

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie
Campus Virchow-Klinikum
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss von Galektin-1, -2 und -4 auf die Wundheilung von Darmepithelzellen

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Katrín Groth
aus Hannover

Gutachter: 1. PD Dr. med. A. Sturm
2. PD Dr. med. B. Siegmund
3. PD Dr. med. E. Cario

Datum der Promotion: 14. Juni 2009

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AB	Antibodies $\hat{=}$ AK
AK	Antikörper $\hat{=}$ AB
AS	Aminosäure/n
BAPTA-AM	Bisaminophenylethyleneglycoltetraessigsäure ein intrazellulärer Kalziumchelator
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Caco-2	Humane Kolon-Adenocarcinoma Zelllinie
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen $\hat{=}$ IBD
CU	Colitis ulcerosa
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
FACS	Durchflußzytometrie
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fmk	Fluoromethylketone
Gal	Galektin
GAM	Goat anti-mouse
GIT	Gastrointestinaltrakt
HT-29	Humane Kolonkarzinom Zelllinie
IBD	Inflammatory bowel disease $\hat{=}$ CED
IEC-6	Intestinale Epithelzelllinie 6 (Rattenepithelzellen)
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten

IL	Interleukin
Inh.	Inhibitor
kDa	kiloDalton
mAK	Monoklonaler Antikörper
MC	Morbus Crohn
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PI	Propideum Iodid
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
rpm	Umdrehungen pro Minute
STDDEV	Standardabweichung (standard deviation)
RT	Raumtemperatur
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor β
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
zVAD	Z-Val-Ala-Asp (OMethylester) ein Caspase-Inhibitor
zDEVD	Z-Asp-Glu-Val-Asp (OMethylester) ein Caspase-3-Inhibitor
zLEHD	Z-Leu-Glu(Ome)-His-Asp-(Ome)-CH ₂ F ein Caspase-9-Inhibitor
Z-LLY	Z-Leu-Leu-Tyr ein Calpain-Inhibitor

2 ZUSAMMENFASSUNG

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) werden durch die verschiedenen Grade der Oberflächenschädigung der Schleimhaut und der daraus folgenden Beeinträchtigung der epithelialen Barrierefunktion charakterisiert. Ein Wiederverschließen der epithelialen Barriere wird durch intestinale Zellmigration und Zellproliferation gewährleistet. Galektine werden immer häufiger als Regulatoren der Inflammation, bzw. Entzündungsreaktion beschrieben. Ziel dieser Arbeit ist es daher, den Einfluss von Galektin (Gal)-2 und Gal-4 auf die epitheliale Zellfunktion und die Wundheilung zu untersuchen.

Die Bindung von Gal-1 und -2 wurde mit Hilfe der Durchflußzytometrie bestimmt. Die Bindungsstellen wurden mit der SDS-PAGE Elektrophorese dargestellt. Die Zellmigration von Gal-1, -2 und -4 wurden mit Hilfe von standardisierten Wundheilungsversuchen untersucht. Zellzyklus und Apoptose wurden ebenfalls mit Hilfe der Durchflußzytometrie untersucht.

Gal-2 und -4 binden über den E-Cadherin/ β -Catenin Komplex an Epithelzellen. Beide Galektine steigern die intestinale Zellrestitution *in vitro*. Die Steigerung der Epithelzellrestitution durch Gal-2 und -4 ist unabhängig von TGF- β . Im Gegensatz hierzu reduziert Gal-1 die Epithelzellmigration in Abhängigkeit von TGF- β . Durch die Zellzyklusanalyse konnte gezeigt werden, dass Gal-2 und -4 eine gesteigerte Cyclin B1 Expression und demzufolge auch eine Zellzyklusprogression bewirken, während Gal-1 den Zellzyklus hemmt. Gal-1 steigert die Apoptose von Epithelzellen über einen Caspase-unabhängigen Mechanismus. Für Gal-2 und -4 konnte keine Induktion der Apoptose nachgewiesen werden. Gal-2 und -4 binden an intestinale Epithelzellen und fördern ihre Restitution.

Diese Arbeit kann erstmals zeigen, dass Galektine eine signifikante Rolle bei den intestinalen Wundheilungsprozessen spielen und demzufolge einen vorteilhaften Effekt auf Krankheiten haben, die durch epitheliale Barrierezerstörung charakterisiert sind, wie es bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen der Fall ist.

Schlüsselwörter: Galektine, Epithelzellen, Apoptose, Proliferation, chronisch entzündliche Darmerkrankungen

ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases (IBD) are characterized by various degrees of mucosal surface damage and subsequent impairment of the intestinal barrier function. Resealing of the epithelial barrier requires intestinal cell migration and proliferation. Galectins are increasingly recognized as novel regulators of inflammation. The aim of this thesis is to explore the effect of galectin-2 (Gal-2) and Gal-4 on epithelial cell function and wound healing.

Binding of Gal-2 and Gal-4 was determined by flow cytometric analysis and binding sites by SDS-PAGE electrophoresis. Cell migration by Gal-1, -2 and -4 was determined by a wound healing assay. Cell cycle analysis and detection of apoptosis were determined by flow cytometric analysis.

Gal-2 and Gal-4 bind to epithelial cells at the E-cadherin/ β -catenin complex. Both galectins significantly enhanced intestinal epithelial cell restitution in vitro. This enhancement of epithelial cell restitution was TGF- β -independent. In contrast, Gal-1 decreased epithelial cell migration TGF- β -dependent manner. By performing cell cycle analysis, it became clear that Gal-2 and Gal-4 increased cyclin B1 expression and consequently cell cycle progression, while Gal-1 inhibited cell cycling. Determining the influence of Gal-2 and Gal-4 on epithelial cell apoptosis we showed no induction of apoptosis, whereas Gal-1 induced apoptosis of epithelial cells significantly and caspase-independently. Gal-2 and Gal-4 bind to intestinal epithelial cells and promote their restitution.

Thus, this study provides for the first time evidence, that these galectins play a significant role in intestinal wound-healing processes and might exert beneficial effects in diseases characterized by epithelial barrier disruption like inflammatory bowel diseases.

Key words: Galectins, epithelial cells, apoptosis, proliferation, Inflammatory Bowel Diseases,

3 INHALTSVERZEICHNIS

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
2	ZUSAMMENFASSUNG	III
	ABSTRACT	IV
3	INHALTSVERZEICHNIS	V
4	EINLEITUNG	1
4.1	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED).....	1
4.2	Therapie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	3
4.3	Das intestinale Epithel.....	5
4.4	Epithelschäden und Wundheilung	6
4.5	Galektine	8
4.6	Grundlagen von Apoptose und Proliferation.....	10
4.6.1	Apoptose	10
4.6.2	Proliferation	11
5	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	12
6	MATERIAL UND METHODEN	13
6.1	Antikörper und Reagenzien.....	13
6.1.1	Medien und Puffer.....	13
6.1.2	AK und Reagenzien für Western Blot.....	15
6.1.3	AK und Reagenzien für die Durchflußzytometrie	15
6.2	Zellkultur und Zelllinien	16
6.2.1	Auftauen und Kultivieren der Zelllinien.....	16
6.2.2	Teilen und Füttern der Zellen	16
6.2.3	Zellzählung.....	17
6.3	Protokolle für die Durchflußzytometrie	17
6.3.1	Bindungseigenschaften.....	18
6.3.2	Caspasen / Apoptosesignalwege	18
6.3.3	Färbung von Cyklinen und Bestimmung des DNA-Gehalts.....	18
6.3.4	Apoptosemessung mit Annexin V	19
6.4	Immunfluoreszenzfärbung.....	19
6.5	Migration	19
6.6	Dynalbeads	20
6.7	Western Blot.....	20
6.8	Statistische Analyse	21

7	ERGEBNISSE.....	22
7.1	Bindung von Galektin-2 und Galektin-4 an gastrointestinale Epithelzellen.	22
7.2	Identifizierung der Galektin-2 und Galektin-4 Bindungsstellen	23
7.3	Auswirkungen von Galektinen auf die intestinale epitheliale Zellmigration.	24
7.4	Auswirkungen von Galektinen auf den Zellzyklus	26
7.5	Galektine haben die Fähigkeit, epithelialen Zelltod zu verursachen.....	27
7.6	Gal-1 induziert Apoptose der Epithelzellen in Abhängigkeit von Calpain ...	28
8	DISKUSSION	30
9	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	34
10	LITERATUR.....	35
11	DANKSAGUNG	41
12	LEBENS LAUF	42
13	VERÖFFENTLICHUNGEN IM RAHMEN DER PROMOTION	43
14	ERKLÄRUNG.....	43

4 EINLEITUNG

4.1 *Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)*

Zu den beiden wichtigsten Verlaufsformen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zählen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, deren Häufigkeit in den letzten Jahrzehnten zugenommen hat. Mit einer Prävalenz von 1:700 bis 1:1.500 in Mitteleuropa werden die Erkrankungen vorwiegend bei Personen zwischen dem 15. und 40. Lebensjahr beobachtet (Herold 2005).

Obwohl es Hinweise auf eine Beteiligung umweltbedingter, immunologischer und genetischer Faktoren bei der Entstehung von CED gibt, sind Ätiologie und Pathogenese noch weitgehend unbekannt. Als mögliche Faktoren werden unter anderem Nikotin, Ernährung, Hygienestandard, Klima, Umweltverschmutzung und Stress diskutiert (Fiocchi 2002). Die intestinale Gewebeschädigung bei CED wird durch das mukosale Immunsystem bewirkt (Targan, Landers et al. 1995; Shanahan 2005). Man geht davon aus, dass es bei genetisch prädisponierten Individuen zu einer überschießenden und fortlaufenden Aktivierung des mukosalen Immunsystems kommt, die durch die Präsenz der physiologischen luminalen Flora angetrieben wird (Seibold 2003).

Bei Colitis ulcerosa (CU) handelt es sich um eine CED, die meist in Schüben verläuft. Die CU beginnt im Rektum und breitet sich bei der Hälfte der Patienten nach proximal aus. Sie befällt typischerweise die Kolon-Mukosa und greift in seltenen Fällen auf die Dünndarmschleimhaut über. Leitsymptome sind blutig-wässrige oder blutig-schleimige Diarrhoen, Gewichtsverlust und Schmerzen im Bereich des Unterbauches oder der Kreuzbeinregion. Eine maligne Entartung im Dickdarmbereich wird gelegentlich beobachtet (Podolsky 1991).

Der Morbus Crohn (MC) ist durch eine diskontinuierlich auftretende entzündliche Veränderung des gesamten Gastrointestinaltraktes (GIT) mit bevorzugter Lokalisation im terminalen Ileum und Kolon gekennzeichnet. Betroffen sind im Gegensatz zur CU alle Wandschichten bis hin zu den regionalen Lymphknoten. Auch hier verläuft die Erkrankung schubweise und wird durch rezidivierende Diarrhoen und krampfartige Schmerzen v.a. im rechten Unterbauch (ähnlich Appendizitis) begleitet.

Es kommt zu einer ödematösen und fibrotischen Verdickung der segmental betroffenen Darmabschnitte mit Ausbildung von Stenosen, Schleimhautgeschwüren mit Fissuren und Fistelbildung (Herold 2005).

Die Diagnose wird aufgrund des Vorliegens der typischen klinischen Symptome, sowie einer Kombination aus Bluttests, Darmspiegelung einschließlich Biopsien, Röntgenuntersuchungen mit Kontrastmitteln, Kernspintomographie oder Computertomographie gestellt.

Neben den oben genannten intestinalen Manifestationen werden auch folgende extraintestinale Manifestationen, bzw. Komplikationen beschrieben, die etwa 25 Prozent aller an CED erkrankten Patienten zeigen. Hierzu zählen vor allem pathologische Veränderungen der Gelenke, der Gallengänge, der Haut und der Augen (Greenstein, Janowitz et al. 1976; Monsen, Sorstad et al. 1990). Zu den Gelenksveränderungen im Rahmen der extraintestinalen Manifestationen der CED werden die Arthritis vom kollagenen Typ, die Spondylitis ankylosans (Auftreten oft vor den intestinalen Symptomen) und die isolierte Arthritis gezählt. Eine spezifische, mit CED assoziierte, hepatobiliäre Erkrankung ist die primär sklerosierende Cholangitis (PSC). Es sind durchschnittlich 10 Prozent der an CED erkrankten Patienten betroffen, wobei eine 70–90 prozentige Assoziation mit CU erkennbar ist (Lindgren, Wallerstedt et al. 1996). Die Manifestation der PSC kann Jahre vor den klinischen Erstsymptomen der CED auftreten (Broome, Lofberg et al. 1995). Etwa 9 bis 19 Prozent der erkrankten Patienten (CU>MC) zeigen häufig eine Hautbeteiligung in Form von Erythema nodosum oder Pyoderma gangraenosum (Gregory und Ho 1992), seltener als Psoriasis, Vitiligo oder dem darmassoziierten Dermatose-Arthritis-Syndrom (Zauli, Fusconi et al. 1984). Okuläre Manifestationen von CED z.B. Uveitis und Episkleritis sind meist mit Gelenkerkrankungen kombiniert (Salmon, Wright et al. 1991). Neue Erkenntnisse zeigen extraintestinale Manifestationen in Form von Hörverlusten bei CU (Akbayir, Calis et al. 2005). Differenzierte Untersuchungen wiesen extraintestinale Manifestationen bei CU zu 51 Prozent, vergleichend dazu 42 Prozent bei MC nach. Das Auftreten hepatobiliärer Erkrankungen, venöser Thromboembolien und Arthralgien wurde vermehrt bei CU beobachtet, Erythema nodosum bei MC (Mendoza, Lana et al. 2005).

4.2 **Therapie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Aufgrund der vielfältigen Ursachen der CED basieren die Therapien auf einer unspezifischen Hemmung der mukosalen Entzündungsreaktion. Diese Therapien werden meist mit Hilfe von Kortikosteroiden, Aminosalizylaten oder Immunsuppressiva, z.B. Azathioprin, durchgeführt (Stange 1999). Patienten mit CED können zudem mit Antikörpern gegen TNF- α behandelt werden, sofern die herkömmliche Therapie nicht greift (Mouser und Hyams 1999; van Balkom, Schoon et al. 2002).

Bei der Therapie des MC unterscheidet man zwischen der Schubtherapie und der Remissionserhaltung. Ziel der Schubtherapie ist die Linderung der akuten Symptome. Mit der remissionserhaltenden Therapie soll die Zahl der Schübe verringert, bzw. die Zeit der Remission verlängert werden.

Für die Therapie des akuten Schubes sind Glukokortikoide die Medikamente der Wahl. Metronidazol und Ciprofloxacin können vor allem zur Behandlung von Fisteln eingesetzt werden. Bei schweren, therapierefraktären Schüben werden insbesondere TNF- α -Blocker wie Infliximab, Adalimumab aber auch Ciclosporin oder Tacrolimus eingesetzt. Die chirurgische Therapie führt zu keiner definitiven Heilung, ist aber bei schwereren Fällen unter Umständen unerlässlich, um schwere Komplikationen wie Stenosen, Fisteln, Abszesse oder Perforationen zu vermeiden.

Für die remissionserhaltende Therapie kommen derzeit zwei Medikamentengruppen in Frage: Immunsuppressiva und TNF- α -Blocker. Azathioprin, bzw. 6-Mercaptopurin und Methotrexat sind als Immunsuppressiva für die Therapie des MC zugelassen. Sie können mitunter schwere Nebenwirkungen haben, so dass Patienten engmaschig kontrolliert werden müssen. Als TNF- α -Blocker sind derzeit Infliximab und Adalimumab zugelassen. TNF- α ist ein multifunktionaler Signalstoff (Zytokin) des Immunsystems, welcher an lokalen und systemischen Entzündungen beteiligt ist. TNF- α wird hauptsächlich von Makrophagen ausgeschüttet. Seine wichtigste Funktion ist, die Aktivität verschiedener Immunzellen zu regeln. Er kann den Zelltod (Apoptose), Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Ausschüttung anderer Zytokine anregen. TNF- α ist bei Patienten mit MC erhöht. Infliximab ist aus einem maus-human-chimären AK entwickelt worden. Während der Behandlung mit Infliximab

werden jedoch häufig andere AK erzeugt, welche die Wirkung des anti-TNF- α -AK abschwächen (Baert, Noman et al. 2003) und Unverträglichkeiten verursachen (Typ I Hypersensitivität). Darüber hinaus scheint Infliximab das Immunsystem im allgemeinen zu unterdrücken und damit den Organismus sekundären Superinfektionen auszusetzen und folglich Sepsis, Tuberkulose und Tod zu verursachen. Adalimumba, welches seit 2003 für die Behandlung des MC zugelassen ist, ist im Unterschied zu Infliximab aus einem voll human monoklonalen AK (mAK) entwickelt worden. Demnach beinhaltet Adalimumba keine tierischen Anteile, welches die Unverträglichkeitsreaktionen reduzieren soll. Jedoch bleibt Infliximab bis heute wirksamer als Adalimumba, so dass dieses nur zum Einsatz kommt, wenn die Therapie mit Infliximab nicht vertragen, bzw. eine Resistenz entwickelt wird. Zurzeit wird auch Certolizumab (Pegol®) getestet, so dass es wahrscheinlich bald drei TNF- α -AK für die Therapie des MC gibt (Podolsky 2002; AWMF 2003).

Zur Behandlung der CU steht wie zur Behandlung des MC eine Reihe von Medikamenten zur Verfügung, die jedoch vor allem bei längerer Anwendung mitunter starke oder zumindest unangenehme Nebenwirkungen haben können. Gemäß den aktuellen Leitlinien (AWMF 02/2004) zur Behandlung von CU wird Mesalazin oder ein anderes 5-ASA-Präparat zur Dauerbehandlung empfohlen, da es nicht nur entzündungshemmend wirkt, sondern auch das Darmkrebs-Risiko verringert. Mesalazin gilt als Medikament mit nur geringen Nebenwirkungen. Bei Unverträglichkeit weicht man meist auf Sulfasalazin aus. Wenn die 5-ASA nicht ausreicht, wird zunächst Kortison örtlich oder systemisch für kurze Zeit eingesetzt.

Ferner besteht die Möglichkeit der Therapie mit den probiotischen Bakterien E-Coli-Nissle-1917 (Mutaflor®), welche sich bei der Remissionserhaltung in mehreren Studien als wirksamer Ersatz von 5-ASA-Präparaten erwiesen haben (Rembacken, Snelling et al. 1999; Kruis, Fric et al. 2004).

Studien haben auch eine Wirksamkeit des TNF- α -Blockers Infliximab (Remicade®) bei CU nachgewiesen, so dass Infliximab seit 2006 auch zur Therapie der CU eingesetzt wird. Die medikamentös nicht heilbare CU ist eine Erkrankung, die durch eine totale Dickdarmentfernung (Kolektomie) geheilt werden kann. Als Faustregel

kann Infliximab bei Patienten eingesetzt werden, welche einer Operation gegenüber eher ablehnend eingestellt sind, und wenn Ciclosporin kontraindiziert ist.

Ist eine längerfristige Immunsuppression sinnvoll, sollte zunächst Azathioprin eingesetzt werden. Bei Unverträglichkeit kann auf 6-Mercaptopurin ausgewichen werden.

Die Behandlung der CED ist demnach sehr komplex und es gibt bisher noch keine zufriedenstellende Therapie. Folglich gibt es einen großen Bedarf für alternative und effiziente Behandlungsmöglichkeiten von Autoimmunerkrankungen, insbesondere für CED.

4.3 ***Das intestinale Epithel***

CED werden nach dem Grad der Oberflächenschädigung der Schleimhaut und dem Vorhandensein von Ulzerationen eingeteilt. Ferner beeinträchtigen Ulzerationen und Entzündungen die intestinale Barrierefunktion. Diese spielt eine entscheidende Rolle, wenn es darum geht, Noxen und Krankheitserreger im Darmlumen von der darunterliegenden Mukosa fernzuhalten, womit eine direkte Interaktion und unkontrollierbare Darmentzündung oder allgemeine Immunantwort verhindert wird (Dignass 2001). Nach Beschädigungen der Schleimhaut ist also ein schnelles Heilen dieser Epitheloberflächen essentiell, um Entzündungen zu verhindern und die intestinale Homöostase aufrecht zu erhalten (Dignass 2001; Dignass, Sturm et al. 2002).

Das Mukosaepithel des menschlichen Dün- und Dickdarms ist durch einen hohen Zellumsatz mit nahezu komplettem Austausch der intestinalen Epithelzellpopulation innerhalb von 24 bis 96 Stunden gekennzeichnet (Lipkin, Sherlock et al. 1963; Potten, Kellett et al. 1992). Modellhaft können intestinale Epithelzellen in zwei unterschiedliche Kompartimente eingeteilt werden. Das proliferative Epithelzellkompartiment ist im Bereich der intestinalen Krypten lokalisiert und räumlich von einem funktionellen Epithelzellkompartiment getrennt, das aus zum Teil hoch differenzierten Epithelzellen im Bereich der intestinalen Villi besteht. Epithelzellen des funktionellen Epithelzellkompartiments migrieren in Richtung der Villusspitze und durchlaufen dabei eine zunehmende Differenzierung und

Spezialisierung. Unter physiologischen Bedingungen besteht ein ausgewogenes Gleichgewicht zwischen der Neubildung von intestinalen Epithelzellen durch natürlichen Zelltod, Apoptose, sowie mechanischer Abschilferung durch verschiedene luminalen Faktoren. Die Homöostase dieses Systems wird durch komplexe modulatorische Einflüsse reguliert, die nur unzureichend aufgeklärt sind.

Die Modulation intestinaler Epithelzellpopulationen erfolgt durch Faktoren, die sich im intestinalen Lumen, innerhalb des intestinalen Epithels, sowie in der benachbarten Basalmembran und der Lamina propria befinden (Dignass et al. 1995). Zu den wichtigsten modulatorischen Faktoren innerhalb des gastrointestinalen Lumens zählen Nahrungsbestandteile, Verdauungssekrete, Säure, intestinale Glykoproteine, verschiedene sezernierte regulatorische Peptide (Epidermaler Wachstumsfaktor aus dem Pankreas der Bauchspeicheldrüse), sowie Bestandteile der intestinalen Mikroflora. Zu den wichtigsten modulatorischen Faktoren innerhalb des intestinalen Epithels zählen regulatorische Peptide, die von intestinalen Epithelzellpopulationen und von intraepithelialen Lymphozyten (IEL) produziert werden, sowie Hormone und lokale Zell-Zell-Interaktionen.

4.4 Epithelschäden und Wundheilung

Das Epithel des Intestinaltraktes ist eine wirksame Barriere gegen ein breites Spektrum von Noxen und antigen wirkenden Substanzen innerhalb des gastrointestinalen Lumens und aus dem Organismus. Bei CED und bakteriellen Infektionen oder auch beim normalen Verdauungsprozess kommt es zu kleinen, oberflächlichen, größeren oder tiefen Epithelläsionen (Neurath und Schurmann 2000). Aus einer geschädigten epithelialen Barriere resultiert ein erhöhter Durchtritt toxischer und antigen wirkender Substanzen, die zu lokalen Entzündungsreaktionen, unkontrollierter Immunantwort und Dysregulation der Homöostase führen können. Für die Aufrechterhaltung der epithelialen Barrierefunktion ist eine schnelle Abdichtung des geschädigten Gewebes notwendig (Gitter, Wullstein et al. 2001).

Eine Schädigung des intestinalen Epithels *in vivo* kann sowohl in einer Reihe von Tiermodellen durch luminalen Applikation von toxischen Substanzen (Essigsäure, Dextransulfat), als auch im Rahmen verschiedener intestinaler Krankheitszustände

beim Menschen, wie zum Beispiel CED, einheimische Sprue oder Strahlenenteritis beobachtet werden (Elson, Sartor et al. 1995).

Es werden zwei Arten von Wunden in der gastrointestinalen Mukosa unterschieden. Zum einen gibt es tiefe Verletzungen, die mit Hämorrhagien und Nekrosen einhergehenden. Zum anderen gibt es oberflächliche Verletzungen des intestinalen Epithels, bei denen die Basallamina unverletzt bleibt. Die mukosale Wundheilung richtet sich nach dem Schadenstyp.

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

Die gastrointestinale Wundheilung kann stark vereinfacht in drei Phasen eingeteilt werden (Dignass et al. 1995). In der ersten Phase migrieren die an die Wunde angrenzenden Zellen, um eine Wundabdeckung zu erzielen. Während dieser Zellmigration flachen die Zellen ab, bilden Pseudopodien-ähnliche Strukturen aus (Lamellipodien) und reorganisieren zusätzlich ihr Zytoskelett. Dieser wenige Minuten bis Stunden andauernde Prozess der Migration und Reorganisation wird Restitution genannt. Die epitheliale Restitution konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden (Lacy 1988; Nusrat, Delp et al. 1992). Er ist der Initialschritt

der epithelialen Wundheilung und wird vollkommen getrennt von einer Zellproliferation betrachtet. Parallel zur, bzw. im Anschluss an die epitheliale Restitution tritt dann eine Steigerung der epithelialen Zellproliferation ein, um zugrunde gegangene Zellen zu ersetzen. In der dritten und letzten Phase erfolgt dann eine Differenzierung und Reifung der zunächst unreifen, durch gesteigerte Zellproliferation nachgewachsenen Zellen, so dass die differenzierten Funktionen des ausgereiften intestinalen Oberflächenepithels wieder aufgenommen werden können.

Bei größeren, bzw. tiefen Defekten setzt zusätzlich eine Zellproliferation und -differenzierung ein. Hierbei spielen entzündliche Prozesse ebenfalls eine Rolle. Verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren haben einen Einfluss auf die Restitution und auch auf die Wundheilung von geschädigtem intestinalen Epithel (Ciacci, Lind et al. 1993; Dignass und Podolsky 1993; Kato, Chen et al. 1999).

Diese mechanische Trennung der intestinalen epithelialen Wundheilung in drei distinkte Vorgänge impliziert eine starke Vereinfachung. *In vivo* wird in der Regel eine derart deutliche Trennung dieser Reparaturvorgänge nicht möglich sein. Es ist vielmehr davon auszugehen, dass die Vorgänge der intestinalen epithelialen Restitution, der epithelialen Zellproliferation und der epithelialen Zelldifferenzierung nicht nur nacheinander, sondern auch parallel zueinander verlaufen. Dennoch sollte die intestinale epitheliale Wundheilung modellhaft auf die drei oben genannten Grundprinzipien zurückgeführt werden, um die einzelnen Phasen anschaulich charakterisieren zu können.

4.5 **Galektine**

Galektine sind Mitglieder einer stark konservierten Familie von β -Galactosidase-bindenden Lektinen, die sich mehr und mehr als signifikante Regulatoren der Immunzell-Homöostase abzeichnen (Rabinovich, Baum et al. 2002). Die biologischen Eigenschaften von Galektinen beinhalten die Regulation von Zellproliferation, Entzündung, Zelladhäsion und Zelltod (Cooper und Barondes 1999; Rabinovich 1999; Liu 2000). Eine Zahl von Experimenten, in denen gezeigt werden konnte, dass Galektine bei der Modulation von CED, Autoimmunerkrankungen und Tumoren eine wichtige Rolle spielen, wurden kürzlich in einem Review zusammen

gefasst (Liu und Rabinovich 2005). Galektine zeichnen sich durch eine Kohlenhydrat-Bindungs-Domäne (carbohydrate recognition domain, CRD) bestehend aus ca. 130 für die Bindung verantwortlichen Aminosäuren (AS) aus. Bisher sind 15 verschiedene Galektine in Säugern bekannt. Interessanterweise verhalten sich eine Reihe von Mitgliedern dieser Proteinfamilie, trotz hoher Sequenzähnlichkeit und ähnlicher Kohlenhydrat-Spezifität, als Verstärker der Entzündungskaskade, während andere homöostatische Signale aktivieren, um Immunantworten zu verhindern (Rabinovich, Rubinstein et al. 2002). Demzufolge muss das, was auf ein Mitglied der Galaktin-Familie zutrifft, nicht unbedingt auf andere Mitglieder zutreffen.

Galektine werden in 3 Gruppen eingeteilt: Galektine vom Proto-Typ (Gal-1, -2, -5 und -7), vom Tandem-repeat Typ (Gal-4, -6, -8, -9 und -12) und vom Chimären-Typ (Gal-3) (Cooper und Barondes 1999; Liu und Rabinovich 2005). Wie oben bereits erwähnt ist allen Mitgliedern der Galektin-Familie gemein, dass sie an β -Galactoside binden. Dennoch hat jedes Galektin eine einzigartige Spezifität für bestimmte langkettige Oligosaccharide. Somit kann jedes Galektin an unterschiedliche glykokonjugierte Rezeptoren binden. Diese spezifischen Bindungseigenschaften ergeben die unterschiedlichen Downstream-Effekte in der Kaskade (Brewer, Miceli et al. 2002). T-Zell-Aktivierung wird beispielsweise von Gal-1 inhibiert, von Gal-4 gefördert und bleibt von Gal-2 unbeeinflusst (Liu und Rabinovich 2005).

In Hinsicht auf den GIT haben Gal-2 und Gal-4 eine bedeutende Funktion. Es wurde gezeigt, dass beide Galektine vom gastrointestinalen Gewebe exprimiert werden, jedoch nicht vom Gewebe des Gehirns, der Niere, der gestreiften Muskulatur, der Leber und der Lunge (Huflejt und Leffler 2004). Obwohl wiederholt in gastrointestinalen Inflammationsmodellen gezeigt wurde, dass Gal-2 und Gal-4 von gastrointestinalen epithelialen Zellen exprimiert werden (Paclik, Berndt et al. 2007), bleiben ihr Effekt auf die epitheliale Zellfunktion und Wundheilungsprozesse bisher weitestgehend unerforscht. Zum Vergleich wurde Gal-1 herangezogen, da dort die Datenlage am besten ist, um familiäre Effekte von Galektin-spezifischen Effekten zu unterscheiden.

Gal-2 wurde bei der Klonierung von Gal-1 entdeckt und besitzt eine 43%-ige Sequenzhomologie mit Gal-1, was die höchste Homologie mit Gal-1 unter allen anderen untersuchten Galektinen darstellt (Gitt 1997). Gal-2 ist ein nicht-kovalentes

Dimer mit Untereinheiten von ca. 14 kDa (Gitt 1997). Die Expression von Gal-2 scheint auf den GIT beschränkt zu sein (Oka, Murakami et al. 1999; Lahm, Andre et al. 2001). Es ist weiterhin bekannt, dass Darmepithelzellen, die Gal-2 exprimieren, normalerweise kein Gal-1 exprimieren, und dass Gal-2 in Gal-1-Null-Mutanten Mäusen nicht auf einem höheren Niveau exprimiert wird (Marschal, Cannon et al. 1994). Während die Eigenschaften von Gal-1 auf umfangreiche Weise untersucht wurden, wurde die Funktion von Gal-2 bis jetzt nicht untersucht und bleibt somit unklar.

4.6 **Grundlagen von Apoptose und Proliferation**

Viele Krankheiten basieren entweder auf einem unkontrollierten Zellzyklus oder gestörter Apoptose. Beides kann zu unkontrollierter Zellproliferation und damit zu Krebs oder Autoimmunstörungen, wie etwa chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, führen. Diese Krankheiten sind bis zum heutigen Tag nicht heilbar, und die existierenden Behandlungsmöglichkeiten sind entweder nicht sehr effizient oder zeigen schwerwiegende Nebenwirkungen. Gal-2, insbesondere humanes Gal-2, ist nicht immunogen und daher besonders für die Anwendung als Medikament geeignet. Auch Gal-4, welches ebenfalls von humanen Epithelzellen produziert wird, zeichnet sich dadurch aus.

4.6.1 **Apoptose**

Wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, spielt Apoptose eine bedeutende Rolle bei CED. Im physiologischen Ablauf der Apoptose können drei verschiedene Phasen unterschieden werden, die durch biochemische Faktoren und morphologisch sichtbare Phänomene charakterisiert sind: Initiierungsphase, Effektorphase und Degradierungsphase (Susin, Zamzami et al. 1997). In der *Phase der Initiierung* wird der Apoptoseprozess durch zellinterne oder zellexterne Stimuli, wie Hormone, Zytokine oder chemische, bzw. physikalische Komponenten ausgelöst. In der *Effektorphase* ist die zelluläre Signalkaskade, die über Caspasen zur Apoptose führt, aktiviert. Der Ablauf ist bis zu dieser Phase reversibel. Die Prozesse der nun folgenden Phase der *Degradierung* sind irreversibel. Morphologisch erfolgt zunächst eine Zellschrumpfung und -verdichtung. Das Kernchromatin kondensiert und erscheint in granulären Ansammlungen an den Kernmembranrand gedrängt (Chromatinmargination) (Majno und Joris 1995; Soini, Paakko et al. 1998). Endonukleasen fragmentieren die DNA in Segmente von ca. 185 bp (Majno und Joris

1995). Es kommt zum Zellzerfall mit Bildung von Apoptosekörpern (=apoptotische Zelle), die u.a. Kernreste enthalten und rasch von benachbarten Makrophagen eliminiert werden (Soini, Paakko et al. 1998). Mit Hilfe der Durchflußzytometrie lassen sich die Zellen in drei Gruppen unterteilen. Zum einen in lebende Zellen, sowie in Zellen, die sich in der Apoptose befinden und in nekrotische Zellen.

4.6.2 Proliferation

Die Zellproliferation läuft in vier Phasen ab: G1, S, G2 und Mitosephase; weiterhin existiert die G0 Phase. Der Zellzyklus soll hier nur grob zur Orientierung wiedergegeben werden. Die G0 Phase entspricht der Ruhephase, in der sich die Zelle zwischen zwei Zyklen befindet. In ihr befinden sich auch die postmitotischen Zellen, also Zellen die kein Signal für den Zellzyklus erhalten. Die G1 Phase oder Präsynthesephase findet sich im Anschluss an die Mitose. In ihr wächst die Zelle und ihre Bestandteile, wie das Zytoplasma oder die Zellorganellen. Es findet die Proteinbiosynthese statt. Danach schließt sich die S Phase (Synthese Phase) an, in welcher die Reduplikation der DNA und der Chromosomen erfolgt. Als nächste Phase folgt die G2 Phase, welche auch als Postsynthesephase bezeichnet wird und durch die Zellvorbereitungen zur Mitose gekennzeichnet ist. In dieser Phase teilen sich die Zentriolenpaare, und es lösen sich auch die Zell-Zell-Kontakte. In der Mitosephase findet schließlich die Teilung von Chromosomen, Zellkern und Zelle statt. Die Mitosephase wird in vier Unterphasen geteilt, die Pro-, Meta-, Ana- und Telophase genannt werden. Danach geht die Zelle wieder in die G1 Phase über. Mittels einfacher lichtmikroskopischer Untersuchungen kann nicht immer geklärt werden, in welcher Phase des Zyklus sich die Zelle befindet (Liebich 1993; Tessema, Lehmann et al. 2004).

5 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen sind weltweit verbreitet und werden multifaktoriell verursacht, wobei die genaue Pathogenese noch nicht bekannt ist. Galektine werden zunehmend als Regulatoren von Entzündungsreaktion beschrieben (Liu und Rabinovich 2005). Die Behandlung der CED ist weiterhin eine große therapeutische Herausforderung und das heterogene Ansprechen der Patienten auf die Behandlung spiegelt wahrscheinlich die heterogenen Mechanismen der mukosalen Entzündungsreaktion wieder. Ein besonderes Augenmerk wird in dieser Arbeit auf Gal-2 und Gal-4 gelegt, da diese von humanen und murinen Epithelzellen im Gastrointestinaltrakt exprimiert werden (Nio, Kon et al. 2005; Paclik, Berndt et al. 2007). Gal-2 und -4 könnten in der Pathogenese der CED eine noch unerkannte, zentrale Rolle spielen und möglicherweise einen wichtigen therapeutischen Effekt in der Behandlung einer mukosalen Entzündungsreaktion haben.

Das Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war es herauszufinden, inwiefern Gal-2 und -4 Einfluss auf die mukosalen Entzündungsreaktionen nehmen, welchen Einfluss sie auf Migration, Proliferation und Apoptose haben und über welche Signalwege sie wirken. Zum Vergleich wurde Gal-1 herangezogen, um familiäre Effekte von spezifischen Effekten abzugrenzen. Damit wurde eine Basis für potentielle alternative und effektivere Behandlungsmethoden geschaffen.

6 MATERIAL UND METHODEN

6.1 *Antikörper und Reagenzien*

Nicht erwähnte Materialien, Reagenzien und Geräte entsprechen denjenigen, die in der Laborroutine in einem medizinisch-naturwissenschaftlich arbeitenden Labor verwendet werden und bei entsprechenden Firmen zu beziehen sind. Das gleiche gilt für Lösungen und Reagenzien, deren Zusammensetzung nicht näher erläutert wird. Alle Reagenzien wurden wie vom Hersteller empfohlen gelagert und gelöst oder verdünnt.

6.1.1 **Medien und Puffer**

<u>Medium für Caco-2 und HT-29:</u>	DMEM (+Glukose,+Glutamat) 10% fetales Kälberserum (FCS), 2% Penicillin/ Streptomycin (10.000 U/ml), 1% Natrium- Pyruvat, Aufbewahrung bei 4°C
<u>Medium für IEC-6:</u>	wie für Caco-2 und HT-29 mit zusätzlich 0,25% Insulin, Aufbewahrung bei 4°C
<u>Reduziertes Medium für Migrationsversuch:</u>	Medium wie oben nur FCS in 0,1% Konzentration
<u>Einfriermedium:</u>	FCS 10% DMSO , Aufbewahrung bei -20°C
<u>10xPBS- Stammlösung:</u>	2,0 g KCl, 80,0 g NaCl, 2,0 g KH ₂ PO ₄ , 4,0 g Na ₂ HPO ₄ xH ₂ O mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen bei Raumtemperatur (RT) lagern
<u>FACS- Puffer:</u>	96,5% PBS 2,5% FCS 1% NaN ₃

<u>PBS/ BSA für Cyclin B1 Färbung:</u>	20 mg/ml BSA in PBS, pH 7,4
<u>für magnetische Beads Assay:</u>	PBS+ 0,1% BSA
<u>Tris Puffer</u>	0,2 M pH 8,5
<u>Borat Puffer</u>	0,1 M Borsäure, Natriumborat, 0,15 M NaCl in Aqua dest., pH 9,5
<u>Lyse Puffer</u>	0,5% Na-Deoxycholat, 0,1% SDS, 1% Triton-X100, 0,5% NP-40, 5 mM EDTA in PBS
<u>Rainbowmarker</u>	6-7 µl Marker 12 µl H ₂ O 5 µl LDS
<u>Lyse-Puffer:</u>	Lyse Puffer: 1% Triton-X 0,5% NP-40 0,1% SDS 0,5% Na-Deoxycholat 5 mM EDTA in PBS 50 mM Protease-Inhibitor (Sigma Aldrich) 50 mM Phosphatase-Inhibitor (Sigma Aldrich) 1 mM PMSF 100 µg/ml Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor 100 µg/ml Chymostatin in PBS
<u>Probenpuffer :</u>	NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen Corp., Karlsruhe)
<u>Wash Puffer:</u>	0,1% Tween-20 in 1xPBS
<u>Transfer Puffer:</u>	4% NuPage Transfer Buffer 20% Ethanol 76% H ₂ O

<u>Running Puffer</u> :	85,5% H ₂ O 4,5% NuPAGE SDS MOPS Running Buffer (Invitrogen Corp., Karlsruhe)
<u>Blocking Puffer</u>	5% Non Fat Dry Milk, Bio-Rad, München; 0,1% Tween-20, Merck-Schuchardt, Hohenbrunn; in 1xPBS

6.1.2 **AK und Reagenzien für Western Blot**

E-Cadherin	BD Pharmingen, Heidelberg
β-Catenin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Multimark Rainbow Marker	Invitrogen Corp., Karlsruhe
BSA (Negativkontrolle)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Protease-Inhibitor	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Phosphatase-Inhibitor	Sigma Aldrich, Taufkirchen
GAM FITC (goat)	Biosource, Solingen
RAM FITC (rabbit)	Biosource, Solingen

6.1.3 **AK und Reagenzien für die Durchflußzytometrie**

Cyclin B1	BD Pharmingen, Heidelberg
zVAD-fmk	Biomol, Hamburg
Caspase-3-Inhibitor	Calbiochem, Schwalbach
Caspase-9-Inhibitor	Calbiochem, Schwalbach
Calpain-Inhibitor	BioVision, Mountain View, CA
BAPTA-AM	Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan
Annexin V	BD Pharmingen, Heidelberg
PI	Calbiochem, Schwalbach
Laktose	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Sucrose	Sigma Aldrich, Taufkirchen
EGTA	Sigma Aldrich, Taufkirchen
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
RNAse	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

6.2 **Zellkultur und Zelllinien**

Für die Versuche wurden Caco-2, HT-29 und die intestinalen Rattenepithelzellen IEC-6 verwendet. Sowohl Caco-2 als auch HT-29 sind Zelllinien, deren Ursprung ein Adenokarzinom des humanen Kolons ist. Die Zellen wurden von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) bezogen. Sie wurden bei 37°C und 5% CO₂ unter Verwendung von Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) (beide von GIBCO, Eggenstein, Deutschland), 1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland), 2% L-Glutamine (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland) und 1,5 g/l Natriumbicarbonat gelagert und inkubiert. Das Medium für IEC-6 enthielt zusätzlich 0,1 U/ml Schweineinsulin (ICN Biomedicals, Eschwege, Deutschland). Fortlaufende Passagen der Zelllinien (Passage Nr. 21-50) wurden benutzt, um die externe Modulation der Zelltransformation zu limitieren. Die Zellen wurden für 24, 48 oder 72 h unter der Anwesenheit oder Abwesenheit von Gal-1, -2 oder -4 inkubiert.

6.2.1 **Auftauen und Kultivieren der Zelllinien**

Die Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die oben genannten Zellen wurden in einem Stickstofftank in DMSO gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen sofort in ein 50 ml Falcon Röhrchen mit 35-40 ml Medium (DMEM) überführt und für 8 min bei 4°C und 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit Medium gewaschen und wie oben zentrifugiert, um das DMSO vollständig zu entfernen. Die Zellen wurden dann in 15-20 ml DMEM aufgenommen und in eine 250 ml Zellkulturflasche überführt. Dann wurde die Flasche bei 37°C, und 5% CO₂ im Inkubator gelagert.

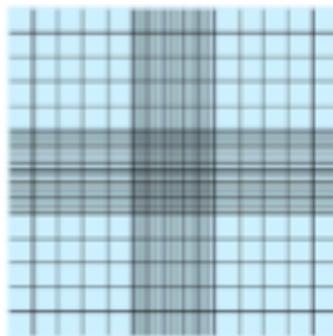
6.2.2 **Teilen und Füttern der Zellen**

Alle 2-3 Tage wurde das Medium gewechselt. Wenn die Zellen den Flaschenboden komplett besiedelten, wurden die Zellen wie folgt geteilt. Das Medium wurde abgesaugt. Danach wurden die Zellen 2x mit vorgewärmten PBS (37°C) gewaschen. Anschließend wurde 2 ml vorgewärmtes (37°C) Trypsin auf die Zellen gegeben, um sie vom Flaschenboden zu lösen. Die Zellen wurden für eine halbe Minute mit dem Trypsin inkubiert, danach wurde das Trypsin abgesaugt und die Zellen für weiter für 3-5 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mit 3 ml vorgewärmten PBS aufgenommen, in ein Falcon Röhrchen mit Medium überführt und für 5 min bei 4°C

und 1500 rpm zentrifugiert. Das Medium wurde verworfen und die Zellen wurden in neues DMEM aufgenommen und in eine größere oder zwei neue Flaschen überführt. Waren genügend Zellen vorhanden, wurden die überschüssigen verworfen.

6.2.3 Zellzählung

Die Zellen wurden trypsinisiert, mit PBS abgelöst und in einem 15 ml Falcon Röhrchen mit 10 ml DMEM überführt und bei 4°C und 1500 rpm 5 min lang zentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt. Die Zellen wurden zunächst in 1 ml DMEM resuspendiert und einige Male vorsichtig hoch und runter pipettiert, um die Zellen voneinander zu trennen und dann mit DMEM auf 10 ml aufgefüllt. Es wurden dann 10 µl entnommen und in ein Well einer 96er Wellplatte pipettiert. Ferner wurden 10 µl Trypanblau (Sigma Aldrich, Taufkirchen) hinzugegeben und kurz gemischt. 10 µl dieses Ansatzes wurden in die Neubauer-Zählkammer überführt.



Neubauer-Zählkammer

Jeweils die oberen vier Zählkammern der vier Quadranten wurden gezählt, addiert und durch vier geteilt dann mit 8×10^4 multipliziert. So erhielt man die Anzahl der Zellen, die sich in einem ml Medium befanden. Um nun die gewünschte Zellmenge für den Versuch zu erhalten, wurde die gewünschte Zellzahl durch die ermittelte Zellzahl in den Zählkammern geteilt und mit 100 multipliziert. So erhielt man die benötigte Menge in µl.

6.3 *Protokolle für die Durchflußzytometrie*

Die Durchflußzytometrie stellt ein Verfahren dar, mit dem einzelne, in Lösung befindliche Zellen aufgrund ihrer Größe, ihrer Lichtbrechungseigenschaften und ihrer Fluoreszenz unterschieden werden können. Um die Aussagekraft der Messung zu

erhöhen, werden mehrere Eigenschaften simultan gemessen. Man verwendet außerdem fluorchrom-konjugierte AK und Reagenzien, um Oberflächenmerkmale, Proteine, DNA-Gehalt und andere Merkmale messbar zu machen.

6.3.1 Bindungseigenschaften

Um die Bindungseigenschaften der Galektine an IEC-6 und Caco-2-Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen mit 5 µg/ml Gal-2 und Gal-4 in Anwesenheit oder Abwesenheit von 50 mM Laktose oder 50 mM Sucrose inkubiert und identifiziert durch die AK anti-Gal-2 und anti-Gal-4 und PE-markiertem AK. Die Bindung von Galektin an die Zellen wurde mit Hilfe des Flowzytometers (FACSCalibur; BD Biosciences) quantifiziert.

6.3.2 Caspasen / Apoptosesignalwege

Um die Apoptosesignalwege zu bestimmen wurden die Zellen unter der Anwesenheit oder Abwesenheit von 50mM Breitspektrum-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk, Caspase-3-Inhibitor zDEVD-fmk, Caspase-9-Inhibitor zLEHD-fmk, Calpain-Inhibitor Z-LLY-fmk oder mit dem Ca²⁺-Chelator EGTA (4 mM) und BAPTA-AM (30 µM) inkubiert. Nach 72 h wurden die Zellen dann mit Annexin V und PI gefärbt und im FACS Gerät gemessen.

6.3.3 Färbung von Cyklinen und Bestimmung des DNA-Gehalts

Für die durchflusszytometrische Messung intrazellulärer Antigene und des DNA-Gehalts wurden die Zellen in 90%-igem Methanol fixiert. Die Arbeiten erfolgten auf Eis oder in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge. Von der Zellsuspension wurden 3x10⁵ Zellen abgenommen und in ein FACS Röhrchen gegeben. Dessen Inhalt wurde mit 500 µl kaltem PBS aufgefüllt, abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl kaltem PBS aufgenommen und dann tropfenweise 900 µl -20°C kaltes Methanol dazugegeben. Die fixierten Zellen wurden im Kühlschrank bei -20°C für mind. 30 min aufbewahrt. Das Pellet wurde in 50 µl PBS/BSA (BSA 20 mg/ml) resuspendiert. Die Zellen wurden dann mit 10 µl Cyclin B1 oder dem Isotyp gefärbt und für 45 min bei 4°C inkubiert und nach 25 min einmal durchgemischt. Nach der Inkubation mit Cyclin B1 wurden weiter 500 µl PBS/BSA zugegeben und die Zellen ruhten weitere 15 min bei 4°C. Danach wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 375 µl PBS/RNase (370 µl + 5 µl RNase) resuspendiert und 15 min bei 37°C inkubiert. Zuletzt wurden 25 µl PI

dazugegeben und für weitere 30 min im Dunklen bei RT inkubiert und anschließend mit Hilfe des FACS Gerätes gemessen.

6.3.4 Apoptosemessung mit Annexin V

Um die Auswirkungen der Galektine auf die Apoptoserate von Zellen zu messen, wurde Annexin V-FITC verwendet. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, welches in der frühen Apoptose (sowie in der Nekrose) vom inneren zum äußeren Blatt der Plasmamembran transloziert. Wenn Annexin V mit einem Fluorochrom konjugiert ist, kann man mit seiner Hilfe den Anteil der apoptotischen Zellen im Durchflusszytometer messen. Um apoptotische von nekrotischen Zellen unterscheiden zu können, muss gleichzeitig eine Färbung mit PI erfolgen. Die Zellen, die Annexin V positiv und PI negativ sind, befinden sich im Messzeitpunkt in Apoptose. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden in Annexin Bindungspuffer 10^5 Zellen pro ml aufgenommen. Davon wurden jeweils 100 μ l Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Röhrrchen mit weiteren 400 μ l Bindungspuffer aufgefüllt und sofort am Durchflusszytometer gemessen. Wir inkubierten mit 5 μ l Annexin V-FITC und 10 μ l PI.

6.4 Immunfluoreszenzfärbung

Caco-2-Zellen wurden mit 5 μ g/ml Gal-2 und Gal-4 inkubiert und mit anti-Gal-2-AK und anti-Gal-4-AK und einem PE- markiertem sekundärem AK gefärbt. Die Zellen wurden unter dem Axioskop betrachtet (Zeiss, Jena, Germany) und digitale Bilder wurden mit einer AxioCam (Zeiss) gewonnen.

6.5 Migration

Dieser Versuch wurde sowohl mit Caco-2, als auch mit IEC-6 Zellen durchgeführt. $1,8 \times 10^6$ Zellen wurden in eine Petrischalen mit dem Durchmesser 6 cm ausgesät und solange inkubiert, bis der Boden komplett zugewachsen war und man eine konfluente Monolayer erhielt. Die Zellen wurden zur Serumreduktion 2x mit vorgewärmten PBS gewaschen und über Nacht für 12 h mit reduziertem DMEM (0,1% FCS) inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Wunde mit Hilfe von einer Rasierklinge (Solingen) erzeugt. Die Wunde war ca. 20 mm breit. Anschließend wurde 2x mit PBS gewaschen, um die Zellreste zu entfernen. Die verwundeten Monolayer wurden dann mit dem reduzierten DMEM und mit 100 μ g/ml Gal-1, -2, -4 oder ohne Galektin für 48 h inkubiert. Vorher wurde noch eine geeignete Schnittstelle

gesucht, die mit Hilfe einer Kanüle markiert wurde und bei einer Vergrößerung von 5-fach und 10-fach unter dem Mikroskop fotografiert wurde. Nach 48 h wurden die Wundränder erneut fotografiert. Hierzu diente ein invertiertes ZEISS Mikroskop Telaval 31 mit einer Nikon F-601 Kamera. Um die Migration der Zellen zu bewerten, wurden die Zellen, die über die Wundränder gewachsen waren, gezählt. Der Versuch wurde für jede Zelllinie mindestens drei Mal durchgeführt und es wurden mehrere Wundgebiete analysiert und ausgezählt, um eine quantitative und repräsentative Aussage über die Migration der Zellen treffen zu können.

6.6 ***Dynalbeads***

Die potentiellen Bindungsstellen von Galektinen an Caco-2-Zellen wurden mittels Dynalbeads identifiziert. Für die Separation von mit Gal-1, -2, -4, -7 assoziierten Komplexen wurden tosyl-aktivierte supermagnetische polystyrene Beads (Dynalbeads, Dynal Biotech) mit BSA, Gal-1, -2, -4, -7 beschichtet. Nach der Inkubation wurden die Beads gewaschen und mit 0,2 M pH 8,5 Tris-Puffer geblockt und anschließend mit 1×10^7 Caco-2-Zellen für 1 h bei 4°C inkubiert. Nicht gebundene Zellen wurden durch Waschen entfernt. Die gebundenen Zellen wurden mit einem Lysis Puffer lysiert (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 0.05 % Triton X-100, 50 mM Phosphatase- und Protease-Inhibitor). Das so gewonnene Protein wurde dann mit Hilfe des Western Blots analysiert.

6.7 ***Western Blot***

Die Proteinextrakte wurden für die Dauer der Arbeit auf Eis gelagert und danach unmittelbar wieder bei -80°C eingefroren. Für Western Blots wurden je Probe 15 µg Protein eingesetzt. Die entsprechende Menge Proteinextrakt wurde mit Sample Buffer und Aqua dest. auf ein Volumen von 17,5 µl gebracht und 10 min bei 85°C in einem Blockheizgerät denaturiert. Dann wurden die Proben in die Taschen des Elektrophoresegels (NuPAGE BIS-TRIS 4-12%, Invitrogen, Karlsruhe) pipettiert und ca. 50 min bei 180 V in einer Elektrophoresekammer (Novex XCell II, San Diego, CA, USA) elektrisch aufgetrennt. Das Gel wurde dann 60 min bei 30 V auf eine Nitrocellulosemembran (Invitrogen, Karlsruhe) geblottet. Nach dem Transfer wurde die Membran über Nacht bei 4°C auf einem Schwenker in Blocking Puffer (40 ml Wash Puffer + 2 g Milchpulver) geblockt. Nach 12 h wurde die Membran 60 min bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Primärantikörper (nach Herstellerempfehlung verdünnt in 5%-iger Trockenmilch) geschwenkt. Danach wurde

die Membran 3x kurz, 1x15 min und 2x5 min auf dem Schüttler in Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper in Blocking Puffer gelöst (20 ml Blocking Puffer + 2 µl AK) und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf der Membran inkubiert, bevor die Membran erneut wie oben beschrieben gewaschen wurde. Nach 5 min Inkubation mit dem Chemilumineszenzsubstrat (PerkinElmer Life Sciences, Rodgau-Jügesheim) wurde mit der Membran in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm (Amersham Freiburg i.Br.) belichtet und entwickelt.

6.8 ***Statistische Analyse***

Die Daten werden als Mittelwert \pm Mittelwert der Standardabweichung (STDDEV) vom Mittelwert dargestellt. Um die signifikanten Unterschiede statistisch zu analysieren wurde die Varianzanalyse und der gepaarte Student's T-Test für parametrische Proben (GraphPad Prism, San Diego, CA) verwendet.

7 ERGEBNISSE

7.1 *Bindung von Galektin-2 und Galektin-4 an gastrointestinale Epithelzellen*

Wie bereits beschrieben, werden Gal-2 und Gal-4 von humanen und murinen Epithelzellen im GIT exprimiert (Nio, Kon et al. 2005; Paclik, Berndt et al. 2007). Dennoch ist unklar, ob Gal-2 oder Gal-4 auch an die intestinalen Epithelzellen binden. Um dies zu testen, wurde ein Bindungsprofil für Gal-2 und Gal-4 an Caco-2- und IEC-6-Zellen erstellt.

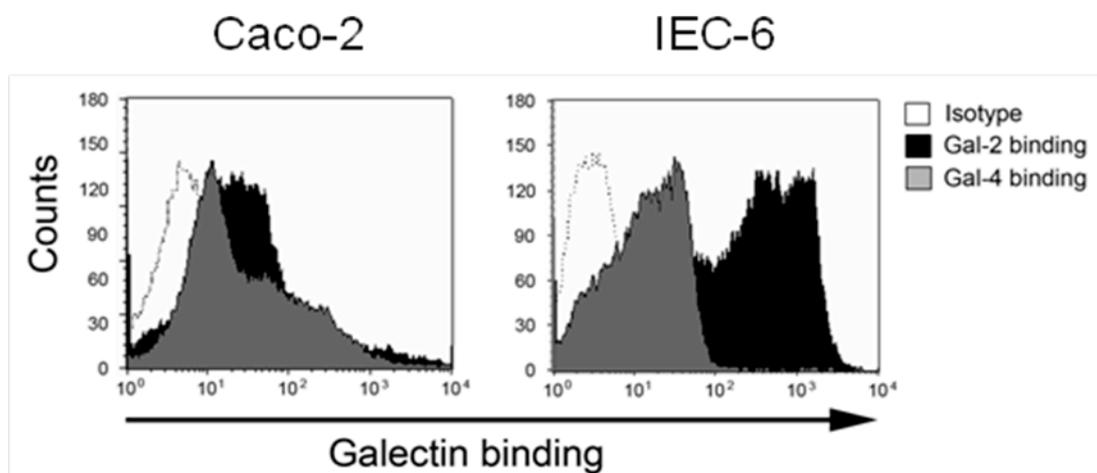


Abbildung 1 A: Flowzytometrische Analyse der Bindung von Gal-2 und Gal-4 und Caco-2- und IEC-6-Zellen mit Gal-2 und -4 unter der Verwendung von anti-Gal-2- und anti-Gal-4-AK sowie PE-markiertem sekundären AK.

Wie in Abb. 1A zu sehen ist, binden Gal-2 und Gal-4 potent an Caco-2 (links) und IEC-6 (rechts). Diese Bindung ist spezifisch abhängig von β -Galactosiden, da unter der Anwesenheit von 50mM Laktose als ein universeller Inhibitor von Galektinen die Bindung signifikant reduziert wurde (Daten nicht dargestellt). Sucrose mit derselben Konzentration zeigte keinen Effekt. Ergänzend zur Flowzytometrie wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt und auch hier bestätigte sich die potente Bindung von Gal-2 und Gal-4 an Caco-2-Zellen (Abb. 1B).

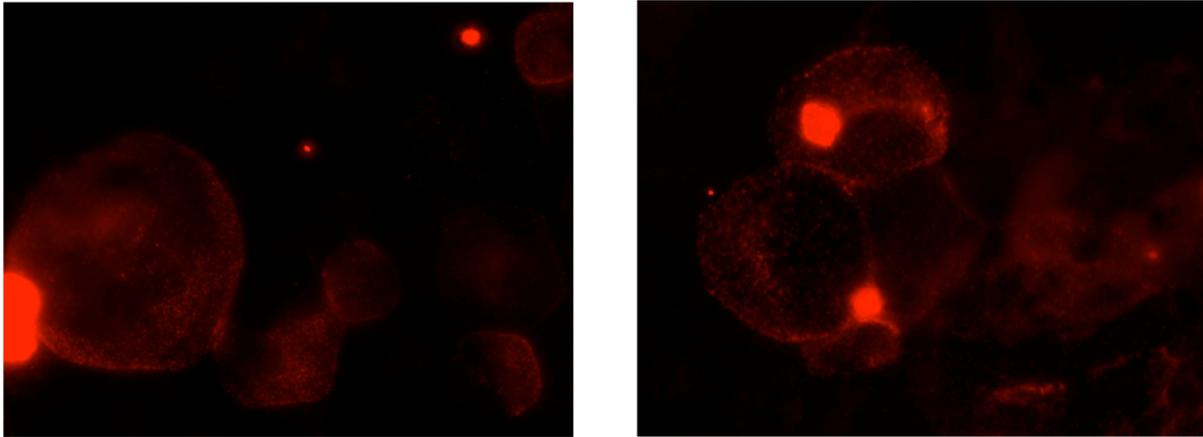


Abbildung 1 B: Immunfluoreszenzen von der Bindung von Gal-2 (links) und Gal-4 (rechts) an Caco-2-Zellen. Die Bindung wurde mit Hilfe von anti-Gal-2- und anti-Gal-4-AK und PE-markierten sekundären AK gefunden. Die Fotos wurden unter 400-facher Vergrößerung aufgenommen.

7.2 Identifizierung der Galektin-2 und Galektin-4 Bindungsstellen

Nachdem die Targets für Gal-1 und Gal-2 auf den Zelloberflächen identifiziert waren, wurde eine Immunpräzipitation gefolgt von Immunoblotting für verschiedene Zelladhäsionsproteine wie E-Cadherin und β -Catenin durchgeführt (Dynalbeads Assay). Es zeigt sich, dass alle drei Galektine an β -Catenin, ein zytosolisches Protein welches Komplexe mit E-Cadherin bildet, binden. Beim Blotting mit E-Cadherin konnte keine Bindung von Gal-1, Gal-2 oder Gal-4 nachgewiesen werden. Es war anzunehmen, dass die Struktur des Cadherin-/Catenin-Komplexes die Bindung der detektierenden Antikörper verhindert. Eine BSA Kontrolle bestätigte die Abwesenheit von nicht-spezifischen Protein-Protein-Interaktionen (Abb. 1C).

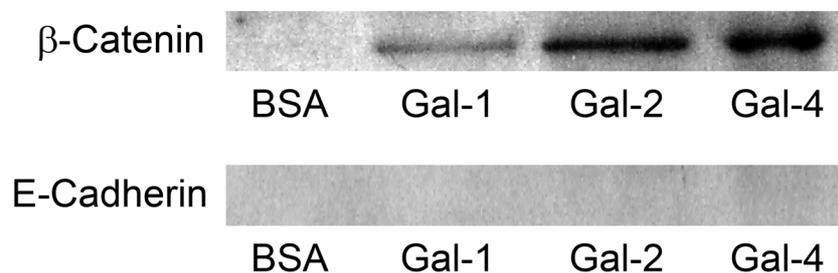


Abbildung 1 C: Die Western-Blot Daten für die Bindungsstelle von Gal-2 und Gal-4 war repräsentativ für 3 individuelle Experimente.

7.3 Auswirkungen von Galektinen auf die intestinale epitheliale Zellmigration

Um die Kontinuität der Epitheloberfläche bei einer Wunde wieder herzustellen und die offene Fläche zu bedecken, müssen Epithelzellen, die an die Wunde angrenzen, in die Wunde migrieren (Dignass, Sturm et al. 2002; Sturm und Dignass 2008). Es wurde ein standardisiertes Wundheilungsmodell mit einer konfluenten Schicht von Caco-2-, bzw. IEC-6-Zellen verwendet, um die intestinale Zellmigration zu untersuchen (Dignass und Podolsky 1993).

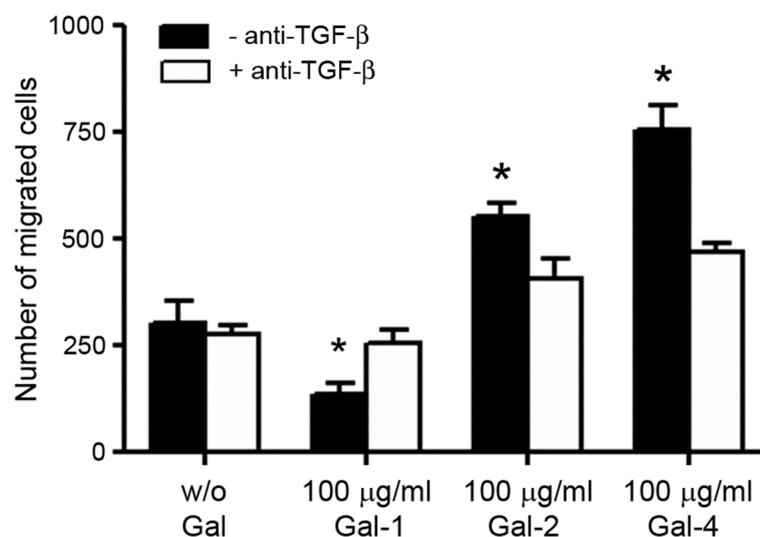


Abbildung 2A: Einfluß von Galektinen auf die Migration von Caco-2-Zellen. Eine konfluente Schicht (Monolayer) von Caco-2-Zellen wurde mit Hilfe einer Rasierklinge eine Wunde gesetzt und für 24 h in Anwesenheit oder Abwesenheit von 50 µg/ml Gal-1, Gal-2 und Gal-4 inkubiert. Um den Effekt von TGF-β auf die Zellmigration von Caco-2-Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen mit und ohne anti-TGF-β neutralisierenden AK inkubiert. Die Balken zeigen den Mittelwert der Anzahl der Zellen, die über den Wundrand migrierten, ± STDDEV der drei individuellen Experimente. *p ≤ 0.05 für den Unterschied zu 0 µg/ml des entsprechenden Galektins.

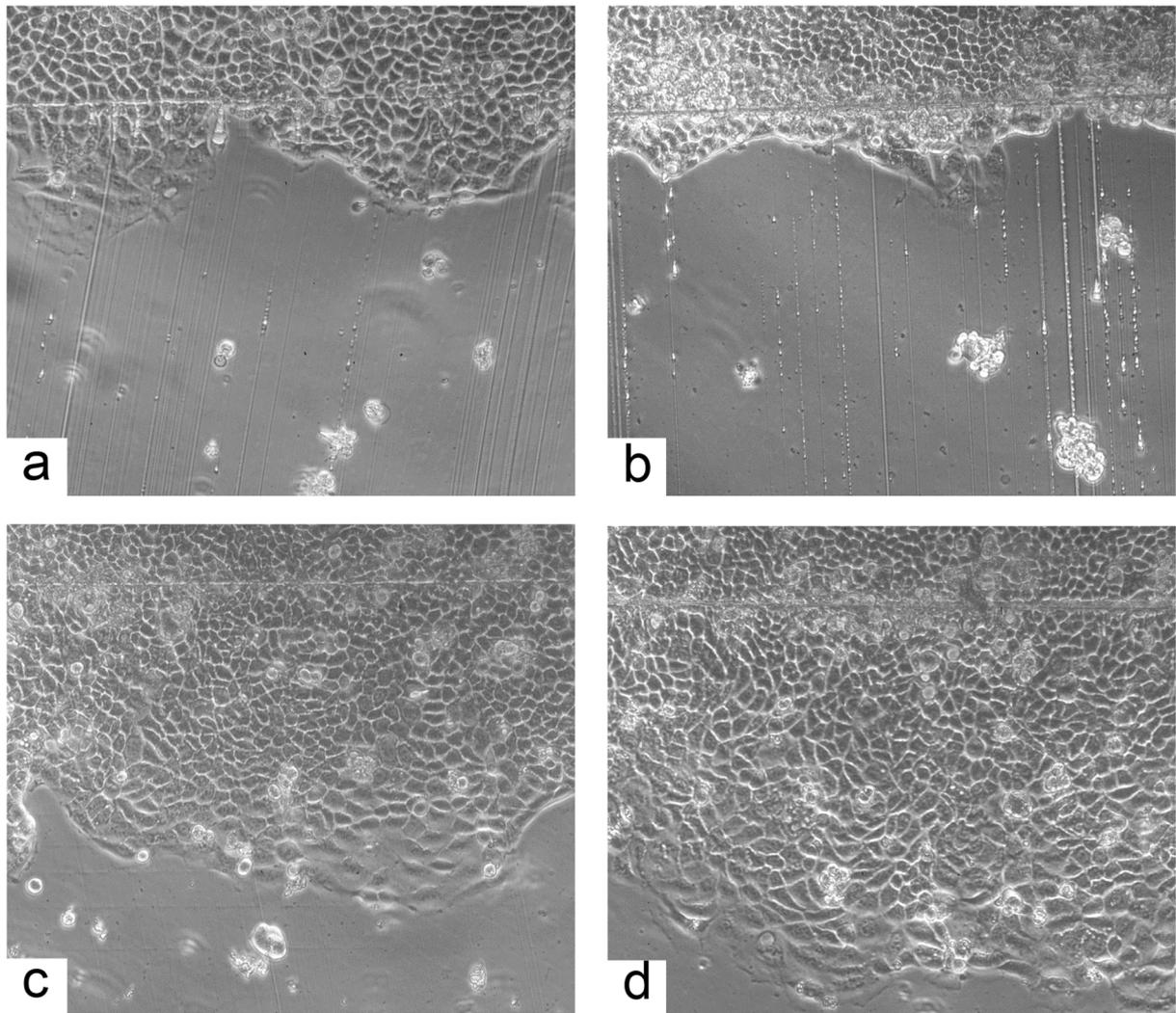


Abbildung 2B: Verwundete Monolayer von Caco-2-Zellen nach 24 h Inkubation unter Abwesenheit (a), Anwesenheit von Gal-1 (b), Gal-2 (c) oder Gal-4 (d). Fotos wurden unter 100facher Vergrößerung aufgenommen. Die Daten sind für drei individuelle Experimente repräsentativ.

Wie in Abb. 2A und B zu sehen ist, bewirken Gal-2 und Gal-4 (nicht hingegen Gal-1) eine signifikant gesteigerte Migrationsrate über die Wundkante ($p < 0,05$). TGF- β (transforming growth factor-beta1) ist einer der Schlüsselfaktoren der epithelialen Wundheilung und im Entzündungsgeschehen (Yanaka, Muto et al. 1996). Dignass et al. konnten durch in vitro-Studien an IEC-6-Monolayern zeigen, dass bei einer Verletzung eine Reihe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (TGF- β , EGF, IL-1 β , und IFN- α) die Produktion von TGF- β 1 erhöhen und somit zu einer beschleunigten Zellrestitution führen (Dignass und Podolsky 1993). Auf der einen Seite erhöht TGF- β 1 die Restitution von intestinalen Epithelien (Ciacci, Lind et al. 1993; Goke und Podolsky 1996), andererseits inhibiert er jedoch gleichzeitig ihre Proliferation (Ciacci, Lind et al. 1993). Folglich wurden die Zellen jeweils unter Anwesenheit und

Abwesenheit von neutralisierenden anti-TGF- β -AK inkubiert und es wurde getestet, ob die Gal-2- und Gal-4-Migration über die TGF- β -Signalkaskade abläuft. Interessanterweise unterbrach TGF- β die Inhibition der Zellmigration, die Migrationsrate von Gal-2 und Gal-4 erhöhte sich (Abb. 2A).

7.4 **Auswirkungen von Galektinen auf den Zellzyklus**

Während des Wundheilungsprozesses ist Zellproliferation notwendig, um den verringerten Zellpool wieder aufzufüllen. Um ein vollständiges Bild über den Zellzyklus zu erhalten, wurde der Effekt von Gal-1, Gal-2 und Gal-4 auf die Proliferation und den Zellzyklus untersucht, indem die Cyclin B1 Expression gemessen und die DNA Färbung evaluiert wurde.

Gal-1 verringerte die Proliferation signifikant um 4%, während Gal-2, Mitglied derselben Unterfamilie, die Expression von Cyclin B1 verstärkte. Derselbe Effekt konnte auch bei Gal-4 nachgewiesen werden (Abb. 3). Für Gal-2 und -4 konnte eine Steigerung um 5% gemessen werden.

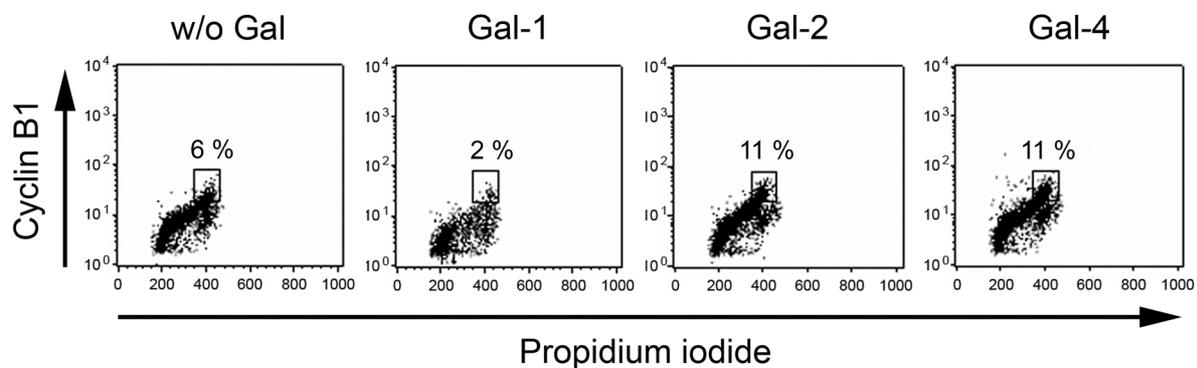


Abbildung 3: Galektine regulieren spezifisch die Zellzyklusprogression und die Expansion von aktivierten T-Zellen. Caco-2-Zellen wurden für 72 h kultiviert/gezüchtet und unter Anwesenheit/Abwesenheit von 100 μ g/ml Gal-1, Gal-2 und Gal-4 inkubiert, gefolgt von einer Cyclin B1 Färbung und der flowzytometrischen Analyse. Die Daten sind repräsentativ für fünf individuelle Experimente, die vergleichbare Ergebnisse zeigen.

7.5 **Galektine haben die Fähigkeit, epithelialen Zelltod zu verursachen**

Apoptose ist der zentrale Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Homöostase. Es wurde bereits gezeigt, dass Galektine Apoptose in verschiedenen Zelltypen regulieren (Sturm, Lensch et al. 2004), jedoch bisher nicht für epitheliale Zellen. Mittels Externalisierung von Phosphatidylserin als Apoptosemarker und DNA-Färbung als Indikator für Membrandysfunktion konnte gezeigt werden, dass Gal-1, nicht jedoch Gal-2 oder Gal-4, die Apoptose in Caco-2-Zellen sehr effektiv einleiten kann (Abb. 4A).

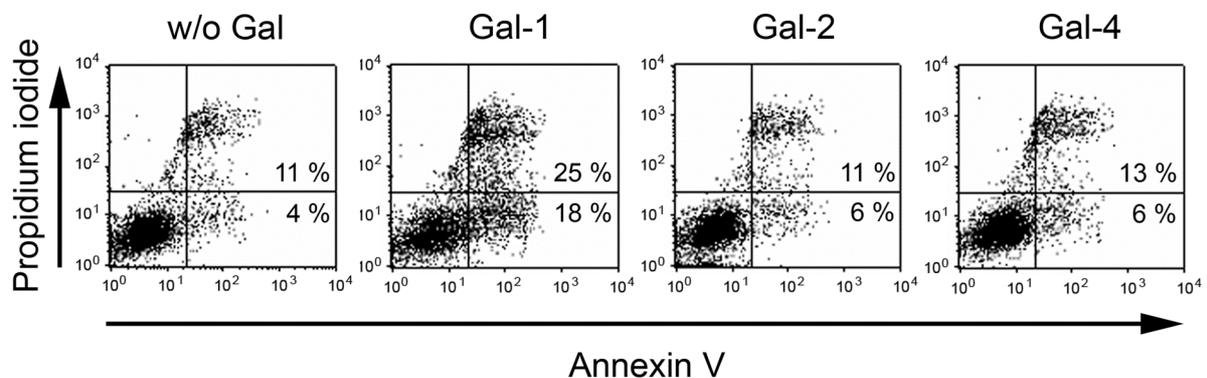


Abbildung 4A: Caco-2-Zellen wurden unter Anwesenheit oder Abwesenheit von 100 µg/ml Gal-1, Gal-2 und Gal-4 für 72 h inkubiert. Apoptose wurde mit Hilfe der Annexin V und PI Färbung bestimmt. Die Balken zeigen den Mittelwert der Anzahl der apoptotischen Zellen ± STDDEV von drei individuellen Experimenten.

Da 50 mM Laktose ausreichen, um Galektin von der Bindung an Epithelzellen abzuhalten, ist anzunehmen, dass dieser Effekt durch Blockierung der Kohlenhydrat-abhängigen Bindung ausgeschaltet werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass dies für Gal-1 zutrifft, auch unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Sucrose (Abb. 4B).

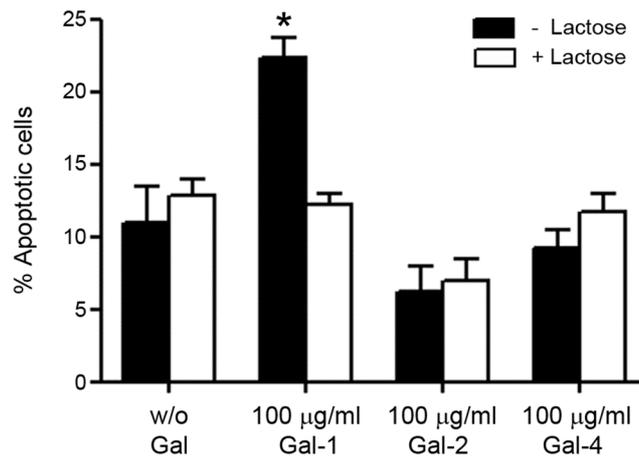


Abbildung 4B: Caco-2-Zellen wurden unter Anwesenheit oder Abwesenheit von 50 mM Laktose und 100 µg/ml Gal-1, Gal-2 und Gal-4 für 72 h kultiviert. Apoptose wurde mit Hilfe von der Annexin V und der PI Färbung bestimmt. *p ≤ 0.05 für den Unterschied zu 0 µg/ml des entsprechenden Galektins.

7.6 ***Gal-1 induziert Apoptose der Epithelzellen in Abhängigkeit von Calpain***

Caspasen spielen eine entscheidende zentrale Rolle bei der Initialisierung und Ausführung von Apoptose (Sturm, Mohr et al. 2002). Folglich züchteten wir Caco-2-Zellen unter Anwesenheit, bzw. Abwesenheit von einigen irreversiblen Caspase-Inhibitoren. Unabhängig von ihrem regulatorischen Einfluss in Kontrollexperimenten, hatten weder der Pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk (50 mM), der Caspase-3-Inhibitor zDEVD-fmk (50 mM), der Caspase-8-Inhibitor zLEHD-fmk (50 mM), noch der Caspase-9-Inhibitor zLEHD-fmk (50 mM) Einfluss auf Gal-1-induzierte Apoptose in Caco-2-Zellen (Abb. 5A).

Konsequenterweise wurden auch die Caspase-unabhängigen Apoptosewege untersucht. Calapine gehören zu der Familie der Ca²⁺-abhängigen Thiolproteasen welche Caspase-unabhängig Apoptose induzieren, indem sie eine große Vielfalt von Zytoskelett-Membran-assoziierten Regulationsproteinen proteolisieren (Leist und Jaattela 2001). Tatsächlich hemmte der irreversible Calpain-Inhibitor Z-LLY-fmk (50 mM) die Gal-1-induzierte Apoptose bei Caco-2-Zellen (Abb. 5B).

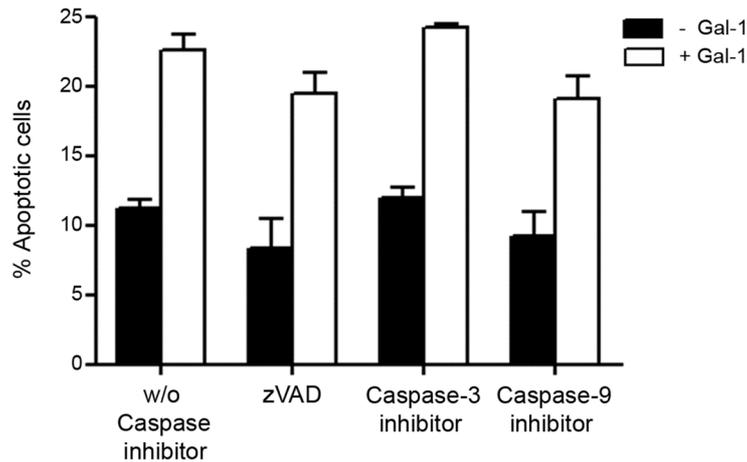


Abbildung 5A: Gal-1 induziert Apoptose Caspase-unabhängig, aber Calpain-abhängig Caco-2-Zellen wurden unter Anwesenheit oder Abwesenheit von 50 mM zVAD-fmk, Caspase-3- oder Caspase-9-Inhibitor und 100 µg/ml Gal-1 für 72 h inkubiert. Apoptose wurde mit Hilfe der Annexin V und PI Färbung bestimmt(A). Die Balken zeigen die durchschnittliche Zahl von apoptotischen Zellen ± STDDEV für vier individuelle Experimente.

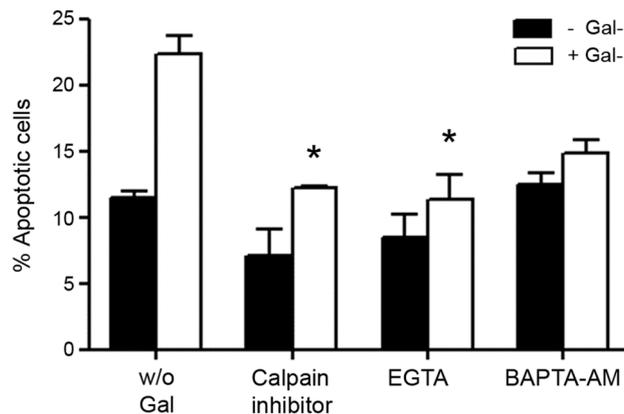


Abbildung 5B: Caco-2-Zellen wurden unter Anwesenheit oder Abwesenheit von 50 mM Calpain-Inhibitor und 100 µg/ml Gal-1 für 72 h inkubiert. Apoptose wurde mit Hilfe der Annexin V und PI Färbung bestimmt. Die Balken zeigen die durchschnittliche Zahl von apoptotischen Zellen ± STDDEV für vier individuelle Experimente.

Mit dem Ziel, die Rolle des Calpain-Signalweges zu bestätigen, wurden die intra- und extrazellulären Kalziumkanäle mit Hilfe der Ca^{2+} -Chelatbildner EGTA und BAPTA-AM gehemmt. Beide Inhibitoren waren in der Lage, die Gal-1-induzierte Apoptose ausreichend zu hemmen (Abb. 5B). Das lässt darauf schließen, dass eine vorhergehende Ca^{2+} -Mobilisierung erforderlich ist, um den Zelltod bei Caco-2-Zellen mit Gal-1 zu induzieren.

8 DISKUSSION

Schädigung und Beeinträchtigung der intestinalen Schleimhaut sind bei einer Vielzahl von gastrointestinalen Erkrankungen vorzufinden. Solche Schädigungen können zu erhöhter Anfälligkeit für Penetration oder Absorption von Toxinen und immunogenen Faktoren im Organismus führen. Folglich kann es zu Entzündungen, unkontrollierter Immunantwort und konsekutiv zu einer Störung der Homöostase kommen. Ein schneller Verschluss der epithelialen Oberfläche ist daher essentiell, um die Homöostase aufrechtzuerhalten und die mukosale Entzündungsreaktion zu limitieren. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass Galektine eine entscheidende Rolle als Regulatoren von Entzündungen und bei der Autoimmunantwort spielen (Ilarregui, Bianco et al. 2005).

Diese Arbeit konnte mit zwei voneinander unabhängigen Methoden zeigen, dass exogen verabreichtes Gal-2 und Gal-4 an Epithelzellen bindet. Die Untersuchungen haben ergeben, dass eine vollständige Konkurrenz mit Laktose, aber keine mit Sucrose um die spezifische Lektin-Kohlenhydrat-Bindungsregion erfolgt. Bei T-Zellen bindet Gal-2 an die Integrin- β 1-Region (Sturm, Lensch et al. 2004). β -Catenin, ein zytosolisches Protein welches Komplexe mit E-Cadherin bildet, wurde als weitere Bindungsstelle für Gal-2 und Gal-4 an Caco-2-Zellen identifiziert. Cadherin und Catenin spielen eine wichtige Rolle bei Zelladhäsion, Signaltransduktion und Morphologie von Epithelzellen, weshalb wir weitere Versuche mit Gal-2 und Gal-4 durchführten, um ihren Einfluss auf die Funktion von Epithelzellen zu analysieren.

Intestinale Wundheilung wird durch Migration von an das Wundgebiet angrenzenden Epithelzellen initialisiert. Die migrierenden Zellen verschließen die entblößte Fläche. Dieser Prozess, auch als epitheliale Restitution bezeichnet, erfolgt innerhalb von wenigen Minuten bis Stunden ohne begleitende Zellproliferation (Taupin und Podolsky 2003). Gal-2 und Gal-4 steigern die intestinale Restitution *in vitro* signifikant, was erstmalig den Schluss zulässt, dass verschiedene Galektine, mit Ausnahme von Gal-1, unterschiedliche, aber bedeutende Rollen bei Wundheilungsprozessen einnehmen. In vorangegangenen Studien konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass Gal-2 sowohl akute, als auch chronische, experimentell induzierte Kolitis signifikant bessert (Paclik, Berndt et al. 2007). Es konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass Gal-2 den Verschluss der mukosalen Barriere

signifikant fördert. Ferner wurde gezeigt, dass Gal-2 in der Lage ist, Entzündungen auf zwei voneinander unabhängigen essentiellen Wegen zu bessern. Hokama *et al.* zeigten in einem T-Zell-Rezeptor Knock-out-Modell, dass Gal-4 eine Verschlechterung einer intestinalen Entzündung bewirkt (Hokama, Mizoguchi *et al.* 2004). Da Gal-4 jedoch auch die Fähigkeit besitzt, die epitheliale Restitution zu steigern, kann vermutet werden, dass dieses Lektin beide Aufgaben in Hinsicht auf mukosale Entzündungs- und Heilungsprozesse übernimmt.

Vorhergehende Studien haben gezeigt, dass multiple Zytokine an der Modulation der epithelialen Restitution über TGF- β -abhängige Signalkaskaden beteiligt sind (Dignass und Podolsky 1993; Wilson und Gibson 1997; Wilson, Byron *et al.* 1999; Dignass 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Steigerung der Restitution durch Gal-2 und Gal-4 unabhängig von TGF- β ist, was vermuten lässt, dass beide Galektine auf anderen Wegen als über mukosale Zytokine oder Wachstumsfaktoren Einfluss auf die intestinale Migration von Epithelzellen nehmen. Neben der Migration ist aber auch Proliferation notwendig, um den verkleinerten Pool von Epithelzellen wieder aufzufüllen (Sturm und Dignass 2008). Anhand von Zellzyklusanalysen konnten wir in dieser Arbeit zeigen, dass Gal-2 und Gal-4 zu einer erhöhten Expression von Cyclin B1 führen und somit zu einer gesteigerten Zellzyklusprogression. Migration und Proliferation sind beide unabkömmlich für Erhaltung und Umbau der gastrointestinalen Barriere im Verlauf von verschiedenen gastrointestinalen Erkrankungen. Nach dem Beweis, dass Gal-2 und Gal-4 sowohl Migration, als auch Proliferation fördern, zeigen die Daten somit, dass Gal-2 und Gal-4 einen möglichen positiven Effekt auf Krankheiten haben, die mit einer beeinträchtigten Barrierefunktion einhergehen.

Nachdem dies für Gal-2 und Gal-4 bewiesen werden konnte, wurde Gal-1 getestet, welches eine große Ähnlichkeit mit Gal-2 aufweist. Obwohl Gal-2 eine 43%-ige Sequenzähnlichkeit mit Gal-1 aufweist (Gitt, Massa *et al.* 1992), unterscheiden sich die Einflüsse von Gal-1 und Gal-2 auf Migration und Proliferation deutlich. Im Gegensatz zu Gal-2 senkte Gal-1 die Anzahl von migrierenden und proliferierenden Zellen. Dieses Ergebnis zeigt, dass selbst innerhalb einer Subfamilie von Galektinen Epithelfunktionen unterschiedlich moduliert werden. Für Gal-4 hingegen, welches eine andere Struktur als Gal-2 hat, konnten ähnliche Eigenschaften wie die von Gal-2

gezeigt werden. Gal-2 und Gal-4 werden hauptsächlich im GIT exprimiert (Huflejt und Leffler 2004; Paclik, Berndt et al. 2007). Die belegten vergleichbaren Funktionen von Gal-2 und Gal-4 im Hinblick auf die intestinalen Wundheilungsprozesse unterstreichen die entscheidende Rolle dieser Proteine für den Verdauungstrakt. Demgegenüber könnte die Unfähigkeit von Gal-1, Migration oder Proliferation zu steigern, spekulativ im Zusammenhang mit seinem breiten Expressionsprofil in Herz, Leber und Lungen diskutiert werden (Shoji, Nishi et al. 2002).

Gesteigerte Apoptoseraten in der gesamten Krypten Villus Achse wird häufig bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beschrieben. Diese gesteigerte Epithelzellapoptose führt zur Störung der mukosalen Barrierefunktion und fördert so mukosale Entzündungen (Schulzke, Bojarski et al. 2006). Konsequenterweise sollten zur Behandlung von CED Medikamente verwendet werden, die in Epithelzellen keine Apoptose induzieren (Iwamoto, Koji et al. 1996), wobei auf mögliche Induktion von Karzinomen geachtet werden muss. Im Gegensatz zu ihrer Eigenschaft, Apoptose von T-Zellen zu modulieren und zu induzieren, zeigen Gal-2 und Gal-4 diese Eigenschaft nicht bei Epithelzellen.

Die Kohlenhydrat-abhängige Induktion von epithelalem Zelltod durch Gal-1 gibt Grund zu der Annahme, dass die verschiedenen Mitglieder der Galektinfamilien sowohl in T-Zellen, als auch in Epithelzellen einen bedeutenden direkten Einfluss auf die Apoptose haben. Ferner zeigt die Identifizierung des Calpain-Signalweges als Kaskade, über die Gal-1 epitheliale Zelltod induziert, dass die bisher untersuchten Galektine darüber hinaus auch in der Lage sind, Apoptose-Kaskaden auszulösen.

Zusammenfassend hat diese Arbeit zum ersten Mal gezeigt, dass die Kohlenhydrat-bindenden Galektine Gal-2 und Gal-4 an intestinale Epithelzellen binden und eine entscheidende Rolle bei den Reparaturmechanismen des Epithels spielen. Epitheliale Wundheilung ist ein Teil des wichtigen Prozesses zur Wiederherstellung der physiologischen Barrierefunktion, die als Folge von Zellschädigung und Apoptose verloren gehen kann. Folglich ist die Eigenschaft von Gal-2 und Gal-4, epitheliale Restitution zu fördern ein Beweis dafür, dass sie eine wichtige Rolle für den Verdauungstrakt spielen, und dass sie eine große Bedeutung in der Heilung von Krankheiten haben, die durch ernste mukosale Verletzungen, wie sie beispielsweise

durch, bzw. bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auftreten, charakterisiert sind.

9 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Obwohl CED weltweit verbreitet sind, bleibt die Pathogenese von CED bisher unklar. Eine entscheidende Rolle spielt die Schädigung der Epitheloberfläche, da sie einen Angriffspunkt für Noxen, Erreger, etc. bildet. Obwohl Galektine zunehmend als Regulatoren verschiedener Entzündungsprozesse identifiziert wurden, sind ihre Wirkungsmechanismen auf Epithelzellen bisher unerforscht. Ziel dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, ob und wie Galektine an Epithelzellen binden und welchen Einfluss sie auf essentielle Funktionen der Zellen, wie z.B. Migration, Apoptose und Proliferation von Epithelzellen haben.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Galektine an intestinale Epithelzellen über den Cadherin-/Catenin-Komplex binden. Ferner konnte aufgedeckt werden, dass Gal-2 und -4 die Migration dieser Zellen über einen Wundrand unterstützen, welches im Falle der CED eine schnellere Heilung der Ulzerationen begünstigen könnte. Die Migration läuft über die TGF- β -Signalkaskade. Es konnte gezeigt werden, dass Gal-2 und -4 einen protektiven Effekt auf Epithelzellen haben, indem sie die Apoptose nicht signifikant beeinflussen. Ganz im Gegensatz zu Gal-1, welches die Apoptose in Abhängigkeit von Calpain signifikant steigert. Die Proliferation wird durch Gal-1 verringert und durch Gal-2 und -4 gesteigert.

Es konnte bestätigt werden, dass Gal-2 und -4 einen protektiven Effekt auf CED haben, jedoch bleiben noch viele Fragen offen. Es wäre interessant herauszufinden, ob es noch andere potentielle Bindungsstellen für Galektin an Epithelzellen gibt. Da die hier präsentierten Ergebnisse auf *in vitro*-Versuchen basieren, wäre es sinnvoll, diese auch *in vivo* zu bestätigen. Es könnten auch andere epitheliale Zelllinien untersucht werden, um zu sehen, ob der Effekt konstant bleibt, bzw. allgemein gültig ist. Die Substitutionsmöglichkeiten *in vivo* wären interessant zu erforschen, auch ob es möglich ist, die verringerte Gal-2-Expression von CED-Patienten *in vivo* zu steigern.

10 LITERATUR

- Akbayir, N., A. B. Calis, et al. (2005). "Sensorineural hearing loss in patients with inflammatory bowel disease: a subclinical extraintestinal manifestation." Dig Dis Sci **50**(10): 1938-45.
- AWMF, A. d. W. M. F. e. V. (02/2004). "Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa." Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen.
- AWMF, A. d. W. M. F. e. V. (2003). "Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn." Zeitschrift für Gastroenterologie: 19-68.
- Baert, F., M. Noman, et al. (2003). "Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease." N Engl J Med **348**(7): 601-8.
- Brewer, C. F., M. C. Miceli, et al. (2002). "Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions." Curr Opin Struct Biol **12**(5): 616-23.
- Broome, U., R. Lofberg, et al. (1995). "Subclinical time span of inflammatory bowel disease in patients with primary sclerosing cholangitis." Dis Colon Rectum **38**(12): 1301-5.
- Ciacci, C., S. E. Lind, et al. (1993). "Transforming growth factor beta regulation of migration in wounded rat intestinal epithelial monolayers." Gastroenterology **105**(1): 93-101.
- Cooper, D. N. und S. H. Barondes (1999). "God must love galectins; he made so many of them." Glycobiology **9**(10): 979-84.
- Dignass, A., A. Sturm, et al. (2002). Epithelial injury and restitution. Intestinal Mucosa and its Diseases. W. Domschke, R. Stoll, T. Brasitius und M. Kagnoff, Dordrecht: Kluwer Academic Publisher: 293-99.
- Dignass, A. U. (2001). "Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair." Inflamm Bowel Dis **7**(1): 68-77.
- Dignass, A. U. und D. K. Podolsky (1993). "Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor beta." Gastroenterology **105**(5): 1323-32.
- Elson, C. O., R. B. Sartor, et al. (1995). "Experimental models of inflammatory bowel disease." Gastroenterology **109**(4): 1344-67.

- Feil, W., S. Klimesch, et al. (1989). "Importance of an alkaline microenvironment for rapid restitution of the rabbit duodenal mucosa in vitro." Gastroenterology **97**(1): 112-22.
- Fiocchi, C. (2002). "Inflammatory bowel disease: genetics and much more." Curr Opin Gastroenterol **18**(4): 408-9.
- Florian, P., T. Schoneberg, et al. (2002). "Single-cell epithelial defects close rapidly by an actinomyosin purse string mechanism with functional tight junctions." J Physiol **545**(Pt 2): 485-99.
- Gitt, M. A., E. K. Jordan, and H. Leffler (1997). "Galectin-2, Galectins-5 and -9, and Galectins-4 and -6." Trends Glycoscience. Glycotechnology.
- Gitt, M. A., S. M. Massa, et al. (1992). "Isolation and expression of a gene encoding L-14-II, a new human soluble lactose-binding lectin." J Biol Chem **267**(15): 10601-6.
- Gitter, A. H., F. Wullstein, et al. (2001). "Epithelial barrier defects in ulcerative colitis: characterization and quantification by electrophysiological imaging." Gastroenterology **121**(6): 1320-8.
- Goke, M. und D. K. Podolsky (1996). "Regulation of the mucosal epithelial barrier." Baillieres Clin Gastroenterol **10**(3): 393-405.
- Greenstein, A. J., H. D. Janowitz, et al. (1976). "The extra-intestinal complications of Crohn's disease and ulcerative colitis: a study of 700 patients." Medicine (Baltimore) **55**(5): 401-12.
- Gregory, B. und V. C. Ho (1992). "Cutaneous manifestations of gastrointestinal disorders. Part II." J Am Acad Dermatol **26**(3 Pt 2): 371-83.
- Heath, J. P. (1996). "Epithelial cell migration in the intestine." Cell Biol Int **20**(2): 139-46.
- Henrikson, C. K., R. A. Argenzio, et al. (1989). "Morphologic and functional effects of bile salt on the porcine colon during injury and repair." Lab Invest **60**(1): 72-87.
- Herold, G. (2005). Innere Medizin. Köln, G. Herold.
- Hokama, A., E. Mizoguchi, et al. (2004). "Induced reactivity of intestinal CD4(+) T cells with an epithelial cell lectin, galectin-4, contributes to exacerbation of intestinal inflammation." Immunity **20**(6): 681-93.
- Huflejt, M. E. und H. Leffler (2004). "Galectin-4 in normal tissues and cancer." Glycoconj J **20**(4): 247-55.

- Ilarregui, J. M., G. A. Bianco, et al. (2005). "The coming of age of galectins as immunomodulatory agents: impact of these carbohydrate binding proteins in T cell physiology and chronic inflammatory disorders." Ann Rheum Dis **64 Suppl 4**: iv96-103.
- Iwamoto, M., T. Koji, et al. (1996). "Apoptosis of crypt epithelial cells in ulcerative colitis." J Pathol **180**(2): 152-9.
- Kato, K., M. C. Chen, et al. (1999). "Effects of growth factors and trefoil peptides on migration and replication in primary oxyntic cultures." Am J Physiol **276**(5 Pt 1): G1105-16.
- Kruis, W., P. Fric, et al. (2004). "Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine." Gut **53**(11): 1617-23.
- Lacy, E. R. (1988). "Epithelial restitution in the gastrointestinal tract." J Clin Gastroenterol **10 Suppl 1**: S72-7.
- Lahm, H., S. Andre, et al. (2001). "Comprehensive galectin fingerprinting in a panel of 61 human tumor cell lines by RT-PCR and its implications for diagnostic and therapeutic procedures." J Cancer Res Clin Oncol **127**(6): 375-86.
- Leist, M. und M. Jaattela (2001). "Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(8): 589-98.
- Liebich, H.-G. (1993). Zelle (Cellula). Stuttgart, New York, Verlag Schattauer.
- Lindgren, A., S. Wallerstedt, et al. (1996). "Prevalence of Crohn's disease and simultaneous occurrence of extraintestinal complications and cancer. An epidemiologic study in adults." Scand J Gastroenterol **31**(1): 74-8.
- Lipkin, M., P. Sherlock, et al. (1963). "Cell Proliferation Kinetics In The Gastrointestinal Tract Of Man. Ii. Cell Renewal In Stomach, Ileum, Colon, And Rectum." Gastroenterology **45**: 721-9.
- Liu, F. T. (2000). "Galectins: a new family of regulators of inflammation." Clin Immunol **97**(2): 79-88.
- Liu, F. T. und G. A. Rabinovich (2005). "Galectins as modulators of tumour progression." Nat Rev Cancer **5**(1): 29-41.
- Majno, G. und I. Joris (1995). "Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death." Am J Pathol **146**(1): 3-15.

- Marschal, P., V. Cannon, et al. (1994). "Xenopus laevis L-14 lectin is expressed in a typical pattern in the adult, but is absent from embryonic tissues." Glycobiology **4**(3): 297-305.
- Martin, P. und J. Lewis (1992). "Actin cables and epidermal movement in embryonic wound healing." Nature **360**(6400): 179-83.
- Mendoza, J. L., R. Lana, et al. (2005). "[Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease: differences between Crohn's disease and ulcerative colitis]." Med Clin (Barc) **125**(8): 297-300.
- Monsen, U., J. Sorstad, et al. (1990). "Extracolonic diagnoses in ulcerative colitis: an epidemiological study." Am J Gastroenterol **85**(6): 711-6.
- Mouser, J. F. und J. S. Hyams (1999). "Infliximab: a novel chimeric monoclonal antibody for the treatment of Crohn's disease." Clin Ther **21**(6): 932-42; discussion 931.
- Neurath, M. F. und G. Schurmann (2000). "[Immunopathogenesis of inflammatory bowel diseases]." Chirurg **71**(1): 30-40.
- Nio, J., Y. Kon, et al. (2005). "Differential cellular expression of galectin family mRNAs in the epithelial cells of the mouse digestive tract." J Histochem Cytochem **53**(11): 1323-34.
- Nusrat, A., C. Delp, et al. (1992). "Intestinal epithelial restitution. Characterization of a cell culture model and mapping of cytoskeletal elements in migrating cells." J Clin Invest **89**(5): 1501-11.
- Oka, T., S. Murakami, et al. (1999). "Identification and cloning of rat galectin-2: expression is predominantly in epithelial cells of the stomach." Arch Biochem Biophys **361**(2): 195-201.
- Paclik, D., U. Berndt, et al. (2007). "Galectin-2 induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes and ameliorates acute and chronic experimental colitis in mice." J Mol Med.
- Paimela, H., P. J. Goddard, et al. (1993). "Restitution of frog gastric mucosa in vitro: effect of basic fibroblast growth factor." Gastroenterology **104**(5): 1337-45.
- Pitha, J. (1971). "The fine structure of regenerating epithelium in the small intestine." Virchows Arch B Cell Pathol **7**(4): 314-41.
- Podolsky, D. K. (1991). "Inflammatory bowel disease (1)." N Engl J Med **325**(13): 928-37.
- Podolsky, D. K. (2002). "Inflammatory bowel disease." N Engl J Med **347**(6): 417-29.

- Potten, C. S., M. Kellett, et al. (1992). "Measurement of in vivo proliferation in human colorectal mucosa using bromodeoxyuridine." Gut **33**(1): 71-8.
- Rabinovich, G. A. (1999). "Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy." Cell Death Differ **6**(8): 711-21.
- Rabinovich, G. A., L. G. Baum, et al. (2002). "Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response?" Trends Immunol **23**(6): 313-20.
- Rabinovich, G. A., N. Rubinstein, et al. (2002). "Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes." Biochim Biophys Acta **1572**(2-3): 274-84.
- Rembacken, B. J., A. M. Snelling, et al. (1999). "Non-pathogenic Escherichia coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial." Lancet **354**(9179): 635-9.
- Riegler, M., W. Feil, et al. (1992). "MIPSY: real-time morphometry to quantify the time course of rapid epithelial restitution." Pathol Res Pract **188**(4-5): 443-8.
- Salmon, J. F., J. P. Wright, et al. (1991). "Ocular inflammation in Crohn's disease." Ophthalmology **98**(4): 480-4.
- Schulzke, J. D., C. Bojarski, et al. (2006). "Disrupted barrier function through epithelial cell apoptosis." Ann N Y Acad Sci **1072**: 288-99.
- Seibold, F. (2003). "[Laboratory diagnosis in inflammatory bowel disease]." Ther Umsch **60**(3): 133-6.
- Shanahan, F. (2005). "Physiological basis for novel drug therapies used to treat the inflammatory bowel diseases I. Pathophysiological basis and prospects for probiotic therapy in inflammatory bowel disease." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **288**(3): G417-21.
- Shoji, H., N. Nishi, et al. (2002). "Purification and cDNA cloning of Xenopus liver galectins and their expression." Glycobiology **12**(3): 163-72.
- Soini, Y., P. Paakko, et al. (1998). "Histopathological evaluation of apoptosis in cancer." Am J Pathol **153**(4): 1041-53.
- Stange, E. F. (1999). "Glucocorticoid receptor activity in inflammatory bowel disease: hindsight or foresight?" Eur J Clin Invest **29**(4): 278-9.
- Sturm, A. und A. U. Dignass (2008). "Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease." World J Gastroenterol **14**(3): 348-53.

- Sturm, A., M. Lensch, et al. (2004). "Human galectin-2: novel inducer of T cell apoptosis with distinct profile of caspase activation." J Immunol **173**(6): 3825-37.
- Sturm, A., S. Mohr, et al. (2002). "Critical role of caspases in the regulation of apoptosis and proliferation of mucosal T cells." Gastroenterology **122**(5): 1334-45.
- Susin, S. A., N. Zamzami, et al. (1997). "The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis." J Exp Med **186**(1): 25-37.
- Targan, S. R., C. J. Landers, et al. (1995). "Perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies are spontaneously produced by mucosal B cells of ulcerative colitis patients." J Immunol **155**(6): 3262-7.
- Taupin, D. und D. K. Podolsky (2003). "Trefoil factors: initiators of mucosal healing." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(9): 721-32.
- Tessema, M., U. Lehmann, et al. (2004). "Cell cycle and no end." Virchows Arch **444**(4): 313-23.
- van Balkom, B. P., E. J. Schoon, et al. (2002). "Effects of anti-tumour necrosis factor-alpha therapy on the quality of life in Crohn's disease." Aliment Pharmacol Ther **16**(6): 1101-7.
- Wilson, A. J., K. Byron, et al. (1999). "Interleukin-8 stimulates the migration of human colonic epithelial cells in vitro." Clin Sci (Lond) **97**(3): 385-90.
- Wilson, A. J. und P. R. Gibson (1997). "Epithelial migration in the colon: filling in the gaps." Clin Sci (Lond) **93**(2): 97-108.
- Yanaka, A., H. Muto, et al. (1996). "Role of transforming growth factor-beta in the restitution of injured guinea pig gastric mucosa in vitro." Am J Physiol **271**(1 Pt 1): G75-85.
- Zauli, D., M. Fusconi, et al. (1984). "Immunological studies in inflammatory bowel disease." Gut **25**(2): 215.

11 DANKSAGUNG

Mein Dank für die überaus hilfreiche Unterstützung bei der Erstellung meiner Doktorarbeit geht vor allem an meinen Doktorvater Herrn PD Dr. med. Andreas Sturm, geschäftsführender Oberarzt an der Med. Klinik für Hepatologie, Gastroenterologie, Ernährung und Stoffwechsel an der Charité, CVK. Besonders sein Motivationstalent, die klare Strukturierung der Arbeit, seine unendliche Geduld, und nicht zuletzt seine wertvollen Ratschläge, trugen zum Erfolg dieser Arbeit bei.

Ferner gilt mein besonderer Dank Frau Dipl.-Biol. Daniela Paclik, die meine Betreuerin im Labor war und mir stets mit hilfreichen Tipps zur Seite stand und meine Fragen immer kompetent beantwortete. Auch ihre unermüdliche Geduld mich in die Methoden und die Versuche einzuführen seien hier noch mal besonders betont. Ihr ist es zu verdanken, dass ich im Labor nicht den Faden verlor.

Ebenso möchte ich Frau Dipl.-Ökothrop. Claudia Guzy danken, mit der ich mir einen Arbeitsplatz teilte, die mir auch immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Danken möchte ich auch Frau Dr. med. Uta Berndt für die Einführung und Tipps in die Wundheilungsversuche.

Auch möchte ich den Mitarbeitern im gastroenterologischen Labor im Forschungsgebäude des CVK, danken, dass ich so liebevoll in ihren Kreis aufgenommen wurde, und sie mich bei der täglichen Laborarbeit moralisch unterstützten.

Ich möchte ganz besonders meinem Mann Philip Groth danken, der mir über meine Motivationstiefs hinweggeholfen hat, mich ständig neu anspornte und immer für mich da war. Ferner danke ich meiner Familie, meinem Vater für die kritische Durchsicht des Manuskriptes und für seine konstruktiven Verbesserungsvorschläge.

Auch möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, die mich nicht nur tatkräftig unterstützt haben, sondern mich stets aufbauten und für die erforderliche Abwechslung sorgten.

12 LEBENSLAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

13 VERÖFFENTLICHUNGEN IM RAHMEN DER PROMOTION

Paclik, D.,K. Lohse, et al. (2008). Galectin-2 and -4, but not Galectin-1 promote intestinal epithelial woundhealing in vitro through a TGF-beta-independent mechanism." Inflamm Bowel Dis.

14 ERKLÄRUNG

Ich, Katrin Groth, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Einfluss von Galektin-1, -2 und -4 auf die Wundheilung von Darmepithelzellen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, Datum

Unterschrift