

5 Diskussion

5.1 Einleitung

Die bei einer HIV-Infektion symptomatisch auftretende HIV-Enteropathie ist durch Epithelschäden der intestinalen Mukosa gekennzeichnet. Histologisch stellen sich die Veränderungen der Darmschleimhaut als Zottenatrophie, Kryptenhyperplasie mit intraepithelialen Immuzellinfiltraten und fokalen Zelldegenerationen dar. Die Epithelschäden werden durch bestimmte Wundheilungsmechanismen schnellstmöglich wieder hergestellt, um die Barrierefunktion des Epithels aufrecht zu erhalten. Den ersten Schritt stellt hierbei die Restitution - also der schnelle Wundverschluss durch Migration von benachbarten Zellen - dar. Die randständigen Zellen der Defektgrenze flachen ab, bilden pseudopodienartige Zellausläufer aus und migrieren in den Zelldefekt um die Läsion schnell abzudecken. Bei großflächigeren Wunden schließt sich eine Phase der Zellproliferation an. Zuletzt wird durch Differenzierung und Reifung der neuen Epithelzellen die Funktion des Gewebes wieder hergestellt. Verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren haben einen Einfluss auf die Proliferation sowie auf die Wundheilung von geschädigtem intestinalem Epithel.

Studien zeigen, dass eine HIV-Infektion von Immuzellen die Produktion einzelner Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, $\text{IFN-}\gamma$ und $\text{IFN-}\alpha$ stimuliert (Schmitz et al., 2002). Außerdem ist bekannt, dass $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ eine Veränderung der intestinalen Barrierefunktion bei HT-29/B6- und T-84-Epithelzellen hervorruft (Madara und Stafford, 1989; Schmitz et al., 1999). Eine HIV-Infektion regt nicht nur die Proliferation des intestinalen Epithels an (Batman et al., 1994), sondern verändert auch die intestinale Permeabilität (Kapembwa et al., 1991). Bis heute ist jedoch nicht bekannt ob diese HIV-typischen Zytokine den mukosalen Reparaturmechanismus, genauer die epitheliale Restitution von Darmzellen, beeinflussen. Diese Fragestellung sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Der erste Schritt dieser Arbeit war die Etablierung einer Methode, anhand derer der Restitutionsmechanismus beobachtet und die Migrationsgeschwindigkeit der intestinalen Epithelzellen gemessen werden konnte. Die Methode bot im zweiten Schritt dann die Möglichkeit, sowohl frische Epitheldefekte, als auch migrierende Zellen darzustellen und die Beeinflussung der Restitution unter dem Einfluss HIV-typischer Zytokine zu untersuchen.

5.2 Methodik bisheriger Restitutionsversuche

Bisherige in vitro-Restitutionsversuche unterschieden sich im wesentlichen in der Methode der Schadenssetzung. Es können hierbei drei Versuchsansätze unterschieden werden:

Dissektions-Methode:

Der von Bürk 1973 erstmals verwendete Migrations-Assay wurde von Sato und Rifkin (Sato und Rifkin, 1988) aufgegriffen und in den nachfolgenden Jahren weiter modifiziert. Bürk kultivierte seine Zellen in herkömmlichen Plastik-Petri-Schalen. Am 3. Tag nach Anzucht wurde in den konfluenten Monolayer mit Hilfe einer Rasierklinge ein Zellschaden gesetzt. Die Klinge durchschnitten den Zellrasen, markierte gleichzeitig die Schnittstelle auf dem Schalenboden und wurde dann zur Seite gezogen um die angrenzenden Zellen zu entfernen. Nach einer 24-stündigen Inkubationsphase wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Durch Auszählung der Zellkerne, die die Startlinie der Schalenmarkierung überschritten hatten, konnte die Migrationsaktivität pro Zeiteinheit bestimmt werden (Bürk, 1973).

McCormack et al. gingen bei der Defektsetzung ähnlich vor. Mit der Schneide einer Rasierklinge wurde ein Defekt in einen Zellrasen gekratzt. Die dabei entstandene ca. 27 mm lange und 7 - 10 mm breite Läsion wurde mit einem inversen Phasen-Kontrast-Mikroskop fotografiert und weitere 6 Stunden inkubiert, um dann nach Migration der Zellen abermals fotografiert zu werden. Es wurden 5 benachbarte 0,1 · 0,1 mm große Quadrate, beginnend an der Schnittlinie, mit einer 100-fachen Vergrößerung ausgezählt. So konnte die Migrationsstrecke ermittelt werden (McCormack et al., 1992).

Diese Methode wurde in den folgenden Jahren bei weiteren Restitutionsversuchen anderer Arbeitsgruppen verwendet (Ciacci et al., 1993; Dignass et al., 1994; Santos et al., 1997; Kato et al., 1999; Sturm et al., 1999).

Suktions-Methode:

Die zweite Methode wurde von der Arbeitsgruppe Nusrat et al. 1992 etabliert. Hier wurde mit Hilfe einer Mikropipette, die mittels eines Mikromanipulators bewegt wurde, ein definiert großer Epithelschaden erzeugt. Die Pipette wurde mit ihrer Spitze (Spitzendurchmesser 0,5 - 0,6 mm) soweit auf den Monolayer abgesenkt, bis sie die apikale Oberfläche der Zellen gerade berührte. Durch vorsichtiges Saugen konnte ein scheibenförmiges Zellareal aus dem Monolayer herausgelöst werden.

Anschließend wurde der Epitheldefekt mehrmals während einer 20-stündigen Inkubationsphase mit einem Phasen-Kontrast-Mikroskop fotografiert, um die Restitutionsmechanismen darzustellen (Nusrat et al., 1992).

Platzhalter-Methode:

Meyer zum Büschenfelde verwendete 2002 eine dritte Technik. Er teilte die Zellkulturschale mit Hilfe eines inliegenden Gummigitters in 4 gleichgroße Quadrate ein. Die Zellsuspension wurde zur Anzucht in die abgetrennten Quadrate gegeben und bis zur Ausbildung eines konfluenten Zellrasens einen Tag kultiviert. Danach wurde das Gummigitter aus der Kulturschale genommen und die zurückbleibenden Zellquadrate fotografiert. Die zellfreien Bereiche unter dem herausgenommenen Gitter konnten auf dem Foto ausgemessen werden. Nach einer 40-stündigen Inkubationsphase wurde der Zellrasen incl. der Migrationsareale erneut fotografiert und ausgemessen. So konnte die Restitutionsgeschwindigkeit pro Zeiteinheit bestimmt werden (Meyer zum Büschenfelde, 2002).

5.3 Methodik dieser Arbeit und Methodenkritik

Zur Defektsetzung und anschließenden Darstellung der Zellrestitution wurde in dieser Arbeit eine neue Methode entwickelt. Mit Hilfe einer Mikropipette und eines dreidimensional beweglichen Objektisches, der über einen Mikromanipulator gesteuert wurde, konnte ein definiert großes Zellstück aus einem Monolayer herausgeschnitten werden. Nach anschließender Immunfluoreszenzfärbung konnte die Zellrestitution dargestellt und die Restitutionsgeschwindigkeit errechnet werden.

HT-29/B6-Zellen wurden 7 bzw. 8 Tage auf PCF-Kulturfiltern bis zur Ausbildung eines konfluenten Monolayers angezchtet. Vor Versuchsdurchführung wurde der transepitheliale Widerstand der Zellen mit Hilfe eines Widerstandmessgerätes gemessen, um so eine Aussage über die Vitalität der Zellen zu erhalten. Obwohl sämtliche Filter einer einheitlichen Behandlung unterlagen, unterschieden sich die Zellen unterschiedlicher Passagen zum Teil deutlich in ihren Widerständen. Monolayer mit sehr niedrigen Widerständen unter $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ wurden nicht zu Restitutionsexperimenten herangezogen. Der Zellrasen wurde mit dem Filter in einen Conductance scanning-Stand eingebaut, der die Vitalität der Zellen durch konstante und temperierte Perfusion aufrecht erhielt und gleichzeitig die Möglichkeit bot, die nachfolgenden Mikromanipulationen unter mikroskopischer Kontrolle durchzuführen. Es wurde versucht, in einem annähernd einheitlichen Zeitfenster zu agieren, um die

Verweildauern (10 - 20 min) im Versuchsstand vergleichbar zu halten.

Mit Hilfe einer Mikropipette und eines über einen Mikromanipulator gesteuerten Objektives wurde zunächst ein 200 μm breites und 2000 μm langes Rechteck aus dem Zellrasen geschnitten und dann möglichst als zusammenhängendes Zellstück herausgelöst (Abb. 13). Da sich die ausgeschnittenen Zellen unterschiedlich gut von dem Filter ablösen ließen, was aber nicht mit der Vitalität bzw. den vorher gemessenen Widerständen korrelierte, kam es zu wenigen μm Differenzen in der Breite des Defektes. Aus diesem Grund wurde eine hohe n-Zahl an Experimenten angestrebt, um so den Fehler des Mittelwertes zu minimieren. Der Monolayer wurde dann entweder sofort oder nach einer weiteren 2-stündigen Inkubations- bzw. Migrationsphase fixiert und immunhistologisch gegen die Tight junction-Proteine ZO-1 und Occludin gefärbt. Anhand der computergestützten Ausmessung des zellfreien Spaltes konnte die Migrationsgeschwindigkeit der Zellen errechnet werden. Da sich die Grundgeschwindigkeit verschiedener Zellpassagen zum Teil deutlich voneinander unterschied, wurde neben jedem Zytokin-Experiment ein parallel laufendes Kontroll-Experiment durchgeführt. Zur Ermittlung der Restitutionsgeschwindigkeit wurden ausschließlich die Parallelwerte herangezogen.

Abschließend ist festzustellen, dass es gelungen ist, ein relativ aufwendig durchzuführendes, aber dafür sehr präzises *in vitro*-Restitutionsmodell zu entwickeln, welches gegenüber der bisher verwendeten Dissektions-Methode exaktere Epitheldefekte erzeugt. Die Genauigkeit der angewendeten Methode beruht insgesamt auf der optischen Auflösung während der Defektsetzung. In Vorexperimenten unserer Arbeitsgruppe konnte zudem gezeigt werden, dass sich die Migrationsgeschwindigkeit linear verhält und Defekte von 200 μm Breite nach 6 Stunden weitestgehend geschlossen waren. Im Unterschied zu anderen Methoden ist somit eine Methode verwendet worden, die ausschließlich den reinen Restitutionsprozess, also die Migration von Epithelzellen vermessen kann.

5.4 Morphologie der Restitution

Um im Verlauf der Zellrestitution die Morphologie der Zellen darstellen zu können, wurden mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops dreidimensionale Bilder der Zellläsion zum Zeitpunkt 0 und 2 Stunden erstellt. Zur besseren Darstellung der Zellgrenzen wurde das Epithel immunhistologisch angefärbt. Neben den routinemäßig durchgeführten Färbungen gegen das intrazellulär liegende Tight junction-Protein ZO-1, wurden zusätzlich einzelne Färbungen gegen das integrale

Membran-Protein Occludin verwendet. Somit konnte die Verteilung der Tight junctions an der Defektkante dargestellt werden.

Die unmittelbar nach Herauspräparieren des Epithelstreifens angefertigten Immunfluoreszenzbilder zeigen eine relativ glatte Schnittkante mit einer homogenen ZO-1- und Occludin-Verteilung an den randständigen Zellen (Abb. 15, linke Spalte). Die Größe und die Höhe der Zellen sind verhältnismäßig einheitlich und entsprechen dem polygonalen Erscheinungsbild von HT-29/B6-Zellen. Im Verlauf der Zellrestitution wurde bei jeder einzelnen randständigen Zelle das Zytoskelett umorganisiert und die Zell-Zell-Kontakte neu ausgebildet. Die wundnahen Zellen des für 2 Stunden inkubierten Epithels zeigen zum Teil ein Mehrfaches ihres Ursprungsdurchmessers, vor allem ihrer Ursprungslänge. Es ist eine schwache bis fehlende Anfärbung von ZO-1 und Occludin an den, sich in Defektrichtung ausstreckenden Zellausläufern der Randzellen zu erkennen (Abb. 15, rechte Spalte). Dies lässt den Schluss zu, dass die Tight junction einzelner randständiger Zellen noch nicht ausgebildet ist. Diese Zellen befinden sich noch in Migration und haben Lamellipodien (pseudopodienartige Zellausläufer) ausgebildet, die keinen Kontakt zu Nachbarzellen besitzen.

Nach neueren Erkenntnissen erfolgt die Tight junction-Formierung nach einem Zwei-Phasen-Modell (Abb. 30) (Rajasekaran und Rajasekaran, 2003). Der erste Schritt ist von der Zell-Zell-Adhäsionsfunktion des E-Cadherins abhängig. Das zur Bildung von Zell-Zell-Verbindungen benötigte E-Cadherin, wird in Transportvesikeln an die Zellmembran transportiert und ist indirekt mit ZO-1 assoziiert, welches so ebenfalls zur Zellmembran gelangt (Rajasekaran et al., 1996). Hier bildet ZO-1, assoziiert mit dem Aktinzytoskelett, Occludin und Claudin, diskontinuierliche Tight junction-Stränge aus. Im weiteren Verlauf kommt es zur Ausbildung eines um den apikalen Zellpol verlaufenden Aktinrings. Durch die schon bestehende E-Cadherin vermittelte Zell-Zell-Verbindung kann sich die Adherens junction ebenfalls neu ausbilden. Eine Inhibition des Zell-Zell-Kontaktes durch E-Cadherin-Antikörper, blockiert die Translokation von ZO-1 zur Plasmamembran (Gumbiner et al., 1988). Im zweiten Schritt der Tight junction-Formierung erfolgt eine Polymerisation von Aktinfilamenten. Hierbei werden globuläre G-Aktin-Moleküle zu perlschnurartigen Ketten von filamentärem F-Aktin aneinandergereiht. Es kommt zur Bildung langer Aktinbündel, den sogenannten stress fibers, die die bisher nur diskontinuierlich ausgebildeten Tight junction-Stränge an der apikolateralen Membranfläche ausrichten und komplettieren. Somit wird die gürtelförmige Tight junction ausgebildet (Rajasekaran und Rajasekaran, 2003).

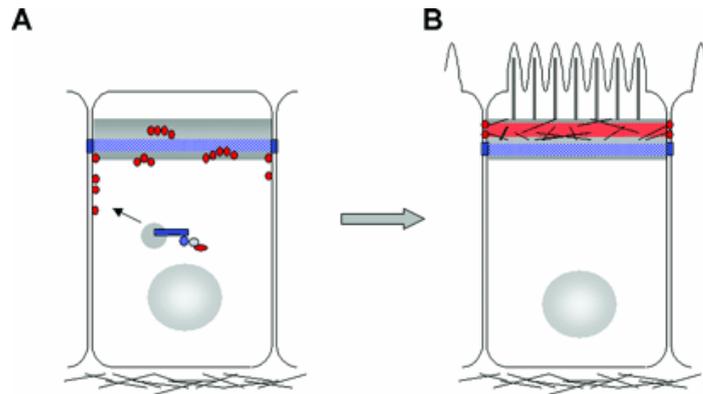


Abb. 30: Tight junction-Aufbau

Das Schema zeigt ein Zwei-Phasen-Modell der Tight junction-Formierung in Epithelzellen.

A: Die Tight junction-Proteine werden vom Zytoplasma zur Plasmamembran transportiert und bilden dort partielle Tight junction-Stränge (rot) aus. Es kommt zur Ausbildung eines ringsum verlaufenden Aktinrings (grau) und der Adhärenz junction (blau).

B: Durch eine gerichtete Polymerisation von langen Aktinbündeln, den sogenannten stress fibers (schwarz), werden die einzelnen Tight junction-Stränge an der apikolateralen Membranfläche ausgerichtet und bilden die gürtelförmige Tight junction (rot) aus.

(Entnommen aus: Rajasekaran et al., 2003)

Vor allem in den Aufsichtsbildern (Abb. 15, rechte Spalte) ist das Fehlen bzw. die diskontinuierliche Anfärbung der Tight junction-Proteine ZO-1 und Occludin während der Zellrestitution zu erkennen. Die ehemalige gerade Schnittkante erscheint durch die Lamellipodienausbildung unregelmäßig. Da die Lamellipodien der migrierenden Zellen keinen Kontakt zu Nachbarzellen besitzen, kann sich demzufolge keine Verbindung im Bereich der Adhärenz junction und nachfolgend keine Tight junction ausbilden.

Die Seitenansicht des Zelldefektes nach 2-stündiger Inkubation zeigt eine Abflachung der randständigen Epithelzellen und die Ausbildung von Lamellipodien. Dass es bei der Migration von Zellen zur Ausbildung von Lamellipodien kommt, wurde bereits von einigen Autoren beschrieben (Lacy, 1988; Nusrat et al., 1992; Heath, 1996; Sheetz et al., 1999; Lotz et al., 2000).

Sheetz et al. teilen die Zellmigration unter lichtmikroskopischen Gesichtspunkten in einem Fünf-Stufen-Modell (Abb. 31) ein:

- 1) Die vordere Zellmembran streckt sich und bildet Lamellipodien aus;
- 2) es folgt eine Anheftung der Integrine (Adhäsionsrezeptoren der Zellmembran) an neue Kontaktpunkte der ECM (Extrazelluläre Matrix);
- 3) durch den dynamischen Auf- und Abbau von Aktin wird das Zytoplasma kontrahiert;
- 4) die Adhärenzverbindungen am hinteren Teil der Zelle lösen sich;
- 5) Integrine der abgelösten Adhärenzverbindungen

werden recycled und vom hinteren Teil der Zelle zur vorderen Zellmembran transportiert, um dort in neue Adhärenzverbindungen eingebaut zu werden (Sheetz et al., 1999).

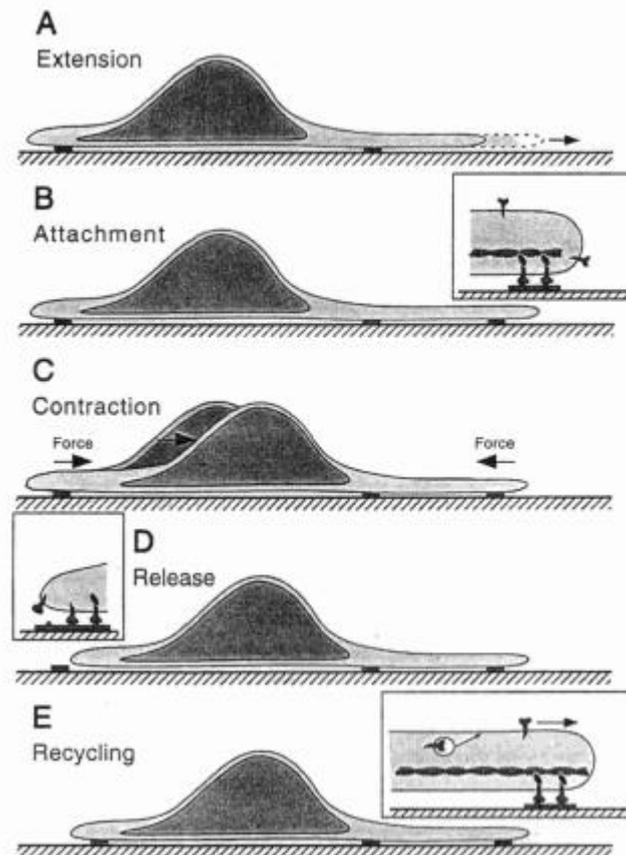


Abb. 31: Zellmigration als Fünf-Stufen-Modell

A: Extension (Ausdehnung): Während des ersten Schritts der Zellmigration werden in Migrationsrichtung Lamellipodien ausgebildet. Diese Ausbildung erfolgt durch eine gerichtete Formierung von Aktinfilamenten, welche einen genügend großen Druck aufbauen, um die Oberflächenspannungskraft der Plasmamembran zu überwinden. Hierbei polymerisieren am Außensaum des Lamellipodiums globuläre G-Aktin-Moleküle zu perlschnurartigen Ketten von filamentärem F-Aktin.

B: Attachment (Anlagerung): Die Anheftung der Integrine (Adhärenzrezeptoren der Membran) wird durch die freie ECM (Extrazelluläre Matrix) initiiert.

C: Contraction (Kontraktion): Durch einen dynamischen Auf- und Abbau des Aktins wird das Zytoplasma von beiden Seiten her kontrahiert, um den Nukleus zu dislozieren.

D: Release (Ablösung): Sobald sich die Adhärenzverbindungen der hinteren Zellmembran lösen, wandert die Zelle in Migrationsrichtung voran.

E: Recycling (Wiederverwertung): Durch Endozytose und vesikulären Transport werden die Integrine zur vorderen Membranoberfläche transportiert.

(Entnommen aus: Sheetz, 1999)

5.5 EGF, TGF- β 1, TNF- α und IL-13 im Restitutionsmodell

Im ersten Versuchsabschnitt wurden einige Zytokine, die bereits zum Teil von verschiedenen Arbeitsgruppen in Restitutionsversuchen beschrieben wurden, im neu entwickelten Restitutionsmodell getestet.

Leider können die Ergebnisse meiner Arbeit nur bedingt mit den meisten der schon in der Literatur beschriebenen Restitutionsergebnissen verglichen werden, da fast alle Angaben zu Zytokinkonzentrationen in der Literatur in ng/ml vorliegen. Da jedoch ausschließlich die biologische Aktivität der Stoffe relevant ist und nicht deren Masse, werden die von mir verwendeten Zytokinkonzentrationen in U/ml angegeben, um sie vergleichbar zu beschreiben. Die Konzentrationsangaben werden im Folgenden entsprechend umgerechnet.

Aus der Literatur ist bekannt, dass sich **EGF** und **TGF- β 1** positiv auf das Wundheilungsgeschehen, speziell auf die Restitution von intestinalen und cornealen Epithelzellen auswirken.

Kato et al. fanden durch das Restitutionsmodell, das mit Hilfe der Dissektions-Methode arbeitet heraus, dass der epidermale Wachstumsfaktor EGF in einer Konzentration von 1 nM (entspricht 6 ng/ml) zu einer beschleunigten Zellmigration führt (Kato et al., 1999). Die Arbeitsgruppe Dignass et al., die die gleiche Technik verwendete, inkubierte einen IEC-6-Monolayer mit einer EGF-Zytokinkonzentration von 10 - 250 ng/ml. Dies erhöhte die Restitution des verwundeten Monolayers konzentrationsabhängig bis zu einem Faktor von 4,6 (Dignass und Podolsky, 1993). Die in meiner Arbeit verwendete EGF-Konzentration lag bei 20 nM (entspricht 120 ng/ml oder $1,24 \cdot 10^3$ U/ml). Nach einer 24-stündigen Vorinkubation mit EGF wurde die Migration von HT-29/B6-Zellen deutlich um 85 % gesteigert. Die Restitutionssteigerung war deutlich geringer als bei Dignass et al., was auf die Verwendung unterschiedlicher Versuchszelllinien zurückzuführen sein könnte. Dignass et al. zeigten weiter, dass in einem verletzten Monolayer eine erhöhte EGF-Konzentration zu einer stimulierten Produktion von TGF- β 1 führt. Die beschleunigte Zellmigration der HT-29/B6-Zellen könnte somit das Ergebnis einer erhöhten TGF β 1-Konzentration sein, die im nachfolgenden Versuch direkt untersucht wurde. Hierfür wurden die Zellen mit einer Inkubationskonzentration von 2 ng/ml (entspricht 40 U/ml) TGF- β 1 behandelt. Im Restitutionsmodell konnte eine um 29 % beschleunigte Migration der intestinalen Epithelzellen festgestellt werden.

Dignass et al. zeigten durch in vitro-Studien an IEC-6-Monolayern, dass es bei einer

Verletzung zur Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (TGF- α , EGF, IL-1 β , und IFN- γ) kommt, die die Produktion von TGF- β 1 erhöhen und so zu einer Beschleunigung der Zellrestitution führen (Dignass und Podolsky, 1993). Der im Überstand gemessene TGF- β 1-Spiegel lag dabei zwischen 1 - 6 ng/ml. Die Inhibition von TGF- β 1 führte, trotz erhöhter Konzentration der oben aufgeführten migrationsfördernden Zytokine, zu einer verzögerten Zellmigration (Dignass und Podolsky, 1993; Yanaka et al., 1996). TGF- β 1 ist als Schlüsselfaktor der epithelialen Wundheilung anzusehen. Kato et al. konnten im Gegensatz dazu nachweisen, dass TGF- β 1 in Konzentrationen von 10 - 100 pM die Restitution von Primärkulturzellen aus der Magenmukosa des Hundes um 20 - 40 % inhibiert (Kato et al., 1999).

Die bei HIV-Patienten nachweislich im Serum und in der Darmmukosa gesteigerte Konzentration des proinflammatorischen Zytokins **TNF- α** , wurde in verschiedenen Restitutionsmodellen getestet. Die Ergebnisse der Migrations-Assays sind konzentrations- und zelllinienabhängig. Corredor et al. untersuchten die Regulation des rezeptor-abhängigen Migrationsmechanismus an einem Kolon- und Dünndarmzelllinien-Modell der Maus. Sie fanden heraus, dass bei einer physiologischen TNF- α -Konzentration von 1 ng/ml die Zellmigration durch den TNF-Rezeptor 2 (p75) erhöht ist, während es andererseits bei pathologischen Werten von 100 ng/ml durch den TNF-Rezeptor 1 (p55) zu einer Inhibierung der Wundheilung kommt (Corredor et al., 2003). Diese Beobachtung deckt sich nicht mit den Versuchsergebnissen von Kato et al., welche bei einer physiologischen Konzentration von 5 U/ml TNF- α eine inhibierte epitheliale Migration von Primärzellen der caninen Magenmukosa feststellten (Kato et al., 1999). Es ist zu vermuten, dass TNF-Rezeptoren zelllinienabhängig verschiedene Bindungsaffinitäten aufweisen, oder die prozentuale Verteilung beider Rezeptoren in unterschiedlichen Zelllinien verschieden ist. Deshalb könnte die Vergleichbarkeit verschiedener Restitutionsmodelle nur bedingt gegeben sein. Florian et al. fanden heraus, dass die Einzelzell-Restitution von HT-29/B6-Zellen durch Zugabe von 100 ng/ml TNF- α verzögert wird (Florian et al., 2001), was mit der Aussage von Corredor et al. übereinstimmt, da hier zu vermuten ist, dass die pathophysiologische TNF- α -Konzentration durch den TNF-Rezeptor 1 zu einer Inhibierung führt. TNF- α löste jedoch am Kolonepithel der Maus bei gleicher Konzentration keine Restitutionsveränderung aus (Florian et al., 2001; Florian, 2002). Die Arbeitsgruppe Dignass et al. konnte bei Versuchen mit einer TNF- α -Konzentration

von 100-1000 U/ml an der intestinalen Zelllinie-6 ebenfalls keine Veränderungen der Zellmigration feststellen (Dignass und Podolsky, 1993). Dignass et al. fanden heraus, dass verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren (TGF- α , EGF, IL-1 β und IFN- γ) die Migration der Zellen durch eine erhöhte Produktion von TGF- β 1 beschleunigen, was aber bei TNF- α nicht festgestellt werden konnte. TNF- α ist mit IL-6 und PDGF ein Zytokin, das keinen Einfluss auf die Expression von TGF- β 1 besitzt.

In meiner Arbeit wurde eine TNF- α -Konzentration von 10000 U/ml (entspricht 100 ng/ml) zur Vorinkubation von HT-29/B6-Zellen verwendet. Bei dieser pathophysiologischen TNF- α -Konzentration konnte keine signifikante Veränderung der Restitutionsgeschwindigkeit festgestellt werden. Warum die Ergebnisse der Restitutionsversuche mit TNF- α zelllinien- und konzentrationsabhängig sind, lässt sich nicht abschließend beantworten. Die durch Schmitz et al. 2002 ermittelte niedrige Konzentration von TNF- α (300 U/ml) im Überstand von HIV-infizierten Immunzellen, wurde aufgrund dieses Versuchsergebnisses, nur in Kombination mit IFN- γ untersucht, da IFN- γ zu einer stimulierten Synthese des TNF- α -Rezeptors führt (Aggarwal und Eessalu, 1987).

Nachfolgend wurde die Restitution von intestinalen Epithelzellen unter dem Einfluss des proinflammatorischen Zytokins **IL-13** betrachtet. HT-29/B6-Zellen wurden mit IL-13 in einer Konzentration von 10 ng/ml für 48 Stunden vorinkubiert. Die Restitutionsgeschwindigkeit der Zellen wurde gegenüber den Kontrollzellen um 29 % erniedrigt.

Ahdieh et al. untersuchten die Funktion der epithelialen Lungenbarriere unter dem Einfluss von IL-13. Durch elektrophysiologische Messungen stellten sie fest, dass die epitheliale Barrierefunktion von Calu-3 (humanen Lungenepithel)-Zellen durch die Applikation von 5 ng/ml IL-13 reversibel gesenkt wird. Es konnte ebenfalls eine verminderte Zellmigrationsgeschwindigkeit gemessen werden. Nachfolgende Analysen der Tight junction-assoziierten Proteine ZO-1 und Occludin zeigten eine Reduktion der Expression von ZO-1 und eine schwache Verminderung der Occludin-expression im Vergleich zu Kontrollen (Ahdieh et al., 2001). Die in der vorliegenden Arbeit durch IL-13 gesenkte Restitutionsgeschwindigkeit könnte auf eine blockierte Tight junction-Formierung zurückzuführen sein. Die Expression einzelner Tight junction-Proteine der migrierenden Zellen wird vermutlich durch IL-13 gehemmt. Vergleichbare Ergebnisse erhielten Ceponis et al.. Bei einer Inkubation von T84-

Zellen mit IL-13 in einer Konzentration von 1 - 100 ng/ml kam es zu einem Abfall des transepithelialen Widerstandes (Ceponis et al., 2000). Die Tight junction, die mit der apikalen Zellmembran die transepitheliale Barriere bildet, wird durch Zugabe von IL-13 in ihrer Morphologie und Funktion so verändert, dass die Barrierefunktion nicht mehr aufrecht erhalten werden kann.

Die Ergebnisse der ersten Versuche bestätigen das Konzept des neu entwickelten Restitutionsmodells und dessen Vergleichbarkeit zu bereits existierenden Modellen. Im zweiten Teil der Arbeit werden nun die Effekte von HIV-typischen Zytokinen auf die epitheliale Restitution untersucht.

5.6 HIV-typische Zytokine im Restitutionsmodell

Im Hinblick auf das Krankheitsbild der HIV-Enteropathie wurden in der Vergangenheit Untersuchungen zu einigen regulatorisch wirkenden Zytokinen durchgeführt.

Im Serum von HIV-infizierten Patienten konnten 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).

In vitro-Versuche mit HIV-infizierten Makrophagen (MDM, von Monozyten abstammende Makrophagen), kokultiviert mit mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC), zeigen eine stimulierte Sekretion von TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IFN- α (Schmitz et al., 2002). Ausgehend von den durch Schmitz et al. ermittelten Zytokin-konzentrationen wurden diese HIV-typischen Zytokine im Restitutionsmodell getestet.

5.6.1 Kombination von TNF- α und IFN- γ

In der vorliegenden Arbeit wurden HT-29/B6-Zellen mit einer TNF- α -Konzentration von 300 U/ml und einer IFN- γ -Konzentration von 6 U/ml vorinkubiert (Schmitz et al., 2002). Die Monolayer durchliefen, wie oben bereits beschrieben, das Restitutions-experiment. Die Restitutionsgeschwindigkeit der Zellen wurde durch die Zytokin-kombination um 16 % beschleunigt.

Durch Proliferationsversuche mit HT-29-Zellen fanden Ruggiero et al. 1986 heraus, dass bei einer TNF- α -Gabe das Zellwachstum gering erniedrigt ist. Bei alleiniger

Verabreichung von IFN- γ ist der inhibierende Effekt deutlich ausgeprägter. Die Hemmung der Proliferation ist am stärksten, wenn beide Zytokine zusammen appliziert werden. Dies könnte auf die durch IFN- γ stimulierte Synthese von TNF- α -Rezeptoren zurückzuführen sein (Aggarwal et al., 1985; Ruggiero et al., 1986). Eine stimulierte Synthese des TNF- α -Rezeptors kann in der vorliegenden Arbeit nicht ausgeschlossen werden. Es wurde bereits gezeigt, dass die Restitution größerer Zelldefekte bei HT-29/B6-Zellen durch eine hohe TNF- α -Applikation von 10000 U/ml (100 ng/ml) nicht signifikant beeinflusst wird. Es ist jedoch möglich, dass es, wie bereits von Corredor et al. beschrieben, unter dem Einfluss der geringen TNF- α -Konzentration über einen TNF-Rezeptor 2 (p75) vermittelten Weg zu einer beschleunigten Zellrestitution kam. Dignass et al. verwendeten in ihrem Restitutions-Assay IFN- γ -Dosen von 10 - 1000 U/ml, welche bei IEC-6-Zellen, ab einer Konzentration von 10 U/ml, zu einer konzentrationsabhängigen Migrationsbeschleunigung führten, die auf eine erhöhte TGF- β 1-Expression zurückzuführen waren (Dignass und Podolsky, 1993). In der vorliegenden Arbeit wird im Folgenden gezeigt, dass bei alleiniger Applikation von IFN- γ in einer Konzentration von 6 U/ml die Geschwindigkeit der Restitution unverändert blieb. Es könnte jedoch vermutet werden, dass durch einen Zytokinsynergismus von TNF- α und IFN- γ die TGF- β 1-Expression erhöht wurde, was nachfolgend zu einer Restitutionsbeschleunigung geführt haben könnte. Im Gegensatz dazu stehen Untersuchungen von Einzelzellschäden am Kolonepithel der Maus. Der Restitutionsmechanismus am nativen Gewebe läuft hauptsächlich über einen purse string-Mechanismus und weniger über eine Migration von Zellen ab. Durch Vorinkubation mit TNF- α (100 ng/ml) und IFN- γ (1000 U/ml) wird die Einzelzellrestitution, d. h. der purse string-Mechanismus, am nativen Kolonepithel gehemmt (Florian et al., 2001; Florian, 2002).

Rival et al. konnten eine verminderte Transmigration von Leukozyten im Endothelzell-Monolayer nach 24-stündiger Inkubation der Zytokinkombination TNF- α und IFN- γ beobachten (Rival et al., 1996). Dies ist auf die verminderte Synthese von Adhäsionsmolekülen an der Zellmembran, speziell dem von Thrombozyten abstammenden endothelialen Zell-Adhäsions-Molekül-1, zurückzuführen. Ähnliche Beobachtungen machten auch Ozaki et al.. Sie fanden heraus, dass es bei Endothelzellen nach Applikation von TNF- α und IFN- γ zu einer Umverteilung des Tight junction-Proteins JAM kommt, was nachfolgend die transendotheliale Migration von Leukozyten herabsetzt (Ozaki et al., 1999).

5.6.2 IFN- γ

IFN- γ stellt ein weiteres HIV-typisches Zytokin dar. In Darmbiopsaten von HIV-infizierten Patienten konnten erhöhte Konzentrationen des Zytokins nachgewiesen werden (McGowan et al., 1994). In dem nun folgenden Versuch wird die von Schmitz et al. ermittelte IFN- γ -Konzentration von 6 U/ml (entspricht 3 ng/ml) zur Vorinkubation bei HT-29/B6-Zellen verwendet. Die vergleichsweise niedrige Zytokinkonzentration nimmt keinen signifikanten Einfluss auf die Restitutionsgeschwindigkeit der intestinalen Epithelzellen. Ähnliche als auch höhere Konzentrationen wurden von Kato et al. in in vitro-Migrationsversuchen eingesetzt. Auch hier zeigten Konzentrationen von 5 - 100 U/ml keinen Effekt auf die Geschwindigkeit, mit der sich die Zellen fortbewegten (Kato et al., 1999). Im Gegensatz dazu verwendeten Dignass et al. IFN- γ -Dosen von 10 - 1000 U/ml, welche bei IEC-6-Zellen, ab einer Konzentration von 10 U/ml, zu einer konzentrationsabhängigen Migrationsbeschleunigung führten, die, wie oben bereits erwähnt, auf eine erhöhte TGF- β 1-Expression zurückzuführen ist. IFN- γ -Konzentrationen von 1000 U/ml beschleunigten die Migration bis zu einem Faktor von 3,8 (Dignass und Podolsky, 1993). Dass IFN- γ in der vorliegenden Arbeit keine Veränderung der Restitutionsgeschwindigkeit ausübte, lag vermutlich an der mit 6 U/ml vergleichsweise niedrigen Zytokinkonzentration. Wie bereits beschrieben, beschleunigt IFN- γ in Kombination mit TNF- α appliziert die Restitution, was auf eine erhöhte TGF- β 1-Expression zurückzuführen sein könnte. Neueste Studien belegen, dass IFN- γ in Kombination mit IL-2 die Reparaturaktivität von Lungenepithelzellen durch eine bis zu 5-fach gesteigerte Zellmigration antreiben kann (Lesur et al., 2003). Durch in vitro-Versuche mit intestinalen Kryptenzellen (IEC-6), die mit mononukleären Zellen des peripheren Blutes kokultiviert wurden, fand man heraus, dass die intestinale epitheliale Restitution unter Einfluss von IFN- γ gesteigert wird. Diese Aussage ließ sich durch die Zugabe von Anti-IFN- γ (10 μ g/ml), welches die Migration der Zellen blockierte, bestätigen (Cario et al., 1999). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Ahdieh et al., die IFN- γ im Hinblick auf die Wundheilungsgeschwindigkeit von Calu-3-Lungenepithelzellen hin untersuchten. Sie inkubierten die Monolayer 72 Stunden mit einer Konzentration von 50 ng/ml. Sowohl die Barrierefunktion als auch die Migrationsgeschwindigkeit der Zellen wurden durch IFN- γ erhöht, was durch weitere Untersuchungen widersprüchlich erscheint, da die Expression von ZO-1 und Occludin der Tight junction so stark herabgesetzt wurde, dass sie nicht mehr detektiert werden konnten (Ahdieh et al., 2001). Einen

verminderten ZO-1-Einbau in die Tight junction nach Inkubation mit IFN- γ stellten Youakim und Ahdieh in intestinalen Epithelzellen (T84) fest. Diese Tatsache und eine Veränderung der Aktinanordnung in der apikalen Zellmembran führt bei T84-Monolayern zu einem Abfall des transepithelialen Widerstandes (Youakim und Ahdieh, 1999).

5.6.3 IFN- α

In der vorliegenden Arbeit wird IFN- α erstmalig in einem Restitutionsmodell beschrieben. HT-29/B6-Zellen wurden mit einer Zytokinkonzentration von 75 U/ml vorinkubiert (Schmitz et al., 2002). Es konnte keine signifikante Veränderung der Restitutionsgeschwindigkeit gegenüber den Kontrollzellen beobachtet werden.

Durch in vivo-Versuche an Mäusen fanden Stout et al. heraus, dass es nach einer subkutanen Injektion mit IFN- α zu einer verzögerten Wundheilung kommt. Histologische Untersuchungen zeigten eine gestörte Kapillareinsprossung ins geschädigte Gewebe und eine geringgradig erniedrigte Fibroblastenproliferation und Epithelzellwanderung über die Inzision hinaus (Stout et al., 1993). Weiterhin ist bekannt, dass HIV-infizierte Immunzellen durch eine stimulierte Sekretion von TNF- α , IL-1 β , IFN- γ und INF- α , 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 kann (Schmitz et al., 2002). Bei HIV-infizierten Patienten konnten sowohl verminderte als auch erhöhte IFN- α -Spiegel nachgewiesen werden (Voth et al., 1990; Grunfeld et al., 1991; von Sydow et al., 1991). Durch in vitro-Versuche mit HIV-infizierten T-Zellen bzw. Monozyten ist bekannt, dass es nach einer IFN- α -Vorbehandlung zu einer erniedrigten bzw. nicht detektierbaren Aktivität der reversen Transkriptase kommt (Gendelman et al., 1990). Bei chronisch infizierten Zellen kommt es unter dem Einfluss von IFN- α zu einer verminderten Ausschleusung von neuen Virionen aus der Plasmamembran (Poli et al., 1989). Somit ist IFN- α als potentieller Inhibitor der HIV-Replikation anzusehen.

5.6.4 IL-1 β

IL-1 β zählt 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 Kolon von Morbus Crohn-Patienten ist

erhöht, wobei zwischen den stark entzündlichen und den histologisch unauffälligen Bereichen des Darms keine statistischen Unterschiede in der Zytokinkonzentration zu erkennen sind (Sher et al., 1995). Ebenfalls wurden in Darmbiopsaten von HIV-infizierten Patienten erhöhte IL-1 β -Spiegel nachgewiesen (Kotler et al., 1993; McGowan et al., 1994). Durch in vitro-Untersuchungen an Kaninchen-Ileum, dem serosal rekombinantes humanes IL-1 β appliziert wurde, konnte eine verminderte Kalium- und Chloridresorption beobachtet werden (Chiossone et al., 1990).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von IL-1 β auf die intestinale Restitution von HT-29/B6-Zellen untersucht. IL-1 β zeigte einen positiven Effekt auf die Wiederherstellung des geschädigten Monolayers, indem es die Restitutionsgeschwindigkeit der Zellen um 23 % steigerte. Dies trat bei einer IL-1 β -Konzentration von 150 U/ml (entspricht 15 ng/ml) auf.

Dignass et al. verwendeten im bereits mehrfach angeführten Restitutionsmodell IL-1 β -Konzentrationen von 10 - 1000 pg/ml, mit denen IEC-6-Zellen für 24 Stunden vorinkubiert wurden. Sie konnten eine konzentrationsabhängige Migrationsbeschleunigung der Zellen bis zur 4-fachen Kontrollgeschwindigkeit feststellen. Dieser Effekt von IL-1 β ist auf die gesteigerte Produktion von TGF- β 1 im verwundeten IEC-6-Monolayer zurückzuführen. Um die funktionelle Relevanz des erhöhten TGF- β 1-Levels zu bestätigen, wurden dem Monolayer neutralisierende TGF- β 1-Antikörper zugegeben. Die Migration der Zellen wurde hierdurch bis auf die Geschwindigkeit der Kontrollzellen gesenkt (Dignass und Podolsky, 1993). Migrationsversuche mit IL-1 β wurden ebenfalls von der Arbeitsgruppe Kato et al. durchgeführt. Durch in vitro-Experimente mit Primärkulturen von Salzsäure-produzierenden Zellen der caninen Magenmukosa, die mit IL-1 β -Konzentrationen von 1 - 50 U/ml für 24 Stunden vorinkubiert wurden, konnte eine Beschleunigung der Zellmigration nachgewiesen werden. Eine anschließende Applikation von 20 nM MAb-528, einem monoklonalen Antikörper gegen den EGF-Rezeptor, blockierte die durch IL-1 β stimulierte Migration völlig. Diese Beobachtung lässt daraus schließen, dass der durch IL-1 β hervorgerufene Migrationseffekt EGF-Rezeptor-vermittelt gesteuert wird (Kato et al., 1999).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete IL-1 β -Konzentration von 150 U/ml (15 ng/ml) stellt ein Vielfaches der Konzentration dar, die in der Literatur als positiv wirkend beschrieben wurde. Es ist wahrscheinlich, dass IL-1 β indirekt durch eine erhöhte Produktion von TGF- β 1 zu einer Migrationsbeschleunigung führt.

5.6.5 Kombination von HIV-typischen Zytokinen

Im Anschluss an die Einzelzytokinuntersuchungen wurden HIV -typische Zytokine in Kombination getestet. HT-29/B6-Zellen wurden mit 300 U/ml TNF- α , 150 U/ml IL-1 β , 6 U/ml IFN- γ und 75 U/ml IFN- α für 24 Stunden vorinkubiert, um nach Defektsetzung eine Aussage über die Migrationsgeschwindigkeit der Epithelzellen treffen zu können.

Aus labortechnischen Gründen wurden zwei zeitlich voneinander getrennte Versuche durchgeführt. Die beiden Zellpassagen (29. und 30.) derselben Zelllinie, zeigten bei den Kontrollmonolayern unterschiedliche Grundgeschwindigkeiten der Zellmigration. Deshalb wurden beide Versuchsergebnisse getrennt voneinander betrachtet. Durch eine Varianzanalyse der beiden Versuche konnte eine Wechselwirkung der Zellpassagen und der Restitutionsgeschwindigkeit jedoch ausgeschlossen werden (Tab. 4 im Anhang).

Im ersten Versuchsansatz (29. Passage) zeigten HT-29/B6-Kontrollzellen eine Restitutionsgeschwindigkeit von 6,3 $\mu\text{m}/\text{h}$. Die mit HIV -typischen Zytokinen behandelten Zellen wiesen eine Geschwindigkeit von 10,1 $\mu\text{m}/\text{h}$ auf. HIV -typische Zytokine führten bei der 29. Zellpassage zu einer deutlichen Beschleunigung der Restitution um 61 %.

Die Epithelzellen der 30. Passage zeigten allgemein eine höhere Restitutionsgeschwindigkeit. Sie lag bei den Kontrollzellen bei 11,5 $\mu\text{m}/\text{h}$, was im Vergleich zu den mit Zytokinen behandelten Zellen, die eine Geschwindigkeit von 13,4 $\mu\text{m}/\text{h}$ aufwiesen, eine Steigerung um 16 % erbrachte.

Der beschleunigende Effekt des „HIV-Cocktails“ ist wahrscheinlich auf die vergleichsweise hohe Konzentration von IL-1 β zurückzuführen, welche ebenfalls im Einzelzytokinexperiment eine Restitutionsbeschleunigung hervorrief. Es ist nicht auszuschließen, dass sich, ähnlich wie bei TNF- α in Kombination mit IFN- γ , zwischen den einzelnen Zytokinen weitere Vernetzungen von Signalkaskaden bilden, die zu einer synergistischen Wirkungsvermittlung führen und so als Gesamtergebnis ebenfalls eine Restitutionsbeschleunigung hervorrufen. Dies könnte durch eine gezielte Ausschaltung einzelner Zytokine mit Hilfe von neutralisierenden Antikörper verifiziert werden. Da dieser Aspekt in die Fragestellung der vorliegenden Arbeit aus Gründen des Umfangs nicht einbezogen werden konnte, sollte dieser Gesichtspunkt in weiterführenden Studien betrachtet werden (Abschnitt 5.8).

5.7 Bedeutung der Ergebnisse für das Krankheitsbild der HIV-Enteropathie

Bei der HIV-Enteropathie, die eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Malabsorption und Wasting-Syndrom spielt, sind histologisch begrenzte Zelldegenerationen vor allem an der Kryptenbasis des Darmepithels zu beobachten. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Kombination von HIV-typischen Zytokinen (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IFN- α) in vitro die intestinale epitheliale Restitution von HT-29/B6-Zellen beschleunigt. Dieses Ergebnis könnte vermuten lassen, dass die Regenerationsmechanismen von Epithelschäden in vivo, die bei einer HIV-Enteropathie auftreten, ebenfalls positiv beeinflusst werden. Es muss hierbei jedoch beachtet werden, dass sich das Restitutionsverhalten von nativem Darmgewebe anders verhalten kann, als die Wundheilungsmechanismen von Zelllinien, wie dies von Florian et al. am Beispiel der TNF- α -Applikation gezeigt wurde (Florian et al., 2001). Die Restitution von Einzelzell-Läsionen an HT-29/B6-Zellen wird durch Zugabe von TNF- α (100 ng/ml) inhibiert. Im Gegensatz dazu löst TNF- α in der gleichen Konzentration bei Einzelzell-Läsionen am Kolonepithel von Mäusen keine Restitutionsveränderung aus (Florian et al., 2001). Aus diesem Grunde sind anzuschließende Studien vorstellbar, die die bisher erhobenen Daten im Sinne der pathophysiologischen Bedeutung an nativem Darmgewebe vervollständigen.

5.8 Ausblick auf anzuschließende Studien

Verifizierung der einzelnen Zytokine

In der vorliegenden Arbeit konnte eine positive Beeinflussung von HIV-typischen Zytokinen in Kombination auf die Restitution von HT-29/B6-Zellen nachgewiesen werden. Dass diese Wirkung auf die Anwesenheit und vergleichsweise hohe Konzentration von IL-1 β zurückzuführen ist, könnte nur durch dessen „Ausschaltung“, entweder durch Herausnahme von IL-1 β aus der Zytokinkombination oder mit Hilfe neutralisierender Antikörper, überprüft werden. Um einen möglichen Synergismus verschiedener Einzelzytokine genauer verifizieren zu können, wäre eine entsprechende Antikörperapplikation, sowohl einzeln (Anti-TNF- α , Anti-IFN- γ , Anti-IFN- α , Anti-IL-1 β) als auch in verschiedenen Kombinationen sinnvoll. Ebenso könnte mit einem Antikörper gegen TGF- β 1 überprüft werden, ob IL-1 β auf dem Wege einer erhöhten TGF- β 1-Expression zu einer Restitutionsbeschleunigung führt.

Untersuchung von Einzelzelldefekten

Im Darm von HIV-infizierten Patienten, speziell bei Patienten mit einer HIV-Enteropathie, kommt es neben größeren Mukosaläsionen auch zu Defekten einzelner Zellen. Die Restitutionsmechanismen von Einzelzelldefekten und auch deren Beeinflussung durch Zytokine sind von denen der größeren Epithelläsionen zu unterscheiden. Dies wird am Beispiel des TNF- α -Effekts auf die epitheliale Restitution deutlich. In der vorliegenden Arbeit konnte an HT-29/B6-Zellen bei größeren Zelldefekten keine Restitutionsbeeinflussung festgestellt werden. Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung, dass bei Einzelzell-Läsionen durch die gleiche Konzentration an TNF- α die Restitution gehemmt wurde (Florian et al., 2001). Bei Einzelzelldefekten reicht der purse string-Mechanismus aus, um die Wunde wieder zu verschließen; bei größeren Läsionen wird hauptsächlich die Zellmigration zur Defektabdeckung genutzt. Eine nachfolgende Untersuchung des Einflusses von HIV-typischen Zytokinen auf die Einzelzellrestitution wird in einer weiterführenden Arbeit angestrebt.

Nativer Überstand von Immunzellen

In der vorliegenden Arbeit kamen im Versuchsansatz ausschließlich rekombinante humane Zytokine zum Einsatz, deren Konzentrationen in vorangegangenen Untersuchungen im nativen Überstand von HIV-infizierten Immunzellen ermittelt wurden (Schmitz et al., 2002). Im nativen Überstand von HIV-infizierten Immunzellen können sich gleichwohl noch eine Reihe von verschiedenen Botenstoffen befinden, wie Chemokine, weitere Zytokine und Wachstumsfaktoren, deren Konzentrationen jedoch unter der Nachweisgrenze liegen und ebenfalls einen Einfluss auf die Restitution von intestinalem Epithelgewebe ausüben können. Aus diesem Grund sollte der gesamte Überstand der HIV-infizierten Immunzellen, nicht nur HIV-typische Zytokine, im Restitutionsmodell getestet werden.

Natives Darmepithel

Der Restitutionsmechanismus von nativem Darmepithel kann sich, im Gegensatz zu Zelllinien, völlig anders darstellen. Es wurden beispielsweise HT-29/B6-Zellen und parallel dazu Kolonepithelien der Maus mit TNF- α inkubiert. Die Einzelzellrestitution am Kolonepithel der Maus wurde, im Gegensatz zur Zelllinie, in ihrer Restitution nicht verändert (Florian et al., 2001).

Da sich natives Darmgewebe durch das Einwirken verschiedener gewebspezifischer Zellen, Immunzellen, Zytokine, Wachstumsfaktoren, Chemokine und Entzün-

dungsmediatoren im Restitutionsmechanismus völlig anders verhalten kann als Zelllinien, sollte eine entsprechende Untersuchung an nativem Darmgewebe angestrebt werden. Dies ist jedoch mit der hier verwandten Methode zur Defekterzeugung kaum durchzuführen. Auch wäre bei solchen Experimenten eine weitere Unterteilung von gesundem humanem Darmgewebe und Darmbiopsaten von HIV-infizierten Patienten sinnvoll. Die Untersuchung des Restitutionsverhaltens von an HIV-Enteropathie erkranktem Darm hat sicherlich dabei die größte Relevanz.