

2 Literatur

2.1 Die epitheliale Barrierefunktion

Epithelien bilden Grenzflächen zwischen dem funktionellen Außenraum und dem Körperinneren. Im Darm grenzt ein einschichtiges Epithel das Darm-lumen von Interstitium und Blutkapillaren ab. Die epitheliale Barriere wird gebildet durch die Zellmembran der Enterozyten (transzelluläre Barriere) und die epithelialen Schlußleisten (*Zonulae occludentes* bzw. *Tight junctions*, para-zelluläre Barriere). Die strukturelle Integrität des intestinalen Epithels wird einerseits durch Apoptose und Zellabschilferung im Rahmen des regulären Turnovers, andererseits mechanisch durch den Inhalt des Darms angegriffen. Eine weitere Hauptfunktion des intestinalen Epithels sind der transepitheliale Transport von Nährstoffen, Elektrolyten und Wasser (Resorption bzw. Sekretion). Zusammen sorgen Transport- und Barrierefunktion für die physiologische Homöostase und die Abwehr von extrinsischen Antigenen (Potten, 1997).

Der Verlust einzelner Zellen, z.B. durch Apoptose, mag für die Transportleistung des Epithels unbedeutend sein. Für die Barrierefunktion stellt er vermutlich eine bedeutsame Störung dar, weil dort pathogene oder antigene Makromoleküle und Organismen eindringen können. Dies wird als entscheidender Teilschritt für die Auslösung verschiedener Colitis-Formen angesehen (Anderson, 2000), der den weiteren Zusammenbruch der Barrierefunktion nach sich zieht. Obwohl die funktionelle Bedeutung von Einzelzelldefekten zunehmend erkannt wird, ist es erst kürzlich gelungen, das hervorgerufene Leck in einer epithelialen Zellkultur zu quantifizieren (Gitter et al., 2000a).

Über die funktionelle Bedeutung und Reparatur größerer epithelialer Wunden (Restitution) ist, z.B. durch Arbeiten von Dignass (Dignass, 2001), schon viel bekannt. Dabei wird die Wunde durch Einwanderung intakter Nachbarzellen innerhalb von Stunden geschlossen. Tiefe Wunden erfordern allerdings zusätzlich Zellproliferation, so daß der Vorgang dann meist Tage in Anspruch nimmt. Auf der anderen Seite ist über den Verschuß von Einzelzelldefekten sehr wenig bekannt. Eine rein morphologische Beobachtung kann nämlich nicht klären, ob das funktionelle Leck geschlossen wird. Bisher gelang es nur Hudspeth (Hudspeth, 1975), den Zeitverlauf des Wiederaufbaus der Barrierefunktion zu dokumentieren. Er zeigte, daß das Leck einer Einzelzell-Läsion im Gallenblasenepithel des Amphibiums *Necturus* innerhalb von 30

min geschlossen wird. Eine über mikroskopische Beobachtung hinausgehende Untersuchung fehlt bisher aber für alle anderen Epithelien, insbesondere für Darmepithelien.

2.1.1 Schlußleisten

2.1.1.1 Morphologie und Ultrastruktur

Nach ersten Beschreibungen der *Tight junction* (Farquhar und Palade, 1963) als Adhäsionsringe benachbarter Zellen besteht aus heutiger Sicht die *Tight junction* aus einem komplexen, die Plasmamembran benachbarter Epithelzellen durchspannenden Maschenwerk (Cereijido et al., 1981; Madara, 1990). Mit Hilfe der Gefrierbruchelektronenmikroskopie konnten kontinuierliche, anastomosierende Netzwerke von intramembranösen Partikelsträngen oder Fibrillen (Staehein, 1973; Staehein, 1974) identifiziert werden (Abb. 1d). Jede beteiligte Zellmembran verfügt dabei über eigene intramembranöse Elemente, die mit korrespondierenden Elementen der benachbarten Zelle verbunden sind (Chalcroft und Bullivant, 1970; Hirokawa, 1982).

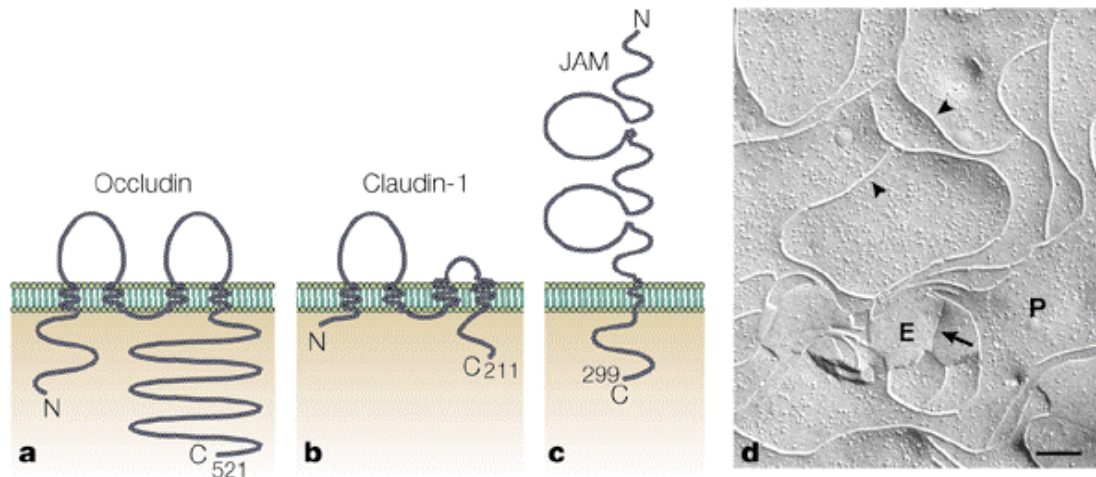


Abb. 1: Struktur der integralen Membranproteine in der *Tight junction*

(a) Occludin und (b) Claudine (hier exemplarisch Claudin-1) stellen über extrazelluläre "Loops" die Verbindung zwischen benachbarten Zellen her (Tsukita et al., 1997; Tsukita und Furuse, 2000a). Beide besitzen vier transmembranäre Domänen. Claudin-1 besitzt allerdings keine Sequenzhomologie zu Occludin. Das zytoplasmatische Ende von Claudin-1 ist deutlich kürzer als das von Occludin. (c) Das *Junctional adhesion molecule* besitzt nur eine transmembranäre Domäne. Extrazellulär bilden sich durch Disulfidbrücken Schleifen aus. (d) Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie von Claudin-1-transfizierten Fibroblasten: In Zell-Zell-Kontaktbereichen bilden sich Stränge (Pfeilköpfe) in P-Betrachtungen und Furchen (Pfeil) in E-Betrachtungen¹ aus. Wichtige *Tight junction*-assoziierte zytoplasmatische Proteine sind z.B. ZO-1, ZO-2 und ZO-3. Sie sind im Detail in ihrer Interaktion in Abb. 2 dargestellt. Maßbalken: 100 nm. Entnommen aus: (Tsukita et al., 2001)

Die Identifizierung des zirka 60 kD schweren Proteins Occludin (Abb. 1a; (Furuse et al., 1993; Furuse et al., 1998)), sowie einer Familie weiterer Proteine, der Claudine (zirka 20 kD; Abb. 1b; (Tsukita und Furuse, 2000b)), von denen bis heute 24 identifiziert wurden, klärten den molekularen Aufbau auf. Ein weiteres, *Junctional adhesion molecule* (zirka 40 kD) genanntes und an der Zell-Zell-Adhäsion beteiligtes Protein, wurde außerdem identifiziert (Abb. 1c; (Martin-Padura et al., 1998)). Bisher sind drei *Junctional adhesion molecule*-verwandte Proteine bekannt. Die Proteine sind einerseits membran-durchspannend andererseits stehen sie mit dem Aktin-Zytoskelett in

¹ Wenn Membranen gefriergebrochen werden, laufen die Bruchkanten durch das zytoplasmatische und extrazytoplasmatische Blatt der Plasmamembran. Dies führt zu sog. P- und E-Bildern der Membranen. Die P-Sicht (protoplasmatisch) betrachtet von Außen das innere Blatt, die E-Sicht (extrazytoplasmatisch) das äußere Blatt von Innen.

Verbindung (Anderson und Van Itallie, 1995; Fanning et al., 1999). Hierbei spielen die *Tight junction*-assoziierten Proteine ZO-1 (Stevenson et al., 1986), ZO-2 (Gumbiner et al., 1991), ZO-3 (Haskins et al., 1998) und Cingulin (Citi und Cordenosi, 1998), die vollständig intrazellulär liegen, eine wichtige Rolle als Vermittler zwischen den *Tight junction*-Proteinen Occludin und den Claudinen sowie den Zytoskelettelementen (Stevenson et al., 1988; Citi, 1992). Die Interaktion des integralen *Tight junction*-Moleküls Occludin mit dem Zytoskelett ist in Abb. 2 schematisch dargestellt.

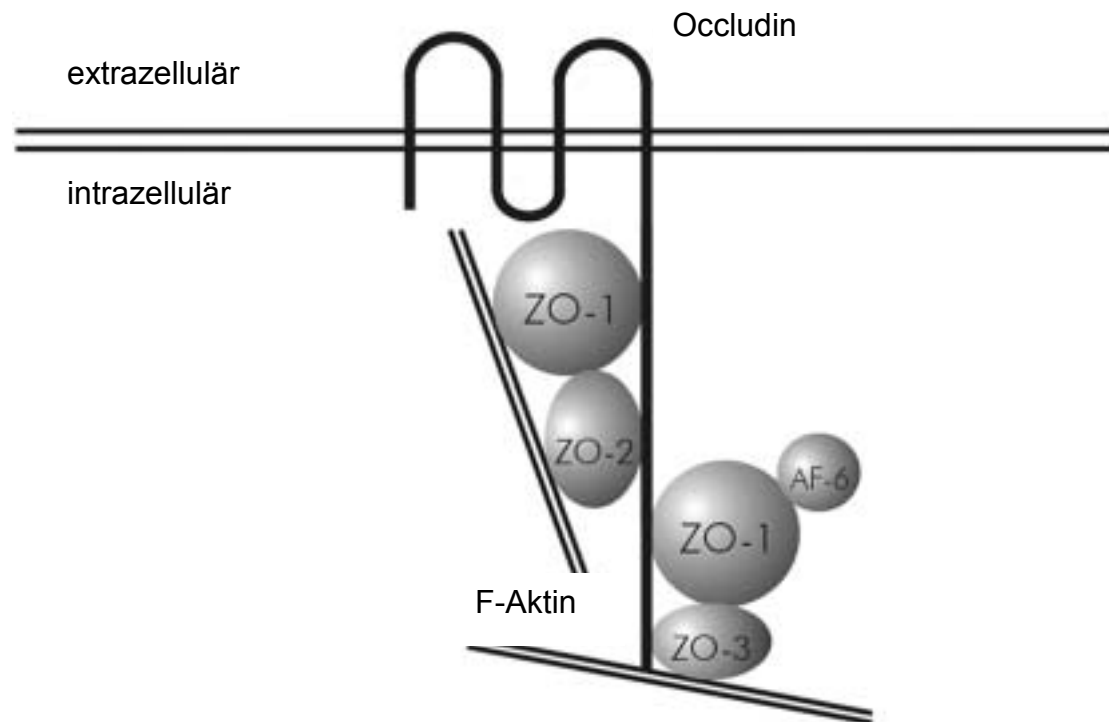


Abb. 2: Schematische Zeichnung einer möglichen Relation der *Tight junction*-Proteine zum Aktinzytoskelett

Es wird gezeigt, daß ZO-2 direkt an ZO-1 und Occludin bindet. ZO-2, ZO-3 und Occludin assoziieren direkt mit Aktinfilamenten. Ältere Arbeiten vermuteten, daß ZO-1 direkt Aktin bindet. Das hier gezeigte Modell basiert auf Daten die eher für zwei Komplexe bestehend aus ZO-1 und ZO-2 bzw. ZO-1 und ZO-3 sprechen. Ein Komplex aus allen drei Proteinen (ZO-1, ZO-2 und ZO-3) scheint nicht beteiligt zu sein. Weitere Bindungsmuster anderer *Tight junction*-Proteine müssen noch geklärt werden. Modifiziert nach: (Wittchen et al., 1999)

2.1.1.2 Funktionelle Bedeutung

Basierend auf den ultrastrukturellen Untersuchungen wurde lange angenommen, daß die *Tight junction* ein statisches System darstellt, welches den parazellulären Weg nahezu impermeabel macht. Am Epithel der *Necturus*-Gallenblase konnte aber bereits gezeigt werden (Frömter und Diamond,

1972), daß es dort eine erhebliche parazelluläre Ionenpermeabilität gibt. Durch weitere Forschungsergebnisse der letzten Jahre wurde gezeigt, daß es sich bei der *Tight junction* um eine dynamisch regulierte Diffusionsbarriere handelt, die auf verschiedene physiologische, pharmakologische und pathologische Bedingungen reagieren kann (Anderson und Van Itallie, 1995). Die *Tight junction* als wesentlicher Bestandteil des parazellulären Schlußleistenkomplexes ist somit für die Aufrechterhaltung und Regulation der epithelialen Barriere verantwortlich (Bentzel et al., 1991; Cereijido et al., 1998). Sie formt durch mehr oder weniger starke Abdichtung der Interzellularräume einen mehr oder weniger durchlässigen Engpaß für passive parazelluläre Transportvorgänge ("*gate*"-Funktion, (Diamond, 1977)), die von elektrochemischen Gradienten über dem Epithel angetrieben werden. Die *Tight junction* verhindert darüber hinaus die laterale Diffusion von Lipiden und Proteinen in der Plasmamembran ("*fence*"-Funktion, (Diamond, 1977)) und erhält dadurch die Polarität der epithelialen Zellmembran mit einer apikalen und einer basolateralen² Domäne.

2.1.1.3 *Tight junction* Modulation

Mehrere Methoden zur Modulation des *Tight junction*-Gefüges sind heute bekannt. Eine der am häufigsten angewandten Methoden, ist die durch extrazellulären Kalziumentzug verursachte Dissoziation der *Tight junction* und der *Adherens junction*. Hierbei wird entweder das reguläre extrazelluläre Medium durch kalziumfreies ersetzt oder eine Komplexbildung des vorhandenen Kalziums mit Hilfe von Chelatbildnern (z.B. EGTA) durchgeführt. Dieses Verfahren führte an verschiedenen Zellkulturmodellen zu einem Abfall des transepithelialen Widerstandes (Galli et al., 1976; Meldolesi et al., 1978; Cereijido et al., 1980; Martinez-Palomo et al., 1980; Citi, 1992; Contreras et al., 1992a; Collares-Buzato et al., 1994; Kottra, 1995). Eine verstärkte Assoziation der *Tight junction* hingegen kann durch einen osmotischen Gradienten (Erhöhung der Osmolarität in der mukosalen Badflüssigkeit) verursacht werden (Loeschke und Bentzel, 1994). Die Modulation des *Tight junction*-Gefüges ändert die parazelluläre Ionenpermeabilität. Extremere Kalziumentzug beispielsweise kann ein vollständiges Zusammenbrechen der epithelialen Barriere zur Folge haben. Die Dynamik der *Tight junction* wird

² Im Darm wird die apikale Membran auch als "mukosal oder luminal", die basolaterale als "serosal oder interstitiell" bezeichnet.

insbesondere bei der Passage von Immunzellen durch das Darmepithel deutlich (Madara et al., 1992).

Es ist bekannt, daß die Aussaat von MDCK³-Zellen in kalziumfreiem Medium eine Ausbildung von *Tight junctions* verhindert. Nach Zugabe von Kalzium ("*Calcium-switch*") entwickeln die Zellen *Tight junctions* in einer deutlich kürzeren Zeitspanne (4-5 h), als ausgesäte Zellen in kalziumhaltiger Lösung (12-16 h) (Gonzalez-Mariscal et al., 1985). Kalziumentzug scheint demnach den Zusammenbau der *Tight junction* zu verhindern, nicht aber die Produktion. Von einigen Autoren wird daher vermutet, daß sich intrazellulär Vesikel, deren Membranen die *Tight junction*-Proteine beinhalten, befinden. Durch den *Calcium-switch* werden die Vesikel über Exozytosemechanismen in die laterale Membran eingebaut, so daß intramembranöse Bausteine eine *Tight junction* bilden könnten. Diese Vermutung wird durch Untersuchungen von Contreras et al. 1992 dadurch untermauert, daß sich eine Membranoberflächenzunahme bei MDCK-Zellen nach *Calcium-switch* feststellen läßt. Exozytosehemmer wie Chloroquin hemmen den Effekt.

Neben der *Tight junction* kann im Prinzip auch der Interzellularspalt benachbarter Zellen zum parazellulären Widerstand beitragen (Spring und Hope, 1979; Kottra und Frömter, 1984a, b), allerdings nur bei extremer Engstellung des Interzellularspaltes, z.B. bei osmotisch induziertem sekretorischen Wasserfluß (Loeschke und Bentzel, 1994; Gitter et al., 1997).

Für die Modulation der *Tight junction* und damit der parazellulären Permeabilität sind außerdem intrazelluläre Mechanismen der Zytoskelettregulation mitverantwortlich. Zur Untersuchung dieser Prozesse werden pflanzliche Zytokine bzw. Pilztoxine und andere Mikrofilament-aktive Pharmaka, wie z.B. Cytochalasin B und D (Bentzel et al., 1980; Stevenson und Begg, 1994; Ma et al., 1995), Latrunculin A und B (Iwig et al., 1995) sowie Modulatoren des Mikrotubulusgefüges wie Colchicin oder Colcemid eingesetzt (Gipson und Keezer, 1982; Gipson et al., 1982; Gotlieb et al., 1983; Evangelisti et al., 1995). Ähnliches gilt für Bakterientoxine (Moore et al., 1990; Fasano et al., 1991; Fasano et al., 1995; Fasano et al., 1997) oder von Gewebemakrophagen sezernierte Zytokine (Madara, 1989; Mullin et al., 1992; Marano et al., 1998). Manche Substanzen können verschiedene, teilweise

³ MDCK (Madin Darbin Canine Kidney)-Zellen wurden 1958 von Madin und Darby aus der Niere eines normalen, ausgewachsenen, männlichen Cocker-Spaniels isoliert und wachsen seitdem in Kultur.

sogar gegensätzliche Effekte auslösen. So führt das polykationische Protein Protamin zu einer biphasischen Änderung des transepithelialen Widerstands, bei der sich die Schlußleistenpermeabilität zunächst verringert, und dann erhöht (Fromm et al., 1985; Bentzel et al., 1987; Victor, 2000). Abhängig von Epithel und Pharmakon können unterschiedliche Signaltransduktionswege an der Vermittlung von Permeabilitätsänderungen beteiligt sein. Die einzelnen Schritte sowie ihre funktionelle Umsetzung am epithelialen Schlußleistenkomplex sind dabei häufig noch ungeklärt.

2.1.2 Conductance scanning

Mit Hilfe der Conductance scanning-Methode (Köckerling et al., 1993; Gitter et al., 1997), welche die Zuordnung lokal gemessener Leitfähigkeiten zu morphologischen Strukturen erlaubt, ist es seit kurzem möglich, regionale Ionenleitfähigkeiten an flächigen Epithelien und an epithelialen Zellkulturen zu messen und zu quantifizieren. Mit dieser Methode wird gewissermaßen die Lücke zwischen der Patch clamp-Technik (Hamill et al., 1981), die an Zellmembranen Verwendung findet und der konventionellen Ussing-Kammer (Ussing und Zerahn, 1951), die nur pauschal den transepithelialen Widerstand (R^t) von Epithelien vermisst, geschlossen. Es kann mit der Conductance scanning-Technik in unterschiedlicher Ortsauflösung auch an Membranübergreifenden Strukturen, wie Kryptenöffnungen, Schlußleisten, Apoptosen und epithelialen Defekten gemessen werden. Die bisherigen Anwendungen erfolgten in drei Auflösungsstufen:

In "niedriger Auflösung" können größere Flächen (mm-Bereich) auf Barriere-defekte untersucht werden, z.B. in Resektionspräparaten von Colitis ulcerosa-Patienten (Gitter et al., 1998; Gitter et al., 2001). Die "mittlere Auflösungsstufe" erlaubt die Untersuchung der epithelialen Leitfähigkeiten von Krypten und Oberflächen der Darmschleimhaut. Auf diese Weise ließen sich die elektrogene Na^+ -Resorption (Köckerling et al., 1993), die cAMP-vermittelte Cl^- -Sekretion (Köckerling und Fromm, 1993), die cAMP- und Aldosteron-induzierte K^+ -Sekretion (Grotjohann et al., 1998b), die Ca^{2+} -vermittelte Cl^- -Sekretion (Grotjohann et al., 1998a) lokalisieren und die apoptotische Leitfähigkeit messen und quantifizieren (Gitter et al., 2000a). Erstmals wurde in der vorliegenden Studie, ebenfalls in "mittlerer Auflösung", eine Messung und Quantifizierung von Einzelzell-Läsionen am intestinalen Epithel durchgeführt. In "hoher Auflösung" lassen sich die Leitfähigkeiten der trans- und parazellulären Wege diskriminieren und mittels eines hierfür entwickelten

mathematischen Modells quantifizieren (Gitter et al., 1997; Bendfeldt et al., 1998; Gitter et al., 2000b).

Das Grundprinzip der Conductance scanning-Technik sei an dieser Stelle kurz skizziert (ausführliche Beschreibung siehe Abschnitt 3). In einer Elektrolytlösung werden dicht über dem Epithel mit Mikroelektroden die von einem transepithelial applizierten Klemmstrom induzierten Potentiale gemessen, deren Größe von den lokalen Leitfähigkeiten am Meßort abhängt. So können z.B. apoptotische Leitfähigkeiten gemessen und quantifiziert werden (Gitter et al., 2000a; Schmitz et al., 2002). Die Messungen erfolgen unter mikroskopischer Kontrolle, so daß die lokalen Strukturen, wie im vorliegenden Fall artifiziell gesetzte Einzelzell-Läsionen, identifiziert werden können.

2.1.3 Messung der intestinalen Barriere am nativen Kolonepithel

Die physiologische Barriere des Darmepithels trennt das Lumen von dem Interstitium und Kapillaren und spielt eine Schlüsselrolle in der Funktion des Kolons (Kraehenbuhl et al., 1997). Durch einen epithelialen Monolayer werden dabei Oberfläche und Krypten abgedeckt. Meist wird die Barriere durch Messung des transmuralen elektrischen Widerstands mit der konventionellen Ussing-Kammer-Technik vereinfacht als transepithelialer Widerstand (R^t) wiedergegeben. Subepitheliales Bindegewebe, Nerven und Muskelschichten tragen jedoch nicht zur Barrierefunktion bei, auch wenn sie bei transmuralen Widerstandsmessungen mit erfaßt werden.

Eine Trennung der einzelnen Komponenten des transmuralen Widerstands ist mit anderen Methoden möglich. Für eine Diskriminierung des epithelialen und subepithelialen Widerstandes wird die Impedanzanalyse angewendet (Gitter et al., 1998). Der Krypten- und Oberflächenwiderstand oder der transzelluläre und parazelluläre Widerstand lassen sich mit Hilfe von Conductance scanning in verschiedenen Auflösungsstufen unterscheiden (Gitter et al., 2000b). Die parazelluläre Barriere wird häufig auch durch Bestimmung von sog. Fluxraten bestimmter radioaktiv markierter Ionen (z.B. $^{22}\text{Na}^+$, $^{36}\text{Cl}^-$) oder Moleküle bestimmter Größe (z.B. D- ^{14}C]Mannitol) charakterisiert (Madara, 1998).

Die epitheliale Barriere spielt für die Genese einer Reihe von Erkrankungen eine Rolle. Somit ist die *Tight junction*-Permeabilität beispielsweise im Hinblick auf die Tumorgenese relevant (Soler et al., 1999). Barrieredefekte durch Läsionen im Epithel sind bisher nur mit Hilfe der Ussing-Kammer-Technik an

nativem Gewebe untersucht worden. Es konnte hier eine Beteiligung des Zytoskeletts an der Restitution von Läsionen nachgewiesen werden (Albers et al., 1996). Bei intakter Basalmembran konnten die Defekte in relativ kurzer Zeit (ca. 60 min) verschlossen werden. Dies zeigt, daß schnelle Mechanismen greifen, um die epitheliale Barriere im Darm aufrecht zu halten.

2.1.4 Restitution als Mechanismus der epithelialen Reparatur

Der Begriff Restitution wurde zuerst 1985 definiert als ein Prozeß, der nach oberflächlichen Defekten schnell die Integrität und Kontinuität von Epithelien wiederherstellt (Silen und Ito, 1985). Dabei kommt es nicht zur Zellproliferation oder Entzündung. Somit wurde ein Terminus gewählt, der sich von anderen Prozessen der Reparatur, die zum Teil mit proliferativen Prozessen oder Entzündungsgeschehen vergesellschaftet sind, abgrenzt. Die Restitution läuft durch die reine Migration von benachbarten Zellen um den Defekt herum ab. Dadurch wird der Defekt schnell abgedeckt. Sowohl in *in vitro*-Systemen (Ciacci et al., 1993; Dignass et al., 1994) als auch in *in vivo*-Systemen (Moore et al., 1992; Sturm et al., 1999) ist dieses Phänomen beschrieben. Eine Voraussetzung für eine funktionierende Restitution ist, daß nur oberflächliche Defekte vorhanden sind. Vermutlich läßt sich dies auf eine für den Prozeß wichtige intakte Basalmembran zurückführen. Die Tatsache, daß Restitution auch in rein epithelialen *in vitro*-Systemen zu beobachten ist, zeigt, daß es sich um einen Prozeß handelt, der durch Epithelzellen allein geleistet werden kann.

Die Restitution nach makroskopischer Schädigung von Epithelien mittels einer Rasierklinge und die Modulation der Restitution durch Zytokine ist fast ausschließlich an Zellkulturen in einem Kulturgefäß untersucht worden (Dignass und Podolsky, 1993). Hierbei wurde mittels morphometrischer Analyse die Bewegung von intakten, lebenden Zellen am Rand des Defektes in den Schaden untersucht. Ergänzend dazu wäre die Wiederherstellung der epithelialen Barrierefunktion mit der Messung der generellen elektrischen Leitfähigkeit in einem konventionellen Ussing-Kammer-System möglich. Dadurch, daß in der Regel größere Defekte untersucht wurden, benötigte der Prozeß der Restitution in diesen Systemen meist mehrere Stunden. An der Kolonzelllinie Caco-2 wurde die Restitution irregulärer, stabförmiger Wunden von ungefähr 100 µm oder weniger (ein bis acht Zelldurchmesser) untersucht (Bement et al., 1993). Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß die Reparatur dieser relativ kleinen Defekte morphologisch durch eine Aktin- und Myosin-II-

Interaktion vermittelt wird. Aufgrund der sich ausbildenden Einschnürung wurde der Vorgang als "*purse string*"-Kontraktion, vergleichbar mit dem Schließen eines Tabaksbeutels, bezeichnet (s. Abschnitt 2.1.5). Bei allen genannten Defekten handelte es sich allerdings um größere Defekte, die mehrere Zellen umfaßten und somit einige Stunden dauerten.

2.1.5 Der *purse string* - Mechanismus

Dieser Mechanismus wurde erstmals von Martin und Lewis (Martin und Lewis, 1992) beschrieben und definiert. Die Untersuchungen wurden an standardisiert großen embryonalen Hautwunden durchgeführt. Wichtigster Unterschied zu bis dahin bekannten Wundheilungsprozessen im adulten Gewebe war das Fehlen von Lamellipodien (füßchenartige Ausstülpungen der Plasmamembran in den Defekt) während der Migration der Zellen (Nusrat et al., 1992). Statt dessen erschien der Wundrand glatt und ringsherum gespannt. Es konnte gezeigt werden, daß ein ringsherum verlaufendes filamentöses Aktinband diese Struktur formt. Gleichzeitig war an dem unmittelbar zum Defekt gelegenen Rand der Zellen Aktin nachweisbar. Es wurde somit eine Art Tabaksbeutel oder "*purse string*" für die Formation als Begriff definiert. In anderen Arbeiten wurde an Caco-2_{BBE}-Zellen eine Kombination der Lamellipodienbildung und des *purse string* beschrieben (Bement et al., 1993). In dieser Arbeit war eine Aktin-Myosin-Interaktion um den Defekt herum nachweisbar. Bei der Kontraktion des *purse string* werden die apikalen oder die basalen Zellabschnitte zusammengezogen und somit der Defekt verkleinert während die basalen oder apikalen Zellbereiche langsam folgen (McCluskey et al., 1993). Mittlerweile ist bekannt, daß der *purse string*-Mechanismus nicht nur im embryonalen Gewebe auftritt. Epitheliale Wunden in der adulten Kornea oder im Magen-Darm-Trakt werden mindestens zum Teil über einen *purse string*-Mechanismus repariert (Heath, 1996; Danjo und Gipson, 1998). Erstaunlicherweise wird durch diese Arbeiten gezeigt, daß die Größe des Defektes den folgenden Reparaturmechanismus mit beeinflußt. Wie die Zellen die Größenunterschiede detektieren können ist allerdings völlig unklar. Ebenso ist bisher nicht vollständig geklärt, welche intrazellulären Signalkaskaden für die Induktion des *purse string* verantwortlich sind. Bisherige Erkenntnisse dazu sind von Jacinto et al. zusammengefaßt dargestellt (Jacinto et al., 2001).

2.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) bei Mensch und Tier

Beim Menschen werden im wesentlichen zwei klinisch von einander trennbare Krankheitsbilder, der Morbus Crohn und die Colitis ulcerosa, unterschieden. Bei beiden Erkrankungen wird davon ausgegangen, daß sie durch eine inadäquate Reaktion des mukosalen Immunsystems auf die normale luminale Flora verursacht werden. Für die Entstehung ist sowohl eine epitheliale Barriestörung als auch ein Defekt im Immunsystem bedeutsam. Darüber hinaus werden genetische Faktoren (z.B. NOD2 bzw. CARD 15 bei Morbus Crohn (Hugot et al., 2001)) und Umweltfaktoren diskutiert. So verursacht z.B. Rauchen ein erhöhtes Risiko für Morbus Crohn und bewirkt vermutlich das Gegenteil bei der Colitis ulcerosa (Lindberg et al., 1988; Cosnes et al., 2001).

Beide Erkrankungen unterscheiden sich immunologisch im wesentlichen durch ihr unterschiedliches Zytokinmuster. Beim Morbus Crohn überwiegt eine T-Helfer-Zell-Typ-1-Antwort, charakterisiert durch die Produktion von Interferon- γ und Interleukin-2. Im Gegensatz dazu dominiert bei der Colitis ulcerosa eine T-Helfer-Zell-Typ-2-Antwort in der die Produktion von TGF- β und Interleukin-5, allerdings nicht von Interleukin-4, vorherrscht. Wichtig für die Pathogenese beider Erkrankungen sind weiterhin Zytokine, die von aktivierten Makrophagen produziert werden. Dazu zählen vor allem die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , Interleukin-1 und Interleukin-6. Durch den erfolgreichen Einsatz von TNF- α -Antikörpern bei der Therapie schwerer Formen des Morbus Crohn, konnte gezeigt werden, welche wichtige Rolle dieses Zytokin bei der Immunmodulation der Erkrankung spielt (Lugering et al., 2001; ten Hove et al., 2002). Ob eine Therapie der Colitis ulcerosa mit TNF- α -Antikörpern erfolgreich ist, ist noch unklar.

Bei Tieren spielen insbesondere beim Hund, bei der Katze und beim Pferd chronisch entzündliche Erkrankungen eine Rolle in der tierärztlichen Praxis. Ähnlich den CEDs beim Menschen sind die Erkrankungen beim Tier durch eine Infiltration des Gastrointestinaltrakts mit Entzündungszellen charakterisiert. Diese histologisch nachweisbaren Veränderungen werden bei der Diagnostik genutzt. Darüber hinaus leiten sich die einzelnen Formen der CED durch die jeweilig vorherrschende Zellpopulation ab.

Beim Pferd unterscheidet man aufgrund der jeweils vorherrschenden Zellpopulation im histologischen Bild eine Granulomatöse Enteritis (Cimprich,

1974; Lindberg et al., 1985), eine multisystemische eosinophile epitheliotrope Erkrankung (Hillyer und Mair, 1992), die lymphozytär-plasmazytäre Enterocolitis (MacAllister et al., 1990) sowie die idiopathische eosinophile Enterocolitis (Scott et al., 1999).

Bei Hund und Katze ist vor allem die lymphozytär-plasmazytäre Enterocolitis vorherrschend (Jacobs et al., 1990; Jergens et al., 1992; Dennis et al., 1993). Bestimmte Rassen, wie z.B. Boxer, Deutscher Schäferhund und bestimmte Rassekatzen zeigen grundsätzlich ein erhöhtes Risiko für CEDs. Bei Basenjis-Hunden konnte eine besondere Form der lymphozytär-plasmazytären Enterocolitis charakterisiert werden (Breitschwerdt et al., 1982). Eine idiopathische eosinophile Enterocolitis ist beim Kleintier insgesamt seltener als eine lymphozytär-plasmazytäre Enterocolitis. Sie kommt außerdem eher beim Hund als bei der Katze vor. Anders als bei der lymphozytär-plasmazytäre Enterocolitis gibt es keine Rasse- oder Geschlechtsdisposition. Neben diesen Formen der CED gibt es noch weitere Varianten wie z.B. die chronische, histiozytäre ulcerative Colitis oder die granulomatöse Enterocolitis. Der Boxer zeigt eine Prädisposition für die chronische, histiozytäre ulcerative Colitis (Hall et al., 1992; German et al., 2000). Leider gibt es relativ wenige systematische Untersuchungen zur Pathogenese der Erkrankung bei oben genannten Tieren. Statt dessen werden die Kenntnisse aus der Humanmedizin vergleichend herangezogen. Da sich die Erkrankungen in ihrer Symptomatik und in ihrem Verlauf mit denen beim Menschen vergleichen lassen, scheinen sich Erkenntnisse aus der Humanmedizin auf die Pathophysiologie beim Tier übertragen zu lassen.

Therapeutisch werden ebenso ähnliche Ansätze beim Tier verfolgt. Die oben erwähnte Therapie mit TNF- α -Antikörpern wird aus Kostengründen allerdings nicht durchgeführt. Üblicherweise sind in der Tiermedizin, wie in der Humanmedizin auch, bestimmte Diäten in Kombination mit nicht steroidalen Antiphlogistika und Cortikosteroiden je nach Schweregrad der Erkrankung und klinischer Symptomatik im Einsatz.

2.3 Barrierestörungen und ihre pathophysiologische Bedeutung

Die intestinale Permeabilität ist bei verschiedenen Krankheiten erhöht. Als klinisches Leitsymptom kommt es dabei durch eine gestörte Transport- und Barrierefunktion zu Durchfällen (Leckfluß-Diarrhoe). Oft sind Entzündungen der Darmmukosa Ursache oder Folge einer Störung der Barrierefunktion. Bei chronisch entzündlichen Veränderungen weiter Teile des Gastrointestinal-

traktes (Morbus Crohn), des Kolons (Colitis ulcerosa) und auch bei HIV-infizierten Patienten kommt es zu massiven Diarrhoen (Riecken et al., 1990). Eine gesteigerte intestinale Permeabilität könnte die intestinale Penetration von potentiell toxischen luminalen Antigenen, wie z. B. Nahrungsmittelzusätzen und Bakterienfragmenten sowie deren Metaboliten ermöglichen und somit eine intestinale Entzündung mit systemischer Zirkulation von Toxinen verursachen (Hollander, 1988). Im Rahmen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen kommt ein Barriereverlust u.a. durch eine Permeabilitätszunahme der Schlußleisten in Betracht (Sandle et al., 1990; Schulzke et al., 1995; Schmitz et al., 1999). Dabei spielen u. a. auch intrazelluläre Prozesse der Zytoskelettmodulation eine Rolle. Am Zytoskelettaufbau sind im wesentlichen strukturelle Anteile wie Mikrotubuli, Intermediärfilamente und Aktin-Mikrofilamente beteiligt. Es besteht eine enge Verknüpfung der einzelnen Elemente zueinander, um Veränderungen der Zellform zu gewährleisten und koordiniert Zellbewegung und –wanderung zu ermöglichen. Dabei spielen Mikrotubuli eine wichtige Rolle um die intrazelluläre Verteilung von Intermediärfilamenten und Aktinfilamenten zu steuern (Selden und Pollard, 1986). Insbesondere Aktinfilamente haben eine direkte Verbindung zu den interzellularen *Tight junction*-Elementen, insbesondere Occludin (Abb. 2), mit denen sie, neben den *Tight junction*-assoziierten Proteinen, interagieren (Pollard, 1986; Pollard und Cooper, 1986; Wittchen et al., 1999). Durch Hemmung der Polymerisation von globulärem Aktin zu filamentösem Aktin mittels Cytochalasin B oder D (Cooper, 1987) kommt es zur Störungen in der epithelialen Barriere.

In einem komplexen Zusammenspiel agieren Zytokine die von aktivierten Immunzellen, aber auch von epithelialen und mesenchymalen Zellen der Darmmukosa gebildet werden (Fiocchi, 1997a, b). Im Rahmen von intestinalen Entzündungen haben Zytokine sowohl regulatorische als auch effektorische Bedeutung. Dies wurde in verschiedenen Studien durch eine transepitheliale Leitfähigkeitszunahme gezeigt. Als effektiv erwies sich, gemessen am transepithelialen Widerstandsabfall von T_{84} -Zellen, Interferon- γ (Madara und Stafford, 1989). Dignass et al. zeigten an IEC-6 Zellen von der Ratte eine gesteigerte Migration unter Interferon- γ (Dignass und Podolsky, 1993). An Primärkulturen aus Magenschleimhautzellen konnte allerdings, bezogen auf die Proliferation oder Migration, kein Effekt gezeigt werden (Kato et al., 1999). Andere Zytokine, wie TNF- α , Interleukin (IL-4) oder Interleukin-6 (IL-6) zeigen keinen Effekt bzw. eine Hemmung der Proliferation durch IL-4

(Morisaki et al., 1992) oder eine moderate Hemmung der Migration durch TNF- α (Kato et al., 1999). An Endothelien kann mittels TNF- α und IL-1 die Gefäßpermeabilität erhöht werden (Brett et al., 1989; Goldblum und Sun, 1990; Campbell et al., 1992; Burke-Gaffney und Keenan, 1993). TNF- α bewirkt in der Schweinenierenzelllinie LLC-PK1 (Mullin et al., 1992) und in HT-29cl.19A-Zellen (Heyman et al., 1994; Rodriguez et al., 1995) einen transienten bzw. geringfügigen Abfall des transepithelialen Widerstandes. Die Komplexität der einzelnen Faktoren bezogen auf das Migrations- und Proliferationsverhalten in einzelnen Zellmodellen und an nativen Geweben soll zusammenfassend in Tab. 1 wiedergegeben werden.

Wachstumsfaktoren		Wirkung	Referenz
HGF/SF		Erhöhung des Wundheilungsprozesses unter Beeinflussung der <i>Migration</i> und <i>Proliferation</i>	(Nusrat et al., 1994), (Watanabe et al., 1994)
EGF/TGF- α		Stimulation der <i>Migration</i>	(Kato et al., 1999), (Dignass und Podolsky, 1993), (Chen et al., 1991)
TGF- β		fördert Heilprozeß durch Steigerung der <i>Migration</i>	(Dignass und Podolsky, 1993), (Ciacci et al., 1993)
IGF-I		Steigerung der <i>Proliferation</i>	(Chen et al., 1991)
bFGF		Stimulation der <i>Migration</i> , Stimulation der <i>Proliferation</i>	(Dignass et al., 1994), (Paimela et al., 1993)
Trefoil Faktoren		Wirkung	Referenz
hSP; rITF		Stimulation der <i>Migration</i>	(Kato et al., 1999), (Dignass et al., 1994)
Zytokine		Wirkung	Referenz
IL-1 β		Stimulation der <i>Migration</i>	(Sutherland et al., 1994), (Varilek et al., 1994), (Yasunaga et al., 1996)
IL-1 α , IL-4		Hemmung des <i>Wachstums</i>	(Morisaki et al., 1992)
IL-6		kein Effekt	(Kato et al., 1999), (Dignass und Podolsky, 1993)
IFN- γ		Stimulation der <i>Migration</i>	(Dignass und Podolsky, 1993)
		kein Effekt	(Kato et al., 1999)
TNF- α		Hemmung der <i>Migration</i>	(Kato et al., 1999)
		kein Effekt auf <i>Migration</i>	(Dignass und Podolsky, 1993)

Tab. 1: Übersicht über die Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren, Trefoil Faktoren und Zytokine auf die Migration und Proliferation von Zellen.

HGF/SF: Hepatozyten-Wachstumsfaktor/Verteilungsfaktor

EGF: Epidermaler Wachstumsfaktor

TGF- α : Transformierender Wachstumsfaktor-alpha

TGF- β : Transformierender Wachstumsfaktor-beta

IGF-I: Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor I (auch: Somatomedin)

bFGF: basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor (exprimiert in Fibroblasten, Makrophagen, wirkt auf Fibroblasten und glatte Muskelzellen; akkumuliert als Peptid in Schleimhautdefekten und Ulzerationen)

Trefoil Peptide: Trefoil Faktoren (Peptide) bilden eine Familie von Molekülen, die sich assoziiert an Schleim finden lassen (pS2, zuerst gefunden und exprimiert an einer humanen Brustkrebszelllinie, hat Homologie zum humanen Molekül hSP; pS2 wird in proximalen Magenabschnitten exprimiert, hSP in distalen Magenabschnitten (Podolsky et al., 1993; Hanby et al., 1994).

ITF, ein weiterer Trefoil Faktor, wird im Dünndarm exprimiert (Podolsky et al., 1993).

IL-1 β : Interleukin-1 beta, proinflammatorisch, produziert von Makrophagen, Thrombozyten, Fibroblasten und Endothelzellen, unterdrückt Magensäureproduktion in Ulkusmodellen

IL-4, IL-6: Interleukin-4, -6, proinflammatorisch

IFN- γ : Interferon-gamma

TNF- α : Tumornekrosefaktor-alpha

Von aktivierten Makrophagen gebildete Zytokine werden bei Patienten mit chronischen Darmentzündungen in erhöhten Konzentrationen gefunden (Isaacs et al., 1992; Youngman et al., 1994; Hyams et al., 1995; Hyams, 2000). Die Gewebekonzentrationen korrelieren mit dem Aktivitätsstadium der jeweiligen Erkrankung und sind in aktiven Schubstadien dramatisch erhöht, in inaktiven Stadien jedoch nicht (Sartor, 1994). Erhöhte TNF- α -Konzentrationen werden bei Colitis ulcerosa-Patienten und bei Patienten mit Morbus Crohn in der Mukosa und im Stuhl gefunden (MacDonald et al., 1990; Braegger und MacDonald, 1994; Brynskov et al., 1994). Bei einem Großteil der mukosalen Zellen von Morbus Crohn-Patienten läßt sich eine erhöhte Expression von TNF- α nachweisen (MacDonald et al., 1990; Murch et al., 1991; Murch et al., 1993; Braegger und MacDonald, 1994; Brynskov et al., 1994; Van Dullemen et al., 1995). Obwohl andere Entzündungszytokine ähnliche biologische Aktivitäten aufweisen, spielt TNF- α bei der Vermittlung von Barrieredefekten offenbar eine herausragende Rolle (van der Poll und Lowry, 1995).

Der Einsatz von chimären monoklonalen TNF- α -Antikörpern als Therapeutikum bei Patienten mit Morbus Crohn ist erfolgversprechend (Van Dullemen et al., 1995; Eigler und Endres, 1997; Mouser und Hyams, 1999). Eine einzige Infusion der Antikörper kann bei Erkrankten, die auf die üblichen Steroidtherapien nicht ansprechen, zu einer vollständigen endoskopisch sichtbaren Remission führen, die bis zu vier Monate anhalten kann.

Anhand der Restitution nach Einzelzell-Läsion unter dem Einfluß inflammatorischer Zytokine wurde im Rahmen dieser Arbeit modellhaft die funktionelle Relevanz kleiner Epitheldefekte für die Schädigung der epithelialen Barrierefunktion und damit auch für die Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen charakterisiert. Zunächst wurde ein Modellsystem etabliert, in dem die artifizielle Läsion einer Einzelzelle im Monolayer von HT29/B6-Kolonepithelzellen untersucht werden konnte. Mittels einer Mikroelektrode wurde gezielt eine Zelle zerstört, nachdem ein

Epithelbereich mit homogener Leitfähigkeitsverteilung gefunden wurde. Die Erfassung der Leitfähigkeitsverteilung mit Hilfe der Conductance scanning-Technik wurde optimiert, so daß auch deren Zeitabhängigkeit bestimmt werden konnte. Somit war es möglich, zusammen mit morphologischen Analysen, den Prozeß der Restitution an einem Einzelzelldefekt modellhaft zu verstehen. Ein aus der Literatur bekannter *purse string*-Mechanismus konnte für die Restitution des Einzelzelldefektes charakterisiert werden. Die pathophysiologische Bedeutung der Restitution wurde zunächst an HT-29/B6-Monolayern unter TNF- α -Einfluß und anschliessend am Mauskolon unter TNF- α allein und in Kombination mit IFN- γ untersucht. TNF- α wurde dabei in einer Konzentration (100 ng/ml), die lokal am Sekretionsort auftreten kann (Schmitz et al., 1996), angewendet. IFN- γ wurde ebenfalls mit 1000 U/ml in einer Konzentration, die lokal auftreten kann, eingesetzt.

2.4 Zytokine (TNF- α , IFN- γ) und ihre Bedeutung für die epitheliale Barriere

Die Vielfalt an Effekten, die durch die Gruppe der TNF-verwandten Liganden und deren Rezeptoren vermittelt wird, ist sowohl in ihrem Mechanismus als auch in den resultierenden Effekten ausgesprochen komplex. Diese reichen von der Zerstörung des Gewebes bis hin zur Steuerung der immunologischen Zelldifferenzierung. Die Aufklärung der funktionellen Hintergründe dieser Mechanismen hat aus diesem Grunde großes Interesse in biomedizinischen und biotechnologischen Forschungsgebieten provoziert. Besondere Aufmerksamkeit kam hierbei dem Zytokin TNF- α zu. Da es in Immunreaktionen eine zentrale Stellung einnimmt, wurde zunehmend deutlich, daß eine Fehlregulation der Funktion in der Pathologie vieler Krankheiten eine Rolle spielt (Braegger und MacDonald, 1994). Vor allem in Makrophagen, aber auch Granulozyten, Fibroblasten und glatten Muskelzellen sind Lipopolysaccharide ein Induktionsstimulus für den Anstieg der TNF- α -Produktion. TNF- α wird zunächst als 26 kD großes Membranprotein exprimiert. Sein 17 kD großer extrazellulärer Anteil wird durch eine Metalloproteinase freigesetzt (Mohler et al., 1994) und bindet als Trimer auf der Oberfläche der Zielzellen an spezifische Rezeptoren. Die zellulären Signaltransduktionswege nach Rezeptorbindung sind vielfältig und schließen eine Beteiligung von Membranproteinen (p55 TNF-Rezeptor-Typ 1 = CD120a, p75 TNF-Rezeptor-Typ 2 = CD120b, Lymphotoxin beta-Rezeptor (LT β R), Herpes-Virus-Eintrittsmediator (HVEM), Fas/Apo-1 (CD95)) sowie löslichen

Mediatoren und Transkriptionsfaktoren (Caspase-, Phospholipase-, Mitogen-aktivierendes-Protein- (MAP) Kinase-Weg und Elemente der NF- κ B-Aktivierungskaskade) mit ein. Für die Signaltransduktion von TNF- α ist die Bindung intrazellulärer Proteine (Wallach, 1997; Wallach et al., 1997; Ashkenazi und Dixit, 1998) an den zytoplasmatischen Teil des Rezeptors entscheidend. Anhand der oben genannten Rezeptoren läßt sich dem CD120a-vermittelten Weg bei Einzelzellen z.B. eine Zelltodinduktion und in vielzelligen Organen eine Abwehrkontrolle durch Koordination der Immunantwort zuordnen. Im Gesamtorganismus treten Symptome wie Fieber, Appetitverlust und Erhöhung der Akute-Phase-Protein Serumspiegel auf. CD120b, meist aktiviert durch die zellgebundene Form von TNF- α , induziert nur wenige Effekte. Bei LT β R ist *in vitro* bekannt, daß die Rezeptorbindung eine Wachstumsstimulation von Fibroblasten bewirkt und zytotoxische Effekte bei einigen Tumorzelllinien ausgelöst werden können (Browning et al., 1996). Darüber hinaus scheint LT β R auch bei chronisch entzündlichen Darm-erkrankungen eine Rolle zu spielen (McKay und Singh, 1997). HVEM hingegen induziert das Wachstum von T-Lymphozyten (Kwon et al., 1997). CD95 induziert einerseits Apoptose, scheint andererseits allerdings auch Zellwachstum zu stimulieren. Außerdem induziert die CD95-Bindung die Synthese von IL-6 und IL-8.

Untersuchungen am gesunden menschlichen Colon *in vitro* zeigen, daß TNF- α dort kurzzeitig eine Chloridsekretion auslöst (Schmitz et al., 1996). Bei chronischen Darmentzündungen ist der Ionentransport im Colon jedoch nicht durch eine gesteigerte Ionensekretion, sondern eher durch eine reduzierte aktive Resorption und gesteigerte mukosale "Leckheit" als Ursache der Diarrhoe gekennzeichnet (Sandle et al., 1990; Schulzke et al., 1995). In epithelialen menschlichen Kolonkarzinomzellen (HT-29/B6) verursacht TNF- α ebenfalls eine Permeabilitätserhöhung ohne Beeinflussung der aktiven tranzellulären Transportmechanismen (Schmitz et al., 1999): Serosale Gabe von TNF- α verringert den transepithelialen elektrischen Widerstand konzentrationsabhängig auf bis zu 20% des Ausgangswertes, ohne daß eine verstärkte Chloridsekretion beobachtet werden kann. HIV-Überstandszytokine (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ und IFN- α) führten außerdem zu einer Erniedrigung des transepithelialen Widerstandes an HT-29/B6-Zellen (Schmitz et al., 2002). Durch den Einsatz von rekombinant hergestellten Zytokinen in gleicher Konzentration konnte der Effekt reproduziert werden. Die Blockade von

TNF- α durch den löslichen Rezeptor führte zur Blockade des Effekts. Dies spricht für einen Haupteffekt durch TNF- α auf die epitheliale Barriere. Mit Hilfe von Conductance scanning-Messungen wurde nachgewiesen, daß der Barriereverlust sowohl auf eine erhöhte Apoptoserate als auch auf eine *Tight junction*-Veränderung zurückzuführen ist. Radioisotopen-Fluxmessungen mit Mannitol zeigen nach Präinkubation der Zellen mit TNF- α eine deutliche parazelluläre Permeabilitätszunahme (McKay und Singh, 1997; Schmitz et al., 1999).

Morphometrische Untersuchungen von HT-29/B6-Gefrierbruchschnitten zeigen eine unter TNF- α reduzierte *Tight junction*-Ausdehnung und *Tight junction*-Strangzahl. Die Freisetzung von Lactat-Dehydrogenase aus TNF- α -behandelten Zellen, ein Maß für unspezifischen Zelluntergang, zeigt keinen Unterschied zu den Kontrollen, so daß eine Nekrose ausgeschlossen werden kann. Insgesamt lassen diese Befunde die Annahme einer parazellulären Barriestörung aufgrund einer generalisierten Beeinträchtigung der *Tight junctions* zu (Schmitz et al., 1999).

Neben seiner Rolle als Entzündungsvermittler ist TNF- α ein Ligand für die Aktivierung des programmierten Zelltodes durch *Apoptose* (Famularo et al., 1994; Ware et al., 1996). In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß eine TNF- α -induzierte intestinale Barriestörung nicht nur generalisiert an den epithelialen Schlußleisten (Schmitz et al., 1999), sondern auch gezielt an einzelnen Apoptosen auftritt (Bendfeldt et al., 1999; Gitter et al., 2000a). Der Effekt von TNF- α auf die Zellmigration oder Restitution von Epithelien ist allerdings nur gering untersucht (Kato et al., 1999). In dieser Studie wurden zur Charakterisierung der TNF- α -Effekte Einzelzelldefekte am Zellmodell HT/29-B6 und am Mauskolon untersucht.

2.5 Einzelzell-Läsionen und ihre funktionelle Bedeutung für die epitheliale Barriere

Epitheliale Zellen in der gastrointestinalen Mukosa sind durch den Kontakt zu Bestandteilen der Nahrung und zur Darmmikroflora in besonderem Maße schädigenden Einflüssen (Toxinen, Carcinogenen etc.) ausgesetzt (Kraehenbuhl et al., 1997). Kommt es zu einer Beeinträchtigung der epithelialen Integrität, so muß diese rasch wieder hergestellt werden (Dignass, 2001) oder eine Entzündung könnte entstehen (Gitter et al., 2001). Bei größeren und tieferen Defekten wird bei der "Heilung" ein proliferativer

Prozeß in Gang gesetzt. Prozesse dieser Art dauern mehrere Tage und sind meist vergesellschaftet mit einer Entzündungsreaktion. Oberflächliche Defekte hingegen sind überwiegend gekennzeichnet durch ein Abflachen und Migrieren der intakten Epithelzellen aus benachbarten Bereichen des Defekts. Diese Form der Reparatur von oberflächlichen Defekten wird als Restitution bezeichnet (Silen und Ito, 1985).

Die Restitution von makroskopischen Defekten, verursacht durch definierte Schädigung eines epithelialen Monolayers (z.B. mit einer Rasierklinge) und deren Modulation durch Zytokine, ist vorwiegend an Zelllinien untersucht worden (Dignass und Podolsky, 1993). Hierbei wurde die Migration der intakten Epithelzellen am Rand des Defekts in das geschädigte Areal mittels Morphometrie gezeigt. Ergänzend dazu konnte in anderen Arbeiten die Wiederherstellung der Barrierefunktion durch Messung der Gesamtleitfähigkeit mit der Ussing-Kammer-Technik verfolgt werden. Da hierbei größere Defekte untersucht wurden, brauchte die Restitution in diesen Fällen meist mehrere Stunden. Im Gegensatz zu diesen größeren Defekten, ist wenig bekannt über die schnelle Restitution kleiner epithelialer Defekte und gar nichts über die Restitution von Einzelzell-Defekten des Darmepithels.

In dieser Arbeit sollen Einzelzelldefekte funktionell untersucht werden, da es nicht ausreicht, bei dem relativ kurzen Restitutionsprozeß nur eine morphologische Analyse durchzuführen. Die konventionelle Ussing-Kammer-Technik nur läßt eine pauschale Aussage über die Gesamtleitfähigkeit zu. An der *Necturus* Gallenblase gelang es Hudspeth (Hudspeth, 1975, 1982) das Leck einer Einzelzell-Läsion mit einer einzelnen Mikroelektrode, die Potentialverschiebung bezogen auf den elektrischen Stromfluß durch das Leck erfaßte, zu messen.

2.6 Schlußfolgerungen für die eigene Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die artifiziell gesetzte Einzelzell-Läsion als Modell genutzt, um die Größe der damit verbundenen Barriestörung und die Geschwindigkeit der Reparatur zu quantifizieren. Weiterhin sollte die Bedeutung des Zytoskeletts an dem Restitutionsprozeß untersucht werden. Der Einfluß von $\text{TNF-}\alpha$, als wichtiges proinflammatorisches Zytokin im Rahmen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, wurde sowohl an dem Zellmodell als auch am nativen Gewebe der Maus untersucht.

Es wurde somit erstmals eine intestinale Zelllinie (HT-29/B6) im Vergleich zu nativen Darmgewebe mittels Conductance scanning hinsichtlich der Barrierefunktion untersucht. Nach dem Aufbau eines Versuchstandes und der Evaluierung der Methode, sowie die morphologische und elektro-physiologische Charakterisierung des Zellmodells hinsichtlich der Restitution einer Einzelzell-Läsion erfolgten vergleichende Messungen am distalen Kolon der Maus.

Durch den Einsatz von Time lapse-Videomikroskopie und Konfokalmikroskopie konnte gezeigt werden, daß der Defekt schnell durch Abflachen der benachbarten Zellen ohne Migration distaler Zellen verschlossen wird. Aktinfilamente formten dabei einen in der Literatur als sog. *purse string*-Mechanismus beschriebenen Ring um den Defekt, der mit Myosin zusammen die Seiten der Zellen nach innen zog. Gleichzeitig fungierte das Zytoskelett als Leitfaden für die neuen *Tight junction*-Proteine, die sich zwischen den Ausläufern der benachbarten Zellen formierten, um den Defekt zu schließen. Mit Hilfe einer bereits in vorherigen Arbeiten beschriebenen Variante der Conductance scanning-Technik (Gitter et al., 1997; Gitter et al., 2000b), konnte das Leck einer Einzelzell-Läsion quantifiziert werden und die zeitliche Entwicklung der Restitution funktionell charakterisiert werden.

Im einzelnen wurden folgende Schritte durchgeführt und folgende Fragestellungen bearbeitet:

Etablierung und morphologische Charakterisierung des Zellmodells

- Etablierung des Setzens und der Messung von Einzelzell-Läsionen an HT-29/B6-Zellen in der Versuchsanordnung.
- Wie verteilen sich *Tight junction*-Elemente und F-Aktin während der Restitution?
- Haben Zytoskelettmodulatoren und eine erniedrigte freie Calciumkonzentration einen morphologisch sichtbaren Einfluß auf die Restitution?

Elektrophysiologische Charakterisierung des Zellmodells

- Welchen Einfluß haben Zytoskelettmodulatoren, eine erniedrigte freie Calciumkonzentration und Rho-Kinase-Inhibitoren auf den transepithelialen Widerstand in der Ussing-Kammer?
- Wie groß ist der Leitwert einer Einzelzell-Läsion an HT-29/B6-Zellen?
- Welchen Einfluß haben Zytoskelettmodulatoren und Rho-Kinasen auf die Restitution?
- Welchen Einfluß hat eine erniedrigte freie Calciumkonzentration auf die Restitution?
- Haben proinflammatorische Zytokine (TNF- α) Einfluß auf die Restitution?
- Wirken Wachstumsfaktoren (EGF) beschleunigend auf die Restitution einer Einzelzell-Läsion?

Restitution im nativen Gewebe der Maus

- Welchen Einfluß haben Zytokine (TNF- α , IFN- γ) auf die Morphologie des Gewebes?
- Wie groß ist das Leck einer Einzelzell-Läsion im nativen Gewebe?
- Mit welcher Geschwindigkeit werden Defekte im nativen Darmepithel repariert?
- Welchen Effekt hat TNF- α auf die Restitution?
- Gibt es eine Änderung in der Restitution, wenn TNF- α zusammen mit IFN- γ eingesetzt wird?