

**Aus dem Institut für Klinische Physiologie,
Universitätsklinikum Benjamin Franklin
der Freien Universität Berlin
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. M. Fromm
Eingereicht über den Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

Restitution von Einzelzell-Läsionen im Kolonepithel

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Peter Florian
Tierarzt aus Münster

Berlin 2002

Journal-Nr. 2674

**Gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft,
Graduiertenkolleg 276/2 "Signalerkennung und -umsetzung"**

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Michael F. G. Schmidt

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Holger Martens

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. phil. nat. Alfred H. Gitter

Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. pol. nat. H. Weiß

Tag der Promotion: 17.12.2002

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	9
2	LITERATUR.....	12
2.1	Die epitheliale Barrierefunktion	12
2.1.1	Schlußleisten	13
2.1.1.1	Morphologie und Ultrastruktur	13
2.1.1.2	Funktionelle Bedeutung	15
2.1.1.3	Tight junction Modulation.....	16
2.1.2	Conductance scanning	18
2.1.3	Messung der intestinalen Barriere am nativen Kolonepithel	19
2.1.4	Restitution als Mechanismus der epithelialen Reparatur	20
2.1.5	Der <i>purse string</i> - Mechanismus	21
2.2	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) bei Mensch und Tier.....	22
2.3	Barrierestörungen und ihre pathophysiologische Bedeutung.....	23
2.4	Zytokine (TNF-α, IFN-γ) und ihre Bedeutung für die epitheliale Barriere.....	28
2.5	Einzelzell-Läsionen und ihre funktionelle Bedeutung für die epitheliale Barriere	30
2.6	Schlußfolgerungen für die eigene Fragestellung	31
3	MATERIAL UND METHODEN.....	34
3.1	HT-29/B6-Zellen	34
3.2	Distales Kolon der Maus.....	35
3.2.1	Präparation der nativen Epithelien	36
3.2.2	Einspannen des Epithels	37
3.3	Lösungen und Testsubstanzen.....	39
3.4	Elektrophysiologische Vorexperimente	42
3.4.1	Messung des transepithelialen Widerstandes (R^t)	42
3.4.2	Ussing-Experimente.....	42
3.5	Conductance scanning.....	44
3.5.1	Theoretische Grundlagen	45
3.5.1.1	Apparente Leitfähigkeit.....	46
3.5.1.2	Setzen der Einzelzell-Läsion	48
3.5.1.3	Berechnung des Leitwertes einer Einzelzell-Läsion	48
3.5.2	Versuchsaufbau	49
3.5.3	Versuchsablauf	52

3.6	Versuchsabläufe	59
3.6.1	Übersicht.....	59
3.6.2	Effekte von Zytoskelettmodulatoren auf den R^t	60
3.6.3	Effekt einer Erniedrigung der extrazellulären $[Ca^{2+}]_a$ auf den R^t ..	60
3.6.4	Einfluß von Zytoskelettmodulatoren auf die Restitution	61
3.6.5	Restitution unter erniedrigter Calcium-Konzentration.....	61
3.6.6	Einfluß von $TNF-\alpha$ auf die Restitution in HT-29/B6-Zellen	62
3.6.7	Einfluß von EGF auf die epitheliale Restitution	63
3.6.8	Messung der Einzelzell-Läsion im nativen Kolon der Maus	64
3.7	Statistische Auswertung	65
3.8	Histologie	67
3.8.1	Gewebepräparation	67
3.8.2	Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Färbung	69
3.8.3	Doppelfärbung: Occludin- und DAPI-Kernfärbung	70
3.8.4	Occludin- und ZO-1-Doppelfärbung	72
3.8.5	F-Aktin-Färbung	74
3.9	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	77
3.10	Videomikroskopie der Einzelzell-Läsion im lebenden Monolayer	77
4	ERGEBNISSE	79
4.1	HT-29/B6	79
4.1.1	Morphologie der Restitution einer Einzelzell-Läsion	79
4.1.2	Nachweis von ZO-1 und Occludin.....	83
4.1.3	Verteilung von ZO-1 und F-Aktin.....	85
4.1.4	Effekt von Zytoskelettmodulatoren und Rho-Kinase-Inhibitoren	87
4.1.5	Morphologie unter Zytoskelettmodulatoren und erniedrigter freier $[Ca^{2+}]_a$	88
4.1.6	Funktionelle Charakterisierung der Restitution	91
4.1.7	Läsionselektrodenfüllung und Restitution	98
4.1.8	Restitution nach Blockade der Zytoskelett-Dynamik	99
4.1.9	Effekt von lecken interzellulären Verbindungen	101
4.1.10	Einfluß von $TNF-\alpha$ auf die Restitution	102
4.1.11	Einfluß von EGF auf die epitheliale Restitution	103
	natives Mauskolon	104
4.2.1	Restitution einer Einzelzell-Läsion	104
4.2.2	Funktionelle Charakterisierung der Restitution	107
5	DISKUSSION	113
5.1	Verschuß und Abdichtung des Lecks an HT-29/B6	113
5.2	Beteiligung des <i>purse string</i>-Mechanismus	114
5.3	Simultane Ausbildung funktionsfähiger <i>Tight junctions</i>	118

5.4	Schnelle Restitution im Oberflächenepithel des nativen Kolons	120
5.5	Einfluß des epidermalen Wachstumsfaktors auf die Restitution	123
5.6	Die pathophysiologische Bedeutung der Studie.....	123
6	ZUSAMMENFASSUNG	125
7	SUMMARY.....	127
8	LITERATURVERZEICHNIS	129
9	ANHANG.....	142

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

BDM	2,3-Butandion Monoxim
bFGF	basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor
BSA	Rinderserum-Albumin
$[Ca^{2+}]_a$	freie extrazelluläre Calciumkonzentration
CARD 15	Caspase-aktivierende und -neubildende Domäne
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
DAPI	4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
F^{Kammer}	stromexponierte Kammerfläche (mm^2)
G_A	sog. apparente Leitfähigkeit (siehe Gleichung (1) Abschnitt 3.5.1.1, $mS\ cm^{-2}$)
G^{intakt}	epitheliale (Grund-)Leitfähigkeit intakter Epithelbereiche ($mS\ cm^{-2}$)
$g^{Läsion}$	Leitwert einer Einzelzell-Läsion (μS)
G^{Ussing}	epitheliale Gesamtleitfähigkeit bestimmt in einer Ussing-Kammer ($mS\ cm^{-2}$)
HE	Hämatoxylin, Eosin
HGF/SF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor/Verteilungsfaktor
HVEM	Herpes-Virus-Eintrittsmediator
IFN- γ	Interferon-gamma
IGF-I	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor I
IL-1 β	Interleukin-1 beta
IL-1 (-4, -6)	Interleukin-1 (-4, -6)
I_{sc}	Kurzschlußstrom
I^t	eingespeister transepithelialer Strom im Conductance scanning-Meßstand
k	spezifische Volumenleitfähigkeit ($mS\ cm^{-1}$, siehe Gleichung (3) Abschnitt 3.5.3)
K_i	Bindungskonstante
LT β R	Lymphotoxin-beta Rezeptor
m	Anzahl der gemessenen Filter bzw. Mäuse
MAP	Mitogen-aktivierendes Protein
MLC	Myosin-leichte-Kette
MLCK	Myosin-leichte-Ketten-Kinase
ML-7	1-(5-Iodonaphthalen-1-Sulfonyl)-1H-Hexahydro-1,4-Diazepin
n	Anzahl der Einzelmessungen
NF- κ B	nukleärer Faktor-kappa B
NOD2	Bezeichnung des Gens auf Chromosom 16, das Bedeutung bei der Pathogenese von M. Crohn hat
n.s.	nicht signifikant
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat-Puffer
PFA	Paraformaldehyd
n.L.	nach Läsion

p160ROCK	Rho-assoziierte Proteinkinase
p55 TNF-R1	Tumornekrosefaktor-alpha-Rezeptor1 (auch: CD120a)
p75 TNF-R2	Tumornekrosefaktor-alpha-Rezeptor2 (auch: CD120b)
R_k	Vorwiderstand der Meßappatur: 100 k Ω
R^t	transepithelialer Widerstand von Epithelien ($\Omega \text{ cm}^2$)
ρ	spezifischer Volumenwiderstand der Elektrolytlösung ($\Omega \text{ cm}$)
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des arithmetischen Mittelwertes
TGF- α	Transformierender Wachstumsfaktor-alpha
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor-beta
Trefoil peptides	Trefoil-Faktoren (Peptide)
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
U	transepitheliale Spannung (mV)
ΔV	Spannungsabfall zwischen den Mikroelektroden (μV)
V^t	transepitheliales Potential
V_{AC}^t	transepitheliale Wechselfspannung
Y-27632	spezifischer Inhibitor der Rho-assoziierten Proteinkinase p160ROCK
ZO-1 (-2, -3)	Zonula-occludens-Protein-1 (-2, -3)
Δz	Abstand der Mikroelektroden (μm)
z_0	konstanter Abstand $z_0 = 25 \mu\text{m}$ des Mikroelektrodenpaars zum Epithel

9 Anhang

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. phil. nat. A. H. Gitter und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. M. Fromm aus dem Institut für Klinische Physiologie für die Vergabe des Dissertationsthemas, für die hervorragende Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft während dieser Zeit. Herrn Univ.-Prof. Dr. med. J. D. Schulzke aus der Medizinischen Klinik I (Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie) danke ich ebenfalls ganz besonders für seine Diskussionsbereitschaft.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. H. Martens danke ich für die Bereitschaft, meine Dissertation fachlich im Fachbereich Veterinärmedizin zu vertreten.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Ing. grad. D. Sorgenfrei für seine ausgezeichnete Hilfsbereitschaft, ganz besonders bei allen technischen Problemen.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Physiologie für die überaus freundliche Aufnahme in ihrer Abteilung.

Herrn Dr. rer. nat. J. Weiske und Herrn PD Dr. med. T. Schöneberg danke ich besonders für die konstruktive Kooperation im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie und für ihre Diskussionsbereitschaft.

Frau A. Fromm, Frau S. Lüderitz, Frau I. Lichtenstein und Frau U. Lempart danke ich für ihre technische Assistenz bei der Durchführung von Experimenten. Frau S. Schön danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der histologischen Arbeiten.

Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. pol. H. Weiß und den Mitarbeiterinnen des Instituts für Biometrie und Informationsverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin danke ich für die statistische Beratung.

Den Studentinnen B. Neykova und C. Stahl danke ich für die Mitarbeit an dem EGF-Projekt im Rahmen des Benjamin Franklin Kollegs.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Kristina für ihre Hilfe bei der Korrektur und ihr Verständnis wenn es mal wieder etwas später wurde.

Diese Arbeit wurde durch ein Promotionsstipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduiertenkollegs 276/2 "Signalerkennung und -umsetzung" gefördert.

Curriculum vitae

persönliche Daten

26.11.1972 geboren: in Münster (Westf.)
Eltern: Hans-Joachim Florian
 Margret Florian, geb. Vienenkötter
Familienstand: ledig

Ausbildung

1979 - 1983 Gertruden Grundschule in Münster (Westf.)
1983 - 1992 Städtisches Gymnasium Kinderhaus in Münster (Westf.),
Erhalt der Allgemeinen Hochschulreife
1992 - 1993 Zivildienst bei der Lebenshilfe e.V. in Münster (Westf.)
1993 - 1994 Paracelsus Schule für Naturheilverfahren in Münster
(Westf.)
1994 - 2000 Studium der Veterinärmedizin, Universität Leipzig, Ab-
schluß der Tierärztlichen Prüfung mit dem Gesamt-
ergebnis 1,64 (gut)

Berufstätigkeit

10. Mai 2000 Approbation als Tierarzt
seit April 2002 wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Klinische
Physiologie, Fachbereich Humanmedizin der Freien
Universität Berlin

Lehrtätigkeit

1997 - 1999 studentische Hilfsassistenz im Veterinär-Physiologischen
Institut der Universität Leipzig
2001 - 2002 Lehraufträge für das Fach Physiologie am Fachbereich
Humanmedizin der Freien Universität Berlin über 60
Stunden/Semester

Praktika und Weiterbildung

- 16.02. - 27.03.98 Praktikum in der Groß- und Kleintierpraxis Dres. Benthin und Wentges, Billerbeck
- 21.09. - 09.10.98 Hilderstone College, Broadstairs, Kent, England, Intensiv-englischsprachkurs
- 01.04. - 28.05.99 Praktikum bei der Schering AG, Berlin
- 18.02. - 22.02.02 Fortbildungskurs der DGPT im Fach Reproduktionstoxikologie, Freie Universität Berlin
- 25.04. - 27.04.02 Weiterbildung zum Thema "Rhetorik des wissenschaftlichen Vortrags", Freie Universität Berlin
- 18.04. - 18.07.02 Seminar und Praktikum "Versuchstierkunde, Tierversuche und Alternativmethoden", Charité in Zusammenarbeit mit der ZEBET, Berlin

Stipendien

- 1997-2000 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
- 06/1999-08/1999 Auslandsstipendium im Rahmen des *Leadership program for veterinary students* an der Cornell University, Ithaca, USA
- 04/2000-03/2002 Stipendiat im Rahmen des Graduiertenkollegs der Deutschen Forschungsgemeinschaft DFG GRK 276/2 "Signalerkennung und -umsetzung", Freie Universität Berlin

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den aufgeführten Hilfsmitteln erstellt habe.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Dissertation erfolgte
Publikationen:

Originalarbeiten

1. Schmitz H, Rokos K, Florian P, Gitter AH, Fromm M, Scholz P, Ullrich R, Zeitz M, Pauli G, Schulzke JD (2002) Supernatants of HIV-infected immune cells affect the barrier function of human HT-29/B6 intestinal epithelial cells. *AIDS* **16** (7): 983-991
2. Florian P, Schöneberg T, Schulzke JD, Fromm M, Gitter AH (2002) Single-cell epithelial defects close rapidly by an actinomyosin purse string mechanism with functional tight junctions. *J Physiol (Lond)* **545** (2): 485-499
3. Mankertz J, Waller JS, Hillenbrand B, Tavalali S, Florian P, Schöneberg T, Fromm M, Schulzke JD (2002) Gene expression of the tight junction protein occludin includes differential splicing and alternative promoter usage. *Biochem Biophys Res Commun* **298**: 657-666

Abstracts

1. Florian P, Gitter AH, Schulzke JD, Fromm M (2001) Recovery of colon epithelial barrier after single-cell lesion. *Pflügers Arch Suppl* **441**: R 208
2. Florian P, Gitter AH, Schulzke JD, Fromm M (2001) Reconstitution in HT-29/B6 colonic epithelium and the role of the cytoskeleton. *J Physiol Biochem*, **57** (2), 141
3. Florian P, Fromm M, Schulzke JD, Gitter AH (2002) Restitution of single-cell lesion in the colon is delayed by TNF- α and IFN- γ . *Pflügers Arch Suppl* **443**: S 289

4. Florian P, Fromm M, Schulzke JD, Gitter AH (2002) Restitution of single-cell lesions in colonic epithelium. Abstractband zur 15. Tagung der Fachgruppe Physiologie und Biochemie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) in Wien, Österreich
5. Florian P, Schöneberg T, Schulzke JD, Fromm M, Gitter AH (2002) Single-cell epithelial defects are closed by a purse string mechanism. Repair is impaired by proinflammatory cytokines (TNF- α and IFN- γ). Abstractband zum 18th EITG Meeting of the European Intestinal Transport Group in Egmond aan Zee, Niederlande
6. Florian P, Gitter AH, Schulzke JD, Fromm M (2000) Recovery of colon epithelial barrier after single-cell lesion. Jahrbuch 2000 des Fachbereichs Humanmedizin der FU Berlin, Hrsg.: M. Fromm, Kommission des Fachbereichs. 329 (Endrundenteilnahme der besten 43 Abstracts beim Forschungspreis-Wettbewerb des Fachbereichs)
7. Florian P, Fromm M, Schulzke JD, Gitter AH (2001) Proinflammatory cytokines, TNF α and IFN γ , delay the rapid epithelial restitution in the colon. Jahrbuch 2001 des Fachbereichs Humanmedizin der FU Berlin, Hrsg.: M. Fromm, Kommission des Fachbereichs. 347 (4. Platz beim Forschungspreis-Wettbewerb des Fachbereichs)