II RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech Ltd., Cambridge).

2.6.6 Denaturierende RNA Gelelektrophorese

Zur Trennung, Identifizierung und Reinigung von Nukleinsäuren gelten Agarosegel-Systeme als Standardmethode. In einem elektrischen Feld werden die Nukleinsäure-Moleküle aufgetrennt. Die Geschwindigkeit der Moleküle hängt dabei von ihrer Gesamt-Nettoladung und Größe, von der Stromstärke, den Pufferbedingungen und der Agarose-Konzentration ab (Gele mit höheren Konzentrationen trennen kleinere RNA-Moleküle.)

Für das Erreichen einer guten Trennung mussten die RNA-Proben zunächst denaturiert werden. Dies wurde erreicht, indem sie vor der Gelbeladung mit $\frac{1}{2}$ Vol 3 x RNA Probenpuffer gemischt wurden und für 15 min bei 65 °C inkubiert und dann bis zur Gelbeladung auf Eis abgekühlt wurden. In dieser Arbeit wurde ein 1,5 %iges denaturierendes Agarosegel verwendet, wobei die Agarose zunächst in 1 x Formaldehyd Gel Puffer (Formaldehyde Gel Running Buffer 10 x, Eppendorf, Hamburg) durch Aufkochen gelöst wurde. Bei < 60 °C wurde dann 2 %iges (v/v) Formaldehyd zugegeben, das Gel ins Gelschiff gegossen und die Vertiefungen für die Proben durch das Einsetzen eines Kamms gebildet. Nach der Abkühlung des Gels wurde das Gelschiff horizontal in die Gelelektrophoresekammer eingesetzt und diese mit 1 x Formaldehyd Gel Puffer gerade das Agarosegel bedeckend aufgefüllt. Nach der Entfernung des Kamms wurden die denaturierten RNA-Proben in die Vertiefungen geladen. Für 2 – 2½ Stunden wurde jetzt eine Spannung von 4-5 V/cm angelegt. Anhand des Bromphenolblau-Farbstoffs konnte das Fortschreiten der Elektrophorese kontrolliert werden.

2.6.7 Northern Blot

Hierbei erfolgt die Identifizierung von RNA-Fragmenten mit Hilfe von markierten einzelsträngigen oder doppelsträngigen Proben. Es werden dabei komplementäre Zielsequenzen in einem komplexen Gemisch aus elektrophoretisch getrennten und immobilisierten Ribonukleinsäuren detektiert. Hier wurden radioaktive cDNA-Sonden benutzt, die spezifisch an die mRNA für die α -, β - und γ -Untereinheit des ENaC und

die GAPDH binden. Nach erfolgter Auftrennung im Agarosegel wurden die RNA-Fragmente auf eine Nylonmembran transferiert. Die relative Position der Fragmente blieb bei diesem Transfer erhalten. Dann erfolgte die Hybridisierung der Fragmente mit der radioaktiv markierten Sonde und der Nachweis der gebundenen Sonde mit einem Röntgen-Film oder alternativ mit einem Phosphor-Imager.

2.6.7.1 Kapillar-Transfer

Nachdem die Elektrophorese beendet war, wurde das Gel zunächst für 30 min in 1 % Glycin-Lösung, dann für 15 min in 0,05 mol/l NaOH vorsichtig bei Raumtemperatur geschüttelt und schließlich für mindestens 40 min in $20 \times$ SSC equilibriert. In der Zwischenzeit erfolgte das Zuschneiden der Membran entsprechend der Größe des Gels. Die Membran wurde in destilliertem H_2O kurz angefeuchtet und ebenfalls in $20 \times$ SSC equilibriert. Der Transfer erfolgte in folgender Apparatur:

Aufbau der Transferapparatur:

- Gewicht
- Papierhandtücher
- 3 \times Whatmann 3MM
- Nylonmembran
- Gel (upside down)
- Parafilmmaske
- 2 \times Whatmann 3MM
- Glas
- Gestell
- Wanne mit $20 \times$ SSC

Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran zunächst in $2 \times \text{SSC}$ gewaschen. Die Fixierung der RNA auf der Membran geschah dadurch, dass im UV-Crosslinker (Hoefer UVC 500 UV-Crosslinker, Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco) eine kovalente Bindung an die positiv geladene Membran durch Bestrahlung mit UV-Licht ($1200 \mu\text{J}/\text{cm}^2$) hergestellt wurde. Die Nylonmembran und das Gel wurden zur Kontrolle des Transfers unter UV-Licht angeschaut. Am Ende wurde die Nylonmembran in destilliertem Wasser gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet, so dass sie bis zur Hybridisierung aufbewahrt werden konnte.

2.6.7.2 Hybridisierung und Detektion

Die QuikHyb-Lösung (Fa. Stratagene) wurde für 10 min bei 68°C vorgewärmt und die Membran im 50 ml Falcon-Tube mit 5 ml QuikHyb-Lösung (Minimum $50 \mu\text{l}/\text{cm}^2$) für 15 min bei 68°C prähybridisiert. Als nächstes wurde die Sonde ($1\text{-}10 \mu\text{l}$) mit $50 \mu\text{l}$ herring sperm DNA ($10 \text{mg}/\text{ml}$) für 10 min bei 95°C denaturiert und danach für 5 min auf Eis gestellt. Die Prähybridisierungslösung wurde nun verworfen und die Sonde mit 5 ml QuikHyb-Lösung (frisch) zur Membran gegeben. Es folgte die Hybridisierung für 2 Stunden bei 68°C . Anschließend wurde die Membran gewaschen und dafür bei Raumtemperatur in $2 \times \text{SSC}/0,1\% \text{ SDS}$ für $2 \times 15 \text{ min}$ (Minimum $2,5 \text{ ml}/\text{cm}^2$) und bei $60\text{-}65^\circ\text{C}$ in $0,1\text{-}0,5 \times \text{SSC}/0,1\% \text{ SDS}$ für ebenfalls $2 \times 15 \text{ min}$ geschüttelt.

Es folgte ein kurzes Anfeuchten mit A. bidest, bevor die Membran für 5 min bei Raumtemperatur in 100 ml Waschpuffer geschüttelt wurde. Danach wurde sie bei Raumtemperatur für mehr als 60 min in 100 ml Blockierungslösung und für weitere 30 min bei Raumtemperatur in 50 ml Antikörper-Lösung geschüttelt. Schließlich wurde die Membran noch in 100 ml Waschpuffer für $2 \times 15 \text{ min}$ bei Raumtemperatur und dann in 20 ml Detektionspuffer für 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Membran wurde nun upside down für 5 min bei Raumtemperatur im Dunkeln in 2 ml Detektionslösung inkubiert. Die überschüssige Flüssigkeit wurde abgelassen und jetzt im LAS-1000 detektiert (alternativ: Röntgenfilm 15 s – 15 min exponieren).

2.6.8 Sondenherstellung für Northern Blots mittels DIG-PCR

Als Sequenzen für die Herstellung Digoxigenin-markierter Sonden für Northern Blots dienten cDNA Klone der α -, β - und γ -Untereinheit des Ratten-ENaC, welche von B. Rossier (Institut für Pharmakologie, Universität Lausanne) zur Verfügung gestellt wurden.

Als interner Standard diente die Detektion von Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-cDNA (GAPDH). Die PCR erfolgte in 30 Zyklen (GeneAmp PCR System 2400) nach den Herstellerangaben (Roche):

1 μ l	Template
5 μ l	DIG Probe 2 (Boehringer)
5 μ l	10 x PCR-Puffer (Roche)
2.5 μ l	25mM MgCl ₂ (Roche)
2 \times 2.5 μ l	Primer (je 25 pmol; 10 pmol/ μ l)
0,5 μ l	AmpliTaq (5 U/ μ l; Quiagen)
ad 50 μ l	H ₂ O

Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

2.7 Molekularbiologische Methoden: Geräte, Chemikalien, Puffer und Lösungen

2.7.1 Geräte

Agarosegel Elektrophorese Kammern	Biorad, München
Brutschrank	Heraeus, Hanau
GeneAmp PCR System 2400	PE-Applied-Biosystems, Weiterstadt
Heizblock	Grant, Berlin
Hybridisierungsöfen	Unitherm, Karlsruhe
Inkubator 1000, Uni max 1010	Heidolph, Kelheim
Luminiszenzbild Analysator (LAS 1000)	Fuji, Düsseldorf
Magnetrührer	Ika-Combimag, München
Mini-Protean 3 Elektrophoresesystem	Biorad, München
Mini Trans-Blot Transfer-Zelle	Biorad, München
Plattenlesegerät Spectra Classic	Tecan, Crailsheim
Thermostat 5320	Eppendorf, Köln
UV-Crosslinker	Pharmacia Biotech, Freiburg
Wasserbad SW 21/TWB 5	Julabo, Selbach
Wippe	Fröbel Labor Technik, Lindau
Zentrifugen	Hermle Z233MK, Wehingen Eppendorf 5414 C, Köln

2.7.2 Materialien

Gel-Blotting-Papier	Schleicher und Schuell, Dassel
10 ml PPN Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Kryo-Röhrchen	Brand, Wertheim
Magnetrührstäbchen	Merck, Berlin
Microtestplatten	Rotilabo, Karlsruhe
Nylon Membran	Roche, Mannheim
Pipetten	Eppendorf, Köln
Poly Screen PVDF-Transfer Membran	NEN, Köln
Röntgenfilm X-OMAT AR	Kodak, Rochester, New York
Röntgenfilm X-OMAT LS	Kodak, Rochester, New York
Standardtips 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Köln
Transparentfolien	Ahrend, Hannover

2.7.3 Chemikalien

Acrylamid	Serva Heidelberg
Agarose	Life Technologies, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Taufkirchen
Anti-Kaninchen IgG-POD-AK	Roche, Mannheim
BCA Protein Assay Reagenz A + B	Pierce, Rockford, Illinois
Bromphenolblau	Amersham Pharmacia Biotech Braunschweig
BSA (100 x)	BioLabs, Frankfurt am Main
Chloroform	Merck, Berlin
Dimethylformamid	Merck, Berlin
Ethidiumbromid	Life Technologies, Karlsruhe
Ethanol	J.T. Backer, Deventer, Niederlande
Formaldehyd	Merck, Berlin
Glycerol	Serva, Heidelberg
Glycin	Serva, Heidelberg
Herring sperm DANN	Life Technologies, Karlsruhe
Isopropanol	J.T. Backer, Deventer, Niederlande
Lumi-Light Western Blotting Kit	Roche, Mannheim
Magnesiumchlorid	Merck, Berlin
Methanol	Merck, Berlin
Natronlauge	Merck, Berlin
Natriumacetat	Merck, Berlin
Natriumchlorid	Serva, Heidelberg
Paraformaldehyd	Merck, Berlin
PBS-Tabletten	Life Technologies, Karlsruhe
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
SBTI	Sigma, Taufkirchen
SDS	Merck, Berlin
SSC 20 x	Life Technologies, Karlsruhe
Tris Base	Calbiochem, Bad Soden
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	Biorad, München
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	Biorad, München
Tris-HCl 1 M, pH 7,4	Life Technologies, Karlsruhe
Triton X 100	Roche, Mannheim
Tween 20	Sigma, Taufkirchen

2.7.4 Puffer und Lösungen

<u>5 % Magermilchpulver in PBS:</u>	5 g Magermilchpulver, PBS ad 100 ml
<u>5 % BSA in PBS:</u>	5 g BSA, PBS ad 100 ml
<u>Gebrauchslösung (Proteinquantifizierung):</u>	je Probe: 196 µl Pierce BCA Protein Assay Reagenz A 4 µl Pierce BCA Protein Assay Reagenz B
<u>10 x Puffer West:</u>	144 g Glycin 30,4 g Tris Base ad 1 l Aqua bidest
<u>Elektrophoresepuffer:</u>	100 ml Puffer West 10 ml 10 % SDS ad 1 l Aqua bidest
<u>Transferpuffer:</u>	100 ml 10 x Puffer West 100 ml Methanol ad 1 l Aqua bidest
<u>PBST:</u>	2 PBS-Tabletten auf 1 l Aqua bi- dest 1 ml Tween
<u>PBST/ 5 % Magermilchpulver:</u>	5 g Magermilchpulver PBST ad 100 ml
<u>BSA-Blockierungslösung:</u>	5 % BSA 0,02 % Natriumazid in PBST

Lysepuffer: 2 ml Tris HCl, pH 7,4
500 µl 1 M MgCl₂
200 µl 0,5 M EDTA
120 µl 0,5 M EGTA
Aqua bidest ad 100 ml

Für 5 ml Lysepuffer frisch ergänzen: 5 µl 1000 x SBTI
100 µl 50 x PPI
50 µl 100 x PIC
5 µl Aprotinin

2.8 Histologische Methoden

2.8.1 Morphometrie

Nach Beendigung des Ussingkammer-Experiments wurde das gestrippte Colongewebe sofort in 10 %iger Formalin Pufferlösung fixiert. Zur Quantifizierung der Krypten wurden die Präparate unter dem Lichtmikroskop und mit einer Digitalkamera sorgfältig betrachtet und die Anzahl der Krypten pro serosale Fläche bestimmt. Als nächstes wurden identische Präparate für mindestens 24 Stunden in Paraffin eingebettet und mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Von diesen Präparaten wurden anschließend die Länge und der innere Durchmesser der Krypten mit Hilfe des Mikroskops und eines Computerprogramms (Analysis) gemessen und statistisch ausgewertet.

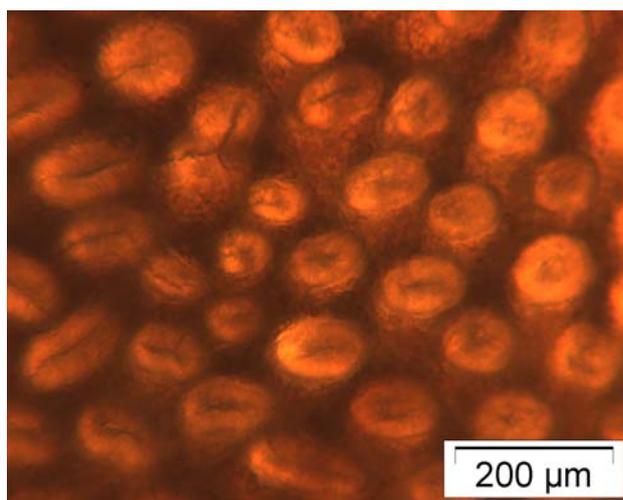


Abb. 7: Kryptendarstellung im Durchlichtmikroskop

2.8.2 Cryoschnitte

Zur Präparation der Cryoschnitte wurden die Gewebestücke zunächst in 30 %iger Sucrose-Lösung inkubiert. Im Cryostat wurden die Colonpräparationen bei 27 °C und mit einer Dicke von 8 µm geschnitten. Die Einbettung in Tissue Tek, eine Gewebefixierungslösung, erfolgte auf Trockeneis. Die Präparate wurden für die Querschnitte senkrecht auf Tissue Tek fixiert. Dann wurden die Schnitte auf Objektträger überführt, anschließend erfolgten die Immunfluoreszenzfärbungen.

2.8.3 Immunfluoreszenz

Die Objektträger wurden zuerst in einen Objektträgerhalter gestellt und dieser in den folgenden Färbeschritten von einer Küvette in die nächste gesetzt. Nach kurzem Waschen in PBS wurden die Schnitte 15 min lang in Paraformaldehyd 4 %ig fixiert und in 5 % Glycin inkubiert, dann wieder in PBS zweimal kurz gewaschen. Schließlich wurden die Präparate für 10 min in 0,5 % Triton-X in PBS-Lösung gegeben und permeabilisiert, nochmals in PBS gewaschen und dann für 30 min bei Raumtemperatur mit 0,5 % Goat-Serum in PBS blockiert. Es folgte das Auftragen des ersten Antikörpers, also anti-ENaC-alpha, -beta und -gamma auf die Objektträger, wobei jeder Objektträger immer nur einen Antikörper erhielt. Es handelte sich hierbei um polyklonale Anti-Rabbit-Antikörper (Alpha Diagnostic International), die auf 1:50 in Blockierlösung verdünnt wurden. Die Inkubation dauerte 60 min. Danach wurden die Schnitte zweimal in Blockierungslösung gewaschen und anschließend der zweite Antikörper vorsichtig aufgetragen, es handelte sich hierbei um goat anti-rabbit (Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG, Molecular Probes, Eugene, OR), Verdünnung 1:50 mit Blockierlösung. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln für 45 min. Wiederum wurden die Präparate zweifach in Blockierungslösung gewaschen und dann kurz in Aqua dest. und absolutem Ethanol abgespült. Zum Schluss wurden die Präparate mit ProTaq-MountFluor (Fa. Biocyc, Luckenwalde) eingedeckt und mit einem Deckgläschen versehen. Die Schnitte mussten danach im Dunkeln bei Raumtemperatur aushärten und waren im Dunkeln bis zu 4 Wochen haltbar.

Die Färbungen der Schnitte wurden mittels Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX 60, Olympus Optical Co. GmbH, Germany) analysiert.

2.9 Statistik

Alle Ergebnisse wurden als arithmetischer Mittelwert zusammen mit der Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Anzahl der Einzelversuche wurde mit n bezeichnet. Zum Vergleich der Kollektive kam der zweiseitige t-Test nach Student für voneinander unabhängige Stichproben zur Anwendung. Als signifikant galt $p < 0,05$.

3 ERGEBNISSE

3.1 Elektrogener Natrium-Transport in Colitis ulcerosa-Präparaten

Die Funktion des ENaC im humanen Colon sigmoideum wurde mittels Ussing Kammer Technik untersucht. Es sollten auf diese Weise mögliche Auswirkungen der chronischen Entzündung auf die Transportfunktion des Epithels gezeigt werden.

Partiell gestripptes Epithel vom Colon sigmoideum wurde mit 3 nmol/l Aldosteron *in vitro* in der Ussingkammer stimuliert und der elektrogene Na^+ -Transport I_{sc} gemessen. Nach achtstündiger Inkubation wurde durch mucosale Zugabe von 10^{-4} mol/l Amilorid die elektrogene Natriumresorption (J_{Na}) bestimmt. In Abb. 8 ist der zeitliche Verlauf von I_{sc} im menschlichen Dickdarm bei Stimulation *in vitro* mit 3 nmol/l Aldosteron dargestellt, wobei nach einer Latenz von einer Stunde eine ständige Zunahme des I_{sc} beobachtet werden konnte. Maximale Werte wurden nach 8 Stunden Inkubationszeit erreicht. Die Größe von J_{Na} entspricht dabei der Größe des durch Amilorid hemmbaren Kurzschlussstroms, d.h. der Differenz der Kurzschlussstromwerte unmittelbar vor und 10 min nach Amilorid-Zugabe. Die Epithelien, die ohne Aldosteronzugabe in der Ussingkammer geblieben waren, zeigten keinen signifikanten Anstieg des J_{Na} . Abb. 8 zeigt den Vergleich von I_{sc} bei $t=0$ h, 8 h und nach Applikation von Amilorid. In den Kontroll-Epithelien führten 3 nmol/l Aldosteron zu einem starken Anstieg des I_{sc} von $10,2 \pm 1,2 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, und der Abfall des Kurzschlussstroms I_{sc} nach Amilorid-Gabe führte zu einem J_{Na} von $6,9 \pm 1,2 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 8$). Im entzündeten Gewebe der Colitis ulcerosa-Präparate konnte Aldosteron keinen Anstieg von J_{Na} ($0,06 \pm 0,04 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$; $n = 7$) bewirken.

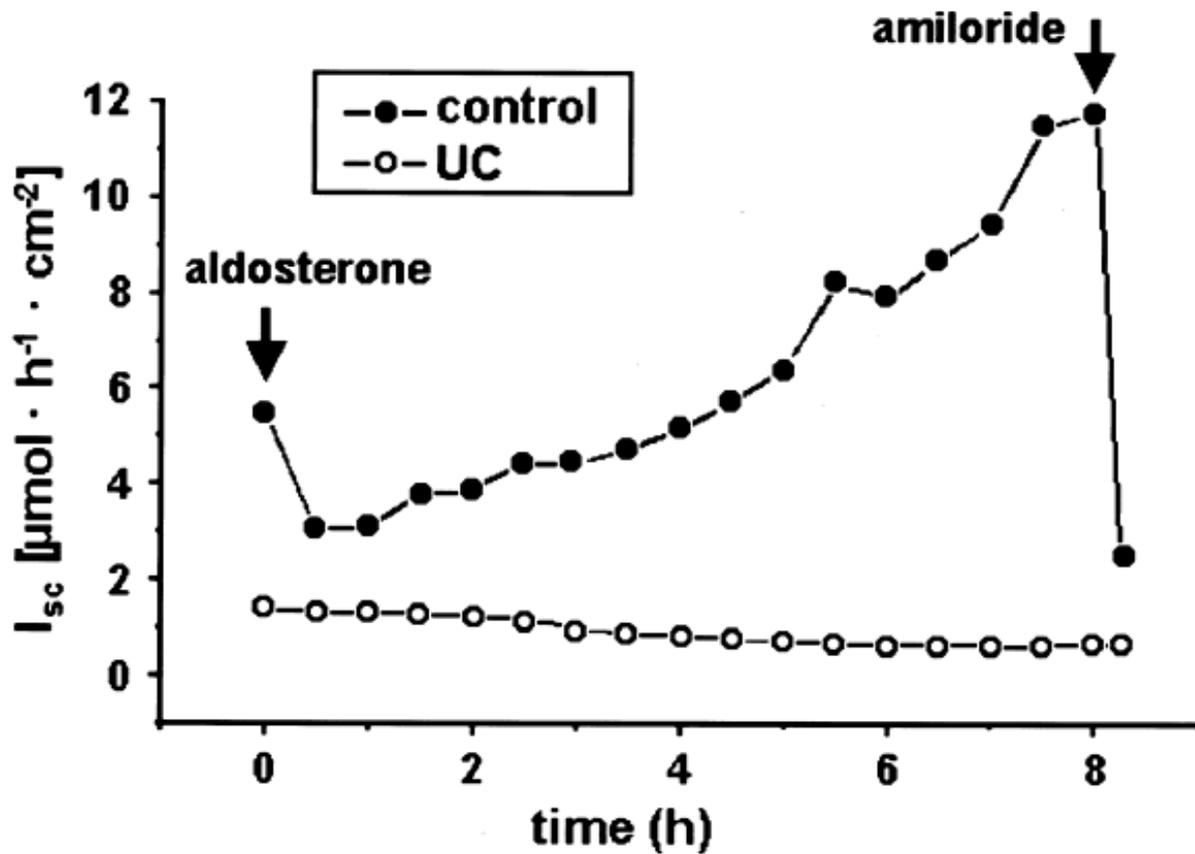


Abb. 8: Wirkung von Aldosteron auf den ENaC

Dargestellt ist der Zeitverlauf des aktiven Natrium-Transports in humanem Colon sigmoideum bei *in vitro*-Stimulation mit Aldosteron ($n = 8$). Die Kontrollgewebe zeigten einen stetigen Anstieg des Kurzschlussstroms durch Aldosteron. Nach 8 Stunden wurde der maximale Natriumstrom durch die Blockierung des ENaC mit $100 \mu\text{mol/l}$ Amilorid bestimmt. Die entzündeten Gewebe der Colitis ulcerosa zeigten keine signifikante Zunahme des Natriumstroms J_{Na} nach Aldosterongabe.

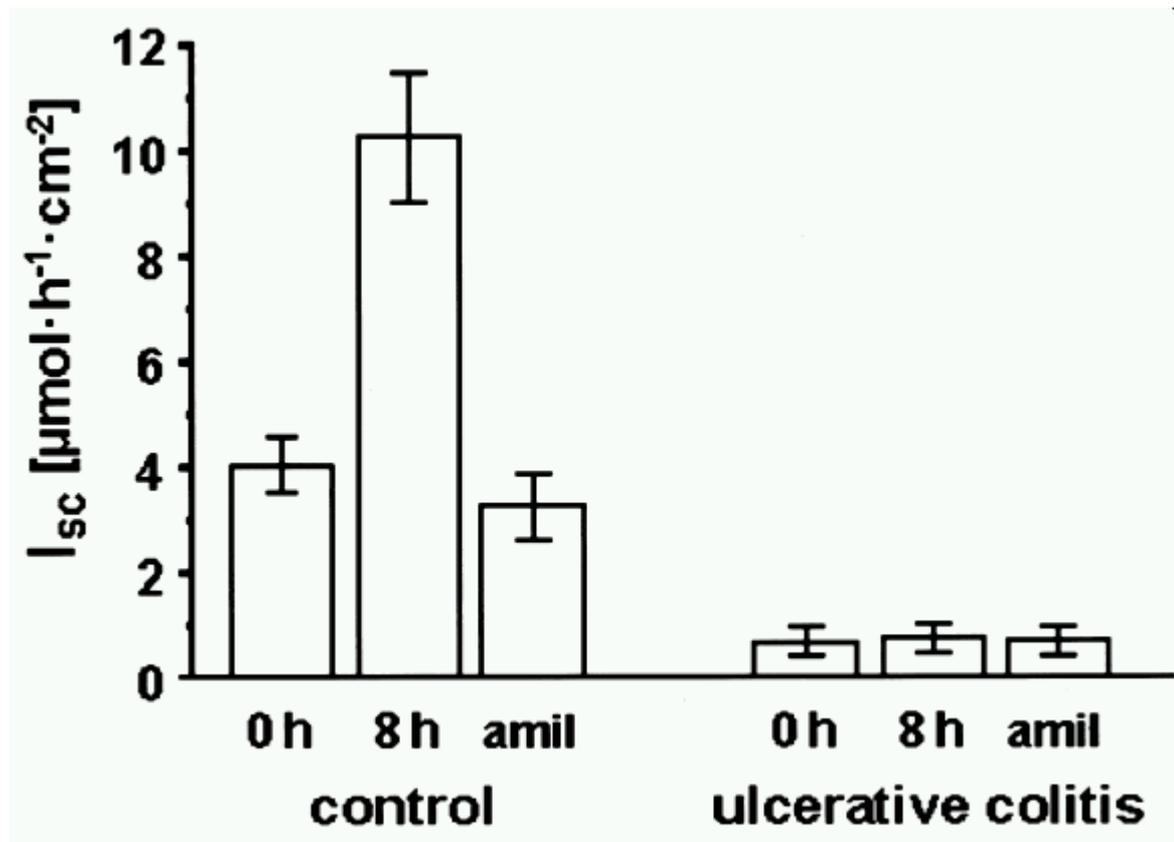


Abb. 9: Kurzschlussstrom (I_{sc}) von Colitis ulcerosa-Geweben. Vergleich des I_{sc} vor und nach Inkubation mit Aldosteron

In den Kontrollen bewirkten 3 nmol/l Aldosteron eine starke Zunahme des I_{sc} , die nach Applikation von Amilorid (amil) wieder abfiel. Dieser Amilorid-sensitive Anteil des Natriumstroms betrug $6,9 \pm 1,2 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$. Im entzündeten Gewebe war der Natriumstrom auf $0,06 \pm 0,04 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ reduziert (n = 8 Experimente für Kontrollgewebe und n = 7 für Colitisgewebe, Mittelwerte \pm Standardabweichung, $P < 0,05$).

Da zusätzlich zum reinen Epithel auch nicht-epitheliale Gewebsanteile mit in die Us-singammer eingespannt werden, entstehen Widerstände zwischen den Spannungselektroden. Zur genauen Bestimmung des epithelialen Widerstands wurden die Messwerte daher um die Widerstände der jeweiligen subepithelialen Gewebsanteile korrigiert. Diese Korrektur ist für die Widerstände der Badlösung allgemein akzeptiert, ebenfalls muss der Kurzschlussstrom I_{sc} jedoch um die Widerstände der subepithelialen Gewebsanteile bei Präparationen des Darms korrigiert werden. Es ist bekannt, dass sogar nach Korrektur für die Badlösung die wahre aktive Transportrate

noch unterbewertet wird, um einen Faktor, der durch den Quotienten R^t durch R^e darstellbar ist. R^t/R^e war $1,16 \pm 0,02$ ($n = 10$) in den Kontrollen und $3,09 \pm 0,27$ ($n = 11$, $P < 0,001$) in den entzündeten Colitisgeweben. Dies bedeutet, dass der gemessene Kurzschlussstrom I_{sc} die echte Transportrate in Colitis ulcerosa-Präparaten mehr untertreibt als in den Kontrollen (ratio, 1:2,7). Dennoch kann auch die Korrektur des I_{sc} in Colitis ulcerosa-Präparaten nicht den hohen Störungsgrad in Colitisgewebe erklären. Die korrigierten J_{Na} -Werte betragen $8.0 \pm 1,4 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ und $0.19 \pm 0,13 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($P < 0,01$ vs. Kontrolle).

3.2 Festlegung eines Korrekturfaktors hinsichtlich unterschiedlicher Gewebsdicke des entzündeten Colonepithels für molekularbiologische Quantifizierung

Ein möglicher Faktor, der den Vergleich zwischen Kontrollepithel und Colitis ulcerosa-Epithel beeinflussen kann, ist die Zunahme der Dicke der subepithelialen Schichten als Zeichen der Entzündung bei Colitis ulcerosa vor allem durch entzündungsbedingtes Ödem und Infiltration von Immunzellen. Diese Zunahme führte zu einem höheren subepithelialen Proteingehalt und damit zur Abschwächung spezifischer epithelialer mRNA und Protein-Signale bei Colitis ulcerosa. Um dieses Phänomen der Abschwächung auszuschalten, wurde die totale Membran-Protein-Fraktion pro exponierter Gewebsoberfläche in der Ussingkammer bestimmt. In dieser Berechnung fiel ein signifikanter Unterschied in der Proteinmenge auf ($329 \pm 26 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ in den Kontrollen gegen $416 \pm 24 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ in Colitis ulcerosa-Präparaten). Nach dieser Berechnung ergab sich ein Korrekturfaktor von $1,26 \pm 0,03$ ($P < 0,001$), der damit einen direkten Vergleich von Signalen aus Northern- und Western-Blots zwischen Kontrollen und Colitis ulcerosa möglich machte.

Zusammenhang zwischen Gewebsprotein und mucosaler Oberfläche

	Protein pro Gewebe ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Protein pro Gewebemassgewicht ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Kryptenlänge (μm)	Innerer Kryptendurchmesser (μm)	Krypten pro serosale Fläche (mm^{-2})	Mucosale Fläche pro serosale Fläche	n
Kontrolle	329 ± 26 (100%)	$4,5 \pm 0,6$	193 ± 5	$24,6 \pm 1,5$	44 ± 1	$1,43 \pm 0,03$ (100%)	4
Colitis ulcerosa	416 ± 24 (126%)	$5,1 \pm 0,9$	126 ± 4	$21,3 \pm 1,3$	24 ± 1	$1,11 \pm 0,01$ (129%)	4
P Wert	< 0,05	ns	< 0,001	ns	< 0,001	< 0,01	

Das gestrippte Colongewebe von Colitis und Kontroll-Patienten wurde aus der Ussingkammer ausgeschnitten und gewogen. Es folgte die Präparation der totalen Membranprotein-Fraktion wie im Methodenteil beschrieben. Aus diesen Werten wurde das Membranprotein pro Gewebe ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) und das Protein pro Gewebemassgewicht ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) bestimmt (n = 4). In der Morphometrie wurden die Unterschiede zwischen Kontroll- und Colitisgewebe bezüglich der Anzahl der Krypten pro mucosaler Oberfläche, der Kryptenlänge und des inneren Kryptendurchmessers gemessen (siehe Methodenteil).

3.3 Histologie und Morphometrie von Colitis ulcerosa-Präparaten

Zur morphologischen Beurteilung des Schweregrades der Entzündung wurden Hämatoxylin & Eosin-Färbungen an Dünnschnitten von Kontrollen und Colitis ulcerosa-Präparaten hergestellt und die Schichtdicke des Subepithels der Gewebestücke aus der Ussingkammer bestimmt und mit dem gemessenen subepithelialen Widerstand korreliert.

Wie in den folgenden Abbildungen erkennbar, fiel bei entzündetem Gewebe eine deutlich veränderte Morphologie auf. Es zeigte sich hierbei eine Veränderung der Oberflächengeometrie, die sich vor allem in der Rarefizierung der Krypten und in einer Verminderung der Kryptenlänge und des Kryptendurchmessers mit verminderter Resorptionsfläche manifestierte. Größere Läsionen wie Ulzerationen konnten bei diesen Gewebstücken jedoch nicht beobachtet werden.

Die subepithelialen Gewebsschichten (Lamina propria mucosae, Lamina muscularis mucosae, Tela submucosa) der untersuchten partiell gestrippten Gewebe waren verdickt. In Kontrollen konnte eine Schichtdicke von $494 \pm 89 \mu\text{m}$ gemessen werden, während entzündete Präparate eine um das 2,5-fach vermehrte Schichtdicke von $1276 \pm 228 \mu\text{m}$ ($n = 7$; $P < 0.05$) aufwiesen. Diese Veränderung der subepithelialen Schichtdicke wurde dabei hervorgerufen durch ein mukosales Ödem, Invasion und Infiltration von Entzündungszellen, sowie durch Verdickung der Lamina muscularis mucosae. Diese Veränderungen sind somit als strukturelles Korrelat zum subepithelialen Widerstandsanstieg zu betrachten.

Abb. 10

Kontrollgewebe



Colitis ulcerosa



Kontrollgewebe

Colitis ulcerosa

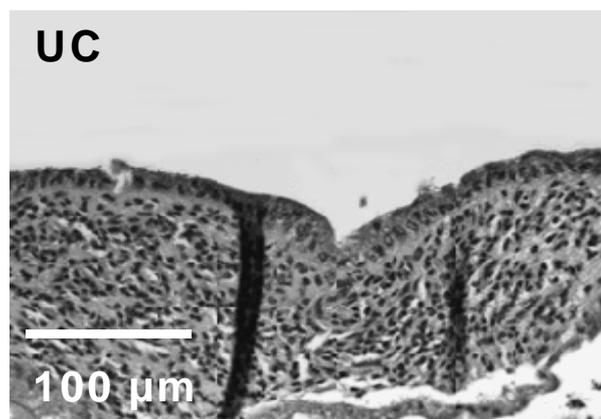
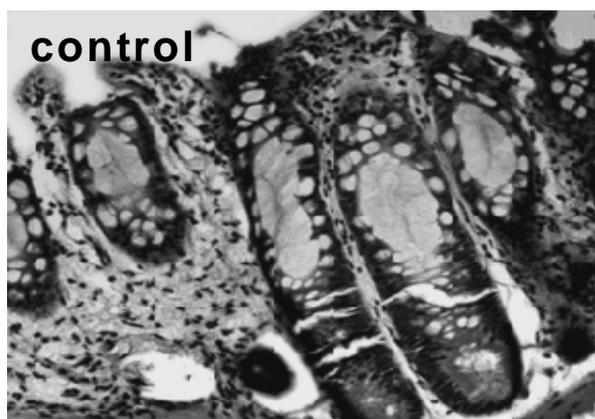


Abb. 10 und 11: Histologische Bilder mit Darstellung der Krypten in der Morphometrie
Deutliche Rarefizierung der Krypten und deutlich verkürzte Kryptenlängen bei Colitis ulcerosa im Vergleich zu Kontrollgewebe.

3.4 ENaC mRNA-Expression in Colitis ulcerosa-Präparaten

Im Anschluss an die elektrophysiologischen Versuche wurde die Gesamt-RNA aus den Gewebsstücken isoliert und die mRNA der α -, β - und γ -Untereinheiten des ENaC mittels Northern Blot Technik analysiert.

In Abb. 12 sind Northern-Blots zu sehen, welche die mRNA der ENaC-Untereinheiten α , β und γ zeigen. Nach 8-stündiger Inkubation mit Aldosteron konnte in den Kontrollgeweben eine Hochregulation der β - und γ -Untereinheiten-mRNA gesehen werden, welches nur durch eine direkte Induktion der Transkription zu erklären ist. In der Densitometrie zeigte sich in der Analyse von 6 – 7 Blots jedoch keine Änderung in der mRNA der α -Untereinheit ($111 \% \pm 9 \%$ des Kontroll-Signals). Im Gegensatz dazu ergab sich für die mRNA der β - und γ -Untereinheiten eine deutliche Hochregulation unter Aldosteron (bis zu $236 \% \pm 18 \%$ und $769 \% \pm 85 \%$ des entsprechenden Kontrollgewebes).

Im entzündeten Colitis-Gewebe war die Expression der mRNA der α -Untereinheit noch vorhanden (nicht signifikanter Unterschied zur Kontrolle), was einen Hinweis auf das veränderte Oberflächenepithel liefert. Es fand jedoch keine Induktion der mRNA von β - und γ -Untereinheit durch Aldosteron bei Colitis-Gewebe statt, welches einen scharfen Kontrast zu den Änderungen bei nicht entzündetem Colongewebe darstellt.

Dies verdeutlicht, dass die Störung des durch Aldosteron stimulierbaren Na^+ -Transports mit einer gestörten Hochregulation der β - und γ -Untereinheit einhergeht, während sich für die α -Untereinheit eine adäquate Antwort auf die Stimulation mit Aldosteron zeigte.

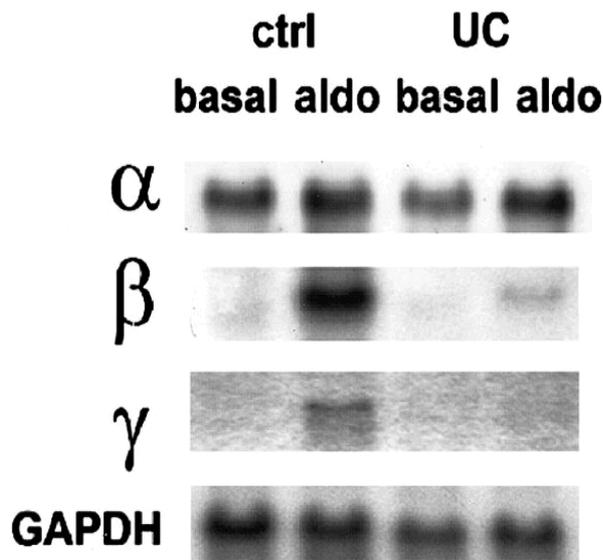


Abb. 12: Northern-Blots: Induktion der ENaC mRNA in Colitis ulcerosa-Präparaten

Repräsentative Blots: In Kontrollgeweben zeigte sich durch 3 nmol/l Aldosteron eine starke Zunahme der β - und γ -ENaC mRNA, während die mRNA der α -Untereinheit unverändert blieb. In Colitis ulcerosa-Präparaten war die α -ENaC-Untereinheit noch vorhanden, während die aldosteronabhängige β - und γ -ENaC-Induktion vollständig zum Erliegen kam (Repräsentative Blots, n = 7 Experimente für jede Gruppe). GAPDH diente als interner Standard.

3.5 ENaC-Protein-Expression in Colitis ulcerosa-Präparaten

Die Veränderungen der ENaC-Untereinheiten auf Proteinebene wurden mittels Western Blot Technik analysiert (Abb. 13). Die Spezifität der Western Blot Signale wurde mit Hilfe der bei der Antikörpersynthese verwendeten Immunisierungs-Peptide überprüft. Die Ergebnisse aus der Densitometrie befinden sich in Abb. 13B (gepooltes Material von n = 4 Patienten). Wieder wurden die Daten um den Faktor für den erhöhten Gesamt-Protein-Gehalt korrigiert. Das Muster der Protein-Expression ähnelte dem Muster der mRNA-Expression. In der Membran-Fraktion der Kontroll-Gewebe blieb die α -Untereinheit nach Inkubation mit Aldosteron unverändert während ein starker Anstieg der β - und γ -Untereinheiten des ENaC beobachtet werden konnte. In der entzündeten Mucosa fehlte der Aldosteron-abhängige Anstieg der β - und γ -Untereinheiten vollständig, während die α -Untereinheit konstant blieb, was sich durch eine Reifung des Oberflächenepithels erklären lässt.

3.6 Immunhistochemie

Die Lokalisation der α -, β - und γ -Untereinheiten wurde mittels spezifischer Antikörper analysiert. In den Kontrollgeweben waren die β - und γ -Untereinheiten stark durch Aldosteron induzierbar, während dies in Colitis-ulcerosa-Präparaten nicht der Fall war (Abb. 14). Die α -Untereinheit hingegen blieb weiterhin exprimiert, auch in entzündetem Colitis-Gewebe. Die Lokalisation aller Untereinheiten war dabei auf das Oberflächenepithel begrenzt, in den Krypten wurden keine Signale sichtbar.

3.7 Expression des Mineralocorticoid-Rezeptors in Colitis ulcerosa-Präparaten

Um sicherzustellen, dass nicht ein veränderter Mineralocorticoidrezeptor (MR) für die beobachteten Veränderungen der ENaC-Untereinheiten auf mRNA- und Proteinebene verantwortlich war, wurde der Rezeptor mittels Western-Blots analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass auch in Colitis ulcerosa-Präparaten der Rezeptor vergleichbar stark wie in der Kontrolle exprimiert wurde. Somit konnte eine verminderte Expression des MRs als Ursache für die fehlenden Aldosteronwirkungen im entzündeten Gewebe ausgeschlossen werden. In Abb. 14 sind die MR-spezifischen Banden bei 116 KD sowohl in Kontroll- als auch in Colitis ulcerosa-Präparaten dargestellt.

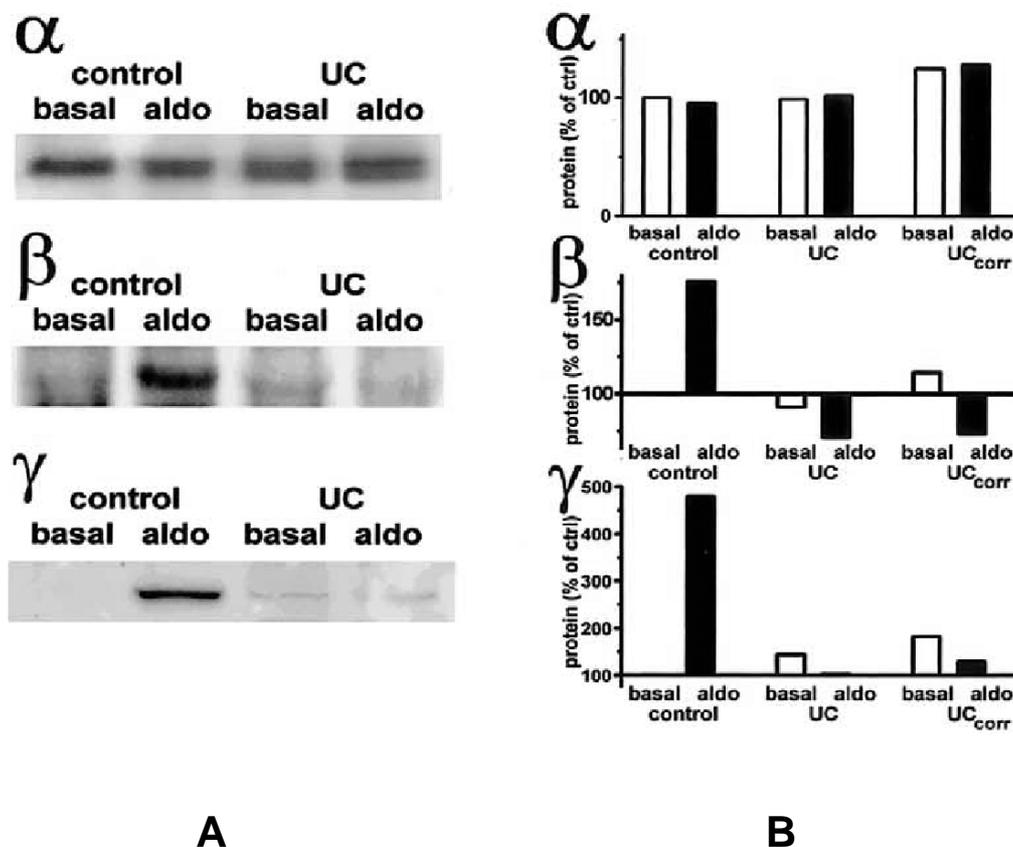


Abb. 13: Induktion der ENaC-Untereinheiten in Colitis ulcerosa-Präparaten

A: Western Blots
B: Densitometrie der Western Blots

Die Veränderungen der α -, β - und γ -Untereinheiten wurden durch Immunoblots analysiert. Hierbei konnten spezifische Signale der Untereinheiten durch den Einsatz entsprechend blockierender Impf-Peptide bestätigt werden. Es konnte eine starke Zunahme der β - und γ -ENaC-Signale in der Membran-Fraktion der mit Aldosteron inkubierten Kontrollgewebe beobachtet werden, aber nicht in Colitis ulcerosa-Präparaten. Für die α -Untereinheit wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden. Die α -ENaC-Signale waren in Kontrollgewebe und in entzündetem Gewebe (Blots $n = 4$, gepooltes Material) gleichermaßen vorhanden. Jeder Antikörper markierte eine einzige Bande bei 72 – 76 KD.

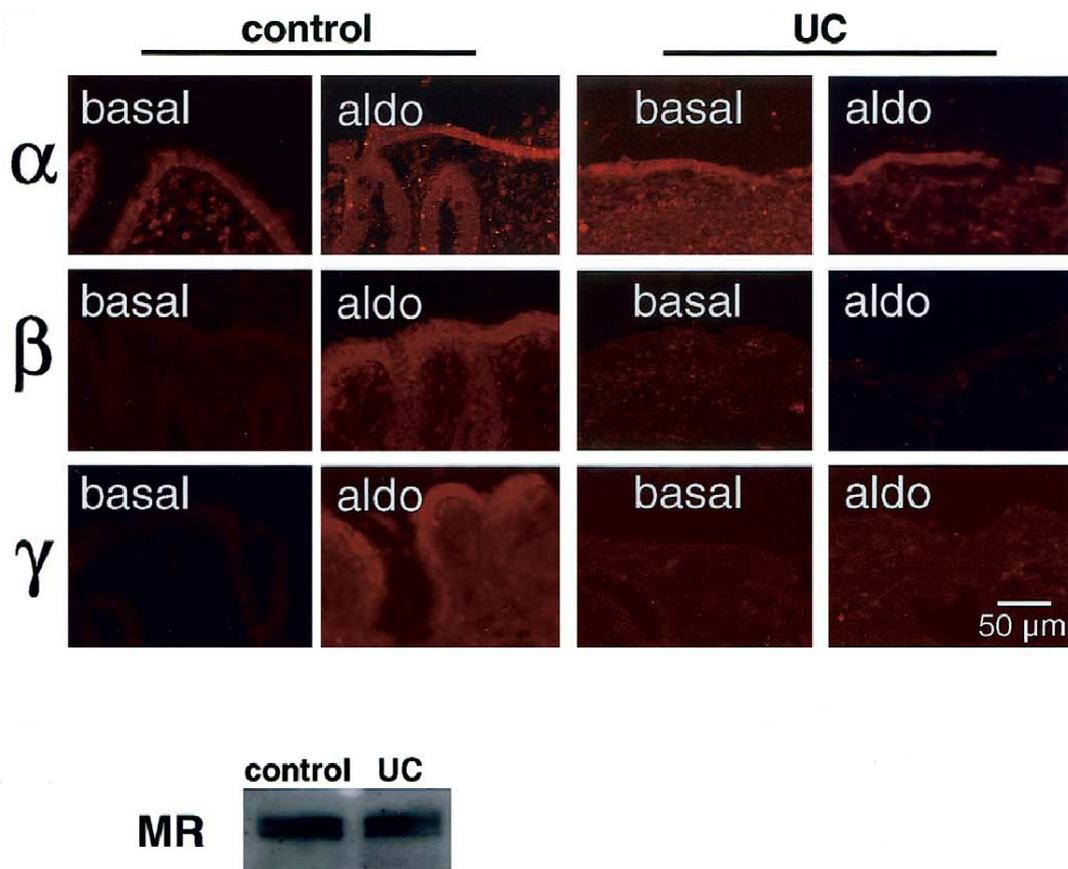


Abb. 14: Immunhistochemie mit Anfärbung und Western Blot-Analyse des Mineralocorticoid-Rezeptors

Aufteilung der α -, β - und γ -Untereinheiten im Colon sigmoideum von Kontroll- und Colitis-Patienten nach 8-stündiger Inkubation mit Aldosteron. α -ENaC konnte in Kontroll- und Colitisgewebe nachgewiesen werden, während die Expression von β - und γ -ENaC nach Inkubation mit Aldosteron auf das Kontrollgewebe beschränkt war (Färbungen aus angrenzenden Gebieten, n = 4).

Ebenso abgebildet ist die Expression des Mineralocorticoidrezeptors (MR), dessen spezifische Signale in Kontrollen und Colitis-Gewebe bei 116 KD nachgewiesen werden konnten (gepooltes Gewebe, n = 4 in beiden Gruppen).

3.8 Effekte von TNF- α und IFN- γ auf humanes Colon sigmoideum

Der Einfluss der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ wurde am menschlichen Darmepithel untersucht. Diese Zytokine sind bei Colitis ulcerosa erhöht, und ihre Rolle bei der Störung von Transportsystemen, wie z.B. dem elektrogeneren Natrium-Transport sollte daher näher beleuchtet werden.

Pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α und IFN- γ haben einen hemmenden Effekt auf den Natriumstrom J_{Na} . Nach der Inkubation des Gewebes mit IFN- γ (1000 U/ml) für zwei Stunden und der folgenden serosalen Applikation von TNF- α (100 ng/ml) für 6 Stunden, wurde 8 Stunden mit Aldosteron ($3 \cdot 10^{-9}$ mol/l) inkubiert (Inkubationszeit insgesamt also 16 Stunden). In diesem Versuchsansatz zeigte sich bei Inkubation mit den Zytokinen eine starke Reduktion des J_{Na} auf $47\% \pm 8\%$.

Neben der deutlichen Reduktion des Natriumstroms in der Ussing-Kammer zeigte sich auch in den Northern-Blots eine deutliche Abnahme der β - und γ -ENaC-mRNA. In der Densitometrie ergab sich kein signifikanter Anstieg der β - und γ -ENaC mRNA ($104\% \pm 14\%$ und $92\% \pm 7\%$ der Kontrolle) nach Inkubation mit Aldosteron und den Zytokinen ($n = 4$, gepooltes Material zur Gewinnung einer adäquaten Menge an Gesamt-RNA). Wiederum wurde als wichtiges Kontrollexperiment auch die α -ENaC mRNA betrachtet. Ihre Expression wurde durch die Zytokine nicht reduziert.

Zur Überwachung, dass das Epithel während der 18 Stunden Inkubation und Exposition mit Zytokinen in der Ussingkammer während des Versuchsablaufs zu jeder Zeit vital war, wurde kontinuierlich der transepitheliale Widerstand registriert. Es ergaben sich hierbei konstante Werte von anfangs $103 \pm 3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ bis $95 \pm 5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ zum Ende des Experiments ($n = 16$).

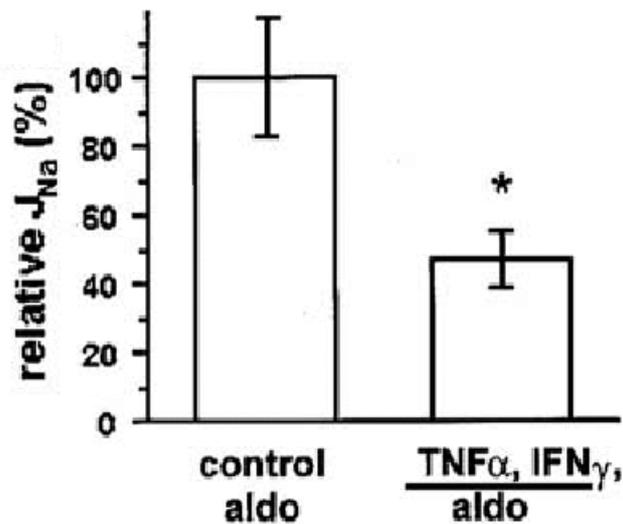


Abb. 15: Induktion des ENaC bei Inkubation mit proinflammatorischen Zytokinen in der Elektrophysiologie

Der Amilorid-sensitive Abfall des I_{sc} als Maß für die ENaC-Induktion war bei der Präsenz von TNF- α (100 ng/ml) und IFN- γ (1000 U/ml) in Kontrollgeweben auf 47 % \pm 8 % vermindert ($P < 0,05$).

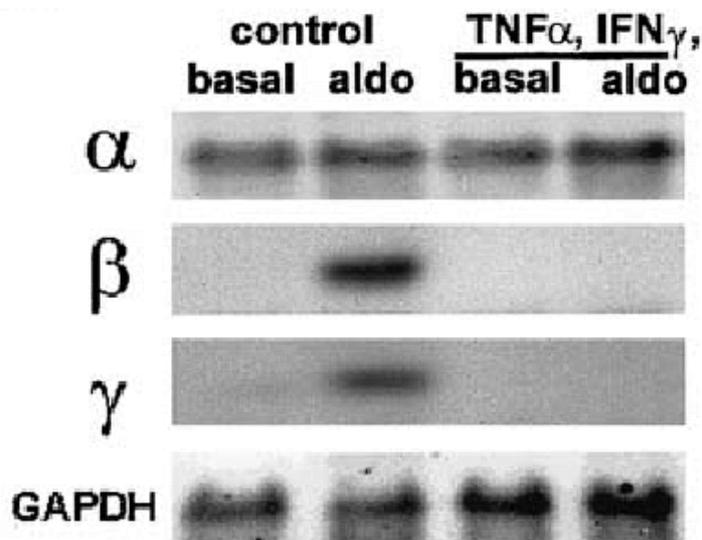


Abb. 16: Northern Blots

Nach 8-stündiger Inkubation mit Aldosteron war eine starke Zunahme der β - und γ -ENaC mRNA sichtbar; dieser Effekt wurde durch die Zytokine dramatisch gehemmt.

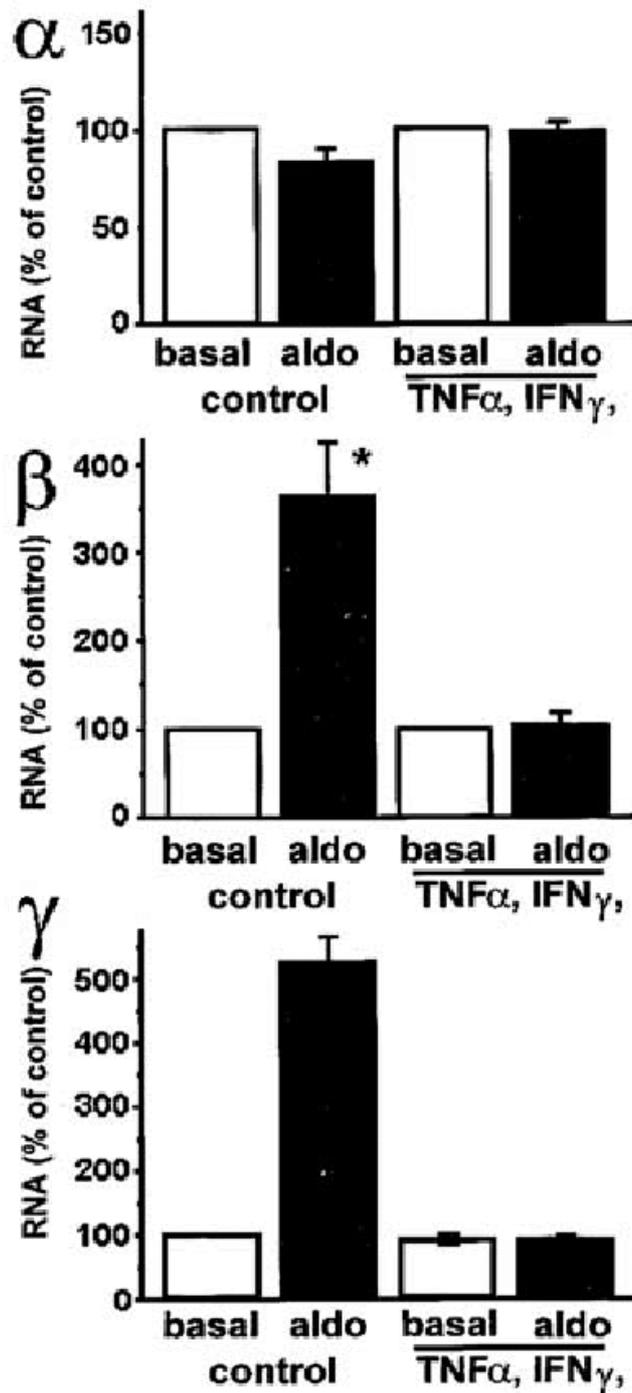


Abb. 17: Densitometrie der Northern Blots

Die Densitometrie zeigte eine Aldosteron-induzierte Zunahme der β - und γ -ENaC Signale auf $363 \% \pm 61 \%$ beziehungsweise $526 \% \pm 39 \%$ ohne Zytokine, jedoch keine signifikante Zunahme ($104 \% \pm 14 \%$ beziehungsweise $92 \% \pm 7 \%$) bei Vorhandensein der Zytokine. Es wurden keine signifikanten Unterschiede der α -ENaC Signale gefunden (in Prozent der Kontrollen, n = 4 in jeder Gruppe).

4 DISKUSSION

4.1 Störung des Natriumstroms J_{Na} bei Colitis ulcerosa-Präparaten

Im Verlauf des Darmrohrs von proximal nach distal gibt es verschiedene Mechanismen der Natrium-Resorption. Im proximalen Colon dominiert noch die elektroneutrale Natriumresorption, während die Natriumresorption über den ENaC in Richtung distales Colon immer bedeutsamer wird. Unter physiologischen Bedingungen ist der Transportmechanismus über den ENaC nur geringgradig ausgeprägt und wird erst durch die Wirkung von Aldosteron bei Diarrhoe und Elektrolytverlusten aktiviert wie in dem Modell der Na^+/H^+ -Antiporter 3 (NHE3)-defizienten Maus gezeigt wurde [Schultheis et al., 1998]. Bei chronischer Stimulation durch Steroide konnte aktiver Natrium-Transport bis in distale Dünndarmabschnitte nachgewiesen werden [Will et al., 1980]. Auf diese Weise ist der Natrium-Transport ein wichtiger intestinaler Resorptionsmechanismus, der als Reserve-Kapazität zum Schutz vor Diarrhoe dient. In dieser Arbeit wurde die ENaC-Dysregulation in Colitis ulcerosa-Präparaten untersucht und wertvolle Informationen über die Pathomechanismen der ENaC-Downregulation bei Colitis ulcerosa auf funktionaler und molekularer Ebene gewonnen.

Bei physiologischen Aldosteron-Konzentrationen ($3 \cdot 10^{-9}$ mol/l) wurde der Natriumstrom *in vitro* auf $8,0 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ im Gewebe der Kontrollpatienten stimuliert. Im Sigma-Gewebe der Colitis-Patienten konnte hingegen kein Anstieg des Natriumtransports unter Aldosteroneinfluss beobachtet werden; der Natrium-Transport in entzündetem Colitisgewebe war erheblich gestört. *In vivo* bedeutet das ein Zurückbleiben der Natrium-Ionen im Lumen, welches durch Bindung der Elektrolyte an Wasser wiederum zu einem erhöhten Elektrolyt- und Wasserverlust durch Diarrhoe führt. Es lag daher die Frage nahe, wie stark sich der Verlust der aktiven, ENaC-regulierten Natriumresorption im distalen Colon quantitativ auswirkt. Zur Beurteilung des Ausmaßes der Diarrhoe kann die Menge des Ausscheidungsvolumens, das von der aktiven Natriumresorption allein abhängt, berechnet werden. Unter physiologischen Bedingungen resorbiert ein 15 cm-Segment des distalen Colons $21 \text{ mmol } Na^+$ pro Tag. Dies lässt sich aus dem Durchmesser des Colons von 2,3 cm und dem Natriumstrom J_{Na} von $8,0 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, wie er bei hohen Aldosteron-Konzentrationen

beobachtet wurde, bestimmen. Obwohl die Messung der absoluten Werte für den Durchmesser des Colons und den Natriumstrom J_{Na} schwierig ist, deutet eine hypothetische Rechnung darauf hin, dass die Resorption von 650 ml Stuhl-Volumen pro Tag entlang eines 15 cm langen Mineralocorticoid-sensitiven distalen Colon-Segments bei Dysfunktion der aktiven Natrium-Resorption verhindert würde. Diese Rechnung erfolgt unter Annahme einer Natrium-Konzentration in den Faeces von 32 mmol/l unter physiologischen Bedingungen und charakterisiert bei schwierig zu verifizierenden Parametern das maximale Ausmaß des ENaC-abhängigen Stuhlvolumens. Auch wenn das effektive Volumen darunter liegt, so würde der ENaC-abhängige Anteil auf jeden Fall zur Diarrhoe bei Colitis ulcerosa beitragen.

4.2 Spezifität der funktionellen Veränderungen in entzündeter Colitis-Mucosa

Wenn in einem entzündeten Gewebe die Transport-Funktionen dieses Gewebes deutlich eingeschränkt sind, stellt sich die Frage, ob dieser Störung ein spezifisches regulatorisches Phänomen zugrunde liegt oder ob es sich um die Folge von genereller Gewebsschädigung handelt. Die letztgenannte Möglichkeit kann ausgeschlossen werden, falls andere aktive Transport-Funktionen wie die elektrogene Chloridsekretion und der elektrische Widerstand als unverändert nachgewiesen werden können. Dieses schien der Fall zu sein, da sowohl in aktuellen als auch in vorherigen Arbeiten gezeigt wurde, dass der elektrische Widerstand während der Ussingkammer-Experimente konstant blieb und auch die maximale Kapazität der Chloridsekretion im Vergleich von Kontrollen und Colitis-ulcerosa-Gewebe nicht signifikant verändert war [Schmitz et al., 1999]. Die Vitalität der Colitis-Mucosa unter *in vitro* Bedingungen war also ausreichend. Der Ausschluss dieser unspezifischen Störfaktoren stützte die Annahme, dass die Reduktion des elektrogenen Natrium-Transports spezifisch ist.

Eine ähnliche Störung des elektrogenen Natrium-Transports konnte im Colitis ulcerosa-Modell der Interleukin-2-defizienten Maus nachgewiesen werden. Diese Störung zeigte sich bereits in einem frühen Entzündungsstadium noch vor der Barrierestörung des Epithels [Barmeyer, 2002]. Dass die Down-Regulation eines aktiven Transports schon ohne vorhandene Barrierestörung des Epithels auftreten kann, ist ein weiterer Hinweis für ein spezifisches Wirken von inflammatorischen Mediatoren auf die Expression von aktiven Transportern.

4.3 Korrektur-Algorithmen der Northern- und Western-Blots für die entzündlichen Veränderungen bei Colitis ulcerosa-Präparaten

Die Ergebnisse aus der Densitometrie von Northern- und Western-Blots wurden zuvor als Rohdaten und nach der Korrektur für subepitheliale Entzündungsveränderungen präsentiert. Der Korrekturfaktor von 1,26 ergab sich durch den Vergleich der Proteinmenge in gesundem und entzündetem Colongewebe (bezugnehmend auf 1 cm² serosale Fläche). Da Northern- und Western-Blots mit identischen Probenmengen für beide Gruppen beladen wurden, hätte ohne Verwendung des Korrekturfaktors ein entscheidender Fehler übersehen werden können. Es wäre eine falsch schwache Detektion in Colitis ulcerosa-Präparaten aufgrund des Verdünnungsartefakts bei hohem Anteil an subepitheliale Protein aufgetreten. Auch ohne Einrechnung des Korrekturfaktors wären die Veränderungen in mRNA- und Protein-Expression in diesem Fall signifikant gewesen. Trotzdem, im Hinblick auf diese inflammatorischen Veränderungen des Protein-Gehalts, erscheint es für die Zukunft sinnvoll, beim Vergleich von entzündeter und nicht entzündeter Mucosa mit verschiedenen Proteinmengen einen solchen Korrektur-Algorithmus anzuwenden.

Ein weiterer Korrektur-Algorithmus war notwendig für den Vergleich von entzündeter und nicht entzündeter Mucosa-Oberfläche. Die Kryptenoberfläche war aufgrund einer Rarefizierung der Krypten in Colitis ulcerosa-Präparaten verglichen mit Kontrollmucosa deutlich verkleinert [Truelove et al., 1956]. In der eigenen Analyse fand sich ein Korrekturfaktor von 1,29. Diese Tatsache ist wichtig bei der Betrachtung von Parametern der epithelialen Barriere wie z.B. Widerstände in Colitis- und Kontrollgewebe, ist aber im Vergleich der ENaC-Expression wahrscheinlich ohne Bedeutung, da der ENaC nur im Oberflächenepithel exprimiert wird, wie in dieser Arbeit durch die Immunohistochemie nachgewiesen werden konnte.

Schon länger wurde diskutiert, ob der schnelle Zellersatz und Zellumsatz in entzündeter Mucosa zu einem weniger differenzierten Oberflächenepithel führt und daraus eine verminderte Kapazität für aktive Resorption resultieren könnte. Diese Hypothese wurde durch die vorhandenen aktuellen Daten nicht gestützt, da eine von den drei ENaC-Untereinheiten, nämlich die α -Untereinheit, in Colitis ulcerosa-Präparaten nicht reduziert auftrat und weiterhin ähnlich stark wie in den Kontrollen detektiert

werden konnte. Das Muster der geschützten und weiter vorhandenen α -Untereinheit ähnelt der Detektionsantwort nach Inkubation mit pro-inflammatorischen Zytokinen. Auch hier wurde die α -Untereinheit unverändert exprimiert. Dies spricht daher mehr für einen Effekt, der durch inflammatorische Regulation ausgelöst wurde, nicht aber allein durch weniger differenziertes Oberflächenepithel.

4.4 Regulation des Aldosteron-induzierten Natrium-Transports auf Transkriptions- und Translationsebene

Bei gesundem humanem Colon sigmoideum zeigte sich auf mRNA-Ebene bei *in vitro* Inkubation mit Aldosteron eine starke Induktion der β - und γ -ENaC-Untereinheiten. Die Induktion des Transports war dabei abhängig von Konzentration und Zeit, was bereits in früheren Experimenten der Arbeitsgruppe an Ratte [Epple et al., 2000] und Mensch [Epple et al., 1995] beobachtet worden war. Die maximale Antwort auf Aldosteron wurde nach 6-8 Stunden erreicht. Die β - und γ -Untereinheiten in der Membran-Fraktion zeigten einen hohen Grad an Korrelation auf mRNA- und Proteinebene. Parallel zu dem verminderten Natrium-Transport im Ussing-Experiment fiel also das Fehlen der Aldosteron-vermittelten Induktion der β - und γ -ENaC mRNA bei Patienten mit Colitis ulcerosa auf. Dies wies auf eine mögliche Ursache für die gestörte Transportfunktion auf Transkriptionsebene hin.

In den Western Blots konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die β - und γ -Untereinheiten im Kontrollgewebe durch Aldosteron induziert wurden, während die α -Untereinheit konstant blieb. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Literatur, in der die α -Untereinheit als im Wesentlichen in der apikalen Membran exprimiert beschrieben wird [Epple et al., 2000].

In Colitis ulcerosa-Präparaten konnte hingegen keine Aldosteron-induzierbare Zunahme der β - und γ -Untereinheiten detektiert werden. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass dem reduzierten elektrogenen Na^+ Transport (J_{Na}) eine verminderte Expression der β - und γ -Untereinheiten auf RNA- und Proteinebene und eine geringere Aldosteron-vermittelte Induktion zugrunde liegt.

Obwohl die transkriptionellen Mechanismen für die Veränderungen der ENaC-Expression bei Colitis ulcerosa verantwortlich zu sein scheinen, muss der Beitrag dieses Mechanismus zum Entstehen der Diarrhoe bei Colitis noch mit anderen Prozessen in Zusammenhang gesehen werden. In entzündetem Colon kommt es zu einer gravierenden Störung der epithelialen Barriere, welches ebenfalls durch pro-inflammatorische Zytokine verursacht sein könnte; entweder durch die Aktivierung der Apoptose oder über direkte Promotoren-Effekte auf Tight Junction-Proteine wie z.B. das Occludin [Mankertz et al., 2000]. Durch pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α wurde der transepitheliale Widerstand in HT29/B6-Zellen vermindert und auch die mRNA-Expression des Tight Junction-Proteins Occludin vermindert nachgewiesen. Dieser Barrieredefekt trägt direkt zur Malabsorption des Natriums durch verminderte Transporter-Expression wie ENaC bei, da bereits resorbiertes Natrium durch die beschädigte epitheliale Barriere bei verminderter Expression von Tight Junction-Proteinen wie Occludin zurück ins intestinale Lumen gelangen kann.

4.5 Effekte der Zytokine auf die Induktion des ENaC bei Colitis ulcerosa-Präparaten

Die Zytokine TNF- α - und IFN- γ hemmten sowohl die Aldosteron-abhängige Induktion des Natriumstroms als auch die β - und γ -ENaC-Expression im humanen distalen Colon *in vitro*. Die Hemmung dieser beiden Untereinheiten fiel besonders im Vergleich zu α -ENaC auf, weil sich die mRNA-Expression der α -Untereinheit nicht beeinträchtigt zeigte. Gleichzeitig blieb der epitheliale Widerstand während des Ussing-Versuchs konstant, welches gegen unspezifische Effekte wie z.B. den zytokin-induzierten Verlust der Oberflächenzellen spricht. Hinzu kommt, dass die Down-Regulation des Mineralocorticoid-Rezeptors in Colitis ulcerosa-Präparaten ausgeschlossen wurde und daher die gesehenen Effekte nicht durch das Fehlen dieses Rezeptors erklärbar waren (siehe Ergebnisse). Zusammengenommen weisen beide Ergebnisse auf einen direkten Einfluss der pro-inflammatorischen Zytokine auf die ENaC-Expression hin, welches auch für die Colitis-Mucosa eine Rolle spielen könnte. In Colitis ulcerosa-Präparaten lassen sich erhöhte Spiegel von Zytokinen nachweisen. Dass Zytokine aus TH1-Zellen auch auf andere Transporter und deren Regulation einen direkten Einfluss haben können, konnten Rocha et al. [2000] für den Natrium-Protonen-Antiporter NHE3 in humanen Caco-2/bbe Zellen und

Natrium-Protonen-Antiporter NHE3 in humanen Caco-2/bbe Zellen und Rattendarm nach Behandlung mit IFN- γ nachweisen. Auch hier führte ein Zytokin (IFN- γ) zur verminderten Expression eines Transporters.

4.6 Expression und Regulation der β - und γ -Untereinheiten des ENaC

Um die Regulation der elektrogenen Natriumresorption auf molekularer Ebene zu analysieren, wurde in der Arbeitsgruppe humane DNA mit ENaC-spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert. Die Sequenzanalyse ergab, dass das Amplimer den mutmaßlichen Transkriptionsstart für die β -ENaC mRNA enthält.

TNF- α reduzierte die β - und γ -ENaC Promotor-vermittelte Reporter-Gen Expression. Dies suggeriert, dass TNF- α die resorptiven Transport-Funktionen durch ein Eingreifen in die Gen-Expression von Transport-Proteinen einschränkt.

Im Allgemeinen werden die transkriptionellen Effekte von Steroidhormonen über sogenannte „Glucocorticoid-Response-Elements“ (GRE) vermittelt. Sowohl für Glucocorticoide als auch für Mineralocorticoide konnte gezeigt werden, dass sie im distalen Colon von Säugetieren und auch in der Niere die Expression von β - und γ -ENaC, aber nicht die von α -ENaC erhöhen [Renard et al., 1995], [Asher et al., 1996], [Escoubet et al., 1997], [Stokes et al., 1998]. Desweiteren konnte nachgewiesen werden, dass der humane α -Untereinheiten-Promotor durch Gluco- und Mineralocorticoide via eines einzigen GRE's in der 5'-Flankenregion des Gens stimuliert wurde [Mick et al., 2001]. Dennoch, der Mechanismus der Steroid-Effekte auf β - und γ -ENaC ist bis heute nicht genau identifiziert.

Für die transkriptionelle Regulation der ENaC-Gen-Expression durch TNF- α wurde eine putative Bindestelle für den nuklearen Faktor- κ B (NF- κ B) im humanen ENaC- α -Untereinheiten-Promotor beschrieben [Thomas et al., 1998]. Die Promotoren-Fragmente für β - und γ -ENaC, die in den Reporter-Gen-Assays benutzt wurden, enthalten einige potentielle Bindestellen, welche immer noch als funktionelles Ziel für die Wirkung des NF- κ B bewiesen werden müssen. Bis heute konnte keine direkte Inter-

aktion zwischen GRE und NF- κ B Bindestellen auf die ENaC-Promotoren-Aktivität beschrieben werden.

Neben der hemmenden Wirkung von TNF- α auf die Induktion des epithelialen Na⁺ Kanals ist insbesondere der Effekt auf die Barriere von entscheidender Bedeutung. Mankertz et al. [2000] zeigten einen direkten Effekt von TNF- α auf die Expression des Tight Junction-Proteins Occludin. TNF- α und IFN- γ verminderten den transepithelialen Widerstand an HT-29/B6-Zellen und führten zu einer Abnahme der Expression der Occludin-mRNA in Northern Blots. Auch die Promotoren-Aktivität des Occludins wurde durch die beiden Zytokine allein, aber auch durch synergistischen Effekt der beiden vermindert, welches auf eine Gen-Regulation der Veränderungen der parazellulären Barriere hinweisen könnte.

4.7 Ausblick

In dieser Arbeit konnte eine Zytokin-abhängige Hemmung der Induktion des elektrogeneren Natrium-Transports in der entzündeten Mucosa von Colitis ulcerosa-Patienten nachgewiesen werden. Damit ließ sich ein direkter Effekt von Zytokinen auf einen Transportmechanismus (aktiver Natrium-Transport) im distalen Colon nachweisen. Die direkte Wirkung von pro-inflammatorischen Zytokinen auf Promotorsequenzen eröffnet ein weites Feld der Erforschung von entzündlichen Effekten auf Transport und Barriere.

In weiteren Arbeiten muss nun die Identifikation der intrazellulären Signal-Transduktions-Mechanismen weiter vorangetrieben werden. Sowohl im ENaC-Gebiet als auch auf Tight Junction-Ebene im Bereich von Occludin und Claudinen werden nun weitere Untersuchungen mit pro-inflammatorischen Zytokinen folgen, welche die Zusammenhänge zwischen Barrierestörung und spezifischer Hemmung von Transportvorgängen näher beleuchten sollen. Auf die weitere Entwicklung in diesem Forschungsgebiet darf man in jedem Falle gespannt sein und hoffen, dass die komplexen Mechanismen, die an der Entstehung der Diarrhoe bei entzündlichen Darmerkrankungen beteiligt sind, schon bald detailliert verstanden werden. Daraus könnten schließlich effektivere Therapien für die betroffenen Patienten entwickelt werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Colitis ulcerosa ist gekennzeichnet durch profuse wässrig-schleimige Durchfälle. Als mögliche Ursachen hierfür sind die Reduktion von resorptiven Transportprozessen, eine aktive Ionensekretion sowie eine Störung der epithelialen Barrierefunktion denkbar. In dieser Arbeit wurde die aktive Na^+ -Resorption unter Beteiligung des epithelialen Na^+ -Kanals (ENaC) in gesundem und Colitis ulcerosa-Gewebe untersucht, die den Hauptmechanismus der Natriumresorption im distalen Colon darstellt. Die Regulation des ENaC in Colitis ulcerosa-Präparaten wurde anhand von elektrophysiologischen, immunhistochemischen und molekularbiologischen Methoden charakterisiert. Ebenso wurden die Auswirkungen von pro-inflammatorischen Zytokinen auf die Regulation des ENaC untersucht.

Zunächst wurde Colongewebe aus Operationspräparaten von Kontroll- und Colitispatienten gewonnen und nach Präparation in die Ussingkammer zur Messung des Kurzschlussstroms eingespannt. Nach 8 Stunden Inkubation mit Aldosteron wurde der elektrogene Natrium-Transport bestimmt und durch Hemmung mit Amilorid quantifiziert. Im gesunden Colongewebe stieg der Natrium-Transport unter Aldosteron deutlich an, während in Colitis ulcerosa-Präparaten ein gestörter Natriumstrom registriert wurde. In Northern-Blots wurde dann die Gesamt-RNA aus den Gewebstücken isoliert und die mRNA-Expression der α -, β - und γ -Untereinheiten des ENaC unter Aldosteron-Einfluss untersucht. In Kontrollgewebe zeigte sich eine deutliche Induktion der β - und γ -Untereinheiten, in Colitis ulcerosa-Präparaten blieb dieser Effekt aus. Die α -Untereinheit war in Colitis ulcerosa-Präparaten nicht signifikant zur Kontrolle verändert. Auf Proteinebene konnten ähnliche Phänomene gesehen werden. In Western-Blots zeigte sich das gleiche Muster wie auf mRNA-Ebene: die Expression der α -Untereinheit blieb unverändert unter Aldosteron-Inkubation, die β - und γ -Untereinheiten wurden in Kontrollgewebe deutlich stärker exprimiert. In Colitis ulcerosa-Präparaten blieb die Antwort der β - und γ -Untereinheiten auf Aldosteron aus. Die α -Untereinheit blieb in der Mucosa enthalten, was einen Hinweis für die Reifung des Epithels lieferte. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe eines Korrekturfaktors, welcher den Unterschied von epithelialelem und subepithelialelem Widerstand der Gewebe berücksichtigte, korrigiert. Dies berücksichtigte verdickte subepitheliale Gewebsanteile der entzündlich ödematösen Mucosa und der daraus resultierenden Verdünnung der

Konzentration epithelialer Proteine. Die Betrachtung der Morphometrie der Gewebe zeigte eine Rarefizierung der Krypten sowie die Verminderung von Kryptenlänge und -durchmesser in Colitis ulcerosa-Präparaten. In Immunfluoreszenzfärbungen zeigte sich, dass die β - und γ -Untereinheiten in den Kontrollgeweben stark durch Aldosteron induzierbar waren, während dies in Colitis-Präparaten nicht der Fall war. Die α -Untereinheit hingegen blieb exprimiert, auch in entzündetem Colitis-Gewebe. Für alle Untereinheiten jedoch galt, dass ihre Expression auf die Oberfläche begrenzt war.

Die Expression der ENaC-Untereinheiten wurde weiter in Experimenten mit pro-inflammatorischen Zytokinen betrachtet. Hierzu wurde humanes Colon sigmoideum zunächst mit den Zytokinen inkubiert, bevor Aldosteron hinzugegeben, der elektrogene Natrium-Transport bestimmt und die mRNA-Expression der drei ENaC-Untereinheiten untersucht wurde. Hierbei fand sich ein um ca. 50 % verminderter elektrogener Natrium-Transport in zuvor mit einer hohen Konzentration von TNF- α und IFN- γ prä-inkubierten Geweben. Diese verminderte Stromantwort spiegelte sich auch in der verminderten mRNA-Expression der β - und γ -Untereinheit wieder. Somit basiert die Störung des elektrogenen Na⁺-Transports auf einer durch Zytokine hervorgerufenen spezifischen Hemmung der mRNA-Expression der β - und γ -Untereinheit. Dies bedeutet, dass pro-inflammatorische Zytokine nicht nur an einer Störung der Barrierefunktion beteiligt sein können, sondern auch spezifische Transportsysteme auf molekularer Ebene gezielt blockieren können. Da die Zytokine TNF- α und IFN- γ bei Colitis ulcerosa erhöht gefunden werden, liegt der gestörten Na⁺-Resorption bei Colitis ulcerosa mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Zytokin-bedingte Hemmung der Transporterexpression zugrunde. Diese Expressionshemmung der ENaC- β - und γ -Untereinheiten durch hohe Zytokinspiegel resultiert in einem Verbleiben der Natrium-Ionen im Darmlumen und einer vermehrten Wasser- und Elektrolyt-ausscheidung mit typischer wässriger Diarrhoe bei Colitis ulcerosa.

Zukünftige Untersuchungen werden Erkenntnisse über die intrazellulären Signal-Transduktions-Mechanismen liefern. Weitere Analysen der Wirkung von pro-inflammatorischen Zytokinen auf die Regulation des ENaC und der Tight-Junction-Proteine könnten die Zusammenhänge zwischen Barriestörung und direkt gehemmtem spezifischen Transport klären. Auf längere Sicht könnten sich daraus neue Behandlungskonzepte mit gezielten Therapieansätzen für Colitis-Patienten entwickeln.

6 VERZEICHNISSE

6.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche (cm ²)
A.	Aqua
Ak	Antikörper
Aldo	Aldosteron
Amil	Amilorid
ASDN	Aldosteron-sensitives distales Nephron
BSA	Bovine Serum Albumin
Ctr	Kontrollgewebe
CU	Colitis ulcerosa
DNA	Dexoxyribonukleinsäure
EDC	Early Distal Colon
ENaC	Epithelialer Natrium-Kanal
I	Stromstärke (A)
IFN- γ	Interferon gamma
I _{sc}	Kurzschlussstrom
J _{Na}	Natriumstrom pro Flächeneinheit
kDa	Kilodalton
K _M	Michaelis-Konstante
LDC	Late Distal Colon
l	Liter
M	mol/l
mRNA	messenger RNA
NKCC	Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	Phosphate Buffered Saline/Tween
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPI	Phosphatase Inhibitor
R ^e	epithelialer Widerstand, bezogen auf serosale Fläche ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
R ^{sub}	subepithelialer Widerstand, bezogen auf serosale Fläche ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)

R^t	elektrischer Widerstand des Gewebes pro Flächeneinheit
RT	Raumtemperatur
SBTI	Soybean Trypsin Inhibitor
SCNN	Sodium channel nonvoltage gated
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SGK1	Serum- und Glucocorticoid- induzierte Kinase 1
SSC	2 M Sodium Chloride, 0,3 M Sodium Citrate, pH 7,0
TJ	Tight Junction
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Kammervolumen (l)
V_{\max}	maximale Transportrate ($\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)
V_{ms}	Potentialdifferenz zwischen mucosaler und serosaler Seite des Gewebes (mV)

6.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Schematische Darstellung der ENaC-Untereinheiten und der Kanalproteine
- Abb. 2: Schematische Darstellung der Darmwand
- Abb. 3: Versuchsstand mit Wärmetauscher
- Abb. 4: Elektrische Messanordnung der Kurzschlussstromversuche nach Ussing
- Abb. 5: Modell des elektrogenen Natrium-Transports im Colon
- Abb. 6: Aldosteron, Wirkung am Rezeptor, Induktion von Transkription und Translation
- Abb. 7: Kryptendarstellung in der Morphometrie
- Abb. 8: Wirkung von Aldosteron auf den ENaC
- Abb. 9: Kurzschlussstroms I_{sc} in Colitis ulcerosa-Präparaten. Vergleich des I_{sc} vor und nach Inkubation mit Aldosteron
- Abb. 10 u. 11: Histologische Bilder mit Darstellung der Krypten in der Morphometrie
- Abb. 12: Northern Blots: Induktion der ENaC mRNA in Colitis ulcerosa-Präparaten
- Abb. 13: Induktion der ENaC-Untereinheiten in Colitis ulcerosa-Präparaten
A: Western Blots, B: Densitometrie der Western Blots
- Abb. 14: Immunhistochemie mit Anfärbung und Western Blot-Analyse des Mineralocorticoid-Rezeptors
- Abb. 15: Induktion des ENaC bei Inkubation mit proinflammatorischen Zytokinen
- Abb. 16: Northern Blots
- Abb. 17: Densitometrie der Northern-Blots

7 LITERATURVERZEICHNIS

Alvarez de la Rosa D, Canessa CM, Fyfe GK, Zhang P. Structure and regulation of amiloride-sensitive sodium channels. *Annu Rev Physiol.* 2000;62:573-94.

Asher C, Wald H, Rossier BC, Garty H. Aldosterone-induced increase in the abundance of Na⁺-channel subunits. *Am J Physiol.* 1996 Aug;271(2 Pt 1):C605-11.

Barbry P, Hofman P. Molecular biology of Na⁺-absorption. *Am J Physiol.* 1997 Sep;273(3 Pt 1):G571-85.

Barmeyer C, Horak I, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. The interleukin-2-deficient mouse model. *Pathobiology.* 2002-2003;70(3):139-42.

Benos DJ.

Amiloride: a molecular probe of sodium transport in tissues and cells. *Am J Physiol.* 1982 Mar;242(3):C131-45. Review.

Canessa CM, Horisberger JD, Rossier BC. Epithelial sodium channel related proteins involved in neurodegeneration. *Nature* 1993;361:467-470.

Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, Rossier BC. Amiloride-sensitive epithelial sodium channel is made by three homologous subunits. *Nature* 1994;367:463-467.

Coric T, Hernandez N, Alvarez de la Rosa D, Shao D, Wang T, Canessa CM. Expression of ENaC and serum- and glucocorticoid-induced kinase 1 in the rat intestinal epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004 Apr;286(4):G663-70.

Epple HJ, Schulzke JD, Schmitz H, Fromm M. Enzyme- and mineralocorticoid receptor-controlled electrogenic Na⁺ absorption in human rectum in vitro. *Am J Physiol* 1995; 269:G42-48.

Epple HJ, Amasheh S, Mankertz J, Goltz M, Schulzke JD, Fromm M. Early aldosterone effect in distal colon by transcriptional regulation of ENaC subunits. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000 May;278(5):G718-24.

Escoubet B, Coureau C, Bonvalet JP, Farman N. Noncoordinate regulation of epithelial Na channel and Na pump subunit mRNAs in kidney and colon by aldosterone. *Am J Physiol*. 1997 May;272(5 Pt 1):C1482-91.

Eskandari S, Snyder PM, Kreman M, Zampighi GA, Welsh MJ, Wright EM. Number of subunits comprising the epithelial sodium channel. *J Biol Chem*. 1999 Sep 17;274(38):27281-6.

Firsov D, Gautschi I, Merillat AM, Rossier BC, Schild L. The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC). *EMBO J*. 1998 Jan 15;17(2):344-52.

Fromm M, Hegel U. Segmental heterogeneity of epithelial transport in rat large intestine. *Pflügers Arch*. 1978 Dec 15;378(1):71-83.

Fromm M, Oelkers W, Hegel U. Time course of aldosterone and corticosterone plasma levels in rats during general anaesthesia and abdominal surgery. *Pflügers Arch*. 1983 Dec;399(4):249-54.

Fromm M, Hegel U. Net ion fluxes and zero flux limiting concentrations in rat upper colon and rectum during anaesthesia-induced aldosterone liberation. *Pflügers Arch*. 1987 Feb;408(2):185-93.

Fromm M, Schulzke JD, Hegel U. Aldosterone low-dose, short-term action in adrenalectomized glucocorticoid-substituted rats: Na, K, Cl, HCO₃, osmolyte, and water transport in proximal and rectal colon *Pflügers Arch*. 1990 Jul;416(5):573-9.

Fromm M, Schulzke JD, Hegel U. Control of electrogenic Na⁺ absorption in rat late distal colon by nanomolar aldosterone. *Am J Physiol* 1993; 264 (*Endocrinol Metab*. 27): E68-E73.

Garty H. Molecular properties of epithelial, amiloride-blockable Na⁺- channels. *FASEB J*. 1994 May;8(8):522-8.

Garty H, Palmer LG. Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev*. 1997 Apr;77(2):359-96.

Geck P, Heinz E.

The Na-K-2Cl cotransport system. *J Membr Biol*. 1986;91(2):97-105. Review.

Greig E, Sandle GI. Diarrhea in ulcerative colitis. The role of altered colonic sodium transport. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;915:327-32

Greig ER, Boot-Handford RP, Mani V, Sandle GI. Decreased expression of apical Na⁺ channels and basolateral Na⁺, K⁺-ATPase in ulcerative colitis *J Pathol.* 2004 Sep;204(1):84-92.

Grotjohann I, Schulzke JD, Fromm M. Electrogenic Na⁺ transport in rat late distal colon by natural and synthetic glucocorticosteroids. *Am J Physiol.* 1999 Feb;276(2 Pt 1):G491-8.

Hawker PC, McKay JS, Turnberg LA. Electrolyte transport across colonic mucosa from patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 1980 Sep;79(3):508-11.

Hegel U, Fromm M.

Electrical measurements in large intestine (including caecum, colon, rectum). *Methods Enzymol.* 1990;192:459-84.

Hegel U, Fromm M, Kreusel KM, Wiederholt M.

Bovine and porcine large intestine as model epithelia in a student lab course. *Am J Physiol.* 1993 Dec;265(6 Pt 3):S10-9.

Hoogerwerf WA, Tsao SC, Devuyst O, Levine SA, Yun CH, Yip JW, Cohen ME, Wilson PD, Lazenby AJ, Tse CM, Donowitz M. NHE2 and NHE3 are human and rabbit intestinal brush-border proteins. *Am J Physiol.* 1996 Jan;270(1 Pt 1):G29-41.

Hummeler E, Horisberger JD. Genetic disorders of membrane transport. V. The epithelial sodium channel and its implication in human diseases. *Am J Physiol.* 1999 Mar;276(3 Pt 1):G567-71. Review.

Kosari F, Sheng S, Li J, Mak DO, Foskett JK, Kleyman TR. Subunit stoichiometry of the epithelial sodium channel. *J Biol Chem.* 1998 May 29;273(22):13469-74.

Lang F, Bohmer C, Palmada M, Seebohm G, Strutz-Seebohm N, Vallon V. (Patho)physiological Significance of the Serum- and Glucocorticoid-Inducible Kinase Isoforms. *Physiol Rev.* 2006 Oct;86(4):1151-78.

Lingueglia E, Renard S, Waldmann R, Voilley N, Champigny G, Plass H, Lazdunski M, Barbry P. Different homologous subunits of the amiloride-sensitive Na⁺ channel are differently regulated by aldosterone. *J Biol Chem*. 1994 May 13;269(19):13736-9.

Mankertz J, Tavalali S, Schmitz H, Mankertz A, Riecken EO, Fromm M, Schulzke JD. Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. *J Cell Sci*. 2000 Jun;113 (Pt 11):2085-90.

Meisler MH, Barrow LL, Canessa CM, Rossier BC. SCNN1, an epithelial cell sodium channel gene in the conserved linkage group on mouse chromosome 6 and human chromosome 12. *Genomics*. 1994 Nov 1;24(1):185-6.

Mick VE, Itani OA, Loftus RW, Husted RF, Schmidt TJ, Thomas CP. The alpha-subunit of the epithelial sodium channel is an aldosterone-induced transcript in mammalian collecting ducts, and this transcriptional response is mediated via distinct cis-elements in the 5'-flanking region of the gene. *Mol Endocrinol*. 2001 Apr;15(4):575-88.

Nellans HN, Frizzell RA, Schultz SG.

Brush-border processes and transepithelial Na and Cl transport by rabbit ileum. *Am J Physiol*. 1974 May;226(5):1131-41.

Rampton DS, Sladen GE. Relationship between rectal mucosal prostaglandin production and water and electrolyte transport in ulcerative colitis. *Digestion*. 1984;30(1):13-22.

Regueiro M, Loftus EV Jr, Steinhart AH, Cohen RD. Clinical Guidelines for the Medical Management of Left-Sided Ulcerative Colitis and Ulcerative Proctitis: Summary Statement. *Inflamm Bowel Dis*. 2006 Oct;12(10):972-978.

Renard S, Voilley N, Bassilana F, Lazdunski M, Barbry P. Localization and regulation by steroids of the alpha, beta and gamma subunits of the amiloride-sensitive Na⁺ channel in colon, lung and kidney. *Pflügers Arch*. 1995 Jul;430(3):299-307.

Rocha F, Musch MW, Lishanskiy L, Bookstein C, Sugi K, Xie Y, Chang EB. IFN- γ down-regulates expression of Na⁺/H⁺ exchangers NHE2 and NHE3 in rat intestine and human Caco-2/bbe cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000; 280:C1224-C1232.

Sandle GI, Hayslett JP, Binder HJ. Effect of glucocorticoids on rectal transport in normal subjects and patients with ulcerative colitis. *Gut*. 1986 Mar;27(3):309-16.

Sandle GI, Binder HJ.
Corticosteroids and intestinal ion transport. *Gastroenterology*. 1987 Jul;93(1):188-96

Sandle GI.
Segmental heterogeneity of basal and aldosterone-induced electrogenic Na transport in human colon. *Pflügers Arch*. 1989 Sep;414(6):706-12.

Sandle GI, Higgs N, Crowe P, Marsh MN, Venkatesan S, Peters TJ. Cellular basis for defective electrolyte transport in inflamed human colon. *Gastroenterology*. 1990 Jul;99(1):97-105.

Schild L.
The epithelial sodium channel: from molecule to disease. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2004;151:93-107.

Schlatter E, Greger R, Weidtko C.
Effect of "high ceiling" diuretics on active salt transport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. Correlation of chemical structure and inhibitory potency. *Pflügers Arch*. 1983 Mar 1;396(3):210-7.

Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, Runkel N, Foss HD, Bentzel CJ, Riecken EO, Schulzke JD. Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1999 Feb;116(2):301-9.

Schultheis PJ, Clarke LL, Meneton P, Miller ML, Soleimani M, Gawenis LR, Riddle TM, Duffy JJ, Doetschman T, Wang T, Giebisch G, Aronson PS, Lorenz JN, Shull GE. Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *Nat Genet*. 1998 Jul;19(3):282-5.

Schulzke JD, Fromm M, Hegel U.
Epithelial and subepithelial resistance of rat large intestine: segmental differences, effect of stripping, time course, and action of aldosterone. *Pflügers Arch*. 1986 Dec;407(6):632-7.

Schulzke JD, Fromm M, Menge H, Riecken EO. Impaired intestinal sodium and chloride transport in the blind loop syndrome of the rat. *Gastroenterology*. 1987 Mar;92(3):693-8.

Schulzke JD, Fromm M, Bentzel CJ, Menge H, Riecken EO. Ion transport in the experimental short bowel syndrome of the rat. *Gastroenterology*. 1992 Feb;102(2):497-504.

Spindler B, Mastroberardino L, Custer M, Verrey F. Characterization of early aldosterone-induced RNAs identified in A6 kidney epithelia. *Pflügers Arch*. 1997 Jul;434(3):323-31.

Staub O, Verrey F. Impact of Nedd4 proteins and serum and glucocorticoid-induced kinases on epithelial Na⁺ transport in the distal nephron. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Nov;16(11):3167-74.

Stokes JB, Sigmund RD. Regulation of rENaC mRNA by dietary NaCl and steroids: organ, tissue, and steroid heterogeneity. *Am J Physiol*. 1998 Jun;274(6 Pt 1):C1699-707.

Thomas CP, Auerbach S, Stokes JB, Volk KA. 5' heterogeneity in epithelial sodium channel alpha-subunit mRNA leads to distinct NH₂-terminal variant proteins. *Am J Physiol*. 1998 May;274(5 Pt 1):C1312-23.

Truelove SC, Richards WC. Biopsy studies in ulcerative colitis. *Br Med J*. 1956 Jun 9;(4979):1315-8.

Ussing HH, Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol. Scand*. 1951;23:110-127

Verrey F, Beron J, Spindler B. Corticosteroid regulation of renal Na,K-ATPase. *Miner Electrolyte Metab*. 1996;22(5-6):279-92.

Verrey F. Early aldosterone action: toward filling the gap between transcription and transport. *Am J Physiol*. 1999 Sep;277(3 Pt 2):F319-27.

Will PC, Lebowitz JL, Hopfer U. Induction of amiloride-sensitive sodium transport in the rat colon by mineralocorticoids. *Am J Physiol*. 1980;238:261-268.

Windmueller HG, Spaeth AE.

Identification of ketone bodies and glutamine as the major respiratory fuels in vivo for postabsorptive rat small intestine. *J Biol Chem.* 1978 Jan 10;253(1):69-76.

Yang H, Jiang W, Furth EE, Wen X, Katz JP, Sellon RK, Silberg DG, Antalis TM, Schweinfest CW, Wu GD. Intestinal inflammation reduces expression of DRA, a transporter responsible for congenital chloride diarrhea. *Am J Physiol.* 1998 Dec;275(6 Pt 1):G1445-53.

8 ANHANG

8.1 Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

8.2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Michael Fromm für die Vergabe des Dissertationsthemas sowie für die exzellente Betreuung und Unterstützung während aller Phasen meiner Doktorarbeit. Ich bedanke mich für die immerwährende Diskussionsbereitschaft und auch für die Chance, als Tutorin für Physiologie das gastroenterologische Praktikum der Klinischen Physiologie für zwei Jahre leiten und gestalten zu dürfen.

Ebenso geht ein herzliches Dankeschön an meinen Betreuer, Dr. rer. nat. Salah Amasheh, der mir während des experimentellen Teils und auch in der Schreibphase immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Während der Versuche konnte ich stets von seinem umfassenden Wissen über die Elektrophysiologie und Molekularbiologie profitieren und mich jederzeit mit Fragen an ihn wenden. Vielen Dank für die große Geduld und Unterstützung.

Ich bedanke mich auch sehr herzlich bei Prof. Dr. med. Jörg-Dieter Schulzke für die Zusammenarbeit bei den Publikationen und die Unterstützung.

Mein Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Physiologie für die freundliche Aufnahme in ihrer Abteilung und den stets hilfsbereiten Umgang miteinander.

Für die technische Hilfe bei den Ussingkammern und bei Formatierungsfragen bedanke ich mich bei Ing. grad. Detlef Sorgenfrei.

Auch den technischen Assistentinnen des Instituts Frau Anja Fromm, Frau Susanne Schön, Frau Sieglinde Lüderitz und Frau Ursula Lempart möchte ich ein herzliches Dankeschön sagen für die Hilfe und Anleitung bei den Methoden.

Für die gute Zusammenarbeit mit der chirurgischen und pathologischen Abteilung des Campus Benjamin Franklin der Charité – Universitätsmedizin Berlin bin ich sehr dankbar.

Meiner Mutter gilt für die stets moralisch aufbauenden Anrufe und ihre Anteilnahme ein herzlicher Dank. Mein Vater hat bis zu seinem Tode im August 2003 sehr großes Interesse an meiner Doktorarbeit gezeigt und mich motiviert. Vielen Dank Euch beiden.

Meiner besseren Hälfte Daniel Ostapowicz bin ich sehr dankbar für die Hilfe in verzweifelten Phasen und die immerwährende Unterstützung.

Meinen Großeltern danke ich für die moralische und die finanzielle Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung.

Meiner Cousine Caroline Hall danke ich sehr herzlich für die praktischen Tips während des Schreibens und für die geduldige Bereitschaft zur Diskussion.

Ein besonderer Gruß geht an unsere Laborband „The Tight Junctions“, in der ich selbst gern mitgewirkt habe. Danke für die schöne Zeit bei den Proben und Konzerten.

8.3 Publikationsliste

Origininalpublikation

1. Amasheh S, Barmeyer C, Koch CS, Tavalali S, Mankertz J, Epple HJ, Gehring MM, Florian P, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD (2004) Cytokine-dependent transcriptional down-regulation of epithelial sodium channel (ENaC) in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 126: 1711-1720. (Impact-Faktor₂₀₀₄ 13,1)

Publizierte Abstracts

2. Amasheh S, Koch CS, Barmeyer C, Epple HJ, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M (2002) Induction of colonic epithelial sodium channel in colitis ulcerosa is directly perturbed by cytokines. *J. Physiol. Biochem.* 58(4):293 (Eur. Intestinal Transport Group, Poster).
3. Amasheh S, Barmeyer C, Koch CS, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M (2003) Downregulation of ENaC by cytokines contributes to diarrhea in ulcerative colitis. *Pflügers Arch.* 445: S30 (Dt. Physiol. Ges., Vortrag)
4. Koch CS, Amasheh S, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M (2004) Pro-inflammatory cytokines abolish induction of the epithelial sodium channel ENaC. *Pflügers Arch.* 447: S124 (Dt. Physiol. Ges., Poster)
5. Amasheh S, Koch CS, Tavalali S, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M (2004) Induction of the epithelial sodium channel is abolished by proinflammatory cytokines. *J. Physiol. Biochem.* 60(2): 177 (Eur. Intestinal Transport Group, Poster)

8.4 Erklärung an Eides statt

Ich, Corinna Koch, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Analyse der gestörten Regulation des epithelialen Na⁺-Kanals (ENaC) bei der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Colitis ulcerosa“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift