

2 Literatur

2.1 Epithelien als Barriere

Epithelien sind Gewebe, die innere und äußere biologische Oberflächen bedecken und somit die Grenzflächen zwischen biologischen Kompartimenten bilden. Im Intestinum bildet das einschichtige Epithel eine Barriere zwischen dem Darmlumen als Teil der Außenwelt und dem Körperinneren.

Der Abstand zwischen benachbarten Epithelzellen beträgt typischerweise etwa 15-20 nm (Tepass, 2003). Damit Zellverbände entstehen, sind Zellkontakte erforderlich. An Epithelien finden sich 3 Arten solcher interzellulären Verbindungen:

1. *Adherens junctions mit punktförmigen Desmosomen und E-Cadherinen*; Funktion: mechanischer Zusammenhalt
2. *Gap junctions*; Funktion: Stoffaustausch zwischen benachbarten Zellen
3. *Tight junctions*; Funktion: epitheliale Abdichtung.

2.2 Tight junction

Die Morphologie der Tight junction konnte durch Gefrierbruchelektronenmikroskopie analysiert werden (Staehein, 1973; Staehein, 1974). An der Tight junction treten die apikalen, äußeren Schichten der Zellmembranen zweier Nachbarzellen miteinander in Kontakt. Diese Kontaktstellen sind in Strängen angeordnet, die netzartig anastomosieren (Gonzalez-Mariscal et al., 2003) (Abb. 1). Tight junction und Adherens junction bilden zusammen die Schlussleiste.

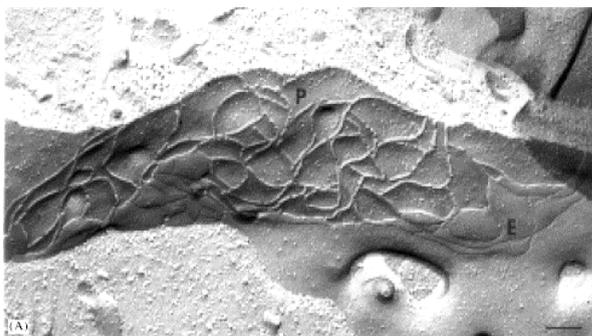


Abb. 1: Struktur der Tight junction

Das linke Bild zeigt einen elektronenmikroskopischen Gefrierbruchschnitt von netzartig anastomosierenden Tight junction-Strängen in einem epithelialen Monolayer. Rechts ein Ultradünnschnitt der Tight junction.

Entnommen aus: González-Mariscal et al., 2003

Funktionell behindert die Tight junction, auch Zonula occludens genannt, den freien parazellulären Durchtritt von Substanzen und verhindert die laterale Diffusion von Membranproteinen zwischen der apikalen und basolateralen Zellmembran. Somit grenzt die Tight junction das Darmlumen vom Interzellularraum ab und regelt den parazellulären Transport von Wasser und Soluten. Im wesentlichen können zwei zelluläre Transportwege unterschieden werden: der parazelluläre Transport durch die Tight junction und der transzelluläre Weg über die apikale und basolaterale Zellmembran mittels Carrier, Pumpen und Kanälen (Abb. 2).

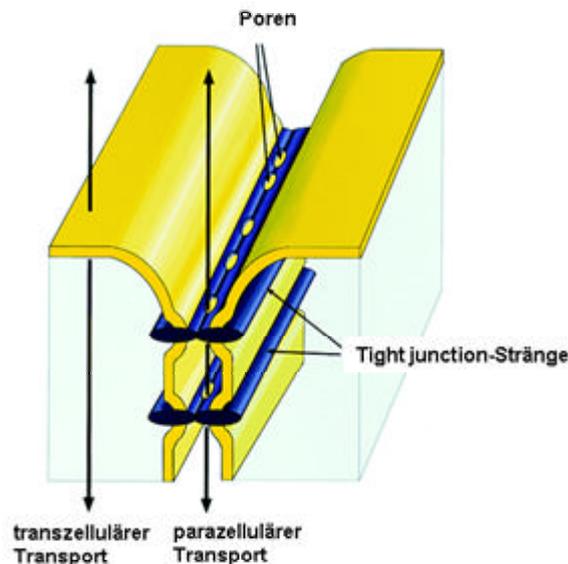


Abb. 2: Zellulärer Transport

Die Abbildung zeigt zwei benachbarte Zellen im Anschnitt, deren Interzellularspalt durch Tight junction-Stränge abgedichtet wird. Wasser und Solute haben die Möglichkeit die epitheliale Barriere entweder auf dem transzellulären Weg zu passieren, oder auf dem parazellulären Transportweg durch die Tight junction. Modifiziert nach: Tsukita et al., 2000

Die Tight junction fungiert aber nicht nur als statische Diffusionsbarriere, sondern ist in ihrer Struktur und Funktion in hohem Maße dynamisch und kann auf verschiedene physiologische, pharmakologische und pathologische Bedingungen mit einer Permeabilitätsänderung reagieren (Anderson und Van Itallie, 1995).

2.3 Proteine der Tight junction

Bisher konnten drei Klassen von Transmembranproteinen an der Tight junction identifiziert werden. Occludin, ein 65 kDa schweres Protein (Furuse et al., 1993) und die Proteinfamilie der Claudine, die 23 kDa groß sind (Tsukita und Furuse, 2000) tragen zur epithelialen Barriere bei. Die 40 kDa schweren Junctional adhesion molecules (JAM 1-3) (Martin-Padura et al., 1998) sind in ihrer Funktion weitgehend unbekannt.

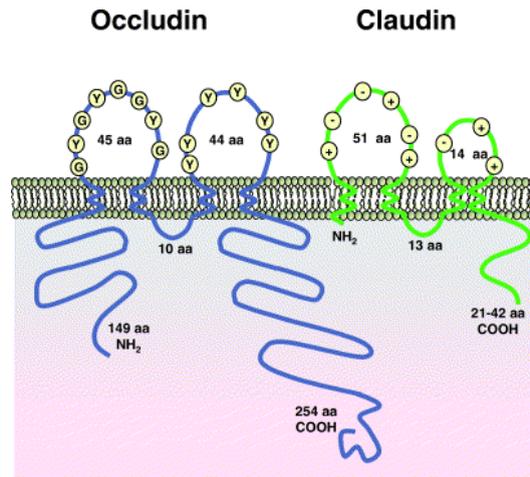


Abb. 3: Transmembranproteine der Tight junction: Occludin, Claudin

Entnommen aus: González-Mariscal et al., 2003

2.3.1 Occludin

Occludin ist ein 65 kDa großes integrales Membranprotein der Tight junction mit vier putativen transmembranalen Domänen (Furuse et al., 1993; Furuse et al., 1998) (Abb. 3, links). Zwei extrazelluläre Schleifen stehen in Verbindung mit Tight junction-Molekülen von benachbarten Zellen. Auf der zytoplasmatischen Membranseite befinden sich eine kurze intrazelluläre Schleife, eine kurze N-terminale und eine lange C-terminale Domäne, wobei die letzten 150 Aminosäuren dieser C-terminalen Domäne mit den MAGUK-(membrane associated guanylate kinase homologs) Proteinen ZO-1, ZO-2 und ZO-3 und einem Anteil des Zytoskeletts, dem F-Aktin interagieren. Ob die Epithelabdichtung der Tight junction wesentlich vom Vorhandensein des Occludins abhängt, ist umstritten. Einerseits fand man heraus, dass sowohl die zweite extrazelluläre (Medina et al., 2000), als auch die intrazelluläre N-terminale Domäne (Bamforth et al., 1999) für die Stabilität von Occludin in der Tight junction verantwortlich sind und damit einen Einfluss auf die strukturelle Integrität der parazellulären Barriere haben. Auch wurde an einem Huhn-Modell gezeigt, dass durch überexprimiertes Occludin der transepitheliale Widerstand in MDCK-Zellen, basierend auf einer Vermehrung der Tight junction-Stränge, um 30 – 40% gesteigert werden konnte (McCarthy et al., 1996). Andererseits konnten bei elektrophysiologischen Messungen des intestinalen Epithels von Knockout-Mäusen keine Beeinträchtigungen der Barrierefunktion festgestellt werden (Saitou et al., 2000).

Im Rahmen meiner Arbeit wird mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbung Occludin als integrales Membranprotein der Tight junction dargestellt (Abb. 15 und Abb. 16).

2.3.2 Claudine

Die Familie der Claudine umfasst bisher 24 identifizierte Mitglieder. Furuse et al. beschrieben 1998 erstmalig Claudin-1 und Claudin-2. Es handelt sich um integrale Membranproteine mit vier putativen transmembranalen Domänen, zwei extrazellulären Schleifen und intrazellulären N- und C-Termini, die ein Molekulargewicht von ca. 23 kD aufweisen (Furuse et al., 1998) (Abb. 3, rechts).

Bezüglich der Abdichtungsfunktion der verschiedenen Claudine ist bisher folgendes bekannt: Claudin-1 hat eindeutig abdichtende Funktion (Furuse et al., 2002) und auch Claudin-4 wirkt für Na^+ abdichtend (Van Itallie et al., 2001).

Es war dann eine große Überraschung, als gezeigt wurde, dass Claudin-2 in der Tight junction von MDCK-Zellen nicht etwa abdichtet, sondern im Gegenteil parazelluläre Poren bildet (Furuse et al., 2001), die spezifisch für kleine Kationen sind (Amasheh et al., 2002). Ein weiteres durchlässiges Protein ist Claudin-16 (=Paracellin-1), das einen parazellulären Magnesiumkanal bildet und vorzugsweise im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife lokalisiert ist (Simon et al., 1999).

2.3.3 ZO-1

ZO-1 ist ein 210 - 225 kDa großes intrazellulär lokalisiertes Phosphoprotein (Stevenson et al., 1986; Stevenson et al., 1988), welches zusammen mit ZO-2 und ZO-3 zur Proteinfamilie der MAGUK gerechnet wird. Durch kombinierte in vivo- und in vitro-Bindungsassays ist bekannt, dass das N-terminale Ende des Proteins in Kontakt mit ZO-2 und Occludin tritt. Die C-terminale Domäne interagiert mit dem F-Aktin des Zytoskeletts der Zelle (Fanning et al., 1998).

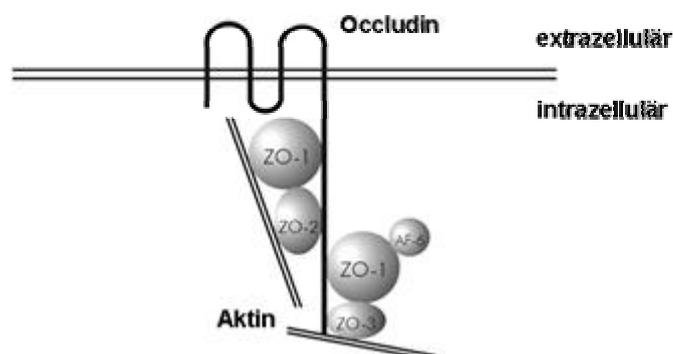


Abb. 4: Tight junction-assozierte Proteine (Schema)

Modifiziert nach: Wittchen et al., 1999

Zusammen mit ZO-2 und ZO-3 stellt ZO-1 über intramembranäre Tight junction-Proteine (Occludin, Claudin, JAM) eine Verbindung zu Nachbarzellen her (Furuse et al., 1993; Martin-Padura et al., 1998; Anderson und Van Itallie, 1999) (Abb. 4).

Um die Epithelgrenzen genau abzubilden wird im Rahmen meiner Arbeit, mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbung, ZO-1 zur Darstellung der Zellgrenzen bzw. der Schnittkante in einem Zellmonolayer genutzt (Abschnitt 3.8.1).

2.4 Epithelschäden und Wundheilung

Das Epithel des Intestinaltraktes repräsentiert eine wirksame Barriere gegen ein breites Spektrum von Noxen und antigen wirkenden Substanzen.

Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, bakteriellen Infektionen oder auch schon durch die tägliche Ingestapassage kommt es zu kleinen, oberflächlichen, größeren oder tiefen Epithelläsionen (Neurath und Schurmann, 2000). Aus einer geschädigten epithelialen Barriere resultiert ein erhöhter Durchtritt toxischer und antigen wirkender Substanzen, die zu lokalen Entzündungsreaktionen, unkontrollierter Immunantwort und Dysregulation der Homöostase führen können. Eine schnelle Abdichtung des geschädigten Gewebes ist für die Aufrechterhaltung der epithelialen Barrierefunktion nötig (Gitter et al., 2001).

Das mukosale Epithel des Verdauungstraktes ist durch eine schnelle Zellproliferation mit einem physiologischen Turnover von 3-5 Tagen (im Dünndarm der Maus) gekennzeichnet (Wright und Irwin, 1982). Die proliferativen Prozesse laufen in der Kryptenregion ab, wo die noch undifferenzierten Krypten-Stammzellen stimuliert werden. Im Verlauf ihrer Wanderung zur Zottenoberfläche entwickeln sie sich zu differenzierten Enterozyten, welche dann an der Zottenoberfläche durch Apoptose untergehen (Hall et al., 1994; Ramachandran et al., 2000).

Um die Kontinuität des Epithels nach Zellschädigung wieder herzustellen, werden im wesentlichen drei verschiedene Mechanismen beschrieben (Dignass, 2001) (Abb. 5): Erstens: Die an die Wunde grenzenden Zellen migrieren, um eine Wundabdeckung zu erzielen. Während dieser Zellmigration flachen die Zellen ab, bilden pseudopodienähnliche Strukturen aus (Lamellipodien) und reorganisieren zusätzlich ihr Zytoskelett. Dieser wenige Minuten bis Stunden andauernde Prozess der Migration und Reorganisation wird Restitution genannt. Er ist der Initialschritt der epithelialen Wundheilung und wird vollkommen getrennt von einer Zellproliferation betrachtet.

Bei Einzelzell-Läsionen reicht ein purse string-Mechanismus aus, um eine epitheliale

Abdichtung wieder herzustellen. Hierbei werden die apikalen und basalen Zellbereiche durch zelluläre Aktinfilamente wie bei einem Tabaksbeutel zusammengezogen und so in Kombination mit einer Zellmigration der Defekt verkleinert (Bement et al., 1993; Florian et al., 2002).

Zweitens: Eine anschließende Proliferation der Basalzellen ist notwendig, um größere Epitheldefekte völlig zu verschließen.

Drittens: Eine Maturation und Differenzierung der bis dahin undifferenzierten Zellen zu Epithelzellen ist erforderlich, um die funktionale Aktivität des mukosalen Oberflächenepithels aufrecht zu erhalten.

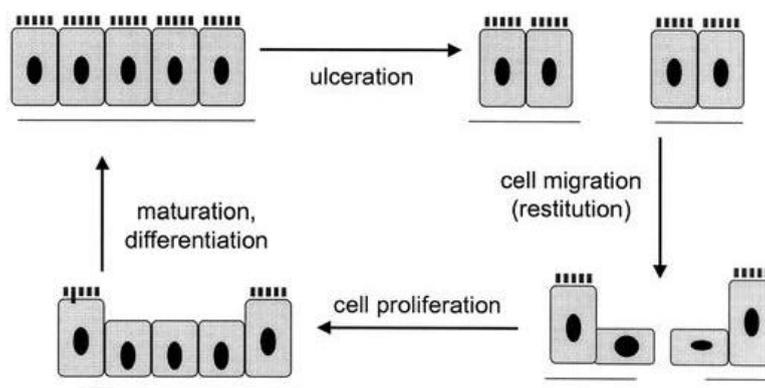


Abb. 5: Epitheliale Wundheilung (Schema)

Das Modell zeigt vereinfacht die epitheliale Wundheilung im Intestinaltrakt.

Kommt es zu einer mukosalen Epithelwunde, versuchen die angrenzenden intakten Zellen durch Abflachen und Ausbildung pseudopodienartiger Ausläufer die Läsion schnell abzudecken (Restitution oder Zellmigration). Um wieder einen kontinuierlichen Zellverband herzustellen, schließt sich bei großflächigeren Wunden eine Phase der Zellproliferation an. Zuletzt wird durch Differenzierung und Reifung der neuen Epithelzellen die Funktion des Gewebes wieder hergestellt.

Entnommen aus: A. Dignass, 2001

Dies ist ein Modell für oberflächlich gelegene intestinale Epithelwunden. Bei tiefgreifenderen Wunden mit Einbeziehung basal liegender Zellschichten spielen entzündliche Prozesse eine weitere Rolle.

Das Epithelzellwachstum der intestinalen Mukosa ist von der Anwesenheit verschiedener Faktoren im Lumen, im Epithel selbst und in der darunter liegenden Lamina propria abhängig. Eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wirken regulierend.

2.4.1 Reparatur von Epitheldefekten in nicht-intestinalen Systemen

Die Wundheilung der **Haut** wird in drei Phasen eingeteilt: in die exsudative, resorptive, reparative oder Proliferationsphase. In Wirklichkeit laufen diese Phasen weitgehend gleichzeitig ab.

Unmittelbar nach Verletzung kommt es in der exsudativen Phase zu einer Vasokonstriktion mit einhergehender Fibrinbildung und Thrombozytenaktivierung, welche unter anderem verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren ausschütten. Reflektorisch stellt sich nach wenigen Minuten eine Vasodilatation ein, wodurch Entzündungszellen und -mediatoren, die weitere proinflammatorische Zytokine abgeben (Nathan, 1987), leichter in das verletzte Gewebe eindringen können und die Nähr- und Sauerstoffversorgung erhöht wird.

In der resorptiven Phase werden Zelldetritus, Bakterien und andere Fremdstoffe durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten aufgenommen.

Die reparative Phase ist gekennzeichnet durch Fibroblastenproliferation und Kapillarinfiltration beginnend nach drei bis fünf Tagen. Es kommt zur Kollagensynthese und führt zur Bildung von Granulationsgewebe, welches die Grundlage für die einsetzende Epithelisierung (Epithelzellproliferation und -migration) ist. Im weiteren Verlauf kontrahieren sich unter dem Epithel die Myofibroblasten im Granulationsgewebe und verkleinern so die Wundoberfläche.

Das Augenmerk dieser kurzen Zusammenfassung soll nun auf dem Reparaturmechanismus des Epithels liegen. Während der Epithelisierung werden die Keratinozyten der Wundränder mobilisiert und beginnen in Wundrichtung zu migrieren (Martin, 1997) (Abb. 6). Bei partiellen, oberflächlichen Hautverletzungen kann dieser Vorgang sofort nach der Verwundung beginnen. Bei tiefgreifenderen Verletzungen muss zuerst eine Schicht Granulationsgewebe gebildet werden. In solchen Fällen besteht eine Latenzzeit von drei bis vier Tagen, bis die Granulation, Zellwanderung und verstärkte Mitoseaktivität am Wundrand beginnt (McClain et al., 1996). Die Wanderung der Epithelzellen ist dann beendet, wenn sich die Zellen berühren und somit eine neue Basalmembran ausgebildet ist, von der aus das Plattenepithel erneuert wird.



Abb. 6: Migration der Epithelzellen

Bei dieser Hautwunde ist die Basalzellschicht des Epithels zerstört und wird durch Abflachen und Migration der wundnahen Keratinozyten wieder hergestellt.

Modifiziert nach: Martin, 1997

Sowohl Epithelzell-, als auch Fibroblastenstimulation und die nachfolgende Zellproliferation werden durch eine Reihe von Faktoren gesteuert. In den vergangenen Jahren wurde deutlich, dass ein weites Netzwerk von Zytokinen und Wachstumsfaktoren z. B. PDGF (platelet-derived growth factor), TGF- β (transforming growth factor-beta), VEGF (vascular endothelial cell growth factor), KGF (keratinocytes growth factor) u. a. die epitheliale Wundheilung beeinflusst (Clark, 2003).

Die Wundheilung am **Auge**, genauer des Corneaepithels, ist weitestgehend unterschiedlich von den kutanen Wundheilungsmechanismen. Funktionell stellt das Epithel der Hornhaut nicht nur einen Schutzmechanismus für die inneren Strukturen des Auges dar, sondern dient mit seiner Vielzahl von Tight junctions und Ionenpumpen als semipermeable Membran. Diese Membran versorgt das nach innen liegende Hornhautstroma mit Nährstoffen und stellt eine Flüssigkeitsbarriere zum Stroma dar.

Kommt es zu einem cornealen Epitheldefekt dringt der Tränenfilm durch den im Stroma herrschenden Unterdruck von - 40 mm Hg in das glycosaminoglycanreiche Stroma ein und bringt dieses zum Quellen. Die Größe und Tiefe der Wunde ist für die nachfolgenden Wundheilungsmechanismen bestimmend. Auch hier laufen die Phasen der Zellwanderung, der Proliferation und der Differenzierung gleichzeitig ab. Die epitheliale Migration wird innerhalb von 5 Stunden nach Verletzung durch die Bildung von Lamellipodien und Filopodien sowie durch die Umstrukturierung der Aktinfilamente eingeleitet. Es stellt sich eine konstante Migrationsgeschwindigkeit von 60 bis 80 $\mu\text{m}/\text{h}$ ein, bis eine oberflächliche Wundabdeckung erreicht ist (Pfister, 1975; Kuwabara et al., 1976; Matsuda et al., 1985). Während der Verzögerungs-

phase zwischen Verwundung und Initialisierung der Zellmigration kommt es zu einer erhöhten Proteinsynthese, die zur Bildung von Zytoskelettbestandteilen und Oberflächenrezeptoren führt (Zieske und Gipson, 1986). Wenn die Kontinuität der Basalzellschicht wieder hergestellt ist, proliferieren und differenzieren die Basalzellen zu Flügel- und Deckzellen (mittlere und äußere Schicht des unverhornten, mehrschichtigen Plattenepithels).

Es wurde beobachtet, dass eine Reihe von Substanzen das epitheliale Wachstum und die Zellmigration beeinflussen. Dazu zählen: EGF (epidermal growth factor), FGF (fibroblast growth factor), TGF (transforming growth factor), KGF (keratinocyte growth factor), HGF (hepatocyte growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), IGF (insulin-like growth factor), IL-1 und -6 (interleukin-1 und -6), TNF- α (tumor necrosis factor- α) (Imanishi et al., 2000).

2.4.2 Reparatur von Epitheldefekten in intestinalen Systemen

Es können zwei Arten von Wunden in der gastrointestinalen Mukosa unterschieden werden. Erstens: Tiefe Verletzungen mit einhergehenden Hämorrhagien und Nekrosen und zweitens: Oberflächliche Schäden des intestinalen Epithels, bei der die Basallamina unverletzt ist. Die mukosale Wundheilung richtet sich nach dem Schadenstyp.

Die Wiederherstellung von tiefgreifenden Wunden nimmt einen Zeitraum von Tagen bis Wochen in Anspruch, da das geschädigte Gewebe durch Zellproliferation ersetzt werden muss. Oberflächliche epitheliale Schäden werden in wenigen Stunden schnell durch Restitution (Migration) von Nachbarzellen in den Wundbereich hinein abgedeckt, wobei die geschädigten oder zerstörten Zellen abgestoßen und als Schutzschicht für migrierende Zellen genutzt werden (Feil et al., 1989). Die migrierenden Epithelzellen flachen ab und bilden Lamellipodien aus. Zur Re-epithelisation sehr kleiner Wunden im Darm reicht der purse string-Mechanismus aus (Abschnitt 2.4), um durch die Kontraktion des intrazellulären Aktinbandes der umliegenden Enterozyten den Defekt zu verschließen (Heath, 1996; Florian et al., 2002). Erst wenn sich die wandernden Zellen berühren und eine neue epitheliale Barriere durch die Ausbildung von Tight junction gebildet haben, ist das oberflächliche Epithel funktionell wieder völlig hergestellt. Dieser Restitutionsmechanismus konnte bei Epithelzellen des Magens (Paimela et al., 1993), des Dünndarms (Pitha, 1971) und des Kolons (Henrikson et al., 1989; Riegler et al., 1992) beobachtet werden.

2.5 Zytokine und Wundheilung

Zytokine und Wachstumsfaktoren sind regulatorische Peptide, die von nahezu allen Zellen des Körpers produziert und in die Umgebung abgegeben werden. Es sind bis heute ca. 50 verschiedene regulatorische Peptide bekannt. Sie sind in der Lage, verschiedenste Funktionen der Körperzellen zu steuern. Eine der wesentlichen Funktionen von Zytokinen und Wachstumsfaktoren im Intestinaltrakt ist die Beeinflussung von Wundheilungsvorgängen und die Steuerung des Immunsystems, einschließlich der Regulation von Entzündungsvorgängen.

Bis heute ist **PDGF** (platelet-derived growth factor) einer der meist untersuchten Wachstumsfaktoren. Er ist der erste bei dem die Funktion der Chemotaxis zur Migration von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Fibroblasten in verletztes Gewebe hinein, nachgewiesen wurde (Heldin und Westermark, 1999). Er ist nicht nur ein wichtiger Faktor bei der Wundheilung am Auge, indem er die Migration von cornealen Epithelzellen stimuliert (Kamiyama et al., 1998) (Tabelle 1), er wird darüber hinaus als erster Wachstumsfaktor zur Behandlung von Extremitäten-Ulzerationen bei Diabetes und anderen schlecht heilenden, chronischen Ulzerationen eingesetzt (Mandracchia et al., 2001; Nagai und Embil, 2002).

EGF (epidermal growth factor) gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren. Hierzu werden auch TGF- α (transforming growth factor-alpha) und HG-EGF (heparin-binding EGF) gerechnet. Sie binden alle an den EGF-Rezeptor und besitzen die Eigenschaft, die biologischen Aktivitäten von EGF nachzuahmen.

IL-1b als proinflammatorisches Zytokin wird von Monozyten, Makrophagen, Thrombozyten, Fibroblasten und Endothelzellen gebildet. EGF und IL-1 β nehmen Einfluss auf die Regeneration der intestinalen epithelialen Barriere, indem die Migration der Epithelzellen beschleunigt wird (Dignass und Podolsky, 1993; Miller und Debas, 1995; Göke und Podolsky, 1996; Riegler et al., 1997; Kato et al., 1999) (Tabelle 1).

Der nächste Schritt in der Stimulierung der Wundheilung durch PDGF, TGF- α (transforming growth factor-alpha) und EGF, ist die nachfolgende Aktivierung der wundnahen Fibroblasten (Piazuelo et al., 2000) und die Proliferation von intakten Epithelzellen (Chen et al., 1991). Auch die Reparaturmechanismen am Auge, insbesondere die Proliferation und Migration von Corneaepithelzellen, werden durch

Wachstumsfaktoren wie: EGF, TGF, KGF (keratinocyte growth factor), HGF (hepatocyte growth factor), PDGF angeregt (Imanishi et al., 2000).

TGF- β 1 (transforming growth factor-beta1) ist einer der Schlüsselfaktoren der epithelialen Wundheilung und im Entzündungsgeschehen (Yanaka et al., 1996). Dignass et al. konnten durch in vitro-Studien an IEC-6-Monolayern zeigen, dass bei einer Verletzung eine Reihe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (TGF- α , EGF, IL-1 β , und IFN- γ) die Produktion von TGF- β 1 erhöhen und somit zu einer beschleunigten Zellrestitution führen (Dignass und Podolsky, 1993). Auf der einen Seite erhöht TGF- β 1 die Restitution von intestinalen Epithelien (Ciacci et al., 1993; Göke und Podolsky, 1996) (Tabelle 1), andererseits inhibiert er jedoch gleichzeitig ihre Proliferation (Ciacci et al., 1993).

In der Literatur wird häufig der Einfluss von **TNF- α** auf die intestinalen epithelialen Wundheilungsmechanismen beschrieben. Nach Kato et al. inhibiert TNF- α (5 U/ml) die epitheliale Migration von Primärzellen der caninen Magenmukosa (Kato et al., 1999) (Tab.1). Die Restitution von Einzelzell-Läsionen an HT-29/B6-Zellen wird durch Zugabe von TNF- α (100 ng/ml) inhibiert (Florian et al., 2001). Bei Einzelzell-Läsionen an Kolonepithel von Mäusen hemmt TNF- α (100 ng/ml) in Kombination mit IFN- γ (1000 U/ml) die Restitution der Enterozyten (Florian et al., 2001; Florian, 2002). Jedoch löst TNF- α alleine keine Restitutionsveränderung aus. Auch die Arbeitsgruppe Dignass et al. konnte bei Versuchen mit einer TNF- α Konzentration von 100-1000 U/ml an der intestinalen Zelllinie-6 keine Veränderungen der Zellmigration feststellen (Dignass und Podolsky, 1993) (Tabelle 1). Corredor et al. untersuchten die Regulation des rezeptorabhängigen Migrationsmechanismus an einem in vitro-Wundheilungsmodell. Sie fanden heraus, dass bei einer physiologischen TNF- α -Konzentration von 1 ng/ml die Zellmigration durch den TNF-Rezeptor 2 erhöht ist, wobei es bei pathologischen Werten von 100 ng/ml durch den TNF-Rezeptor 1 zu einer Inhibierung der Wundheilung kommt (Corredor et al., 2003). Allgemein lässt sich sagen, dass TNF- α die Vitalität von Intestinalzellen herabsetzt, was durch in vitro-Studien mit humanen Kolonepithelzellen beschrieben wurde (Pedersen et al., 2000).

Das proinflammatorische Zytokin **IFN-g** (Interferon-gamma) führt bei Versuchen mit intestinalen T84-Epithelzellen, einem humanem Kolonepithelmodell, zu einem transepithelialen Widerstandsabfall indem es die Tight junction Permeabilität erhöht (Madara und Stafford, 1989). Man beobachtet, dass die intestinale Restitution und auch die Restitution von Epithelzellen der Lunge durch eine hohe Konzentration von IFN- γ beschleunigt (Dignass und Podolsky, 1993; Göke und Podolsky, 1996) (Tabelle 1), (Ahdieh et al., 2001) und durch Gabe von Anti-IFN- γ -Antikörper inhibiert werden kann (Cario et al., 1999). Die Arbeitsgruppe Dignass et al. erklärt die beschleunigte epitheliale Migration bei IEC-6-Zellen damit, dass die Konzentration von TGF- β 1 durch IFN- γ erhöht wird (Dignass und Podolsky, 1993).

Durch Proliferationsversuche mit HT-29-Zellen fand man heraus, dass bei einer **TNF-a**-Gabe das Zellwachstum geringfügig erniedrigt ist. Bei Verabreichung von **IFN-g** ist der inhibierende Effekt deutlicher ausgeprägt. Die Hemmung der Proliferation ist am stärksten wenn beide Zytokine zusammen appliziert werden. Dies könnte auf die durch IFN- γ stimulierte Synthese des TNF- α -Rezeptors zurückzuführen sein (Ruggiero et al., 1986). Aggarwal et al. konnten ebenfalls eine IFN- γ -bedingte Zunahme an TNF- α -Rezeptoren beobachten (Aggarwal und Eessalu, 1987).

TNF- α und IFN- γ fördern als Einzelzytokine die Expression von Zell-Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen und begünstigen so die transendotheliale Migration von Leukozyten (Osborn et al., 1989). Wenn beide Zytokine in Kombination appliziert werden, vermindern sie die Migration (Rival et al., 1996) durch die Umverteilung von Adhäsionsmolekülen an der Zellmembran (Ozaki et al., 1999).

Auch endotheliale Wundheilungsvorgänge können durch Zytokine und Wachstumsfaktoren, z. B. durch das antiinflammatorische Zytokin **IFN-a** (Interferon-alpha), beeinflusst werden. Durch in vivo-Versuche an Mäusen konnte man belegen, dass die Kombination von IFN- α und - β die endotheliale Wundheilung durch eine Proliferationshemmung der Zellen behindert (Stout et al., 1993).

Ein großer Anteil der Forschung an **IL-13** setzt ihren Schwerpunkt auf den Zytokineinfluss auf Lungenepithelzellen und anderer Zellen des Atmungstraktes. So haben Booth et al. Versuche mit humanen Bronchialepithelzellen durchgeführt. Sie beobachteten einen proliferationsfördernden Effekt von IL-13, der auf die vermittelnde Wirkung von TGF- α zurückzuführen ist. Neutralisierende Antikörper gegen TGF- α inhibieren die Proliferationsantwort (Booth et al., 2001). Ahdieh et al. führten an Calu-3 (humanen Lungenepithel)-Zellen, die mit IL-13 vorinkubiert wurden, elektrophysiologischen Untersuchungen durch. Es stellte sich ein reversibler Abfall der Barrierefunktion ein. Analysen der Tight junction-assoziierten Proteine ZO-1 und Occludin zeigten eine Reduktion der Expression von ZO-1 und eine schwache Verminderung der Occludinexpression im Vergleich zu Kontrollen. Bei Wundheilungsversuchen führte die Applikation von IL-13 zu einer Hemmung der Migration von Calu-3-Zellen (Ahdieh et al., 2001).

2.5.1 Zytokine / Wachstumsfaktoren und Restitution

Substanz	Zellen	Beeinflussung der Restitution	Literatur
EGF	COM	positiv	Kato et al., 1999
	IEC-6	positiv	Dignass et al., 1993
TGF- α	COM	positiv	Kato et al., 1999
	IEC-6	positiv	Dignass et al., 1993
TGF- β	COM	<i>negativ</i>	Kato et al., 1999
	IEC-6	positiv	Ciacci et al., 1993
IGF-I	COM	positiv	Kato et al. 1999
PDGF	IEC-6	keine	Dignass et al., 1993
	CEC	positiv	Kamiyama et al., 1998
IL-1 β	COM	positiv	Kato et al., 1999
	IEC-6	positiv	Dignass et al., 1993
IL-6	IEC-6	keine	Dignass et al., 1993
IFN- γ	IEC-6	positiv	Dignass et al., 1993
	COM	keine	Kato et al., 1999
TNF- α	COM	<i>negativ</i>	Kato et al., 1999
	IEC-6	keine	Dignass et al., 1993
	HT-29/B6	<i>negativ</i>	Florian, 2002 *
TNF- α + IFN- γ	KdM	<i>negativ</i>	Florian, 2002 *

Tabelle 1: Zytokine / Wachstumsfaktoren (Übersicht)

Diese Tabelle stellt eine Auswahl der in der Literatur beschriebenen Zytokine und Wachstumsfaktoren dar, die in Restitutionsexperimenten getestet wurden.

* Florian untersuchte Einzelzellrestitutions, die im Gegensatz zu mehrzelligen Restitutions weitgehend ohne Zellmigration stattfinden.

Wachstumsfaktoren: EGF: Epidermaler Wachstumsfaktor

TGF- α : Transformierender Wachstumsfaktor-alpha

TGF- β : Transformierender Wachstumsfaktor-beta

IGF-I: Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor I

PDGF: Thrombozyten-abgeleiteter Wachstumsfaktor

Zytokine:

IL-1 β : Interleukin-1beta

IL-6: Interleukin-6

IFN- γ : Interferon-gamma

TNF- α : Tumornekrosefaktor-alpha

Zellen:

COM: canine oxyntic mucosa (Primärkultur aus Zellen des Salzsäure-produzierenden Bereichs der Magenmukosa des Hundes)

CEC: cornea epithelial cells (Corneaepithelzellen)

IEC-6: intestinal epithelial cell line-6 (intestinale Epithelzelllinie-6)

HT-29/B6: human colorectal cancer cell line HT-29 clon B6 (humane Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29 Klon B6)

KdM: distales Kolon der Maus

2.6 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Zu den beiden wichtigsten Verlaufsformen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zählen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, deren Häufigkeit in den letzten Jahrzehnten zugenommen hat. Mit einer Prävalenz von 1:700 bis 1:1.500 in Mitteleuropa werden die Erkrankungen vorwiegend bei Personen zwischen dem 15. und 40. Lebensjahr beobachtet (Stange, 1999; Dignass und Stein, 2000).

Die Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist bis heute nicht geklärt. Man geht davon aus, dass es bei genetisch prädisponierten Individuen zu einer überschießenden und fortlaufenden Aktivierung des mukosalen Immunsystems kommt, die durch die Präsenz der physiologischen luminalen Flora angetrieben wird.

Bei Colitis ulcerosa handelt es sich um eine chronisch entzündliche, meist in Schüben verlaufende Dickdarmerkrankung, die im Rektum beginnt und sich bei der Hälfte der Patienten nach proximal ausbreitet. Sie befällt typischerweise die Colon-Mukosa und greift nur selten auf die Dünndarmschleimhaut über. Leitsymptome sind blutig-wässrige oder blutig-schleimige Diarrhoen, Gewichtsverlust und Schmerzen im Bereich des Unterbauches oder der Kreuzbeinregion.

Der Morbus Crohn ist gekennzeichnet durch eine diskontinuierlich auftretende entzündliche Veränderung des gesamten Gastrointestinaltraktes mit bevorzugter Lokalisation im terminalen Ileum und Colon. Betroffen sind im Gegensatz zur Colitis ulcerosa alle Wandschichten bis hin zu den regionalen Lymphknoten. Auch hier verläuft die Erkrankung schubweise und wird durch rezidivierende Diarrhoen und krampfartige Schmerzen v. a. im rechten Unterbauch (ähnlich Appendizitis) begleitet. Es kommt zu einer ödematösen und fibrotischen Verdickung der segmental betroffenen Darmabschnitte mit Ausbildung von Stenosen, Schleimhautgeschwüren mit Fissuren und Fistelbildung.

Die Therapie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beruht, aufgrund der unklaren Ätiologie, meist auf einer unspezifischen Hemmung der mukosalen Entzündungsreaktion, mit Hilfe von Kortikosteroiden, Aminosalizylaten und Immunsuppressiva (Azathioprin) (Stange, 1999). Antikörper gegen TNF- α werden als Therapeutikum bei Patienten mit Morbus Crohn eingesetzt, falls die herkömmliche antiinflammatorische Therapie nicht greift (Mouser und Hyams, 1999; van Balkom et al., 2002).

2.6.1 Zytokine und CED / Barriere des Darms

Die beiden Erkrankungen unterscheiden sich immunologisch durch das von den T-Lymphozyten sezernierte Zytokinmuster. Je nach Zusammensetzung der abgegebenen Zytokine werden T-Lymphozyten in T_H1 - oder T_H2 -Zellen unterteilt. Bei Colitis ulcerosa überwiegt eine T_H2 -Antwort mit Produktion von TGF- β , IL-13 und IL-5 (Fuss et al., 1996; Heller et al., 2002; Podolsky, 2002), die eine humorale Immunantwort begünstigen. Im Gegensatz dazu dominiert bei Morbus Crohn eine T_H1 -Antwort, die durch eine Sekretion von TNF- α , IFN- γ und IL-2 gekennzeichnet wird (Fuss et al., 1996; Parronchi et al., 1997; Plevy et al., 1997; Schreiber et al., 1999), also Zytokine, die die Effektorzellen (natürliche Killer-Zellen, Makrophagen) des Immunsystems unterstützen.

Das proinflammatorische Zytokin **TNF-a** (tumor necrosis factor-alpha) spielt sowohl bei der intestinalen Wundheilung, als auch bei Immunreaktionen und Entzündungsprozessen eine zentrale Rolle. So wurden erhöhte TNF- α -Konzentrationen in der intestinalen Mukosa (MacDonald et al., 1990) und im Serum (Murch et al., 1991) von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa nachgewiesen, welche eine ständige Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktionen zur Folge haben.

Die intestinale epitheliale Barriere, die von der apikalen Zellmembran der Enterozyten und den Tight junction gebildet wird, kann durch die Anwesenheit von Zytokinen und Wachstumsfaktoren beeinflusst werden. In vitro-Untersuchungen an gesundem humanen Colon haben gezeigt, dass TNF- α am Epithel kurzzeitig eine Chloridsekretion auslöst (Schmitz et al., 1996). Die serosale Gabe von TNF- α führt bei HT-29/B6-Zellen (humane epitheliale Kolonkarzinom-Zelllinie) zu einer konzentrationsabhängigen epithelialen Barrierebeeinflussung, indem die Anzahl der Tight junction-Stränge dezimiert wird. Dies lässt den transepithelialen Widerstand der Zellen sinken (Gitter et al., 2000a), ohne dass eine verstärkte Chloridsekretion beobachtet werden kann (Schmitz et al., 1999).

Ähnliche Beobachtungen machten Heyman et al.. Sie fanden durch in vitro-Experimente heraus, dass bei Kindern die an einer Kuhmilchallergie erkrankt waren, die Produktion von TNF- α erhöht ist. Es konnte eine Erniedrigung des epithelialen Widerstandes gemessen werden, jedoch kam es nicht zu einer intestinalen Chloridsekretion (Heyman et al., 1994).

IL-1b (Interleukin-1beta) zählt ebenfalls zu den proinflammatorischen Zytokinen und ist ein wichtiger Mediator bei entzündlichen Prozessen. Es lässt sich bei experimentell ausgelöster Colitis eine erhöhte Konzentration von IL-1 β -Messenger-RNA in Enterozyten nachweisen (Radema et al., 1991). Die Konzentration von IL-1 β im Colon von Morbus Crohn-Patienten ist erhöht, wobei zwischen den stark entzündlichen und den histologisch unauffälligen Bereichen des Darms keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Zytokinkonzentration zu erkennen sind (Sher et al., 1995).

In in vitro-Untersuchungen am Kaninchen-Ileum, dem serosal rekombinantes humanes IL-1 β appliziert wurde, konnte eine verminderte Kalium- und Chlorid-Resorption beobachtet werden (Chiossone et al., 1990).

Sumer et al. konnten zeigen, dass bei Patienten mit chronisch ulzerativer Colitis **INF-a** zu einer Remission der mukosalen Entzündungsherde führt (Sumer und Palabiyikoglu, 1995).

IL-13 (Interleukin-13) zählt zu den proinflammatorischen Zytokinen. IL-13 inhibiert die Synthese der proinflammatorischen Zytokine IL- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 und TNF- α (Minty et al., 1993; Cosentino et al., 1995). Heller et al. zeigten anhand in vivo-Experimenten an Mäusen, dass bei der T_H2-Immunantwort einer experimentellen Oxazolone Colitis, die auch histologisch mit Colitis ulcerosa vergleichbar ist, eine erhöhte Produktion von IL-13 stattfindet (Heller et al., 2002). Bei einer Inkubation mit T84-Zellen führt IL-13 zu einem Abfall des transepithelialen Widerstandes (Ceponis et al., 2000).

2.7 HIV-Infektion

Die Erkrankung wird durch das humane Immundefizienz-Virus (HIV), einem Retrovirus, das zu der Familie der Lentiviren gehört, hervorgerufen. Lentivirusinfektionen verlaufen charakteristischerweise chronisch, zeigen eine lange Latenzphase, eine persistierende Virämie, sowie eine Beteiligung des zentralen Nervensystems.

Beim humanen Immundefizienz-Virus unterscheidet man zwei Typen: HIV-1, das weltweit vorkommt und HIV-2, das hauptsächlich in West-Afrika verbreitet ist (Barre-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1983; Clavel et al., 1986). Beide Virustypen lassen sich zwar in ihren molekularen und virologischen Eigenschaften, nicht aber in ihrer Morphologie differenzieren. HIV-1-Viruspartikel sind im Durchmesser ca. 100 nm groß und von einer Lipoproteinhülle umgeben, welche durch Alkohol relativ gut und schnell aufgebrochen werden kann (Inaktivierung von HIV).

Die auf der Oberfläche des Viruspartikels vorhandenen Glykoproteine (gp120 und gp41) vermitteln die Anhaftung an, sowie auch das Eindringen des Virus in die Zelle (Deng et al., 1996; Doranz et al., 1996; Dragic et al., 1996; Feng et al., 1996). Gp120 bindet an die CD₄-Rezeptoren, die sich auf der Oberfläche von T-Lymphozyten (T-Zellen), Monozyten, Makrophagen, Eosinophilen, dendritischen Zellen und Mikrogliazellen des ZNS befinden (CD₄⁺-Zellen) (Dalglish et al., 1984; Klatzmann et al., 1984). Unter Mitwirkung von Co-Rezeptoren (CXCR4, CCR5), die sonst als Chemokinrezeptoren dienen, kommt es zur Membranfusion. Wie bei allen Retroviren erfolgt bei HIV nach der Infektion der Zelle eine reverse Transkription des RNA-Genoms in DNA, die nach Komplettierung zum DNA-Doppelstrang in das zelluläre Genom eingebaut wird. Durch die intrazelluläre Existenz entzieht sich das Virus sowohl der humoralen als auch der zellulären immunologischen Abwehr und es folgen lange Latenzphasen. Durch Aktivierung der CD₄⁺-Zellen kommt es zur Virusvermehrung und schließlich zur Zerstörung der infizierten Zelle. Nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen bis 3 Wochen kommt es zu einem grippeähnlichen Syndrom, wobei Fieber, Abgeschlagenheit und Lymphadenopathie am häufigsten diagnostiziert werden.

In den ersten Wochen nach Infektion sinkt, durch den zytotoxischen Effekt des Virus, die CD₄⁺-T-Zell-Zahl im Blut (Abb. 7). Gleichzeitig steigen die Werte der HIV-RNA-Kopien im Plasma und auch die Anzahl der zytotoxischen T-Zellen (CTL), die für die spezifische Zerstörung der virusinfizierten CD₄⁺-Zellen verantwortlich sind. Zytotoxische T-Zellen tragen meist einen CD₈-Marker (CD₈-Zellen) auf ihrer

Oberfläche und werden u. a. durch IL-2, das von HIV-spezifischen CD_4^+ -T-Zellen produziert wird, zur Proliferation angeregt. Durch die nach wenigen Wochen einsetzende Serokonversion und die erhöhte CD_8 -Zell-Zahl (Abb. 7), stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Virusreplikation und -eliminierung ein („set point“) (Jurriaans et al., 1994; Mellors et al., 1995; Feinberg, 1996).

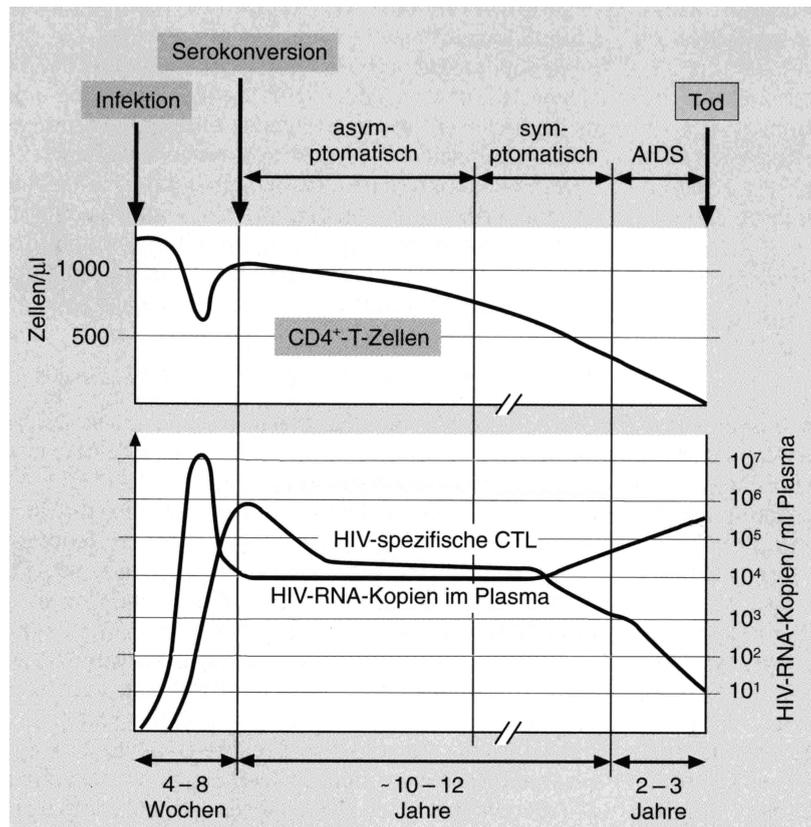


Abb. 7: Verlauf einer HIV-Infektion (Schema)

Diese schematische Übersicht stellt den Verlauf einer HIV-Infektion mit einhergehender Krankheitsentwicklung dar.

Modifiziert nach: Feinberg, 1996

Die Höhe der Viruslast (HIV-RNA-Kopien pro ml Plasma) und die CD_4^+ -T-Zell-Zahl hat prognostischen Wert für den Verlauf der Krankheit: je höher die Viruslast, je ausgeprägter die CD_4^+ -T-Zell-Depletion, desto schneller das Fortschreiten der Krankheit bzw. der Immundefizienz (Mellors et al., 1996). In dieser, oft mehrere Jahre andauernden immunsystemkontrollierten Phase, verläuft die Krankheit klinisch weitgehend asymptomatisch. Trotz des extrem hohen zellulären Umsatzes kommt es durch die enorme virale Replikation zu einem progredienten Verlust der CD_4^+ -Zellen. Mit zunehmender Dezimierung der CD_4^+ -T-Zellen und Absinken des IL-2-Spiegels kann das Immunsystem die erhöhte Produktion von zytotoxischen CD_8 -Zellen nicht mehr aufrechterhalten. Dies führt einerseits zu einer Phase erhöhter Virusreplikation

und andererseits zu klinischen Zeichen der Immundefizienz (symptomatische Phase). Es sind nicht nur Allgemeinsymptome wie Fieberschübe, Nachtschweiß, nicht-erregerbedingte rezidivierende Diarrhoen (HIV-Enteropathie) und Gewichtsverlust (Wasting-Syndrom), sondern auch AIDS-definierende Erkrankungen wie Pneumocystis-carinii- oder Candida-Pneumonie, Soor-Ösophagitis, chronische Herpes simplex-Infektion, Tuberkulose, HIV-Enzephalopathie, Cytomegalie-Virus-Infektion und erhöhte Inzidenz definierter Tumoren (Kaposi-Sarkom, Non-Hodgkin-Lymphom) zu beobachten (AIDS) (Gölz et al., 1999).

Therapeutisch wird zwischen der symptomatischen Behandlung der opportunistischen Erkrankungen und der direkt gegen HIV gerichteten antiretroviralen Therapie (ART) unterschieden. Dabei wird nach dem Prinzip der HAART-Therapie (highly active antiretroviral therapy) vorgegangen, indem drei virusreplikationshemmende Medikamente aus mindestens zwei verschiedenen Wirkstoffklassen gleichzeitig eingesetzt werden, um die Viruslast zu senken und die CD₄⁺-T-Zell-Zahl zu erhöhen. Eine zusätzliche Immuntherapie mit IL-2, die zu einem CD₄- und CD₈-Zellanstieg führt, kann ebenfalls eingesetzt werden. Eine vollständige Eliminierung des Virus und damit eine Heilung der HIV-Infektion ist bis heute jedoch nicht möglich.

2.7.1 Zytokine und HIV-Infektion

Bei HIV-infizierten Patienten wurden im Serum gesteigerte Konzentrationen von **TNF- α** und **IFN- α** ermittelt (von Sydow et al., 1991; Capobianchi et al., 1992; Piasecki et al., 1999). Im Verlauf einer antiretroviralen Therapie wurden in einer Studie der Arbeitsgruppe Brazille et al. die Plasmakonzentration von TNF- α , sowie die IFN- γ - und IL-2-mRNA-Konzentration in PBMC (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) gemessen. Zu Beginn der Therapie waren die TNF- α - und IFN- γ -Level erhöht und die IL-2-Konzentration erniedrigt. Nach 12-monatiger Medikamenteneinnahme ließ sich die Viruslast nicht mehr detektieren und die mittlere CD₄⁺-T-Zell-Zahl war angestiegen. Es konnte gezeigt werden, dass durch eine HAART die IFN- γ -mRNA und TNF- α -Konzentration erniedrigt und die Produktion von IL-2 erhöht werden kann (Brazille et al., 2003).

Es wurden auch in Darmbiopsaten von HIV-infizierten Patienten erhöhte TNF- α -, **IL-1b**- und **IFN-g**-Spiegel nachgewiesen (Kotler et al., 1993; McGowan et al., 1994).

In vitro-Versuche mit PBMC, kokultiviert mit HIV-infizierten Makrophagen (MDM, von Monozyten abstammende Makrophagen), zeigten eine stimulierte Sekretion von TNF- α , IL-1 β , IFN- γ und **IFN- α** , die die epitheliale Barriere von HT-29/B6-Zellen

schwächen (Vyakarnam et al., 1991; Stockmann et al., 2000), was durch den Abfall des transepithelialen Widerstandes dokumentiert werden konnte (Schmitz et al., 2002).

Stylianou et al. fanden heraus, dass bei HIV-infizierten Patienten die Genexpression von TNF- α durch IFN- α angeregt wird. Des Weiteren hat IFN- α einen stimulierenden Effekt auf die Expression des CCR5-Chemokinrezeptors (Stylianou et al., 2002). Es sind zwar verschiedene Studien zu verfolgen, die bei einer HIV-Infektion neben der herkömmlichen antiretroviralen Therapie eine Kombinationstherapie mit IFN- α einsetzen (Mildvan et al., 1996; Haas et al., 2000; Hatzakis et al., 2001), in der Praxis kommen diese Kombinationstherapien bislang nur bei Koinfektion mit Hepatitis C zum Einsatz, da unter anderem IFN- α als pathogener Faktor der progredienten Immundefizienz angesehen werden kann.

2.7.2 HIV-Enteropathie

Diarrhoe, intestinale Dysfunktion und das Wasting-Syndrom (chronische Gewichtsabnahme) sind häufige Symptome einer HIV-Infektion. Während des Krankheitsverlaufs klagt ein Großteil der Patienten über gastrointestinale Beschwerden. Oft ist dies durch eine Koinfektion mit Kryptosporidien, Mikrosporidien, Cytomegalieviren, Adenoviren, Giardien, atypische Mykobakterien, E. coli oder Salmonellen zu erklären (Rene et al., 1989; Kotler und Orenstein, 1994; Orenstein und Kotler, 1995). In vielen Fällen können jedoch keine Erreger nachgewiesen werden (Colebunders et al., 1988; Rene et al., 1989).

Der Begriff "HIV-Enteropathie" wurde erstmals 1984 in Zusammenhang mit gastrointestinalen Beschwerden wie Diarrhoe, Gewichtsverlust und einhergehenden Veränderungen der intestinalen Mukosa beschrieben (Kotler et al., 1984). In dieser Studie wurden 12 homosexuelle Männer mit einem erworbenen Immundefizienz-Syndrom und 11 gesunde homosexuelle Kontrollpersonen untersucht. Sieben Patienten litten unter Diarrhoe und Gewichtsverlust, wobei bakterielle und parasitäre Infektionen ausgeschlossen werden konnten. Alle Patienten zeigten gegenüber den Kontrollpersonen eine Malnutrition, eine deutlich erniedrigte T-Helfer- und Suppressor-Zellzahl, geringeres Körpergewicht und eine herabgesetzte Serum-Albumin-Konzentration. Weiterhin konnte eine D-Xylose-Malabsorption und Steatorrhoe vor allem bei Patienten mit Diarrhoe diagnostiziert werden. An Biopsiematerial von Jejunum und Rektum wurden histologische Veränderungen festgestellt.

Eine partielle Villusatrophie mit einhergehender Kryptenhyperplasie und einer erhöhten Anzahl an intraepithelialen Lymphozyten wurde in den Jejunum-Biopsaten beobachtet. In den rektalen Präparaten zeigten sich intranukleäre virale Einschlüsse, Mastzellinfiltrationen der Lamina propria und fokale Zelldegenerationen an der Kryptenbasis.

In den nachfolgenden Jahren wurden eine Reihe von histologisch vergleichbaren Beobachtungen gemacht. So konnten Villusatrophie, Kryptenhyperplasie, intraepitheliale Lymphozyteninfiltration, erhöhte Mitoseaktivität der Enterozyten in Biopsaten von HIV-infizierten Patienten nachgewiesen werden (Batman et al., 1989; Ullrich et al., 1989; Cummins et al., 1990; Greenson et al., 1991; Church et al., 1992).

Die histologischen Befunde belegen, dass die Lamina propria des Dün- und Dickdarms spezifische pathologische Prozesse durchläuft, die mit dem Krankheitsbild des erworbenen Immundefizienz-Syndrom einhergeht und unter dem Begriff "HIV-Enteropathie" zusammengefasst wird.

In Zusammenhang mit diesem Krankheitsbild wurden unter anderem Untersuchungen zu einigen regulatorisch wirkenden Zytokinen durchgeführt. Man fand heraus, dass die im Überstand von HIV-infizierten Immunzellen detektierten Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IFN- α , IFN- γ), die Barrierefunktion von intestinalen HT-29/B6-Zellen beeinflussen (Schmitz et al., 2002). Außerdem ist bekannt, dass TNF- α und IFN- γ eine Veränderung der intestinalen Barrierefunktion bei HT-29/B6- und T-84-Epithelzellen hervorrufen (Madara und Stafford, 1989; Schmitz et al., 1999).

Es konnten im Serum von HIV-infizierten Patienten erhöhte TNF- α - und IFN- α Spiegel (von Sydow et al., 1991; Capobianchi et al., 1992; Piasecki et al., 1999) und in Darmbiopsaten erhöhte Konzentrationen von TNF- α , IL-1 β und IFN- γ gemessen werden (Kotler et al., 1993; McGowan et al., 1994). Auch bei in vitro-Versuchen zeigten mit HIV-infizierte mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) eine stimulierte Sekretion von TNF- α und IL-1 β , was zu einer verstärkten HIV-Replikation führt (Vyakarnam et al., 1991).

Es stellt sich nun die Frage, inwieweit speziell diese Zytokine einen Einfluss auf die intestinale Restitution von Epithelzellen ausüben. In dieser Arbeit sollen Epitheldefekte und deren Restitutionsgeschwindigkeit im Hinblick auf ihre Beeinflussung durch HIV-typische Zytokine untersucht werden.

2.7.3 Immundefizienz-Virus beim Tier

Ähnlich dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) sind einige Retroviren, Genus Lentiviren, einzuordnen, die bei verschiedenen Tierarten ebenfalls eine Immunschwäche hervorrufen.

Hierzu zählt das feline Immundefizienz-Virus (**FIV**) das erstmals 1986 von Pedersen et al. isoliert werden konnte (Pedersen et al., 1987). FIV verursacht bei Katzen eine chronisch persistierende Infektion, die durch eine progressive Immunschwäche, neurologische Veränderungen und opportunistische Infektionen charakterisiert ist. Die Prävalenz der Infektion schwankt zwischen 1 und 12 %, je nach Alter, Verhalten und Geschlecht der Tiere (Pedersen et al., 1989; Courchamp und Pontier, 1994; Bendinelli et al., 1995). Die Verbreitung des FIV ist weltweit, wobei freilaufende Kater zur Risikogruppe gerechnet werden, da sie durch aggressives Territorialverhalten einem hohen Infektionsrisiko ausgesetzt sind. Die Übertragung des Virus erfolgt zellgebunden hauptsächlich durch Biss (Blut, Speichel), beim Deckakt (Nackebiss), in Einzelfällen perinatal vom infizierten Muttertier auf die Welpen (Callanan et al., 1991; Hopper et al., 1992) und über die Muttermilch (Rance et al., 1994). Der Ausbruch der Erkrankung wird meist bei älteren Katzen beobachtet (Grindem et al., 1989; Pedersen et al., 1989). Hier kommt es im frühen Stadium zu Fieberschüben, generalisierter Lymphadenopathie, zu einem Abfall der CD4⁺-Zellen und später zu einem erhöhten Auftreten von opportunistischen Erkrankungen.

Zu den Sekundärinfektionen zählen nicht nur parasitäre Erkrankungen wie Toxoplasmose und Chlamydien-Infektionen, sondern auch Pilzinfektionen, Erkrankungen des Respirationstraktes, Veränderungen der Nieren, der Haut, der Augen (z. B. Konjunktividen), der lymphatischen Organe und des Nervensystems. Der Gastrointestinaltrakt ist das am meisten betroffene Organsystem. Häufigste Symptome sind Veränderungen an der Maulschleimhaut in Form von proliferativen oder ulzerösen Stomatitiden und Glossitiden (Lutz et al., 1988; Hopper et al., 1989). Als weitere Erkrankungen sind Enteritiden, Diarrhoen, Gastritiden und Hepatopathien zu beobachten (Hartmann und Hinze, 1991). Pathohistologische Untersuchungen ergeben ähnliche Organbefunde wie bei einer HIV-Infektion. Chronisch-entzündliche Veränderungen des Darms mit Degenerationen des Kryptenepithels und zelluläre Infiltrationen wurden dokumentiert (Dieth et al., 1989).

Eine Heilung der FIV-Infektion ist nicht möglich. Neben der symptomatischen Therapie der Sekundärinfektionen stehen für die antivirale Chemotherapie

Medikamente aus der HIV-Therapie (AZT, Zidovudin) zur Verfügung. Viele Katzen leben jedoch viele Jahre ohne klinische Symptome, insbesondere wenn sie in keim- und stressarmer Umgebung gehalten werden (Kraft und Dürr, 1996).

SIV (simiane immunodeficiency-virus) ist ein, bei afrikanischen Schimpansen und anderen Affenarten vorkommendes Lentivirus. Das Virus besitzt eine ähnliche Struktur wie HIV und wird hauptsächlich durch Biss übertragen. HIV-1 ist dem SIV der Schimpansen genetisch ähnlicher, HIV-2 ist dem SIV der Grünen Meerkatzen genetisch ähnlicher, als es beide HIV-Typen untereinander sind. Mit Hilfe hochspezieller molekularbiologischer, statistischer und mathematischer Verfahren konnte man auf einen Übertritt eines SIV-Subtypen auf den Menschen in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts, wahrscheinlich um 1930, schließen (Med-World et al., 2003). Infizierte Tiere zeigen Diarrhoe, Gewichtsabnahme, CD4⁺ T-Zell-Zerstörung und eine erhöhte Anfälligkeit für opportunistische Infektionen (Desrosiers, 1990).

Das bovine Immundefizienz-Virus (**BIV**) besitzt antigene und morphologische Ähnlichkeiten mit HIV-1. Die Erkrankung ist weltweit verbreitet. Die Ergebnisse einer Studie an oberbayrischen Rindern erbrachte eine serologische Prävalenz von 2 - 5 % (Bartels, 2001). Bei den infizierten Rindern werden Sekundärinfektionen wie Metritis, subkutane Abszesse, purulente Arthritiden, Mastitis (Snider et al., 2003), Absinken der Milchleistung, Abmagerung, persistierende Lymphozytose und perivaskuläre Infiltrate im ZNS beobachtet. Die Bedeutung der BIV-Infektion für die Rinderpopulation ist nicht restlos geklärt.

2.8 Ziel meiner Arbeit

Bereits in der frühen, asymptomatischen Phase der HIV-Infektion, wenn im peripheren Blut nur geringe Mengen des Virus nachzuweisen sind, sind in lymphatischen Organen wie auch in der intestinalen Mukosa eine hohe Virusbelastung und -replikation zu finden (Pantaleo et al., 1993). Der Gastrointestinaltrakt ist somit als Eintrittspforte und Reservoir für HIV anzusehen. Der Verlust und die Schädigung der CD₄⁺-T-Lymphozyten, führt nicht nur zu allgemeiner Immundefizienz der HIV-infizierten Patienten, sondern auch zu einer Störung der Immunregulation an mukosalen Oberflächen, sowie zu morphologischen und funktionellen Veränderungen der intestinalen Mukosa.

Bei der HIV-Enteropathie, die eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Malabsorption und Wasting-Syndrom spielt, sind histologisch begrenzte Degenerationen bzw. Defekte des intestinalen Epithels zu beobachten. Das Sekretionsmuster bestimmter Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IFN- α , IFN- γ), die bei HIV-Patienten erhöht sind, führt bei in vitro-Versuchen zur Beeinflussung der Barrierefunktion von intestinalen Epithelzellen (HT-29/B6) (Schmitz et al., 2002). Wie sich diese Zytokine auf die Reparatur geschädigter Mukosa bei einer HIV-Enteropathie auswirken, ist jedoch nicht bekannt.

Im Rahmen meiner Arbeit sollte erstmalig der Einfluss dieser Zytokine, auf das intestinale epitheliale Restitutionsverhalten untersucht werden. Hieraus könnte man Rückschlüsse auf die mukosalen Regenerationsmechanismen bei einer HIV-Enteropathie ziehen.

Im einzelnen wurden folgende Schritte durchgeführt:

1. Etablierung eines in vitro-Restitutionsmodells an der intestinalen Epithelzelllinie HT-29/B6
2. Untersuchung des Effekts von EGF und TGF- β 1 auf die Restitution
3. Einfluss von TNF- α und IL-13 auf den Restitutionsmechanismus
4. Analyse der Restitutionsbeeinflussung durch einzelne HIV-typische Zytokine
5. Untersuchung des Effekts von TNF- α in Kombination mit IFN- γ auf die epitheliale Restitution
6. Einfluss von HIV-typischen Zytokinen auf die Restitution (TNF- α , IL-1 β , IFN- α , IFN- γ in Kombination)