

Aus dem  
CharitéCentrum für Innere Medizin mit Gastroenterologie und Nephrologie (CC13)  
Medizinische Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie  
(einschl. Arbeitsbereich Ernährungsmedizin)  
Campus Benjamin Franklin  
Direktorin: Prof. Dr. Britta Siegmund

## **Habilitationsschrift**

# **Mechanismen gestörter Ionentransports bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. med. Christian Alexander Barmeyer**  
**geboren in Freiburg im Breisgau**

<b>Eingereicht:</b>	<b>September 2016</b>
<b>Dekan:</b>	<b>Prof. Dr. med. Axel R. Pries</b>
<b>1. Gutachter/in:</b>	<b>Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wolfgang Stremmel</b>
<b>2. Gutachter/in:</b>	<b>Prof. Dr. med. Georg Lamprecht</b>

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungen</b>	1
<b>1. Einleitung</b>	3
1.1. Transport- und Barrierefunktion im Colon	3
1.1.1. Die elektroneutrale Resorption von Na <sup>+</sup> und Cl <sup>-</sup>	3
1.1.2. Die elektrogene Na <sup>+</sup> -Resorption	4
1.1.3. Die Tight Junction und ihr molekularer Aufbau	5
1.2. Formen der Diarrhö	6
1.2.1. Osmotische Diarrhö	6
1.2.2. Motilitätsbedingte Diarrhö	7
1.2.3. Malabsorptive Diarrhö	7
1.2.4. Sekretorische Diarrhö	7
1.2.5. Leckflux-Diarrhö	8
1.3. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	8
1.3.1. Colitis ulcerosa	9
1.3.2. Mikroskopische Colitis	9
1.4. Fragestellung	10
<b>2. Eigene Arbeiten</b>	12
2.1. Die Interleukin-2 Knockout Maus eignet sich als Modell für die entzündliche Regulation von Ionentransportprozessen im Colon	12
2.2. K <sup>+</sup> -Kanäle mittlerer Leitfähigkeit: Identifizierung unterschiedlicher Isoformen	17
2.3. Störungen der epithelialen Barriere und der elektrogenen Na <sup>+</sup> -Resorption als Diarrhömechanismen bei der mikroskopischen Colitis	32
2.4. Der gestörte elektrogene Na <sup>+</sup> -Transport bei lymphozytärer Colitis wird über einen MEK-ERK1/2-abhängigen Signalweg vermittelt	39
2.5. Die IL-13-induzierte Störung der elektrogenen Na <sup>+</sup> -Resorption wird vermittelt durch Modulation des STAT6/p38 MAPK-Signalwegs	50
<b>3. Diskussion</b>	66
<b>4. Zusammenfassung</b>	76
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	78
<b>6. Danksagung</b>	89
<b>7. Erklärung</b>	91

## Abkürzungen

CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
CNK3	<i>Scaffold Protein Connector Enhancer of Kinase Suppressor of Ras Isoform 3</i>
CU	Colitis ulcerosa
DRA	<i>Down-regulated in Adenoma</i> (Cl <sup>-</sup> /HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Austauscher)
ENaC	epithelialer Natriumkanal
ERC	ENaC-regulierender Komplex
ERK1/2	Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase 1/2
G <sup>e</sup>	epitheliale Leitfähigkeit
G <sup>s</sup>	subepitheliale Leitfähigkeit
G <sup>t</sup>	transmurale Leitfähigkeit
GILZ1	Glukokortikoid-induziertes Leuzin-Zipper Protein 1
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
NHE3	Natrium/Protonen-Austauscher 3
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IL-1 $\beta$	Interleukin-1beta
IL-13	Interleukin-13
IL-15	Interleukin-15
IL-2 <sup>-/-</sup> Maus	Interleukin-2-Knockout Maus
J <sub>Na</sub>	ENaC-vermittelter Amilorid-sensitiver elektrogener Na <sup>+</sup> -Transport
JAK1/2	Januskinase 1/2
KC	kollagene Colitis
LC	lymphozytäre Colitis
LSM	<i>Laser Scanning</i> Mikroskopie

MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MC	Morbus Crohn
MEK1/2	Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase 1/2
MR	Mineralokortikoid-Rezeptor
Nedd4-2	<i>Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2</i>
NHE3	Natrium/Protonen-Austauscher 3
NHERF1-3	Natrium/Protonen-Austauscher regulierender Faktor
p38 MAPK	p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
PD	elektrische Potentialdifferenz
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Protein Kinase A
Raf-1	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma-1</i>
R <sup>e</sup>	epithelialer Widerstand
R <sup>sub</sup>	subepithelialer Widerstand
R <sup>t</sup>	transmuraler Gesamtwiderstand
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RT-qPCR	<i>real time</i> -quantitative-Polymerase-Kettenreaktion
SGK1	Serum- und Glukokortikoid-induzierte Kinase 1
SGLT1	Na/Glukose-Cotransporter 1
STAT6	<i>Signal transducer and activator of transcription 6</i>
TGF-β	<i>Tumor Growth Factor-beta</i>
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure

## 1. Einleitung

### 1.1. Transport- und Barrierefunktion im Colon

Die Aufgabe des Colons besteht in der Resorption von Elektrolyten und Wasser und der Eindickung und Vorbereitung des Stuhls für die Ausscheidung. Täglich erreichen 1500 - 2000 ml Speisebrei aus dem Dünndarm das Colon. 1400 - 1900 ml elektrolytreiche Flüssigkeit wird zwischen Zökopol und Rektum durch die Dickdarmmukosa resorbiert, so dass die tägliche Ausscheidung nur etwa 100 ml Faeces beträgt. Dabei bewirken resorptive Transportprozesse, die durch Transport- und Kanalproteine in der apikalen und basolateralen Membran der polarisierten Epithelzellen reguliert werden, die Aufnahme von Elektrolyten und Wasser aus dem Darmlumen in den Organismus, während sekretorische Prozesse in der entgegengesetzten Richtung ablaufen. Unter physiologischen Bedingungen erfolgt im Colon eine Netto-Resorption von Elektrolyten und Wasser. Das heißt, die Gesamtheit aller resorptiven Transportvorgänge übersteigt die sekretorischen Transportvorgänge mit der Folge, dass mehr elektrolytreiche Flüssigkeit in den Organismus aufgenommen als in das Darmlumen abgegeben wird. Resorbiert werden vor allem  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  und Wasser, während  $\text{K}^+$  und  $\text{HCO}_3^-$  sezerniert werden. Die zentralen resorptiven Transportprozesse sind die elektroneutrale  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Resorption und die elektrogene  $\text{Na}^+$ -Resorption. Unter pathologischen Bedingungen kann diese Balance gestört sein mit der Folge von Elektrolyt- und Wasserverlust (Kunzelmann und Mall 2002).

Ein zentraler Faktor, der der Aufrechterhaltung dieser Balance dient, ist die Barrierefunktion der Epithelzellschicht, die durch den molekularen Aufbau der Tight Junction (TJ) bestimmt wird. Die epitheliale Barriere hat dabei zwei Funktionen, zum einen verhindert sie das Eindringen von Antigenen in den Organismus und zum anderen den Verlust von Elektrolyten und Wasser in das Darmlumen. Ist sie gestört, kann ebenfalls die Regulation der Elektrolyt- und Flüssigkeitsaufnahme gestört sein.

Einer genaueren Betrachtung dieser Mechanismen widmen sich die folgenden Unterkapitel.

#### **1.1.1. Die elektroneutrale Resorption von $\text{Na}^+$ und $\text{Cl}^-$**

Die elektroneutrale  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Resorption lässt sich im gesamten Colon nachweisen und findet sich sowohl im Oberflächenepithel als auch in Krypten (Singh et al. 1995). Sie zeigt eine segmentale Aufteilung mit abnehmender Aktivität von proximal nach distal (Kunzelmann und Mall 2002, Farkas et al. 2011) und ist verantwortlich für den Hauptteil der luminalen Resorption von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  im Colon, die über einen gekoppelten  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ - und  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch geschieht. Als verantwortliche Transportproteine für den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch wurden in der apikalen Membran die  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher Typ 2 und 3 (NHE2/3) identifiziert.

Dabei kommt dem NHE3 die entscheidende Rolle bei der elektroneutralen Na<sup>+</sup>-Resorption zu (Ikuma et al. 1999, Farkas et al. 2011). So konnte anhand von Knockout-Maus-Modellen gezeigt werden, dass der Verlust von NHE3, nicht aber von NHE2, zu einer Diarrhö führt (Schultheis et al. 1998, Ledoussal et al. 2001). Als zuständige Transportproteine für den Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austausch sind im Menschen die Proteine SLC26A3 (*Down-Regulated in Adenoma* (DRA)) und SLC26A6 (*Putative Anion Transporter Type 1* (PAT1)) verantwortlich (Schweinfest et al. 1993, Wang et al. 2005, Zachos et al. 2005). Letzterer ist jedoch ausschließlich im Dünndarm exprimiert. In der Ratte hingegen wird der Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austausch neben dem DRA auch noch durch den *Anion Exchanger Type 1* (AE1) vermittelt (Rajendran et al. 2000). Als treibende Kraft für die elektroneutrale Na<sup>+</sup>-/Cl<sup>-</sup>-Resorption fungiert die in der basolateralen Membran lokalisierte Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Jørgensen 1980).

Die Regulation der elektroneutralen Na<sup>+</sup>-/Cl<sup>-</sup>-Resorption erfolgt über eine Vielzahl von Faktoren und ist insbesondere für den NHE3 untersucht worden. Dabei spielen Protein-Protein-Interaktionen (z.B. mit den Scaffoldern NHERF1-4), Signaltransduktion (z.B. Clathrin-vermittelte Endozytose, Interaktion mit dem Zytoskelett, Nachweis in Recycling-Endosomen), Regulation der Transkription (z.B. durch Zytokine, Gluko-/Mineralokortikoide, enteropathogene Bakterienprodukte) und Phosphorylierung durch Aktivierung von Protein Kinase A (PKA) oder durch die Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase 1 (SGK1) eine große Rolle (He und Yun 2010).

### **1.1.2. Die elektrogene Na<sup>+</sup>-Resorption**

Die elektrogene Na<sup>+</sup>-Resorption findet sich vor allem im distalen Colon und ist beschränkt auf Oberflächenepithel und obere Kryptenanteile (Kunzelmann und Mall 2002). Auch hier zeigt sich eine segmentale Aufteilung, die sich invers zur elektroneutralen Na<sup>+</sup>-/Cl<sup>-</sup>-Resorption mit abnehmender Aktivität nach proximal verhält und im proximalen Colon nur noch gering nachweisbar ist (Sandle et al. 1986, Farkas et al. 2011). Allerdings muss hier erwähnt werden, dass es Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies gibt. So dominiert der elektrogene Na<sup>+</sup>-Transport als hauptverantwortlicher Mechanismus für die Na<sup>+</sup>-Resorption insbesondere im distalen Colon von Kaninchen, während dies im distalen Colon der Ratte die elektroneutrale Na<sup>+</sup>-/Cl<sup>-</sup>-Resorption ist (Potter und Burlingame 1986, Binder et al. 1987). Für den Menschen war dies lange Zeit unklar. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass, ähnlich wie beim Kaninchen, der elektrogene Na<sup>+</sup>-Transport auch hier der vorherrschende Mechanismus für die Na<sup>+</sup>-Resorption im distalen Colon ist (Farkas et al. 2011).

Zuständig für den elektrogenen Na<sup>+</sup>-Transport ist der epitheliale Na<sup>+</sup>-Kanal (ENaC), der sich aus den drei Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  zusammensetzt. Ein funktionsfähiger Kanal erfordert eine Zusammensetzung aus je einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit (Firsov et al. 1998, Jasti et al.

2007). Während sich die  $\alpha$ -Untereinheit konstitutiv in der apikalen Membran des Colonozyten befindet, werden die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten erst nach Stimulation durch Mineralo- oder Glukokortikoide exprimiert und in die apikale Membran eingebaut.

Die Regulation der elektrogenen  $\text{Na}^+$ -Resorption erfolgt durch ein komplexes Zusammenspiel von aktivierenden und inhibitorischen Faktoren. Dabei kommt zwei Signalwegen eine zentrale Rolle zu: dem Raf-1-MEK1/2-ERK1/2-Signalweg und der E3-Ubiquitin-Ligase Nedd4-2. Unstimuliert überwiegt die Aktivität der inhibitorischen Proteine Raf-1 und Nedd4-2. Die Aktivierung von Raf-1 führt zu einer Aktivierung der MEK1/2-ERK1/2-Signalkaskade, deren Komponenten innerhalb eines Multi-Protein-Komplexes, dem ENaC-regulierenden Komplex (ERC) (Kyriakis 2007), organisiert sind und dort die Inhibition des ENaC vermitteln (Soundararajan et al. 2010). Auch Nedd4-2, welches durch Phosphorylierung seines C-terminalen Endes eine Hemmung der ENaC-Untereinheiten bewirkt, interagiert mit dem ERC. Die Anwesenheit von Aldosteron hingegen bewirkt eine vermehrte Expression der ENaC-stimulierenden Proteine GILZ1, SGK1 und CNK3, wodurch die inhibierende Wirkung von ERK1/2 und Nedd4-2 aufgehoben wird. Nach der Hypothese von Soundararajan et al. bildet dabei CNK3 das zentrale Mineralokortikoid-gesteuerte Grundgerüst für die Zusammensetzung des ERC, das für eine adäquate Signaltransduktion erforderlich ist (Soundararajan et al. 2012).

### **1.1.3. Die Tight Junction und ihr molekularer Aufbau**

Das morphologische Korrelat für die epitheliale Barriere im Colon ist die TJ, die aus besonders charakteristischen netzwerkartigen Zell-Zell-Verbindungen zwischen den Epithelzellen aufgebaut ist. TJs sind im apikalen Teil der lateralen Membran verankert und umgeben die Epithelzellen ringförmig. Sie verhindern die freie Diffusion von Soluten und Wasser zwischen dem vaskulären Kompartiment und dem Darmlumen ebenso wie das unkontrollierte Eindringen von luminalen Antigenen. Ihre molekulare Zusammensetzung entscheidet über die „Dichtheit“ des Epithels. Je dichter ein Epithel ist, desto größer können Konzentrationsunterschiede sein, gegen die Solute transportiert werden. Das einschichtige hochprismatische Epithel des Colons gilt gemeinhin als semidichtes Epithel mit einer graduellen Zunahme der „Dichtheit“ von proximal nach distal, was es ihm erlaubt, Solute aktiv gegen hohe Konzentrationsgefälle zu transportieren.

Der molekulare Aufbau der TJ basiert auf strangartig vernetzten Molekülen von denen 1993 als erstes Occludin identifiziert wurde (Furuse et al. 1993). Occludin interagiert innerhalb der TJ mit TJ-assoziierten Molekülen wie ZO-1 und ZO-2 und ist außerdem mit dem Zytoskelett verankert (Furuse et al. 1994). Eine weitere Gruppe von TJ-Molekülen ohne Sequenzhomologie mit Occludin ist die multigene Familie der Claudine. Erstmals

beschrieben 1998 von einer japanischen Arbeitsgruppe (Furuse et al. 1998) sind bis heute 27 unterschiedliche Claudine beim Säugetier bekannt, davon 26 beim Menschen, von denen aber nicht alle auch im Colon zu finden sind (Mineta et al. 2011). Sie bilden das Grundgerüst der TJ. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Claudine höchst unterschiedliche Funktionen ausüben können. So unterscheidet man zunächst Barriere-/Kanalbildner, die eine Art Türsteher-Funktion („gate function“) ausüben und Nicht-Barriere-/Kanalbildner, die in der zellulären Signaltransduktion, Proliferation, Differenzierung, Rezeptorfunktion und Motilität/Migration involviert sind. Eine weitere Funktion besteht in einer Zaun-Funktion („fence function“), durch die eine Vermischung von Proteinen der apikalen und der lateralen Membran verhindert wird. Somit verhindern Claudine zum einen die unkontrollierte parazelluläre Passage von Soluten und Wasser sowie das Eindringen von luminalen Antigenen über das Epithel in den Organismus und fungieren zum anderen als selektiver parazellulärer Permeationsort, über den kontrolliert resorptive und sekretorische Prozesse ablaufen (Krug et al. 2014).

## **1.2. Formen der Diarrhö**

Die Diarrhö als Symptom stellt die Endstrecke unterschiedlicher, einzeln oder gemeinsam im Darm auftretender pathophysiologischer Vorgänge dar. In Abhängigkeit vom vorherrschenden Mechanismus lassen sich unterschiedliche Formen der Diarrhö unterscheiden. Grundsätzlich gilt aber, dass mit Ausnahme der motilitätsbedingten Diarrhö alle Diarrhöformen durch osmotische Wirkungen entstehen, bei denen durch das vermehrte Vorhandensein osmotisch wirksamer Solute im Darmlumen, sei es durch verminderte Resorption oder vermehrte Sekretion, auch vermehrt Wasser im Darmlumen gebunden und schließlich ausgeschieden wird.

In den folgenden Unterkapiteln werden nun verschiedene Formen der Diarrhö, die auf unterschiedlichen Pathomechanismen beruhen, betrachtet.

### **1.2.1. Osmotische Diarrhö**

Kommt es zu einer Anreicherung von nicht resorbierbaren Substanzen im Colon spricht man von einer osmotischen Diarrhö im engeren Sinne. Hierzu zählen z.B. Laktulose und Magnesiumsalze (Hammer et al. 1989, Schiller 2012). Ein charakteristisches diagnostisches Kriterium für das Vorliegen einer osmotischen Diarrhö ist ihr Sistieren bei Nahrungskarenz.



### **1.2.2. Motilitätsbedingte Diarrhö**

Motilitätsbedingte Diarrhöen entstehen durch Hyper- oder Hypomotilität des Darms. Bei der hypermotilen Form der Diarrhö liegt eine verkürzte Kontaktzeit der aus dem Dünndarm ankommenden Faeces mit der Colonschleimhaut durch vermehrte Darmkontraktionen vor. Die maximale Resorptionskapazität des Colons in der Zeit bis zur Ausscheidung reicht dabei nicht aus, um dem Stuhl eine ausreichende Menge an Soluten und Wasser zu entziehen und ihn für die Ausscheidung einzudicken (Spiller 2006). Diese Form der Diarrhö lässt sich beispielsweise bei der Hyperthyreose oder dem Karzinoidsyndrom beobachten. Bei der hypomotilitätsbedingten Form der Diarrhö spielt vor allem die Überwucherung mit Bakterien die entscheidende Rolle. Diese Diarrhöform findet sich zum Beispiel beim Diabetes mellitus.

### **1.2.3. Malabsorptive Diarrhö**

Von einer malabsorptiven Diarrhö spricht man, wenn prinzipiell resorbierbare Substanzen nicht ausreichend resorbiert werden. Dies kann auf zweierlei Prinzipien beruhen:

1. auf gestörten Transportmechanismen, wie z.B. der Glukose-Galaktose-Malabsorption, bei der ein Defekt im Natrium/Glukose-Cotransporter (SGLT1) vorliegt (Xin und Wang 2011, Podeshanskyy et al. 2014),  
  
und
2. aufgrund einer verminderten Resorptionsfläche, was zu einer verminderten Resorption von osmotisch wirksamen Substanzen führt, wie z.B. bei der Zöliakie.

Eine Form der malabsorptiven Diarrhö ist auch die maldigestive Diarrhö. Von einer maldigestiven Diarrhö spricht man bei verminderter oder fehlender Aufspaltung von Nahrungsbestandteilen in ihre resorbierbaren Einheiten. Eine solche Form der Diarrhö findet sich z.B. bei der exokrinen Pankreasinsuffizienz (Brelvi und Tenner 2012).

### **1.2.4. Sekretorische Diarrhö**

Die sekretorische Diarrhö entsteht durch aktive transepitheliale Sekretion von Elektrolyten, insbesondere von Anionen ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ), in das Darmlumen. Dadurch kommt es zu einer entsprechenden Bindung von Wasser mit konsekutiver Diarrhö. Dies ist zum Beispiel bei bakteriellen Toxinen, wie der Cholera der Fall. Das Cholera-toxin bewirkt eine massive  $\text{Cl}^-$ -Sekretion mit charakteristischen, sehr dünnen, weißlich-trüben Durchfällen, was bei fehlender Flüssigkeitssubstitution letal enden kann (Harris et al. 2012). Auch die kongenitale Chloriddiarrhö (Holmberg 1986) oder die vermehrte Ausscheidung von Gallen- und Fettsäuren führen zu einer sekretorischen Diarrhö.

### **1.2.5. Leckflux-Diarrhö**

Bei der Leckflux-Diarrhö liegt eine gestörte Funktion der epithelialen Barriere vor. Dabei ist die TJ nicht mehr in der Lage die Abdichtung des Epithels zu erhalten. Die parazelluläre Permeabilität ist erhöht. Es kommt zum parazellulären Verlust von Elektrolyten und Wasser, der auch durch intakte transzelluläre Ionentransportprozesse nicht aufgehalten werden kann. Dies resultiert in einer parazellulären Verschiebung von Flüssigkeit und Soluten in das Darmlumen, was schließlich in einer Diarrhö resultiert. Ein Beispiel für eine solche Leckflux-Diarrhö ist die pseudomembranöse Colitis durch Infektion mit *Clostridium difficile* (Nusrat et al. 2001).

Lange Zeit war unklar, welchen Einfluss Apoptosen auf die epitheliale Barriere haben und ob sie auch zu einer Leckflux-Diarrhö beitragen könnten. Zunächst glaubte man nicht an einen relevanten Einfluss. So wurde in der Zellkultur an LLC-PK1-Zellen, einer Nierenepithelzelllinie, gezeigt, dass eine Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ )-induzierte erhöhte Apoptoserate keine Störung der epithelialen Barriere verursachte. Dies wurde durch ein gezieltes „tissue remodeling“ erklärt (Peralta Soler et al. 1996), bei dem „die Nachbarzellen die Abdichtung der apoptotischen Zelle während ihrer Extrusion aus dem Epithelverband garantieren können“ (Bücker 2015). Gitter et al. hingegen etablierten die hochauflösende „Voltage Scanning“-Technik, mit der es gelang, einzelne Apoptosen auf ihre Leitfähigkeit hin zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass die Erhöhung der Leitfähigkeit einzelner Apoptosen sehr wohl dazu beiträgt, eine Barrierestörung zu induzieren (Gitter et al. 2000). Dies konnte unter anderem beim Morbus Crohn und bei gastrointestinalen Infektionen, wie der Lambliasis oder der Norovirusinfektion, nachgewiesen werden (Zeissig et al. 2004, Troeger et al. 2007, Troeger et al. 2009).

### **1.3. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen**

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind schubweise verlaufende chronische Erkrankungen mit unterschiedlich schweren Verläufen. Zu ihnen zählen im engeren Sinn die Colitis ulcerosa (CU) und der Morbus Crohn (MC), zwei Erkrankungen, die gehäuft in der Adoleszenz und im jungen Erwachsenenalter auftreten. Eine Sonderform der CED ist die mikroskopische Colitis. Diese tritt gehäuft im höheren Lebensalter auf und umfasst die beiden Subtypen lymphozytäre (LC) und kollagene Colitis (KC). Der Verlauf der mikroskopischen Colitis kann ebenfalls schubweise sein, die Symptomatik bleibt jedoch eher blande im Vergleich zu den „klassischen“ CED. Im Folgenden folgt eine kurze Übersicht über die CU und die mikroskopische Colitis.

### **1.3.1. Colitis ulcerosa**

Die Colitis ulcerosa (CU) ist, wie der Name bereits erkennen lässt, dadurch gekennzeichnet, dass sie sich abgesehen von einer als „Backwash“-Ileitis bezeichneten gelegentlichen Mitbeteiligung des terminalen Ileums ausschließlich auf das Colon bezieht. Es ist eine Erkrankung die gehäuft in Industriestaaten vorkommt und dort vor allem Erwachsene zwischen 25 und 35 betrifft. Ein zweiter, aber nicht so deutlich ausgeprägter Erkrankungsgipfel findet sich im 7. und 8. Lebensjahrzehnt. Die Prävalenz liegt bei 40-200 Erkrankungen/100.000 Einwohner. Die Klinik umfasst akute Schübe mit symptomfreien Intervallen dazwischen, sowie chronisch kontinuierliche Verläufe. Die Langzeit-Prognose ist jedoch gut. So ist zwar die Rezidivrate innerhalb der ersten 5 Jahre nach Diagnosestellung mit 83% relativ hoch, danach jedoch erreichen 43% der Patienten innerhalb des Beobachtungszeitraums von 10 Jahren Rezidivfreiheit (Solberg et al. 2009). Eine Progression von einer Proktitis oder Linksseitencolitis hin zu einer Pancolitis konnte in etwa 20% der Fälle beobachtet werden und die Kolektomie-Rate war mit 9,8% innerhalb des Beobachtungszeitraums verhältnismäßig niedrig (Solberg et al. 2009). Leitsymptome sind blutig-schleimige Durchfälle und Bauchschmerzen bis hin zu Tenesmen. Auch extraintestinale Symptome können auftreten. Hierzu gehören Anämie, Gewichtsverlust, Fieber, Arthritis, Erythema nodosum und Augensymptome. Begleiterkrankungen wie die primär sklerosierende Cholangitis und Lebererkrankungen sind nicht selten (Colia et al. 2016). Die Diagnose wird durch Anamnese und körperliche Untersuchung, Labor, sowie den endoskopischen und histologischen Befund gestellt (Dignass et al. 2011). Durch eine Stuhluntersuchung auf Erreger sollte eine infektiöse Genese ausgeschlossen werden. Die Therapie basiert auf einer medikamentösen antientzündlichen, bzw. immunsuppressiven Behandlung mit Substanzen wie Mesalazin, Prednisolon, Azathioprin, TNF- $\alpha$ -Blockern, Cyclosporin A, Tacrolimus und Vedolizumab, die individuell angepasst wird und sich nach dem Verlauf richtet (Dignass et al. 2011, Feagan et al. 2013). In schweren, therapierefraktären Fällen kann auch eine Kolektomie notwendig werden. Grundsätzliches Ziel ist die Durchbrechung des akuten Schubes und die möglichst lange Aufrechterhaltung einer Remission, sowie langfristig die Vermeidung eines Colonkarzinoms, dessen Entstehungsrisiko bei ausgedehntem Colonbefall und langem Krankheitsverlauf erhöht ist (Eaden et al. 2001, Winther et al. 2004, Lakatos et al. 2006, Söderlund et al. 2009).

### **1.3.2. Mikroskopische Colitis**

Unter der mikroskopischen Colitis werden zwei Subtypen subsummiert, die lymphozytäre (LC) und die kollagene Colitis (KC). Das endoskopische Bild ist häufig unauffällig. In einigen Fällen kann aber auch ein mildes Schleimhautödem beobachtet werden (Villanueva und

Alimi 2015). Die exakte Diagnose wird histologisch gestellt. Beide Subtypen sind gekennzeichnet durch eine Erhöhung der intraepithelialen Lymphozyten im Colon über den Grenzwert von 20/100 Enterozyten hinaus. Bei der KC ist zusätzlich noch das in der Lamina propria gelegene kollagene Band mit  $>10 \mu\text{m}$  verdickt. Es ist jedoch nicht ganz klar, ob es sich dabei um zwei unterschiedliche Krankheitsentitäten handelt oder um ein und dieselbe Entität unterschiedlicher Ausprägung. Die mikroskopische Colitis galt bisher als selten, ist nun jedoch eine zunehmend häufiger diagnostizierte Erkrankung, die vor allem Menschen in höherem Alter betrifft. So stieg etwa die Inzidenz laut einer populationsbasierten kanadischen Studie innerhalb von vier Jahren von 16,9 auf 26,2 Neuerkrankungen/100.000 Einwohner (Stewart et al. 2011). Die gleiche Studie ermittelte beispielsweise für die CU und den MC eine Inzidenz von 11 und 16,5/100.000. Diese lag somit sogar etwas niedriger als bei der mikroskopischen Colitis. Auf ähnliche Zahlen kam eine dänische Studie, die den Zeitraum von 2002 – 2011 untersuchte (Bonderup et al. 2015). Die Symptomatik ist gekennzeichnet durch das Leitsymptom wässrige Diarrhö, die häufig auch nachts auftritt. Weitere Symptome sind Gewichtsverlust, Bauchschmerzen, Übelkeit oder Blähungen. Bei kollagener Colitis kann es auch zu extraintestinalen Symptomen kommen, wie z.B. rheumatischen Gelenksbeschwerden, Psoriasis oder Schilddrüsenfunktionsstörungen. Die Diagnose wird ausschließlich biotisch im Rahmen einer Koloskopie gestellt. Dabei zeigen sich die oben bereits erwähnten histologischen Veränderungen am häufigsten im proximalen Colon. Die Therapie besteht je nach Schwere der Symptomatik z.B. in der Gabe von Budesonid. Der Verlauf der LC und KC ist gutartig, auch wenn chronische Verläufe häufig vorkommen.

#### **1.4. Fragestellung**

CED, wie CU, LC und KC, sind komplexe Krankheitsbilder mit unterschiedlichen Erscheinungsformen. Ihnen allen gemeinsam ist jedoch die Diarrhö als Hauptsymptom. Die molekularen Mechanismen die hierfür verantwortlich sind, sind jedoch nicht hinreichend bekannt. So belegen in vivo-Daten einen verminderten Netto Ionen-Transport bei Patienten mit CED, der auf einer verminderten Resorption von  $\text{Na}^+$  und Wasser basiert (Harris und Shields 1970, Rask-Madsen 1973, Rask-Madsen und Dalmark 1973, Rask-Madsen und Jensen 1973). Funktionelle in vitro-Untersuchungen am Rektum von Patienten mit CU und MC konnten zeigen, dass bei beiden Krankheitsentitäten eine Störung des elektrogenen  $\text{Na}^+$ -Transports und eine erhöhte Durchlässigkeit („Leakiness“) der Mukosa besteht (Sandle et al. 1990). Dies ließ auf eine Beteiligung des ENaC, aber auch der epithelialen Barriere

schließen. Untersuchungen zu möglichen Veränderungen auf molekularer Ebene wurden bisher jedoch nicht durchgeführt.

Die folgenden Arbeiten eint daher die zentrale Fragestellung nach den molekularen Mechanismen, die hinter der Entstehung der Diarrhö bei CED stehen. Hierzu wurden an Biopsien von Patienten mit CU und mikroskopischer Colitis, unterschiedlichen Tiermodellen, aber auch in Zellkulturen, verschiedene elektrophysiologische, molekularbiologische und bildgebende Techniken bis hin zu den neuesten Sequenzieretechniken eingesetzt, um ein möglichst umfassendes Bild über die pathologischen Vorgänge auf molekularer Ebene zu gewinnen. Dies umfasst die Analyse der Expression und Funktion einzelner Transportprozesse wie z.B. des ENaC, aber auch die Untersuchung der epithelialen Barrierefunktion in entzündlichen Situationen.

## 2. Eigene Arbeiten

### 2.1. Die Interleukin-2-Knockout Maus eignet sich als Modell für die entzündliche Regulation von Ionentransportprozessen im Colon

(Barmeyer, C., Horak, I., Zeitz, M., Fromm, M., Schulzke, J. D. (2002). "The Interleukin-2-deficient Mouse Model." Pathobiology 70: 139-142.)

In dieser Originalarbeit wurden die Mechanismen der Diarrhoe bei der Interleukin-2-Knockout (IL-2<sup>-/-</sup>) Maus funktionell untersucht. Wie von B. Siegmund beschrieben, gibt es unterschiedliche Tiermodelle für die experimentelle Colitis, die zwar keine Kopie der humanen Erkrankungen darstellen, aber für das pathophysiologische Verständnis von Entzündungsreaktionen bedeutsam sind (Siegmund 2005). Neben Tiermodellen, die auf einer experimentellen Immundefizienz beruhen (z.B. CD4<sup>+</sup>CD45<sup>rb</sup><sup>high</sup>-Transfer Maus) gibt es auch Tiermodelle mit einer durch exogene Noxen ausgelösten Colitis (z.B. Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)-induzierte Colitis der Maus) und genetisch veränderte Tiere zu denen auch das Modell der IL-2<sup>-/-</sup>-Maus gehört (Siegmund 2005). Aufgrund klinischer und morphologischer Ähnlichkeit spiegelte die IL-2<sup>-/-</sup>-Maus Aspekte einer CU wider (Sadlack et al. 1993) und wurde daher hinsichtlich der pathophysiologischen Mechanismen der zugrunde liegenden Diarrhö untersucht. Im Gegensatz zur Colitis ulcerosa (Schmitz et al. 1999) ist die epitheliale Barriere bei der Colitis der IL-2<sup>-/-</sup>-Maus nicht gestört. So lag die epitheliale Leitfähigkeit ( $G^e$ ) bei der IL-2<sup>-/-</sup>-Maus mit  $20,2 \pm 1,3 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$  sogar unterhalb der Leitfähigkeit der Kontrolltiere (Wildtyp, IL-2<sup>+/+</sup>) ( $28,8 \pm 2,8 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $p < 0,02$ ). Bei ebenfalls verminderter subepithelialer Leitfähigkeit  $G^s$  ( $29,5 \pm 4,1 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$  versus  $53,1 \pm 4,9 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,  $p < 0,01$ ), die auf entzündliche Veränderungen in Lamina propria und Submukosa zurückzuführen ist, spiegelte sich der Abfall von  $G^e$  und  $G^s$  auch in einer entsprechend verminderten transepithelialen Leitfähigkeit  $G^t$  wider ( $11,4 \pm 0,9$  versus  $17,9 \pm 1,2 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;  $p < 0,001$ ). Während die epitheliale Barriere nicht gestört war, wurde jedoch eine Dysfunktion des elektrogenen Na<sup>+</sup>-Transports im distalen Colon bei diesem Modell festgestellt. Der Aldosteron-stimulierte Amilorid-sensitive elektrogene Na<sup>+</sup>-Transport ( $J_{\text{Na}}$ ) war bei den IL-2<sup>-/-</sup>-Mäusen mit  $1,7 \pm 0,7$  versus  $6,9 \pm 0,9 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  ( $p < 0,001$ ) so gut wie nicht mehr stimulierbar. Im Gegensatz zur CU, bei der ein Leckflux-Mechanismus vorliegt, beruht die Diarrhö bei der IL-2<sup>-/-</sup>-Maus somit vor allem auf dem Mechanismus einer Na<sup>+</sup>-Malabsorption und weniger auf einer Dysfunktion der epithelialen Barriere.

Mit dieser Arbeit gelang es erstmals eine Dysfunktion des ENaC unter entzündlichen Bedingungen herauszuarbeiten. Diese Erkenntnisse stellten auch die Grundlage für einige der folgenden Arbeiten dar.

<http://dx.doi.org/10.1159/000068145>









## 2.2. K<sup>+</sup>-Kanäle mittlerer Leitfähigkeit: Identifizierung unterschiedlicher Isoformen

(Barmeyer, C., Rahner, C., Yang, Y., Sigworth, F. J., Binder, H. J. and Rajendran, V. M. (2010). "Cloning and identification of tissue-specific expression of KCNN4 splice variants in rat colon." Am J Physiol Cell Physiol 299(2): C251-263.)

Ca<sup>2+</sup>-abhängige Kaliumkanäle mittlerer Leitfähigkeit, auch KCNN4 oder K<sub>Ca</sub>3.1 genannt, haben eine Reihe von wichtigen Funktionen. So dienen sie zum einen der Aufrechterhaltung der intrazellulären Homöostase, spielen aber auch insbesondere eine zentrale Rolle bei der Sekretion von K<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> in Epithelzellen (Joiner et al. 2003, Wang et al. 2003, Lauf et al. 2008). Aufgrund ihrer physiologischen Eigenschaften, der guten Modulierbarkeit durch Inhibitoren, wie z.B. Clotrimazol und seiner Analoga TRAM 34 und ICA-17043, aber auch aufgrund ihrer Lokalisation - typischerweise in peripherem Gewebe, wie Epithelien und glatter Muskulatur, und Blutzellen, wie Erythrozyten und T-Lymphozyten - rückten sie schon früh als mögliches therapeutisches Ziel bei Autoimmunerkrankungen, wie z.B. CED in den Fokus (Jensen et al. 2002). So konnte gezeigt werden, dass KCNN4-Kanäle in intestinalen Epithelzellen sowohl in der basolateralen als auch in der apikalen Membran exprimiert werden (Furness et al. 2003, Joiner et al. 2003, Chen et al. 2004, Halm et al. 2006). Allerdings wurde in diesen Studien nicht geklärt, ob es sich dabei um ein und dasselbe oder unterschiedliche Transkripte handelt. Diese Fragen zu beantworten, war Ziel der folgenden Arbeit.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang im Colon der Ratte unter Einsatz der Reversen-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR), der *real-time*-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) und der Immunfluoreszenzmikroskopie die Identifizierung und die Darstellung der zellulären Verteilung dreier Splice-Varianten des KCNN4, die als KCNN4a, KCNN4b und KCNN4c benannt wurden. Die drei Transkripte hatten eine Länge von 425 (KCNN4a), 424 (KCNN4b) und 395 (KCNN4c) Aminosäuren. KCNN4a unterschied sich von KCNN4b an Position 415, an dem ein zusätzliches Glutamin eingebaut war, und anhand von 628 bp in der 3' untranslatierten Region. KCNN4c wiederum fehlte im Vergleich zu KCNN4b das zweite Exon, ein Motif, das für 29 Aminosäuren kodiert. Die KCNN4a-mRNA war zwar in der glatten Muskulatur exprimiert, aber nur äußerst gering im Gastrointestinaltrakt. KCNN4b- und KCNN4c-mRNA hingegen ließ sich in allen Abschnitten des Dick- und Dünndarms und des Magens nachweisen, nicht jedoch in der glatten Muskulatur. Das Verhältnis der mRNA Expression von KCNN4a zu KCNN4b/c im distalen Colon lag bei 1:5. Dass KCNN4b und KCNN4c für den Gastrointestinaltrakt spezifisch sind, konnte auch dadurch belegt werden, dass nur diese beiden Transkripte, nicht jedoch KCNN4a in IEC-6 Zellen, einer intestinalen Rattenzelllinie, nachweisbar waren.

Um nun die Proteinlokalisierung innerhalb der Zellmembran bestimmen zu können, wurde ein polyklonaler Antikörper generiert und getestet (rabbit anti-KCNN4-abc). Dabei zeigte sich elektronenmikroskopisch ein Signal in der apikalen und lateralen Membran, nicht jedoch basal. Im Western Blot konnte dann in der apikalen ein 37 kDa (entsprechend KCNN4c) und in der basolateralen Membranfraktion ein 40 kDa großes Protein (KCNN4b) detektiert werden, so dass die intermembranäre Verteilung für KCNN4b offensichtlich streng lateral und für KCNN4c apikal vorliegt und somit unterschiedliche Funktionen zu vermuten sind.

Um die Funktion zu untersuchen wurden die Transkripte KCNN4b und KCNN4c zunächst in HEK293-Zellen transfiziert und per Patch-Clamp-Technik versucht, ihre Funktion zu charakterisieren. Aufgrund zu niedriger Kanaldichte und Instabilität der Patches gelang es jedoch nicht, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der gemessenen Ströme zu belegen, so dass die Versuche in Oozyten durchgeführt werden mussten. Hier konnte dann die Funktion nach Injektion der cRNA beider Transkripte durch  $^{86}\text{Rb}$ -Fluxe und den Einsatz des KCNN4-Inhibitors TRAM-34 eindeutig belegt werden. TRAM-34 inhibierte dabei den  $^{86}\text{Rb}$ -Flux mit unterschiedlichen inhibitorischen Konstanten von  $0,6 \pm 0,1$  für KCNN4b und  $7,8 \pm 0,4$   $\mu\text{M}$  für KCNN4c, was unterschiedliche Funktionen beider Splice-Varianten belegt.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass im Rattencolon zwei unterschiedliche KCNN4-Transkripte exprimiert sind: zum einen KCNN4b in der lateralen Membran und zum anderen KCNN4c in der apikalen Membran der Colonozyten. KCNN4b könnte somit die treibende Kraft für die  $\text{Cl}^-$ - und  $\text{HCO}_3^-$ -Sekretion sein, während der apikale KCNN4c für die Regulation der  $\text{K}^+$ -Sekretion zuständig und möglicherweise für die hohen  $\text{K}^+$ -Konzentrationen, die bei Diarrhö im Stuhl gemessen werden, mitverantwortlich ist.

<http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00091.2009>





























### **2.3. Störungen der elektrogenen Na<sup>+</sup>-Resorption und der epithelialen Barriere als Diarrhömechanismen bei der mikroskopischen Colitis**

(Barmeyer, C., Erko, I., Fromm, A., Bojarski, C., Allers, K., Moos, V., Zeitz, M., Fromm, M., Schulzke, J. D. (2012). "Ion transport and barrier function are disturbed in microscopic colitis." Ann N Y Acad Sci 1258: 143-148)

Neben der Colitis ulcerosa und dem Morbus Crohn zählt auch die mikroskopische Colitis zu den CED. Für diese Entität existierten bisher aber nur wenige Untersuchungen über die zugrunde liegenden Diarrhömechanismen. Die folgende Arbeit widmete sich dieser Fragestellung.

Die Untersuchungen wurden am Colon sigmoideum von Patienten mit aktiver kollagener Colitis (KC), lymphozytärer Colitis (LC) und an LC-Patienten, die nach einer mindestens vierwöchigen Therapie mit täglich 9 mg Budesonid beschwerdefrei waren, durchgeführt. In dieser Arbeit wurde ein Methodenspektrum eingesetzt, das neben elektrophysiologischen Untersuchungen in Ussing-Kammern einschließlich der Ein-Wege-Impedanz-Spektroskopie auch Cytometric Bead Arrays umfasste. Es konnte gezeigt werden, dass die ENaC-vermittelte elektrogene Na<sup>+</sup>-Resorption ( $J_{Na}$ ) bei Patienten mit mikroskopischer Colitis gestört ist.  $J_{Na}$  war bei Kontrollen mit  $15,5 \pm 3,2 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  mehr als 3x so hoch wie bei Patienten mit KC ( $4,7 \pm 2,1 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ). Auch war die epitheliale Barriere bei der KC gestört. Der epitheliale Widerstand als Maß für die Barrierefunktion des Epithels war gegenüber Kontrollen um etwa 25% vermindert, was gleichbedeutend mit einer Störung der epithelialen Barriere ist. Die Therapie mit Budesonid führte dann zu einer Symptomnormalisierung mit Reduktion der Stuhlfrequenz von 5,7 Stühlen/Tag in unbehandelter mikroskopischer Colitis auf 1,7 Stühle/Tag bei behandelten Patienten. Dies ging einher mit einer Normalisierung von  $J_{Na}$  ( $11,7 \pm 4,0 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ), nicht aber der Barriestörung. Diese blieb weiterhin bestehen ( $41 \pm 2$  bei Kontrollen versus  $27 \pm 4 \Omega \cdot \text{cm}^2$  bei behandelter LC). Die unter Budesonid erzielte Symptombefreiheit, trotz weiterhin bestehender Barriestörung, lässt darauf schließen, dass die Diarrhö bei der mikroskopischen Colitis möglicherweise primär durch die Störung des Ionentransports zustande kommt und nicht durch die Barriestörung. Ein weiterer Indikator hierfür ist auch die im Verhältnis zu Morbus Crohn und Colitis ulcerosa eher geringe Störung der epithelialen Barriere.

Zusätzlich wurde ein Zytokin-Profil mit Hilfe von Cytometric Bead Arrays aus Überständen von Biopsien des Colon sigmoideum erstellt. Dabei zeigten sich bei der mikroskopischen Colitis die pro-inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$  erhöht. Diese könnten für die beobachteten Effekte verantwortlich sein.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06631.x>













## 2.4. Der gestörte elektrogene Na<sup>+</sup>-Transport bei lymphozytärer Colitis wird über einen MEK-ERK1/2-abhängigen Signalweg vermittelt

(Barmeyer, C., Erko, I., Fromm, A., Bojarski, C., Loddenkemper, C., Dames, P., Kerick, M., Siegmund, B., Fromm, M., Schweiger, M.R., Schulzke, J. D. (2016). "ENaC Dysregulation Through Activation of MEK1/2 Contributes to Impaired Na<sup>+</sup> Absorption in Lymphocytic Colitis." Inflamm Bowel Dis 22(3): 539-547.)

Wie in der vorherigen Publikation von Barmeyer et al. (2012), aber auch von anderen bereits beschrieben (Tagkalidis et al. 2007, Dey et al. 2013, Kumawat et al. 2013), weist die lymphozytäre Colitis (LC), ähnlich dem Morbus Crohn, ein Zytokinprofil mit erhöhten Konzentrationen von TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und insbesondere IL-15 (nicht aber IL-13) auf. Dieses legte den Schluss nahe, dass auch bei der wässrigen Diarrhö der LC eine Störung des elektrogenen Na<sup>+</sup>-Transports im distalen Colon vorliegen könnte. Da zu den Diarrhömechanismen bei LC bis dahin nichts bekannt war, wurde in der folgenden Arbeit diese Frage gezielt untersucht.

Die Untersuchungen wurden mit Hilfe elektrophysiologischer und molekularbiologischer Methoden am Colon sigmoideum von Patienten mit neu diagnostizierter LC durchgeführt. Histologisch zeigten sich keine Ulzerationen oder Defekte. Lediglich die Zahl der intraepithelialen Lymphozyten (IEL) war erhöht ( $43 \pm 7$  versus  $4 \pm 1$  IEL/100 Enterozyten;  $p < 0,001$ ). Die maximale ENaC-Transportkapazität nach Aldosteron-Stimulation ( $J_{Na}$ ) erreichte jedoch lediglich 36% im Vergleich zu Kontrollen und war somit erheblich vermindert. Dies ging einher mit einer stark verminderten Hochregulation der mRNA-Expression der  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC, nicht jedoch der  $\beta$ -Untereinheit, die sich nur tendenziell änderte. Die mRNA der  $\alpha$ -Untereinheit hingegen war gar nicht verändert und ist als konstitutionell exprimiert anzusehen. Mit Hilfe von Versuchen am Rattendarm, einem geeigneten Modell für den elektrogenen Na<sup>+</sup>-Transport (Barmeyer et al. 2004), konnten nach Gabe eines Zytokin-Cocktails bestehend aus TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-15 diese Beobachtungen in der Ussing-Kammer simuliert werden. Auch hier zeigte sich ein deutlicher Abfall der maximalen ENaC-Transportkapazität in Anwesenheit der Zytokine. Welcher Signalweg war nun verantwortlich für die Hemmung der ENaC-Funktion? Nachdem Zeissig et al. für den MC bereits demonstriert hatten, dass der MEK-ERK1/2-Signalweg eine zentrale Rolle spielt (Zeissig et al. 2008), erschien es naheliegend, dies auch bei der Ratte und schließlich der LC zu testen. Hierbei zeigte sich im mit den oben genannten Zytokinen vorinkubierten Rattenmodell eine Aufhebung durch den ERK1/2-Inhibitor U0126, nicht jedoch durch die p38- und c-Jun-Inhibitoren SB202190 und SP600125. Dieses Ergebnis zeigte sich dann

auch bei der LC, wo sich durch U0126 die Hemmung der maximalen Transportkapazität des ENaC aufheben ließ (Disinhibitionsansatz).

Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass eine MEK-ERK1/2-vermittelte elektrogene Na<sup>+</sup> Resorptionsstörung im distalen Colon bei Patienten mit LC zur wässrigen Diarrhö beiträgt. Dies geschieht mittels Aktivierung des oben genannten Signalwegs durch die proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-15, was wiederum eine Hemmung der Aldosteron-vermittelten transkriptionellen Regulation der  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC zur Folge hat.

<http://dx.doi.org/10.1097/MIB.0000000000000646>



















## 2.5. Die IL-13-induzierte Störung der elektrogenen Na<sup>+</sup>-Resorption wird vermittelt durch Modulation des JAK1/2-STAT6-p38 MAPK-Signalwegs

(Dames, P., Bergann, T., Fromm, A., Bücker, R., **Barmeyer, C.**, Krug, S. M., Fromm, M., Schulzke, J. D. (2015). "Interleukin-13 affects the epithelial sodium channel in the intestine by coordinated modulation of STAT6 and p38 MAPK activity." J Physiol 593(24): 5269-5282.)

Nachdem in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass die maximale Transportkapazität des ENaC bei der CU durch den Einfluss pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  gestört ist (Amasheh et al. 2004), identifizierten Heller et al. bei der CU IL-13 als das hauptverantwortliche pro-inflammatorische Zytokin für den Zusammenbruch der epithelialen Barriere durch vermehrte Apoptose und Veränderungen der TJ (Heller et al. 2005). Dies führte zu der Frage, ob neben TNF- $\alpha$  auch IL-13 einen Effekt auf die Transportfunktion des ENaC hat. Dieser Frage wurde mit der nachfolgenden Arbeit nachgegangen.

Die Primäruntersuchungen wurden an Zellkulturen durchgeführt. Dazu wurde eine stabil mit dem Glukokortikoid- und Mineralokortikoid-Rezeptor transfizierte Zelllinie (HT-29/B6-GR/MR), einem Subklon der weit verbreiteten humanen Colonkarzinomzelllinie HT-29, verwendet (Bergann et al. 2011). Die Stimulation des ENaC mit 50 nM Dexamethason, 2 mM Na-Butyrat und 3 nM Aldosteron (DBA) führte zu einer Aktivierung der elektrogenen Na<sup>+</sup>-Resorption ( $J_{Na}$ ) durch den ENaC, die in Anwesenheit von IL-13 dosisabhängig bis auf 49 $\pm$ 9% der Kontrolle abfiel. Ein ähnlicher Effekt konnte im Colon von intraperitoneal mit IL-13 vorbehandelten Mäusen beobachtet werden. Hier zeigte sich eine um mehr als 50% reduzierte maximale ENaC-Aktivierungskapazität nach DBA-Stimulation. Dies war zurückzuführen auf eine verminderte Hochregulation der mRNA der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC und der Serum- und Glukokortikoid-induzierten Kinase 1 (SGK1), einem zentralen Regulator des Einbaus der ENaC-Untereinheiten in die apikale Zellmembran, die jeweils auf einer Hemmung der Promotoraktivität beruhen, wie Luciferase-Assays zeigten.

Im nächsten Schritt wurde der Frage nachgegangen, welche intrazellulären Signalwege involviert sind. Dabei konnte eine Abhängigkeit der IL-13 induzierten  $J_{Na}$ -Hemmung von der p38 MAPK demonstriert werden, bei der eine Inhibition der DBA-induzierten Phosphorylierung in Anwesenheit von IL-13 beobachtet wurde. Auch konnte durch Hemmung der p38 MAPK durch den spezifischen p38-Inhibitor SB202190 in Anwesenheit von nur DBA die maximale Aktivierungskapazität des ENaC um nahezu 80% inhibiert werden, was darauf hindeutete, dass die Phosphorylierung der p38 MAPK eine Voraussetzung für das Erreichen der maximalen Transportkapazität des ENaC ist. In weiteren Experimenten gelang dann auch der Nachweis, dass die Aktivierung von STAT6,

einem Downstream-Target von IL-13, eine Hemmung von  $J_{Na}$  induziert, genauso wie die Aktivierung von JAK1/2. Die Hemmung von STAT6 oder JAK1/2 hingegen stellte die maximale Transportkapazität des ENaC wieder vollständig her. Eine Hemmung der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K), ebenfalls ein Downstream-Target von IL-13, zeigte hingegen keinen Effekt auf  $J_{Na}$ . Diese Beobachtungen konnten abschließend in STAT6<sup>-/-</sup> Mäusen bestätigt werden. Hier hatte die intraperitoneale Gabe von IL-13 erwartungsgemäß keinen Effekt auf die DBA-induzierte maximale ENaC Transportkapazität.

Aus diesen Daten ergab sich ein neues Modell für die ENaC-Regulation durch IL-13: IL-13 bewirkt eine Aktivierung von JAK1/2, was zu einer Phosphorylierung von STAT6 führt. Das wiederum bewirkt eine Hemmung der DBA-stimulierten Aktivierung der p38 MAPK wodurch die Expression der ENaC  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit und/oder SGK1 gehemmt wird.

<http://dx.doi.org/10.1113/JP271156>































### 3. Diskussion

Mit bis zu 200 m<sup>2</sup> resorptiver Oberfläche ist der Darm im menschlichen Körper das Organ mit der größten exponierten Fläche gegenüber der Umwelt. Er ist ausgekleidet mit einem einschichtigen, hochprismatischen Epithel, welches den Organismus von den Einflüssen der Außenwelt trennt und auch schützt. Dabei kommen dem Darm zwei entscheidende und für das Wohlergehen des Menschen essentielle Funktionen zu:

1. die Transportfunktion mit kontrollierter Resorption von Nährstoffen, Soluten und Wasser,

und

2. die Barrierefunktion als primäre Verteidigungslinie gegenüber luminalen Antigenen.

Bei CED kann eine profuse Diarrhö auftreten (Sandle et al. 1986). Etliche Faktoren scheinen dabei eine Rolle zu spielen, aber kein einzelner kann allein alle Aspekte der Krankheitsentstehung erklären. Es handelt sich vielmehr um ein kompliziertes Zusammenspiel von Umwelteinflüssen, genetischen und/oder psychologischen Faktoren, in Kombination mit Infektionen und einem gestörten Immunsystem, wodurch eine Fehlregulation der Immunantwort bewirkt wird. Aus dieser Fehlregulation resultiert letztlich eine chronische Entzündung mit teilweise irreparablen Schaden der gastrointestinalen Mukosa (Yadav et al. 2016). Obwohl dies sowohl für die CU, als auch den MC gleichermaßen gilt, gibt es doch Unterschiede in der Immunantwort. Neben den durch aktivierte Makrophagen und dendritische Zellen der Lamina propria freigesetzten pro-inflammatorischen Zytokinen (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-18) wird bei MC durch Freisetzung von IL-12 und IL-23 noch eine Th17 Antwort induziert (Zanello et al. 2014), während man bei CU vor allem vermehrt TGF- $\beta$ , IL-5 und IL-13 findet (Fuss und Strober 2008, Mannon et al. 2011, Corridoni et al. 2014). Diese Mediatoren beeinflussen Transport und Barriere einerseits im Rahmen einer akuten Regulation *via* intrazellulärer Botenstoffe wie cAMP oder Calcium, andererseits aber auch bei chronischer Einwirkung durch eine gestörte Expression von Transportproteinen oder eine Störung der Darmarchitektur. Dadurch entstehen Störungen der resorptiven Transportfunktion des Darmes, die nicht nur in makroskopisch oder mikroskopisch befallenen Darmsegmenten auftreten, sondern auch außerhalb davon (Amasheh et al. 2004, Zeissig et al. 2008). Gleichzeitig tritt häufig eine mehr oder weniger ausgeprägte epitheliale Barriestörung auf, die zu der Diarrhö im Sinne eines Leckflux-Mechanismus beiträgt (Schmitz et al. 1999, Gitter et al. 2000). Hierfür sind sowohl Veränderungen der Tight Junction-Struktur (Schmitz et al. 1999) als auch die Induktion von Apoptosen im Epithelverband (Strater et al. 1997) verantwortlich und das

macht die klinisch oft ausgeprägte Symptomatik erklärbar. In den folgenden Unterkapiteln sollen diese Phänomene einzeln diskutiert werden.

### **Gestörter Ionentransport bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Das quantitativ bedeutendste resorptive Transportsystem des Colons für  $\text{Na}^+$  ist die elektroneutrale  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Resorption, die durch einen gekoppelten Ionenaustausch von  $\text{Na}^+$  und  $\text{H}^+$ , vermittelt durch den NHE3, sowie  $\text{Cl}^-$  und  $\text{HCO}_3^-$ , vermittelt durch DRA, reguliert wird.

Der aktive elektrogene  $\text{Na}^+$ -Transport hingegen ist quantitativ das wichtigste ionale Resorptionssystem des distalen Colons und hat große Bedeutung für die Eindickung der Faeces. Insofern besitzt der Dickdarm auch eine relevante Reservefunktion bei Diarrhöen. Seine Transportkapazität wird durch Mineralokortikoide und Glukokortikoide reguliert, die als Folge von Diarrhö-bedingten Elektrolytverlusten vermehrt freigesetzt werden. So findet sich bei gestörter elektroneutraler  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Resorption, wie sie beispielsweise bei  $\text{NHE3}^{-/-}$ -Mäusen beobachtet wird, eine kompensatorische Hochregulation von Aldosteron im Plasma, die eine Aktivierung von ENaC zur Folge hat (Schultheis et al. 1998, Ledoussal et al. 2001).

Im Colon wird die elektrogene  $\text{Na}^+$ -Resorption durch Aldosteron nach einer durch Rezeptorbindung, Translokation, Transkription und Translation bedingten Latenzphase aktiviert. Dies ist durch Heraufregulation der Expression des ENaC bedingt, später wird zusätzlich die basolaterale  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase stimuliert (Benos et al. 1995). Der ENaC besteht molekular aus der  $\alpha$ -Untereinheit, die das eigentliche Porenprotein darstellt, und regulatorischen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten. Die Klonierung der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC von Ratte und Menschen ermöglichte einen direkten experimentellen Zugang (Canessa et al. 1993, Lingueglia et al. 1993, Canessa et al. 1994, Baker et al. 1995). In kombinierten molekularbiologischen und elektrophysiologischen Messungen konnte unsere Gruppe zeigen, dass die Aktivierung der elektrogenen  $\text{Na}^+$ -Resorption im distalen Colon durch die Heraufregulation der mRNA-Expression der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit induziert wird (Epple et al. 2000, Amasheh et al. 2004, Barmeyer et al. 2004).

Daneben spielt auch die Regulation der Rekrutierung des ENaC in die apikale Enterozytenmembran eine wichtige Rolle. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, kommt dabei insbesondere zwei Signalwegen, dem Raf-1-MEK1/2-ERK1/2-Signalweg und Nedd4-2, eine zentrale Rolle zu. Ohne Mineralo- oder Glukokortikoid-Stimulation überwiegt zunächst die Aktivität der inhibitorischen Proteine Raf-1 und Nedd4-2, die Teil des ERC sind. Nach Mineralokortikoid-Stimulation hingegen bewirkt eine vermehrte Expression und das Zusammenspiel der ENaC-stimulierenden Proteine GILZ1, SGK1 und CNK3 eine Konformationsänderung des ERC (Soundararajan et al. 2012), woraufhin die inhibierende

Wirkung von ERK1/2 und Nedd4-2 aufgehoben wird und die Genexpression und Rekrutierung der ENaC-Untereinheiten in die apikale Enterozytenmembran erfolgen kann.

Verantwortlich für funktionelle Veränderungen bei intestinaler Entzündung sind insbesondere pro-inflammatorische Mediatoren wie TNF- $\alpha$  (Schmitz et al. 1999) und IFN- $\gamma$  (Madara und Stafford 1989, Willemsen et al. 2005), die in erhöhter Konzentration in der intestinalen Mukosa bei CED (Stallmach et al. 2004) und auch bei mikroskopischer Colitis gefunden wurden (Tagkalidis et al. 2007, Barmeyer et al. 2012, Dey et al. 2013, Kumawat et al. 2013). Die Funktion von IL-13 hingegen, welches eine Rolle bei der CU spielt, ist nicht abschließend geklärt. Zwar gilt als gesichert, dass IL-13 neben einem Anstieg der Apoptoserate auch eine Störung der epithelialen Barriere und der mukosalen Restitution induziert (Heller et al. 2005), Phase IIa Studien mit den IL-13 Antikörpern Tralokinumab und Arunkinzumab hatten aber keinen messbaren therapeutischen Effekt bei aktiver CU gezeigt (Danese et al. 2015, Reinisch et al. 2015). Allen diesen Entzündungsmediatoren ist jedoch gemein, dass sie die epitheliale Barrierefunktion über die TJ (Heyman et al. 1994) und durch Erhöhung der epithelialen Apoptoserate beeinflussen können (Gitter et al. 2000). Außerdem sind sie in der Lage, epitheliale Resorptionssysteme funktionell zu inhibieren, wie wir für die elektrogene Na<sup>+</sup>-Resorption (Amasheh et al. 2004, Barmeyer et al. 2004) und andere für den Natrium-Protonen-Austauscher 2 und 3 (NHE2 und NHE3) bei der elektroneutralen Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Resorption zeigen konnten (Rocha et al. 2001). Den Einfluss der bei CED erhöhten pro-inflammatorischen Zytokine konnten wir dabei insbesondere am Beispiel der elektrogenen Na<sup>+</sup>-Resorption über den ENaC genauer charakterisieren. Nachdem wir in der IL-2<sup>-/-</sup>-Maus erstmals nachweisen konnten, dass die elektrogene Na<sup>+</sup>-Resorption in der entzündlichen Situation nachhaltig gestört ist und auch durch Stimulation mit Aldosteron nicht mehr aktiviert werden konnte (Barmeyer et al. 2002, Barmeyer et al. 2004), untersuchten wir gezielt die Wirkung von TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$  auf die Funktion des ENaC sowohl im Rektum der Ratte (Barmeyer et al. 2004) als auch des Menschen (Amasheh et al. 2004). Dabei gelang uns der Nachweis, dass die Expression der  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC-Untereinheit durch TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  auf Promotorebene inhibitorisch beeinflusst wird. In der Folge kommt es durch Hemmung der mRNA-Expression für diese beiden Kanaluntereinheiten zu einer Störung der ENaC-Aktivität und damit der aktiven elektrogenen Na<sup>+</sup>-Resorption. Im Ergebnis resultiert daraus eine Diarrhö. Dabei scheinen, in Abhängigkeit vom vorherrschenden Zytokinprofil, unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden eine Rolle zu spielen. Bei Erkrankungen, die ein TNF- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ -prädominantes Zytokinprofil ohne IL-13 aufweisen, wie z.B. KC oder LC, konnten wir zeigen, dass insbesondere die Aktivierung der MEK-ERK1/2-Signalkaskade eine Hemmung der mRNA-Expression der  $\gamma$ -Untereinheit induziert. Wird diese Hemmung durch Inhibition von ERK1/2 aufgehoben, lässt sich die Aktivität des ENaC komplett wieder

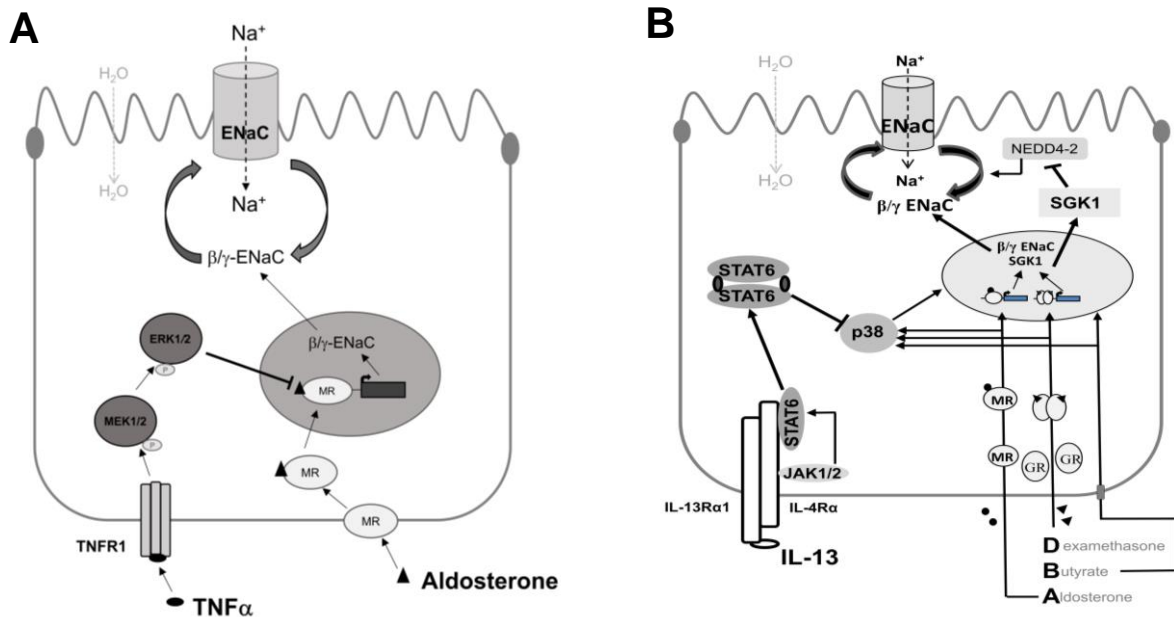
herstellen (Zeissig et al. 2007, Barmeyer et al. 2016). Anders verhält es sich in Anwesenheit von IL-13. Hier gelang uns der Nachweis, dass noch ein weiterer, MEK-ERK1/2-unabhängiger Signalweg involviert sein kann: JAK1/2-STAT6/p38MAPK. Wird dieser Signalweg durch IL-13 aktiviert, inhibiert dies zum einen die Expression der ENaC  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit auf Promotorebene und zum anderen die Expression von SGK1, was eine Störung des elektrogeneren  $\text{Na}^+$ -Transports mit verminderter maximaler Transportkapazität zur Folge hat (Dames et al. 2015). Aus diesen Daten konnten wir in Abhängigkeit vom Zytokinprofil zwei unabhängige Modelle für die entzündliche ENaC-Regulation herleiten:

1. Inhibition des ENaC über den MEK1/2-ERK1/2-Signalweg bei Vorliegen von hohen  $\text{TNF-}\alpha$ - und  $\text{IFN-}\gamma$ -Spiegeln (Abb. 1A),

und

2. Inhibition des ENaC über die JAK1/2-STAT6/p38MAPK-Signalkaskade durch hohe IL-13 Spiegel (Abb. 1B).

Ähnlich fundierte Modelle lassen sich für die elektroneutrale  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Resorption bisher noch nicht herleiten. Durch unsere Arbeiten mit der IL-2<sup>-/-</sup>-Maus (Barmeyer et al. 2002, Barmeyer et al. 2004) gelang überhaupt erst der Nachweis, dass die Expression von NHE3 auf mRNA- und Proteinebene im entzündeten Colon quantitativ herabreguliert sein kann. Dabei zeigte sich eine Diskrepanz zwischen der deutlichen, um 80% verminderten  $\text{Na}^+$ -Resorption im proximalen Colon, aber nur einer um 24% verminderten NHE3-Proteinkonzentration, die diesen erheblichen Einbruch der  $\text{Na}^+$ -Resorption alleine nicht erklären konnte (Barmeyer et al. 2004). Erst später gelang der experimentelle Nachweis, dass eine entzündlich bedingte Herabregulation von NHERF3 (PDZK1), einem Adapterprotein, dass für die Funktion des NHE3 eine wichtige Rolle spielt, zu deutlich verminderten Transportraten führt, ohne dass die Expression von NHE3 nachhaltig vermindert ist (Yeruva et al. 2015). Die Daten zur mRNA- und Proteinexpression von NHE3 sind auch weiterhin widersprüchlich. Während Sullivan et al. und Siddique et al. eine deutlich verminderte Expression auf Proteinebene, sowohl im Western Blot als auch in der Immunfluoreszenz (nur Sullivan et al.), bei Patienten mit aktiver CU oder aktivem MC feststellten (Siddique et al. 2009, Sullivan et al. 2009), beobachteten Lohi et al. auf mRNA-Ebene und Yeruva et al. auf mRNA- und Proteinebene dies nicht (Lohi et al. 2002, Yeruva et al. 2010, Yeruva et al. 2015). Unabhängig von diesen widersprüchlichen Beobachtungen scheint die verminderte Expression der NHE3-Adapterproteine NHERF1, -2 und -3 hier aber eine tragende Rolle zu spielen (Sullivan et al. 2009, Yeruva et al. 2015). Weiterführende Untersuchungen sind aber sicherlich nötig, um die Regulation der elektroneutralen  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Resorption unter entzündlichen Bedingungen besser zu verstehen und die verantwortlichen intrazellulären Signalwege zu identifizieren.



**Abbildung 1: Modelle der entzündlichen ENaC-Regulation.** (A), TNF- $\alpha$ -induzierte Aktivierung der MEK2-ERK1/2-Signalkaskade führt zu einer Inhibition der Transkription der  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC-Untereinheit. Durch die konsekutiv fehlende Translation und den fehlenden Einbau der beiden Untereinheiten zu einem funktionsfähigem Kanalprotein in der apikalen Colonozytenmembran kommt es zu einer deutlichen Verminderung der maximalen Transportkapazität nach Stimulation mit Aldosteron. (B, entnommen aus Dames et al. 2015), Im HT29/B6-GR/MR-Zellkulturmodell führt die Stimulation mit DBA zu einer Hochregulation der  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC-Untereinheit und von SGK1. Dies wird zum einen erreicht durch die p38 MAPK und zum anderen durch Transaktivierung von Zielgenen über die Aktivierung des Mineralokortikoid- (MR) und Glukokortikoid-Rezeptors (GR). IL-13 bindet an den IL-13R $\alpha$ 1/IL-4R $\alpha$ -Typ-I-Rezeptor und bewirkt eine Aktivierung von JAK1/2. Dadurch wird STAT6 phosphoryliert und das wiederum führt zu einer Hemmung der DBA-stimulierten und aktivierten p38 MAPK, wodurch es in der Konsequenz zu einer Hemmung der Expression der  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC-Untereinheit und der SGK1 kommt (Dames et al. 2015).

Um eine reibungslose Na<sup>+</sup>-Resorption im distalen Colon zu gewährleisten, ist die Aufrechterhaltung der elektrischen Potentialdifferenz (PD) essentiell. Dies geschieht zum einen durch die apikale Cl<sup>-</sup>-Sekretion und die Aktivität der basolateral lokalisierten Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase und zum anderen zum großen Teil durch die elektrogene Na<sup>+</sup>-Resorption selbst, durch die eine Lumen-negative PD aufgebaut wird (Sandle et al. 1986). Kommt es nun durch entzündliche Prozesse, wie bei CED, zu einer Hemmung der Expression funktioneller ENaC-Untereinheiten und der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase mit entsprechend eingeschränkter maximaler Transportkapazität, resultiert daraus eine Depolarisation der Zelle (Amasheh et al. 2004, Greig et al. 2004). Durch Experimente mit intrazellulären Mikroelektroden gelang dabei der Nachweis, dass für den Verlust der PD unterschiedliche Phänomene verantwortlich sind, zum einen eine Depolarisation der basolateralen Membran und zum anderen eine



Hyperpolarisation der apikalen Membran und eine mehr als doppelt so hohe mukosale Leitfähigkeit (Sandle et al. 1990). Das intrazelluläre Membranpotential selbst, welches ebenfalls für die Na<sup>+</sup>-Resorption eine wichtige Rolle spielt, wird dabei vor allem durch basolateral lokalisierte Ca<sup>2+</sup>-abhängige Kaliumkanäle mittlerer Leitfähigkeit (KCNN4 oder nach neuerer Nomenklatur K<sub>Ca</sub>3.1) aufrechterhalten (Sandle et al. 1994, Bowley et al. 2003). Schon früh wurde daher spekuliert, dass KCNN4 für die Änderung der elektrischen Eigenschaften bei aktiver CED mit verantwortlich sein könnte, und rückte daher als mögliches therapeutisches Ziel in den Fokus (Jensen et al. 2002). Da KCNN4 in polarisierten Epithelzellen aber nicht nur basolateral, sondern auch apikal nachweisbar ist (Furness et al. 2003, Joiner et al. 2003, Chen et al. 2004, Halm et al. 2006), lag der Verdacht nahe, dass unterschiedliche KCNN4-Varianten vorliegen, die entsprechend unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen könnten. Vor diesem Hintergrund ist unsere Arbeit zur Identifizierung von KCNN4 Splice-Varianten innerhalb der polarisierten Epithelzelle zu sehen, die am Colon der Ratte durchgeführt wurde (Barmeyer et al. 2010). Mit dieser Arbeit gelang uns die Identifizierung von insgesamt drei KCNN4 Splice-Varianten, die als KCNN4a, -b und -c bezeichnet wurden und von denen nur KCNN4b und -c im Colonepithel nachweisbar sind, während KCNN4a in glatter Muskulatur zu finden war. Mit Hilfe von Oozyten-Injektionsexperimenten konnten wir unterschiedliche funktionelle Eigenschaften nachweisen. Zusammen mit Western Blots ließ sich ableiten, dass KCNN4b in der basolateralen Membran lokalisiert ist und in erster Linie die treibende Kraft für die Cl<sup>-</sup>- und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Sekretion sein dürfte, während KCNN4c in der apikalen Membran die K<sup>+</sup>-Sekretion reguliert und auch mitverantwortlich für die erhöhten K<sup>+</sup>-Spiegel im Stuhl von CED-Patienten sein könnte (Barmeyer et al. 2010). Experimentelle Evidenz hierfür fand sich bei CU-Patienten, bei denen eine um 54% verminderte KCNN4-Dichte in der basolateralen Membran von Colonozyten vorlag, trotz im Vergleich zu Kontrollen unveränderter mRNA-Expression. Patch Clamp-Analysen zeigten eine um 61% verminderte KCNN4-Aktivität, wodurch die basolaterale K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit der Colonozyten auf 25% der Kontrollen zurückging (Al-Hazza et al. 2012). Bei CU-Patienten in klinischer Remission hingegen zeigten sich keine Veränderungen im Vergleich mit Kontrollen. Diese Daten führten zu dem Schluss, dass ein substantieller Verlust der KCNN4-Aktivität und -Expression zur Depolarisation der Zelle führt, die zur Störung der elektrogenen Na<sup>+</sup>-Resorption im Colon von Patienten mit aktiver CU beiträgt. Ein potentieller therapeutischer Einsatz von KCNN4-Inhibitoren wurde vor allem an Colitis-Modellen untersucht. So konnten Strobaek et al. für die Dinitrobenzolsulfonsäure-induzierte Colitis der Ratte zeigen, bei der KCNN4 insbesondere auf die Krypten, die Mukosa und die Submukosa infiltrierenden ED1<sup>+</sup>-Makrophagen und CD43<sup>+</sup>-T-Zellen vermehrt exprimiert ist, dass durch den KCNN4-Inhibitor NS1680 die Entzündung im Colon unterdrückt werden konnte und als Resultat die Tiere wieder an Gewicht zunahmen (Strobaek et al. 2013). In einer weiteren

Arbeit, die 2010 in PNAS erschien (Di et al. 2010), transferierten die Autoren naive oder KCNN4-defiziente CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD45RB<sup>high</sup> T-Zellen in Rag2<sup>-/-</sup>-Mäuse. Dabei zeigte sich, dass die Rag2<sup>-/-</sup>-Mäuse, die die KCNN4-defizienten T-Zellen erhielten, im Vergleich zu Rag2<sup>-/-</sup>-Mäusen, die naive T-Zellen erhielten, keine schwere Colitis entwickelten. Eine ähnliche Beobachtung machten die Autoren in Mäusen denen TNBS rektal appliziert wurde und die zusätzlich den selektiven KCNN4-Inhibitor TRAM-34 erhielten. Aus diesen Studien konnte geschlossen werden, dass die Inhibition von KCNN4 einen positiven Einfluss auf die Schwere der Colitis ausübt (Di et al. 2010). Ob dies in ähnlicher Weise für die CU gilt ist jedoch umstritten, da sich hier ohnehin eine reduzierte KCNN4-Aktivität und -Expression in der Mukosa findet und eine Inhibition die Diarrhö eher noch verstärken könnte (Al-Hazza et al. 2012). Auch konnte gezeigt werden, dass ein KCNN4-Polymorphismus, der in einer australischen und neuseeländischen Population nachgewiesen wurde, mit verstärkter Krankheits-Aktivität bei M. Crohn-Patienten im terminalen Ileum assoziiert ist (Simms et al. 2010). Ein funktioneller Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität ist jedoch unklar, da funktionelle Untersuchungen bezüglich dieses Polymorphismus bisher nicht durchgeführt wurden. Es ist somit ungeklärt, ob die pharmakologische Inhibition von KCNN4 die Symptomatik bei CED eher verstärkt oder abmildert.

### **Gestörte epitheliale Barriere bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Auch wenn die epitheliale Barriere in den in dieser Habilitationsschrift diskutierten Originalarbeiten nicht im Vordergrund steht, soll diese hier doch aufgrund des offensichtlichen Zusammenhangs zwischen gestörter Transportfunktion, gestörter epithelialer Barriere und dem vorherrschenden Symptom, der Diarrhö, diskutiert werden. Schon länger ist bekannt, dass die epitheliale Barrierefunktion bei Patienten mit CED gravierend beeinträchtigt sein kann. Es wird davon ausgegangen, dass dadurch der Eintritt von Antigenen in die Darmwand erleichtert ist, wodurch einerseits die entzündliche Aktivität perpetuiert wird und andererseits aufgrund eines Leckflux-Mechanismus die Diarrhö entsteht (Fasano et al. 1991). Diese entzündlich bedingten Störungen der epithelialen Barriere werden zum einen verursacht durch epitheliale Läsionen wie apoptotische Foci, Erosionen und Ulzerationen (Gitter et al. 2001) und zum anderen durch eine gesteigerte transzelluläre Aufnahme von Antigenen in die Darmmukosa via Endozytose (Söderholm et al. 2004). Welche Rolle die für die Integrität der epithelialen Barriere verantwortlichen TJ spielen, war lange Zeit unklar, da morphologische Untersuchungen fehlten. In einer Arbeit konnten wir an Kolektomie-Resektaten von Patienten mit CU mit Hilfe der Wechselstrom-Impedanzanalyse demonstrieren, dass die Barriestörung bei CU noch gravierender ist, als damals angenommen (Schmitz et al. 1999). Als morphologisches Korrelat zeigte sich in der

Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie eine verminderte Dicke der TJ-Stränge mit vermehrt aberranten Strängen, durch die die Integrität des TJ-Netzwerks entscheidend gestört und das Eindringen von luminalen Antigenen entsprechend begünstigt wird. Diese erstmals gezeigte Veränderung der TJ-Architektur hat auch zur Folge, dass es zu einem „back-leak“ von bereits resorbierten Substanzen und Wasser in das Darmlumen kommt, was wiederum in einer Diarrhö resultiert (Schmitz et al. 1999). Diese Arbeit war Ausgangspunkt für eine Reihe von Folgearbeiten, die die Identifizierung molekularer und regulatorischer Veränderungen der TJ bei CED zum Ziel hatten. Insbesondere die durch Furuse et al. 1998 erstmals beschriebenen Claudine rückten dabei in den Fokus der TJ-Forschung (Furuse et al. 1998). So konnte gezeigt werden, dass für entzündliche Funktionsänderungen eine veränderte TJ-Proteinzusammensetzung verantwortlich ist, die durch ganz verschiedenartige Mechanismen zustande kommt, wie z.B. eine veränderte Expression der Proteine vom Promotor, veränderte Halbwertszeiten, proteolytische Spaltung oder eine Umverteilung aus der TJ-Domäne der Epithelzelle heraus, die ebenfalls infolge einer Spaltung z.B. des Carboxy-Terminus von TJ-Proteinen oder durch Einwirkung des Actin-Mikrofilamentsystems induziert sein kann. Direkte experimentelle Hinweise auf eine veränderte molekulare Zusammensetzung der TJ, z.B. bei CED, konnten erbracht werden, nachdem für die meisten Claudine Antikörper zur Verfügung standen (Kucharzik et al. 2001, Prasad et al. 2005, Zeissig et al. 2007). So fand sich beispielsweise beim M. Crohn eine Herabregulation der Expression von Occludin, Claudin-3, -5 und -8, während Claudin-1, -4 und -7 unverändert blieben. Dagegen war die Claudin-2-Expression sogar heraufreguliert (Zeissig et al. 2007). Weniger ist bisher über die TJ-Proteine bei der CU oder auch bei den mikroskopischen Colitiden bekannt.

Von Interesse sind bezüglich einer entzündlichen intestinalen Barrierestörung vor allem TJ-Proteine, die im Darmepithel exprimiert sind und für die eine Funktionalität belegt ist. Innerhalb der Claudin-Familie trifft das für Claudin-1, -3, -4, -5 und -8 sowie Tricellulin als Barriere-induzierende Komponenten der TJ-Stränge zu, sowie auch für die Claudine 2 und 7, die Poreneigenschaften aufweisen (Van Itallie und Anderson 2006). Allerdings sind bisher noch immer nicht alle Claudine funktionell charakterisiert worden.

Schaut man sich vor diesem Hintergrund Daten zur Expression von TJ-Proteinen bei der CU an, stellt man fest, dass diese weiterhin unvollständig und teils widersprüchlich sind. Während die einen keine wesentliche Veränderung von Claudin-1 in Rektumbiopsien aus akut entzündeten Bereichen feststellen konnten (Oshima et al. 2008), beobachteten andere eine vermehrte Expression von Claudin-1 und Claudin-2 in Abhängigkeit vom Grad der Entzündung (Weber et al. 2008, Poritz et al. 2011). Auch für Claudin-3 liegen unterschiedliche Daten vor. Oshima et al. konnten keine wesentliche Veränderung der Claudin-3-Expression im Rektum von Patienten mit aktiver CU feststellen (Oshima et al.

2008), während andere wiederum eine verminderte Claudin-3-Expression und vermehrte Ausscheidung im Urin beobachteten (Prasad et al. 2005, Thuijls et al. 2010). Claudin-4 und -7 hingegen waren vermindert (Oshima et al. 2008). Heller et al. dagegen konnten im milde entzündeten Sigma eine Heraufregulation des Poren-bildenden TJ-Proteins Claudin-2 und eine Herabregulation der abdichtenden TJ-Proteine Claudin-1 und -4 zeigen (Heller et al. 2005). Keine dieser Arbeiten beschäftigte sich jedoch mit der Verteilung der TJ-Proteine in der Epithelzelle. Allerdings muss konstatiert werden, dass der Großteil dieser Untersuchungen zu einer Zeit entstanden ist, als nur ein begrenztes Spektrum von Claudin-Antikörpern zur Verfügung stand und die Verteilung dieser Proteine in der Epithelzelle mittels Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) noch nicht untersucht wurde.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass offensichtlich differentielle Regulationsprozesse mit unterschiedlichem Ergebnis vorliegen können. So konnten wir beispielsweise an der IL-2<sup>-/-</sup>-Maus demonstrieren, dass trotz phänotypischer Merkmale für eine CU die Barrierefunktion nicht gestört, sondern sogar verstärkt ist (Barmeyer et al. 2002, Barmeyer et al. 2004). So zeigt sich, trotz deutlich vermehrter Expression von Claudin-2, ein Anstieg des epithelialen Widerstands und ein verminderter Mannitol-Flux. Dies ist aber zurückzuführen auf eine deutlich verstärkte Expression der abdichtenden TJ-Proteine Claudin-1, -3, -5 und Occludin (Barmeyer et al. 2004).

Etwas besser untersucht, insbesondere hinsichtlich der Lokalisation einzelner Claudine, ist der MC. Wegweisend ist dabei die Arbeit von Zeissig et al., die eine umfassende Aufarbeitung der morphologischen Veränderungen der TJ auf ultrastruktureller und molekularer Ebene ermöglichte. Auch hier zeigt sich eine epitheliale Barriestörung mit einer Reduktion des epithelialen Widerstands um 40% bei milder bis mäßig aktiver Entzündung, die morphologisch mit „ausgedünnten“ Tight Junction-Strängen mit Diskontinuitäten einhergeht (Zeissig et al. 2007). Anders als bei der CU ist aber beispielsweise Claudin-1 im Wesentlichen unverändert hinsichtlich Expression und Lokalisation. Lediglich subjunktional in der lateralen Membran scheint eine geringfügige Verminderung der Expression von Claudin-1 vorzuliegen. Es ist jedoch fraglich, ob dies funktionell relevant ist. Anders verhält es sich dafür mit Claudin-5 und -8. Nicht nur, dass sie als Barriere-bildende Claudine vermindert exprimiert sind, sondern sie sind auch aus der TJ heraussortiert und zeigen sich vermehrt in der lateralen Membran (Claudin-5), bzw. im apikalen Zytoplasma (Claudin-8). Auch Claudin-3, welches im humanen Colon nicht direkt in der TJ, sondern in der lateralen Membran lokalisiert ist, zeigt eine Lokalisationsänderung unter entzündlichen Bedingungen und findet sich diffus im Zytoplasma. Allerdings ist die Relevanz dieser Beobachtung fraglich, da Claudin-3 schon bei Kontrollen nicht mit der TJ assoziiert ist (Zeissig et al. 2007).

In den letzten Jahren sind die pro-inflammatorischen Zytokine als die wesentlichen Mediatoren für TJ-Veränderungen bei Entzündungen des Darmes erkannt worden. Insbesondere das Zytokin TNF- $\alpha$  nimmt hier eine zentrale Rolle ein. Im HT-29/B6-Zellmodell konnte gezeigt werden, dass der Barriere-Effekt von TNF- $\alpha$  auf einer Abnahme der Komplexität der TJ beruht (Schmitz et al. 1999). IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  wirken dabei synergistisch. Dies kann zum Beispiel durch Expressionsregulation über die Promotoren von TJ-Proteinen bedingt sein, wie für Occludin (Mankertz et al. 2000) und für Claudin-2 gezeigt werden konnte (Mankertz et al. 2009). Dabei werden TJ-Moleküle durch TNF- $\alpha$ -abhängige Aktivierung von zellulären Enzymen gespalten (Bojarski et al. 2004) was über den Wnt-Signalweg vermittelt wird, wie für Claudin-1 und -2 gezeigt werden konnte (Mankertz et al. 2004) und was auch bei Zelldifferenzierung und epithelialer Restitution von Bedeutung ist. Neben TNF- $\alpha$  sind auch das bereits erwähnte IFN- $\gamma$  (Madara und Stafford 1989, Willemsen et al. 2005), sowie IL-13 (Heller et al. 2005) relevante Effektorzytokine.

Im Gegensatz dazu hat das bei mikroskopischen Colitiden relevante IL-15 keine pro-inflammatorische Wirkung (Obermeier et al. 2006). Trotzdem findet sich bei LC ebenfalls eine Barriestörung, die vor allem auf der gesteigerten Aktivität von TNF- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ -regulierten Downstream-Targets beruht (Barmeyer et al. 2016). Die Barriestörung ist jedoch nicht so ausgeprägt, wie bei der CU. Bei der kollagenen Colitis konnten Bürgel et al. mit Hilfe der Ein-Wege-Impedanzspektroskopie einen verminderten epithelialen Widerstand beschreiben, der durch eine verminderte Claudin-4 Expression erklärt wurde. Die Claudine 1, 2, 3 und 5 waren jedoch unverändert (Bürgel et al. 2002). Auch bei der lymphozytären Colitis konnten wir parallel zu einer deutlich verminderten maximalen Transportkapazität des ENaC eine Barriestörung nachweisen (Barmeyer et al. 2012, Barmeyer et al. 2016). Interessanterweise kam es nach 6-wöchiger Therapie mit Budesonid zu einer Restitution der ENaC-Funktion und zu einer klinischen Remission der Patienten mit Normalisierung der Stuhlfrequenz, nicht jedoch zu einer Normalisierung der Barrierefunktion (Barmeyer et al. 2012). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass bei der mikroskopischen Colitis vor allem die Ionen-Transportfunktion relevant für die ausgeprägte Symptomatik ist und weniger die gestörte Barriere. Offenbar ist es möglich durch die Wiederherstellung der Na<sup>+</sup>-Resorption die Nachteile der gestörten Barrierefunktion bei der mikroskopischen Colitis zu kompensieren.

#### 4. Zusammenfassung

Der epitheliale Ionentransport und die epitheliale Barrierefunktion sind die zwei zentralen Elemente, die die korrekte Funktion des Colons gewährleisten. Kommt es zu einer Störung einer der beiden oder beider Komponenten resultiert Krankheitsaktivität, in der Regel in Form einer Diarrhö. Dabei spielt vor allem die Na<sup>+</sup>-Resorption eine zentrale Rolle. Im gesunden Colon überwiegt die Na<sup>+</sup>-Resorption quantitativ gegenüber allen anderen resorptiven und sekretorischen Prozessen. Dadurch wird per „Solvent Drag“ Wasser auf osmotischem Weg dem Lumen entzogen und die Faeces werden eingedickt. Es werden zwei wichtige Na<sup>+</sup>-Transportsysteme im Colon unterschieden, die elektroneutrale Na<sup>+</sup>-Resorption, die sich vor allem in den proximalen Anteilen des Colons findet, und die elektrogene Na<sup>+</sup>-Resorption, die im distalen Colon dominiert. Beide Transportmechanismen wurden untersucht und zeigten unter entzündlichen Bedingungen eine verminderte Transportkapazität. So konnte erstmals am Modell der IL-2<sup>-/-</sup>-Maus beschrieben werden, dass bei Vorliegen einer Colitis die maximal durch Aldosteron stimulierbare Transportkapazität des ENaC erheblich vermindert ist. Durch darauf aufbauende Arbeiten gelang für den ENaC dann der Nachweis, dass dies auf einer verminderten Hochregulation der mRNA-Expression der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit durch eine Hemmung der Promotoren dieser beiden Untereinheiten zustande kommt und dass hierfür pro-inflammatorische Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  oder auch IL-1 $\beta$ , verantwortlich sind. Dies konnte parallel sowohl am Rattendarm als auch am humanen Colon gezeigt werden. Mit den darauf folgenden Arbeiten gelang dann der Nachweis von zwei entzündlich regulierten Signalwegen, über die die Hemmung der Transkription der  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC-Untereinheit vermittelt wird. Dabei ist offensichtlich die Zusammensetzung des Zytokin-Profiles von Bedeutung. Unter entzündlichen Bedingungen, die in erster Linie von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  dominiert werden, wie dies z.B. bei Immunreaktionen beim Morbus Crohn (MC) oder bei der lymphozytären Colitis (LC) beobachtet werden, kommt der Aktivierung des MEK-ERK1/2-Signalwegs die größte Bedeutung zu. Durch Hemmung dieses Signalwegs durch den ERK1/2-Inhibitor U0126 gelingt die vollständige Wiederherstellung der ENaC-Funktion bei MC und LC. Im Gegensatz dazu spielt dieser Signalweg in Anwesenheit von IL-13 keine Rolle. Stattdessen kommt es durch IL-13 über den IL-13R $\alpha$ 1/IL-4R $\alpha$ -Typ-I-Rezeptor zu einer Aktivierung von JAK1/2 und Phosphorylierung von STAT6. Das wiederum resultiert in einer Hemmung der p38 MAPK, die unter physiologischen Bedingungen durch Mineralokortikoide phosphoryliert und aktiviert wird, wodurch die Expression der  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC-Untereinheit und die SGK1 gesteigert wird. Durch die Hemmung der p38 MAPK geschieht dies jedoch nicht. Folge davon ist eine verminderte Expression der  $\beta$ - und  $\gamma$ -ENaC-Untereinheiten und der SGK1 nach Mineralokortikoid-Stimulation, was in einer verminderten Transportkapazität resultiert.

Auffällig ist die verminderte Potentialdifferenz bei CED. Diese ist zumindest teilweise mitverantwortlich für den gestörten ionalen Transport. Für die Aufrechterhaltung der elektrischen Potentialdifferenz sind  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kaliumkanäle mittlerer Leitfähigkeit (KCNN4 oder nach neuerer Nomenklatur  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ ) erforderlich. Deshalb sind diese schon früh in den Fokus als Ziel möglicher therapeutischer Interventionen bei CED gerückt worden. Zunächst dachte man, dass diese nur basolateral lokalisiert seien, bis man durch Einsatz der Patch-Clamp-Technik diese auch apikal detektieren konnte. Es gelang im Rattencolon schließlich der Nachweis von insgesamt drei funktionellen Splice-Varianten, von denen jeweils eine in der apikalen und der basolateralen Membran von Enterozyten lokalisiert waren, während die dritte Variante in der glatten Muskulatur exprimiert wird. Diese Ergebnisse waren wichtig für das Verständnis der KCNN4-Funktionen und der Rolle als ein mögliches therapeutisches Ziel. Obwohl es darauf aufbauend bereits hoffnungsvolle Resultate durch die Hemmung von KCNN4 in murinen Colitis-Modellen gibt, bleibt es jedoch unklar, welcher Effekt bei CED auftreten würde, da die KCNN4-Expression hier bereits vermindert ist und auch eine Studie an einer australisch/neuseeländischen Population eine Assoziation zwischen einer verstärkten Krankheitsaktivität bei M. Crohn-Patienten mit Ileitis terminalis und einem KCNN4-Polymorphismus demonstrieren konnte.

Die zweite wichtige Komponente, die Barrierefunktion, wurde bei der  $\text{IL-2}^{-/-}$ -Maus und der LC untersucht. Dabei zeigte sich in der  $\text{IL-2}^{-/-}$ -Maus, einem Colitis-Modell mit klinischer und morphologischer Ähnlichkeit einer CU, keine Störung der epithelialen Barriere. Die bei diesem Modell vorliegende Diarrhö war somit eine rein malabsorptive Diarrhö aufgrund gestörter Ionen-Transportfunktion. Bei der LC hingegen konnte zusätzlich eine Barrierefunktionsstörung nachgewiesen werden, die aber nicht so gravierend war, wie dies bereits für die CU oder den MC gezeigt werden konnte. Interessanterweise war diese auch nach Induktion einer klinischen Remission mit Budesonid unverändert nachweisbar. Dies lässt vermuten, dass der gestörte Ionentransport, der, wie für die elektrogene  $\text{Na}^+$ -Resorption gezeigt, unter Budesonid wiederhergestellt wurde, anders als bei den klassischen CED, die entscheidende Komponente bei der Entstehung der Diarrhö bei der LC ist.

## 5. Literaturverzeichnis

- Al-Hazza, A., Linley, J. E., Aziz, Q., Maclennan, K. A., Hunter, M. and Sandle, G. I. (2012). "Potential role of reduced basolateral potassium (IKCa3.1) channel expression in the pathogenesis of diarrhoea in ulcerative colitis." J Pathol **226**(3): 463-470.
- Amasheh, S., Barmeyer, C., Koch, C. S., Tavalali, S., Mankertz, J., Epple, H. J., . . . Schulzke, J. D. (2004). "Cytokine-dependent transcriptional down-regulation of epithelial sodium channel in ulcerative colitis." Gastroenterology **126**(7): 1711-1720.
- Baker, E. H., Boot-Handford, R. P. and Sandle, G. I. (1995). "Cloning of subunits of the human colonic epithelial Na<sup>+</sup> channel." Biochem Soc Trans **23**(1): 130S.
- Barmeyer, C., Amasheh, S., Tavalali, S., Mankertz, J., Zeitz, M., Fromm, M. and Schulzke, J. D. (2004). "IL-1beta and TNFalpha regulate sodium absorption in rat distal colon." Biochem Biophys Res Commun **317**(2): 500-507.
- Barmeyer, C., Erko, I., Fromm, A., Bojarski, C., Allers, K., Moos, V., . . . Schulzke, J. D. (2012). "Ion transport and barrier function are disturbed in microscopic colitis." Ann N Y Acad Sci **1258**: 143-148.
- Barmeyer, C., Erko, I., Fromm, A., Bojarski, C., Loddenkemper, C., Dames, P., . . . Schulzke, J. D. (2016). "ENaC Dysregulation Through Activation of MEK1/2 Contributes to Impaired Na<sup>+</sup> Absorption in Lymphocytic Colitis." Inflamm Bowel Dis **22**(3): 539-547.
- Barmeyer, C., Harren, M., Schmitz, H., Heinzl-Pleines, U., Mankertz, J., Seidler, U., . . . Schulzke, J. D. (2004). "Mechanisms of diarrhea in the interleukin-2-deficient mouse model of colonic inflammation." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **286**(2): G244-252.
- Barmeyer, C., Horak, I., Zeitz, M., Fromm, M. and Schulzke, J. D. (2002). "The interleukin-2-deficient mouse model." Pathobiology **70**(3): 139-142.
- Barmeyer, C., Rahner, C., Yang, Y., Sigworth, F. J., Binder, H. J. and Rajendran, V. M. (2010). "Cloning and identification of tissue-specific expression of KCNN4 splice variants in rat colon." Am J Physiol Cell Physiol **299**(2): C251-263.
- Benos, D. J., Awayda, M. S., Ismailov, II and Johnson, J. P. (1995). "Structure and function of amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> channels." J Membr Biol **143**(1): 1-18.
- Bergann, T., Fromm, A., Borden, S. A., Fromm, M. and Schulzke, J. D. (2011). "Glucocorticoid receptor is indispensable for physiological responses to aldosterone in epithelial Na<sup>+</sup> channel induction via the mineralocorticoid receptor in a human colonic cell line." Eur J Cell Biol **90**(5): 432-439.
- Binder, H. J., Foster, E. S., Budinger, M. E. and Hayslett, J. P. (1987). "Mechanism of electroneutral sodium chloride absorption in distal colon of the rat." Gastroenterology **93**(3): 449-455.



- Bojarski, C., Weiske, J., Schöneberg, T., Schröder, W., Mankertz, J., Schulzke, J. D., . . . Huber, O. (2004). "The specific fates of tight junction proteins in apoptotic epithelial cells." J Cell Sci **117**(Pt 10): 2097-2107.
- Bonderup, O. K., Wigh, T., Nielsen, G. L., Pedersen, L. and Fenger-Gron, M. (2015). "The epidemiology of microscopic colitis: a 10-year pathology-based nationwide Danish cohort study." Scand J Gastroenterol **50**(4): 393-398.
- Bowley, K. A., Morton, M. J., Hunter, M. and Sandle, G. I. (2003). "Non-genomic regulation of intermediate conductance potassium channels by aldosterone in human colonic crypt cells." Gut **52**(6): 854-860.
- Brelian, D. and Tenner, S. (2012). "Diarrhoea due to pancreatic diseases." Best Pract Res Clin Gastroenterol **26**(5): 623-631.
- Bücker, R. (2015). "Pathomechanismen epithelialer Barrieredysfunktion durch bakterielle Enteropathogene." Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin.
- Bürgel, N., Bojarski, C., Mankertz, J., Zeitz, M., Fromm, M. and Schulzke, J. D. (2002). "Mechanisms of diarrhea in collagenous colitis." Gastroenterology **123**(2): 433-443.
- Canessa, C. M., Horisberger, J. D. and Rossier, B. C. (1993). "Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration." Nature **361**(6411): 467-470.
- Canessa, C. M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J. D. and Rossier, B. C. (1994). "Amiloride-sensitive epithelial Na<sup>+</sup> channel is made of three homologous subunits." Nature **367**(6462): 463-467.
- Chen, M. X., Gorman, S. A., Benson, B., Singh, K., Hieble, J. P., Michel, M. C., . . . Trezise, D. J. (2004). "Small and intermediate conductance Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels confer distinctive patterns of distribution in human tissues and differential cellular localisation in the colon and corpus cavernosum." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **369**(6): 602-615.
- Colia, R., Corrado, A. and Cantatore, F. P. (2016). "Rheumatologic and extraintestinal manifestations of inflammatory bowel diseases." Ann Med: 1-9.
- Corridoni, D., Arseneau, K. O. and Cominelli, F. (2014). "Inflammatory bowel disease." Immunol Lett **161**(2): 231-235.
- Dames, P., Bergann, T., Fromm, A., Bücker, R., Barmeyer, C., Krug, S. M., . . . Schulzke, J. D. (2015). "Interleukin-13 affects the epithelial sodium channel in the intestine by coordinated modulation of STAT6 and p38 MAPK activity." J Physiol **593**(24): 5269-5282.
- Danese, S., Rudzinski, J., Brandt, W., Dupas, J. L., Peyrin-Biroulet, L., Bouhnik, Y., . . . Keshav, S. (2015). "Tralokinumab for moderate-to-severe UC: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase IIa study." Gut **64**(2): 243-249.

- Dey, I., Beck, P. L. and Chadee, K. (2013). "Lymphocytic colitis is associated with increased pro-inflammatory cytokine profile and up regulation of prostaglandin receptor EP4." PLoS One **8**(4): e61891.
- Di, L., Srivastava, S., Zhdanova, O., Ding, Y., Li, Z., Wulff, H., . . . Skolnik, E. Y. (2010). "Inhibition of the K<sup>+</sup> channel KCa3.1 ameliorates T cell-mediated colitis." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(4): 1541-1546.
- Dignass, A., Preiss, J. C., Aust, D. E., Autschbach, F., Ballauff, A., Barretton, G., . . . Stallmach, A. (2011). "[Updated German guideline on diagnosis and treatment of ulcerative colitis, 2011]." Z Gastroenterol **49**(9): 1276-1341.
- Eaden, J. A., Abrams, K. R. and Mayberry, J. F. (2001). "The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis." Gut **48**(4): 526-535.
- Epple, H. J., Amasheh, S., Mankertz, J., Goltz, M., Schulzke, J. D. and Fromm, M. (2000). "Early aldosterone effect in distal colon by transcriptional regulation of ENaC subunits." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **278**(5): G718-724.
- Farkas, K., Yeruva, S., Rakonczay, Z., Jr., Ludolph, L., Molnar, T., Nagy, F., . . . Hegyi, P. (2011). "New therapeutic targets in ulcerative colitis: the importance of ion transporters in the human colon." Inflamm Bowel Dis **17**(4): 884-898.
- Fasano, A., Baudry, B., Pumplun, D. W., Wasserman, S. S., Tall, B. D., Ketley, J. M. and Kaper, J. B. (1991). "Vibrio cholerae produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(12): 5242-5246.
- Feagan, B. G., Rutgeerts, P., Sands, B. E., Hanauer, S., Colombel, J. F., Sandborn, W. J., . . . Group, G. S. (2013). "Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis." N Engl J Med **369**(8): 699-710.
- Firsov, D., Gautschi, I., Merillat, A. M., Rossier, B. C. and Schild, L. (1998). "The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC)." EMBO J **17**(2): 344-352.
- Furness, J. B., Robbins, H. L., Selmer, I. S., Hunne, B., Chen, M. X., Hicks, G. A., . . . Neylon, C. B. (2003). "Expression of intermediate conductance potassium channel immunoreactivity in neurons and epithelial cells of the rat gastrointestinal tract." Cell Tissue Res **314**(2): 179-189.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K. and Tsukita, S. (1998). "Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin." J Cell Biol **141**(7): 1539-1550.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S. and Tsukita, S. (1993). "Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions." J Cell Biol **123**(6 Pt 2): 1777-1788.

- Furuse, M., Itoh, M., Hirase, T., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S. and Tsukita, S. (1994). "Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions." J Cell Biol **127**(6 Pt 1): 1617-1626.
- Fuss, I. J. and Strober, W. (2008). "The role of IL-13 and NK T cells in experimental and human ulcerative colitis." Mucosal Immunol **1 Suppl 1**: S31-33.
- Gitter, A. H., Bendfeldt, K., Schulzke, J. D. and Fromm, M. (2000). "Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis." FASEB J **14**(12): 1749-1753.
- Gitter, A. H., Wullstein, F., Fromm, M. and Schulzke, J. D. (2001). "Epithelial barrier defects in ulcerative colitis: characterization and quantification by electrophysiological imaging." Gastroenterology **121**(6): 1320-1328.
- Greig, E. R., Boot-Handford, R. P., Mani, V. and Sandle, G. I. (2004). "Decreased expression of apical Na<sup>+</sup> channels and basolateral Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in ulcerative colitis." J Pathol **204**(1): 84-92.
- Halm, S. T., Liao, T. and Halm, D. R. (2006). "Distinct K<sup>+</sup> conductive pathways are required for Cl<sup>-</sup> and K<sup>+</sup> secretion across distal colonic epithelium." Am J Physiol Cell Physiol **291**(4): C636-648.
- Hammer, H. F., Santa Ana, C. A., Schiller, L. R. and Fordtran, J. S. (1989). "Studies of osmotic diarrhea induced in normal subjects by ingestion of polyethylene glycol and lactulose." J Clin Invest **84**(4): 1056-1062.
- Harris, J. and Shields, R. (1970). "Absorption and secretion of water and electrolytes by the intact human colon in diffuse untreated proctocolitis." Gut **11**(1): 27-33.
- Harris, J. B., LaRocque, R. C., Qadri, F., Ryan, E. T. and Calderwood, S. B. (2012). "Cholera." Lancet **379**(9835): 2466-2476.
- He, P. and Yun, C. C. (2010). "Mechanisms of the regulation of the intestinal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3." J Biomed Biotechnol **2010**: 238080.
- Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., . . . Schulzke, J. D. (2005). "Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution." Gastroenterology **129**(2): 550-564.
- Heyman, M., Darmon, N., Dupont, C., Dugas, B., Hirribaren, A., Blaton, M. A. and Desjeux, J. F. (1994). "Mononuclear cells from infants allergic to cow's milk secrete tumor necrosis factor alpha, altering intestinal function." Gastroenterology **106**(6): 1514-1523.
- Holmberg, C. (1986). "Congenital chloride diarrhoea." Clin Gastroenterol **15**(3): 583-602.

- Ikuma, M., Kashgarian, M., Binder, H. J. and Rajendran, V. M. (1999). "Differential regulation of NHE isoforms by sodium depletion in proximal and distal segments of rat colon." Am J Physiol **276**(2 Pt 1): G539-549.
- Jasti, J., Furukawa, H., Gonzales, E. B. and Gouaux, E. (2007). "Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH." Nature **449**(7160): 316-323.
- Jensen, B. S., Hertz, M., Christophersen, P. and Madsen, L. S. (2002). "The Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel of intermediate conductance: a possible target for immune suppression." Expert Opin Ther Targets **6**(6): 623-636.
- Joiner, W. J., Basavappa, S., Vidyasagar, S., Nehrke, K., Krishnan, S., Binder, H. J., . . . Rajendran, V. M. (2003). "Active K<sup>+</sup> secretion through multiple KCa-type channels and regulation by IKCa channels in rat proximal colon." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **285**(1): G185-196.
- Jørgensen, P. L. (1980). "Sodium and potassium ion pump in kidney tubules." Physiol Rev **60**(3): 864-917.
- Krug, S. M., Schulzke, J. D. and Fromm, M. (2014). "Tight junction, selective permeability, and related diseases." Semin Cell Dev Biol **36**: 166-176.
- Kucharzik, T., Walsh, S. V., Chen, J., Parkos, C. A. and Nusrat, A. (2001). "Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins." Am J Pathol **159**(6): 2001-2009.
- Kumawat, A. K., Strid, H., Tysk, C., Bohr, J. and Hornquist, E. H. (2013). "Microscopic colitis patients demonstrate a mixed Th17/Tc17 and Th1/Tc1 mucosal cytokine profile." Mol Immunol **55**(3-4): 355-364.
- Kunzelmann, K. and Mall, M. (2002). "Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease." Physiol Rev **82**(1): 245-289.
- Kyriakis, J. M. (2007). "The integration of signaling by multiprotein complexes containing Raf kinases." Biochim Biophys Acta **1773**(8): 1238-1247.
- Lakatos, L., Mester, G., Erdelyi, Z., David, G., Pandur, T., Balogh, M., . . . Lakatos, P. L. (2006). "Risk factors for ulcerative colitis-associated colorectal cancer in a Hungarian cohort of patients with ulcerative colitis: results of a population-based study." Inflamm Bowel Dis **12**(3): 205-211.
- Lauf, P. K., Misri, S., Chimote, A. A. and Adragna, N. C. (2008). "Apparent intermediate K conductance channel hyposmotic activation in human lens epithelial cells." Am J Physiol Cell Physiol **294**(3): C820-832.
- Ledoussal, C., Woo, A. L., Miller, M. L. and Shull, G. E. (2001). "Loss of the NHE2 Na(+)/H(+) exchanger has no apparent effect on diarrheal state of NHE3-deficient mice." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **281**(6): G1385-1396.

- Lingueglia, E., Voilley, N., Waldmann, R., Lazdunski, M. and Barbry, P. (1993). "Expression cloning of an epithelial amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> channel. A new channel type with homologies to *Caenorhabditis elegans* degenerins." FEBS Lett **318**(1): 95-99.
- Lohi, H., Makela, S., Pulkkinen, K., Hoglund, P., Karjalainen-Lindsberg, M. L., Puolakkainen, P. and Kere, J. (2002). "Upregulation of CFTR expression but not SLC26A3 and SLC9A3 in ulcerative colitis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **283**(3): G567-575.
- Madara, J. L. and Stafford, J. (1989). "Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers." J Clin Invest **83**(2): 724-727.
- Mankertz, J., Amasheh, M., Krug, S. M., Fromm, A., Amasheh, S., Hillenbrand, B., . . . Schulzke, J. D. (2009). "TNFalpha up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling." Cell Tissue Res **336**(1): 67-77.
- Mankertz, J., Hillenbrand, B., Tavalali, S., Huber, O., Fromm, M. and Schulzke, J. D. (2004). "Functional crosstalk between Wnt signaling and Cdx-related transcriptional activation in the regulation of the claudin-2 promoter activity." Biochem Biophys Res Commun **314**(4): 1001-1007.
- Mankertz, J., Tavalali, S., Schmitz, H., Mankertz, A., Riecken, E. O., Fromm, M. and Schulzke, J. D. (2000). "Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma." J Cell Sci **113 ( Pt 11)**: 2085-2090.
- Mannon, P. J., Hornung, R. L., Yang, Z., Yi, C., Groden, C., Friend, J., . . . Fuss, I. J. (2011). "Suppression of inflammation in ulcerative colitis by interferon-beta-1a is accompanied by inhibition of IL-13 production." Gut **60**(4): 449-455.
- Mineta, K., Yamamoto, Y., Yamazaki, Y., Tanaka, H., Tada, Y., Saito, K., . . . Tsukita, S. (2011). "Predicted expansion of the claudin multigene family." FEBS Lett **585**(4): 606-612.
- Nusrat, A., von Eichel-Streiber, C., Turner, J. R., Verkade, P., Madara, J. L. and Parkos, C. A. (2001). "Clostridium difficile toxins disrupt epithelial barrier function by altering membrane microdomain localization of tight junction proteins." Infect Immun **69**(3): 1329-1336.
- Obermeier, F., Hausmann, M., Kellermeier, S., Kiessling, S., Strauch, U. G., Duitman, E., . . . Rogler, G. (2006). "IL-15 protects intestinal epithelial cells." Eur J Immunol **36**(10): 2691-2699.
- Oshima, T., Miwa, H. and Joh, T. (2008). "Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis." J Gastroenterol Hepatol **23 Suppl 2**: S146-150.

- Peralta Soler, A., Mullin, J. M., Knudsen, K. A. and Marano, C. W. (1996). "Tissue remodeling during tumor necrosis factor-induced apoptosis in LLC-PK1 renal epithelial cells." Am J Physiol **270**(5 Pt 2): F869-879.
- Pode-Shakked, B., Reish, O., Aktuglu-Zeybek, C., Kesselman, D., Dekel, B., Bujanover, Y. and Anikster, Y. (2014). "Bitterness of glucose/galactose: novel mutations in the SLC5A1 gene." J Pediatr Gastroenterol Nutr **58**(1): 57-60.
- Poritz, L. S., Harris, L. R., 3rd, Kelly, A. A. and Koltun, W. A. (2011). "Increase in the tight junction protein claudin-1 in intestinal inflammation." Dig Dis Sci **56**(10): 2802-2809.
- Potter, G. D. and Burlingame, S. M. (1986). "Ion transport by neonatal rabbit distal colon." Am J Physiol **250**(6 Pt 1): G754-759.
- Prasad, S., Mingrino, R., Kaukinen, K., Hayes, K. L., Powell, R. M., MacDonald, T. T. and Collins, J. E. (2005). "Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells." Lab Invest **85**(9): 1139-1162.
- Rajendran, V. M., Black, J., Ardito, T. A., Sangan, P., Alper, S. L., Schweinfest, C., . . . Binder, H. J. (2000). "Regulation of DRA and AE1 in rat colon by dietary Na depletion." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **279**(5): G931-942.
- Rask-Madsen, J. (1973). "Simultaneous measurement of electrical polarization and electrolyte transport by the entire normal and inflamed human colon during in vivo perfusion." Scand J Gastroenterol **8**(4): 327-336.
- Rask-Madsen, J. and Dalmark, M. (1973). "Decreased transmural potential difference across the human rectum in ulcerative colitis." Scand J Gastroenterol **8**(4): 321-326.
- Rask-Madsen, J. and Jensen, P. B. (1973). "Electrolyte transport capacity and electrical potentials of the normal and the inflamed human rectum in vivo." Scand J Gastroenterol **8**(2): 169-175.
- Reinisch, W., Panes, J., Khurana, S., Toth, G., Hua, F., Comer, G. M., . . . Cataldi, F. (2015). "Anrukinzumab, an anti-interleukin 13 monoclonal antibody, in active UC: efficacy and safety from a phase IIa randomised multicentre study." Gut **64**(6): 894-900.
- Rocha, F., Musch, M. W., Lishanskiy, L., Bookstein, C., Sugi, K., Xie, Y. and Chang, E. B. (2001). "IFN-gamma downregulates expression of Na(+)/H(+) exchangers NHE2 and NHE3 in rat intestine and human Caco-2/bbe cells." Am J Physiol Cell Physiol **280**(5): C1224-1232.
- Sadlack, B., Merz, H., Schorle, H., Schimpl, A., Feller, A. C. and Horak, I. (1993). "Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene." Cell **75**(2): 253-261.
- Sandle, G. I., Hayslett, J. P. and Binder, H. J. (1986). "Effect of glucocorticoids on rectal transport in normal subjects and patients with ulcerative colitis." Gut **27**(3): 309-316.

- Sandle, G. I., Higgs, N., Crowe, P., Marsh, M. N., Venkatesan, S. and Peters, T. J. (1990). "Cellular basis for defective electrolyte transport in inflamed human colon." Gastroenterology **99**(1): 97-105.
- Sandle, G. I., McNicholas, C. M. and Lomax, R. B. (1994). "Potassium channels in colonic crypts." Lancet **343**(8888): 23-25.
- Sandle, G. I., Wills, N. K., Alles, W. and Binder, H. J. (1986). "Electrophysiology of the human colon: evidence of segmental heterogeneity." Gut **27**(9): 999-1005.
- Schiller, L. R. (2012). "Definitions, pathophysiology, and evaluation of chronic diarrhoea." Best Pract Res Clin Gastroenterol **26**(5): 551-562.
- Schmitz, H., Barmeyer, C., Fromm, M., Runkel, N., Foss, H. D., Bentzel, C. J., . . . Schulzke, J. D. (1999). "Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis." Gastroenterology **116**(2): 301-309.
- Schmitz, H., Fromm, M., Bentzel, C. J., Scholz, P., Detjen, K., Mankertz, J., . . . Schulzke, J. D. (1999). "Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6." J Cell Sci **112 ( Pt 1)**: 137-146.
- Schultheis, P. J., Clarke, L. L., Meneton, P., Miller, M. L., Soleimani, M., Gawenis, L. R., . . . Shull, G. E. (1998). "Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger." Nat Genet **19**(3): 282-285.
- Schweinfest, C. W., Henderson, K. W., Suster, S., Kondoh, N. and Papas, T. S. (1993). "Identification of a colon mucosa gene that is down-regulated in colon adenomas and adenocarcinomas." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(9): 4166-4170.
- Siddique, I., Hasan, F. and Khan, I. (2009). "Suppression of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform-3 in human inflammatory bowel disease: lack of reversal by 5'-aminosalicylate treatment." Scand J Gastroenterol **44**(1): 56-64.
- Siegmund, B. (2005). "Effektorphase der intestinalen Immunantwort: Regulation durch Interleukin-18 und Leptin." Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin.
- Simms, L. A., Doecke, J. D., Roberts, R. L., Fowler, E. V., Zhao, Z. Z., McGuckin, M. A., . . . Radford-Smith, G. L. (2010). "KCNN4 gene variant is associated with ileal Crohn's Disease in the Australian and New Zealand population." Am J Gastroenterol **105**(10): 2209-2217.
- Singh, S. K., Binder, H. J., Boron, W. F. and Geibel, J. P. (1995). "Fluid absorption in isolated perfused colonic crypts." J Clin Invest **96**(5): 2373-2379.
- Söderholm, J. D., Streutker, C., Yang, P. C., Paterson, C., Singh, P. K., McKay, D. M., . . . Perdue, M. H. (2004). "Increased epithelial uptake of protein antigens in the ileum of Crohn's disease mediated by tumour necrosis factor alpha." Gut **53**(12): 1817-1824.

- Söderlund, S., Brandt, L., Lapidus, A., Karlén, P., Broström, O., Löfberg, R., . . . Askling, J. (2009). "Decreasing time-trends of colorectal cancer in a large cohort of patients with inflammatory bowel disease." Gastroenterology **136**(5): 1561-1567; quiz 1818-1569.
- Solberg, I. C., Lygren, I., Jahnsen, J., Aadland, E., Hoie, O., Cvancarova, M., . . . Group, I. S. (2009). "Clinical course during the first 10 years of ulcerative colitis: results from a population-based inception cohort (IBSEN Study)." Scand J Gastroenterol **44**(4): 431-440.
- Soundararajan, R., Pearce, D., Hughey, R. P. and Kleyman, T. R. (2010). "Role of epithelial sodium channels and their regulators in hypertension." J Biol Chem **285**(40): 30363-30369.
- Soundararajan, R., Pearce, D. and Ziera, T. (2012). "The role of the ENaC-regulatory complex in aldosterone-mediated sodium transport." Mol Cell Endocrinol **350**(2): 242-247.
- Spiller, R. (2006). "Role of motility in chronic diarrhoea." Neurogastroenterol Motil **18**(12): 1045-1055.
- Stallmach, A., Giese, T., Schmidt, C., Ludwig, B., Müller-Molaian, I. and Meuer, S. C. (2004). "Cytokine/chemokine transcript profiles reflect mucosal inflammation in Crohn's disease." Int J Colorectal Dis **19**(4): 308-315.
- Stewart, M., Andrews, C. N., Urbanski, S., Beck, P. L. and Storr, M. (2011). "The association of coeliac disease and microscopic colitis: a large population-based study." Aliment Pharmacol Ther **33**(12): 1340-1349.
- Strater, J., Wellisch, I., Riedl, S., Walczak, H., Koretz, K., Tandara, A., . . . Moller, P. (1997). "CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis in colon epithelial cells: a possible role in ulcerative colitis." Gastroenterology **113**(1): 160-167.
- Strobaek, D., Brown, D. T., Jenkins, D. P., Chen, Y. J., Coleman, N., Ando, Y., . . . Christophersen, P. (2013). "NS6180, a new K(Ca) 3.1 channel inhibitor prevents T-cell activation and inflammation in a rat model of inflammatory bowel disease." Br J Pharmacol **168**(2): 432-444.
- Sullivan, S., Alex, P., Dassopoulos, T., Zachos, N. C., Iacobuzio-Donahue, C., Donowitz, M., . . . Li, X. (2009). "Downregulation of sodium transporters and NHERF proteins in IBD patients and mouse colitis models: potential contributors to IBD-associated diarrhea." Inflamm Bowel Dis **15**(2): 261-274.
- Tagkalidis, P. P., Gibson, P. R. and Bhathal, P. S. (2007). "Microscopic colitis demonstrates a T helper cell type 1 mucosal cytokine profile." J Clin Pathol **60**(4): 382-387.
- Thuijls, G., Derikx, J. P., de Haan, J. J., Grootjans, J., de Bruine, A., Masclee, A. A., . . . Buurman, W. A. (2010). "Urine-based detection of intestinal tight junction loss." J Clin Gastroenterol **44**(1): e14-19.



- Troeger, H., Eppe, H. J., Schneider, T., Wahnschaffe, U., Ullrich, R., Burchard, G. D., . . . Schulzke, J. D. (2007). "Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum." *Gut* **56**(3): 328-335.
- Troeger, H., Loddenkemper, C., Schneider, T., Schreier, E., Eppe, H. J., Zeitz, M., . . . Schulzke, J. D. (2009). "Structural and functional changes of the duodenum in human norovirus infection." *Gut* **58**(8): 1070-1077.
- Van Itallie, C. M. and Anderson, J. M. (2006). "Claudins and epithelial paracellular transport." *Annu Rev Physiol* **68**: 403-429.
- Villanueva, M. S. and Alimi, Y. (2015). "Microscopic colitis (lymphocytic and collagenous), eosinophilic colitis, and celiac disease." *Clin Colon Rectal Surg* **28**(2): 118-126.
- Wang, J., Morishima, S. and Okada, Y. (2003). "IK channels are involved in the regulatory volume decrease in human epithelial cells." *Am J Physiol Cell Physiol* **284**(1): C77-84.
- Wang, Z., Wang, T., Petrovic, S., Tuo, B., Riederer, B., Barone, S., . . . Soleimani, M. (2005). "Renal and intestinal transport defects in *Slc26a6*-null mice." *Am J Physiol Cell Physiol* **288**(4): C957-965.
- Weber, C. R., Nalle, S. C., Tretiakova, M., Rubin, D. T. and Turner, J. R. (2008). "Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation." *Lab Invest* **88**(10): 1110-1120.
- Willemsen, L. E., Hoetjes, J. P., van Deventer, S. J. and van Tol, E. A. (2005). "Abrogation of IFN-gamma mediated epithelial barrier disruption by serine protease inhibition." *Clin Exp Immunol* **142**(2): 275-284.
- Winther, K. V., Jess, T., Langholz, E., Munkholm, P. and Binder, V. (2004). "Long-term risk of cancer in ulcerative colitis: a population-based cohort study from Copenhagen County." *Clin Gastroenterol Hepatol* **2**(12): 1088-1095.
- Xin, B. and Wang, H. (2011). "Multiple sequence variations in *SLC5A1* gene are associated with glucose-galactose malabsorption in a large cohort of Old Order Amish." *Clin Genet* **79**(1): 86-91.
- Yadav, V., Varum, F., Bravo, R., Furrer, E., Bojic, D. and Basit, A. W. (2016). "Inflammatory bowel disease: exploring gut pathophysiology for novel therapeutic targets." *Transl Res.*
- Yeruva, S., Chodisetti, G., Luo, M., Chen, M., Cinar, A., Ludolph, L., . . . Seidler, U. (2015). "Evidence for a causal link between adaptor protein PDZK1 downregulation and Na(+)/H(+) exchanger NHE3 dysfunction in human and murine colitis." *Pflugers Arch* **467**(8): 1795-1807.
- Yeruva, S., Farkas, K., Hubricht, J., Rode, K., Riederer, B., Bachmann, O., . . . Seidler, U. (2010). "Preserved Na(+)/H(+) exchanger isoform 3 expression and localization, but

- decreased NHE3 function indicate regulatory sodium transport defect in ulcerative colitis." Inflamm Bowel Dis **16**(7): 1149-1161.
- Zachos, N. C., Tse, M. and Donowitz, M. (2005). "Molecular physiology of intestinal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange." Annu Rev Physiol **67**: 411-443.
- Zanello, G., Kevans, D., Goethel, A., Silverberg, M., Tyler, A. and Croitoru, K. (2014). "Genetics and innate and adaptive immunity in IBD." Nestle Nutr Inst Workshop Ser **79**: 41-55.
- Zeissig, S., Bergann, T., Fromm, A., Bojarski, C., Heller, F., Günther, U., . . . Schulzke, J. D. (2008). "Altered ENaC expression leads to impaired sodium absorption in the noninflamed intestine in Crohn's disease." Gastroenterology **134**(5): 1436-1447.
- Zeissig, S., Bojarski, C., Bürgel, N., Mankertz, J., Zeitz, M., Fromm, M. and Schulzke, J. D. (2004). "Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by tumour necrosis factor alpha antibody treatment." Gut **53**(9): 1295-1302.
- Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., . . . Schulzke, J. D. (2007). "Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease." Gut **56**(1): 61-72.

## **Danksagung**

Mein größter Dank gebührt meinem Förderer und Mentor Herrn Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke. Seine Unterstützung, sein persönliches Engagement und die vielen fruchtbaren Diskussionen in den zurückliegenden Jahren haben diese Arbeit erst möglich gemacht.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Michael Fromm für seine Unterstützung und dafür, dass er mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Frau Prof. Dr. Britta Siegmund danke ich sehr für Ihre persönliche Unterstützung und die vielen fachlichen Diskussionen, die mich weiter gebracht haben.

Nicht minder dankbar bin ich meinem Mentor Herrn Prof. Henry J. Binder sowie Herrn Prof. Vazhaikkurichi Rajendran. Ihre intensive Unterstützung, ihre Diskussionsbereitschaft und ihre immer offen stehenden Türen während meiner Zeit an der Yale University haben es mir leicht gemacht, mich in den Tiefen der epithelialen Physiologie zurechtzufinden.

Ganz besonders danke ich auch Herrn PD Dr. Christian Bojarski für seine immerwährende Kooperationsbereitschaft und die andauernde Hilfsbereitschaft bei der Gewinnung von Biopsiematerial.

Ein großes Dankeschön gebührt folgenden ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des Instituts für klinische Physiologie: Prof. Dr. Salah Amasheh, PD Dr. Roland Bücken, Dr. Petra Dames, Prof. Dr. Dorothee Günzel, Dr. Ingo Grotjohann, Dr. Nina Hering, Britta Jebautzke, PD Dr. Susanne Krug, In-Fah Maria Lee, Ursula Lempart, Sieglinde Lüderitz, PD Dr. Jürgen Mankertz, Dr. Jörg Piontek, Dr. Svenja Plöger, PD Dr. Rita Rosenthal, Dr. Heinz Schmitz, Susanne Schön, Elisabeth Schulze, Detlef Sorgenfrei und Dr. Shida Tavalali, mit denen ich viele fruchtbare Diskussionen führen konnte und die mir bei vielen kleineren und größeren technischen und administrativen Problemen zur Seite standen.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich in diesem Zusammenhang bei Frau Anja Fromm, mit der ich immer wieder große und kleine technische Fragestellungen erörtern konnte und die auch immer wieder aushalf, wenn Sprechstunden, Patientenversorgung oder anderweitige klinische Verpflichtungen ein langes Experiment zu unterbrechen drohten.

Nicht zuletzt gebührt mein Dank der ehemaligen Doktorandin Irene Erko, mit der mir die Zusammenarbeit viel Freude bereitet hat, und deren experimentelle Ergebnisse zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders herzlich und vor allem möchte ich meiner Frau, Frau Prof. Dr. Dr. Michal-Ruth Schweiger, danken. Ihre stete Unterstützung war und ist für mich unverzichtbar.

## Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....

Datum

.....

Unterschrift