

Aus dem Lehrstuhl  
für Innere Medizin I  
Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

# **Das Migrationsverhalten intestinaler Epithelzellen bei chronischer Entzündung:**

## **Einfluss und Interaktionen von K<sup>+</sup>-Kanälen und EGFr**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der **Medizin** (Dr. med.)

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von

**Sebastian Zundler**

2013



Aus dem Lehrstuhl  
für Innere Medizin I  
Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

# **Das Migrationsverhalten intestinaler Epithelzellen bei chronischer Entzündung:**

## **Einfluss und Interaktionen von K<sup>+</sup>-Kanälen und EGFr**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der **Medizin** (Dr. med.)

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von

**Sebastian Zundler**

2013

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thorsten E. Reichert

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Ulrike Strauch

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Stefan Farkas

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Februar 2015 / 20. Februar 2015



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>vi</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>x</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>xiii</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>xv</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Funktionaler Aufbau des menschlichen Darms</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen</b>	<b>2</b>
1.2.1 Morbus Crohn	5
1.2.2 Colitis ulcerosa	7
<b>1.3 Gastrointestinale epitheliale Wundheilung</b>	<b>8</b>
<b>1.4 Zellmigration</b>	<b>10</b>
1.4.1 Polarisierung	10
1.4.2 Vorwärtsbewegung des vorderen Zellpols	11
1.4.3 Nachziehen des hinteren Zellpols	13
<b>1.5 Kaliumkanäle</b>	<b>13</b>
1.5.1 Kaliumkanalfamilien	14
1.5.2 Kaliumkanäle und Zellmigration	16
1.5.3 Kaliumkanäle in IEC	16
<b>1.6 Intrazelluläre Signalkaskaden ausgehend von EGFr</b>	<b>17</b>
1.6.1 PI3K-Signalweg	18
1.6.1.1 Aktivierung von PKB/Akt	18
1.6.1.2 Regulation der Aktivierung	19
1.6.1.3 Effekte von PKB/Akt	19
1.6.2 MAPK/ERK-Signalweg	20
1.6.2.1 Aktivierung von ERK-1/2	20
1.6.2.2 Effekte von ERK-1/2	21
1.6.3 weitere von Rezeptortyrosinkinasen ausgehende Signalwege	22
1.6.3.1 PLC $\gamma$ -Signalweg	22
1.6.3.2 STAT-Signalweg	22
1.6.3.3 Src-Signalweg	23
1.6.4 EGFr und Kaliumkanäle	23
<b>1.7 Arbeitsziele</b>	<b>23</b>

<b>2 Material</b>	<b>26</b>
<b>2.1 Chemikalien und Kits</b>	<b>26</b>
2.1.1 Zellkultur	26
2.1.2 Migrationsassays	26
2.1.3 Western Blot und Vorarbeiten	27
2.1.3.1 Isolation von Proteinen	27
2.1.3.2 Proteinbestimmung	27
2.1.3.3 Laemmli-Puffer	27
2.1.3.4 Größenstandards	27
2.1.3.5 Gradientengel und Western Blot-Membran	28
2.1.3.6 Running- und Transfer-Puffer	28
2.1.3.7 Wasch- und Blocking-Puffer	28
2.1.3.8 Detektion	28
2.1.3.9 Antikörper	28
2.1.3.10 Stripping	29
2.1.4 Real Time-PCR im Taqman® und Vorarbeiten	29
2.1.4.1 Isolation von mRNA	29
2.1.4.2 Umschreiben von mRNA in cDNA	30
2.1.4.3 TaqMan® Real-time PCR	30
2.1.4.4 Oligonukleotide	30
<b>2.2 Verbrauchsmaterialien</b>	<b>30</b>
<b>2.3 Geräte</b>	<b>31</b>
<b>2.4 Software</b>	<b>32</b>
<b>3 Methoden</b>	<b>34</b>
<b>3.1 Zellkultur und Migrationsexperimente</b>	<b>34</b>
3.1.1 Kultivierung und Subkultivierung von IEC18	34
3.1.2 Auftauen und Einfrieren von IEC18	35
3.1.2.1 Zellzählung in der modifizierten Neubauer-Zählkammer	35
3.1.3 Untersuchung der Wundheilung mit weiter entwickelten „scratch assays“	36
3.1.3.1 Vergleich von Abstands- und Flächenmessung bei der Quantifizierung von scratch-assays	38
3.1.4 Untersuchung der Zellmigration in Boyden-Kammern	40
3.1.4.1 Technisches Vorgehen	41
3.1.4.2 Färbung der Zellen	42
3.1.4.3 Zählung der migrierten Zellen und Auswertung	43

<b>3.2 Western Blot und hinführende Arbeiten</b>	<b>44</b>
3.2.1 Zellstimulation	44
3.2.2 Lyse von intestinalen Epithelzellen	45
3.2.3 Proteinbestimmung durch BCA-Test	46
3.2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	46
3.2.5 Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran	48
3.2.6 Proteindetektion	49
3.2.7 „Strippen“ der Membran	50
<b>3.3 Real-time PCR im TaqMan®</b>	<b>51</b>
3.3.1 Isolierung von intestinalen Epithelzellen aus chirurgischen Resektaten und endoskopischen Biopsien	51
3.3.2 Isolierung von mRNA aus intestinalen Epithelzellen	53
3.3.3 RNA-Konzentrationsmessung und Reverse Transkriptase- PCR	54
3.3.4 TaqMan® Real-time PCR	54
3.3.5 Auswertung	56
<b>3.4 Statistische Analysen</b>	<b>56</b>
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>58</b>
<b>4.1 Untersuchung intestinaler Wundheilung in scratch-assays</b>	<b>58</b>
4.1.1 Welchen Einfluss haben Kaliumkanäle auf die intestinale Wundheilung?	58
4.1.2 Wie beeinflussen Kaliumkanäle die Wundheilung unter entzündlichen Bedingungen?	62
4.1.3 Welchen Effekt hat EGF auf die kaliumkanalabhängige Wundheilung?	65
4.1.4 Welchen Effekt hat EGF auf die kaliumkanalabhängige Wundheilung nach 24h Vorinkubation mit IFN- $\gamma$ ?	67
4.1.5 Ergebnisse der scratch-assays im Überblick	69
4.1.5.1 IbTx	69
4.1.5.2 Cit	70
4.1.5.3 1-EBIO	71
<b>4.2 Untersuchung intestinaler Migration in Boyden     Kammer-assays</b>	<b>73</b>
4.2.1 Führt K <sub>ca</sub> 3.1-Inhibition zu einer spezifischen Steigerung der Migration?	73
4.2.2 Welchen Effekt hat K <sub>ca</sub> 3.1-Inhibition auf die Migration unter entzündlichen Bedingungen?	73
<b>4.3 Western Blot</b>	<b>77</b>
4.3.1 Untersuchung EGFr-abhängiger Signalwege	77
4.3.1.1 PI3K-Signalweg	78
4.3.1.2 MAPK/ERK-Signalweg	81



4.3.2 Beeinflussung des PI3K- und MAPK/ERK-Signalwegs im Verlauf und Korrelation mit den scratch-assays	81
4.3.3 Welchen Einfluss hat Vorinkubation mit IFN- $\gamma$ auf die Expression von K <sub>Ca</sub> 3.1?	86
<b>4.4 Ist die K<sub>Ca</sub>3.1-Expression bei Patienten mit CED verändert?</b>	<b>87</b>
<b>5 Diskussion</b>	<b>90</b>
<b>5.1 Migrationsexperimente an intestinalen Epithelzellen <i>in vitro</i></b>	<b>90</b>
<b>5.2 Einfluss von Kaliumkanälen auf die Migration von IEC</b>	<b>93</b>
5.2.1 nicht entzündliche Bedingungen	93
5.2.2 entzündliche Bedingungen	100
5.2.3 Rolle EGFr-abhängiger Signalwege	103
<b>5.3 Expression von K<sub>Ca</sub>3.1 in IEC 18 nach 24 h Vorinkubation mit IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>106</b>
<b>5.4 Expression von K<sub>Ca</sub>3.1-mRNA in humanen IEC</b>	<b>106</b>
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>109</b>
<b>6.1 Einfluss von Kaliumkanälen auf die intestinale Restitution</b>	<b>109</b>
<b>6.2 Rolle EGFr-abhängiger Signalwege</b>	<b>110</b>
<b>6.3 K<sub>Ca</sub>3.1-Expression bei Patienten mit CED</b>	<b>111</b>
<b>7 Ausblick</b>	<b>112</b>
<b>8 Literaturverzeichnis</b>	<b>114</b>
<b>9 Anhang</b>	<b>131</b>
<b>9.1 Vorträge und Posterpräsentationen</b>	<b>131</b>
<b>9.2 Danksagungen</b>	<b>133</b>
<b>9.3 Erklärung zur Promotion</b>	<b>134</b>
<b>9.4 Lebenslauf</b>	<b>135</b>

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintri-phosphat
BAD	bcl-2-Antagonist 'of cell death'
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
C 293 B	Chromanol 293 B
Casp	Caspase
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
ChTx	Charybdotoxin
Clt	Clotrimazol
CPS	Carbamoylphosphatsynthetase
CRC	Colorectales Carcinom
CREB	'cAMP response element'-bindendes Protein
CU	Colitis ulcerosa
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	Dextran-Natriumsulfat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF(r)	Epidermaler Wachstumsfaktor(rezeptor)
eNOS	epitheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERK	'extracellular signal regulated'-Kinase
FAK	'focal adhesion'-Kinase
FCS	fetales Kälberserum
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor
FOXO	'forkhead box'-Protein O
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor
GSK3 $\beta$	Glykogensynthasekinase 3 $\beta$

GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HBSS	Hank's gepufferte Salzlösung
HRP	Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase)
IbTx	Iberiotoxin
IEC	intestinale Epithelzellen
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
IRS	Insulinrezeptor-Substrat
JNK	Jun-N-terminale Kinase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MC	Morbus Crohn
min	Minute(n)
mTORC	'mammalian target of rapamycin'-Komplex
NF- $\kappa$ B	nukleärer Faktor 'kappa-light-chain-enhancer' aktivierter B-Zellen
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NOD/CARD	Nukleotid-Oligomerisationsdomäne/Caspaserekrutierungsdomäne
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	'platelet derived' Wachstumsfaktor
PDK-1	Phosphoinositid-abhängige Kinase 1
PH	'pleckstring' Homologiedomäne
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat
PKB/Akt	Proteinkinase B/Akt
PLC $\gamma$	Phospholipase C $\gamma$
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRAS 40	prolinreiches Akt-Substrat von 40 kDa
P/S	Penicillin/Streptomycin

PTB	Phosphotyrosin-bindende Domäne
PTEN	Phosphatase und Tensin-Homolog
Rac	'related to' Proteinkinase A & C
Raf	'rat fibrosarcoma'-Protein
Ras	'rat sarcoma'-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Sigmadivertikulitis
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SH	'sonic hedgehog'
SH 2/3	src Homologiedomäne 2/3
STAT	'signal transducer and activator of transcription'
Tab.	Tabelle
TBST	TRIS-gepufferte Salzlösung mit Tween 20®
TEA	Tetraethylammoniumchlorid
TGF- $\beta$	'transforming' Wachstumsfaktor $\beta$
T <sub>H</sub> 1/2	T-Helferzelle Typ 1/2
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC 2	'tuberous sclerosis'-Protein 2
VEGF(r)	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (-rezeptor)
WB	Western Blot

## Abbildungsverzeichnis

	Seite	
Abb. 1.1	Schematischer Aufbau der Darmwand	1
Abb. 1.2	Schematische Darstellung einer Auswahl von nach heutigem Stand der Wissenschaft für die Pathogenese des MC wichtiger Elemente	4
Abb. 1.3	Ansprechraten auf Corticosteroidtherapie bei neu diagnostiziertem MC in einer populationsbasierten Studie in Olmsted County, Minnesota	6
Abb. 1.4	Krankheitslokalisation bei Morbus Crohn	7
Abb. 1.5	Krankheitslokalisation bei Colitis ulcerosa	8
Abb. 1.6	Modellhafter Ablauf der gastrointestinalen epithelialen Wundheilung	9
Abb. 1.7	Rasterelektronenmikroskopisches Bild einer migrierenden Zelle	11
Abb. 1.8	Schematische Darstellung wichtiger Vorgänge der Zellmigration	12
Abb. 1.9	Grundstruktur von Kaliumkanälen	14
Abb. 1.10	„Stammbaum“ der Kaliumkanäle	16
Abb. 1.11	Chloridsekretion in IEC	17
Abb. 1.12	Autophosphorylierung von Rezeptortyrosinkinasen	18
Abb. 1.13	Schematische Darstellung des PKB/Akt-Signalwegs	20
Abb. 1.14	Schematische Darstellung des ERK1/2-Signalwegs	22
Abb 3.1	Modifizierte Neubauer-Zählkammer (Digital-Bio) und eingraviertes Zählnetz	35
Abb 3.2	Skizze zum zeitlichen Ablauf der Scratch Assays	37
Abb 3.3	Beispiel für die Markierung der Wundränder und Berechnung der Wundfläche mit AxioVision	38
Abb. 3.4	Übersicht über die in den scratch assays untersuchten Konstellationen	38
Abb. 3.5	Quantifizierung der Wundheilung durch Abstandsmessung der Wundränder an willkürlich ausgewählten Stellen	39
Abb. 3.6	Quantifizierung der Wundheilung durch Flächenmessung der gesamten Wunde	39
Abb. 3.7	Wiederholung der Quantifizierung der Wundheilung durch Abstandsmessung der Wundränder an willkürlich ausgewählten Stellen	40
Abb. 3.8	Skizzenhafte Darstellung der wesentlichen Bestandteile der Boyden-Kammer zur Verdeutlichung des Versuchsprinzips	41
Abb. 3.9	Beispiel für ein Färbeergebnis	42
Abb. 3.10	In den Stimulationsexperimenten untersuchte Konstellationen	45
Abb. 3.11	Reaktionsprinzip des BCA-Tests	46
Abb. 3.12	Schematische Darstellung des Funktionsweise des Western-Blots	49
Abb. 3.13	Schematische Darstellung der RNeasy spin column	53
Abb. 3.14	Schematische Darstellung des Reaktionsprinzips beim TaqMan®	
Abb. 4.1	Repräsentative Bilder von Wunden direkt nach sowie acht Stunden nach Verwundung bei den eingesetzten Kaliumkanalmodulatoren	59
Abb. 4.2	Wundheilung von IEC 18 in Abhängigkeit von verschiedenen Kaliumkanalmodulatoren	60
Abb. 4.3	Wundheilung von IEC 18 in Abhängigkeit von 10 bzw. 40 µl DMSO	61
Abb. 4.4	Verlauf der Wundheilung nach Zugabe von Kaliumkanalmodulatoren	62
Abb. 4.5	Wundheilung nach 24 h Vorinkubation mit IFN-γ	63
Abb. 4.6	Repräsentative Bilder von Wunden direkt nach sowie acht Stunden nach Verwundung bei den	64

	eingesetzten Kaliumkanalmodulatoren nach 24 h Vorinkubation mit IFN- $\gamma$	
Abb. 4.7	Wundheilung in Abhängigkeit verschiedener Kaliumkanalmodulatoren nach 24 h Vorinkubation mit IFN- $\gamma$	65
Abb. 4.8	Wundheilung mit EGF	66
Abb. 4.9	Kaliumkanalabhängige Wundheilung unter EGF-Einfluss	67
Abb. 4.10	Kaliumkanalabhängige Wundheilung unter EGF-Einfluss nach 24 h Vorinkubation mit IFN- $\gamma$	68
Abb. 4.11	Kaliumkanalabhängige Wundheilung nach 24 h Vorinkubation mit IFN- $\gamma$ mit und ohne EGF	69
Abb. 4.12	Auswirkung von IbTx auf die Restitution von IEC nach Verwundung	70
Abb. 4.13	Auswirkung von Clt auf die Restitution von IEC nach Verwundung	71
Abb. 4.14	Auswirkung von 1-EBIO auf die Restitution von IEC nach Verwundung	72
Abb. 4.15	Auswirkung von 1-EBIO auf die Restitution von IEC nach Verwundung in Relation zu 40 $\mu$ L DMSO	72
Abb. 4.16	Migration von IEC 18 in Boyden-Kammern in Abhängigkeit von Kaliumkanalmodulatoren	74
Abb. 4.17	Migration von IEC 18 in Boyden-Kammern in Abhängigkeit von Kaliumkanalmodulatoren nach Vorinkubation mit IFN- $\gamma$	74
Abb. 4.18	Repräsentative Bilder für die Ergebnisse der Boyden Kammer-assays in Abhängigkeit von Modulatoren kalziumabhängiger Kaliumkanäle sowie mit und ohne Vorinkubation mit IFN- $\gamma$	75
Abb. 4.19	Migration von IEC 18 in Boyden Kammer in Abhängigkeit von Kaliumkanalmodulatoren mit und ohne Vorinkubation mit IFN- $\gamma$	76
Abb. 4.20	EGFr-Phosphorylierung an Tyr 1173	77
Abb. 4.21	Repräsentative Western Blots mit den Antikörpern pAkt, Akt und $\beta$ -Actin	78
Abb. 4.22	Phosphorylierung von Akt im Verlauf von acht Stunden nach Verwundung von IEC 18 in Abhängigkeit von K <sub>Ca</sub> 3.1-Modulatoren, Vorinkubation mit IFN- $\gamma$ und 5nM EGF	79
Abb. 4.23	Phosphorylierung von ERK im Verlauf von acht Stunden nach Verwundung von IEC 18 in Abhängigkeit von K <sub>Ca</sub> 3.1-Modulatoren, Vorinkubation mit IFN- $\gamma$ und 5nM EGF	80
Abb. 4.24	K <sub>Ca</sub> 3.1-Modulator-abhängige Phosphorylierung von Akt und ERK sowie Flächenwachstum im Verlauf	82
Abb. 4.25	Korrelation der Clt-abhängigen Wundheilung mit der Akt-Phosphorylierung	85
Abb. 4.26	K <sub>Ca</sub> 3.1-Expression von IEC 18 nach Vorinkubation mit und ohne IFN- $\gamma$	86
Abb. 4.27	K <sub>Ca</sub> 3.1-mRNA-Expression bei IEC aus chirurgischen Resektaten und endoskopischen Biopsien	87
Abb. 4.28	K <sub>Ca</sub> 3.1-mRNA-Expression bei IEC aus chirurgischen Resektaten und endoskopischen Biopsien. Auswertung nach Subgruppen.	88
Abb. 4.29	K <sub>v</sub> 7.1-mRNA-Expression bei IEC aus chirurgischen Resektaten und endoskopischen Biopsien. Auswertung nach Subgruppen.	89
Abb. 5.1	Mögliche Mechanismen der Beeinflussung EGFr-abhängiger Signalwege durch K <sub>Ca</sub> 3.1-Hemmung	95
Abb. 5.2	Räumliche Verteilung von K <sub>Ca</sub> 3.1 und Kalzium in migrierenden Zellen	97
Abb. 5.3	Mögliche Mechanismen der Beeinflussung EGFr-abhängiger Signalwege durch K <sub>Ca</sub> 3.1-Hemmung	102
	II	
Abb. 5.4	Mögliche Mechanismen der Beeinflussung EGFr-abhängiger Signalwege durch K <sub>Ca</sub> 3.1-Hemmung	104
	III	

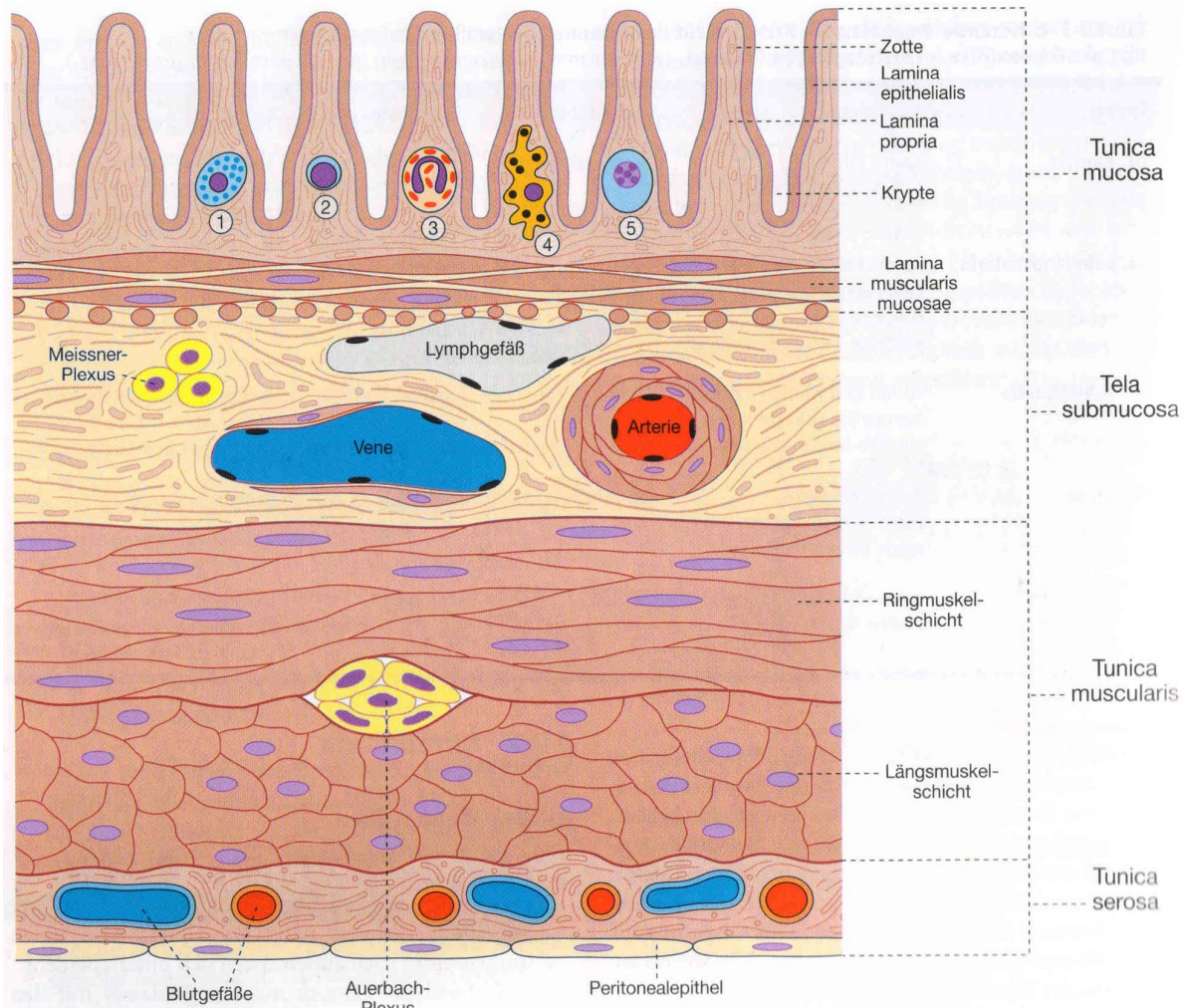
## Tabellenverzeichnis

	Seite	
Tab 3.1	Übersicht über die verwendeten Kaliumkanalmodulatoren sowie deren Konzentrationen, Lösungsmittel und Literaturangaben	37
Tab 3.2	Patienten, Diagnosen und Herkunft der IEC-Lysate	52
Tab. 4.1	Wundheilung von IEC 18 in Abhängigkeit von verschiedenen Kaliumkanalmodulatoren	60
Tab 4.2	Wundheilung von IEC 18 in Abhängigkeit von verschiedenen Kaliumkanalmodulatoren nach 24 h Vorinkubation mit IFN- $\gamma$	64
Tab. 4.3	Wundheilung von IEC 18 mit EGF	66
Tab. 4.4	Wundheilung von IEC 18 mit EGF nach 24 h Vorinkubation mit IFN- $\gamma$	68

# 1 Einleitung

## 1.1 Funktionaler Aufbau des menschlichen Darms

Der Darm stellt die größte Kontaktfläche des menschlichen Körpers mit der Außenwelt dar. Allein die Oberfläche des Dünndarms ist etwa 200 m<sup>2</sup> groß und damit deutlich größer als beispielsweise die Oberfläche des Alveolarraums mit rund 80-140 m<sup>2</sup> <sup>1)</sup>. Diese enorme Größe ist für die Verdauungsfunktion notwendig, bedeutet aber gleichzeitig auch eine enorme Expositionsfläche gegenüber einer ganzen Reihe potenziell schädlicher Organismen und Substanzen wie beispielsweise Bakterien und bakteriellen Produkten, Viren, Parasiten oder Toxinen und Nahrungsbestandteilen, die abgewehrt werden müssen. Diese beiden unterschiedlichen Aufgaben – Resorption von Nährstoffen und Vitaminen einerseits und Abwehr schädigender Agenzien andererseits – spiegeln sich in der Architektur der Darmwand wider:



**Abb. 1.1: Schematischer Aufbau der Darmwand**

Die Darmwand besteht prinzipiell in allen Darmabschnitten aus den vier Schichten Mukosa, Submukosa, Muskularis und Serosa. Einzelheiten siehe Text. [aus <sup>1)</sup>]



## Einleitung

---

Prinzipiell wird die Darmwand in allen Darmabschnitten von vier Schichten gebildet, die je nach Lokalisation leichten Variationen unterworfen sind. Das Lumen wird durch eine in sich wiederum dreischichtige *Tunica mucosa* begrenzt, die sich von innen nach außen aus einer *Lamina epithelialis*, einer *Lamina propria* und einer *Lamina muscularis mucosae* zusammensetzt <sup>1)</sup>.

In den im Rahmen dieser Arbeit interessanten Abschnitten Dünn- und Dickdarm besteht das Epithel aus einer einzigen Schicht zylindrischer Enterozyten, die sowohl für die Resorption zuständig sind als auch eine physiologische Barriere zwischen Körper und Außenwelt darstellen. Zell-Zell-Kontakte dichten das Epithel auch zwischen den Enterozyten ab. Durch Ein- (Krypten) und Ausstülpungen (Zotten, nicht im Dickdarm) kommt es zu einer starken Oberflächenvergrößerung. Zwischen den Enterozyten befinden sich zudem Becherzellen, die die Darmschleimhaut mit einer schleimigen Schutzschicht bedecken und besonders im Kolon häufig sind, endokrine Zellen mit sensorischen und sekretorischen Funktionen sowie Lymphozyten und in den Krypten auch sekretorisch und phagozytierend aktive Paneth-Körnerzellen im Dienste der Immunabwehr. Ausgehend von in den Krypten gelegenen Stammzellen erfolgt alle 5-6 Tage eine komplette Erneuerung des Epithels.

Die bindegewebige *Lamina propria* enthält neben zahlreichen Blut- und Lymphgefäßen, die u.a. für den Abtransport resorbierter Nährstoffe wichtig sind, auch lymphatische Zellen, z.B. Makrophagen, Plasmazellen, Lymphozyten, Mastzellen und Eosinophile, die eine schnelle Auseinandersetzung des intestinalen Immunsystems mit luminalen Antigenen ermöglichen. Die *Lamina muscularis mucosae* erlaubt der Mukosa eine gewisse Eigenmobilität.

An die Mukosa schließt sich nach außen die *Tela submucosa* an, in deren Bindegewebe sich Blut- und Lymphgefäße sowie Nervenzellen des enterischen Nervensystems befinden.

Die nun folgende *Tunica muscularis* besteht aus einer inneren Ring-, einer äußeren Längsmuskelschicht sowie dem dazwischen liegenden für die Motilität verantwortlichen Nervenplexus und steht im Dienste der Peristaltik.

Nach außen wird die Darmwand durch die *Tunica serosa* abgeschlossen <sup>1)</sup>.

## 1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Die beiden Krankheiten „Morbus Crohn“ (MC) und „Colitis ulcerosa“ (CU) werden als chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) zusammengefasst. Wesentliche

## Einleitung

---

Elemente der Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankungen sind weiterhin unklar.

Als gesichert gilt die multifaktorielle Genese durch ein Zusammenspiel von genetischen Prädispositionsfaktoren und Umwelteinflüssen <sup>2)</sup>.

So zeigten Zwillingsstudien bei monozygoten Zwillingen Konkordanzraten von 20-50 % für MC bzw. 14-19 % für CU, während die Rate bei Heterozygoten zwischen 0 und 7 % (MC) bzw. 4,5 % (CU) liegt <sup>3),4),5),6)</sup>. Eine positive Familienanamnese liegt bei ca. 10 % der Erkrankten vor, das Lebenszeitrisiko für erstgradig Verwandte von an CED Erkrankten beträgt 5 % für MC bzw. 1,6 % für CU <sup>7)</sup>. Zudem existieren ethnische Unterschiede, beispielsweise erkranken Angehörige der jüdischen Volksgruppe der Ashkenazim besonders häufig <sup>8)</sup>.

Passend dazu konnten zahlreiche Genpolymorphismen, die mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko einhergehen, identifiziert werden: Beispiele sind der IL-23-Rezeptor auf Chromosom 1, der sowohl bei MC als auch CU eine Rolle spielt oder NOD2-Polymorphismen als Risikofaktor für MC <sup>9),10),11),12)</sup>. Insgesamt sind mehr als 30 Genloci mit einem erhöhten Risiko assoziiert <sup>13)</sup>.

Die Bedeutung von Umweltfaktoren für die Krankheitsentwicklung wird nicht nur aufgrund der erwähnten Konkordanzraten, sondern auch durch geographische Unterschiede in der Inzidenz und Prävalenz sowie die historische Entwicklung deutlich: Während die Häufigkeit von CED in Nordamerika und (Nord-) Europa in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts weiter zunahm und sich jetzt zu stabilisieren scheint, ist in vielen Entwicklungsländern parallel zur Veränderung der Lebensbedingungen eine Zunahme zu verzeichnen. In Nordamerika gleicht sich die Inzidenz bei Afro-Amerikanern und Weißen unter gleichen Lebensbedingungen an <sup>14)</sup>.

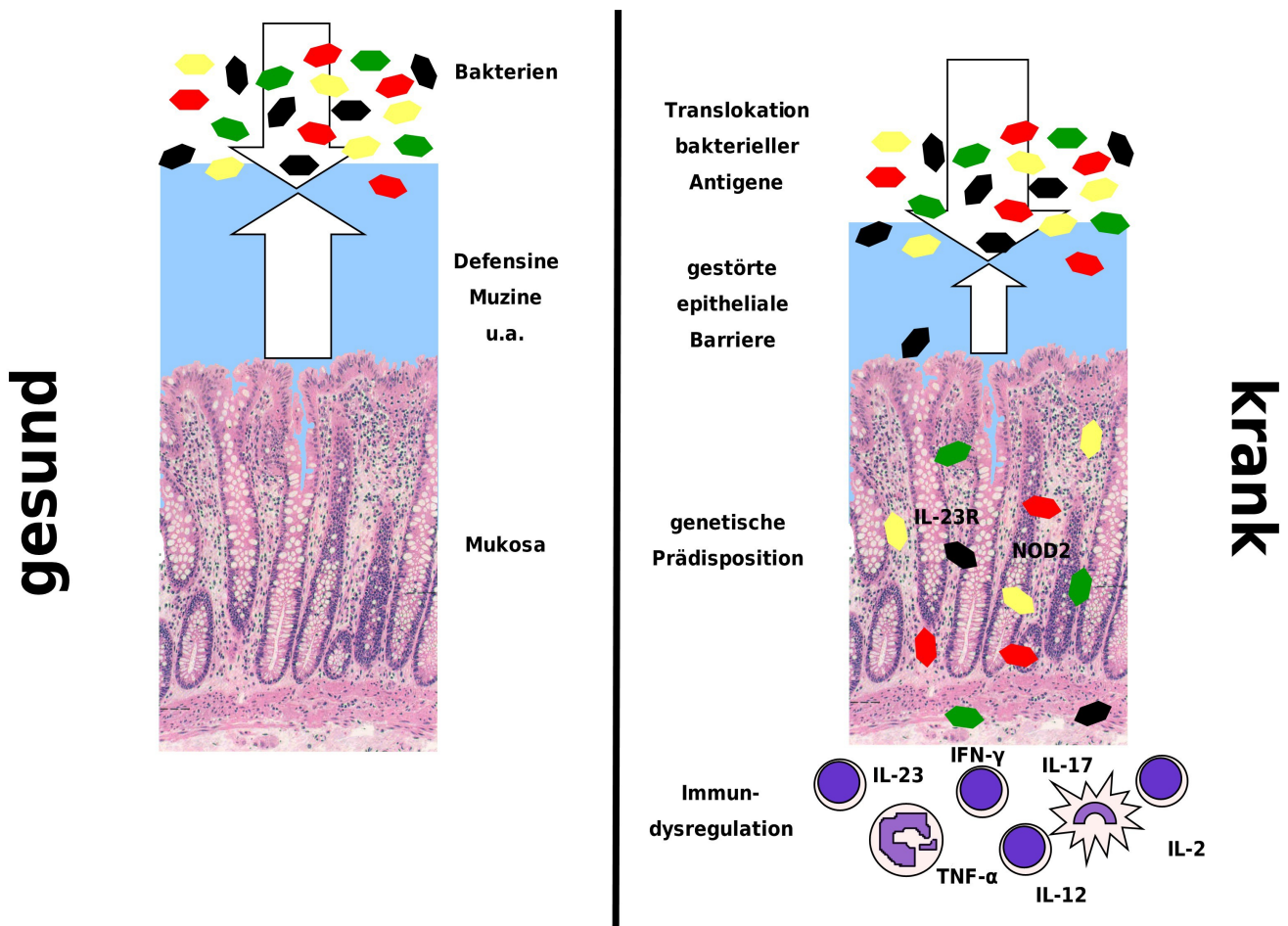
Der wohl wichtigste äußere Einfluss bei CED ist die intestinale Darmflora. In Tiermodellen kann bei keimfrei gehaltenen Ratten keine experimentelle Colitis induziert werden <sup>15)</sup>. Bei CED-Patienten scheint im Zuge einer Immundysregulation eine übersteigerte und fehlregulierte Immunantwort gegen die kommensale Darmflora stattzufinden, die zu chronischer Entzündung und Schädigung der Darmmukosa führt. Möglicherweise spielt dabei auch eine veränderte Zusammensetzung der Darmflora eine Rolle <sup>16)</sup>.

Zur Induktion und Aufrechterhaltung dieser übersteigerten Immunantwort ist eine Kontaktaufnahme von Zellen des Immunsystems mit der Darmflora erforderlich, wofür ein Missverhältnis aus protektiven und aggressiven Mechanismen verantwortlich gemacht wird, das zur Translokation luminaler mikrobieller Antigene durch die Epithelbarriere führt. Als wichtiger protektiver Mechanismus haben sich in den vergangenen Jahren Defensine herauskristallisiert. Diese antimikrobiellen Peptide werden von Paneth-Zellen sezerniert

## Einleitung

und sind in ihrer Konzentration vor allem bei Morbus Crohn reduziert <sup>17),18)</sup>. Für die Colitis ulcerosa wurde gezeigt, dass der Gehalt an Phosphatidylcholin (PC) im Mukus reduziert ist <sup>19)</sup> und die exogene Applikation von PC die Entzündungsaktivität reduziert <sup>20)</sup>. Dies wird inzwischen auch therapeutisch eingesetzt <sup>21)</sup>.

Daneben sind noch weitere von intestinalen Epithelzellen sezernierte Produkte und Bestandteile der im Kolon normalerweise 800 µm dicken Schleimschicht auf dem Epithel in ihrer Konzentration erniedrigt. Zudem tragen eine gesteigerte epitheliale Permeabilität und Defekte in Zell-Zell-Kontakten zur Dysfunktion der epithelialen Barriere bei CED bei. Auch Wunden im Epithel stellen eine bedeutende Eintrittspforte für die Darmflora dar. Nach wie vor ist allerdings unklar, ob das Überwiegen aggressiver Faktoren das primäre, krankheitsauslösende Ereignis darstellt oder sekundär als Folge der Entzündungsreaktion auftritt und diese so unterhält <sup>22)</sup>. Zunehmend deutlicher wird jedoch, dass das Epithel nicht nur eine passive Barriere darstellt, sondern auch aktiv mit Immunzellen interagiert <sup>23)</sup>.



**Abb. 1.2: Schematische Darstellung einer Auswahl von nach heutigem Stand der Wissenschaft für die Pathogenese des MC wichtiger Elemente**

In einer gesunden Darmschleimhaut wird die kommensale Darmflora durch Abwehrmechanismen kontrolliert. Bei MC ist die epitheliale Barriere dagegen gestört, sodass eine Translokation luminaler Antigene möglich ist und bei genetisch prädisponierten Individuen eine fehlgesteuerte Immunantwort hervorruft. Diese führt sekundär zu Gewebeschäden [unter Verwendung einer Fotografie aus <sup>24)</sup>].

## Einleitung

---

Der durch die Darmflora getriggerte Entzündungsprozess bei CED ist durch ein verändertes Zytokinprofil gekennzeichnet: Bei MC überwiegen die Th1-Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 und IL-12, während bei CU Th2-typische Zytokine wie IL-5, IL-13 und TGF- $\beta$  dominieren <sup>25),26)</sup>. Dies führt bei MC zu einer gesteigerten mukosalen Produktion und erhöhten Serumspiegeln von IFN- $\gamma$  <sup>27)</sup>. Es kommt außerdem zu einem Übergewicht von Effektor-T-Zellen über regulatorische T-Zellen <sup>28)</sup>, wofür unter anderem die Interleukin-17 produzierende T-Zell-Population Th17 verantwortlich gemacht wird. Diese entwickelt sich TGF- $\beta$ -abhängig aus naiven T-Zellen <sup>29)</sup> und wird durch Interleukin-23 zur Produktion von IL-17 und IL-6 stimuliert <sup>30)</sup>. Interleukin-17 ist bei CED heraufreguliert und in Schleimhaut und Serum vermehrt exprimiert <sup>31)</sup>.

Für diese immunologische Dysregulation wiederum scheint die genetische Suszeptibilität eine wichtige Rolle zu spielen. Als Beispiel seien Mutationen in NOD2, einem intrazellulären Rezeptor für das bakterielle Produkt N-Acetyl-Muramyl-Dipeptid und Aktivator des proentzündlichen NF $\kappa$ B-Signalwegs, genannt, durch die die Immunantwort gegenüber Bakterien und bakteriellen Produkten weniger effektiv ausfällt <sup>32)</sup>.

Ein weiterer gesicherter Umweltfaktor, der das Auftreten von MC und CU beeinflusst, ist das Rauchen (erhöhtes Risiko für MC, erniedrigtes Risiko für CU). Diskutiert werden zudem Einflüsse durch Appendektomie, orale Kontrazeption, Ernährungsgewohnheiten, Stillen, Maserninfektion bzw. -impfung sowie Infektionen mit Mykobakterien <sup>14)</sup>.

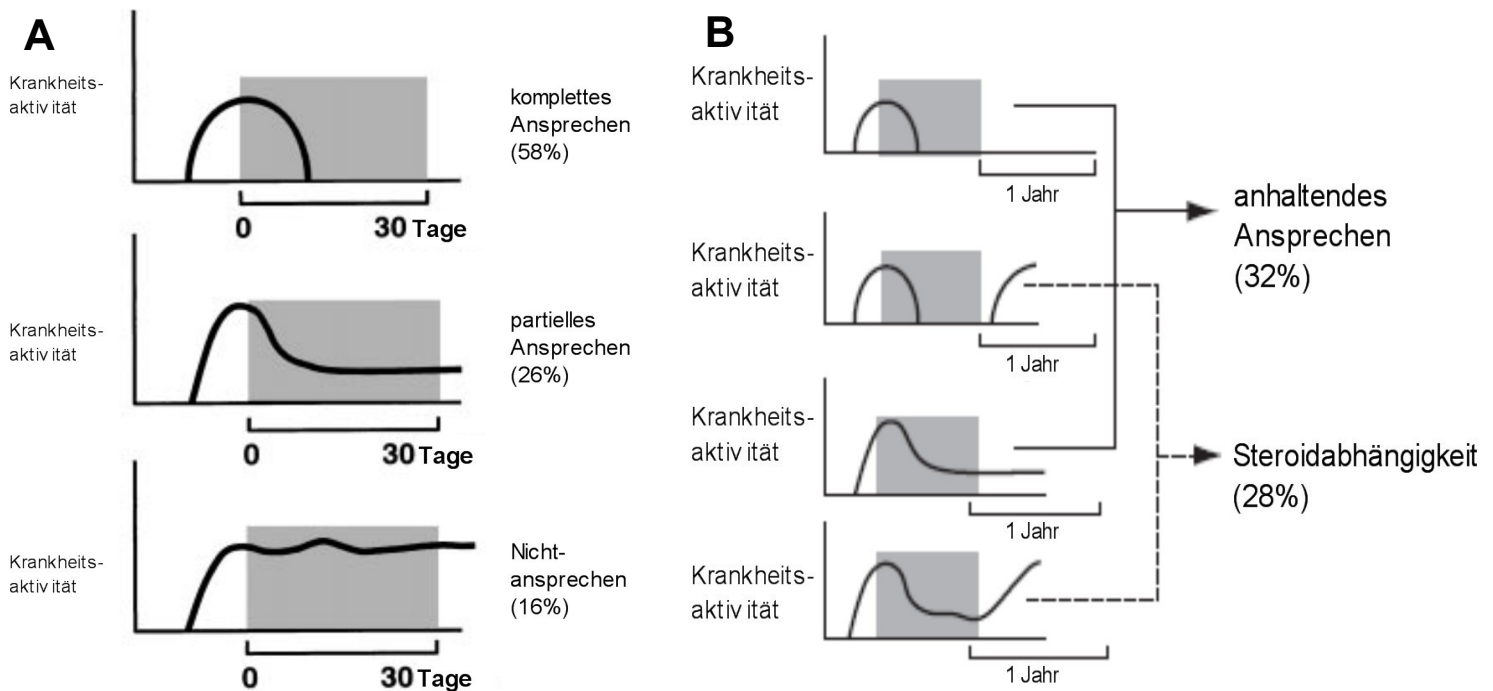
### **1.2.1 Morbus Crohn**

In Deutschland sind rund 300.000 Menschen an MC erkrankt. Die Erkrankung kann im gesamten Gastrointestinaltrakt auftreten, das terminale Ileum ist jedoch am häufigsten befallen. Das Entzündungsmuster ist segmental, d.h. es können sich entzündete und gesunde Darmabschnitt abwechseln („skip lesions“). Histologisch findet sich eine transmurale Entzündung aller Wandschichten des Darmes, in 40 % sind Epitheloidzellgranulome nachweisbar <sup>33)</sup>.

Symptomatisch wird MC meist durch Bauchschmerzen, die sich oft auf den rechten Unterbauch projizieren, sowie Diarrhoen. Durch eingeschränkte Nahrungsaufnahme und/oder -resorption können Gewichtsabnahme und Malnutrition, insbesondere ein Vitamin B12-Mangel, auftreten. Des Weiteren können die entzündlichen Prozesse Komplikationen wie Stenosen, Fisteln und Abszesse mit den daraus resultierenden Symptomen verursachen. Auch extraintestinale Manifestationen, z.B. Arthropathien oder Hautmanifestationen, kommen bei etwa einem Viertel der Patienten vor <sup>33),34),35)</sup>.

## Einleitung

Eine Heilung ist bisher nicht möglich. Durch immunsuppressive Therapiestrategien können aber Schübe abgemildert und Häufigkeit und Schwere von Rezidiven reduziert werden. Aufgrund epidemiologischer Beobachtungen lässt sich dabei im kurzfristigen Verlauf ein komplettes, partielles oder Nicht-Ansprechen unterscheiden. Im langfristigen Verlauf spricht man von anhaltendem Ansprechen bzw. bei Wiederauftreten oder Zunahme der Beschwerden von Steroidabhängigkeit<sup>36)</sup>.

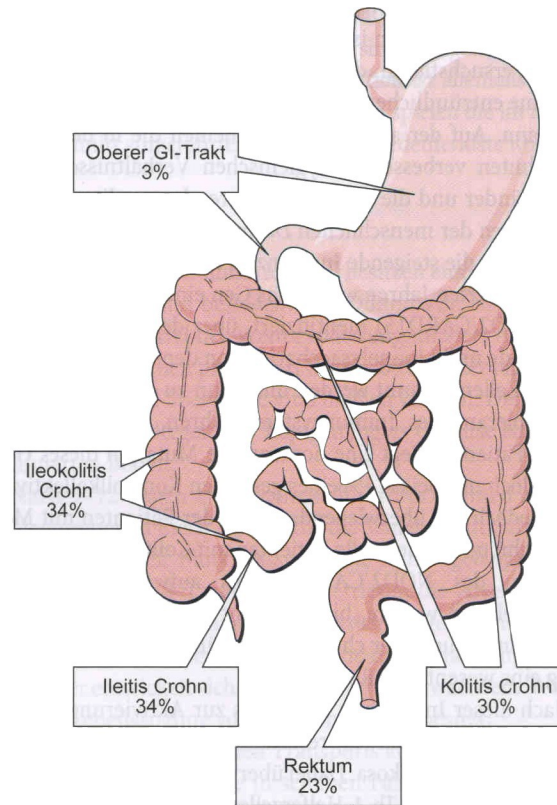


**Abb. 1.3: Ansprechraten auf Corticosteroidtherapie bei neu diagnostiziertem MC in einer populationsbezogenen Studie in Olmsted County, Minnesota<sup>36)</sup>:**

(A) Innerhalb von 30 Tagen nach Beginn einer Stoßtherapie mit Steroiden sprachen die meisten Patienten komplett oder partiell an, bei 16% kam es zu keinerlei Rückgang der klinischen Symptome. (B) Ein Jahr nach Beginn der Steroidtherapie (diese wurde wenn möglich über drei bis sechs Monate ausgeschlichen) zeigten je etwa ein Drittel der Patienten einen stabilen Rückgang der Symptome bzw. eine Steroidabhängigkeit mit Rekurrenz der Beschwerden. 38% wurden innerhalb eines Jahres operiert (nicht dargestellt).

Es existieren drei prinzipielle Formen des Krankheitsverlaufes: In der Mehrzahl der Fälle (67-73 %) kommt es zu einem chronischen Krankheitsbild mit rezidivierenden Entzündungsschüben. In 10-13 % schließt sich an Entzündungsschübe eine stabile Remission über mehrere Jahre an. Ein chronisch aktiver Verlauf tritt bei 13-20 % der Patienten auf, dabei kommt es trotz Therapie nach dem initialen Schub zu keiner kompletten Remission der entzündlichen Aktivität<sup>34)</sup>.

Wesentliche Komplikationen des MC sind enterale Fisteln und Stenosen. Innerhalb von 20 Jahren nach Diagnosestellung treten diese bei der Hälfte der Patienten auf und erfordern dann eine chirurgische Intervention. Diese führt jedoch ebenfalls nicht zur Heilung der Erkrankung, 10 Jahre postoperativ sind wieder bis zu 55% der Patienten betroffen<sup>37)</sup>.



**Abb. 1.4: Krankheitslokalisation bei Morbus Crohn**

Am häufigsten ist bei Morbus Crohn das terminale Ileum betroffen. Prinzipiell können aber alle Darmabschnitte befallen sein. [aus <sup>33)</sup>

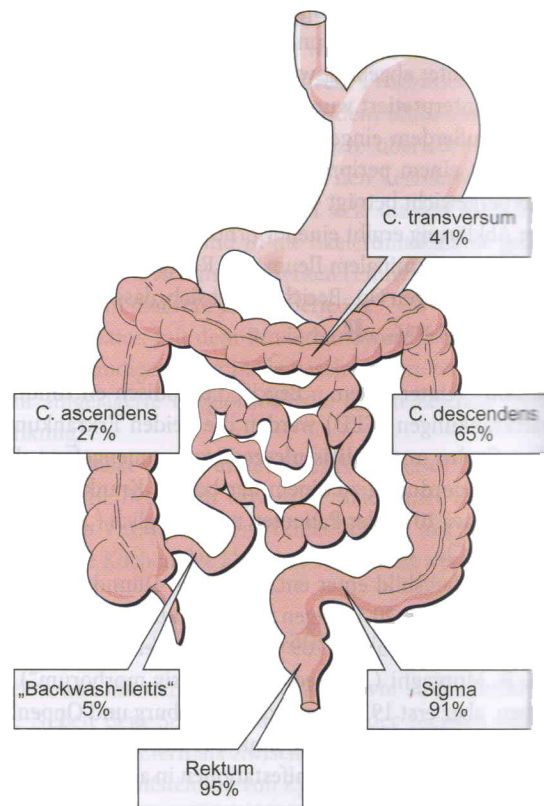
### 1.2.2 Colitis ulcerosa

Schätzungen gehen von etwa 200.000 Colitis ulcerosa-Patienten in Deutschland aus, aufgrund milder subklinischer Verläufe kann jedoch von einer gewissen Dunkelziffer ausgegangen werden. Im Gegensatz zu MC befällt die Colitis ulcerosa lediglich das Colon, selten ist auch das terminale Ileum im Rahmen einer sogenannten „Backwash-Ileitis“ betroffen. Die Ausbreitung der Entzündung ist bei der CU kontinuierlich und vollzieht sich von distal nach proximal. Histologische Charakteristika sind auf die Mukosa beschränkte entzündliche Veränderungen sowie Kryptenabszesse <sup>33)</sup>.

Als Leitsymptom stehen meist blutige Diarrhoen im Vordergrund, die mit Tenesmen einhergehen. Schmerzen werden tendenziell eher im linken Unterbauch verspürt. Stenosen und Fisteln finden sich nicht. Extraintestinale Manifestationen sind ähnlich häufig wie bei MC <sup>33),35)</sup>, wobei die primär sklerosierende Cholangitis deutlich stärker mit der CU (in 2 % der Fälle) als mit dem MC (0,4 %) assoziiert ist <sup>38)</sup>. Entgegen früherer Annahmen muss nach neueren Untersuchungen davon ausgegangen werden, dass das kolitisassoziierte Karzinom als Komplikation der chronischen Entzündung bei der CU und der Colitis Crohn ähnlich häufig ist. Die kumulative Inidenzrate nach 30 Jahren wird mit 7,5 % bis 18 % angegeben und scheint in letzter Zeit abzunehmen <sup>39),40),41)</sup>.

## Einleitung

Verlauf und medikamentöse Therapieoptionen entsprechend weitgehend denen des MC. Eine Heilung ist durch Proktokolektomie mit ileoanaler Pouch-Anlage aber grundsätzlich möglich <sup>33),34)</sup>.



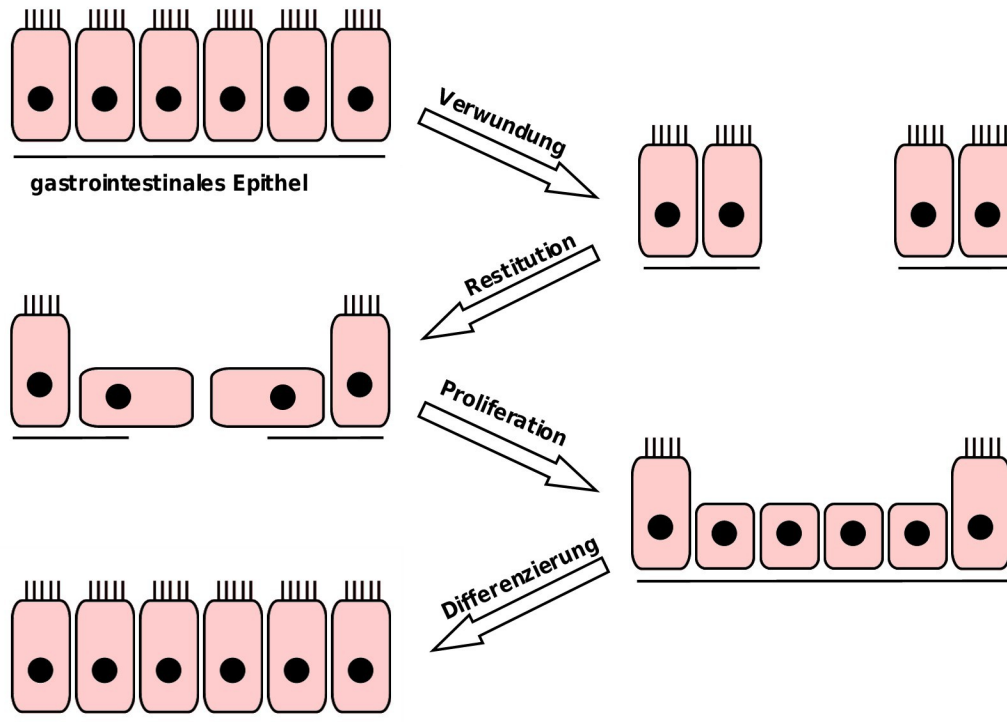
**Abb. 1.5: Krankheitslokalisation bei Colitis ulcerosa**

Immer beginnt die Erkrankung im Rektum und kann sich im Kolon von dort noch oral ausbreiten. Nur sehr selten ist auch das terminale Ileum im Sinne einer Backwash-Ileitis befallen. Andere Darmabschnitte sind nie betroffen. [aus <sup>33)</sup>

### 1.3 Gastrointestinale epitheliale Wundheilung

Die große Oberfläche des Darmes, in dem sich noch dazu rund 100 Billionen Bakterien befinden, macht schnelle und effektive Wundheilungsmechanismen bei Verletzungen des intestinalen Epithels notwendig <sup>42)</sup>.

In einem vereinfachten Modell, dessen Schritte sich *in vivo* überlappen, findet die epitheliale Wundheilung dreistufig statt: In einem als epitheliale Restitution bezeichneten Vorgang dedifferenzieren zunächst dem Epitheldefekt benachbarte IEC, migrieren in das geschädigte Areal und redifferenzieren dort. So kommt es nur durch Migration und ohne Zellproliferation zu einer schnellen Abdeckung der Wunde innerhalb von Minuten bis Stunden. Die Zellproliferation folgt erst im zweiten Schritt, um die Zahl der das Epithel bildenden Zellen wieder auf das Ausgangsniveau zu heben. Zur endgültigen Herstellung des ursprünglichen Zustands kommt es schließlich zur Reifung und weiteren Differenzierung der migrierten und proliferierten Zellen <sup>43),44),45),46)</sup>.



**Abb. 1.6: Modellhafter Ablauf der gastrointestinalen epithelialen Wundheilung**

Auf eine Verwundung reagiert das gastrointestinale Epithel mit einer schnellen Abdeckung des Defekts durch Migration benachbarter Epithelzellen (Restitution). Zur Herstellung des Ausgangszustands folgen Proliferation und Differenzierung (Einzelheiten siehe Text). [nach <sup>44)</sup>

Diese Vorgänge werden von zahlreichen Signalwegen gesteuert und beeinflusst. So induziert eine intestinale Verwundung beispielsweise den proinflammatorischen NF- $\kappa$ B-Signalweg <sup>47)</sup>, den MAPK p38-Signalweg und PI3K-abhängig GSK3 $\beta$ , die alle die Wundheilung positiv beeinflussen <sup>42),48),49),50)</sup>. Des Weiteren fördern auch zahlreiche Wachstumsfaktoren den epithelialen Wundschluss, z.B. Transforming Growth Factor-beta (TGF- $\beta$ ) durch Steigerung der Migration, nicht aber der Proliferation <sup>51)</sup>, Fibroblast Growth Factor (FGF) <sup>52)</sup> oder Epidermal Growth Factor (EGF) in einem u.a. PI3K-abhängigen Mechanismus <sup>53),54),55)</sup>.

Daneben besteht Evidenz für eine Beeinflussung der intestinalen epithelialen Wundheilung auch durch luminalen Faktoren wie Gallensäuren, mittelkettige Fettsäuren oder kommensale Bakterien <sup>42)</sup>.

Beschränkt sich die Wunde nicht auf das Epithel, sondern reicht sie in tiefere Schichten, so wird der Wundheilungsprozess noch weit komplexer und es kommt zur Einbeziehung von subepithelialen Myofibroblasten und Immunzellen. Als Folgen sind Narben, Fibrose oder gar Stenosen möglich <sup>56),57)</sup>.



### 1.4 Zellmigration

Die Migration von Zellen ist von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung, das Wachstum und die Regeneration menschlicher Gewebe (beispielsweise bei der gastrointestinalen epithelialen Wundheilung) und spielt in einer Vielzahl von pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Der komplex regulierte Prozess der Zellmigration kann modellhaft durch zyklische Prozesse erklärt werden:

Auf einen migrationsfördernden Stimulus hin kommt es zunächst zu einer Polarisierung der migrierenden Zelle in eine Zellfront (leading edge) und einen Zellschwanz (rear pole). Es folgen dann abwechselnd eine Protrusion der Zellfront in Migrationsrichtung und eine Retraktion des Zellschwanzes. Dieses Konzept ist in der Lage, die grundlegenden Prinzipien der Zellmigration zu erklären, stellt aber gleichzeitig eine Vereinfachung dar, da sich diese Prozesse insbesondere bei sich schnell fortbewegenden Zellen wie Neutrophilen überlappen und sich der Ablauf der Migration zwischen verschiedenen Zelltypen teilweise stark unterscheidet. So kann zum Beispiel die Morphologie der Protrusionen sogar bei derselben Zelle in Abhängigkeit von der Umgebung stark variieren <sup>58),59),60)</sup>.

#### 1.4.1 Polarisierung

Die Polarisierung der migrierenden Zelle kommt durch die gezielte Lokalisierung von Proteinen zustande. Unter Beteiligung der vor allem an der Spitze der Zellfront aktiven Rho-GTPase Cdc42 <sup>61),62),63)</sup> werden das Mikrotubulus Organisationszentrum und der Golgi-Apparat auf die in Richtung Zellfront gerichtete Seite des Zellkerns dirigiert, wodurch vermutlich die dorthin gerichtete Entstehung von Mikrotubuli und damit Bereitstellung und Transport von für die Protrusion benötigten Proteinen erleichtert werden <sup>64)</sup>.

Für die Festlegung der Migrationsrichtung ist die PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) von entscheidender Bedeutung. Schon 10 %-ige Gradienten eines Chemotaxins sorgen G-Protein-vermittelt für eine Akkumulierung und Aktivierung auf der Zellseite höherer Konzentration, während der Gegenspieler PTEN (phosphatase and tensin homolog) sich an den Seiten und dem Ende der wandernden Zelle sammelt. Über PIP<sub>3</sub> (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat) wird das chemotaktische Signal verstärkt und in die Zelle weitergeleitet <sup>58)</sup>.

Zellmigration geht zudem mit räumlichen Unterschieden in der intrazellulären Kalziumkonzentration einher. So sind die Spiegel am Vorderpol erniedrigt, während sie am

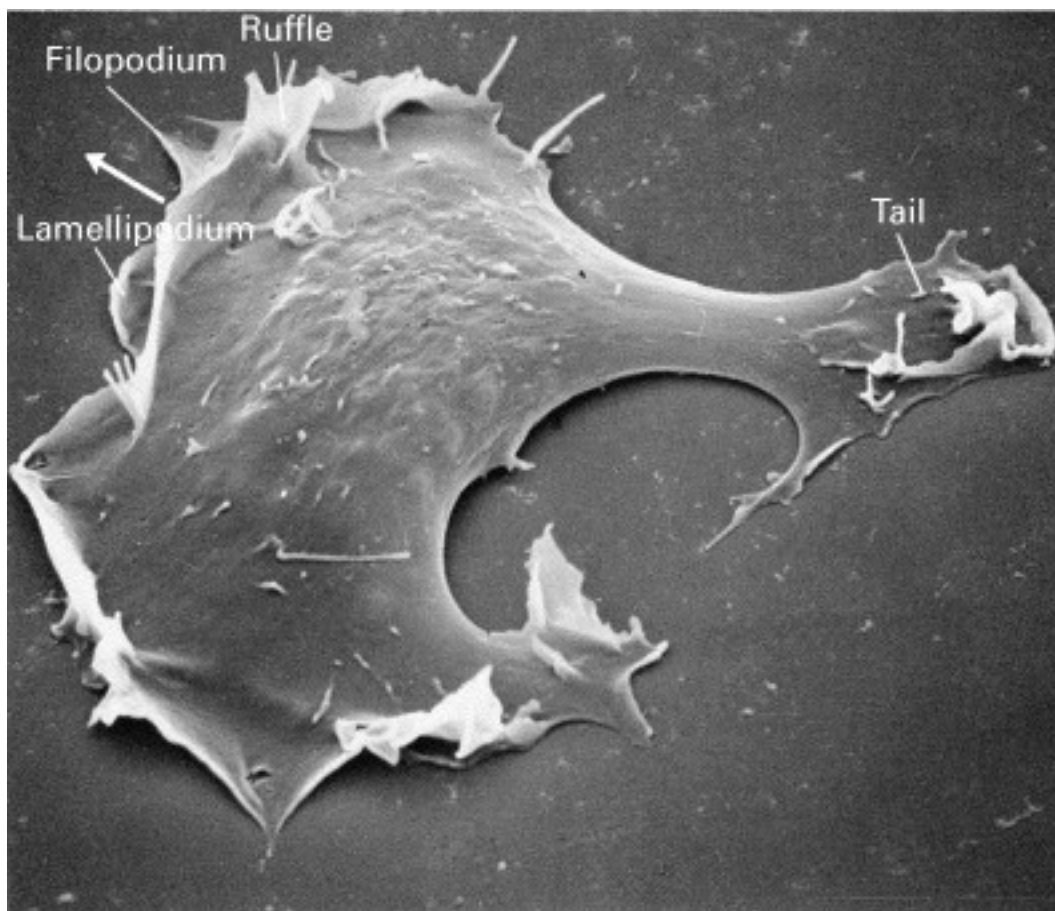
## Einleitung

---

Hinterpol erhöht sind. Ionenkanäle wie z.B. der NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor sind darin involviert <sup>65</sup>).

### 1.4.2 Vorwärtsbewegung des vorderen Zellpols

Das Vorschieben des vorderen Zellpols kann grundsätzlich mittels breiten Lamellipodien oder schmalen, feinen Filopodien zustande kommen. In beiden Fällen ist die intrazelluläre Aktinpolymerisation zu Mikrofilamenten die Triebkraft, durch die die Membran in Migrationsrichtung ausgestülpt wird <sup>58</sup>). Mikrofilamente sind Polymere aus G-Aktin mit einem (+)-Ende, an das sich ATP-abhängig weitere Monomere anlagern können, und einem (-)-Ende, von dem Monomere abdissoziieren können. Dieser Vorgang sowie die Architektur der Filamente werden durch zahlreiche assoziierte Proteine gesteuert. So induziert der durch sogenannte nucleation promoting factors (NPF) aktivierte Komplex Arp2/3 (actin related protein 2/3) in Lamellipodien Verzweigungen der Aktinfilamente und sorgt damit für eine verästelte Struktur. Dagegen kommen in Filopodien parallele Bündel aus Mikrofilamenten vor, die durch Fascin gebündelt werden <sup>66</sup>).



**Abb. 1.7: Rasterelektronenmikroskopisches Bild einer migrierenden Zelle**

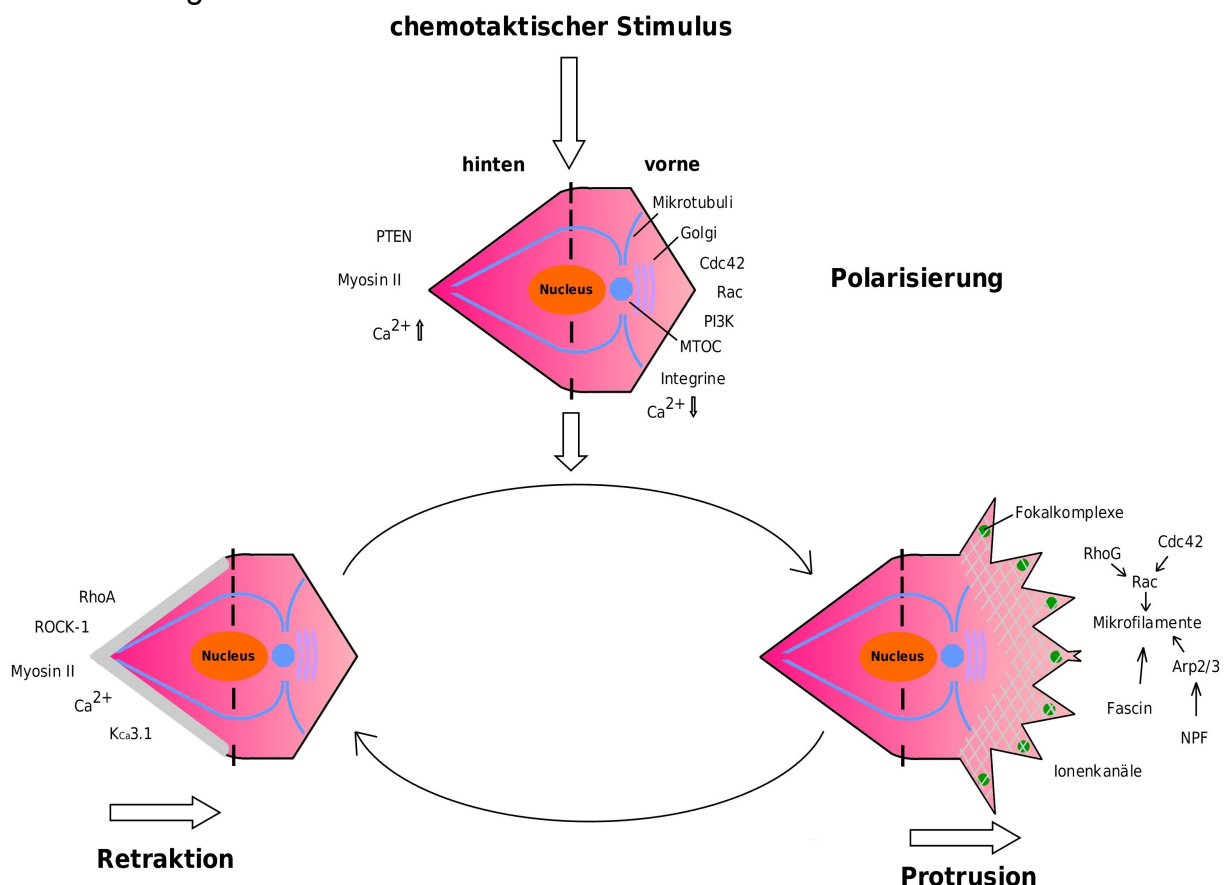
Es sind sowohl Lamelli- als auch Filopodien und der in Retraktion befindliche Zellschwanz zu erkennen (Quelle: <http://bioweb.wku.edu/courses/biol22000/27Actin/Lecture.html>)

## Einleitung

Die Stabilisierung der Membranprotrusionen erfolgt über Integrine an der extrazellulären Matrix oder anderen Zellen. Integrine sind heterodimere Transmembranproteine aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Je nach Kombination der verschiedenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten dienen die Integrine als Rezeptoren für eine Vielzahl von extrazellulären Liganden. Über eine enorme Menge an assoziierten Proteinen wird eine Verbindung der intrazellulären Domänen mit dem Aktin-Zytoskelett hergestellt. Auf diese Weise bilden sich an der Front von Lamellipodien sogenannte Fokalkontakte aus. Als intrazelluläre Verbindung zu den Mikrofilamenten dienen unter anderem Vinculin und Paxillin <sup>67)</sup>.

Reguliert wird die Ausbildung von Lamelli- und Filopodien durch die Rho-GTPasen Rac, Cdc42 und RhoG, die in GTP-gebundenem Zustand aktiv sind und die Polymerisation von Aktinfilamenten und die Zusammenlagerung von Integrinen induzieren sowie sich gegenseitig steuern und stabilisieren <sup>63),68)</sup>.

Auch Ionenkanäle können zur Ausbildung von Lamelli- und Filopodien beitragen, indem sie Ionen in die Ausstülpungen aufnehmen und der folgende passive Wassereinstrom zu einer Schwellung führt <sup>65)</sup>.



### Abb. 1.8: Schematische Darstellung wichtiger Vorgänge der Zellmigration

Auf einen chemotaktischen Stimulus hin kommt es zur Polarisierung der Zelle und der Ansammlung bestimmter Moleküle und Zellorganellen am vorderen bzw. hinteren Pol. Die folgenden Prozesse können modellhaft durch eine zyklische Abfolge von Protrusion der Zellfront und Retraktion des Zellschwanzes beschrieben werden (Einzelheiten siehe Text).

### 1.4.3 Nachziehen des hinteren Zellpols

Analog sind Ionenkanäle auch für die Folgebewegung des Zellschwanzes wichtig: Insbesondere konnte für den Kaliumkanal  $K_{Ca}3.1$  gezeigt werden, dass seine Aktivität für ein Anschwellen des hinteren Zellpols essentiell ist. Interessanterweise wird er vor allem in migrationsfähigen Zellen exprimiert <sup>69)</sup>.

Ausgehend von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren für Chemotaxine wird im hinteren Zellpol über eine Signalkaskade die Rho-GTPase RhoA aktiviert. RhoA hat antagonistische Wirkungen zu Rac und stimuliert unter anderem Myosin II zur Ausbildung kontraktile Komplexe mit Aktin, die ein Nachziehen des hinteren Zellpols ermöglichen. Zudem hemmt Myosin II Rac- und  $PIP_3$ -vermittelte Signale <sup>70)</sup>.

Des Weiteren vermittelt RhoA im Zellschwanz über die Kinase ROCK-1 (Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1) eine Lockerung der fokalen Komplexe <sup>71)</sup>.

## 1.5 Kaliumkanäle

Die Lipiddoppelschicht von Zellmembranen verhindert den Durchtritt geladener Ionen. Daher verfügen Zellen in ihren Membranen über Ionenkanäle, die als integrale Membranproteine mit einer wassergefüllten Pore den Ein- und Ausstrom von Ionen entlang des elektrochemischen Gradienten ermöglichen. Kationenkanäle weisen dabei als verbindendes Bauprinzip auf, dass sie aus jeweils vier Untereinheiten bestehen, wobei jede Untereinheit zwingend zwei porenbildende Transmembranhelices sowie eine sie verbindende sogenannte P-Schleife enthält. Fakultativ können in jeder Untereinheit außerdem noch vier weitere Transmembranhelices vorhanden sein, deren Funktion es ist, als Sensoren der Membranspannung das „gating“, also den Wechsel zwischen Offen- und Geschlossenzuständen des Kanals, zu steuern. Durch verschiedene homo- und heteromere Kombinationen von Untereinheiten mit zwei bzw. sechs Domänen – was bei manchen Kanälen bereits auf DNA-Ebene geschieht – entstehen eine Vielzahl von Kanalfamilien und -unterfamilien, deren Schaltverhalten unterschiedlich reguliert ist. Die Substratspezifität kommt im Fall von Kaliumkanälen durch einen speziellen Abschnitt der P-Schleifen der Untereinheiten zustande: Jeweils ein Tyrosin- und ein Glycinrest tragen zu einer Ringstruktur bei, die die Hydrathülle von Kaliumionen, nicht aber von anderen Ionen, ersetzen kann und somit den Ionendurchtritt auch energetisch ermöglicht <sup>72),73)</sup>.



**Abb. 1.9: Grundstruktur von Kaliumkanälen**

Ansicht von extrazellulär (links) sowie von seitlich (rechts). Ein Kaliumkanal setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen (Einzelheiten siehe Text). Quelle: <sup>73)</sup>

### 1.5.1 Kaliumkanalfamilien

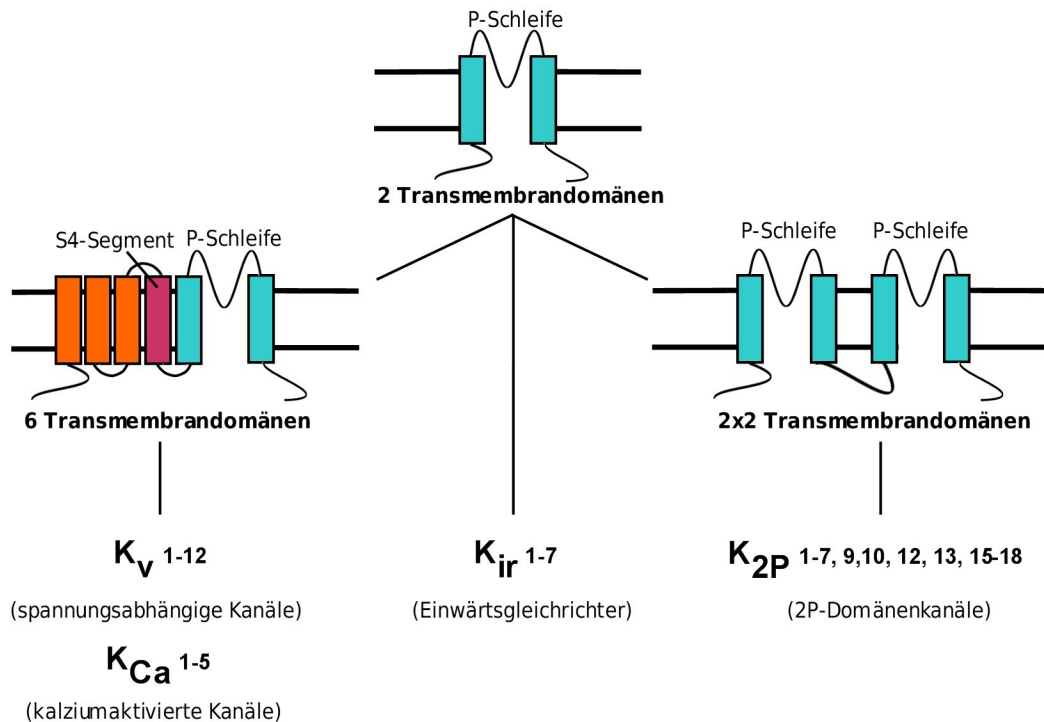
In Abhängigkeit von der Morphologie der Untereinheiten und des gating-Verhaltens werden vier Familien von selektiven Kaliumkanälen unterschieden, deren Nomenklatur sich in dieser Arbeit an den offiziellen Benennungen der IUPHAR (International Union of Basic and Clinical Pharmacology) orientiert. Die alternativen Benennungen des HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) sind im Folgenden einmalig in Klammer angeführt:

- Einwärtsgleichrichter-Kaliumkanäle  $K_{ir}$  (KCNJ): Sieben Unterfamilien mit insgesamt 15 Vertretern dieser Familie sind bis heute bekannt. Sie bestehen aus jeweils vier homologen Untereinheiten mit zwei Transmembrandomänen <sup>74)</sup>. Der Name rührt daher, dass durch sie – bei hyperpolarisierter Membran - Kaliumionen in erster Linie nach intrazellulär fließen, während der Kaliumstrom bei gegenüber dem Gleichgewichtspotenzial depolarisierter Membran durch andere Ionen, die die Kanalpore blockieren, verhindert wird. Vor allem an quergestreifter Muskulatur und epithelialen Zellen bedingen sie das Ruhemembranpotenzial <sup>72)</sup>. Die beiden Kanäle der Unterfamilie  $K_{ir6}$  weisen zudem eine zytoplasmatische Bindungsstelle für ATP auf, dessen Bindung zur Inaktivierung des Kanals führt. Dies spielt unter anderem bei der Insulinfreisetzung aus den B-Zellen des Pankreas eine wichtige Rolle <sup>72)</sup>, wo

diese Kanäle aufgrund ihrer Kopplung mit dem Sulfonylharnstoffrezeptor auch ein bedeutendes pharmakologisches Ziel sind <sup>33)</sup>. Einige weitere Einwärtsgleichrichter werden über intrazelluläre Sensoren außerdem durch den pH-Wert reguliert. Mutationen von  $K_{ir}$ -Kanälen spielen bei zahlreichen Erkrankungen eine Rolle, u.a. ist ein Funktionsverlust von  $K_{ir}1.1$  für das Bartter-Syndrom, ein renales Salzverlustsyndrom, verantwortlich <sup>33),74)</sup>.

- 2P-Domänen-Kaliumkanäle  $K_{2P}$  (KCNK): Diese Kanalfamilie umfasst wiederum 15 Mitglieder, die allesamt Dimere darstellen, wobei jedes Monomer zwei Motive aus zwei Transmembrandomänen mit dazwischenliegender P-Schleife enthält. Vor allem in neuronalen Geweben sind sie für die Generierung des Gleichgewichtspotenzials der Zellmembran verantwortlich und werden durch eine Fülle von Einflüssen reguliert <sup>75)</sup>.
- Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle  $K_v$  (KCNA, KCNB, KCNC, KCND, KCNF, KCNG, KCNQ, KCNS, KCNH): Zwölf Unterfamilien mit insgesamt 40 Kanälen gehören dieser damit größten Kaliumkanalfamilie an. Sie bestehen aus Homo- oder Heterotetrameren von Untereinheiten mit sechs (in manchen Fällen auch sieben) Transmembrandomänen <sup>76)</sup>. Eine der nicht porenbildenden Transmembranhelices, das sogenannte S4-Segment, fungiert dabei als Spannungsfühler: Aufgrund positiv geladener Aminosäurereste bewegt es sich bei einer Membrandepolarisation in Richtung Extrazellulärraum und induziert dadurch eine Konformationsänderung der porenbildenden Helices, worüber der Kanal für Kaliumionen durchgängig wird. Bei einer Repolarisation dreht sich dieser Prozess um. Da die Aktivierung von  $K_v$ -Kanälen deutlich langsamer erfolgt als bei entsprechenden  $Na_v$ -Kanälen, ermöglichen sie im Zusammenspiel mit diesen den typischen Ablauf des Aktionspotenzials an Nerven und Muskeln <sup>72)</sup>. Auch  $K_v$ -Kanäle sind an zahlreichen pathologischen Prozessen beteiligt, ein bekanntes Beispiel sind erbliche long-QT-Syndrome ausgelöst durch Mutationen in  $K_v7.1$  <sup>76)</sup>.
- Kalziumaktivierte Kaliumkanäle  $K_{Ca}$  (KCNN, KCNM, KCNT, KCNU): In ihrem Aufbau gleicht diese Kanalfamilie den spannungsaktivierten Kaliumkanälen, d.h. die jeweils vier Untereinheiten bestehen aus sechs (teilweise sieben) Transmembrandomänen. Die Familie umfasst zwei unterschiedlichen Gruppen: zum einen die Unterfamilien  $K_{Ca}2$  („small conductance“, KCNN1-3) und 3 („intermediate conductance, KCNN4), die Kalzium über C-terminal assoziiertes Calmodulin detektieren und dadurch aktiviert werden und zum anderen die Unterfamilien  $K_{Ca}1$ , 4 und 5 („large conductance“), wobei  $K_{Ca}1.1$  durch Erkennung von Kalzium an Motiven der eigenen

C-terminalen Aminosäuresequenz aktiviert wird und die Vertreter der Unterfamilien 4 und 5 nicht kalziumreguliert sind, sondern nur aufgrund ihrer genetischen Verwandtschaft mit  $K_{Ca}1.1$  dieser Familie zugeordnet werden <sup>77)</sup>.



**Abb. 1.10: „Stammbaum“ der Kaliumkanäle**

Die Monomere der Kaliumkanäle aller Kaliumkanalfamilien enthalten zwei Transmembrandomänen und eine sie verbindende P-Schleife. Bei 2P-Domänenkanälen sind zwei solcher Motive kombiniert, die Kanalbildung erfolgt durch Dimerisierung. Spannungsabhängige und kalziumaktivierte Kanäle enthalten in jedem ihrer vier Monomere noch vier weitere Transmembrandomänen. [nach <sup>72)</sup>

**1.5.2 Kaliumkanäle und Zellmigration**

Ein bedeutender – je nach Gewebe und Kanal positiver oder negativer – Einfluss von Kaliumkanälen auf die Zellmigration konnte bereits mehrfach gezeigt werden <sup>78),79),80),81),82),83)</sup>. Ein zugrunde liegender Mechanismus ist, dass Kaliumkanäle das Membranpotenzial der Zelle und damit wiederum die Triebkraft für den Kalziumeinstrom kontrollieren, der wie oben beschrieben bei der Migration eine wichtige Rolle spielt. Daneben regulieren Kaliumkanäle auch das Zellvolumen und beeinflussen so das lokale An- und Abschwellen von „leading edge“ und „rear pole“ im Rahmen von Protrusion und Retraktion. Des Weiteren existieren direkte Interaktionen zwischen Kaliumkanälen und Integrinen, im Rahmen derer über Konformationsänderungen Signale ausgetauscht werden können <sup>59)</sup>.

**1.5.3 Kaliumkanäle in IEC**

Wie alle Zellen, exprimieren auch IEC Kaliumkanäle in ihrer Zellmembran <sup>72)</sup>. Diese kontrollieren nicht nur das Membranpotenzial, sondern sind auch an den zahlreichen

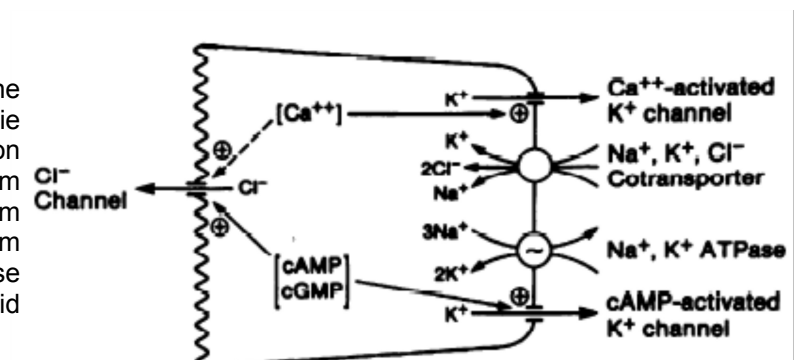
## Einleitung

Ionentransportprozessen über die apikale und basolaterale Membran von IEC beteiligt: Für das Membranpotenzial sind in humanen IEC basolaterale  $K_{Ca3.1}$ -Kanäle entscheidend<sup>84)</sup>. Das negative Membranpotenzial stellt wiederum die Triebkraft für den im Rahmen von Absorptions- und Resorptionsvorgängen notwendigen Transport anderer Ionen über die Zellmembran dar<sup>85)</sup>. Als Beispiel sei die Chloridsekretion ins Darmlumen erwähnt: Basolaterale kalzium- und cAMP-abhängige Kaliumkanäle vermitteln und regulieren die Hyperpolarisation von IEC und treiben so apikal Chlorid aus der Zelle. Zudem sind sie Teil von Kaliumrecycling-Kreisläufen, die dafür sorgen, dass netto Chlorid von basolateral nach luminal sezerniert wird und passiv Wasser mit ausströmt<sup>86)</sup>.

Während physiologischerweise Absorptionsvorgänge die Sekretion überwiegen, ist dieses Verhältnis bei vielen pathologischen Zuständen, wie z.B. CED, gestört und Ursache von Diarrhoe<sup>85),86),87),88)</sup>.

### Abb. 1.11: Chloridsekretion in IEC:

Basolaterale Kaliumkanäle vermitteln eine Hyperpolarisation und erzeugen so die Triebkraft für den apikalen Ausstrom von Chlorid. Dieses wurde basolateral im Cotransport mit Kalium und Natrium aufgenommen. Das Recycling von Kalium und Natrium wird durch die  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase vervollständigt, sodass netto Chlorid sezerniert wird. Quelle:<sup>86)</sup>

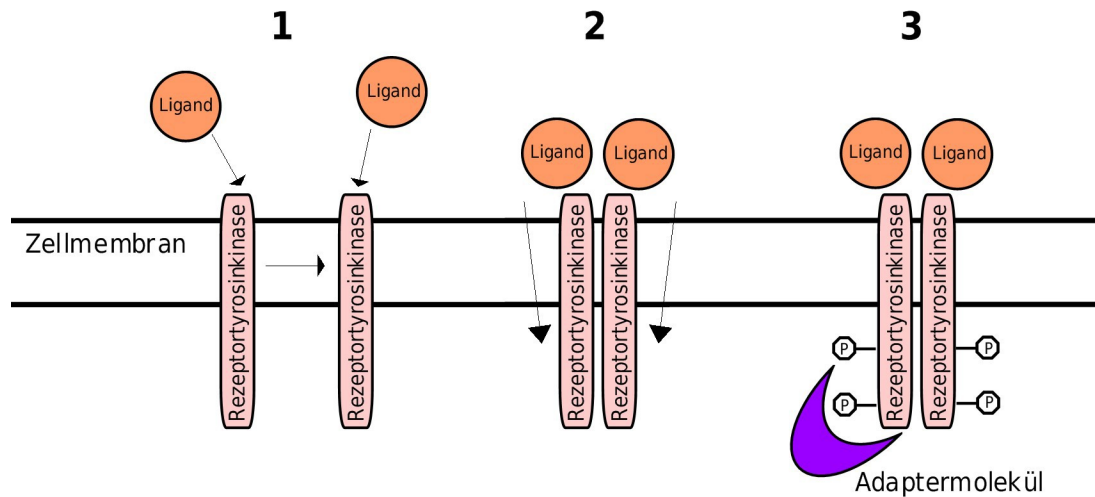


## 1.6 Intrazelluläre Signalkaskaden ausgehend von EGFr

Der EGFr zählt zu den Rezeptortyrosinkinasen, zu denen auch die Rezeptoren für Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), für Platelet Derived Growth Factor (PDGF) oder für Insulin zählen<sup>89)</sup>.

Die Aktivierung intrazellulärer Signalwege wird durch Bindung der Liganden an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors initiiert. Diese führt zur Dimerisierung der Rezeptortyrosinkinase und zur Autophosphorylierung von Tyrosinresten in den cytoplasmatischen katalytischen Domänen. Durch diese Phosphorylierung entstehen sogenannte SH2-, SH3- („src-homology“) und PTB-Domänen („phosphotyrosin-bindend“), die als Adapterregionen für intrazelluläre Signalmoleküle dienen und so die Weiterleitung des Signals in verschiedene Signalwege ermöglichen<sup>89),90)</sup>. Auf diese Weise steuert der EGFr zentrale Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose<sup>91)</sup>.





**Abb. 1.12: Autophosphorylierung von Rezeptortyrosinkinasen:**

Nach Ligandbindung (1) kommt es zur Dimerisierung von Rezeptortyrosinkinasen (2). Dies ermöglicht die Autophosphorylierung von intrazellulären Domänen, die in phosphorylierter Form als Adapterregion für intrazelluläre Signalmoleküle dienen (3). nach <sup>90)</sup>

## 1.6.1 PI3K-Signalweg

### 1.6.1.1 Aktivierung von PKB/Akt

Der PI3K-Signalweg spielt in zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen eine zentrale Rolle <sup>92)</sup>. Zu den durch ihn regulierten Funktionen zählen beispielsweise Apoptose, Zellwachstum, Zellproliferation und Zellmigration, Angiogenese und Stoffwechsel. PKB (Proteinkinase B) und Akt (v-akt murine thymoma viral oncogene homologue) sind dabei Synonyme für die zentrale Kinase der Sequenz, die in den drei eng verwandten Isoformen Akt-1, -2 und -3 vorkommt <sup>93)</sup>.

Die Aktivierung vollzieht sich wie folgt: An die SH2- und SH3-Domänen der aktivierten Rezeptortyrosinkinasen kann auch die regulatorische Einheit der PI3K binden, wodurch ihre katalytische Einheit aktiviert wird. Alternativ kann auch Insulinrezeptor-Substrat-1 (IRS-1) mit der Rezeptortyrosinkinase interagieren und dann seinerseits PI3K aktivieren. Aktivierte PI3K phosphoryliert den Zellmembranbestandteil Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) zu  $PIP_3$ .  $PIP_3$  dient nun wiederum als Bindungsstelle für PDK-1 (phospholipid-dependent kinase) und PKB/Akt, die so an die Zellmembran rekrutiert werden, wo PKB/Akt von PDK-1 an Threonin 308 (T308) phosphoryliert wird <sup>93)</sup>.

Daneben ist für die Aktivierung von PKB/Akt auch die Phosphorylierung an Serin 473 (S473) erforderlich. Diese wird durch den mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2)-Komplex vermittelt. Die Phosphorylierung von S473 begünstigt die Phosphorylierung von T308 <sup>94),95)</sup>. mTORC2 wird seinerseits auf noch unbekannte Weise von Rezeptortyrosinkinasen aktiviert <sup>93)</sup>.

### 1.6.1.2 Regulation der Aktivierung

Um überschießende Reaktionen zu vermeiden, gibt es – wie in anderen Signalwegen auch – Gegenspieler, die die Aktivierung von PKB/Akt negativ regulieren.

So ist der Tumorsuppressor PTEN in der Lage, die PIP<sub>3</sub>-Phosphorylierung wieder aufzuheben und die Phosphatase PHLPP (PH domain and leucin rich repeat protein phosphatase) kann als Gegenspieler von mTORC2 die Akt-Phosphorylierung an S473 rückgängig machen <sup>93)</sup>.

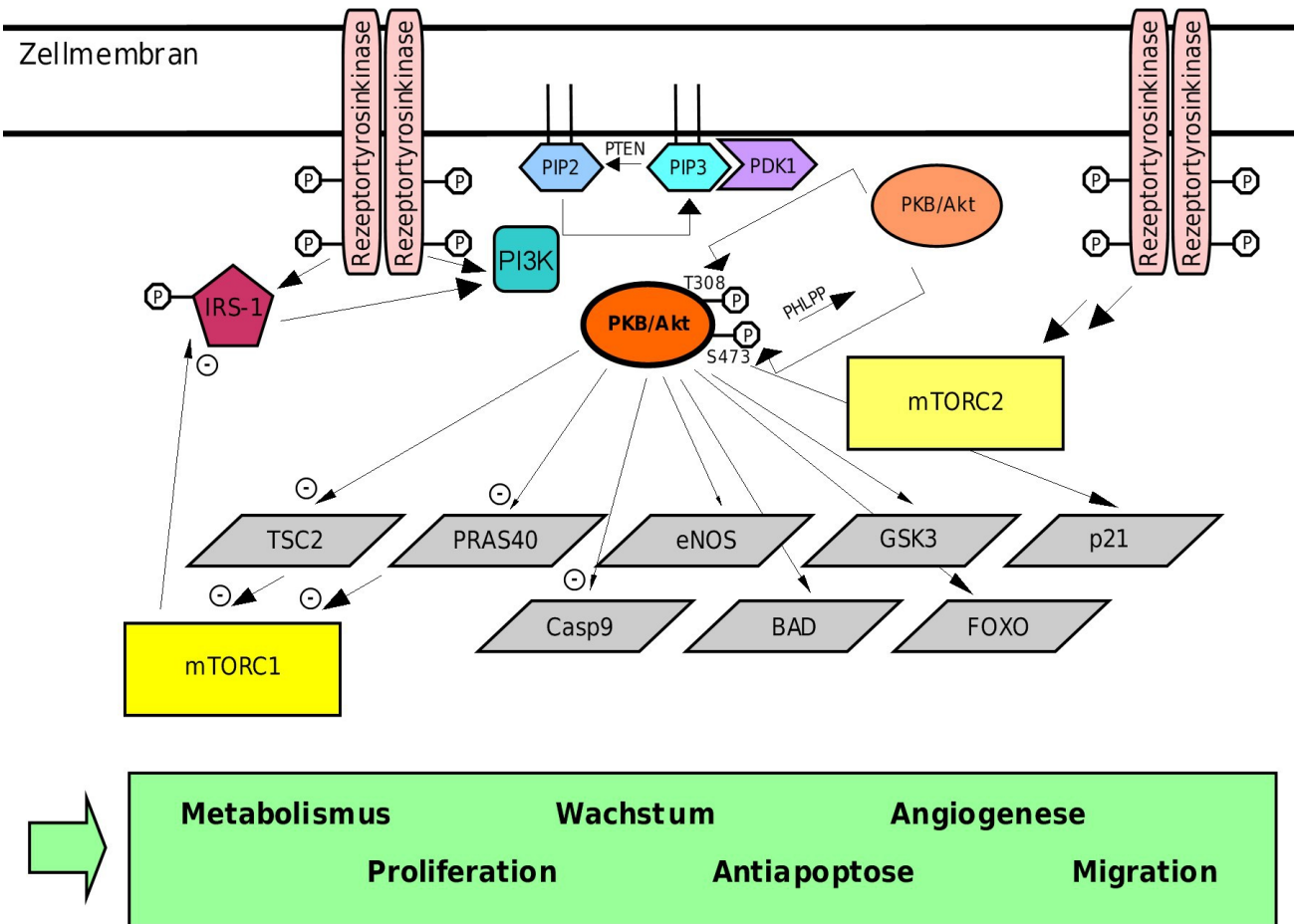
Zudem besteht ein typischer negativer feedback-Mechanismus, durch den die Aktivierung von PKB/Akt zur Inhibition von IRS-1 und so zur Bremsung der weiteren Aktivierung führt. Dieser feedback-loop wird über den mTORC1-Komplex vermittelt: mTORC1 sowie Substrate von mTORC1 hemmen IRS-1 <sup>93)</sup>. PKB/Akt steigert die Aktivität von mTORC1, indem es PRAS40 (proline-rich Akt/PKB substrate 40 kDa) und TSC2 (tuberous sclerosis complex 2), einen direkten und einen indirekten Inhibitor von mTORC1 phosphoryliert und damit hemmt <sup>96),97),98)</sup>.

### 1.6.1.3 Effekte von PKB/Akt

Seine Wirkung übt PKB/Akt durch die Phosphorylierung von Serin- und/oder Threoninresten anderer Proteine aus, die dadurch ihrerseits aktiviert oder inhibiert, vor Degradation geschützt, von anderen Proteinen gebunden oder in andere zelluläre Kompartimente transloziert werden <sup>92)</sup>.

Ein Effekt von PKB/Akt ist der antiapoptotische Einfluss, der unter anderem über eine Hemmung von Caspase-9, FOXO (forkhead box O), BAD (bcl-2-associated death promotor) und GSK-3 (Glykogensynthasekinase 3) vermittelt wird und PKB/Akt zu einem in der Tumorforschung interessanten Protein macht <sup>93)</sup>.

GSK-3 weist darauf hin, dass PKB/Akt auch in den Metabolismus eingreift und dazu noch zahlreiche weitere Effektoren beeinflusst. Daneben greift PKB/Akt über den bereits geschilderten aktivierenden Einfluss auf mTORC1 auch fördernd in die Proteinbiosynthese und damit das Zellwachstum ein. Zudem übt PKB/Akt über Aktivierung von eNOS (epithelial NO-Synthase) einen steigernden Einfluss auf die Angiogenese aus und regt über eine Interaktion mit verschiedenen Zellzyklus-kontrollierenden Proteinen (z.B. p21<sup>CIP/WAF</sup>) auch zur Proliferation an <sup>92)</sup>.



**Abb. 1.13: Schematische Darstellung des PKB/Akt-Signalwegs**

Ausgehend von aktivierten Rezeptortyrosinkinasen wird die Kinase PKB/Akt durch eine von mTORC2 und PI3K/PDK1 vermittelte doppelte Phosphorylierung aktiviert und beeinflusst dann seinerseits zahlreiche Effektorproteine mit pleiotropen Wirkungen (dargestellt ist eine Auswahl an Effektoren). Weitere Einzelheiten im Text.

Nicht zuletzt beeinflusst PKB/Akt auch die Migration von Zellen, wobei den Isoformen von Akt unterschiedliche, noch dazu kontextabhängige Auswirkungen, zukommen. An Brustkrebszelllinien konnte gezeigt werden, dass Akt-1 deren Migration hemmt und Akt-2 sie stimuliert <sup>99),100)</sup>, während Experimente mit embryonalen Mäusefibroblasten dazu gegensätzliche Effekte von Akt-1 und -2 zeigten <sup>101)</sup>.

## 1.6.2 MAPK/ERK-Signalweg

### 1.6.2.1 Aktivierung von ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase)

Der MAPK/ERK-Signalweg ist eine weitere wichtige Signalkaskade, die ausgehend von Rezeptortyrosinkinasen aktiviert wird und unter anderem proliferative und anti-apoptische Effekte vermittelt <sup>102)</sup>.

ERK 1 und 2 sind intrazelluläre Serin-/Threoninkinasen mit einer Molekülmasse von 44 bzw. 42 kDa und 85 % Sequenzhomologie. Sie werden ihrerseits durch Phosphorylierung

## Einleitung

---

eines Threonin- und Tyrosinrestes aktiviert. Diese Aktivierung vollzieht sich im Rahmen einer Kinasekaskade <sup>103)</sup>.

Deren erster Schritt ist der Austausch von GDP gegen GTP im membranständigen kleinen G-Protein Ras, was durch den Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) Sos bewerkstelligt wird. Dieser besitzt eine SH3-Domäne, mit der das Adapterprotein Grb2 interagieren kann. Dessen zusätzliche SH2-Domäne vermittelt den Kontakt mit der phosphorylierten Rezeptortyrosinkinase, wodurch Sos an die Membran rekrutiert wird. Als zusätzliche Adapter zwischen Grb2 und den Phosphotyrosinen können Shc und SHP2 (SH2-containing tyrosine phosphatase) dienen <sup>104)</sup>.

Das so entstehende Ras-GTP aktiviert nun die Serin-/Threoninkinase Raf-1, welche ihrerseits die Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kinasen MEK 1 und 2 phosphoryliert. ERK 1 und 2 sind das Substrat dieser Threonin-/Tyrosinkinasen <sup>90)</sup>.

ERK 1 und 2 gehören zur Familie der MAPK, zu der unter anderem auch die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und die p38-Kinase gehören. Deren Aktivierung vollzieht sich in Abhängigkeit von verschiedenen Stimuli in analog aufgebauten Phosphorylierungskaskaden durch andere Kinasen <sup>105),106),107)</sup>.

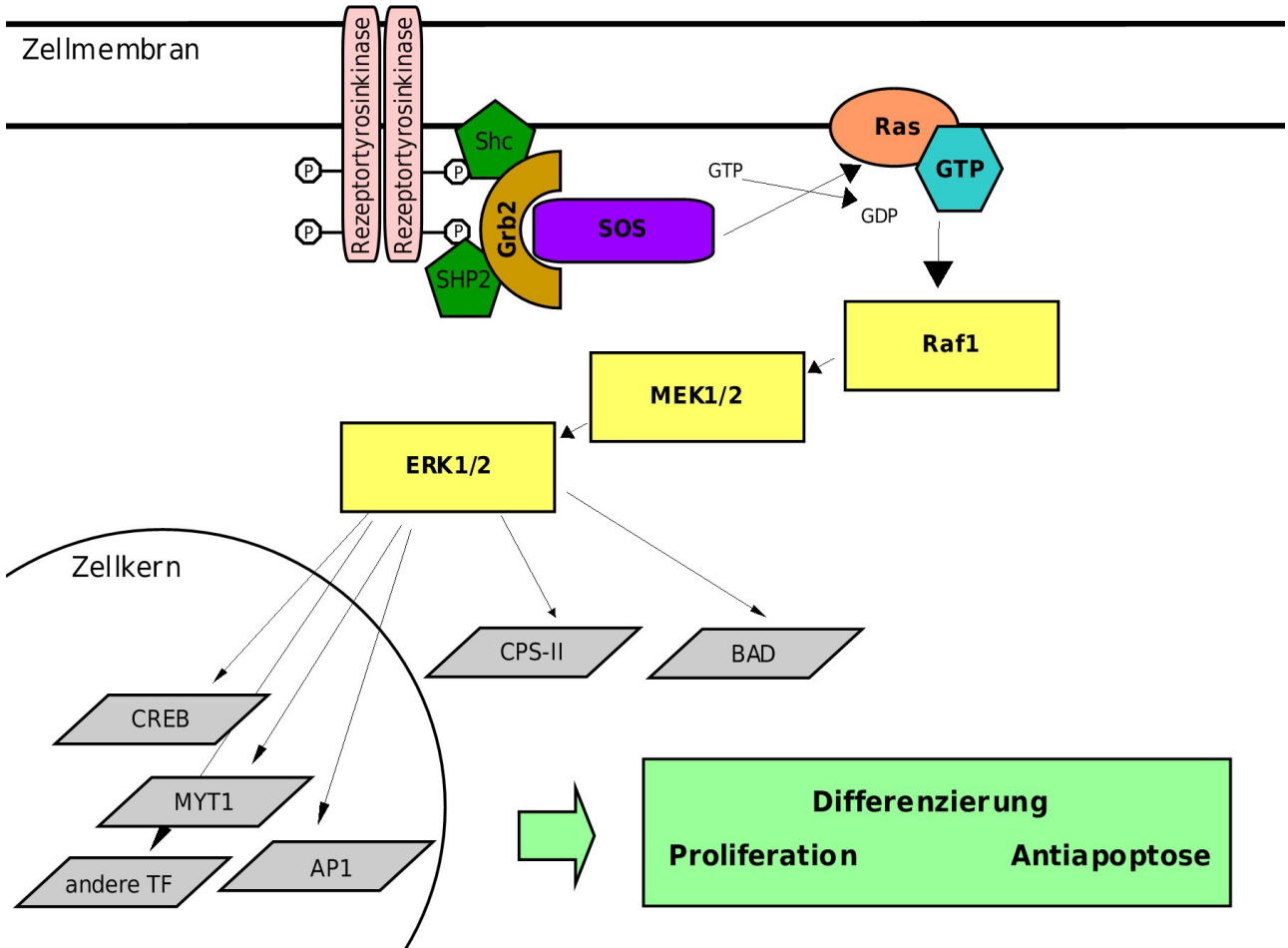
### 1.6.2.2 Effekte von ERK1/2

Durch die Phosphorylierung von zahlreichen intrazellulären und membranständigen Substraten, insbesondere aber durch schnelle Translokation in den Zellkern und dortige Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren beeinflussen ERK1/2 eine Vielzahl von zellulären Funktionen <sup>104)</sup>.

Eine zentrale Rolle nimmt dabei die Stimulation der Zellproliferation ein. Dazu werden unter anderem Carbamoylphosphat-Synthetase (CPS) als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym der Pyrimidinbiosynthese aktiviert und die Kinase MYT1 (myelin transcription factor), die den Zellzyklus bremst, inaktiviert. Durch AP-1(activator protein 1)-Aktivierung wird außerdem vermehrt Cyclin D1 gebildet <sup>102)</sup>.

Auf zweierlei Arten wirken ERK1/2 der Apoptose entgegen: Durch Phosphorylierung des proapoptischen Proteins BAD an Serin 112 wird eine verminderte Apoptoserate ebenso beobachtet wie durch die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP-response element binding protein), der seinerseits die Transkription antiapoptischer Effektoren stimuliert <sup>108)</sup>.

Zudem sind ERK1/2 in der Lage, die Differenzierung von Zellen zu fördern <sup>109)</sup>.



**Abb. 1.14: Schematische Darstellung des ERK1/2-Signalwegs**

Über mit aktivierten Rezeptortyrosinkinase interagierende Adaptermoleküle wird SOS an die Membran rekrutiert und wirkt als Guaninnukleotid-Austauschfaktor für Ras. Ras-GTP aktiviert die Kinasekaskade von Raf1 über MEK1/2 zu ERK1/2. ERK1/2 phosphoryliert intrazelluläre Proteine und zahlreiche Transkriptionsfaktoren (dargestellt ist eine Auswahl an Effektoren). Weitere Einzelheiten im Text.

### 1.6.3 Weitere von Rezeptortyrosinkinase ausgehende Signalkaskaden

#### 1.6.3.1 Phospholipase C- $\gamma$ (PLC- $\gamma$ )-Signalweg

Auch das Enzym PLC- $\gamma$  interagiert über SH2- und SH3-Domänen mit Phosphotyrosinen der aktivierten Rezeptortyrosinkinase. Über eine PH-Domäne kann dann PIP<sub>3</sub> erkannt (durch PI3K aus PIP<sub>2</sub> phosphoryliert, s.o.) und zu Inositol-(1,4,5)-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG) gespalten werden. IP<sub>3</sub> wird von einem Rezeptor am endoplasmatischen Retikulum gebunden und führt dort zur Freisetzung von Kalzium. Im Verbund mit DAG führt Kalzium zur Aktivierung der Proteinkinase C, einer Serin-/Threoninkinase, die Transkriptionsfaktoren reguliert<sup>90</sup>.

#### 1.6.3.2 Signal transducers and activators of transcription (STAT)-Signalweg

Durch die Steuerung von Migration, Proliferation, Apoptose und Differenzierung von Zellen

## Einleitung

---

kommt dem STAT-Signalweg eine wichtige Bedeutung für eine Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen zu. Dies trifft insbesondere auf die Immunzellentwicklung zu <sup>110)</sup>.

Erneut führt eine SH2-Domäne in der Struktur von STAT3-Proteinen zu deren Bindung und Aktivierung am EGFr und verwandten Rezeptoren. Dies ermöglicht eine Homo- oder Heterodimerisierung zweier STATs, woraufhin diese in den Zellkern translozieren und die Expression von Zielgenen beeinflussen, die u.a. für die Regulation von Zellzyklus und Apoptose bedeutsam sind <sup>111)</sup>.

Alternativ können die sieben Mitglieder der STAT-Familie auch über den aktivierten IL-6-Rezeptor und assoziierte Januskinasen (JAKs) aktiviert werden <sup>112)</sup>.

### 1.6.3.3 Src-Signalweg

Auch der Src-Signalweg (von Sarcoma) steht im cross-talk mit dem EGFr. Zum einen enthält diese mehrere Mitglieder umfassende Familie von zytosolischen Tyrosinkinase ebenfalls eine SH2-Domäne für eine direkte Interaktion mit Phosphotyrosinresten, zum anderen scheint Src seinerseits Tyrosine am EGFr zu phosphorylieren und seine Aktivierung so zu verstärken <sup>113)</sup>. Zu den von Src phosphorylierten Zielproteinen zählen PI3K, STAT3 und die für die Zellmigration wichtige Focal Adhesion Kinase (FAK) <sup>114)</sup>.

### 1.6.4 EGFr und Kaliumkanäle

EGFr und die von ihm ausgehenden Signalwege einerseits und verschiedene Kaliumkanäle andererseits beeinflussen sich in vielfacher Weise.

Es ist bereits seit Langem bekannt, dass EGF Kaliumkanäle und somit Kaliumströme über die Membran sowie das Membranpotenzial beeinflusst <sup>115),116)</sup>.

Aber auch im Rahmen von Proliferation und Migration ist dieses Zusammenspiel von Bedeutung, da EGF in Lungenepithelzelllinien bestimmte Kaliumströme aktiviert und Kaliumkanalinhibitoren ihrerseits EGF-abhängige Migrationsvorgänge beeinflussen <sup>86)</sup> sowie die wachstumsfaktorabhängige Proliferation in einer Myeloblastenzelllinie und an Kornealzellen mit der Aktivität eines Kaliumkanals gekoppelt ist <sup>117),118)</sup>.

## 1.7 Arbeitsziele

Die molekularen und zellulären Grundlagen und Folgen von entzündlichen Prozessen im menschlichen Darm, wie sie beispielsweise bei CED auftreten, und die daraus resultierenden Symptome sind bisher nur unzureichend verstanden. Trotz großer

## Einleitung

---

Fortschritte im Verständnis der pathogenetischen Ursachen dieser Erkrankungen, zeigt sich dies auch in den nach wie vor unbefriedigenden Therapieoptionen bei MC und CU.

Wie oben dargelegt, besteht allerdings Konsens darüber, dass eine gestörte intestinale epitheliale Barriere und eine damit verbundene Translokation von luminalen Antigenen, insbesondere Bakterienbestandteilen, bei genetisch suszeptiblen Individuen zu einer fehlgesteuerten Entzündungsreaktion führen, die sich in der Folge selbst unterhält und das Darmgewebe schädigt. Für die Störung der intestinalen epithelialen Barriere könnten primär und/oder sekundär Epitheldefekte im Sinne von kleinen Wunden verantwortlich sein.

Für ein weitergehendes Verständnis der pathogenetischen Vorgänge bei CED und sich daraus in Zukunft möglicherweise ergebenden neuartigen Therapiestrategien, ist daher die Regulation der Wundheilung und insbesondere der Zellmigration am intestinalen Epithel als erster Schritt zur Wiederherstellung einer intakten Barriere interessant.

Zentrale Steuerungsmoleküle der Wundheilung sind Wachstumsfaktoren wie EGF. Da es außerdem zahlreiche Hinweise auf einen Einfluss von Kaliumkanälen bei Migrations- und Proliferationsvorgängen, sowie an alveolären Epithelzellen auch Evidenz für eine Kopplung von EGF mit Kaliumkanälen gibt, war die zentrale Zielstellung dieser Arbeit, die bisher noch nicht erforschte Hypothese zu untersuchen, dass Kaliumkanäle die intestinale Wundheilung unter nicht entzündlichen und unter entzündlichen Bedingungen beeinflussen und dabei mit EGF bzw. dem EGFr interagieren.

Die sich daraus ergebenden Schritte und zu untersuchenden Fragestellungen waren die Folgenden:

1. Adaptation von „scratch assays“ – eines etablierten in vitro-Modells der Wundheilung – an die intestinale Rattenepithelzelllinie IEC 18 und die lokalen Gegebenheiten in Regensburg.
2. Welchen Einfluss haben verschiedene Kaliumkanäle, insbesondere  $K_{Ca3.1}$  in diesem Modell auf die intestinale Restitution?  
Dazu wurden diverse Kaliumkanalmodulatoren eingesetzt.
3. Welchen Einfluss haben Kaliumkanäle auf die intestinale Restitution unter entzündlichen Bedingungen?  
Mittels IFN- $\gamma$ -Vorinkubation der Zellen wurden entzündliche Bedingungen simuliert und erneut bestimmte Kaliumkanalmodulatoren getestet.

4. Wie beeinflusst EGF die kaliumkanalabhängige Wundheilung?

Dies wurde durch gleichzeitige Zugabe von EGF bei Wundheilungsexperimenten mit Kaliumkanalmodulatoren untersucht.

5. Wie beeinflusst EGF die kaliumkanalabhängige Wundheilung unter entzündlichen Bedingungen?

Die Vorinkubation mit IFN- $\gamma$  und die Zugabe von EGF wurden hierbei kombiniert.

6. Lassen sich die gefundenen Ergebnisse in einem weiteren Migrationsassay bestätigen?

Der Einfluss von Kaliumkanälen unter entzündlichen und nicht entzündlichen Bedingungen wurde dazu in migrationsspezifischen Boyden Kammer-Assays überprüft.

7. Lassen sich intrazelluläre Signalwege identifizieren, die die gefundenen Ergebnisse teilweise erklären können?

Dies erfolgte mittels der Durchführung von Western Blots, in denen die Phosphorylierung der EGFr-abhängigen Signalmoleküle Akt und ERK nach Verwundung und Stimulation mit Kaliumkanalmodulatoren mit oder ohne EGF unter entzündlichen und nicht entzündlichen Bedingungen gemessen wurde.

8. Können Hinweise für eine mögliche Bedeutung von Kaliumkanälen im Rahmen von MC und CU auch bei menschlichen Zellen von CED-Patienten gefunden werden?

Aus Operationsresektaten und endoskopischen Biopsien von Patienten mit CED und Kontrollen wurden intestinale Epithelzellen isoliert und in der real-time PCR die Expression von zwei bestimmten Kaliumkanälen auf mRNA-Ebene quantifiziert und verglichen.



## 2. Material

### 2.1 Chemikalien und Kits

#### 2.1.1 Zellkultur

Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) high glucose (4,5 g/L) mit L-Glutamin	PAA, Pasching/Österreich
fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Insulin aus bovinem Pankreas	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Penicillin/Streptomycin-Lösung (100 x)	PAA, Pasching/Österreich
Phosphat-gepufferte Salzlösung ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> (PBS)	PAA, Pasching/Österreich
Trypsin-EDTA (0,5 %-0,2 %) 10 x	PAA, Pasching/Österreich
Zelllinie IEC 18	T. Karrasch, Regensburg

#### 2.1.2 Migrationsassays:

Bariumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tetraethylammoniumchlorid (TEA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Charybdotoxin, rekombinant	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Iberiotoxin, rekombinant	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Clotrimazol kristallin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TRAM-34 (1-[(2-Chlorophenyl)-diphenylmethyl]-1H-pyrazol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chromanol 293 B	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
1-EBIO (1-Etyhl-2-benzimidazolinon)	Tocris Bioscience, Bristol/Großbritannien
IFN- $\gamma$ , Ratte, rekombinant	PromoCell GmbH, Heidelberg
EGF, Ratte, rekombinant	PeproTech GmbH, Hamburg
Poretics Polycarbonate, PVPF 8.0 Micron, 25x80 mm	Osmonics Deutschland GmbH, Moers
Hemacolor® Schnellfärbekit	Merck KGaA, Darmstadt
Immersionsöl für Mikroskopie	Nikon GmbH, Düsseldorf
bovines Serumalbumin (BSA)	Biomol GmbH, Hamburg

## Material

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypanblau 0,5 % (w/v) in 0,9 % NaCl	Biochrom AG, Berlin
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

## 2.1.3 Western Blot und Vorarbeiten

### 2.1.3.1 Isolation von Proteinen

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PBS	PAA, Pasching/Österreich
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumfluorid (NaF)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Complete mini Protease-Inhibitor-Tabletten	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Natriumvanadat (NaVO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pepstatin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

### 2.1.3.2 Proteinbestimmung

Bicinchoninic Acid Solution (BCA-Lösung)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kupfer(II)-Sulfat-Lösung (4 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
BSA	Biomol GmbH, Hamburg

### 2.1.3.3 Lämmli-Puffer (6 x):

TRIS-HCl (Tris-(hydroxymethyl-)amino-methan-hydrochlorid)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

### 2.1.3.4 Größenstandards

Full-Range Rainbow MW Markers	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Precision Plus Protein Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Kaleidoscope	

### 2.1.3.5 Gradientengel und Western Blot-Membran

NuPage® 4-12 % Bis-Tris-Gel 1,0 mm x 10 well	Invitrogen, Carlsbad/CA/USA
Nitrocellulose Membrane Filter Paper Sandwich 0,45 µm-Poren	Invitrogen, Carlsbad/CA/USA

### 2.1.3.6 Running- und Transfer-Puffer

NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer 20 x	Invitrogen, Carlsbad/CA/USA
NuPAGE® Transfer Buffer 20 x	Invitrogen, Carlsbad/CA/USA
NuPAGE® Antioxidant	Invitrogen, Carlsbad/CA/USA
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt

### 2.1.3.7 Wasch- und Blockingpuffer:

TRIS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Riedel-de Haën, Seelze
Natronlauge (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TWEEN® 20 (Polysorbat 20)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
BSA	Biomol GmbH, Hamburg

### 2.1.3.8 Detektion:

Luminol-NaH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
p-Coumarin-Säure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TRIS-HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck KGaA, Darmstadt

### 2.1.3.9 Antikörper:

anti-EGFr-Antikörper (monoklonal, Hase anti-human/rat)	Cell Signaling Technology Inc., Danvers/MA/USA
anti-phospho-EGFr-Antikörper (Tyr1173, monoklonal, Hase anti-human/rat)	Cell Signaling Technology Inc., Danvers/MA/USA
anti-Akt-Antikörper (Hase, anti-human/rat)	Cell Signaling Technology Inc., Danvers/MA/USA
anti-phospho-Akt-Antikörper (Ser473, monoklonal, Hase anti-human/rat)	Cell Signaling Technology Inc., Danvers/MA/USA

## Material

anti-p44/42 MAPK (ERK1/2)-Antikörper (monoklonal, Hase, anti-human/rat)	Cell Signaling Technology Inc., Danvers/MA/USA
anti-phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2)-Antikörper (Thr202/Tyr204, Hase, anti-human/rat)	Cell Signaling Technology Inc., Danvers/MA/USA
anti-β-Actin-Antikörper (Maus, anti-human/rat)	Millipore Co., Billerica/MA/USA
anti-rabbit-IgG-Antikörper (Ziege), HRP-konjugiert	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg
anti-mouse-IgG-Antikörper (Ziege), HRP-konjugiert	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg
anti-K <sub>Ca</sub> 3.1-IgM-Antikörper (monoklonal, Maus, anti-human/rat)	Alomone Labs, Jerusalem/Israel
Anti-mouse-IgM-Antikörper (Ziege), HRP-konjugiert	DAKO Deutschland GmbH, Hamburg
Röntgenfilme	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
BSA	Biomol GmbH, Hamburg
Trypanblau 0,5 % (w/v) in 0,9 % NaCl	Biochrom AG, Berlin

### 2.1.3.10 Stripping:

Re-Blot Plus Strong Solution (10 x)	Chemicon International, Temecula/CA/USA
-------------------------------------	---

## 2.1.5 Real-time PCR im TaqMan® und Vorarbeiten

### 2.1.5.1 Isolation von mRNA:

β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hank's balanced salt solution ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> (HBSS)	PAA, Pasching/Österreich
EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PBS	PAA, Pasching/Österreich
DTT (Dithiotreitol)	Qiagen, Hilden
Ethanol	J. T. Baker, Griesheim
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
Trypanblau 0,5 % (w/v) in 0,9 % NaCl	Biochrom AG, Berlin

### 2.1.5.2 Umschreiben von mRNA in cDNA

Affinity Script-Master Mix	Agilent Technologies GmbH, Böblingen
----------------------------	--------------------------------------

### 2.1.5.3 TaqMan® Real-time PCR

Brilliant II Mastermix for qPCR with high ROX	Agilent Technologies GmbH, Böblingen
Human GAPDH-Mix (20 x)	Applied Biosystems, Carlsbad/CA/USA

### 2.1.5.4 Oligonukleotide:

alle Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon, Ebersberg, bezogen

K <sub>Ca</sub> 3.1 human for	5'-CCC TCA TCA AAA ACA CTC TCA CTA TG-3'
K <sub>Ca</sub> 3.1 human rev	5'-TCC AGT CGC CTG CAC TTG-3'
K <sub>Ca</sub> 3.1 human probe	5'-FAM - TGC TAT GGA CGA CCT CCA GCT CTC AGT T - TAMRA-3'
K <sub>V</sub> 7.1 human for	5'-CGC ATG GAG GTG CTA TGC T-3'
K <sub>V</sub> 7.1 human rev	5'-GGC CTT CCG GAT GTA GAT CTT-3'
K <sub>V</sub> 7.1 human probe	5'-FAM - AGA ACC CCG ACT CCT CCA CCT - TAMRA-3'

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

C-Chip Disposable Hemocytometer (Neubauer Improved)	Digital Bio, Seoul/Südkorea
Cell Scraper, steril	Corning Inc., Corning/NY/USA
LabTek ChamberSlides (1 well, Glas), steril	Fisher Scientific, Schwerte
2-Propanol 70 % (v/v)-Desinfektionsmittel	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
BD Plastipak™ Insulinspritze	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Kanülen (27 G)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Nunc Cryo Tube™ Vials	Nunc A/S, Roskilde/Dänemark
Mikrotiterplatten 96-well	Corning Inc., Corning/NY/USA
Mikrotiterplatten 384-well	Corning Inc., Corning/NY/USA
Objektträger	Engelbrecht GmbH, Edermünde
Petrischalen	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen
Einmalpipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL), steril	Corning Inc., Corning/NY/USA

## Material

Pipettenspitzen, steril	Sarstedt, Nümbrecht
gestopfte Pipettenspitzen, steril	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Combitips-Pipettenspitzen, steril	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (0,2 mL)	Kisker Biotech GmbH & Co. KG
Reaktionsgefäße (1,5 mL)	Eppendorf, Hamburg
BD Falcon™-Reaktionsgefäße (15 mL, 50 mL)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Peha-soft Untersuchungshandschuhe, puderfrei	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Kimtech Satin Plus Untersuchungshandschuhe, puderfrei	Kimberly-Clark Europe Ltd., Reigate/UK
Steriflip Vakuum-Filtereinheiten mit Auffanggefäß	Millipore Co., Billerica/MA/USA
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> )	Corning Inc., Corning/NY/USA
Zellkulturschalen 100 mmx20 mm	Corning Inc., Corning/NY/USA

## 2.3 Geräte

Analysewaage	Sartorius AG, Göttingen
Schüttelapparat	GFL GmbH, Burgwedel
Schüttelapparat im 4 °C-Raum	GFL GmbH, Burgwedel
Blotmodul Novex Mini Cell	Invitrogen, Carlsbad/CA/USA
Modified Boyden Chamber	Receptor Technologies Ltd., Royal Leamington Spa/GB
Brutschrank	Haereus Instruments, Hanau
CO <sub>2</sub> -Regler „the brick“	Life Imaging Services, Basel/CH
Personal Densitometer SI	Molecular Dynamics, Sunnyvale/CA/USA
Eismaschine AF 20	Scotsman, Vernon Hills/IL/USA
Entwickler	AGFA, München
Filmkassette	Siemens AG, München
Mikroskop Axiovert 200 M MAT	Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Mikroskopkamera AxioCam Mr 5c	Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Inkubationsraum (37 °C)	Kälte-/Klimatechnik Schübl, Reinhausen
Kühlraum (4 °C)	Kälte-/Klimatechnik Schübl, Reinhausen

## Material

Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Kelheim
Mikroskop DMIL	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
pH-Meter CG 840	Schott Instruments GmbH, Mainz
precision microplate reader (Photometer)	Molecular Devices, Sunnyvale/CA/USA
Nano Photometer	Implen GmbH, München
Pipetboy Acu	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Certomat R-Schüttelapparat im 37 °C-Raum	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen
Spannungsquelle PowerEase 500	Invitrogen, Carlsbad/CA/USA
Multipette Xstream	Eppendorf, Hamburg
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank LaminAir®	Haereus Instruments, Hanau
Temperaturregler HT 200	Ibidi GmbH, Martinsried
Thermocycler T 3	Biometra GmbH, Göttingen
AbiPrism® - Sequence Detector 7900 HT	Applied Biosystems, Carlsbad/CA/USA
Tischzentrifuge „sprout“	Heathrow Scientific LLC, Vernon Hills/IL/USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia/NY/USA
Wasserbad ET 12	Lauda GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Wärmethermostat Ecoline staredition	Lauda GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Reinstwasseraufbereitungsanlage Q-Pod	Millipore, Billerica/MA/USA
Biofuge fresco	Haereus Instruments, Hanau
Flüssigstickstofftank Chronos Biosafe	Messer, Griesheim
Multifuge 3 S-R	Haereus Instruments, Hanau

## 2.4 Software

Carl Zeiss AxioVision 4.7.2.0	Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Microsoft Office Excel	Microsoft, Redmond/WA/USA
Image Quant 5.2	Molecular Dynamics, Sunnyvale/CA/USA
SOFTmax for Windows	Molecular Devices, Sunnyvale/CA/USA
PASW Statistics 18.0	SPSS Inc., Chicago/IL/USA
SDS 2.2 und 2.3	Applied Biosystems, Carlsbad/CA/USA

## Material

---

Windows Bild- und Faxanzeige	Microsoft, Redmond/WA/USA
Picture it! 10.0	Microsoft, Redmond/WA/USA
Sigma Plot 8.0	SPSS Inc., Chicago/IL/USA



## 3. Methoden

### 3.1 Zellkultur und Migrationsexperimente

Zur Untersuchung der intestinalen Migration wurde in dieser Arbeit die aus der Ratte stammende nicht transformierte intestinale Epithelzelllinie IEC 18 verwendet, die aus Kryptenzellen des Ileums generiert wurde <sup>119)</sup> und bereits in zahlreichen anderen Migrationsstudien eingesetzt wurde <sup>z.B. 50),120),121)</sup>.

Sämtliche Arbeiten mit der Zelllinie wurden nach gründlicher Desinfektion mit Einmalhandschuhen unter der Sterilbank durchgeführt, nachdem diese für 15 min mit UV-Licht bestrahlt wurde sowie 15 min die Lüftung vorgelaufen war. Es kamen ausschließlich sterile Einwegartikel oder bei 120 °C autoklavierte Instrumente zum Einsatz. Alle Lösungen und Medien wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt.

#### 3.1.1 Kultivierung und Subkultivierung von IEC18

Die Kultivierung erfolgte in 75 cm<sup>2</sup>- und 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit 10 mL bzw. 4 mL Medium, welches alle 48-72 h gewechselt wurde und sich wie folgt zusammensetzte:

500 mL	Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) high glucose (4,5 g/L) mit L-Glutamin
25 mL (5 %)	Fetales Kälberserum (FCS)
5 mL (1 %)	Penicillin/Streptomycin (P/S)
350 µL	1M bovines Insulin

Die Zellen wurden in einem Brutschrank aufbewahrt, in dem 37 °C bei einem CO<sub>2</sub>-Anteil von 10 % und 95 % relativer Luftfeuchte herrschten.

Sobald die Zellen nach 72-96 h Konfluenz erreicht hatten, erfolgte die Subkultivierung. Dazu wurde das Medium abgesaugt und mögliche Mediumreste auf den Zellen vorsichtig mit 10 mL PBS abgespült. Es wurden 1,5 mL Trypsin/EDTA zugegeben und die Zellen damit 30-60 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert, bevor Trypsin/EDTA wieder entfernt wurde und die IEC 18 für weitere 5-10 min in den Brutschrank überführt wurden. Anschließend konnten die Zellen durch leichtes Klopfen gegen die Zellkulturflasche von

deren Boden abgelöst und in Kulturmedium resuspendiert werden. Die Aufteilung („splitting“) auf neue Zellkulturflaschen erfolgte im Verhältnis 1:6.

### 3.1.2 Auftauen und Einfrieren von IEC18

Zur längeren Aufbewahrung wurden die IEC 18 wie beschrieben mit Trypsin/EDTA „geerntet“ und zur Blockierung und Entfernung von Trypsin-Resten in 10 mL Kulturmedium überführt und gründlich resuspendiert. Zur Zellzählung wurden 10 µL der Suspension entnommen und der Rest 10 min bei 1.600 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen nach Zählung (s.u.) so in „freezing medium“ resuspendiert, dass darin eine Konzentration von 1 Million Zellen/mL herrschte. Jeweils 1 mL wurde in Kryo Vials pipettiert und in Flüssigstickstoff bei -196 °C gelagert.

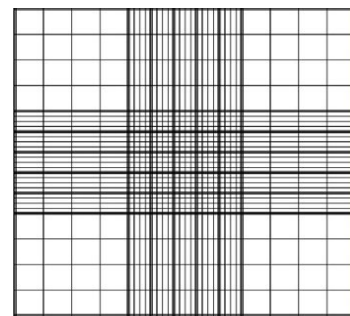
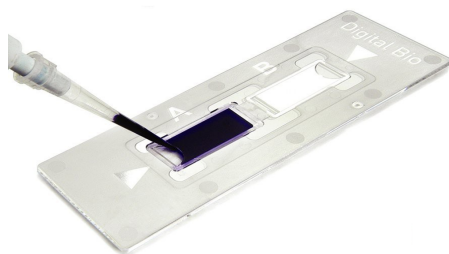
Zur Weiterkultivierung wurde der Inhalt der Vials bei Raumtemperatur aufgetaut und jeweils in ein 50 mL-Reaktionsgefäß mit 9 mL vorgewärmtem Kulturmedium überführt. Nach Zentrifugation (10 min, 1.600 rpm) wurde der DMSO enthaltende Überstand verworfen und das Pellet in 4 mL Kulturmedium in eine 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche überführt, der erste Mediumwechsel erfolgte nach 24 h.

Zusammensetzung des „freezing mediums“:

500 mL	DMEM high glucose (4,5 g/L) mit L-Glutamin
60 mL (10 %)	FCS
45 mL (7,5 %)	DMSO

#### 3.1.2.1 Zellzählung in der modifizierten Neubauer-Zählkammer

Zur Ermittlung der Zahl der geernteten Zellen wurden 10 µL der erhaltenen Suspension mit 10 µL Trypanblau gemischt und 10 µL dieses Gemisches in ein Feld einer modifizierten Neubauer-Zählkammer pipettiert (Digital Bio).



**Abb. 3.1: modifizierte Neubauer-Zählkammer (Digital-Bio, links) und eingraviertes Zählnetz (rechts)**

(Quellen: <http://www.montreal-biotech.com/Products/ContentImages/C-Chip%20Disposable%20Hemocytometers.jpg> bzw. <http://zaehnkammer.de/deutsch/neubauer.improved.html>)

Auf dem Grund des Feldes ist ein quadratisches Zählnetz (Seitenlänge 3 mm) eingraviert, das in weitere 3 x 3 Großquadrate unterteilt ist, wobei fünf davon vom kreuzförmig angeordneten, sogenannten Thoma-Netz durchzogen sind. Aufgrund der speziellen Architektur der Kammer mit genau 0,100 mm Höhe kann durch Zählung der Zellen über einer definierten Fläche des Netzes auf die Konzentration der Zellen in der eingesetzten Zellsuspension rückgeschlossen werden.

In diesem Fall wurden die Zellen in den vier großen Eckquadraten inklusive der auf den äußeren Begrenzungslinien und exklusive der auf den inneren Begrenzungslinien liegenden Zellen gezählt.

Mithilfe folgender Formel wurde die Gesamtzahl der geernteten und in 10mL suspendierten Zellen bestimmt:

$$\text{Gesamtzahl der Zellen} = 2 \cdot 10^5 \cdot \frac{\text{gezählte Zellen}}{4}$$

Das zur Erreichung der Zielkonzentration (hier: 1 Million Zellen/mL) bei der Resuspension benötigte Volumen errechnete sich so:

$$\text{Resuspensionvolumen [mL]} = \frac{\text{Gesamtzahl der Zellen}}{\text{Zielkonzentration [n/mL]}}$$

### **3.1.3 Untersuchung der Wundheilung mit weiter entwickelten „Scratch Assays“**

Die von anderen Autoren <sup>z.B. 51),122),123)</sup> beschriebene Technik der „scratch assays“, „wound healing assays“ oder auch „cell migration assays“ wurde für die Experimente im Rahmen dieser Arbeit angepasst und weiter entwickelt.

Etwa 48 Stunden vor geplanter Verwundung wurden konfluente Zellen aus 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen wie oben beschrieben mit Trypsin/EDTA geerntet und dann im Verhältnis 1:3 in 1-well-Chamber Slides mit 4 mL Medium ausgesät.

24 h vor Verwundung, d.h. ca. 24 h nach Aussaat, hatten die IEC 18 jeweils Konfluenz erreicht und das Kulturmedium wurde durch 4 mL serumreduziertes Medium mit nur 1 % FCS und ohne Insulin („starving medium“ <sup>49)</sup>) sowie zur Simulation einer intestinalen Entzündung mit oder ohne zusätzlich 100 ng/ml IFN- $\gamma$  <sup>vgl. 124),125)</sup> ersetzt.

Nach 24-stündiger Inkubation wurde das überstehende Medium abgesaugt und der Zellrasen mit einer P 10-Pipettenspitze der Länge nach verwundet. Mit 3 mL PBS wurden am Wundrand adhärente Zellen und Mediumreste vorsichtig abgewaschen. Anschließend

## Methoden

wurden sofort 4 mL frisches „starving medium“, je nach Experiment ggf. unter Zusatz verschiedener Kaliumkanalmodulatoren bzw. von 5 nM EGF <sup>vgl. 126),127)</sup>, zugegeben und das Chamber Slide in die Brutkammer des AxioVert-Mikroskops (Zeiss) überführt (37 °C, 10 % CO<sub>2</sub>). Bei 200-facher Vergrößerung wurde nun ein Wundareal mit einer Größe zwischen 120.000 und 200.000 µm<sup>2</sup> eingestellt (entsprechend einem Abstand der Wundränder von ca. 200 µm bzw. 10-15 Zelldurchmessern) und mithilfe der Software AxioVision (Zeiss) über einen Zeitraum von 8 Stunden automatisiert alle 15 min fotografiert.

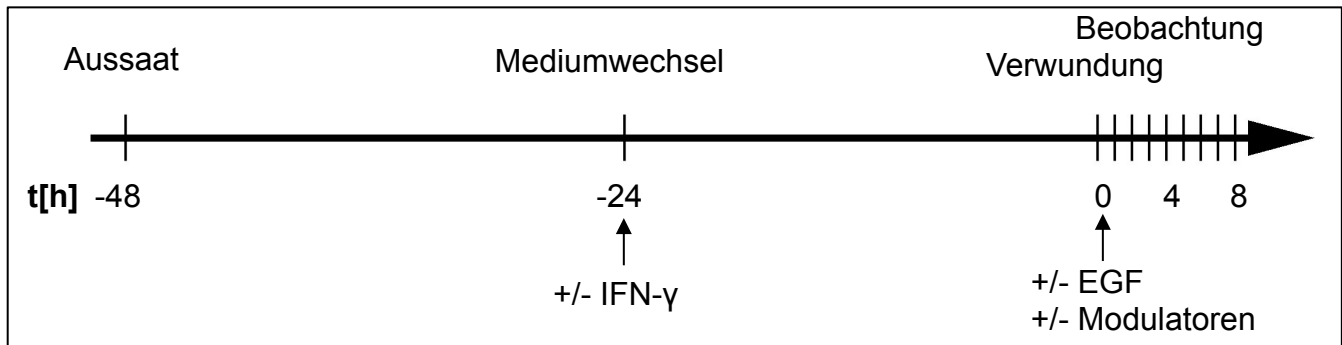


Abb. 3.2: Skizze zum zeitlichen Ablauf der Scratch Assays (Skala nicht maßstabsgetreu)

Zum Einsatz kamen Zellen der Passagen 25-55 <sup>vgl. 120),128),129)</sup>. Folgende Kaliumkanalmodulatoren wurden verwendet und dazu in den genannten Lösungsmitteln zu 10 oder 40 µL – in entsprechend 400- bzw. 100-facher Konzentration gegenüber der angegebenen und letztendlich eingesetzten – aliquotiert:

Modulator	Konzentration	Lösungsmittel	Wirkung	Referenz
Barium (Ba <sup>2+</sup> )	5 mM	DMEM	Blocker: meiste K <sub>ir</sub> , einige K <sub>2P</sub> und K <sub>v</sub>	130)
Tetraethylammonium (TEA)	5 mM	DMEM	Blocker: meiste K <sub>v</sub> , K <sub>Ca</sub> 1,3,4,5, manche K <sub>ir</sub>	131)
Iberitoxin (IbTx)	100 nM	DMEM	Blocker: K <sub>Ca</sub> 1.1	130)
Charybdotoxin (ChTx)	200 nM	DMEM	Blocker: K <sub>Ca</sub> 1.1, K <sub>Ca</sub> 3.1, manche K <sub>v</sub>	131)
Clotrimazol (Clt)	10 µM	DMSO	Blocker: K <sub>Ca</sub> 3.1	78) (30-60 µM) 130) (1 µM)
TRAM-34	5 µM	DMSO	Blocker: K <sub>Ca</sub> 3.1	130)
Chromanol 293B (C293B)	10 µM	DMSO	Blocker: K <sub>v</sub> 7.1	132)
1-EBIO	600 µM	DMSO	Aktivierung: K <sub>Ca</sub> 2, K <sub>Ca</sub> 3.1	133)

Tab. 3.1: Übersicht über die verwendeten Kaliumkanalmodulatoren sowie deren Konzentrationen, Lösungsmittel und Literaturangaben.

## Methoden

Die Auswertung erfolgte mittels AxioVision, indem – beginnend unmittelbar nach Verwundung – jede Stunde die Wundfläche gemessen wurde. Dazu wurden die Wundränder per Mauszeiger markiert, das Programm berechnete dann automatisch die enthaltene Fläche. Aus den Differenzen zwischen den Wundflächen konnte für jeden Zeitpunkt berechnet werden, welche

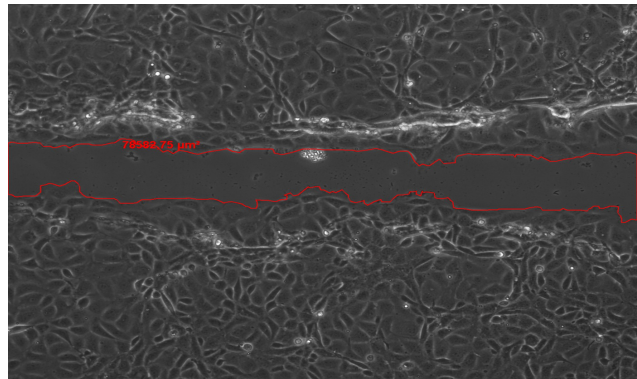


Abb. 3.3: Beispiel für die Markierung der Wundränder und Berechnung der Wundfläche mit AxioVision.

Wundfläche pro Stunde aktuell und seit Verwundung im Mittel durch die IEC 18 wieder bedeckt wurde („Flächenwachstum“).

Für jede untersuchte Konstellation wurden drei bis fünf Verwundungen durchgeführt.

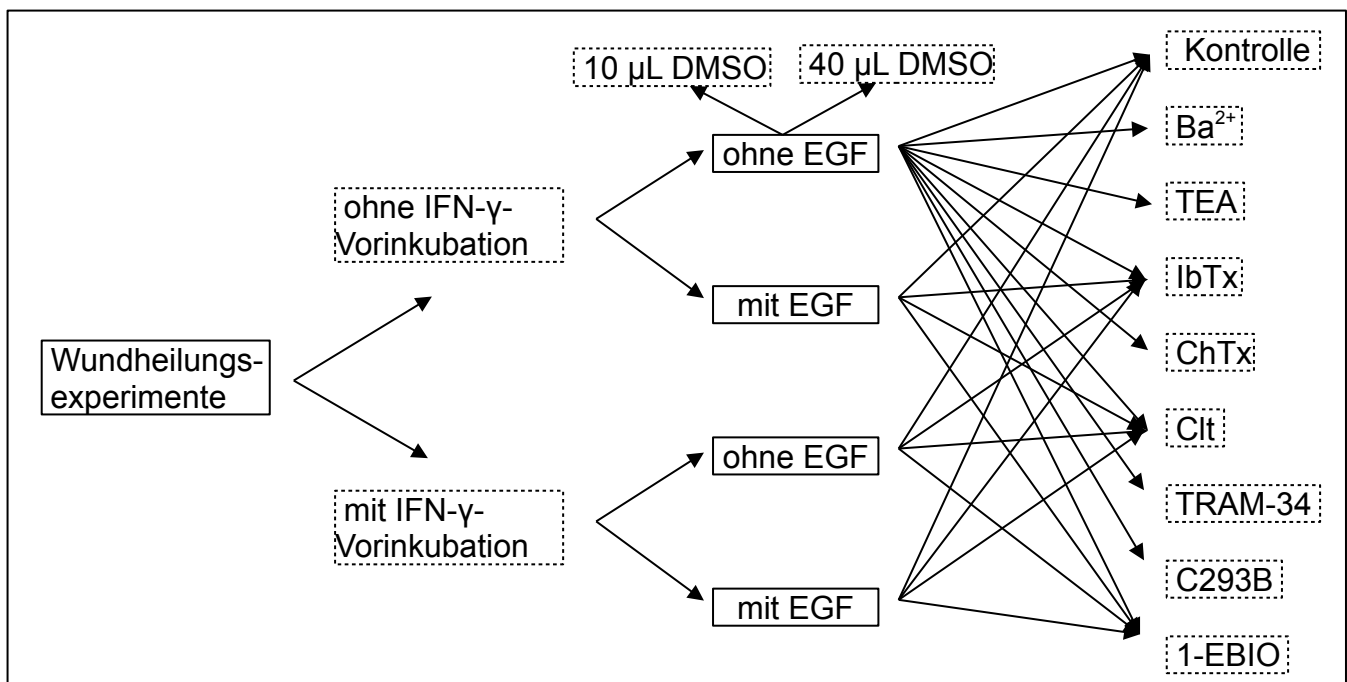


Abb. 3.4: Übersicht über die in den scratch assays untersuchten Konstellationen.

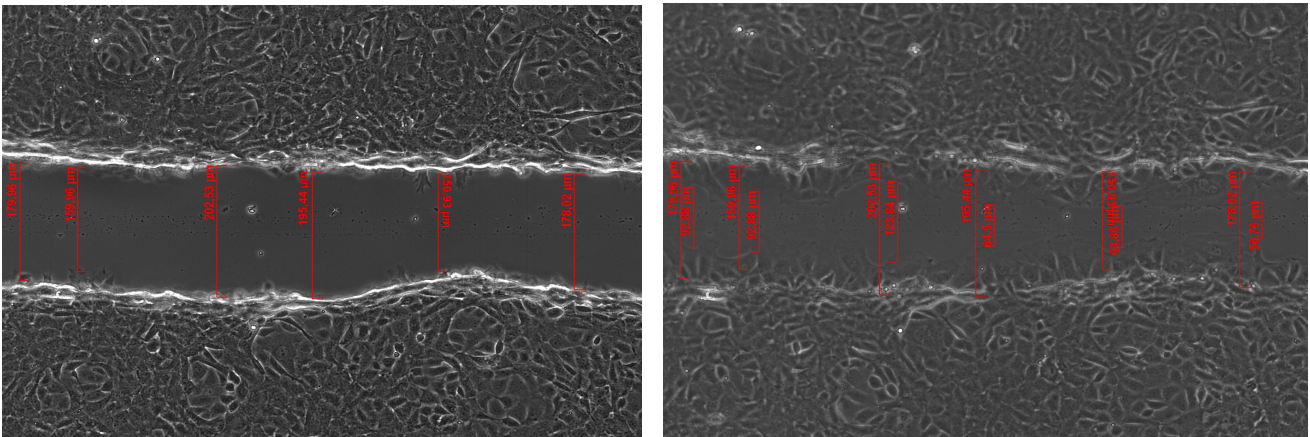
### 3.1.3.1 Vergleich von Abstands- und Flächenmessung bei der Quantifizierung von scratch-assays

Die Auswertung von scratch-assays erfolgt häufig durch Messung des Abstands der Wundränder im Verlauf des Experiments <sup>z.B. 134),135)</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde zur genaueren Quantifizierung stattdessen die Wundfläche vermessen.

Eine beispielhaft an einem Wundheilungsexperiment durchgeführte Abstandsmessung der Wundränder zu Beginn des Experiments sowie nach drei Stunden zeigt, dass sich die so

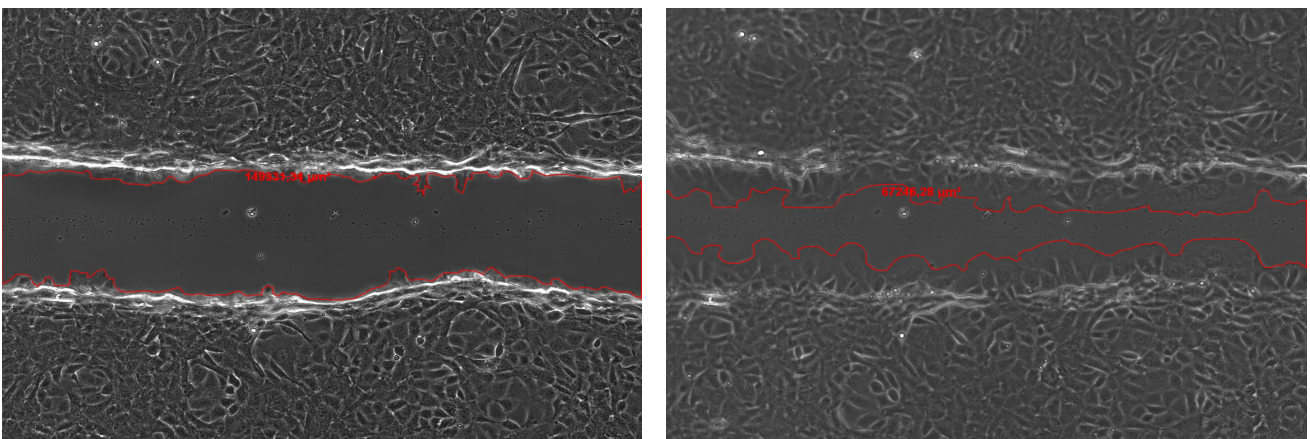
## Methoden

gemessenen Wundschlussraten je nach Ort der Messung stark unterscheiden, unabhängig davon ob sie absolut oder prozentual dargestellt werden:



**Abb. 3.5: Quantifizierung der Wundheilung durch Abstandsmessung der Wundränder an willkürlich ausgewählten Stellen**

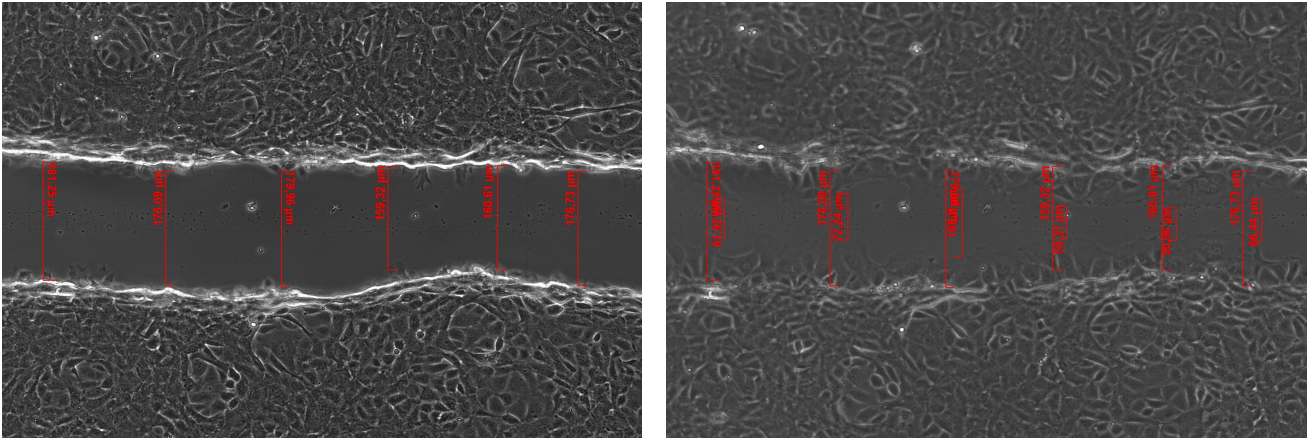
Bei sechs Messungen an willkürlich ausgewählten Stellen näherten sich die Wundränder zwischen  $67\ \mu\text{m}$  und  $131\ \mu\text{m}$  an, der Mittelwert betrug  $95,35\ \mu\text{m}$ , die Standardabweichung somit  $25\ \mu\text{m}$  (26,3 %) und der Standardfehler  $10\ \mu\text{m}$  (10,8 %). Bei prozentualer Angabe schwanken die Werte zwischen 38,9 % und 68,15 % um den Mittelwert von 53,7 %, dessen Standardabweichung  $\pm 12,6\ %$  und dessen Standardfehler  $\pm 5,1\ %$  beträgt.



**Abb. 3.6: Quantifizierung der Wundheilung durch Flächenmessung der gesamten Wunde**

Dieser Mittelwert deckt sich zwar relativ gut mit dem bei der Flächenmessung gefundenen Wert von 55,0 % für die relative Wundheilung, zeigt allerdings, dass eine Abstandsmessung zwingend an mehreren Stellen erfolgen muss um im Mittel ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten.

Um die Reliabilität der beiden Quantifizierungsmethoden abschätzen zu können, wurde die Abstandsmessung wiederholt und erneut willkürlich sechs Stellen ausgewählt.



**Abb. 3.7:** Wiederholung der Quantifizierung der Wundheilung durch Abstandsmessung der Wundränder an willkürlich ausgewählten Stellen

Die Abstandsminderung betrug nun zwischen 72 µm und 119 µm bei einem Mittelwert von 104 µm in absoluten Zahlen bzw. zwischen 39,9 % und 68,4 % bei einem Mittelwert von 60,6 % in relativen Zahlen. Diese Werte lagen um 9,0 % bzw. 13,0 % über den entsprechenden Werten der ersten Auswertung.

Die Flächenmessung am Bild zu Beginn des Verwundungsexperimentes wurde unter unveränderten Bedingungen vier weitere Male durchgeführt. Die erhaltenen Werte lagen zwischen 148.911,36 µm<sup>2</sup> und 149.503,37 µm<sup>2</sup>. Das entspricht einer Abweichung von 0,4 % des größten Wertes gegenüber dem kleinsten. Die Standardabweichung zum Mittelwert von 149.227,88 µm<sup>2</sup> betrug +/- 0,15 %, der Standardfehler +/- 0,04 %.

Daher wurde die Flächenmessung zur Quantifizierung eingesetzt. Zur besseren Vergleichbarkeit bei verschiedenen Wundgrößen erfolgt keine prozentuale Angabe der Wundheilung, sondern die absolute Angabe des Flächenwachstums [µm<sup>2</sup>/ h], also der Wundfläche, die die IEC im Rahmen der Restitution innerhalb einer Stunde wieder bedecken.

### 3.1.4 Untersuchung der Zellmigration in Boyden-Kammern

Als weitere Methode zur Untersuchung der Zellmigration wurden Experimente mit Boyden-Kammern eingesetzt. Dabei wird die Eigenschaft von Zellen zur aktiven amöboiden Fortbewegung genutzt.

In Abhängigkeit von verschiedenen Chemotaxinen, die sich als Testlösung in der Bodenplatte befinden, kann das Migrationsverhalten von Zellen, die als Suspension in die Deckplatte gegeben werden, untersucht werden, indem nach einer bestimmten Inkubationszeit die von oben an der Membran adhären Zellen abgewaschen und die nach Diapedese durch die Poren unten anhaftenden Zellen gefärbt, fixiert und gezählt werden <sup>136)</sup>.

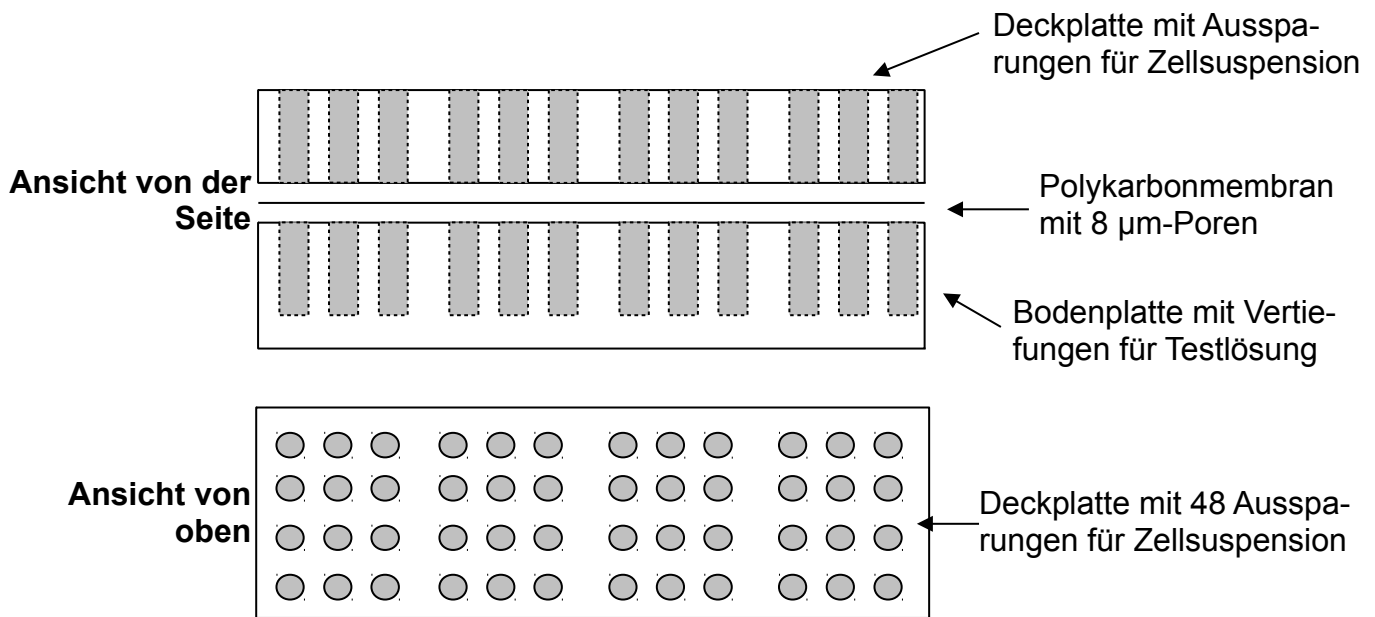


Abb. 3.8: Skizzenhafte Darstellung der wesentlichen Bestandteile der Boyden-Kammer zur Verdeutlichung des Versuchsprinzips.

### 3.1.4.1 Technisches Vorgehen

Konkret wurde bei den Experimenten zur vorliegenden Arbeit wie folgt vorgegangen: Konfluente IEC 18 wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn auf serumreduziertes Medium ohne Insulin und mit oder ohne IFN- $\gamma$  (100 ng/ml, s.o.) gesetzt.

Am Versuchstag wurden dann in 32 Vertiefungen der Bodenplatte luftblasenfrei jeweils 30,6  $\mu$ L Kulturmedium mit oder ohne Zusatz verschiedener Kaliumkanalmodulatoren pipettiert. Zum Einsatz kamen in jeweils acht Wells pro Versuch (vgl. Tab. 3.1):

- IbTx, 100 nM
- Clt, 10  $\mu$ M
- 1-EBIO, 600  $\mu$ M

Die übrigen acht Wells stellten die Kontrolle dar. In den äußeren Bereichen wurden bewusst eine bzw. zwei Spalten an Vertiefungen frei gelassen, um die anschließende Auflage einer Polykarbonmembran mit 8  $\mu$ m Porengröße zu erleichtern. Diese wurde nach Schnittmarkierung an einer Ecke mithilfe von Pinzetten vorsichtig und unter Vermeidung des Austritts von Testlösung aus den Wells auf die Bodenplatte aufgebracht. Darüber wurde eine Silikondichtung gelegt und die Deckplatte mithilfe einer Schraubvorrichtung dicht anliegend befestigt. Durch die in der Silikonabdichtung enthaltenen – denen der Deckplatte entsprechenden – Aussparungen kamen die Wells der Deckplatte so – nur durch die Membran getrennt – direkt über den Wells der Bodenplatte zu liegen.



## Methoden

---

Zur pH-Einstellung der Testlösung erfolgte nun eine 30-40-minütige Inkubation der Boyden-Kammer im Brutschrank (37 °C, 10 % CO<sub>2</sub>). In der Zwischenzeit wurden die vorinkubierten Zellen wie oben beschrieben mit Trypsin und EDTA geerntet, in 10 mL Kulturmedium gründlich resuspendiert und in ein 50 mL-Reaktionsgefäß überführt. Aus diesem wurden 10 µL in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß pipettiert und für die Zellzählung (s.u.) weiter verwendet, während die restliche Suspension 10 min bei 1.600 rpm zentrifugiert wurde. Anschließend wurde das überstehende Medium abgenommen und die IEC 18 mithilfe des Ergebnisses der Zellzählung so in Zellkulturmedium resuspendiert, dass die Konzentration der neuen Suspension 200.000 Zellen/mL betrug.

Jeweils 50 µL – entsprechend 10.000 Zellen – dieser Suspension wurden nun luftblasenfrei in die Wells der Deckplatte der Boyden-Kammer pipettiert.

Für die folgenden sechs Stunden wurde die Boyden-Kammer im Brutschrank inkubiert (37 °C, 10 % CO<sub>2</sub>) und die Zellen hatten die Möglichkeit, entlang des Konzentrationsgradienten der Kaliummodulatoren durch die Poren der Membran zu wandern.

Nach Abschluss der Migrationsperiode wurden die Schraubverschlüsse der Boyden-Kammern geöffnet und Deckplatte sowie Silikonabdichtung abgenommen. Wells, in denen sich während der Inkubation unterhalb der Membran eine Luftblase gebildet hatte, wurden notiert und bei der späteren Zählung nicht berücksichtigt. Unter genauer Berücksichtigung der Orientierung wurde die Polykarbonmembran mit Pinzetten abgehoben, an zwei Klemmen befestigt und die Oberseite der Membran mit den an ihr anhaftenden, nicht migrierten Zellen dreimal vorsichtig in PBS gewaschen und danach jeweils an einer Gummilamelle abgestreift.

### **3.1.4.2 Färbung der Zellen:**

Die an der unteren Seite der Membran verbleibenden, migrierten Zellen wurden mithilfe des Hemacolor® -Kits (Merck) gefärbt. Dazu wurden jeweils 50 mL der Fixierlösung, der Farbreagenz rot sowie der Farbreagenz blau des Kits in 50 mL-Reaktionsgefäße gefüllt und ein viertes Gefäß mit 50 mL PBS vorbereitet. Nach Lufttrocknung der Membran wurde diese fünfmal für je eine Sekunde zur Fixierung in das erste, mit Methanol-Fixierlösung gefüllte, Reaktionsgefäß getaucht. Nach sorgfältigem Abtropfenlassen von Flüssigkeitsresten erfolgte dasselbe Vorgehen dreimal in der „Färbelösung rot“ und sechsmal in der „Färbelösung“ blau.

Überschüssiger Farbstoff wurde zuletzt in PBS abgewaschen, die Membran an der Luft getrocknet und schließlich mithilfe von Immersionsöl auf einem Objektträger fixiert.

## Methoden

---

Die „Färbelösung rot“ enthält den sauren Farbstoff Eosin G, der mit den basischen Proteinen der Zelle Verbindungen eingeht und diese dadurch rötlich färbt. Die „Färbelösung blau“ enthält den basischen Farbstoff Azur B, der die sauren Ribonukleinsäuren der Zelle blau anfärbt. Außerdem bilden Eosin und Azur B untereinander stabile Komplexe, sodass das Färberesultat von Menge und Verhältnis der Farbstoffe abhängt. Zellkerne färben sich so in der Regel rot bis violett, womit das optische Ergebnis einer Pappenheim-Färbung entspricht (Hersteller-informationen, 2011).

### 3.1.4.3 Zählung der migrierten Zellen und Auswertung:

Aufgrund der teilweise äußerst hohen Zahl der migrierten Zellen wurde zu deren Zählung folgendes Verfahren angewandt: Am Leica-Fluoreszenzmikroskop (genutzt als Durchlichtmikroskop) mit angeschlossener Kamera wurde bei 50-facher Vergrößerung das auszuwertende Well zentral eingestellt, was aufgrund beinahe Deckungsgleiche mit dem Sichtfeld gut reproduzierbar möglich war. In unveränderter Position des Objektträgers wurde repräsentativ für das jeweilige Well das Zentrum 200-fach vergrößert und fotografiert.

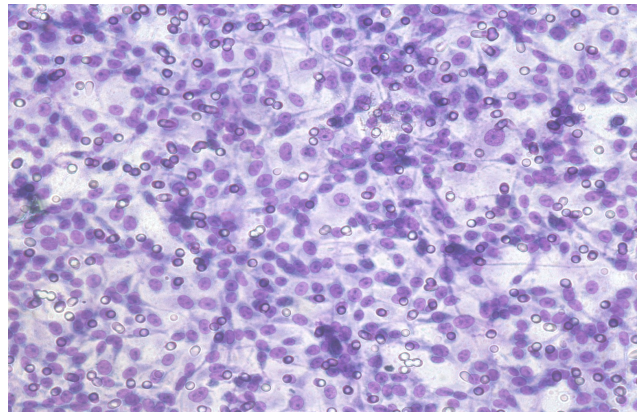


Abb. 3.9: Beispiel für ein Färbeergebnis

Die Zählung der darin enthaltenen Zellen erfolgte am PC-Bildschirm mithilfe einer davor befestigten Klarsichtfolie, auf der jede bereits gezählte Zelle mit einem Folienstift markiert wurde, um so sowohl das Übersehen als auch das doppelte Zählen von Zellen zu vermeiden.

Wells, in denen sich während der Inkubationsperiode eine Luftblase unter der Membran gebildet hatte, wurden von der Auswertung ausgeschlossen und somit nicht gezählt. Die pro Bild repräsentativ für das jeweilige Well gezählte Zellzahl wurde notiert. Für die Auswertung erfolgte die Mittelwertbildung über alle Zellzahlen der Bilder für die betreffende Konstellation (+/- Kaliumkanalmodulatoren, +/- IFN- $\gamma$ ).

## 3.2 Western Blot und hinführende Arbeiten

### 3.2.1 Zellstimulation

Zur Untersuchung subzellulärer Vorgänge bei der Zellmigration in Abhängigkeit von Kaliumkanalmodulatoren erfolgte die Isolierung von Proteinen aus analog zu den scratch-assays behandelten IEC 18-Kulturen der Passage 38.

Dazu wurden IEC 18 48 Stunden vor Verwundung im Verhältnis 1:3 in Zellkulturschalen mit 10 mL Medium ausgesät und 24 h vor Verwundung auf 10 mL starving medium mit oder ohne 100 ng/ml IFN- $\gamma$  gesetzt. Die Verwundung erfolgte mit acht P 10-Pipettenspitzen auf einer Multipette, die – um 90° versetzt – zweimal über den Zellrasen gezogen wurde.

Sofort anschließend wurden 10 mL starving medium mit oder ohne Kaliumkanalmodulatoren sowie mit oder ohne 5 nM EGF zugegeben und die verwundeten Kulturschalen in den Brutschrank überführt. Als Kaliumkanalmodulatoren kamen 10  $\mu$ M Clt und 600  $\mu$ M 1-EBIO zum Einsatz. Zudem wurde für 10 bzw. 40  $\mu$ L DMSO kontrolliert

Für alle 14 verschiedenen Ansätze erfolgte die Verwundung von je drei Zellkulturschalen und die Herstellung von Gesamtzelllysaten nach 30, 120 und 480 min. Zudem wurden auch IEC 18 aus unverwundeten Zellkulturschalen nach 24-stündiger Vorinkubation mit starving medium mit oder ohne 100 ng/ml IFN- $\gamma$  lysiert.

Dazu wurde aus den Zellkulturschalen zum entsprechenden Zeitpunkt sofort das Medium entfernt, die Zellen mit in Eis vorgekühltem PBS gewaschen und die Schale auf Eis gestellt. Nun wurden die Zellen gründlich abgeschabt, in insgesamt 15 mL kaltem PBS aufgenommen und möglichst vollständig in ein 15mL-Reaktionsgefäß transferiert. Dieses wurde 5 min lang bei 4 °C und 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde zur Herstellung von Gesamtzelllysaten verwendet.

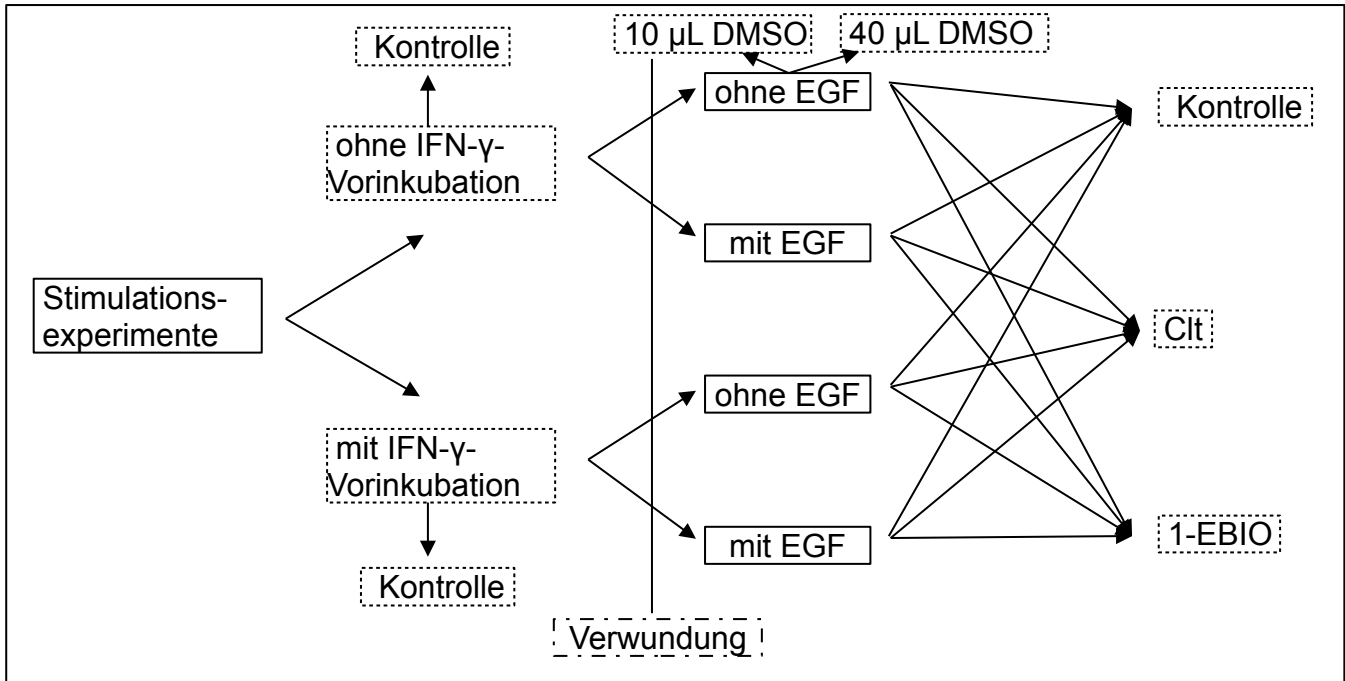


Abb. 3.10: In den Stimulationsexperimenten untersuchte Konstellationen.

### 3.2.2 Lyse von intestinalen Epithelzellen

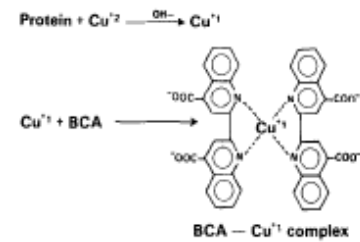
Um Gesamtzellsate zur weiteren Untersuchung auf die Proteinexpression zu erstellen, wurde Zellpellets von IEC 18 ein Lysepuffer zugegeben, der sich wie folgt zusammensetzte:

- 5 mL 1 % Triton X-100
- 100 µL 0,05 mM EDTA
- 50 µL 2 mM Natriumfluorid (NaF)
- 50 µL 100 mM Natriumvanadat ( $\text{Na}_4\text{VO}_4$ )
- 10 µL 500 µg/mL Pepstatin
- 1 Complete Mini Tablet (Protease-Inhibitor-Cocktail)
- 50 µL 10 mg/mL PMSF

Je nach Größe des Pellets wurden 200-500 µL des Lysepuffers zugegeben. Die Zellen wurden während der folgenden 30-45 Minuten auf Eis lysiert. Zellmembranbestandteile wurden anschließend abzentrifugiert (15 min, 13.000 rpm, 4 °C) und der Proteinüberstand in ein anderes 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt, welches bei -20 °C gelagert wurde.

### 3.2.4 Proteinbestimmung durch Bicinchoninic acid (BCA)-Test

Mithilfe des BCA-Testes kann photometrisch die Proteinkonzentration einer Lösung bestimmt werden. Protein ist in wässriger alkalischer Lösung in der Lage  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  zu reduzieren, welches wiederum mit zwei BCA-Molekülen einen Komplex bildet. Die Absorption dieses Komplexes kann bei 540 nm im Photometer gemessen werden. Mittels einer Referenzkurve wird auf die Proteinkonzentration rückgeschlossen<sup>137)</sup>.



**Abb. 3.11: Reaktionsprinzip des BCA-Tests**<sup>129)</sup>

Dazu wurden jeweils 10  $\mu\text{L}$  einer Verdünnungsreihe von 2 mg/mL BSA und somit bekannter Konzentration sowie je 10  $\mu\text{L}$  der zu vermessenden Proben in Doppelbestimmung auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. In jedes Well wurden 200  $\mu\text{L}$  eines „working reagents“ aus 50 Teilen BCA-Lösung und einem Teil 4 % Kupfer(II)sulfatpentahydrat-Lösung zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Farbintensität der Reaktionslösung im Elisa-Reader vermessen.

Mit SOFTmax für Windows (Molecular Devices) wurde durch die Auftragung der Absorption der Verdünnungsreihe gegen deren Proteinkonzentration eine Eichgerade erstellt, anhand derer das Programm den Proteingehalt der Proben berechnete.

### 3.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der SDS-PAGE können Proteine in einem Gel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dies gelingt, indem durch vorherige Behandlung der Proteine mit Natriumdodecylsulfat (SDS) und einem reduzierenden Agens wie z.B.  $\beta$ -Mercaptoethanol die für die Tertiär- und Quartärstruktur des Proteins verantwortlichen hydrophoben Wechselwirkungen gestört bzw. Disulfidbrückenbindungen gelöst werden und das Protein somit in seine Untereinheiten getrennt und entfaltet wird. Zudem wird mittels SDS die durch positiv geladene (Arginin, Lysin), negativ geladene (Aspartat, Glutamat) sowie ionisierbare Aminosäuren (Cystein, Histidin) hervorgerufene intrinsische Ladung des Proteins maskiert und durch eine konstante Ladung pro Längeneinheit ersetzt (ein SDS-Molekül auf 1,5-2 Peptidbindungen). Damit ist die Wanderung der Proteine zur Anode im Polyacrylamidgel, welches ein quervernetztes dreidimensionales „Molekularsieb“ bestimmter Porengröße und somit ein Hindernis für die Bewegung der Proteine darstellt,

## Methoden

---

nur von der Größe des Moleküls, nicht von dessen Ladung abhängig – kleinere Proteine gelangen schneller durch die Poren.

Meist werden – wie auch im Rahmen dieser Arbeit – Modifikationen des diskontinuierlichen Systems nach Laemmli <sup>138)</sup> verwendet, in diesem Fall das System NuPAGE® von Invitrogen, das eine Wanderung der Proteine bei pH  $\approx$  7 und damit ohne wesentliche Proteinmodifikationen ermöglicht <sup>139)</sup>.

Zur Durchführung der SDS-PAGE wurden die Proben auf Eis aufgetaut. Das einem Proteingehalt von 7,5  $\mu$ g entsprechende Volumen wurde in 1,5 mL-Reaktionsgefäße pipettiert, mit destilliertem Wasser auf 25, 30 oder 33,33  $\mu$ L aufgefüllt und entsprechend 5, 6 bzw. 6,66  $\mu$ L 6 x Laemmli-Puffer mit 2 %  $\beta$ -Mercaptoethanol hinzugegeben, sodass Gesamtvolumina von 30, 36 bzw. 40  $\mu$ L entstanden. Die Denaturierung der Proben erfolgte während 5 min bei 95 °C.

Zur Anwendung kamen 4-12 %-Gradientengele der Stärke 1 mm (Invitrogen), von denen jeweils zwei in eine NuPAGE-Kammer eingesetzt wurden. Deren innere Kammer wurde bis über die Taschen der Gele mit Running Buffer gefüllt und zusätzlich 500  $\mu$ L Antioxidant zugegeben, restlicher Puffer wurde in die äußere Kammer gefüllt.

In die Taschen der Gele wurden nun mit einer Kapillarspitze vorsichtig 10  $\mu$ L eines Standards mit gefärbten Proteinen bekannter Molekulargröße bzw. die Proben pipettiert, die sich wegen des Glycerols im Laemmli-Puffers am Boden der Taschen sammeln. Über den Deckel der Kammer wurde die untere Pufferkammer mit der Anode, die obere Pufferkammer mit der Kathode der Spannungsquelle verbunden und der Lauf bei 200 V und 130 mA (variabel) gestartet. Die Laufzeit betrug ca. eine Stunde.

Zusammensetzung des Lämmli-Puffers:

- 2,5 mL 1,5 M TRIS-HCl pH 6,8
- 3 mL 20 % SDS
- 0,24 mL 0,5 M EDTA
- 2 mL Glycerol
- 2,26 mL destilliertes H<sub>2</sub>O
- 1 Spatelspitze Bromphenolblau
- 200  $\mu$ L  $\beta$ -Mercaptoethanol

Zusammensetzung des Running Buffer:

- 25 mL 20 x NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (Invitrogen)
- 475 mL destilliertes Wasser

### 3.2.6 Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran

Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden die jeweils zwei Gelkassetten aus der Kammer genommen und geöffnet. Mit einem Skalpell wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel gekürzt. Schwämme, Filterpapier und Nitrocellulosemembran wurden in Transferpuffer vollständig durchtränkt. Den Gelen wurde kathodenseitig luftblasenfrei ein Filterpapier und anodenseitig eine Nitrocellulosemembran sowie darüber ein Filterpapier angelagert und diese „sandwichs“ in korrekter Orientierung zwischen Schwämmen ins Western Blot-Modul (Invitrogen) gelegt.

Das geschlossene Blot-Modul wurde wiederum in der NuPAGE-Kammer befestigt, mit restlichem Transfer-Puffer zunächst das Modul und dann die übrige Kammer gefüllt. Die Spannungsquelle wurde angeschlossen und die Proteine während ca. 80 min bei 20 Volt und 220 mA auf die Membran transferiert.

Im Anschluss wurden die Nitrocellulosemembranen entnommen, der Erfolg des Transfers wurde am vollständigen Übergang der farbigen Banden des Proteinmarkers vom Gel auf die Membran festgemacht. Nach Beschriftung und vorsorglicher zusätzlicher Markierung der Banden des Standards mit Kugelschreiber wurden die Membranen in 5 %-ige BSA-Lösung in Waschpuffer gelegt und bei Raumtemperatur eine Stunde lang langsam bewegt, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Zur Parallelisierung der nachfolgenden Schritte und um ein allzu häufiges „Strippen“ der Membranen zu vermeiden (s.u.) wurden die Membranen dann unter Orientierung am Standard bei ca. 50 kDa und 70 kDa auseinander geschnitten.

Zusammensetzung des Transfer-Puffers:

- 25 mL 20 x NuPAGE® Transfer-Puffer (Invitrogen)
- 50 mL Methanol
- 425 mL destilliertes Wasser
- 500 µL Antioxidant

Zusammensetzung des TBST-Waschpuffers:

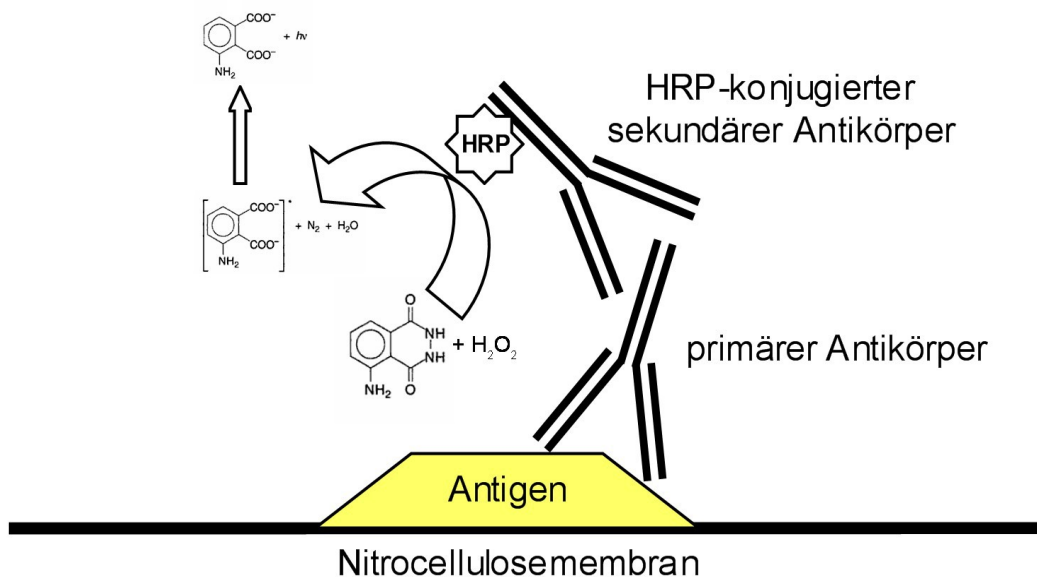
- 40 mL 1 M TRIS (pH 7,5)
- 60 mL 5 M NaCl
- 1900 mL destilliertes Wasser
- 2 mL Tween® 20

### 3.2.7 Proteindetektion

Um spezifische Proteine nachzuweisen, wurden die blockierten Nitrocellulosemembranen über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler mit entsprechend den Angaben der Hersteller in 7 mL 5 % BSA in TBST-Waschpuffer verdünnten primären Antikörpern inkubiert, die gegen ERK, phospho-ERK, Akt-1, phospho-Akt-1, EGFr, phospho-EGFr, K<sub>Ca</sub>3.1 und  $\beta$ -Actin gerichtet waren.

Am Folgetag wurde die Antikörperlösung entfernt und die Membran sechsmal für jeweils sechs Minuten mit TBST gewaschen und dabei langsam bewegt. Nun wurde die Membran in eine Lösung des an Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase = HRP) gekoppelten Sekundärantikörpers in 5 % BSA in TBST (1 : 5.000) gelegt und wiederum eine Stunde bei Raumtemperatur bewegt. Die Sekundärantikörper stammten aus der Ziege und waren gegen IgG bzw. IgM der jeweiligen Spezies gerichtet, aus der der Primärantikörper stammte (Hase bzw. Maus). Es folgt ein weiterer Waschschriff wie oben beschrieben.

Zur Darstellung der Proteine wurden die Membranen auf einer Folie für fünf Minuten mit 5 mL ECL-Lösung pro Membran bedeckt. Die Antikörper-konjugierte Meerrettichperoxidase katalysiert die Umsetzung des darin enthaltenen Wasserstoffperoxids und ermöglicht so mehrere Reaktionsschritte des ebenfalls enthaltenen Luminols, die schließlich zur Emission von Licht führen <sup>140</sup>.



**Abb. 3.12: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Western Blots.**

An das nach SDS-PAGE auf die Membran transferierte Protein (= Antigen) bindet der primäre Antikörper spezifisch. Dieser wiederum ist Zielstruktur für den HRP-konjugierten sekundären Antikörper. Durch Emission von Licht (425 nm) nach Zugabe von Luminol und  $H_2O_2$  kann diese Detektion sichtbar gemacht werden.



## Methoden

---

Die ECL-Lösung wurde anschließend gründlich abgetropft und die Membran mithilfe einer Pinzette in eine Klarsichtfolie in eine Filmkassette gelegt. In der Rotlicht-Dunkelkammer konnte nun ein Röntgenfilm aufgelegt werden, wurde so je nach Signalintensität für zwei Sekunden bis zwölf Minuten belassen und dann im Entwicklungsautomaten (AGFA) entwickelt.

Die entwickelten Filme wurden im Densitometer (Molecular Dynamics) eingescannt, die Intensität der erhaltenen Banden konnte dann mithilfe der ImageQuant-Software quantifiziert und für Berechnungen verwendet werden. Eine Ladungskontrolle und Normierung erfolgte durch Bezug der Werte auf die Expression des house-keeping-Proteins  $\beta$ -Actin.

Für jede Konstellation wurden zwei bis sieben Proben im Western Blot untersucht.

Zusammensetzung und Verwendung der ECL-Lösung:

- 2 mL 250 mM Luminol in DMSO
- 890  $\mu$ L 90 mM p-Coumarinsäure in DMSO
- 20 mL 1 M TRIS-HCl-Puffer (pH 8,5)
- 177,11 mL destilliertes Wasser

Die Lösung wurde in einer dunklen Flasche vor Lichteinstrahlung abgeschirmt. Unmittelbar vor Verwendung wurden 3,05  $\mu$ L  $H_2O_2$  je 10 mL Lösung zugegeben.

### 3.2.8 „Strippen“ der Membranen

Um Membranen nach erfolgter Proteindetektion für weitere Nachweise verwenden zu können, wurden sie bis zu dreimal „gestrippt“. Dazu wurde die jeweilige Membran für 15 min bei Raumtemperatur in 10 mL 0,5 x Re-Blot-Plus-Strong-Lösung gelegt und dabei bewegt sowie anschließend zweimal für fünf Minuten in Waschpuffer gewaschen. Nach einstündiger Blockierung der Membran mit 5 % BSA in TBST-Waschpuffer konnte der Nachweis eines weiteren Proteins wie beschrieben erfolgen.

Zusammensetzung der Re-Blot-Plus-Lösung:

- 1 mL 10 x Re-Blot-Plus Strong Solution (Chemicon)
- 19 mL destilliertes Wasser

### 3.3 Real-time Polymerase-chain-reaction (PCR) im Taqman®

#### 3.3.1 Isolierung von intestinalen Epithelzellen aus chirurgischen Resektaten und endoskopischen Biopsien

Zur Untersuchung der mRNA-Expression wurden intestinale Epithelzellen aus chirurgischen Resektaten und endoskopischen Biopsien von Patienten mit MC (n = 14), CU (n = 8), Sigmadivertikulitis (SD, n = 3) und colorectalem Karzinom (CRC, n = 7) isoliert. In sechs Fällen wurde bei MC-Patienten zusätzlich auch das Epithel aus makroskopisch nicht entzündeten Bereichen untersucht, bei einem weiteren Patienten nur das Epithel aus einem nicht entzündeten Bereich.

Es existiert ein entsprechender Ethik-Antrag an der Universität Regensburg.

Patient Nr.	Geschlecht	Alter	Resektat/ Biopsie	Probe Nr.	Erkrankung	Bemerkungen
1	m	62	Resektat	1	Rektumkarzinom	-
2	f	86	Resektat	2	Anastomosenrezidiv bei Z.n. Colonkarzinom	-
3	f	71	Resektat	3	Colonkarzinom	-
4	m	65	Resektat	4	Rektumkarzinom	-
5	f	73	Resektat	5	Sigmadivertikulitis	-
6	f	86	Resektat	6	Descendo-/ Sigmakarzinom	-
7	m	79	Resektat	7	rez. Colonkarzinom	-
8	m	72	Resektat	8	maligner Sigmoidpolyp	-
9	f	73	Resektat	9	gedeckt perforierte Sigmadivertikulitis	-
10	m	73	Resektat	10	Sigmadivertikulitis	-
11	m	65	Resektat	11	Colitis ulcerosa	-
12	m	35	Resektat	12	Morbus Crohn	-
13	f	29	Resektat	13	Morbus Crohn, Konglomerattumor	makroskopisch nicht entzündete Schleimhaut
14	f	19	Resektat	14	Morbus Crohn, Konglomerattumor	-
				15		makroskopisch nicht entzündete Schleimhaut
15	m	62	Resektat	16	Morbus Crohn, Konglomerattumor	makroskopisch nicht entzündete Schleimhaut
16	w	42	Biopsie	17	Colitis ulcerosa	
17	w	40	Resektat	18	Morbus Crohn, Stenose	makroskopisch nicht entzündete Schleimhaut
18	m	33	Resektat	19	Pancolitis ulcerosa	-
19	w	23	Resektat	20	Colitis ulcerosa	-
20	m	50	Resektat	21	Morbus Crohn, Stenose	-
21	m	23	Resektat	22	Colitis ulcerosa	-
22	w	37	Resektat	23	Colitis ulcerosa	-
23	m	45	Resektat	24	Colitis ulcerosa	-
24	n. bek.	n. bek.	Resektat	25	Colitis ulcerosa	-

## Methoden

25	w	32	Resektat	26	Morbus Crohn	-
				27		makroskopisch nicht entzündete Schleimhaut
26	w	42	Resektat	28	Morbus Crohn	-
				29		makroskopisch nicht entzündete Schleimhaut
27	m	66	Resektat	30	Morbus Crohn, Fistel	-
28	m	28	Resektat	31	Morbus Crohn	-
29	w	38	Resektat	32	Morbus Crohn	-
30	w	44	Resektat	33	Morbus Crohn, Fistel	-
31	m	50	Resektat	34	Morbus Crohn	makroskopisch nicht entzündete Schleimhaut
32	w	36	Resektat	35	Morbus Crohn, Konglomerattumor	-
33	w	41	Resektat	36	Morbus Crohn, Stenose	-

**Tab. 3.2: Patienten, Diagnosen und Herkunft der IEC-Lysate**

Um den *in vivo*-Zustand der Zellen so gut wie möglich zu erhalten, wurden die Operationspräparate sofort nach Resektion an der Operationsschleuse abgeholt. In der Pathologie wurden direkt anschließend ein bis zwei kleine Darmwandareale aus dem Präparat geschnitten, zum Transport in ein 50 mL-Reaktionsgefäß überführt und möglichst schnell verarbeitet.

Mit HBSS und Papiertüchern wurden die Proben gewaschen und Blut- oder Stuhlreste entfernt. Mithilfe von Pinzetten, Schere und Klemmen wurde die Mukosa von der Muskularis getrennt und erneut in HBSS gewaschen. Um anhaftenden Schleim zu entfernen wurden die Mukosastücke in 1 mM Dithiotreitol (DTT) in 10 mL PBS 15 min lang im 37 °C-Raum bei 225 rpm geschüttelt und dann erneut gewaschen sowie weiterer Schleim mechanisch entfernt.

Nun wurde die Mukosa in 2 mM EDTA in 10 mL HBSS überführt und erneut 20 min lang bei 37 °C geschüttelt (225 rpm). Im Folgenden konnten die Krypten des Darmepithels – jede mit ca. 200 intestinalen Epithelzellen – durch Vortexen in PBS aus dem Präparat herausgeschüttelt werden. Dazu wurden auf Eis je fünf 50 mL-Reaktionsgefäße mit je 10 mL PBS gefüllt und das Mukosastück der Reihe nach in jedem davon für fünf bis zehn Sekunden gevortext.

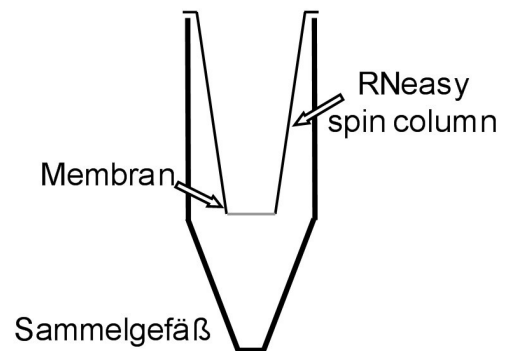
Beginnend mit dem ersten Reaktionsgefäß wurden je 40 µL der Fraktionen auf einem Objektträger zur Anfärbung apoptotischer Zellen mit 40 µL Trypanblau gemischt und bei 40-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop (Leica) Qualität und Verschmutzungsgrad beurteilt. Alle Fraktionen, in denen sich weder apoptotische Zellen noch Schmutz fanden – in der Regel alle Fraktionen außer der ersten –, wurden in einem 50mL-Reaktionsgefäß vereint und anschließend 5 min bei 1200 rpm in der auf 4 °C vorgekühlten Megafuge zentrifugiert.

Nach Verwerfen des Überstandes wurde das verbleibende Zellpellet zur Isolation von mRNA verwendet.

### 3.3.2 Isolation von mRNA aus IEC

Die RNA-Isolation aus humanen IEC aus chirurgischen Resektaten bzw. endoskopischen Biopsien erfolgte mithilfe des RNeasy Kits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers: Den wie oben beschrieben hergestellten IEC-Zellpellets wurde RNase-inaktivierender RLT-Puffer (350  $\mu$ L) mit 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol zugegeben, die erhaltene Suspension zur mechanischen Zellyse durch Auf- und Abziehen in einer Insulinspritze mit 27 G-Kanüle mehrfach geschert und anschließend bei -80 °C gelagert.

Zur Isolation der mRNA wurden die Proben auf Eis aufgetaut und jeder Probe 350  $\mu$ L 70 % Ethanol zupipettiert, das Gemisch homogenisiert und dann auf eine RNeasy spin column gegeben, die eine Membran enthält, an die RNA-Moleküle mit mehr als 200 Nukleotiden mit hoher Affinität binden (Herstellerinformationen, 2010). Die Säule wurde bei 13.000 rpm für eine Minute zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule durch Zugabe von 700  $\mu$ L RW1-Puffer und erneute einminütige Zentrifugation bei 13.000 rpm gewaschen. Wiederum wurde der Durchfluss verworfen. Pro Säule wurden nun 80  $\mu$ L DNase-Mastermix auf die Membran der Säule aufgetragen und in der Probe befindliche DNA während 15 min bei Raumtemperatur verdaut.



**Abb. 3.13: Schematische Darstellung der RNeasy spin column**

Es folgten drei weitere Waschschrte, zunächst erneut mit 700  $\mu$ L RW1-Puffer, dann zweimal mit 500  $\mu$ L RPE-Puffer wie oben beschrieben. Im Anschluss wurde die Säule zur Trocknung der Membran 90 Sekunden leer bei 13.000 rpm zentrifugiert.

Die Elution der RNA von der Membran der Säule erfolgte auf einem neuen 1,5 mL-Reaktionsgefäß durch Zugabe von 30  $\mu$ L RNase-freiem Wasser und einminütige Zentrifugation bei 13.000 g, die erhaltene RNA-Lösung wurde sofort weiterverarbeitet oder bei -80 °C gelagert.

Zusammensetzung des DNase-Mastermix je 80  $\mu$ L:

- 10  $\mu$ L DNase I-Stocklösung
- 70  $\mu$ L RPP-Puffer

### 3.3.3 RNA-Konzentrationsmessung und Reverse-Transkriptase-PCR

Die Messung der Konzentration der erhaltenen RNA erfolgte mit dem NanoPhotometer (Implen). Dazu wurde zunächst mit 3  $\mu\text{L}$  destilliertem Wasser dessen Referenzwert bestimmt und dann jeweils 3  $\mu\text{L}$  der Probe aufgetropft und vermessen.

Das für 2  $\mu\text{g}$  RNA benötigte Volumen der RNA-Lösung sowie die zu 25,4  $\mu\text{L}$  fehlende Menge RNase-freien Wassers wurden berechnet. In ein 0,2 mL-Reaktionsgefäß wurde nun zunächst RNase-freies Wasser, dann 14,6  $\mu\text{L}$  Affinity Script-Mastermix und schließlich das jeweilige Volumen der zuvor zehn Minuten bei 70 °C denaturierten RNA-Lösung pipettiert. Lag deren Konzentration zu niedrig, wurde auf Wasser verzichtet und lediglich 25,4  $\mu\text{L}$  RNA-Lösung eingesetzt.

Nach kurzer Zentrifugation erfolgte die Umschreibung in cDNA im Thermocycler durch 15-minütige Inkubation bei 42 °C, dann wurde der Ansatz für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt um die Reaktion zu stoppen und schließlich auf 4 °C gekühlt.

Die erhaltene cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

Zusammensetzung des Affinity Script-Mastermix je 14,6  $\mu\text{L}$ :

- 6  $\mu\text{L}$  random primer
- 4  $\mu\text{L}$  10x Puffer
- 1,6  $\mu\text{L}$  dNTP (10 mM)
- 1  $\mu\text{L}$  RNase-Block
- 2  $\mu\text{L}$  Affinity Script

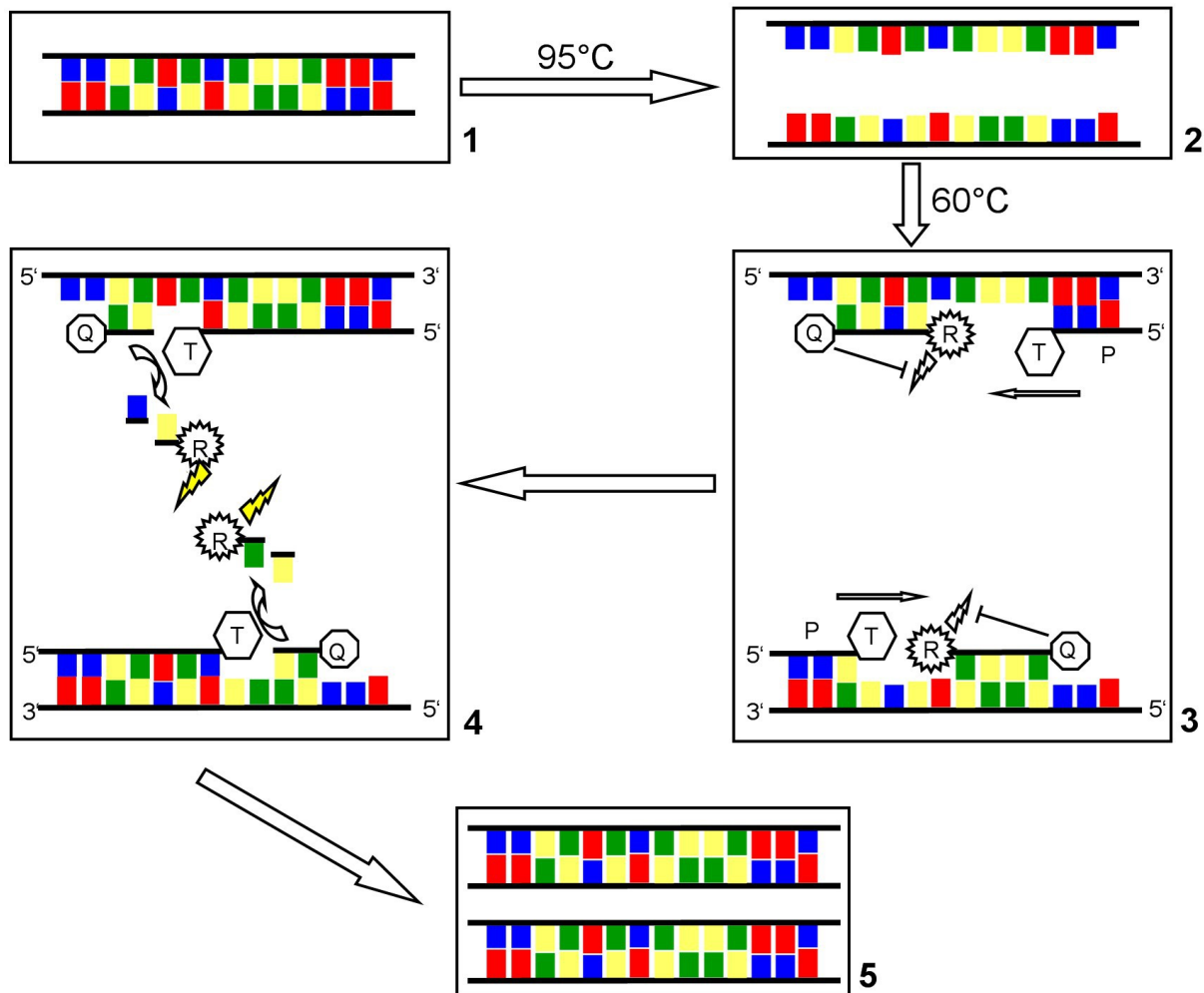
### 3.3.4 TaqMan® -PCR

Die TaqMan® -PCR ist ein quantitatives real-time-PCR-Verfahren und damit eine Weiterentwicklung der von Mullis beschriebenen rein qualitativen PCR<sup>141)</sup>. Wie bei der herkömmlichen PCR erfolgt ausgehend von spezifischen, für das jeweilige Gen passend hergestellten Primern mithilfe von DNA-Polymerase und dreifach phosphorylierten Desoxyribonukleinsäuren eine Polymerasekettenreaktion. Durch zyklische Änderung der Temperatur werden synthetisierte Doppelstränge bei 95 °C denaturiert und stehen so anschließend bei 60 °C für die nächste Replikation als Matrize zur Verfügung.

Zusätzlich ist bei der TaqMan® -PCR noch eine Sonde im Reaktionsgemisch enthalten, die an einen mittleren Abschnitt des Gens bindet und an ihrem 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Farbstoff („Reporter“) gekoppelt ist. Dessen Fluoreszenz wird aber durch

## Methoden

einen 3'-wärts gelegenen, sogenannten „Quencher“ unterdrückt. Bei der Polymerisierung wird die Sonde durch die 5'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase abgebaut und der Reporter dadurch freigesetzt, seine Fluoreszenz nicht mehr unterdrückt. Diese Zunahme an freiem Farbstoff kann vom TaqMan® -Gerät gemessen und mithilfe einer Software die relative Ausgangsmenge an cDNA berechnet werden. Durch gleichzeitige Amplifikation eines housekeeping-Gens mit konstitutiver Expression, z.B. GAPDH, kann eine Normierung erfolgen.



**Abb. 3.14: Schematische Darstellung des Reaktionsprinzips beim TaqMan®.**

Doppelsträngige DNA (**1**) wird bei 95 °C denaturiert, sodass die Einzelstränge vorliegen (**2**). Bei 60 °C lagern sich spezifische Primer an Basensequenzen an, die das Zielgen am 5'-Ende flankieren, sodass davon ausgehend der komplementäre Strang von der von der Taq-Polymerase (T) 3'-wärts synthetisiert werden kann. In der Sequenz des Zielgens bindet zudem eine spezifische Sonde, an deren 5'-Ende ein fluoreszierender Reporter (R) konjugiert ist, dessen Fluoreszenz durch einen Quencher (Q) am 3'-Ende unterdrückt wird (**3**). Mit fortschreitender Synthese des komplementären Strangs wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonuclease-Aktivität der Taq-Polymerase schrittweise abgebaut. Dabei entzieht sich der Reporter der hemmenden Wirkung des Quenchers und emittiert Licht (**4**). Nach vollendeter Synthese der komplementären Stränge liegen zwei neue doppelsträngige DNA-Moleküle vor (**5**). Ein neuer Zyklus kann starten, die Fluoreszenz steigt durch mit jedem Zyklus freigesetzte Reporter mit den Zyklen annähernd exponentiell an.

## Methoden

---

Konkret wurde so vorgegangen: Primer und Proben für die humanen Gene  $K_{Ca}3.1$  und  $K_v7.1$  wurden in RNase-freiem Wasser auf 18  $\mu\text{M}$  bzw. 5  $\mu\text{M}$  verdünnt und aliquotiert. Auf einer 384-well-Mikrotiterplatte wurden die cDNA-Proben in dreifacher Bestimmung in einem Volumen von je 20  $\mu\text{L}$  vermessen, das sich folgendermaßen zusammensetzte:

- 5  $\mu\text{L}$  destilliertes Wasser
- 1  $\mu\text{L}$  cDNA
- 10  $\mu\text{L}$  Brilliant II-Masternmix for qPCR with high ROX
- 1  $\mu\text{L}$  forward primer
- 1  $\mu\text{L}$  reverse primer
- 1  $\mu\text{L}$  Sonde
- 1  $\mu\text{L}$  GAPDH-Mix (20 x)

Mit einer durchsichtigen Klebefolie wurde die Platte abgedeckt, drei Minuten bei 3.000 rpm zentrifugiert und schließlich eine TaqMan® -PCR durchgeführt: Initial erfolgte eine Inkubation über zwei Minuten bei 50 °C und dann über zehn Minuten bei 95 °C, bevor 40 Zyklen à je 15 Sekunden bei 95 °C und 60 Sekunden bei 60 °C gestartet wurden.

Die Sequence Detector Software (Applied Biosciences) zeichnete die Fluoreszenz jedes wells in Abhängigkeit von der Zyklenzahl auf.

### 3.3.5 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mithilfe von SDS 2.3 bzw. 2.2 und Microsoft Excel. In der exponentiellen Phase der Amplifikation und damit auch der Farbstofffreisetzung wurde der Detektionsschwellenwert (Ct) festgelegt. Von den Ct-Werten für das jeweilige Gen wurde der Ct-Wert von GAPDH abgezogen und der erhaltene dCt-Wert über alle Messungen für die jeweilige Probe gemittelt. Der Mittelwert der Kontrollpatienten wurde willkürlich als Wert „1“ definiert und die übrigen Proben dazu in Bezug gesetzt („relativer Wert“).

Über die Rechenvorschrift:  $2^{-(\text{relativer Wert})}$  erhielt man die relative Startkopienzahl des Gens in Bezug auf den Mittelwert der Kontrollen.

## 3.4 Statistische Analysen:

Messwerte sind stets als Mittelwert +/- SEM (standard error of the mean) ausgedrückt. Alle statistischen Analysen erfolgten mit PASW Statistics 18.0 (SPSS). Statistische Signifikanz

## Methoden

---

wurde mithilfe des Student-t-Test ermittelt, in Abhängigkeit vom Ergebnis des Levene-Testes wurde dabei Varianzhomogenität angenommen oder nicht. P-Werte  $< 0,05$  wurden als signifikant betrachtet. Ausreißer, die mithilfe des Grubbs-Test zu  $\alpha < 0,05$  als solche identifiziert wurden, wurden von der Signifikanzberechnung ausgeschlossen. Diagramme wurden mit Sigma Plot (SPSS) erstellt.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchung intestinaler Wundheilung in scratch-assays

IEC 18 bilden in Kultur einen konfluenten Monolayer aus und sind nicht transformiert. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Kaliumkanälen und EGF sowie von 24-stündiger Vorinkubation mit IFN- $\gamma$  auf die Wundheilung dieser Zelllinie nach mechanischer Verwundung untersucht.

#### 4.1.1 Welchen Einfluss haben Kaliumkanäle auf die intestinale Wundheilung?

Kaliumkanäle werden von allen Zellen des Körpers exprimiert und spielen bei zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen eine zentrale Rolle <sup>72)</sup>. Wir untersuchten daher deren Einfluss auf die intestinale Wundheilung. Dazu wurden konfluente IEC 18 in chamber slides verwundet, mit verschiedenen Kaliumkanalmodulatoren inkubiert und videomikroskopisch über acht Stunden beobachtet. Das Wundareal wurde währenddessen alle 60 min gemessen und daraus die Flächenwachstumsgeschwindigkeit als Maß für die Wundheilungsrate von IEC 18 nach Verwundung berechnet.

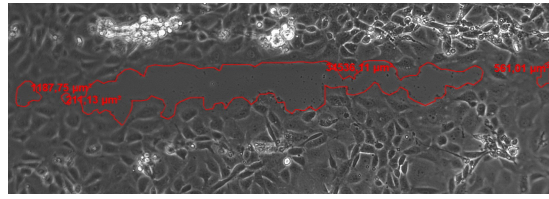
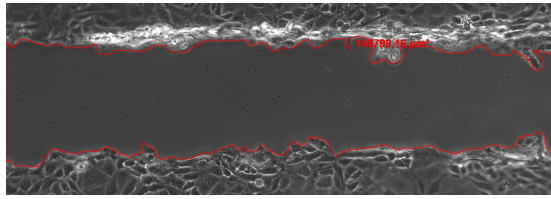
Über die gesamte Beobachtungszeit von acht Stunden gemittelt (sofern bereits vorher ein kompletter Wundschluss erfolgte, wurde bei den Berechnungen das mittlere Flächenwachstum bis zu diesem Zeitpunkt verwendet), steigerte die Inhibition von kalziumabhängigen  $K_{Ca}1.1$ -Kanälen mit Iberiotoxin (IbTx, 100 nM) sowie die Inhibition von kalziumabhängigen  $K_{Ca}3.1$ -Kanälen sowohl mit Clotrimazol (Clt, 10  $\mu$ M) als auch mit TRAM-34 (5  $\mu$ M) das Flächenwachstum signifikant, während die Aktivierung von kalziumabhängigen  $K_{Ca}3.1$ - und  $K_{Ca}2$ -Kanälen mit 1-EBIO (600  $\mu$ M) zu einer signifikanten Abnahme führte. Die Hemmung von Einwärtsgleichrichter-Kaliumkanälen mit Barium (5 mM), von spannungsabhängigen Kaliumkanälen mit Tetraethylammonium (TEA, 5 mM), sowohl kalziumabhängiger als auch spannungsabhängiger Kanäle mit Charybdotoxin (ChTx, 200 nM) sowie spannungsabhängiger  $K_{v}7.1$ -Kanäle mit Chromanol 293B (C293B, 10  $\mu$ M) zeigten keine statistisch signifikanten Effekte (Abb. 4.1 und 4.2, Tab. 4.1).

Ein Zusammenhang zwischen der Zellpassage und der mittleren Wundheilung bestand nicht (Pearson-Koeffizient 0,05;  $p = 0,57$ ).

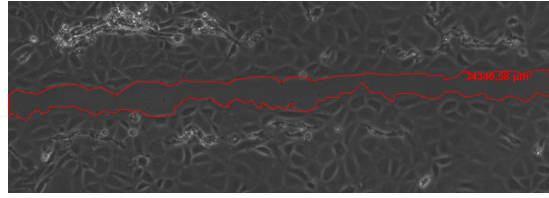
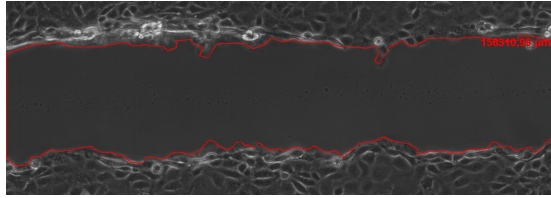
0 h nach Verwundung

8 h nach Verwundung

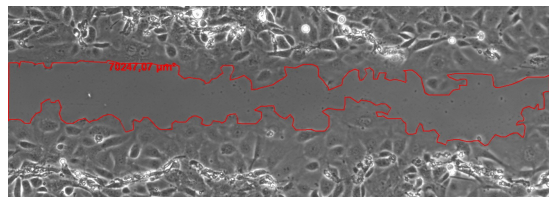
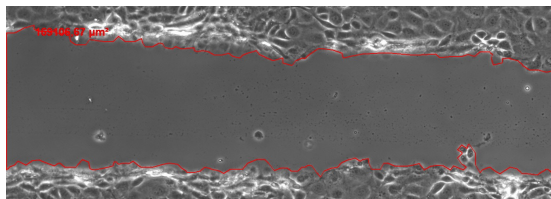
Kontrolle



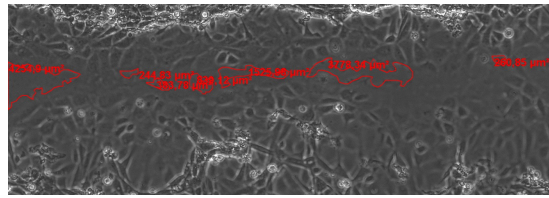
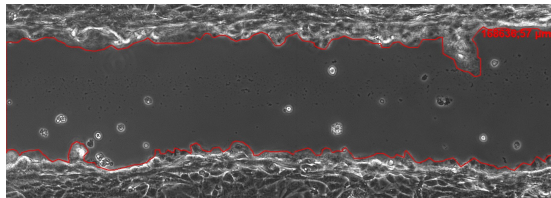
Barium



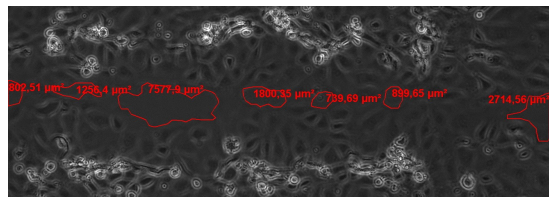
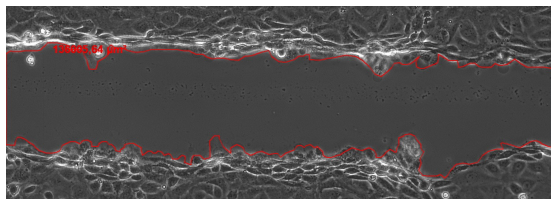
TEA



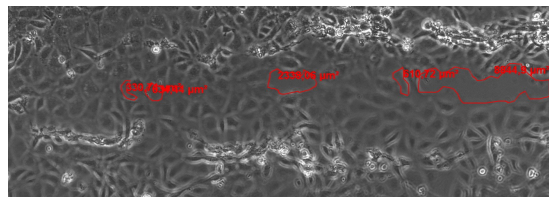
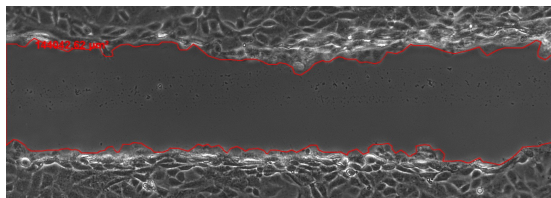
IbTx



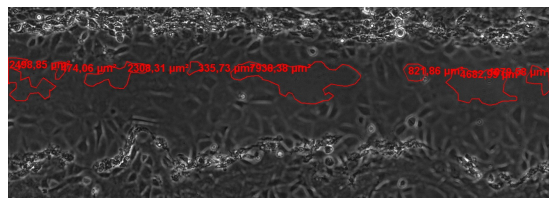
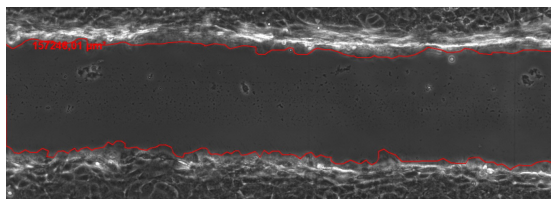
ChTx



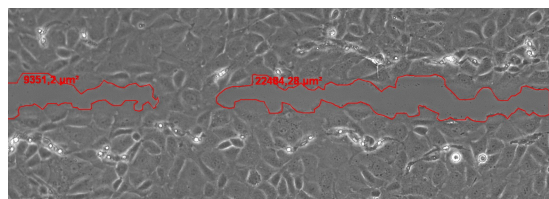
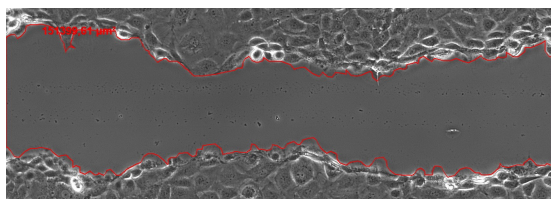
Clt



TRAM-34



C293B



1-EBIO

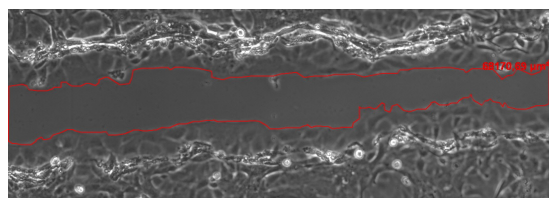
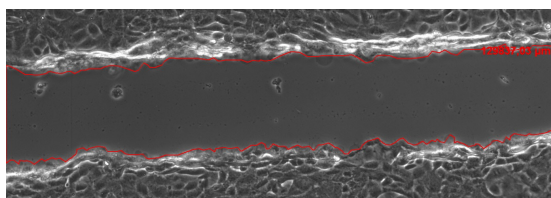
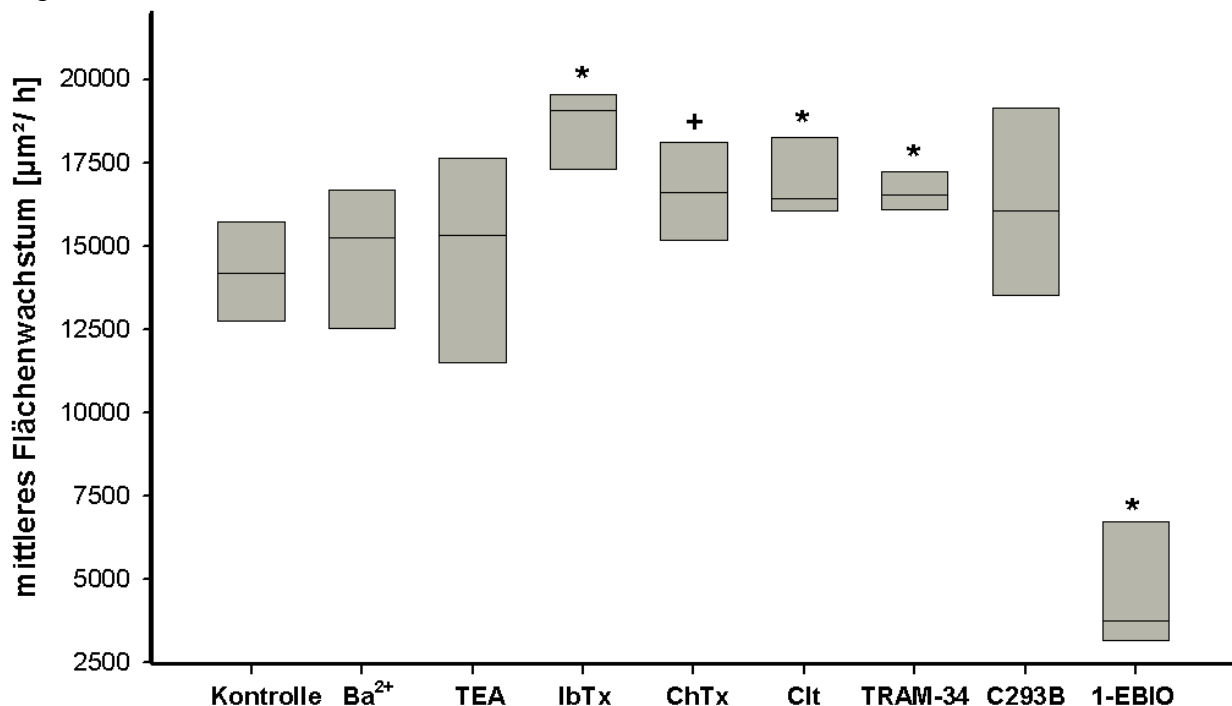


Abb. 4.1: Repräsentative Bilder von Wunden direkt sowie acht Stunden nach Verwundung bei den eingesetzten Kaliumkanalmodulatoren

## Ergebnisse



**Abb. 4.2: Wundheilung von IEC 18 in Abhängigkeit von verschiedenen Kaliumkanalmodulatoren.**

Die Modulatoren IbTx (Inhibitor von K<sub>Ca</sub>1.1), Clt (Inhibitor von K<sub>Ca</sub>3.1) und TRAM-34 (Inhibitor von K<sub>Ca</sub>3.1) steigern das mittlere Flächenwachstum als Maß für die intestinale Wundheilung im Beobachtungszeitraum von 8 Stunden signifikant. 1-EBIO (Aktivator von K<sub>Ca</sub>2- und K<sub>Ca</sub>3.1-Kanälen) bremst die Wundheilung deutlich. Die Modulatoren Barium (Inhibitor der meisten K<sub>ir</sub>- sowie einiger K<sub>v</sub>- und K<sub>2p</sub>-Kanäle), TEA (Inhibitor der meisten K<sub>v</sub>-, einiger K<sub>Ca</sub>- und K<sub>ir</sub>-Kanäle), ChTx (Inhibitor von K<sub>Ca</sub>1.1, K<sub>Ca</sub>3.1 und einiger K<sub>v</sub>-Kanäle) sowie C293B (Inhibitor von K<sub>v</sub>7.1) zeigen keinen signifikanten Effekt. n = 5; \* p < 0,05 vs. Kontrolle; + p ≈ 0,05 vs. Kontrolle

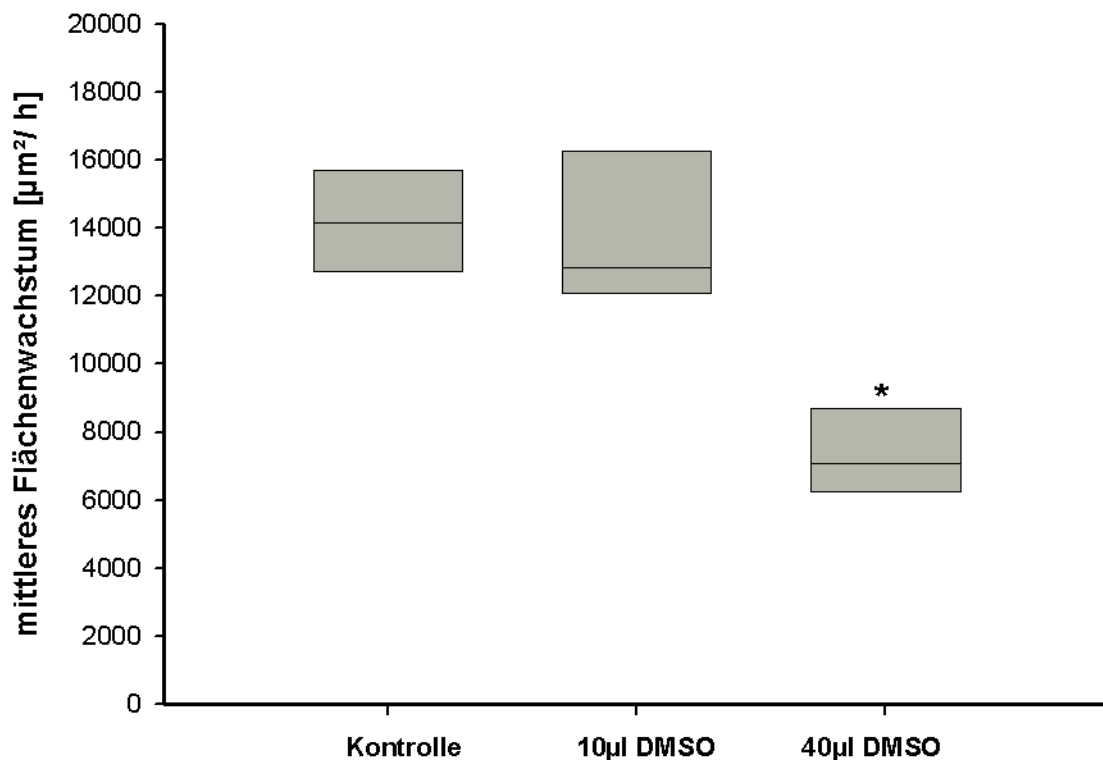
Modulator	Absolute Werte		Prozentuale Werte		p-Wert vs. Kontrolle
	Mittleres Flächenwachstum [µm²/h]	SEM [µm²/h]	Mittleres Flächenwachstum vs. Kontrolle [%]	SEM [%]	
Kontrolle	14.214,91	+/- 842,94		+/- 5,93	
Ba <sup>2+</sup>	14.736,62	+/- 1.048,52	+ 3,67	+/- 7,38	0,708
TEA	14.729,62	+/- 1.431,35	+ 3,62	+/- 10,07	0,765
IbTx	18.560,67	+/- 533,63	+ 30,57	+/- 3,57	0,002
ChTx	16.638,49	+/- 653,79	+ 17,05	+/- 4,60	0,053
Clt	17.002,25	+/- 614,94	+ 19,61	+/- 4,33	0,028
TRAM-34	16.637,69	+/- 275,42	+ 17,04	+/- 1,94	0,026
C293B	16.278,73	+/- 1.381,54	+ 14,52	+/- 9,72	0,238
1-EBIO	4.706,70	+/- 894,40	- 66,89	+/- 6,29	<0,001

**Tab. 4.1: Wundheilung von IEC 18 in Abhängigkeit von verschiedenen Kaliumkanalmodulatoren**

Iberiotoxin steigert das mittlere Flächenwachstum als Maß für die intestinale Wundheilung während der achtstündigen Beobachtungszeit der scratch-assays um über 30 %. Clt und TRAM-34 vermitteln eine Steigerung von knapp 20 % bzw. rund 17 %. 1-EBIO hingegen induziert ein um mehr als zwei Drittel gebremstes mittleres Flächenwachstum. In Abhängigkeit von den übrigen Modulatoren ergeben sich keine signifikanten Veränderungen.

## Ergebnisse

Die hydrophoben Substanzen Clt, TRAM-34, C293B und 1-EBIO mussten zur Aliquotierung in DMSO gelöst werden (ClT, TRAM-34 und C293B in 10  $\mu$ L, 1-EBIO in 40  $\mu$ L). Für DMSO sind u.a. toxische Effekte auf Zellen beschrieben <sup>142</sup>). Daher wurde der Versuch zusätzlich für 10  $\mu$ L (0,25 % v/v) und 40  $\mu$ L DMSO (1 % v/v) in starving medium kontrolliert (Abb. 4.3). 10  $\mu$ L DMSO hatten keinen Einfluss auf die Wundheilungsgeschwindigkeit (-2,1 % +/- 7,0 %;  $p = 0,828$ ), während 40  $\mu$ L DMSO diese um 48,0 % +/- 4,7 % bremsten ( $p < 0,001$ ).



**Abb. 4.3: Wundheilung von IEC 18 in Abhängigkeit von 10 bzw. 40  $\mu$ L DMSO**

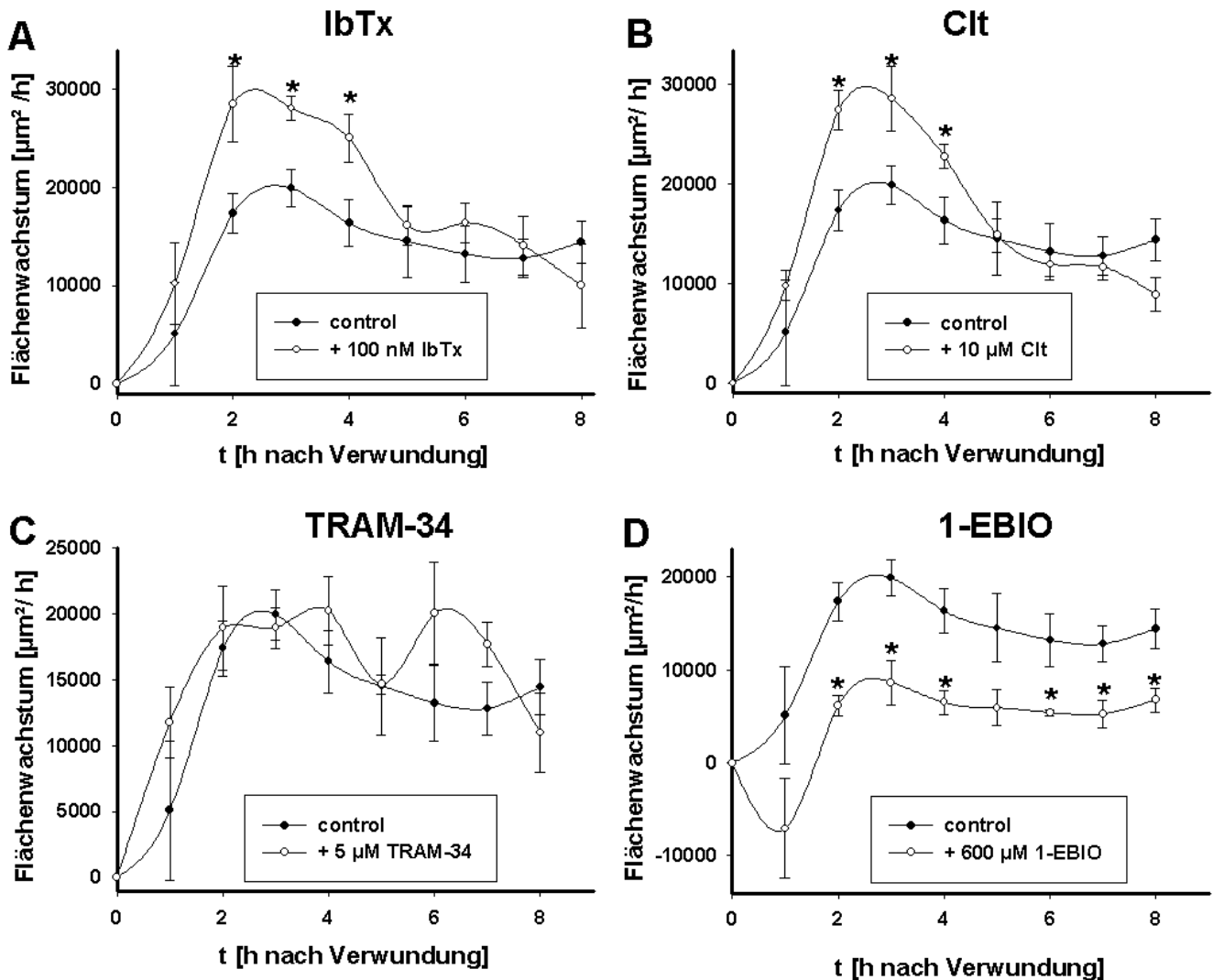
40  $\mu$ L, nicht aber 10  $\mu$ L DMSO zeigen einen signifikanten Einfluss auf das mittlere Flächenwachstum als Maß für die Wundheilung von IEC 18. \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle

Anhand der in jeder Stunde der Experimente gemessenen Flächenwachstumsgeschwindigkeit als Maß für die jeweils aktuelle Wundheilungsrate der IEC 18 nach Verwundung wurde außerdem der Verlauf der Wundheilung ausgewertet (Abb. 4.4).

IbTx steigerte die Wundheilung insbesondere und signifikant in der zweiten, dritten und vierten Stunde nach Verwundung. Dasselbe galt für Clt. TRAM-34 zeigte demgegenüber – trotz Hemmung desselben Kaliumkanals – einen anderen Verlauf der Wundheilung mit vor allem in der sechsten und siebten Stunde nach Verwundung erhöhten Werten des Flächenwachstums, die sich aber zu keinem Zeitpunkt signifikant von der Wundheilung

## Ergebnisse

der Kontrolle unterschieden. 1-EBIO führt nahezu über den gesamten Verlauf des Experiments zu signifikant erniedrigten Wachstumswerten.



### Abb. 4.4 Verlauf der Wundheilung nach Zugabe von Kaliumkanalmodulatoren

n = 5 für jede Bedingung, \* p < 0,05 vs. jeweiliger Kontrollwert. **(A)** IbTx führt in der zweiten, dritten und vierten Stunde nach Verwundung zu signifikant erhöhten Werten für das Flächenwachstum als Maß für die Wundheilung. **(B)** Nach Clt-Zugabe ist das Flächenwachstum ebenfalls in der zweiten, dritten und vierten Stunde signifikant gegenüber Kontrolle erhöht. **(C)** Die für TRAM-34 gemessenen Wundheilungsraten unterscheiden sich nicht signifikant von den Kontrollwerten **(D)** Applikation von 1-EBIO senkt die Wachstumsgeschwindigkeit beinahe während des gesamten Beobachtungszeitraums signifikant

## 4.1.2 Wie beeinflussen Kaliumkanäle die intestinale Wundheilung unter entzündlichen Bedingungen?

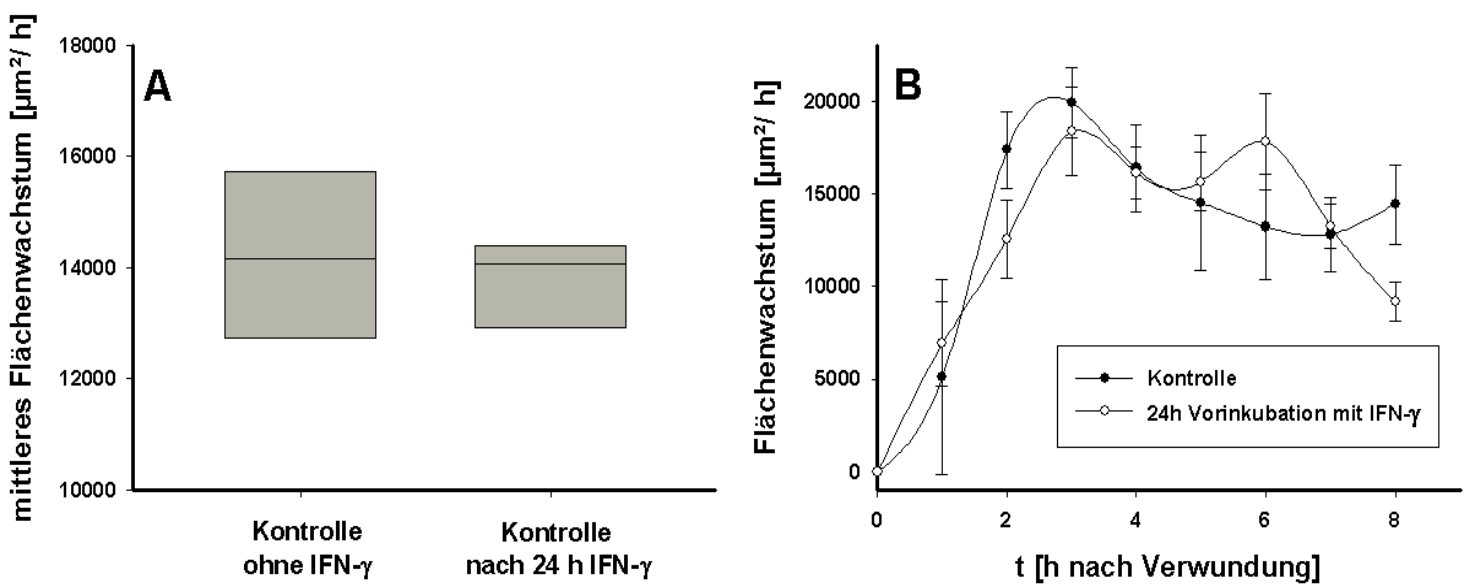
Wesentliches Ziel dieser Arbeit war es, Erkenntnisse über den Einfluss von Kaliumkanälen auf die intestinale Wundheilung unter entzündlichen Bedingungen zu gewinnen, um damit erste Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von Kaliumkanälen an Pathogenese und

## Ergebnisse

Unterhaltung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zu erhalten.

Dafür wurden konfluente IEC 18 in chamber slides 24 h vor Verwundung mit 100 ng/ml IFN- $\gamma$  inkubiert, anschließend verwundet und die Wundheilung in Abhängigkeit von verschiedenen Kaliumkanalmodulatoren videomikroskopisch über acht Stunden beobachtet.

Die alleinige Vorinkubation mit IFN- $\gamma$  bewirkt weder im mittleren Wachstum während der Beobachtungszeit (-3,34 % +/- 2,49 %,  $p = 0,62$ ) noch im Verlauf der Wundheilung Unterschiede gegenüber nicht entzündlichen Kontrollbedingungen (Abb. 4.5).



### Abb. 4.5: Wundheilung nach 24 h Vorinkubation mit IFN- $\gamma$

Gegenüberstellung der Wundheilung ohne Zugabe von Kaliumkanalmodulatoren ohne und mit Vorinkubation mit 100 ng/ml IFN- $\gamma$  über 24 h vor Verwundung ( $n = 5$ ). **(A)** Das mittlere Flächenwachstum während der achtstündigen Beobachtungszeit ändert sich nicht. **(B)** Auch im Verlauf der Wundheilung ergeben sich unter entzündlichen Bedingungen keine signifikanten Veränderungen.

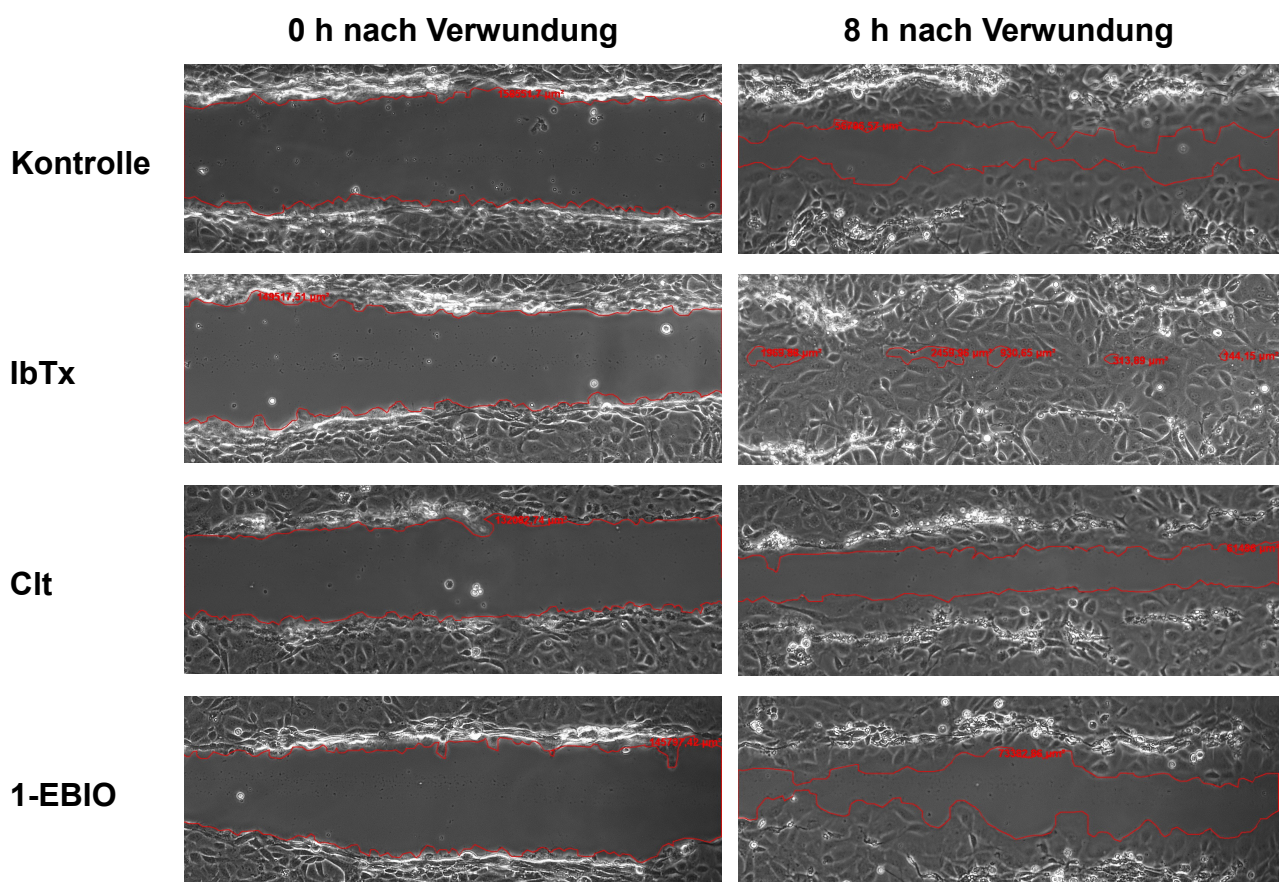
IbTx und damit die Inhibition von kalziumabhängigen  $K_{Ca1.1}$ -Kanälen steigert auch nach IFN- $\gamma$ -Vorinkubation tendenziell die Wundheilung ( $p = 0,05$ ). Die Hemmung von  $K_{Ca3.1}$  mittels Applikation von Clt hingegen führt unter diesen Bedingungen ebenso wie die  $K_{Ca3.1}$ -Aktivierung durch 1-EBIO zu einem signifikanten Rückgang der Wundheilung ( $p < 0,01$  bzw.  $p < 0,001$ ), während Clt ohne IFN- $\gamma$ -Vorinkubation die Wundheilung steigerte (Abb. 4.9 und 4.10, Tab. 4.2, vgl. Kap. 4.1.1).

## Ergebnisse

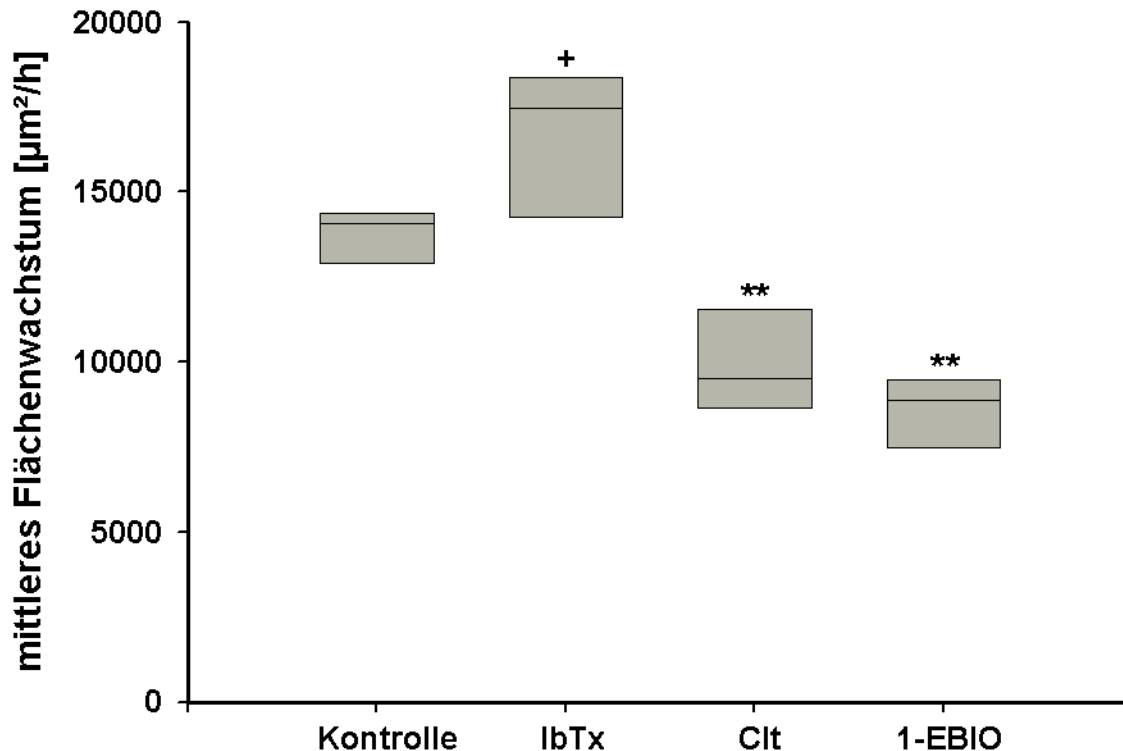
Modulator	Absolute Werte		Prozentuale Werte		p-Wert vs. Kontrolle
	Mittleres Flächenwachstum [ $\mu\text{m}^2/\text{h}$ ]	SEM [ $\mu\text{m}^2/\text{h}$ ]	Mittleres Flächenwachstum vs. Kontrolle [%]	SEM [%]	
Kontrolle	13.739,50	+/- 353,94		+/- 2,58	
IbTx	16.534,08	+/- 1.186,81	+ 20,34	+/- 8,64	0,054
Clt	9.968,91	+/- 805,39	- 27,44	+/- 5,86	0,003
1-EBIO	8.553,60	+/- 646,11	-37,74	+/- 4,70	<0,001

**Tab. 4.2: Wundheilung von IEC 18 in Abhängigkeit von verschiedenen Kaliumkanalmodulatoren nach 24 h Vorinkubation mit IFN- $\gamma$**

IbTx induziert eine Steigerung der Wundheilung um ca. 20 %, während das mittlere Flächenwachstum Clt abhängig um über 27 % und durch 1-EBIO um über 37 % und signifikant erniedrigt ist.



**Abb. 4.6: Repräsentative Bilder von Wunden direkt sowie acht Stunden nach Verwundung bei den eingesetzten Kaliumkanalmodulatoren nach 24 h Vorinkubation mit IFN- $\gamma$**



**Abb. 4.7: Wundheilung in Abhängigkeit verschiedener Kaliumkanalmodulatoren nach 24 h Vorinkubation mit IFN- $\gamma$**

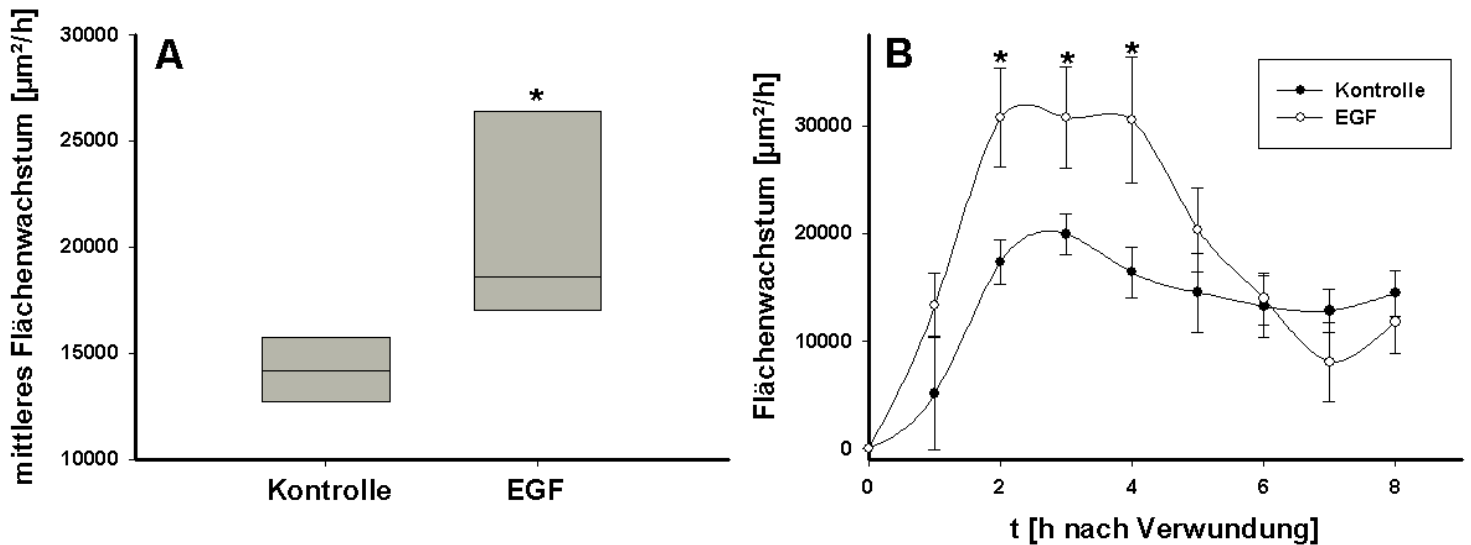
Darstellung des mittleren Flächenwachstums während des Beobachtungszeitraums. IbTx (Inhibitor von KCa1.1) führt zu einer tendenziellen Steigerung der Wundheilung, während Clt (Inhibitor von KCa3.1) und 1-EBIO (Aktivator von KCa3.1) die Migration signifikant bremsen. n = 5; + p = 0,05 vs. Kontrolle; \*\* p < 0,01 vs. Kontrolle

#### 4.1.3 Welchen Effekt hat epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) auf die Kaliumkanal-abhängige Wundheilung?

EGF und die vom EGF-Rezeptor (EGFr) ausgehenden Signalwege beeinflussen wie in zahlreichen anderen Geweben auch im Gastrointestinaltrakt die Migration und Proliferation u.a. 143),144),145) und interagieren zudem häufig mit Kaliumkanälen 117),134). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, wie sich 5 nM EGF in scratch assays auf die Kaliumkanal-abhängige Wundheilung auswirkt.

Erwartungsgemäß war EGF in der Lage die mittlere Flächenwachstumsgeschwindigkeit signifikant zu steigern (+48,27 % +/- 20,97 %, p = 0,01), was sich insbesondere auf eine signifikant gesteigerte Wundheilung in der zweiten, dritten und vierten Stunde nach Verwundung zurückführen ließ (Abb. 4.8).





**Abb. 4.8: Wundheilung mit EGF**

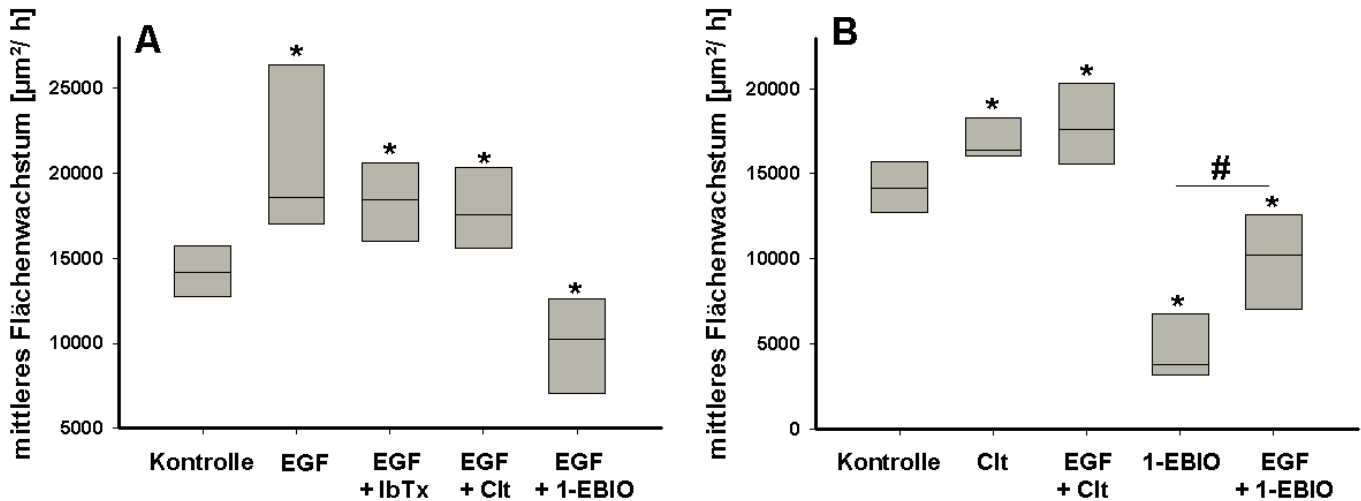
Gegenüberstellung der Wundheilung ohne Zugabe von Kaliumkanalmodulatoren ohne und mit Zugabe von 5 nM EGF nach Verwundung (n = 5). **(A)** Das mittlere Flächenwachstum während der achtstündigen Beobachtungszeit ist signifikant gesteigert. **(B)** Im Verlauf der Wundheilung liegen in der zweiten, dritten und vierten Stunde nach Verwundung signifikant erhöhte Wachstumsraten vor.

Auch in Verbindung mit Clt war das mittlere Flächenwachstum unter EGF-Einfluss weiterhin signifikant erhöht (p = 0,028). Keine Veränderung zeigte sich allerdings gegenüber dem Clt-induzierten Wachstum ohne EGF (p = 0,50). Dieselben Verhältnisse lagen bei der Kombination von EGF mit IbTx vor: Die Wundheilung war signifikant gegenüber Kontrolle (p = 0,032), nicht aber gegenüber IbTx-abhängigen Werten ohne EGF (p = 0,88; vgl. Abb. 4.11) erhöht. Unter 1-EBIO und EGF war die Wundheilung weiterhin signifikant reduziert, gegenüber 1-EBIO alleine jedoch signifikant gesteigert (p = 0,02) (Abb. 4.9, Tab. 4.3).

Modulator	Absolute Werte		Prozentuale Werte		p-Wert vs. Kontrolle
	Mittleres Flächenwachstum [µm²/h]	SEM [µm²/h]	Mittleres Flächenwachstum vs. Kontrolle [%]	SEM [%]	
Kontrolle	14.214,91	+/- 842,94		+/- 5,93	
EGF	21.075,96	+/- 2.980,42	+ 48,27	+/- 20,97	0,012
EGF+IbTx	18.362,93	+/- 1.331,79	+ 29,18	+/- 9,37	0,032
EGF+Clit	17.896,47	+/- 1.091,07	+ 25,90	+/- 7,68	0,028
EGF+1-EBIO	9.952,80	+/- 1.616,10	- 29,98	+/- 11,37	0,040

**Tab. 4.3: Wundheilung von IEC 18 mit EGF**

EGF steigert die Wundheilung um 48 %. Auch in Kombination mit Iberiotoxin und Clotrimazol lassen sich signifikant beschleunigte Wundschlussraten beobachten, während mit 1-EBIO die Wundheilung um knapp 30 % reduziert ist.



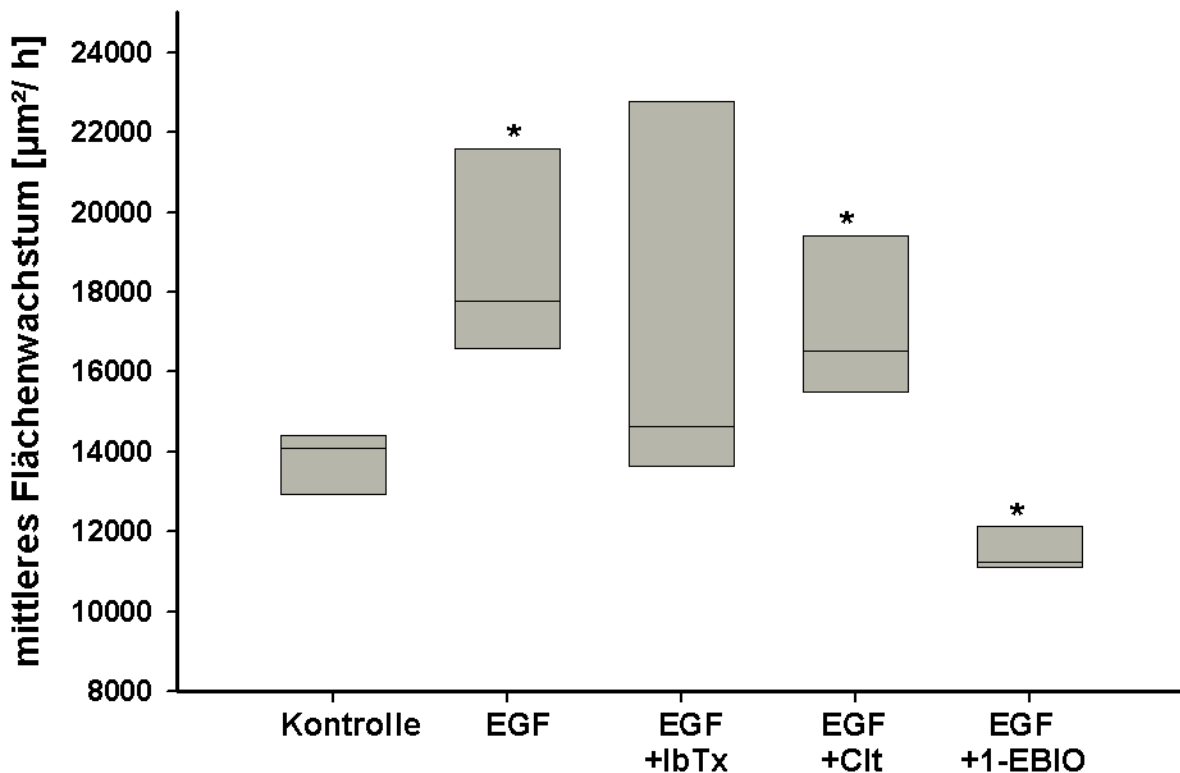
**Abb. 4.9: Kaliumkanalabhängige Wundheilung unter EGF-Einfluss**

(A) EGF steigert das mittlere Flächenwachstum während der Verwundungsexperimente signifikant, in Kombination mit Clt (n = 5) oder IbTx (n = 3) ist dies ebenfalls der Fall. Die Verbindung mit 1-EBIO führt zu einer signifikant reduzierten Wundheilung (n = 3). (B) Vergleich des Clt- und 1-EBIO-abhängigen mittleren Flächenwachstums in den scratch assays mit und ohne zusätzlich 5 nM EGF: EGF kann die Clt-induzierte Beschleunigung der Wundheilung nicht weiter steigern (n = 5). Zwar bremsen auch 1-EBIO und EGF gemeinsam die Wundheilung (n = 3), jedoch ist dies signifikant weniger der Fall als durch 1-EBIO alleine (n = 5). \* p < 0,05 vs. Kontrolle; # p < 0,05

#### 4.1.4 Welchen Effekt hat EGF auf die Kaliumkanal-abhängige Wundheilung nach 24 h Vorinkubation mit IFN-γ?

Vor dem Hintergrund einer möglichen Beeinflussung von EGFr-abhängigen Signalwegen durch Modulierung von Kaliumkanälen wurde des Weiteren untersucht, ob und wie EGF die kaliumkanalabhängige Wundheilung nach 24 h Vorinkubation mit IFN-γ beeinflusst.

5 nM EGF beschleunigen auch unter diesen entzündlichen Bedingungen das mittlere Flächenwachstum. Wird EGF nach Vorinkubation mit IFN-γ mit Kaliumkanalmodulatoren kombiniert, so liegt die Wundheilung für IbTx tendenziell und für Clt signifikant über dem Kontrollwert. Erneut wurden mit 1-EBIO signifikant erniedrigte Migrationsraten festgestellt (Abb. 4.10, Tab. 4.4).



**Abb. 4.10: Kaliumkanalabhängige Wundheilung unter EGF-Einfluss nach 24 h Vorinkubation mit IFN-γ**

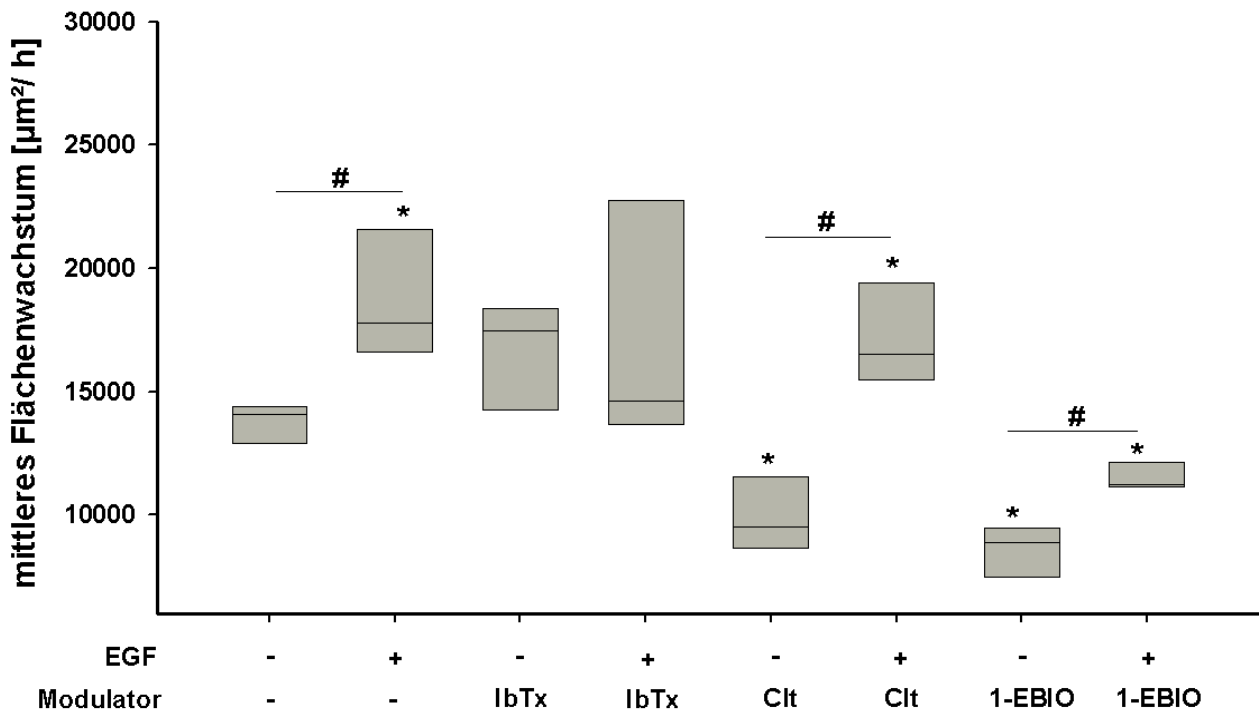
Sowohl 5 nM EGF allein (n = 5) als auch die Kombination von 5 nM EGF mit Cit (n = 5) steigert nach 24 h Vorinkubation mit IFN-γ das mittlere Flächenwachstum während des Beobachtungszeitraums, während es von EGF und 1-EBIO (n = 3) gesenkt wird. IbTx zeigt bei großer Streuung nur tendenziellen Effekt (n = 3); \* p < 0,05 vs. Kontrolle

Modulator	Absolute Werte		Prozentuale Werte		p-Wert vs. Kontrolle
	Mittleres Flächenwachstum [µm²/h]	SEM [µm²/h]	Mittleres Flächenwachstum vs. Kontrolle [%]	SEM [%]	
Kontrolle	13.739,50	+/- 353,94		+/- 2,58	
EGF	18.825,08	+/- 1.192,32	+ 37,01	+/- 8,68	0,004
EGF+IbTx	17.014,20	+/- 2890,02	+ 23,83	+/- 21,03	0,181
EGF+Cit	17.258,87	+/- 922,63	+ 25,61	+/- 6,72	0,007
EGF+1-EBIO	11.499,64	+/- 320,40	- 16,30	+/- 2,33	0,005

**Tab. 4.4: Wundheilung von IEC 18 mit EGF nach 24 h Vorinkubation mit IFN-γ**

Nach 24 h Vorinkubation steigert EGF die Wundheilung sowohl allein als auch in Kombination mit Kaliumkanalmodulatoren um 23 bis 63 %.

Der Vergleich mit den unter entzündlichen Bedingungen ohne zusätzliche EGF-Applikation erzielten Ergebnissen zeigt, dass die Cit-induzierte Verlangsamung der Wundheilung nach Vorinkubation mit IFN-γ durch EGF aufgehoben und in eine Steigerung umgekehrt wird. Die 1-EBIO-abhängig verlangsamte Restitution unter diesen Bedingungen läuft mit EGF signifikant schneller ab als ohne. In Abhängigkeit von IbTx zeigen sich keine relevanten Unterschiede (Abb. 4.11).



**Abb. 4.11: Kaliumkanalabhängige Wundheilung nach 24 h Vorinkubation mit IFN- $\gamma$  mit und ohne EGF**

5 nM EGF steigern auch nach Vorinkubation mit IFN- $\gamma$  die Wundheilung (n = 5). Die Kombination von EGF mit IbTx (n = 3) führt zu keiner Veränderung der durch IbTx allein erzielten Werte (n = 5). Die Hemmung der Wundheilung durch Clt unter entzündlichen Bedingungen wird in Kombination mit EGF zu einer Steigerung (je n = 5) und die 1-EBIO abhängige Wundheilung nach IFN- $\gamma$ -Vorinkubation ist weiterhin, aber signifikant weniger erniedrigt. \* p < 0,05 vs. Kontrolle; # p < 0,05

#### 4.1.5 Ergebnisse der scratch-assays im Überblick

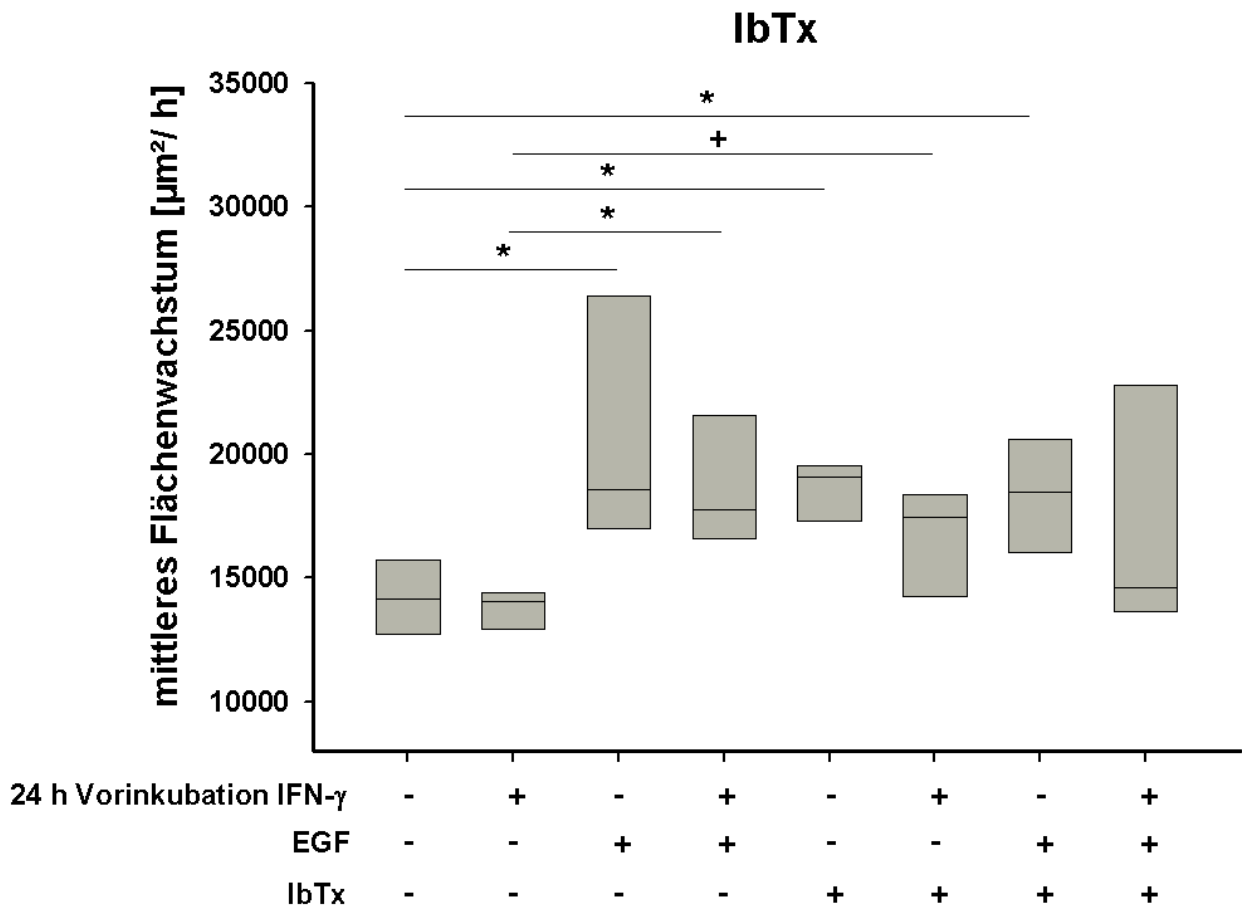
Die Hemmung der kalziumabhängigen Kaliumkanäle  $K_{Ca1.1}$  und  $K_{Ca3.1}$  steigert die Wundheilung der intestinalen Epithelzelllinie IEC 18 nach mechanischer Verwundung. Andere Kaliumkanäle scheinen hierauf keinen Einfluss zu haben. Die mit den Modulatoren der betreffenden Kanäle durchgeführten Experimente sind im Folgenden nochmals in der Übersicht dargestellt.

##### 4.1.5.1 IbTx

100 nM IbTx – ein Inhibitor des kalziumabhängiger Kaliumkanals  $K_{Ca1.1}$  – steigert die Wundheilung signifikant gegenüber Kontrollbedingungen. Auch nach 24-stündiger Vorinkubation mit IFN- $\gamma$  lassen sich durch IbTx tendenziell erhöhte Wachstumsraten erzielen. Bei zusätzlicher EGF-Applikation unter normalen Bedingungen ist das mittlere Flächenwachstum signifikant gesteigert, aber nicht über den durch IbTx alleine

## Ergebnisse

hervorgerufenen Effekt hinaus. Unter entzündlichen Bedingungen zeigt sich kein eindeutiger Trend (Abb. 4.12).



**Abb. 4.12: Auswirkungen von IbTx auf die Restitution von IEC nach Verwundung**

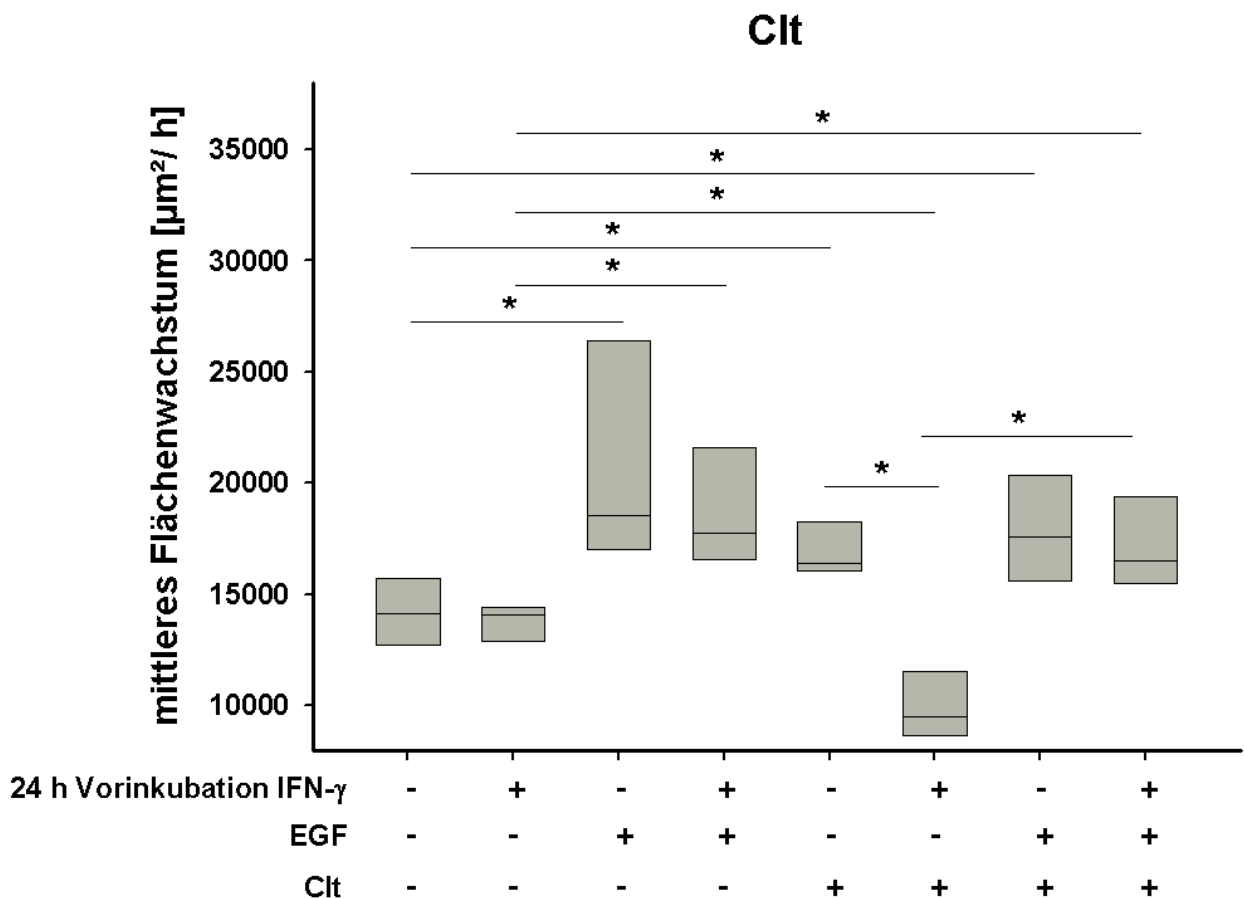
Kontrollbedingungen ohne und mit vorherige Inkubation mit IFN- $\gamma$  sowie Wundheilung für EGF mit und ohne vorherige Inkubation mit IFN- $\gamma$  zum Vergleich mit dargestellt.

IbTx-abhängig ist die Wundheilung von IEC unter normalen Bedingungen signifikant und unter entzündlichen Bedingungen tendenziell erhöht (alle  $n = 5$ ). Zusätzlich EGF führt unter normalen Bedingungen zu keiner weiteren Steigerung der Wachstumswerte, unter entzündlichen Bedingungen ist bei geringer n-Zahl kein Trend erkennbar (beide  $n = 3$ ). \*  $p < 0,05$ ; +  $p \approx 0,05$

### 4.1.5.2 Clt

Clt hemmt den kalziumabhängigen Kaliumkanal  $K_{Ca3.1}$ . 10  $\mu\text{M}$  dieser Substanz bewirken eine signifikante Beschleunigung der intestinalen Restitution nach Verwundung, die zusätzliche Applikation von 5 nM EGF vermag diese Wachstumsbeschleunigung nicht weiter zu steigern. Nach 24-stündiger Vorinkubation mit 100 ng/ml IFN- $\gamma$  wird die Wundheilung durch Clt jedoch gebremst. Gibt man nun allerdings zusätzlich 5 nM EGF zu, wird diese Hemmung aufgehoben und das Wachstum auf Werte angehoben, wie sie bei alleiniger Clt-Gabe beobachtet werden (Abb. 4.13).

Clt vermittelt also unter entzündlichen Bedingungen eine gegensätzliche Regulation der intestinalen Wundheilung, die durch Applikation von EGF wieder normalisiert werden kann.



**Abb. 4.13: Auswirkungen von Clt auf die Restitution von IEC nach Verwundung**

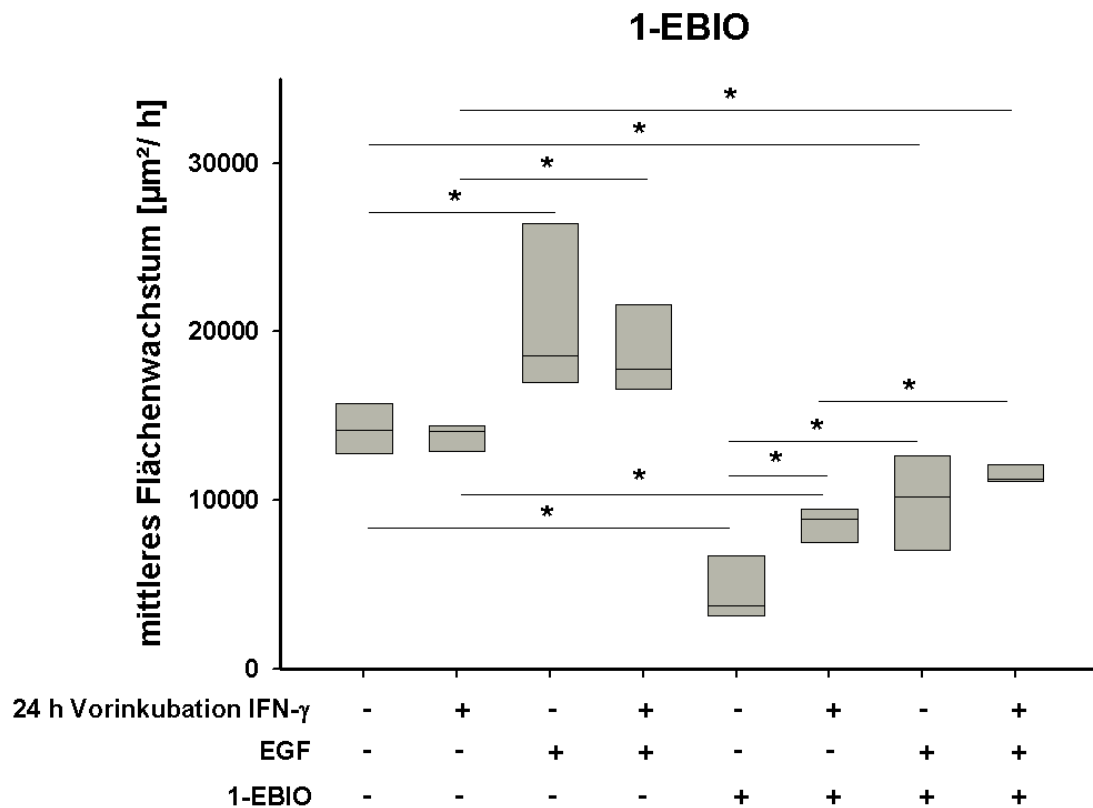
Kontrollbedingungen ohne und mit vorherige Inkubation mit IFN- $\gamma$  sowie Wundheilung für EGF mit und ohne vorherige Inkubation mit IFN- $\gamma$  zum Vergleich mit dargestellt.

Clt-abhängig ist die Wundheilung von IEC unter normalen Bedingungen signifikant gesteigert und unter entzündlichen Bedingungen signifikant erniedrigt. Zusätzlich EGF führt unter normalen Bedingungen zu keiner weiteren Steigerung der Wachstumswerte, unter entzündlichen Bedingungen wird die Clt-induzierte Hemmung der Wundheilung aufgehoben (alle n = 5). \* p < 0,05

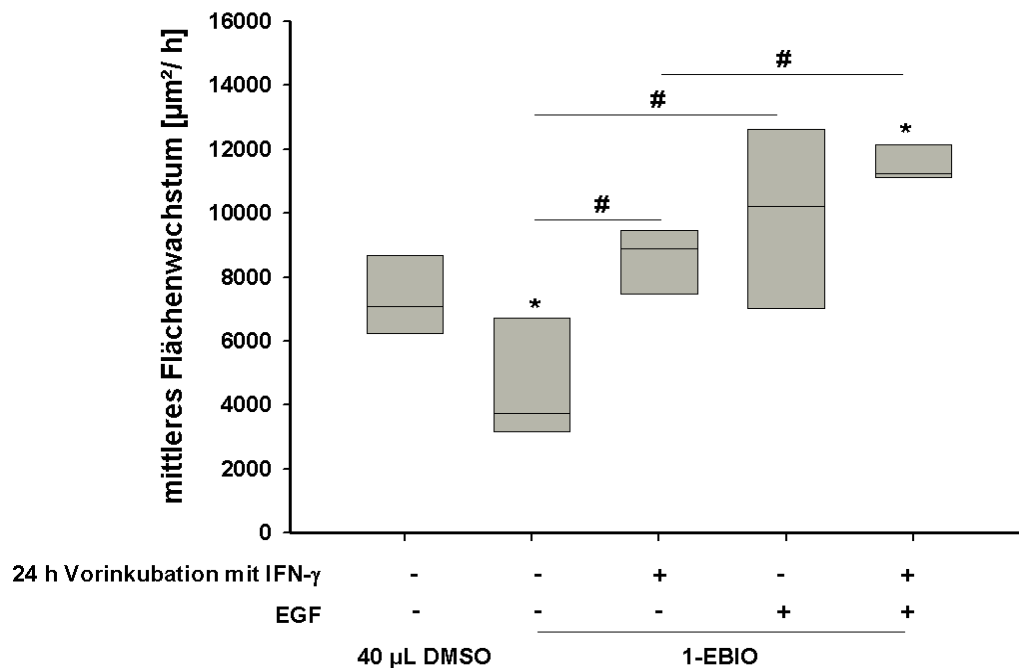
#### 4.1.5.3 1-EBIO

1-EBIO aktiviert den Kanal  $K_{Ca3.1}$  und Kanäle der Familie  $K_{Ca2}$ . Unter normalen wie unter entzündlichen Bedingungen bremst 1-EBIO die Wundheilung, EGF kann diesen Effekt jeweils signifikant reduzieren, aber nicht aufheben (Abb. 4.14).

Wie oben gezeigt beeinflussen auch 40  $\mu\text{L}$  des zur Lösung von 1-EBIO in Medium benötigten DMSO die Wundheilung. Wählt man 40  $\mu\text{L}$  DMSO als Kontrolle für die 1-EBIO-abhängigen Experimente, so zeigt sich demgegenüber durch 1-EBIO ebenfalls eine gebremste Wundheilung (p = 0,04). 24-stündige Vorinkubation mit IFN- $\gamma$  hebt diesen Effekt allerdings ebenso auf wie zusätzlich EGF. Die Kombination dieser beiden Einflussfaktoren sorgt gar für gegenüber 40  $\mu\text{L}$  DMSO gesteigerte Wundschlussraten (Abb. 4.15).



**Abb. 4.14: Auswirkungen von 1-EBIO auf die Restitution von IEC nach Verwundung**  
 Kontrollbedingungen ohne und mit vorherige Inkubation mit IFN-γ sowie Wundheilung für EGF mit und ohne vorherige Inkubation mit IFN-γ zum Vergleich mit dargestellt. 1-EBIO bremst die Wundheilung von IEC unter normalen Bedingungen. Sowohl entzündliche Bedingungen (je n = 5) als auch zusätzlich EGF unabhängig von der Vorinkubation steigern die Wundheilung demgegenüber signifikant (je n = 3); diese liegt dabei allerdings weiterhin signifikant unter dem Niveau der Kontrollen. \* p < 0,05



**Abb. 4.15: Auswirkungen von 1-EBIO auf die Restitution von IEC nach Verwundung in Relation zu 40 μL DMSO**  
 1-EBIO bremst die Wundheilung von IEC auch gegenüber 40 μL DMSO. Entzündliche Bedingungen (alle n = 5) oder Zugabe von EGF heben diesen Effekt auf. Zusätzlich EGF unter entzündlichen Bedingungen (je n = 3) führt zu 1-EBIO-abhängig gesteigerter Wundheilung. \* p < 0,05 vs. 40 μL DMSO; # p < 0,05

## **4.2 Untersuchung intestinaler Migration in Boyden Kammer-assays:**

Neben der Migration von Zellen trägt auch deren Proliferation zur Heilung nach Verwundung bei <sup>42)</sup>. Daher ist ein proliferativer Einfluss auf die oben gezeigten Ergebnisse der scratch-assays nicht auszuschließen. Um eine spezifische Aussage für die Migration von IEC treffen zu können und um die Ergebnisse der scratch-assays zu bestätigen, wurden daher Boyden Kammer-assays durchgeführt, in denen die Migration von IEC 18 in – durch eine Membran mit 8  $\mu\text{M}$ -Poren getrennte – Kompartimente mit Kaliumkanalmodulatoren untersucht wurde.

### **4.2.1 Führt $K_{\text{Ca}3.1}$ -Inhibition zu einer spezifischen Steigerung der Migration?**

Konfluente IEC 18 ohne vorherige Vorinkubation mit IFN- $\gamma$  wurden in definierter Konzentration in die wells einer Boyden-Kammer pipettiert und ihre Migration durch die Membran untersucht. In den unteren wells befanden sich IbTx (100 nM), Clt (10  $\mu\text{M}$ ), 1-EBIO (600  $\mu\text{M}$ ) bzw. Kontrollmedium. Nach sechsständiger Inkubation wurden die migrierten Zellen fixiert, gefärbt und gezählt.

Die  $K_{\text{Ca}3.1}$ -Hemmung durch Clt steigerte signifikant die Zahl der durch die Membran migrierten Zellen. Auch die Inhibition von  $K_{\text{Ca}1.1}$ -Kanälen durch Iberiotoxin führte zu einer tendenziellen Steigerung der Migration. Für die  $K_{\text{Ca}3.1}$ -Aktivierung mittels 1-EBIO zeigte sich kein Effekt (Abb. 4.16 und 4.18).

### **4.2.2 Welchen Effekt hat $K_{\text{Ca}3.1}$ -Inhibition auf die Migration unter entzündlichen Bedingungen?**

Derselbe Versuch wurde auch mit IEC18 durchgeführt, die zuvor 24 h mit FN- $\gamma$  inkubiert wurden, um so den spezifischen Einfluss von Kaliumkanal-Modulatoren auf die Migration unter entzündlichen Bedingungen zu untersuchen.

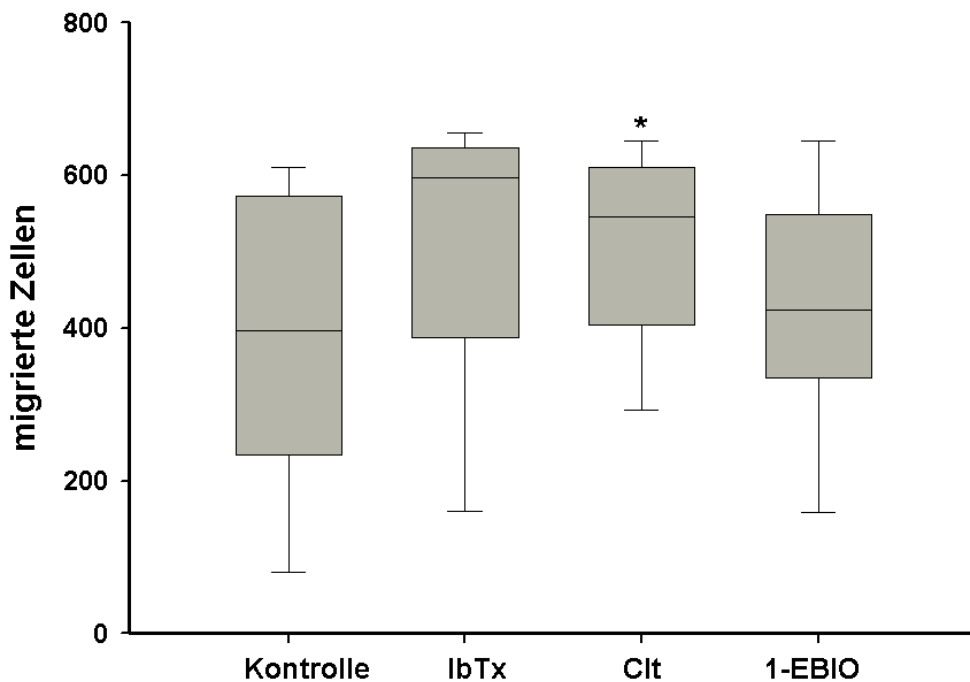
Die Migration von IEC 18 unter Kontrollbedingungen war nach IFN- $\gamma$ -Vorinkubation gegenüber Kontrollbedingungen ohne IFN- $\gamma$ -Vorinkubation etwas, aber nicht signifikant reduziert.

Die IbTx-abhängige Migration unterschied sich nicht von Kontrollbedingungen. Bei Zugabe



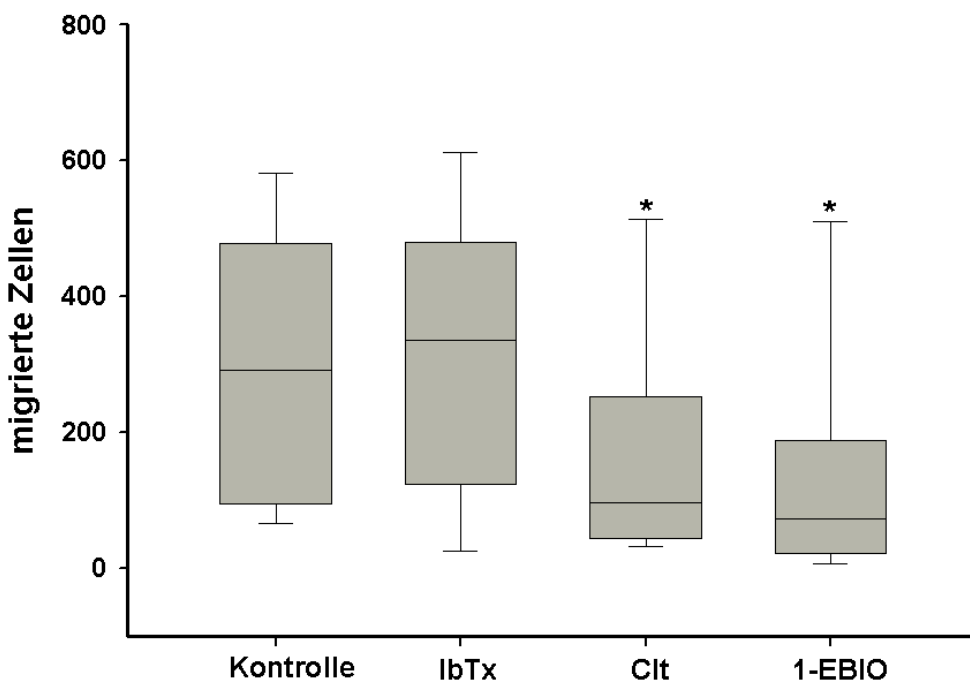
## Ergebnisse

von Clt lag die Zahl der migrierten Zellen nun signifikant unter den Werten für Kontrollbedingungen. Die Migration unter 1-EBIO war ebenfalls signifikant gegenüber Kontrolle erniedrigt (Abb. 4.17 und 4.18).



**Abb. 4.16: Migration von IEC 18 in Boyden-Kammern in Abhängigkeit von Kaliumkanalmodulatoren**

Clt (n = 16) steigert auch in Boyden Kammer-Assays die Migration von IEC 18 signifikant gegenüber Kontrolle (n = 14). Für IbTx (n = 12) zeigt sich ebenfalls ein Trend zu gesteigerter Migration (p = 0,06), während sich mit 1-EBIO (n = 16) keine Auswirkungen ergeben. \* p < 0,05 vs. Kontrolle

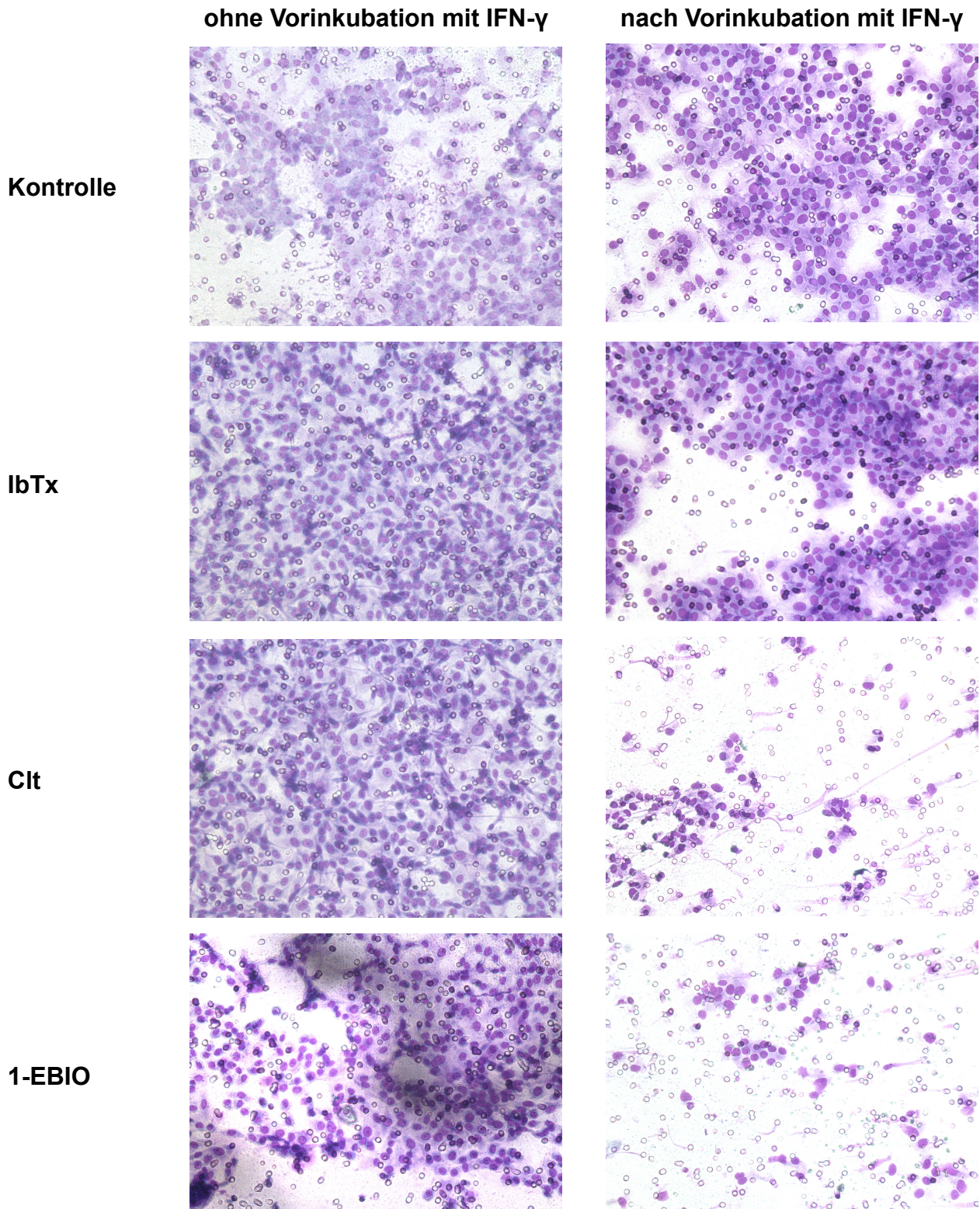


**Abb. 4.17: Migration von IEC 18 in Boyden-Kammern in Abhängigkeit von Kaliumkanalmodulatoren nach Vorinkubation mit IFN-γ**

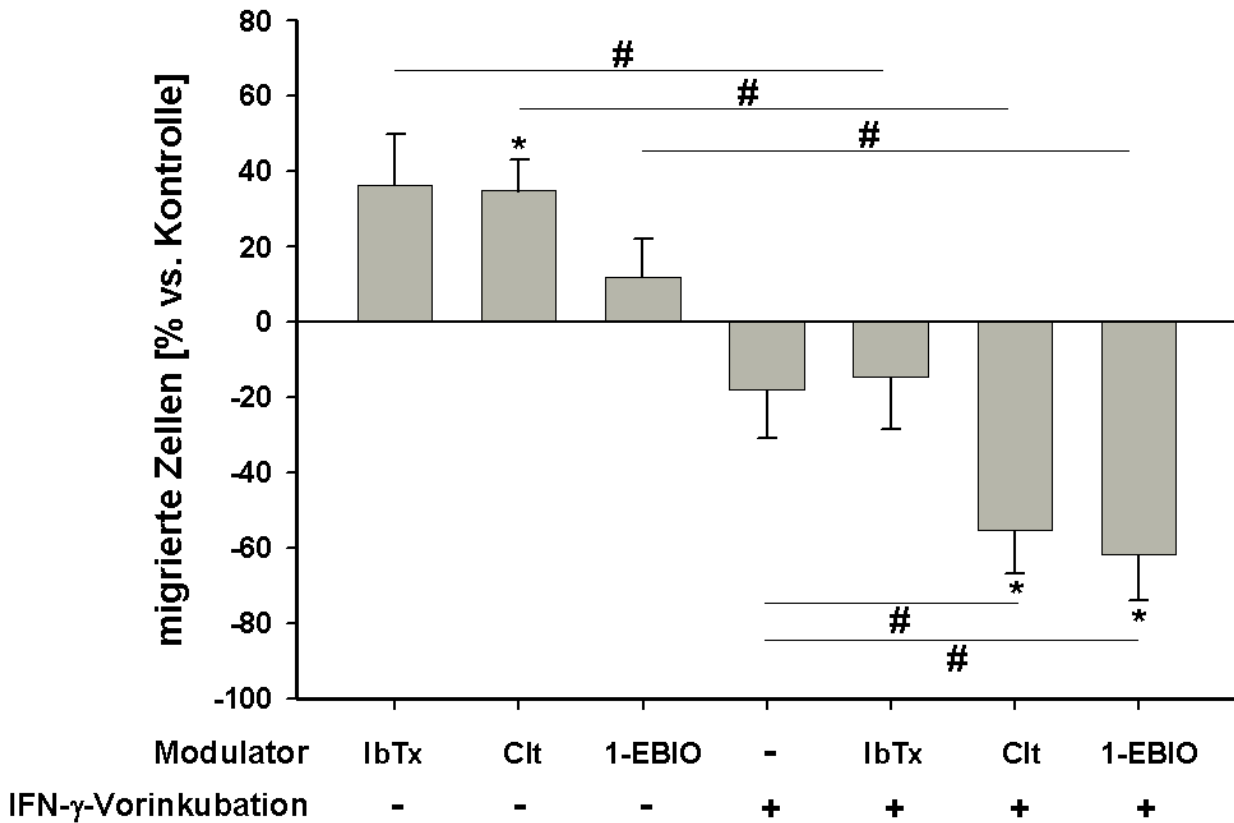
Clt (n = 16) und 1-EBIO (n = 14) senken die Zahl der migrierten Zellen signifikant gegenüber entzündlicher Kontrolle (n = 15). IbTx (n = 16) zeigt keinen Effekt. \* p < 0,05 vs. Kontrolle

## Ergebnisse

Im Vergleich entzündlicher und nicht entzündlicher Bedingungen zeigt sich damit für alle Kaliumkanalmodulatoren eine signifikante Erniedrigung der Migration nach 24-stündiger IFN- $\gamma$ -Inkubation gegenüber dem Einsatz des Kaliumkanalmodulators nach Vorinkubation ohne IFN- $\gamma$  (Abb. 4.19).



**Abb. 4.18: Repräsentative Bilder für die Ergebnisse der Boyden Kammer-Assays in Abhängigkeit von Modulatoren kalziumabhängiger Kaliumkanäle sowie mit und ohne Vorinkubation mit IFN- $\gamma$**



**Abb. 4.19: Migration von IEC 18 in Boyden-Kammern in Abhängigkeit von Kaliumkanalmodulatoren mit und ohne Vorinkubation mit IFN- $\gamma$**

Darstellung der prozentualen Veränderung der Migration gegenüber Kontrollbedingungen. Nach Vorinkubation mit IFN- $\gamma$  ist die Migration in Abhängigkeit von allen drei Kaliumkanalmodulatoren gegenüber Vorinkubation ohne IFN- $\gamma$  reduziert. \* p < 0,05 vs. Kontrolle; # p < 0,05

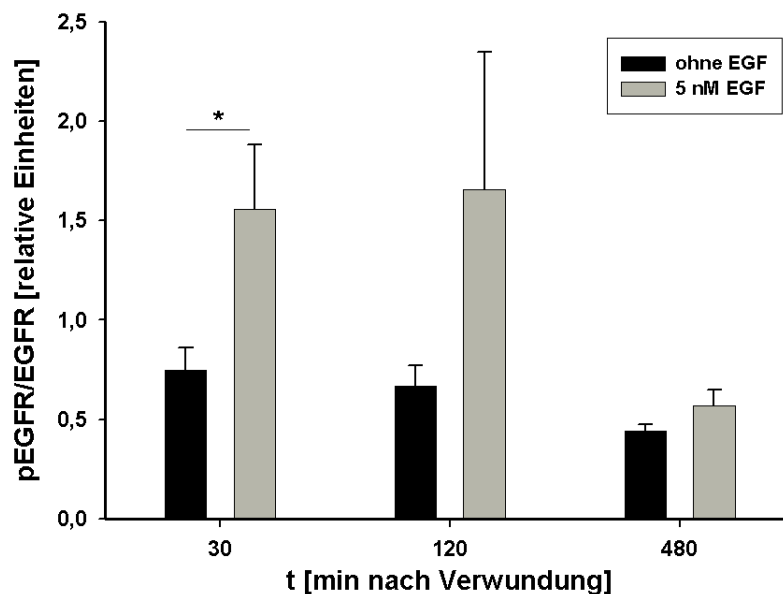
## 4.3 Western Blot

### 4.3.1 Untersuchung EGFr-abhängiger Signalwege

Um die sich aus den scratch assays ergebende Hypothese einer Beeinflussung von EGFr-abhängigen Signalwegen durch  $K_{Ca}3.1$ -Modulatoren zu testen, wurden die von EGFr ausgehenden Signalwege über PI3K und ERK im Western Blot untersucht.

Dazu wurden bis zu Konfluenz in Zellkulturschalen kultivierte IEC 18 nach 24-stündiger Vorinkubation in serumreduziertem Medium mit oder ohne 100 ng/ml IFN- $\gamma$  verwundet und die Wundheilung unter Kontrollbedingungen sowie nach Zugabe von 10  $\mu$ M Clt bzw. 600  $\mu$ M 1-EBIO jeweils mit und ohne 5 nM EGF nach 30, 120 und 480 min unterbrochen und Lysate der Zellen erstellt, die im Western Blot auf die Expression von Akt, pAkt, ERK und pERK untersucht wurden. Als entscheidende Größe wurde nach Densitometrie und Normierung auf die mit  $\beta$ -Actin durchgeführte Ladungskontrolle der Phosphorylierungsstatus pAkt/Akt bzw. pERK/ERK berechnet, der jeweilige Wert für unverwundete Zellen nach Vorinkubation wurde willkürlich gleich „1“ gesetzt und die übrigen Ergebnisse dazu in Relation gesetzt.

Mit Antikörpern gegen EGFr und pEGFr (Tyr 1173) wurde die Phosphorylierung von EGFr nach Verwundung und EGF-Zugabe bestimmt. Sie war 30 min nach Verwundung signifikant um 108,5 %  $\pm$  43,1% gesteigert, nach 120 min lag nur noch eine Tendenz zu einer Steigerung ( $p = 0,09$ ) vor und nach acht Stunden lag sie wieder auf Kontrollniveau (Abb. 4.20).



**Abb. 4.20: EGFr-Phosphorylierung an Tyr 1173**

Phosphorylierung von EGFr nach Verwundung wurde unter Kontrollbedingungen sowie nach Zugabe von EGF bestimmt. Mit EGF war die Phosphorylierung nach 30 min signifikant, nach 120min deutlich, aber nicht signifikant gesteigert. Nach acht Stunden bestand kein Unterschied mehr. \*  $p < 0,05$ ;  $n = 2-5$

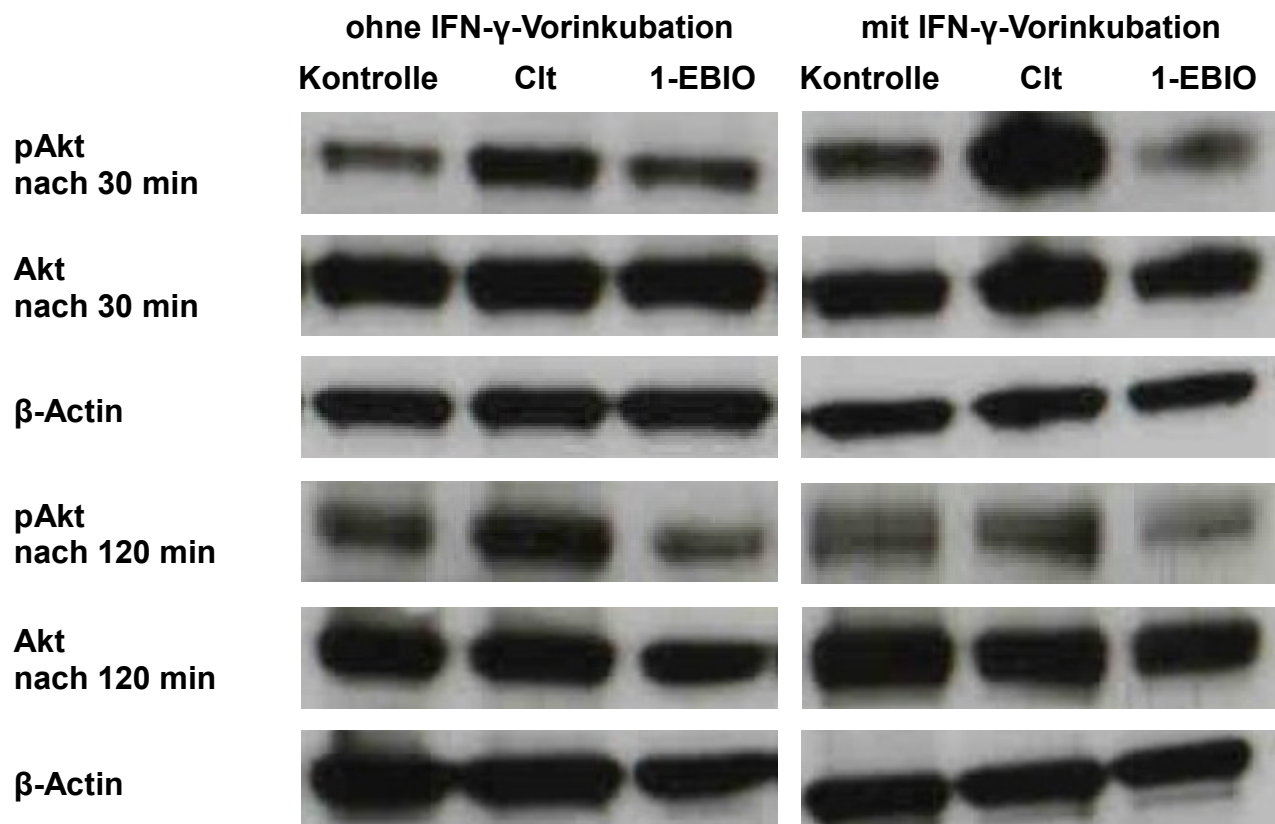
### 4.3.1.1 PI3K-Signalweg

Der PI3K-Signalweg ist einer der zentralen Signalwege, die von Rezeptortyrosinkinasen wie dem EGFr aktiviert werden. Die Kinase Akt nimmt in ihm eine zentrale Stellung ein.

30 min nach Verwundung war die Akt-Phosphorylierung unter nicht entzündlichen Bedingungen Clt-abhängig signifikant um 55,5 % +/- 12,8 % gesteigert und lag damit auch signifikant über den 1-EBIO-vermittelten Werten. Mit IFN- $\gamma$  vorinkubierte Zellen zeigten unabhängig vom eingesetzten Kaliumkanalmodulator deutlich erhöhte Spiegel der Akt-Phosphorylierung, je nach Modulator im Bereich von +116,4 % +/- 57,4 % bis +237,9 % +/- 92,9 % (jeweils  $p < 0,05$ ). Erwartungsgemäß war die zusätzliche Zugabe von EGF – außer Clt-abhängig nach IFN- $\gamma$ -Vorinkubation – in der Lage, die Phosphorylierung der Kinase signifikant zu erhöhen. Diese Zunahme betrug je nach Konstellation zwischen 126,0 % +/- 48,5 % und 416,4 % +/- 111,0 %.

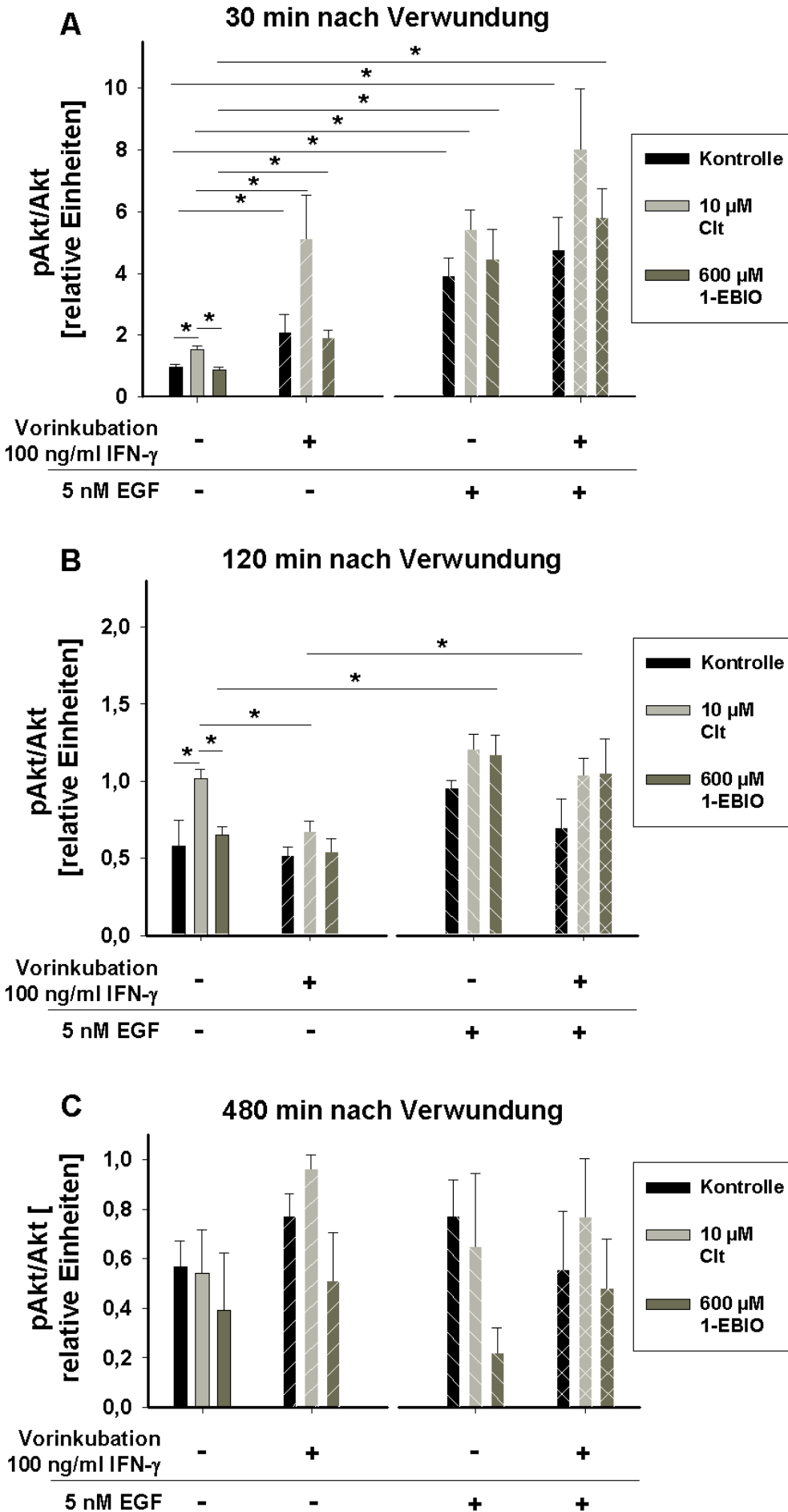
2 h nach Verwundung sorgte Clt weiterhin für eine signifikant gesteigerte Phosphorylierungsrate (+74,3 % +/- 10,4 %) sowohl gegenüber Kontrolle als auch gegenüber 1-EBIO. Dieser Wert war nun jedoch auch gegenüber der Clt-vermittelten Phosphorylierung von Akt nach 24 h Vorinkubation mit IFN- $\gamma$  um 50,4 % +/- 9,0 % signifikant erhöht.

Nach acht Stunden ergaben sich keine signifikanten Unterschiede mehr (Abb. 4.22).



**Abb. 4.21: Repräsentative Western Blots mit den Antikörper pAkt, Akt und  $\beta$ -Actin**

Die Akt-Phosphorylierung ist Clt-abhängig unter nicht entzündlichen Bedingungen sowohl 30 als auch 120 min nach Verwundung gesteigert, während sie unter entzündlichen Bedingungen nach 120 min wieder Kontrollniveau erreicht hat.



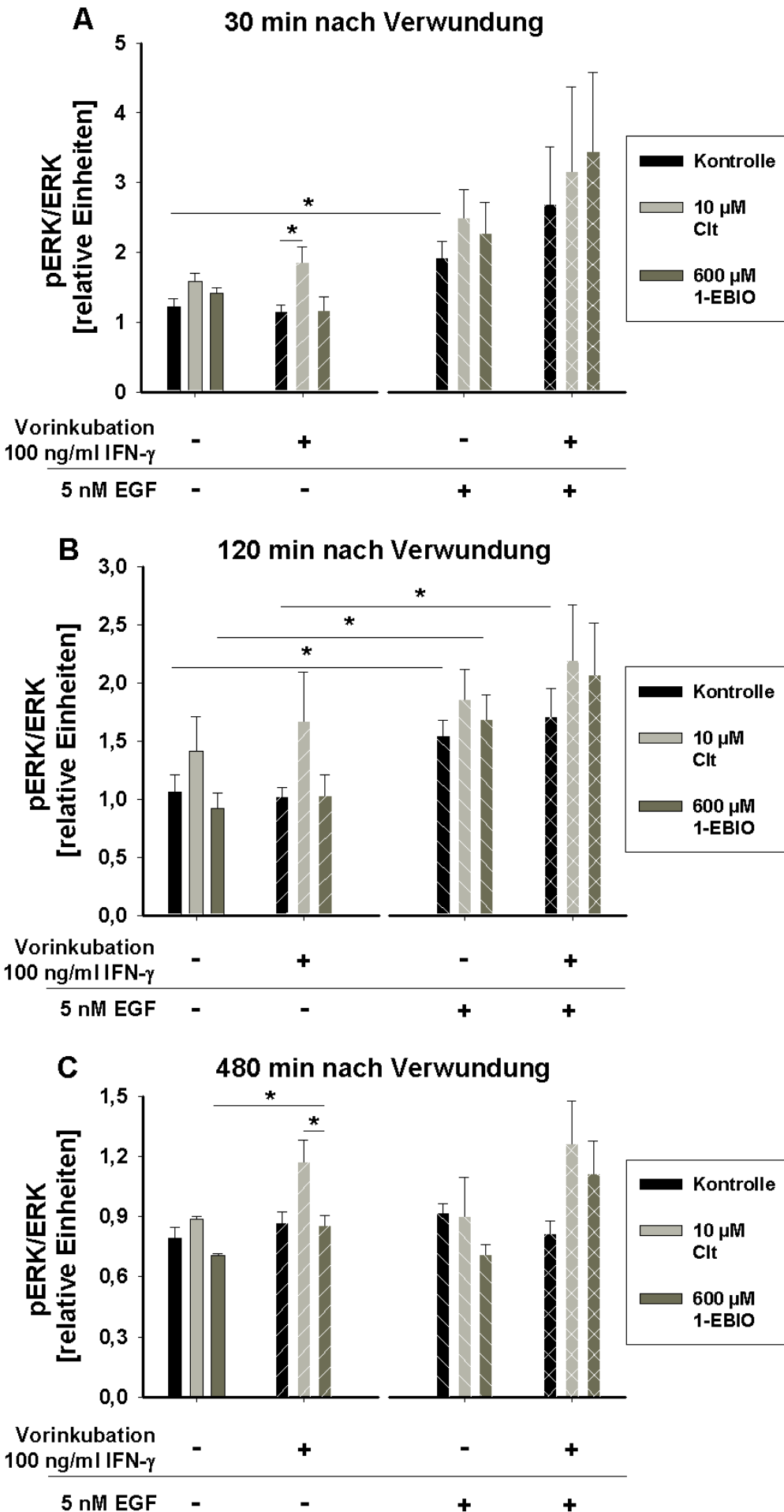
**Abb. 4.22: Phosphorylierung von Akt im Verlauf von acht Stunden nach Verwundung von IEC 18 in Abhängigkeit von  $K_{Ca}3.1$ -Modulatoren, Vorinkubation mit IFN- $\gamma$  und 5 nM EGF**

Darstellung des aus densitometrischen Analysen berechneten Verhältnisses pAkt/Akt als Maß für die Aktivierung des PI3K-Signalwegs. In jeder Balkengruppe sind die Werte für Kontrolle, 10  $\mu$ M Clt und 600  $\mu$ M 1-EBIO dargestellt (farblich codiert), wobei sich die einzelnen Gruppen durch die Konstellation von Vorinkubation mit 100 ng/ml IFN- $\gamma$  und Zugabe von 5 nM EGF unterscheiden (zusätzlich durch Maserung codiert). \*  $p < 0,05$ ;  $n = 3-7$

(A) Nach 30 min steigert Clt die Akt-Phosphorylierung unter nicht entzündlichen Bedingungen gegenüber Kontrolle und 1-EBIO. Die Werte nach IFN- $\gamma$ -Inkubation sind unter allen drei Bedingungen erhöht. Außer Clt-abhängig nach Vorinkubation mit IFN- $\gamma$  trifft dies auch auf die Zugabe von EGF zu.

(B) Zum Zeitpunkt 120 min führt Clt unter nicht entzündlichen Bedingungen weiterhin zu einer Steigerung der Akt-Phosphorylierung gegenüber Kontrolle und 1-EBIO sowie nun auch gegenüber Clt nach IFN- $\gamma$ -Vorinkubation. Eine Steigerung durch EGF-Zugabe nach Verwundung lässt sich nur noch in zwei Konstellationen (1-EBIO-abhängig ohne sowie Clt-abhängig mit Vorinkubation) nachweisen.

(C) Acht Stunden nach Verwundung finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Konstellationen mehr.



**Abb. 4.23: Phosphorylierung von ERK im Verlauf von acht Stunden nach Verwundung von IEC 18 in Abhängigkeit von  $K_{Ca}3.1$ -Modulatoren, Vorinkubation mit IFN- $\gamma$  und 5 nM EGF**

Darstellung des aus densitometrischen Analysen berechneten Verhältnisses pERK/ERK als Maß für die Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs. In jeder Balkengruppe sind die Werte für Kontrolle, 10  $\mu$ M Clt und 600  $\mu$ M 1-EBIO dargestellt (farblich codiert), wobei sich die einzelnen Gruppen durch die Konstellation von Vorinkubation mit 100 ng/ml IFN- $\gamma$  und Zugabe von 5 nM EGF unterscheiden (zusätzlich durch Maserung codiert). \*  $p < 0,05$ ;  $n = 3-4$

(A) Nach 30 min zeigt sich unter Kontrollbedingungen ohne IFN- $\gamma$ -Vorinkubation eine signifikant gesteigerte ERK-Phosphorylierung durch EGF. Nach IFN- $\gamma$ -Vorinkubation ist der Phosphorylierungsstatus von ERK Clt-abhängig erhöht.

(B) 120 min nach Verwundung sind drei EGF-abhängige Phosphorylierungsspiegel gegenüber dem jeweiligen Vergleichswert signifikant, die übrigen im Trend erhöht.

(C) Acht Stunden nach Verwundung führt 1-EBIO nach 24-stündiger Vorinkubation mit IFN- $\gamma$  zu erniedrigten Werten gegenüber Clt bzw. 1-EBIO ohne IFN- $\gamma$ -Vorinkubation.

#### **4.3.1.2 MAPK/ERK-Signalweg**

Der MAPK/ERK-Signalweg ist ein zweiter entscheidender Signalweg, der von Rezeptortyrosinkinasen wie dem EGFr aktiviert wird.

Nach einer halben Stunde findet sich EGF-abhängig nur in einer Konstellation, nämlich ohne Modulatoren und ohne Vorinkubation mit IFN- $\gamma$ , eine signifikant gesteigerte ERK-Phosphorylierung. In vier der übrigen fünf Konstellationen ist ein Trend zu gesteigerter Phosphorylierung vorhanden (p-Werte zwischen 0,07 und 0,11). Nach IFN- $\gamma$ -Vorinkubation ist der Phosphorylierungsstatus von ERK CIt-abhängig erhöht.

120 min nach Verwundung lässt sich in drei Konstellation ein steigernder Effekt von EGF auf die ERK-Phosphorylierung signifikant nachweisen.

Nach acht Stunden liegen auch die Werte für die ERK-Phosphorylierung weitgehend auf demselben Niveau, nur der 1-EBIO-abhängige Wert nach Vorinkubation mit IFN- $\gamma$  liegt signifikant unter dem CIt-abhängigen sowie unter dem 1-EBIO-abhängigen ohne Vorinkubation mit IFN- $\gamma$  (Abb. 4.23)

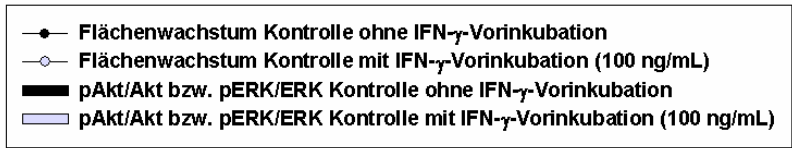
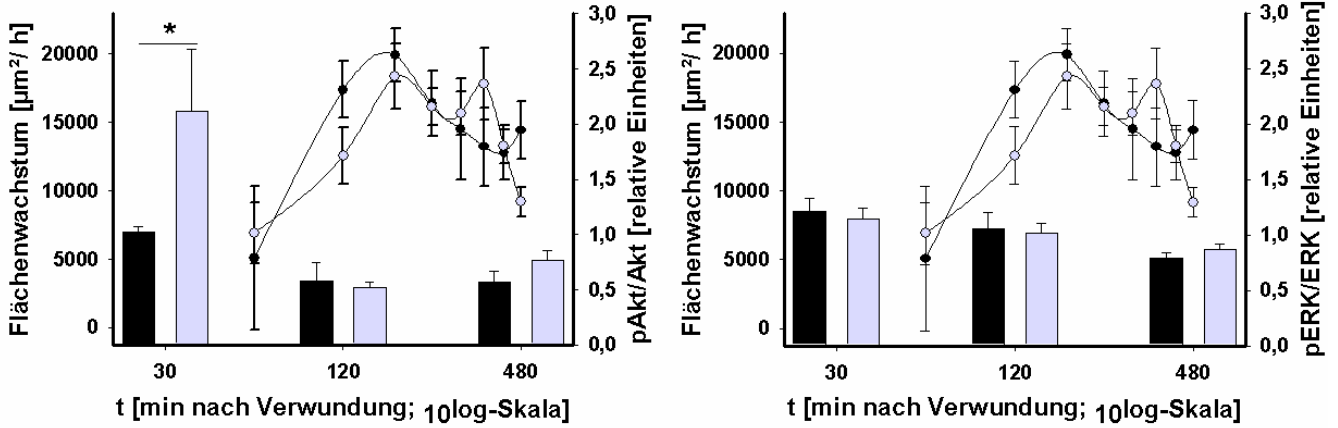
#### **4.3.2 Beeinflussung des PI3K- bzw. MAPK/ERK-Signalwegs im Verlauf und Korrelation mit den scratch-assays**

In den scratch-assays hatte sich gezeigt, dass die Unterschiede in der Restitution insbesondere auf die zweite bis vierte Stunde nach Verwundung zurückzuführen sind. Daher ist zu vermuten, dass damit eine veränderte Regulation von Signalwegen vor allem in diesem Zeitraum einhergehen könnte. Aufgrund der oben gezeigten Daten scheint der PI3K-Signalweg, nicht aber im MAPK/ERK-Signalweg geeignet, um die in den scratch-assays gezeigten Effekten von  $K_{Ca}3.1$ -Modulatoren auf die intestinale Restitution teilweise zu erklären.

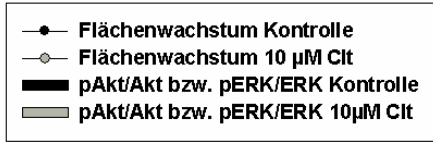
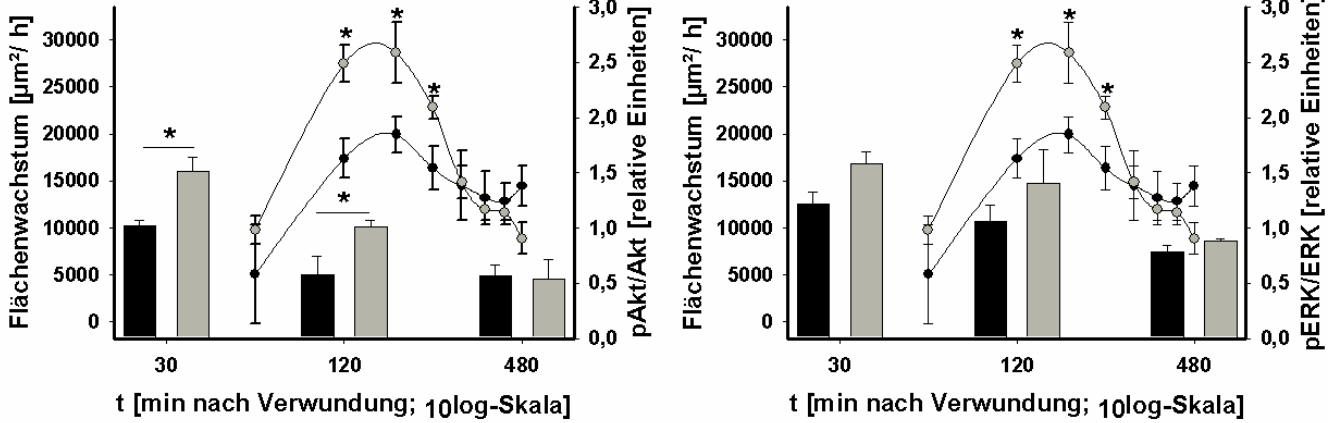
Dies soll im Folgenden demonstriert werden, indem Kontrollbedingungen, die CIt-abhängigen Konstellationen sowie 1-EBIO unter nicht entzündlichen Bedingungen einander paarweise zum Vergleich gegenüber gestellt werden (Abb. 4.24 A-F). Hierzu wurde in den folgenden Diagrammen für die zu vergleichenden Konstellationen jeweils der Verlauf der im WB gemessenen Phosphorylierung von Akt (links) bzw. ERK (rechts) mit dem Wachstumsverlauf der korrespondierenden scratch-assays dargestellt.



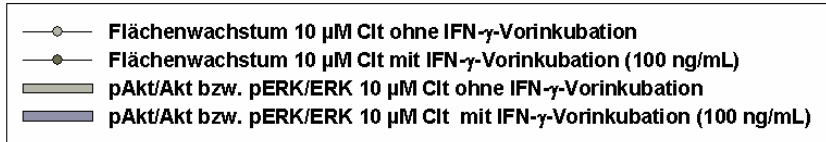
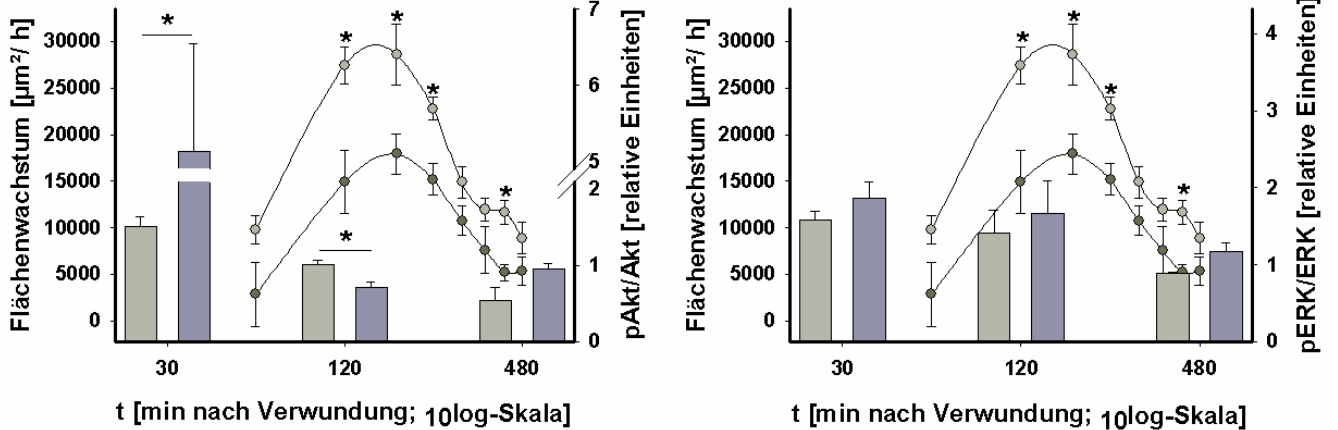
**A Kontrolle ohne vs. Kontrolle mit IFN- $\gamma$ -Vorinkubation**

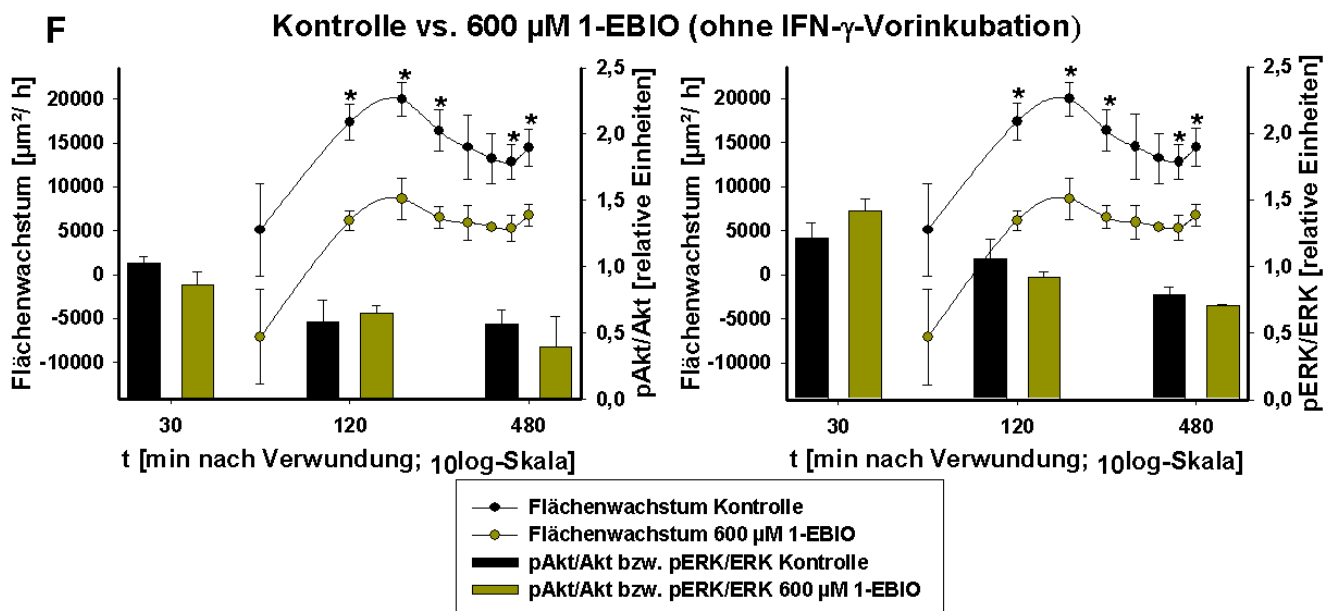
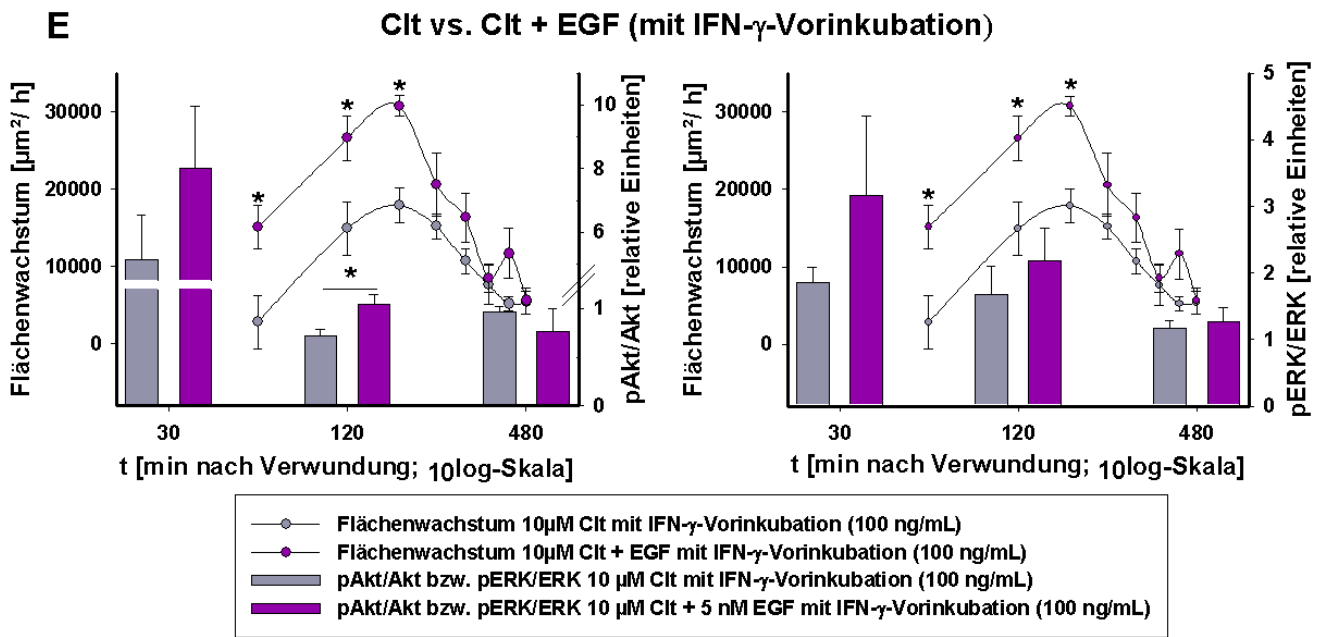
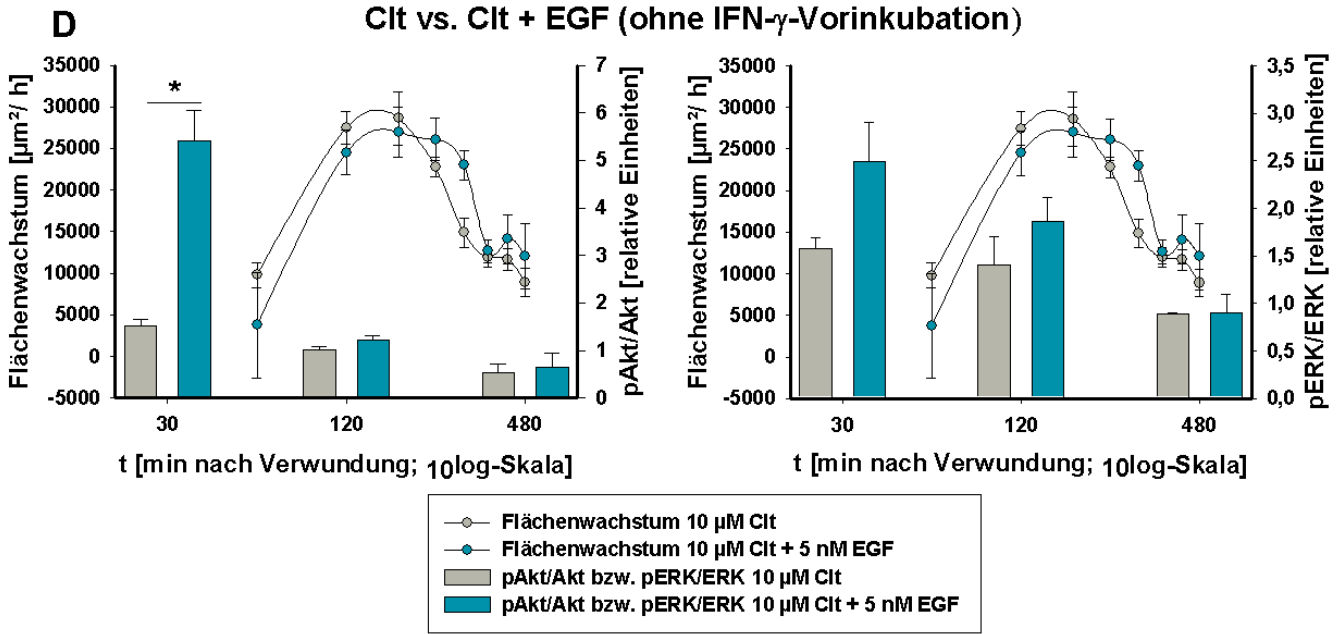


**B Kontrolle vs. 10  $\mu\text{M}$  Clt (ohne IFN- $\gamma$ -Vorinkubation)**



**C 10  $\mu\text{M}$  Clt ohne vs. 10  $\mu\text{M}$  Clt mit IFN- $\gamma$ -Vorinkubation**





#### **Abb. 4.24: K<sub>Ca</sub>3.1-Modulator-abhängige Phosphorylierung von Akt und ERK sowie Flächenwachstum im Verlauf**

Darstellung des aktuellen Flächenwachstums (Linien) und korrelierende Phosphorylierung (Balken) von Akt (linke Seite) und ERK (rechte Seite) im Verlauf von 8 Stunden nach Verwundung (logarithmische Skala); \*  $p < 0,05$ ;  $n = 3-5$  für Migrationsexperimente,  $n = 3-7$  für WB

**(A)** Die Vorinkubation mit 100 ng/ml IFN- $\gamma$  hat wie bereits gezeigt keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Wundschlusses. Die ERK-Phosphorylierung wird nicht beeinflusst. Die Akt-Phosphorylierung ist nach IFN- $\gamma$ -Vorinkubation zunächst deutlich erhöht, nach zwei Stunden wieder auf demselben Niveau. **(B)** Mit der Steigerung der Wundheilung durch Clt geht eine signifikante Steigerung der Phosphorylierung von Akt, nicht aber von ERK 30 und 120 min nach Verwundung einher. **(C)** Gegenüber Clt unter nicht entzündlichen Bedingungen bewirkt Clt unter entzündlichen Bedingungen nach 30 min mehr als verdreifachte Werte für die Akt-Phosphorylierung. Im Gegensatz dazu liegen nach 120 min unter entzündlichen Bedingungen jedoch signifikant niedrigere Werte vor, was mit zwischen der zweiten und vierten Stunde signifikant niedrigeren Wundheilungsraten korreliert. Die ERK-Phosphorylierung liegt zu allen Zeitpunkten auf ähnlichem Niveau. **(D)** Die Clt-abhängigen Wachstumsprofile sind mit und ohne EGF identisch. Die Zugabe von EGF sorgt für eine nach 30 min, nicht aber während der stärksten Wachstumsphase erhöhte Akt-Phosphorylierung. ERK wird nicht beeinflusst. **(E)** Nach Vorinkubation mit IFN- $\gamma$  wird die Clt-vermittelt gebremste Wundheilung durch zusätzlich EGF v.a. durch eine gesteigerte Wundheilung in der ersten bis dritten Stunde wieder auf gesteigerte Restitutionsraten angehoben. Dies geht mit EGF-abhängig nach 120, tendenziell auch nach 30 min erhöhten Akt-Phosphorylierungsspiegeln einher. ERK zeigt keine signifikanten Veränderungen. **(F)** Die Zugabe von 1-EBIO führt im Vergleich zu Kontrollbedingungen zu in beiden Signalwegen vergleichbaren Phosphorylierungswerten und einer reduzierten Migration über den gesamten Verlauf.

Die Phosphorylierung von ERK wurde weder durch die Vorinkubation mit 100 ng/ml IFN- $\gamma$ , noch durch die Zugabe von 10  $\mu$ M Clt, deren Kombination oder 600  $\mu$ M 1-EBIO zu einem der untersuchten Zeitpunkte signifikant gegenüber der Kontrolle verändert. Auch die zusätzliche Zugabe von EGF zeigte in den dargestellten Konstellationen keine Auswirkungen auf diese Kinase (Abb. 4.24 A-F).

24-stündige Vorinkubation mit IFN- $\gamma$  sorgte gegenüber nicht entzündlichen Bedingungen für eine signifikant gesteigerte Akt-Phosphorylierung nach 30 Minuten (+116,4 % +/- 57,4 %) bei danach wieder gleichen Werten. Auch die Wundheilungsraten entsprachen sich weitgehend (Abb. 4.24 A).

Die Zugabe von Clt unter nicht entzündlichen Bedingungen führte gegenüber der Kontrolle sowohl nach 30 (+55,5 % +/- 12,8 %) als auch nach 120 min (+74,3 % +/- 10,4 %) zu erhöhten Phosphorylierungsspiegeln von Akt. Die Migration war in der zweiten bis vierten Stunde signifikant um 46,9 % +/- 13,6 % gesteigert (Abb. 4.24 B).

Im Vergleich von Clt unter nicht entzündlichen und entzündlichen Bedingungen (Abb. 4.24 C) zeigte sich 30 min nach Verwundung eine signifikant um 237,9 % +/- 92,9 % gesteigerte Akt-Phosphorylierung. Nach 120 min war die Phosphorylierung der Kinase jedoch unter entzündlichen Bedingungen (-33,5 % +/- 6,7 %) signifikant erniedrigt – ebenso wie die Restitution in der zweiten bis vierten Stunde nach Verwundung (-39,1 % +/- 9,2 %).

Die zusätzliche Zugabe von EGF zu Clt führte gegenüber Clt allein unter nicht entzündlichen Bedingungen (Abb. 4.24 D) 30 min nach Verwundung zu signifikant

## Ergebnisse

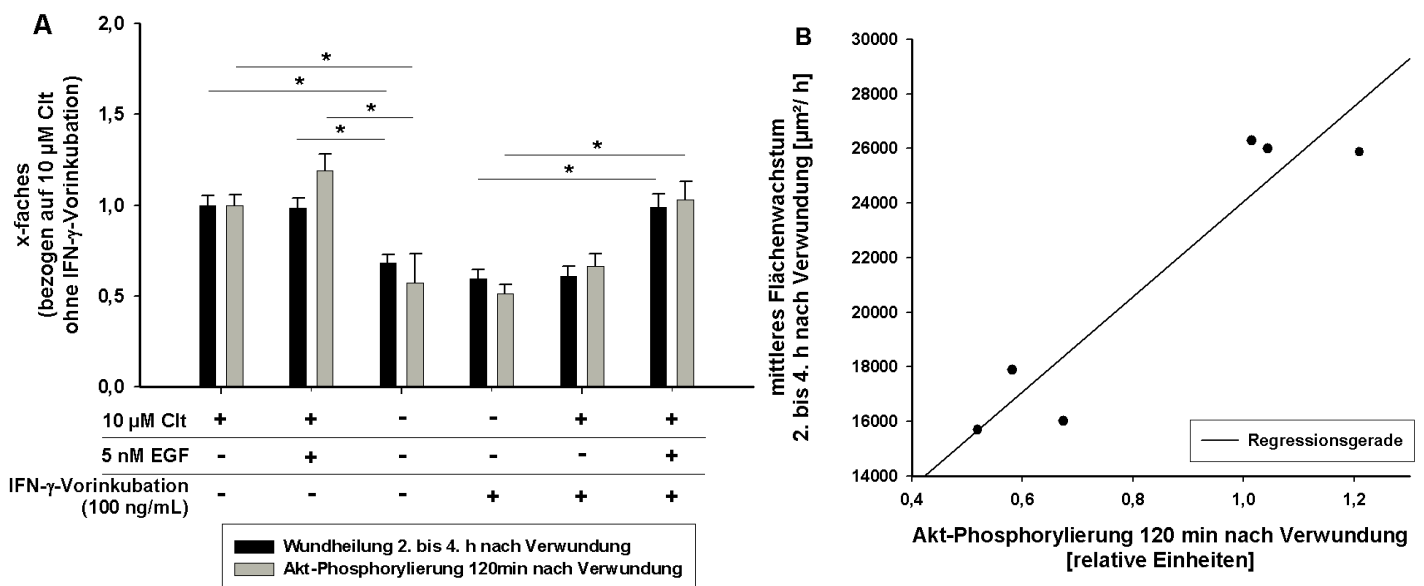
gesteigerten Phosphorylierungsraten von Akt (+256,1 % +/- 41,7 %). Nach 120 min war die EGF-abhängige Akt-Phosphorylierung jedoch nicht mehr erhöht, auch die Migrationsraten in diesem Zeitraum entsprachen sich.

Eine andere Situation bot sich unter entzündlichen Bedingungen: Zusätzlich EGF bewirkte gegenüber Clt allein (Abb. 4.24 E) sowohl eine vermehrte Phosphorylierung von Akt nach zwei Stunden (+54,7 % +/- 15,4 %) als auch signifikant gesteigerte Restitutionsraten in der ersten bis dritten Stunde (+103,4 % +/- 18,5 %). Die Dimensionen der jeweiligen Werte entsprachen dabei in etwa denen, wie sie unter nicht entzündlichen Bedingungen mit Clt alleine oder mit EGF gefunden wurden.

1-EBIO verursachte gegenüber Kontrolle (Abb. 4.24 F) zwar über den gesamten Beobachtungszeitraum erniedrigte Migrationsraten, jedoch zu keinem Zeitpunkt eine veränderte Akt-Phosphorylierung.

Anhand dieser Daten ist eine Korrelation der mittleren Clt-abhängigen Wundheilung in der zweiten bis vierten Stunde nach Verwundung – der Phase der stärksten Migration – mit der Akt-Phosphorylierung 120 min nach Verwundung zu erkennen.

Dieser Zusammenhang wurde statistisch weiter untersucht (Abb 4.25) und ergab für die Clt-abhängigen Werte und Kontrollen eine signifikante Korrelation der beiden Parameter mit einem Pearson-Koeffizienten von 0,936 ( $p = 0,003$ ).



**Abb. 4.25: Korrelation der Clt-abhängigen Wundheilung mit der Akt-Phosphorylierung**

(A) Die mittlere Clt-abhängige Wundheilung in der 2. bis 4. h nach Verwundung bzw. die Clt-abhängige Akt-Phosphorylierung nach 120 min wurden willkürlich gleich „1“ gesetzt und die übrigen Clt-abhängigen Werte sowie Kontrollen darauf bezogen. (B) Es zeigte sich eine signifikante und sehr starke Korrelation zwischen der Wundheilung und der Akt-Phosphorylierung mit einem Pearson-Koeffizienten von 0,936 ( $p = 0,003$ ). Für die vier Clt-abhängigen Wertepaare allein lag der Pearson-Koeffizient bei 0,949 ( $p = 0,026$ ; nicht dargestellt). \*  $p < 0,05$

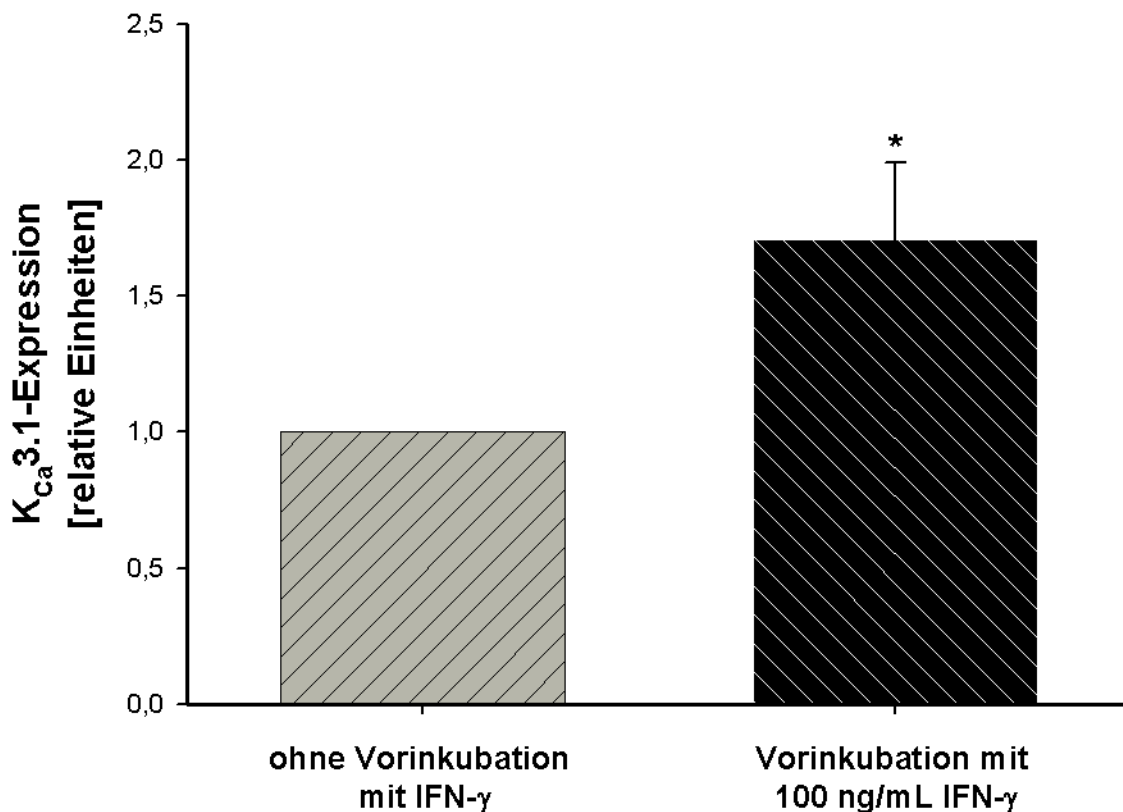
## Ergebnisse

Um auch für die Western-Blot-Experimente eine Beeinflussung durch das als Lösungsmittel für Clt und 1-EBIO verwendete DMSO auszuschließen, wurde die Akt-Phosphorylierung nach Verwundung in Abhängigkeit von 0,25 % v/v sowie 1 % v/v DMSO in starving medium zum Zeitpunkt 120 min untersucht. Beide Konstellationen zeigten keine Auswirkung auf die Akt-Phosphorylierung (-4,6 % +/- 11,6 %,  $p = 0,88$  bzw. +17,6 % +/- 10,1 %,  $p = 0,57$ ).

### 4.3.3 Welchen Einfluss hat die Inkubation mit IFN- $\gamma$ auf die Expression von $K_{Ca}3.1$ ?

IEC 18, die für 24 Stunden mit serumreduziertem Medium mit bzw. ohne 100 ng/ml IFN- $\gamma$  inkubiert worden waren, wurden wie oben beschrieben lysiert und im Western Blot auf den kalziumabhängigen Kaliumkanals  $K_{Ca}3.1$  untersucht, um damit dessen Expression zu Beginn der Verwundung zu bestimmen.

Die  $K_{Ca}3.1$ -Expression nach Vorinkubation ohne IFN- $\gamma$  wurde jeweils willkürlich gleich eins gesetzt. Demgegenüber war die  $K_{Ca}3.1$ -Expression nach Vorinkubation mit IFN- $\gamma$  um 70,6 % (+/- 16,8 %) gesteigert (Abb. 4.26).

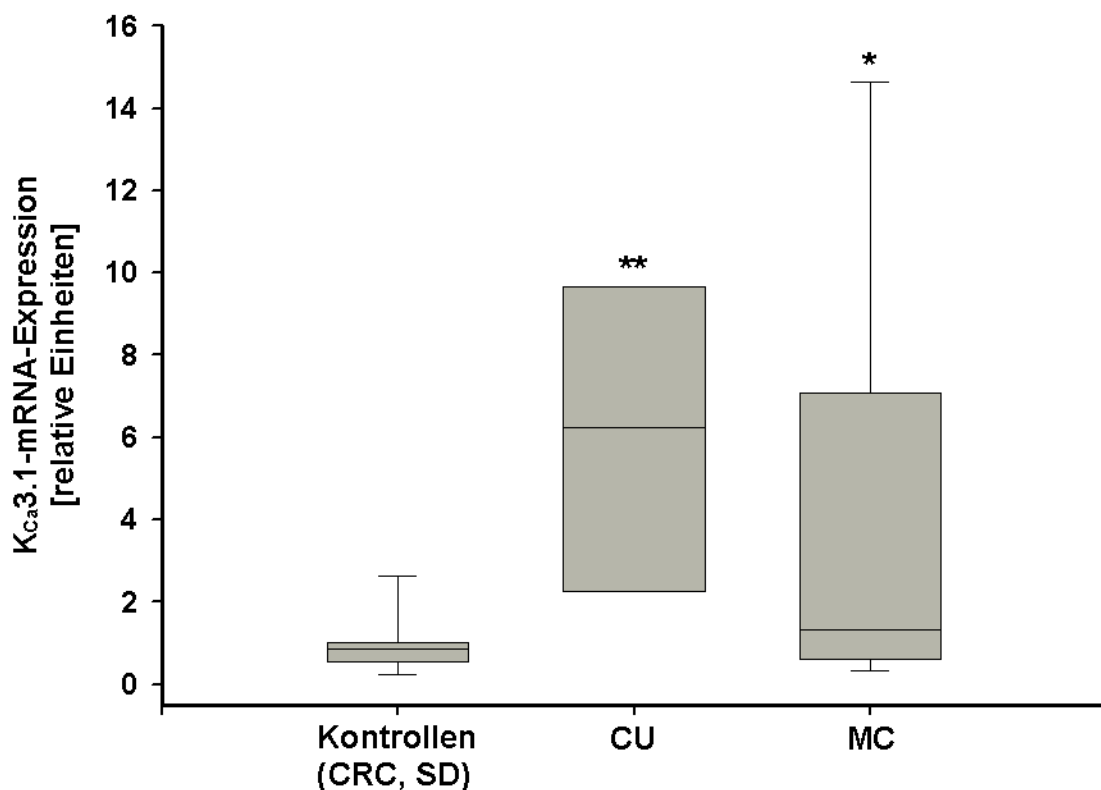


**Abb. 4.26:  $K_{Ca}3.1$ -Ex-pression von IEC 18 nach Vorinkubation mit und ohne IFN- $\gamma$**   
Vorinkubation mit 100 ng/mL IFN- $\gamma$  führt zu einer signifikant gesteigerten Expression von  $K_{Ca}3.1$ .  $n = 12$ ; \*  $p < 0,05$

#### 4.4 Ist die $K_{Ca}3.1$ -Expression bei Patienten mit CED verändert?

Mit der Fragestellung einer möglichen Bedeutung des Kaliumkanals  $K_{Ca}3.1$  im Rahmen von CED bei Patienten wurden IEC von Patienten aus chirurgischen Resektaten und endoskopischen Biopsien isoliert und mittels real-time PCR auf die mRNA-Expression von  $K_{Ca}3.1$  und  $K_v7.1$  untersucht.

Dabei zeigte sich sowohl für Proben von Patienten mit CU (+531,5 % +/- 137,2 %) als auch für Proben von Patienten mit MC (+316,2 % +/- 110,9 %) eine gegenüber Kontrollpatienten mit Colorectalem Carcinom (CRC) und Sigmadivertikulitis (SD) signifikant erhöhte Expression der  $K_{Ca}3.1$ -mRNA (Abb. 4.27).



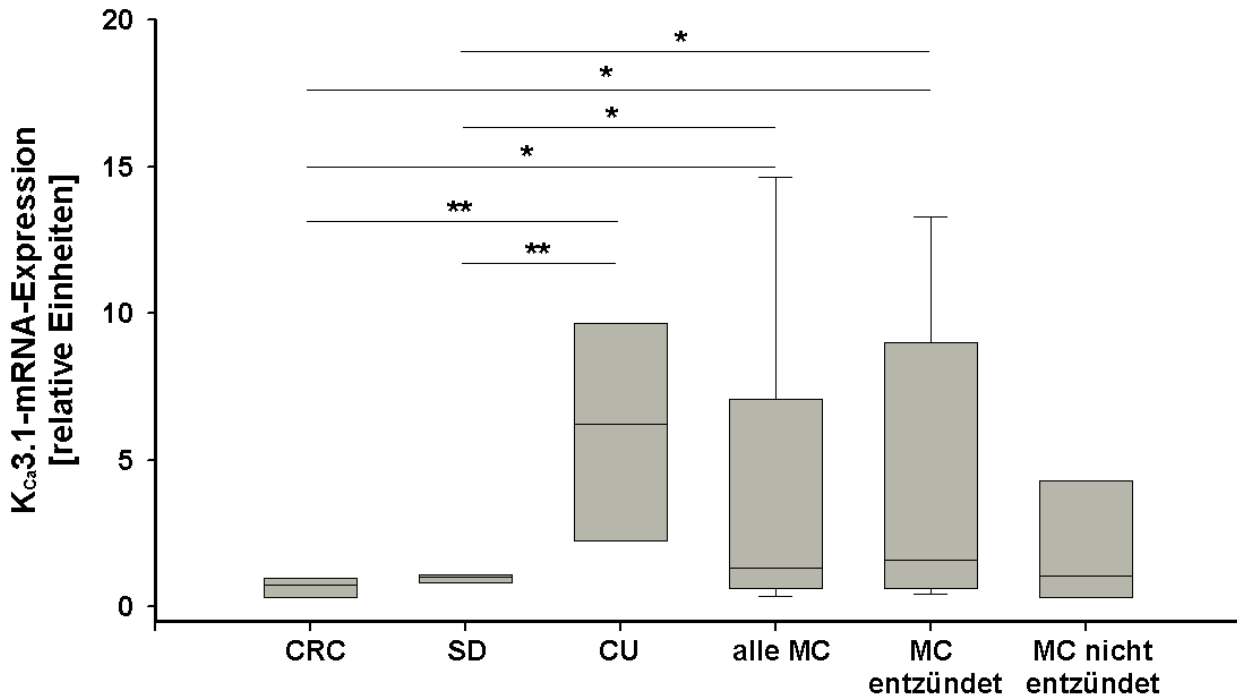
**Abb. 4.27:  $K_{Ca}3.1$ -mRNA-Expression bei IEC aus chirurgischen Resektaten und endoskopischen Biopsien**

Darstellung in relativen Einheiten, Mittelwert der Kontrollen (n = 10; CRC und SD) willkürlich gleich 1 gesetzt. Demgegenüber signifikant gesteigerte Expression der  $K_{Ca}3.1$ -mRNA bei CU (n = 8) und bei MC (n = 21). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01

Wurde bei den Kontrollen nach CRC und SD getrennt ausgewertet, so zeigte sich die gesteigerte mRNA-Expression von  $K_{Ca}3.1$  in IEC bei CU-Patienten gegenüber beiden Gruppen (+ 539,0 % +/- 138,9 % gegenüber CRC, + 514,7 % +/- 133,6 % gegenüber SD, jeweils p < 0,01).

## Ergebnisse

Bei den IEC von Patienten mit MC wurde zudem weiter danach unterschieden, ob die IEC aus makroskopisch entzündeten oder nicht entzündeten Arealen stammten. Für die Zellen aus makroskopisch entzündeten Arealen war die gesteigerte Expression ebenfalls gegenüber beiden Untergruppen der Kontrollen signifikant (+ 351,0 % +/- 142,0 % gegenüber CRC, +333,9 % +/- 136,6 % gegenüber SD, jeweils  $p < 0,05$ ), während die Zellen aus makroskopisch nicht entzündeten Bereichen sich statistisch nicht von den Zellen der Kontrollpatienten unterschieden (Abb. 4.28).

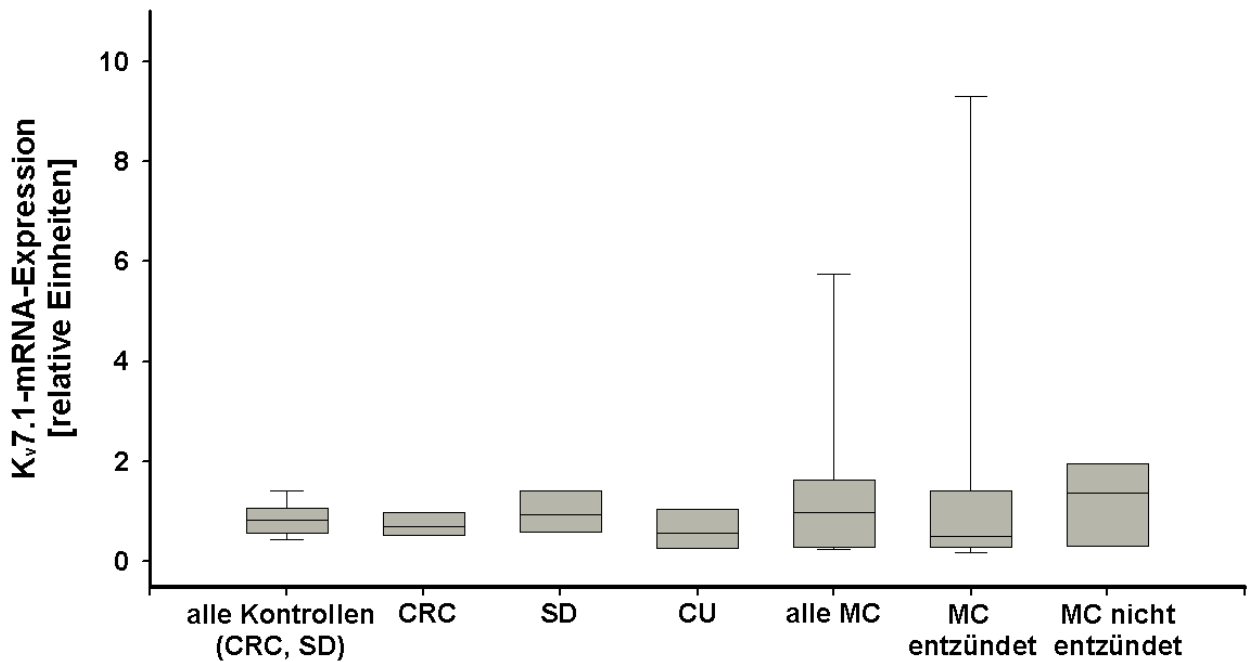


**Abb. 4.28: K<sub>Ca</sub>3.1-mRNA-Expression bei IEC aus chirurgischen Resektaten und endoskopischen Biopsien. Auswertung nach Subgruppen**

Die gesteigerte Expression von K<sub>Ca</sub>3.1-mRNA bei CU (n = 8) gegenüber allen Kontrollen (n = 10) ist insbesondere auf den Unterschied zur Subgruppe der CRC (n = 7) zurückzuführen. Gegenüber der Gruppe SD (n = 3) zeigt sich aber ebenfalls ein Unterschied. Sowohl gegenüber CRC als auch gegenüber SD exprimieren auch IEC aus Patienten mit MC (n = 21) vermehrt K<sub>Ca</sub>3.1-mRNA, was – wie sich bei weiterer Stratifizierung nach makroskopisch entzündeten oder nicht entzündeten Arealen zeigt – vor allem durch die Proben aus makroskopisch entzündeten Arealen bedingt ist. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

Um auszuschließen, dass es sich bei diesem Befund für K<sub>Ca</sub>3.1 um einen unspezifischen Effekt auf Kaliumkanäle im Allgemeinen handelt, wurde im selben Versuch parallel auch die Expression der mRNA des Kaliumkanals K<sub>v</sub>7.1 bestimmt.

Hierbei zeigten sich zwischen allen Gruppen keinerlei signifikante Unterschiede (Abb. 4.29), sodass die geschilderten Ergebnisse mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine besondere Rolle von K<sub>Ca</sub>3.1 zurückzuführen sind.



**Abb. 4.29: K<sub>v</sub>7.1-mRNA-Expression bei IEC aus chirurgischen Resektaten und endoskopischen Biopsien. Auswertung nach Subgruppen**

Darstellung in relativen Einheiten, Mittelwert der Kontrollen willkürlich gleich „1“ gesetzt. Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Kontrollen: n = 10, davon CRC: n = 7 und SD: n = 3; CU: n = 5; alle MC: n = 18, davon entzündet: n = 11 und nicht entzündet: n = 7

Dies legt eine Bedeutung von K<sub>Ca</sub>3.1 auch im Rahmen der Pathogenese oder Aufrechterhaltung von CED nahe. Da sich auch im Vergleich zu SD sowohl für CU als auch für MC erhöhte Expressionslevel von K<sub>Ca</sub>3.1 finden, scheint es sich dabei zudem nicht um einen unspezifisch entzündlichen Effekt zu handeln, wenngleich die geringe Probenzahl für SD einschränkend erwähnt werden muss.



## 5 Diskussion

Die durch Migration geprägte Restitution von IEC ist ein Prozess, mit dem kleinere Wunden im Epithel schnell geschlossen werden können und der daher im Rahmen intestinaler Entzündung bedeutend ist <sup>146)</sup>. Obwohl es zahlreiche Hinweise auf einen Einfluss von Kaliumkanälen auf die Wundheilung und Migration gibt <sup>59)</sup>, ist die Rolle von Kaliumkanälen bei der intestinalen Wundheilung nach wie vor nur unzureichend geklärt.

Auch die funktionelle Bedeutung von IFN- $\gamma$  im Rahmen der chronischen intestinalen Entzündung ist noch weitgehend unverstanden. Es gibt Evidenz für eine Erhöhung der epithelialen Permeabilität sowie einer Einschränkung des Ionentransports <sup>147),148),149)</sup>. Inwiefern sich IFN- $\gamma$  auf die Migration von IEC auswirkt, wurde bisher allerdings nicht ausreichend untersucht.

Des Weiteren sind EGF und EGFr-abhängige Signalwege in vielen Geweben wichtige Regulatoren der Wundheilung und der Migration <sup>146),150)</sup>. An alveolären Epithelzellen ist dies zudem mit Kaliumkanälen gekoppelt <sup>134)</sup>, sodass auch ein – bis heute noch unbekannter – Zusammenhang bei IEC denkbar erscheint.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte daher an zwei etablierten Modellen der intestinalen Migration der Einfluss von Kaliumkanälen und EGF unter normalen und durch IFN- $\gamma$  induzierten entzündlichen Bedingungen auf die Migration untersucht werden. Um die Hypothese zu testen, dass ein Zusammenhang mit EGFr-abhängigen Signalwegen besteht, wurden WB-Experimente durchgeführt. Die mRNA-Expression des Kaliumkanals  $K_{Ca}3.1$  wurde in IEC von CED- und Kontrollpatienten bestimmt.

### 5.1 Migrationsexperimente mit IEC *in vitro*

Zum Studium der intestinalen Wundheilung, insbesondere der Migration, wurde in der vorliegenden Arbeit die aus neugeborenen Ratten stammende Zelllinie IEC 18 eingesetzt. Diese Zelllinie wurde 1981 von Quaroni und Isselbacher eingeführt, ist nicht transformiert und leitet sich aus Kryptenzellen des Ileums ab <sup>119)</sup>. Es handelt sich um undifferenzierte epitheliale Vorläuferzellen <sup>120)</sup>, die in Kultur konfluente Monolayer bilden und bis in hohe Passagen ihren Phänotyp und die damit verbundene Fähigkeit, zu reifen Enterozyten zu differenzieren, bewahren <sup>129)</sup>. Grundsätzlich ist auch die Differenzierung zu neuro-endokrinen, Paneth-Zellen oder Becherzellen ähnlichen Phänotypen möglich <sup>151)</sup>.

Seither wurde diese Zelllinie von zahlreichen Arbeitsgruppen eingesetzt und näher

## Diskussion

---

charakterisiert z.B. 119),129),152),153),154),155). Sie wurde zur Untersuchung epithelialer Permeabilität<sup>156),157)</sup>, von Ionentransportprozessen<sup>158),159)</sup>, intrazellulärer Signalkaskaden<sup>160),161),162)</sup> und der intestinalen Wundheilung<sup>49),50),120),121),127),163),164),165),166)</sup> genutzt.

Zunächst wurden an konfluenten IEC 18 scratch-assays durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein weit verbreitetes und gut etabliertes zweidimensionales *in vitro*-Modell für die epitheliale Wundheilung<sup>48),49),50),51),122),167),168)</sup>. Die Verwundung erfolgt mechanisch, bei den Experimenten zu dieser Arbeit mit einer schräg aufgesetzten dünnen Pipettenspitze und nicht wie von anderen Arbeitsgruppen beschrieben mit einer Rasierklinge, um eine Verletzung des Untergrundes zu vermeiden<sup>122)</sup>.

Diese assays stellen eine grobe Vereinfachung der tatsächlichen Abläufe bei der intestinalen epithelialen Wundheilung dar und berücksichtigen nicht die Einflüsse der Immunzellen der subepithelialen Lamina propria. Aussagen über den Ablauf der Wundheilung bei über das Epithel hinaus penetrierenden Verletzungen können nicht getroffen werden.

Auf der anderen Seite bieten scratch-assays entscheidende Vorteile: In ihrem räumlichen Aufbau imitieren sie die Vorgänge der epithelialen Wundheilung *in vivo*, wobei Zellkontakte zu den umgebenden Epithelzellen und zur extrazellulären Matrix erhalten bleiben. Durch kontinuierliches Fotografieren oder Filmen des Heilungsvorgangs ist eine live-Beobachtung möglich, die Methode kann jederzeit – z.B. durch den Einsatz fluoreszierender Sonden für intrazelluläre Proteine – verfeinert werden. Zudem wird für die Experimente nur geringe technische Ausstattung benötigt, die Durchführung ist einfach und vergleichsweise billig<sup>169)</sup>.

Verschiedene Autoren haben die Methode in vielfältiger Weise modifiziert, z.B. um einen höheren Zelldurchsatz zu erreichen<sup>170)</sup>, als kritisch erwies sich dabei immer wieder die Quantifizierung der Wundheilung<sup>171)</sup>, die herkömmlicherweise vorgenommen wird, indem in einem definierten Areal zu einem bestimmten Zeitpunkt die Zahl der über den ursprünglichen Wundrand migrierten Zellen gezählt wird oder der Abstand der Wundränder im Laufe der Wundheilung mit einer Software gemessen wird<sup>122),134),131),169),172)</sup>.

Beide Verfahren haben Nachteile: Die Abstandsmessung der Wundränder als Maß für die intestinale Migration ist in hohem Grad Zufallseinflüssen unterworfen, denn (1) der Abstand der Wundränder ist über den Wundbereich unterschiedlich – schon ein einziger Zelldurchmesser mehr oder weniger kann große Unterschiede bedingen (Abb 3.5) - und (2) die den Wundrand bildenden Zellen migrieren in sehr unterschiedlicher Geschwindigkeit in das Wundareal – je nach gewähltem Ausgangspunkt schwanken die

nach einer bestimmten Zeit gemessenen Abstände also erheblich. Es wäre daher (3) eine unökonomisch große Zahl an Messungen und entsprechender Auswertung notwendig, um diese Zufälle auszugleichen oder einen „observer bias“ mit hinreichender Sicherheit auszuschließen. Auch die Zählung der über den Wundrand migrierten Zellen ist potenziell anfällig für einen „observer bias“ und muss daher mit einer Markierung des Wundrandes nach Verwundung sowie einer verblindeten Auswertung kombiniert werden <sup>172)</sup>. Zudem muss auch diese Art der Quantifizierung sich auf kleine Bereiche der Wunde beschränken, um mit angemessenem Aufwand durchgeführt werden zu können. Insgesamt sind diese Quantifizierungsmethoden somit nicht effizient.

Die scratch assay-Methode wurde daher für diese Arbeit weiter entwickelt und eine neuartige Methode zur Quantifizierung und Ergebnisdarstellung verwendet: Die Quantifizierung erfolgte mittels Flächenmessung. Eine solche Flächenmessung lässt sich durch Markierung des Wundrandes auf den während der Experimente aufgenommenen Bildern mit der entsprechenden Software (hier: Carl Zeiss AxioVision) ohne größeren Aufwand durchführen. Da der Wundrand eindeutig zu erkennen ist, ist eine Beeinflussung der Ergebnisse durch den Beobachter und somit ein „observer bias“ nur schwer vorstellbar. Zudem kann der gesamte fotografierte Wundbereich für die Auswertung in Betracht gezogen werden, wodurch zufällige Fehler minimiert werden. Wie gezeigt werden konnte, hat dieses Verfahren mit einer Standardabweichung von nur 0,15% eine hohe Reliabilität. Auch für die Verlaufsbeobachtung bieten sich dadurch bedeutende Vorteile. Anders als sonst üblich <sup>78),134)</sup> wurde als Maß für die Wundheilung kein prozentualer, sondern ein absoluter Wert errechnet, da bei der experimentellen Prozedur der scratch assays die Größe der Wunde zwangsläufig zwischen den verschiedenen Experimenten differiert. Bei gleicher Migrationsgeschwindigkeit können somit unterschiedliche relative Wundschlussraten erzielt werden und es erscheint daher ungenau, Prozentwerte miteinander zu vergleichen.

Da scratch assays auf initiale Ereignisse (hier: die ersten acht Stunden) der Wundheilung fokussieren, besteht weitgehender Konsens darüber, dass bei diesem Verfahren in erster Linie die Zellmigration untersucht wird <sup>169),171),173)</sup>. Gegenüber der in der Einleitung dargestellten Migration von einzelnen Zellen unterscheidet sie sich allerdings dadurch, dass die Zellwanderung kollektiv in einem Zellverband erfolgt, Zell-Zell-Kontakte bleiben erhalten. Einzelne Zellen oder Zellgruppen übernehmen dabei gewissermaßen die Vorhut und wandern den übrigen Zellen voran. Bei der Retraktion ihres Zellschwanzes kommt es durch die Vernetzung mit den dahinter gelegenen Zellen gleichzeitig zum Nachziehen des

Vorderpols der nachfolgenden Zellen<sup>174)</sup>.

Trotz der im Vergleich zur Beobachtungszeit langen Generationszeit von IEC 18<sup>129)</sup> kann nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass auch die Zellproliferation Einfluss auf die Ergebnisse hatte, sodass die scratch assays – um eine spezifische Aussage über die Migration treffen zu können – mit Boyden Kammer-assays kombiniert wurden. Dabei handelt es sich um ein weiteres Standardverfahren zur Untersuchung der Zellwanderung<sup>136),169)</sup>, bei dem auch chemotaktische Gradienten generiert werden können.

## **5.2 Einfluss von Kaliumkanalmodulatoren auf die Migration von IEC**

### **5.2.1 nicht entzündliche Bedingungen**

Anhand von Wundheilungsexperimenten mit der aus der Ratte stammenden und nicht transformierten intestinalen Epithelzelllinie IEC 18 wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst der Einfluss von Kaliumkanalmodulatoren auf die intestinale Wundheilung *in vitro* untersucht. Konfluente IEC 18 wurden mechanisch verwundet und die Zellmigration in die Wunde videomikroskopisch aufgezeichnet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Inhibition kalziumabhängiger Kaliumkanäle durch Clt, TRAM-34 und IbTx unter nicht entzündlichen Bedingungen zu einer Beschleunigung der Wundheilung und damit in erster Linie der Migration führt, während der Kaliumkanalaktivator 1-EBIO sie bremst. Mit ChTx, welches ebenfalls kalziumaktivierte Kaliumkanäle hemmt, zeigte sich ein Trend hin zu einer gesteigerten Wundheilung. Inhibitoren anderer Kanäle, namentlich Ba<sup>2+</sup>, TEA und C 293 B, hatten keinen Einfluss auf die Wundheilung. Boyden-Kammer-assays zeigten in Abhängigkeit von Clt und im Trend auch von IbTx, nicht aber von 1-EBIO ebenfalls eine gesteigerte Migration und bestätigten damit die Ergebnisse der scratch-assays.

Der steigernde Effekt von Clt auf die intestinale Wundheilung wurde – in scratch-assay-ähnlichen Wundheilungsexperimenten – bereits zuvor an den beiden humanen Kolonkarzinom-Zelllinien T84 und CaCo2 beschrieben<sup>78)</sup>, während der gegenteilige Effekt von 1-EBIO in dieser Studie bei einer vergleichsweise geringen Konzentration<sup>133),175)</sup> nicht nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise führte allerdings Hyperpolarisation der Zellen durch kaliumfreies Medium und damit die Imitierung des Effekts eines Kaliumkanalaktivators doch zu einer Herabsetzung der Wundheilung. Obwohl die Autoren

## Diskussion

---

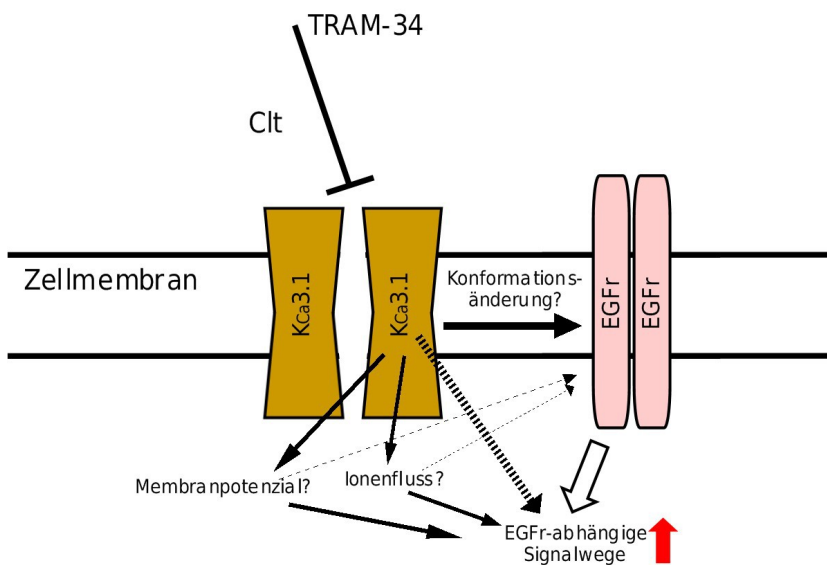
frühe Ereignisse im Rahmen der Wundheilung für den gesteigerten Clt-abhängigen Wundschluss verantwortlich machen konnten, gelang es ihnen nicht, dies spezifisch für die Zellmigration nachzuweisen.

Clt hemmt selektiv den kalziumabhängigen Kaliumkanal  $K_{Ca3.1}$  <sup>176),177)</sup>. Da Clt einen Imidazolring enthält und dadurch zusätzlich auch Enzyme der Cytochrom-Familie inhibiert <sup>178),179)</sup>, wäre es allerdings prinzipiell auch möglich, dass die beobachtete Steigerung der Migration nicht allein über die Wirkung auf den Kaliumkanal erklärbar ist. Daher wurde zusätzlich auch TRAM-34 eingesetzt, welches  $K_{Ca3.1}$  ebenfalls hochspezifisch hemmt, aber keine Wirkung auf Cytochrom-Enzyme hat <sup>179)</sup>. Da auch TRAM-34 die Wundheilung signifikant und noch dazu in ähnlichem Ausmaß steigerte, kann jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass tatsächlich die Inhibition von  $K_{Ca3.1}$  für die durch Clt gesteigerte Migration verantwortlich ist.

Sowohl IbTx als auch Clt führten in erster Linie in der ersten Hälfte des Beobachtungszeitraum von acht Stunden zu deutlich und signifikant erhöhten Migrationsraten in den scratch-assays. Ein identisches Verlaufsprofil zeigt auch die gesteigerte Migration in Abhängigkeit von EGF. Zudem kann EGF die durch IbTx bzw. Clt hervorgerufene Wundheilung nicht weiter steigern, hat also keinen additiven Effekt. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass eine Aktivierung von EGFr-abhängigen Signalwegen durch die Inhibition kalziumabhängiger Kaliumkanäle zumindest teilweise zur Steigerung der Restitution nach mechanischer Verwundung beiträgt und die Bindung von EGF an seinen Rezeptor somit keine zusätzliche Aktivierung nachgeschalteter Signalketten vermitteln kann.

Ein solcher Mechanismus wäre nichts Ungewöhnliches: Es liegt zunehmende Evidenz dafür vor, dass Kalium- und andere Ionenkanäle ihre Wirkungen auf die Migration vermitteln, indem sie Komplexe mit Signalmolekülen bilden, im Rahmen derer durch Konformationsänderungen regulatorische Signale ausgetauscht werden. So wurde beispielsweise an Leukämie-Zellen gezeigt, dass Blockade des Kaliumkanals  $K_v11.1$  die Migration bremst und dass dabei eine Komplexbildung von  $K_v11.1$  mit dem VEGFr und  $\beta_1$ -Integrin von Bedeutung ist <sup>180)</sup>. In humanen T-Zellen gibt es Hinweise auf die Existenz von Komplexen zwischen  $K_v1.3$  und  $\beta_1$ -Integrinen, die die Förderung integrinabhängiger Migration durch  $K_v1.3$ -Aktivierung bzw. die Hemmung durch  $K_v1.3$ -Blockade erklären könnten <sup>181),182)</sup>. Eine ähnliche Assoziation wurde auch für  $\beta_1$ -Integrine und den Kationenkanal hERG1 nachgewiesen, wobei dessen Funktion für die Aktivierung

intrazellulärer Signalmoleküle der Migration wie z.B. FAK oder Rac1 essentiell ist <sup>183</sup>). An humanen Osteoblasten wurde eine direkte Interaktion von  $K_{Ca}1.1$  mit FAK gezeigt <sup>184</sup>). deHart et al. wiesen an mehreren Zelllinien nach, dass die Funktion von  $K_{ir}4.2$  durch Kolokalisierung mit  $\alpha_9\beta_1$ -Integrin für die Migration essentiell ist <sup>185</sup>). Auch eine Beeinflussung von Signalmolekülen durch Konformationsänderungen in Abhängigkeit vom Membranpotenzial oder von Ionenfluss ist denkbar <sup>186</sup>).



**Abb. 5.1: Mögliche Mechanismen der Beeinflussung EGFr-abhängiger Signalwege durch  $K_{Ca}3.1$ -Hemmung:**

$K_{Ca}3.1$ -Hemmung könnte über Konformationsänderungen EGFr und darüber EGFr-abhängige Signalwege beeinflussen. Dies könnte direkt oder über EGFr auch durch das Membranpotenzial oder den Ionenfluss vermittelt werden.

Unabhängig von Migrationsvorgängen belegen auch die Ergebnisse von Tahara et al., dass Kaliumkanäle EGFr-abhängige Signalwege beeinflussen können: An Kardiomyozyten verursacht die Kaliumkanalblockade mittels 4-Aminopyridin eine ERK-Phosphorylierung, die durch EGFr vermittelt ist <sup>187</sup>).

Einen umgekehrten Mechanismus entdeckten Jin et al. an einer Nierenzelllinie: Für die Steigerung der Migration durch Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF) war die Funktion kalziumabhängiger Kaliumkanäle essentiell. Deren Blockade u.a. mit Clt und IbTx hemmte die HGF-stimulierte Migration <sup>188</sup>). Kaliumkanäle waren in diesem Fall in der Signalkaskade also unterhalb des Wachstumsfaktorrezeptors lokalisiert.

Betrachtet man die mit 1-EBIO gefundenen Migrationsraten, so zeigen auch diese, dass ein Zusammenhang von kalziumaktivierten Kaliumkanälen mit EGFr-abhängigen Signalwegen denkbar ist: Während 1-EBIO die Wundheilung deutlich reduziert und damit die Aktivierung von  $K_{Ca}3.1$  den gegenteiligen Effekt einer Hemmung bewirkt, mindert zusätzlich EGF diesen Einfluss signifikant. Dies wird insbesondere deutlich, wenn man die von 1-EBIO und EGF abhängige Wundheilung auf diejenige in Abhängigkeit von 40  $\mu$ L DMSO, der Lösungssubstanz für 1-EBIO, bezieht. Im Vergleich hierzu wird die Reduktion

## Diskussion

---

der Wundheilung sogar komplett aufgehoben. Dies wäre im Sinne einer Reaktivierung oder Aktivierung von durch  $K_{Ca3.1}$ -Öffnung gehemmten oder nicht aktivierten EGFr-abhängigen Signalwegen erklärbar.

Generell scheint der Bezug der Ergebnisse für 1-EBIO auf die mit 40  $\mu$ L DMSO erzielten Kontrollwerte sinnvoller, da so die diesen Migrationsraten immanente Verzerrung durch das Lösungsmittel berücksichtigt wird.

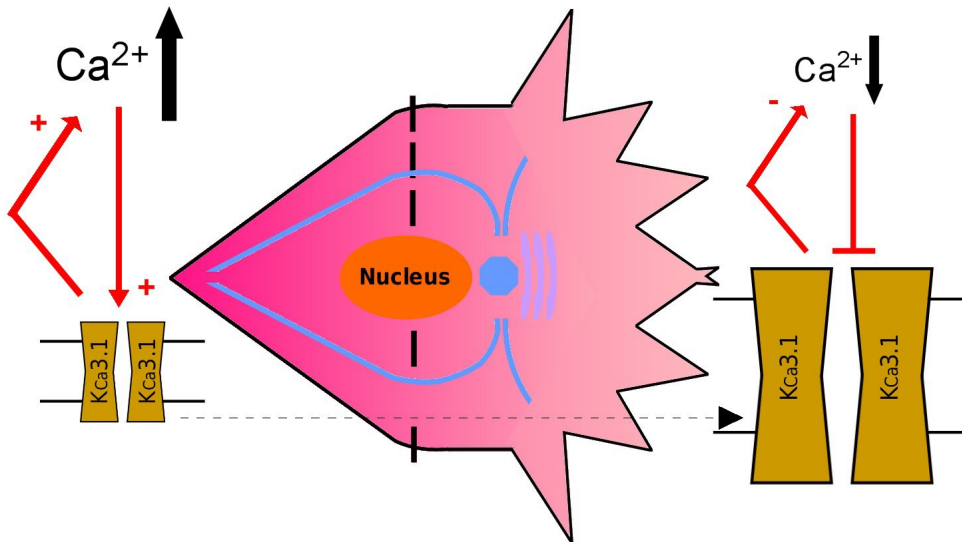
Dennoch sind die Werte für 1-EBIO nicht vollkommen konklusiv, da 1-EBIO in den Boyden-Kammern die Wirkung von Clt auf die Migration nicht umkehren kann. Dies mag damit zusammenhängen, dass 1-EBIO neben  $K_{Ca3.1}$  auch  $K_{Ca2}$  aktiviert<sup>77),189)</sup> und zudem weitere Zielmoleküle beeinflusst, beispielsweise die Adenylatcyclase oder den CFTR<sup>133)</sup>.

An MDCK-F-Zellen, einer Nierenepithelzelllinie, wurde gezeigt, dass  $K_{Ca3.1}$ , der von Clt gehemmte Kanal, in migrierenden Zellen an der Zellfront höher als im Zellschwanz exprimiert ist<sup>190),191)</sup> – ein Prozess, der auf clathrinabhängigem endozytotischem Recycling und mikrotubulären Transport beruht<sup>192)</sup>. Dazu gegensätzlich ist die intrazelluläre Kalziumkonzentration in migrierenden Zellen verteilt: Im Vorderpol findet sich eine signifikant niedrigere Konzentration als im Zellschwanz<sup>193),194),195)</sup>. Es ist also davon auszugehen, dass an der Zellfront zwar vermehrt  $K_{Ca3.1}$ -Kanäle vorhanden, dort jedoch aufgrund des erniedrigten Kalziumspiegels vermindert aktiv sind. Die Inhibition von  $K_{Ca3.1}$  durch Clt würde somit diese physiologische Hemmung noch weiter verstärken und könnte dadurch die Migration beschleunigen. Die ebenfalls durch Clt bewirkte Hemmung von verstärkt aktiven Kanälen im Zellschwanz könnte in diesem Fall durch deren geringere Zahl nicht ins Gewicht fallen.

Es sollte jedoch erwähnt werden, dass auch im Vorderpol von migrierenden Zellen kurzfristige und räumlich begrenzte Erhöhungen der intrazellulären Kalziumkonzentration für die Migration essentiell sind<sup>196),197)</sup>.

Im Gegensatz zu den Befunden bei IEC wirkte sich eine Hemmung von  $K_{Ca3.1}$  an Zelllinien aus zahlreichen anderen Geweben negativ auf die Zellmigration aus, so z.B. an dendritischen Zellen der Lunge<sup>79)</sup>, an Glioblastomzellen<sup>198)</sup>, an MDCK-F-Zellen<sup>199)</sup>, kardialen glatten Muskelzellen<sup>200)</sup>, Fibroblasten und malignen Melanom-Zellen<sup>201)</sup>. Eine mögliche Erklärung dafür liegt in der Tatsache, dass zwar im Vorderpol migrierender Zellen erniedrigte Aktivitätslevel von  $K_{Ca3.1}$  die Migration positiv beeinflussen (s.o.), aber gleichzeitig eine in Verbindung mit erhöhter Kalziumkonzentration<sup>193)</sup> stehende Aktivierung von  $K_{Ca3.1}$  im Zellschwanz durch Beeinflussung des Zellvolumens für die Vorwärtsbewegung ebenfalls wichtig ist<sup>202)</sup>. Die Bedeutung dieser Mechanismen könnte in

verschiedenen Geweben unterschiedlich ausgeprägt sein und somit unterschiedliche Reaktionsmuster bei  $K_{Ca3.1}$ -Inhibition bedingen.



**Abb. 5.2: Räumliche Verteilung von  $K_{Ca3.1}$  und Kalzium in migrierenden Zellen**

Zwar erfolgt bei der Migration eine Umverteilung von  $K_{Ca3.1}$  zugunsten der Zellfront, aufgrund des erniedrigten Kalziumspiegels ist der Kanal dort aber – wie auch nach Hemmung durch Clt oder TRAM-34 – weniger aktiv und fördert dadurch in Abwesenheit spannungsabhängiger Kalziumkanäle seinerseits erniedrigte Kalziumspiegel. Die gegenteilige Situation am Zellschwanz könnte das bei  $K_{Ca3.1}$ -Hemmung gebremste Wachstumsverhalten anderer Zellen erklären.

Zur weiteren Erklärung sowohl der bei IEC gesteigerten Migration durch  $K_{Ca3.1}$ -Hemmung als auch der unterschiedlichen Reaktion anderer Zellen darauf könnte zudem die Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Kaliumkanäle und Kalziumkanäle dienen. Intestinale Epithelzellen exprimieren keine spannungsabhängigen Kalziumkanäle, sodass die Triebkraft für Kalziumeinstrom nur vom Membranpotenzial abhängig ist<sup>203)</sup>. Das Membranpotenzial wird in erster Linie durch Kaliumkanäle bestimmt, sodass deren Hemmung es hin zu positiveren Werten verschiebt<sup>72),204)</sup>. Dies mindert den Kalziumeinstrom<sup>203),205)</sup> und trägt so zumindest im Vorderpol der Zelle zum nötigen Milieu für die Vorwärtsbewegung bei. Basolaterale  $K_{Ca3.1}$ -Kanäle wurden als entscheidende Kaliumkanäle für die Aufrechterhaltung des Membranpotenzials in humanen Kolonzellen identifiziert<sup>84),88),206),207)</sup>.

Andere Zelltypen wie beispielsweise glatte Muskelzellen exprimieren dagegen spannungsabhängige Kalziumkanäle. Hier führt ein positiveres Membranpotenzial durch Hemmung von Kaliumkanälen im Sinne einer Depolarisation zu einer verstärkten Offenwahrscheinlichkeit dieser Kalziumkanäle und damit zum Kalziumeinstrom<sup>203),208)</sup>, was wiederum – auf den Vorderpol der Zelle bezogen – für die Zellmigration kontraproduktiv ist.

Schwab et al. schlug für das von anderen Zelltypen abweichende Verhalten intestinaler Epithelzellen außerdem eine Bedeutung der Galvanotaxis vor<sup>59)</sup>. Unter Galvanotaxis oder



## Diskussion

---

Elektrotaxis ist die gerichtete Zellmigration in Abhängigkeit eines äußeren elektrischen Feldes zu verstehen <sup>209</sup>). Elektrische Felder entstehen im Darm durch die Resorption von Ionen und dadurch hervorgerufene transepitheliale Potenzialdifferenzen, im Rektum beispielsweise durch Natriumaufnahme via ENaC <sup>210</sup>).

Die migrationssteigernde Wirkung von IbTx und damit der spezifischen  $K_{Ca1.1}$ -Blockade auf IEC wurde in dieser Arbeit erstmals beschrieben. Auch dies steht in scheinbarem Widerspruch zum Verhalten humaner Gliomzellen, die auf Hemmung von  $K_{Ca1.1}$  mittels IbTx mit verminderter Migration reagieren <sup>82</sup>). Es ist jedoch auch eine verminderte Migration durch Aktivierung des Kanals beschrieben. In diesem Fall gibt es Hinweise, dass die intrazelluläre Kalziumkonzentration keine Rolle als second messenger spielt <sup>211</sup>).

Allerdings lässt sich an  $K_{Ca1.1}$  auch demonstrieren, dass Expression und Einfluss von Kaliumkanälen sich stark zwischen verschiedenen Zellen unterscheiden: Während Gliomzellen in erster Linie  $K_{Ca1.1}$  exprimieren <sup>82</sup>), sind es in Melanomzellen v.a.  $K_{Ca3.1}$ ,  $K_{Ca2.1}$  und  $K_{Ca2.2}$  <sup>212</sup>). Im Kontext des jeweiligen Gewebes bzw. des jeweiligen Zelltyps variierende Bedeutungen von Kaliumkanälen stellen also nichts Außergewöhnliches dar.

Die Auswirkungen der Hemmung von kalziumabhängigen Kaliumkanälen mit geringer Leitfähigkeit aus der Familie  $K_{Ca2}$  wurden in dieser Studie nicht untersucht. Jedoch aktiviert 1-EBIO auch diese Kanäle <sup>213</sup>), sodass ein zusätzlicher Einfluss dieser Kanäle nicht ausgeschlossen werden kann, zumal sie in IEC exprimiert werden <sup>214</sup>). Dass diese Kaliumkanäle die Migration grundsätzlich regulieren können, zeigten Potier et al. an einer Brustkrebszelllinie, in der  $K_{Ca2.3}$ -Expression die Migration steigerte und  $K_{Ca2.3}$ -knockdown sie hemmte <sup>215</sup>).

Lotz et al. beobachtete in der bereits zitierten Arbeit <sup>78</sup>) an T84-Zellen außerdem eine Steigerung der intestinalen Wundheilung durch Hemmung von Kaliumkanälen mit Barium und ChTx. Beides konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden, im Fall von ChTx war allerdings ein starker Trend ( $p = 0,053$ ) zu erkennen, sodass möglicherweise zu wenig Versuche durchgeführt wurden, um dessen Effekt statistisch signifikant nachweisen zu können. Angesichts der Tatsache, dass ChTx sowohl  $K_{Ca1.1}$  als auch  $K_{Ca3.1}$  hemmt <sup>216</sup>), wäre ein solcher Effekt eigentlich zu erwarten, allerdings keineswegs zwingend, da ChTx auch einige spannungsabhängige Kaliumkanäle inhibiert <sup>217</sup>) und somit anderweitige Einflüsse auf die Wirkung von ChTx denkbar sind. Die mit Barium, einem Inhibitor von Einwärtsgleichrichter-Kaliumkanälen <sup>74</sup>) gefundene Beschleunigung der Wundheilung war

äußerst gering, sodass eine relevante Bedeutung *in vivo* unwahrscheinlich ist.

Dass darüber hinaus auch andere Kaliumkanäle für die Zellmigration und -proliferation von großer Bedeutung sind, belegen Daten, die an einer Vielzahl von Zellen bzw. Zelllinien und mit Fokus auf zahlreiche verschiedene Kaliumkanäle erhoben wurden:

Rao et al. zeigten einen positiven Zusammenhang zwischen Expression und Aktivität der spannungsabhängigen Kaliumkanälen  $K_v1.1$  und  $K_v1.5$  und der Migration von IEC. Als intrazellulären Mittler dieses Effekts machten sie die durch die resultierende Hyperpolarisation gesteigerte zytosolische Kalziumkonzentration aus <sup>80)</sup>. Dazu passend konnte in einer anderen Arbeit nachgewiesen werden, dass die durch Cyclooxygenase-Inhibitoren hervorgerufene Hemmung der Migration von IEC mit einer erniedrigten Expression und Aktivität von  $K_v1.4$  und  $K_v1.6$  einhergeht <sup>218)</sup>. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich nach Zugabe von TEA kein Einfluss von spannungsabhängigen Kaliumkanälen, wobei mit Ausnahme von  $K_v1.1$  zur Hemmung der Mitglieder der Familie  $K_v1$  die eingesetzte Konzentration von 5 mM nicht ausreichend gewesen sein dürfte <sup>76)</sup>. Allerdings legen auch die genannten Arbeiten nahe, dass die intrazelluläre Kalziumkonzentration ein entscheidender Effektor der Migrationsregulation durch Kaliumkanäle sein dürfte.

Trinh et al. zeigten an alveolären Epithelzellen, dass die Blockade der Kanäle  $K_{ir}6.1$  und  $K_v7.1$  die EGF-stimulierte Wundheilung, Migration und Proliferation reduziert <sup>81)</sup>. Gomez-Varela et al. erzielten mit einem monoklonalen Antikörper gegen  $K_v10.1$  deutlich herabgesetzte Proliferationsraten in verschiedenen Tumorzelllinien, u.a. auch in der Colonicarcinom-Zelllinie HT29, an Brust- und Pankreaskrebszellen <sup>83)</sup>. Bei mikroglialen Zellen führt eine Hemmung des Kanals  $K_v3.1$  mit Margatoxin zu deutlich erniedrigten Migrationsraten <sup>219)</sup>. Des Weiteren seien beispielhaft die bereits oben erwähnte Reduktion der Migration von Leukämiezellen durch Hemmung von hERG <sup>180)</sup> und die an mehreren Zelllinien gezeigte Minderung der Migration durch Inhibition oder Unterdrückung der Expression von  $K_{ir}4.2$  genannt <sup>185),220)</sup>.

Mit Inhibitoren spannungsabhängiger Kaliumkanäle und von Einwärtsgerichteter-Kaliumkanälen wurden bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten mit IEC18 allerdings keine veränderte Wundheilung gefunden. Wie schon bei den kalziumabhängigen Kaliumkanälen festzustellen war, scheint der Einfluss von Kaliumkanälen auf die Zellmigration also abhängig von Gewebe bzw. Zellart unterschiedlich zu sein. Diese Zusammenhänge stellen daher ein lohnenswertes Ziel weiterer Forschung und potenzieller zukünftiger Therapieansätze dar. Dies gilt

insbesondere, da die Migration von Zellen nicht nur bei der Wundheilung, sondern z.B. auch bei der Metastasierung von Tumoren <sup>221)</sup> oder im Rahmen der Immunantwort <sup>222),223),224),225)</sup> wichtig ist.

Interessanterweise konnten zudem Grishin et al. in einer Studie demonstrieren, dass die Inhibition von  $K_v2.1$  mittels verschiedener Modulatoren die Apoptose von IEC hemmt, indem der dabei stattfindende Kaliumefflux blockiert wird <sup>226)</sup>. Auch dies unterstreicht die Bedeutung von Kaliumkanälen für die zukünftige CED-Forschung.

### 5.2.2 Entzündliche Bedingungen

Mittels 24-stündiger Vorinkubation von konfluenten IEC 18 mit rekombinantem IFN- $\gamma$  wurde eine chronische intestinale Entzündung simuliert und der Zellrasen anschließend verwundet. Die Zellmigration in Abhängigkeit von Kaliumkanalmodulatoren wurde gemessen.

IFN- $\gamma$  ist ein Zytokin, das typischerweise von  $T_H1$ -Zellen sezerniert wird, und so gemeinsam mit anderen Zytokinen wie beispielsweise IL-12 eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des Morbus Crohn hat, bei dem  $T_H1$ -Zellen die Immunreaktion dominieren <sup>227)</sup>. Dies spiegelt sich auch in aus der Darmmukosa stammenden erhöhten IFN- $\gamma$ -Spiegeln im Serum von MC-Patienten wider <sup>27)</sup>. Unter der im Mausmodell häufig verwendeten Induktion einer Colitis mit Natriumdodecylsulfat (DSS) zeigt sich ebenfalls ein ausgeprägtes  $T_H1$ -Profil <sup>228)</sup>, in dem IFN- $\gamma$  eine essentielle Rolle spielt <sup>229)</sup>.

Chronisch entzündliche Bedingungen am intestinalen Epithel wurden daher in Anlehnung an andere Autoren <sup>124),125),230),231)</sup> durch eine lang dauernde Vorinkubation der Zellen mit IFN- $\gamma$  in der angegebenen Konzentration simuliert.

Während sich die grundlegende Migrationsrate nach 24-stündiger Vorinkubation mit IFN- $\gamma$  nicht änderte, war sie nach Zugabe von IbTx wie schon unter nicht entzündlichen Bedingungen erhöht, im Gegensatz dazu aber nach Zugabe von Clt und 1-EBIO erniedrigt.

Der Einfluss von  $K_{Ca}1.1$  auf die Migration scheint sich daher unter entzündlichen Bedingungen nicht von normalen Bedingungen zu unterscheiden. Demgegenüber vermittelt  $K_{Ca}3.1$ -Blockade nach IFN- $\gamma$ -Inkubation eine gegensätzliche Regulation der intestinalen Wundheilung in vitro. Zwar ist die 1-EBIO-abhängige Migration bei diesen Verhältnissen weiterhin deutlich erniedrigt, jedoch signifikant weniger als dies ohne vorherige Applikation von IFN- $\gamma$  der Fall war. Bezogen auf 40  $\mu$ L DMSO als

Kontrollbedingung wird die Minderung der Migration sogar komplett aufgehoben. Auch diese Daten für die Aktivierung von  $K_{Ca}3.1$  legen daher eine gegensätzliche Regulation der Migration durch den Kaliumkanals unter entzündlichen Bedingungen nahe.

Diese Beeinflussung der intestinalen Wundheilung *in vitro* ist bisher nicht beschrieben, auch in anderen Zellkulturmodellen wurde ein solcher Zusammenhang noch nicht untersucht. Um die genaue Bedeutung dieser Kaliumkanal-abhängigen gegensätzlichen Regulation der intestinalen Migration unter nicht entzündlichen und entzündlichen Bedingungen sowie mögliche Konsequenzen daraus zu definieren, sind weitere Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* nötig. Es könnte sich dabei um einen Mechanismus handeln, der primär die Entstehung oder sekundär die Unterhaltung chronischer intestinaler Entzündung und deren Symptome fördert, indem er zu gesteigerter epithelialer Permeabilität beiträgt und so beispielsweise die Translokation von Antigenen oder den Austritt von Flüssigkeit ermöglicht.

Die als Antwort auf IFN- $\gamma$ -Inkubation gesteigerte epitheliale Permeabilität wurde bisher vor allem auf eine Minderung funktionaler Zell-Zell-Kontakte und Aktivierung parazellulärer Poren sowie dem daraus resultierenden erniedrigten transepithelialen Widerstand zurückgeführt <sup>125),147),232),233),234),235),236)</sup>. Auch für aktiven Morbus Crohn, im Rahmen dessen IFN- $\gamma$  eine zentrale Rolle einnimmt (s.o.), konnte dies gezeigt werden <sup>237)</sup>.

In Boyden-Kammer-Experimenten zeigte sich nach 24-stündiger Vorinkubation der Zellen mit IFN- $\gamma$  ebenfalls der gegensätzliche Einfluss einer  $K_{Ca}3.1$ -Hemmung auf die Migration und untermauert damit den Befund der scratch-assays. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass sich die Ergebnisse für IbTx und 1-EBIO in diesem Modell nicht bestätigt werden konnten. Verantwortlich dafür könnte sein, dass in Boyden-Kammern im Unterschied zu scratch-assays die Migration einzelner Zellen und nicht die Migration von Zellverbänden untersucht wird. Zudem spielen in Boyden-Kammern chemotaktische Gradienten der eingesetzten Substanzen eine Rolle, während sie in mechanischen Verwundungsmodellen eine homogene räumliche Verteilung zeigen.

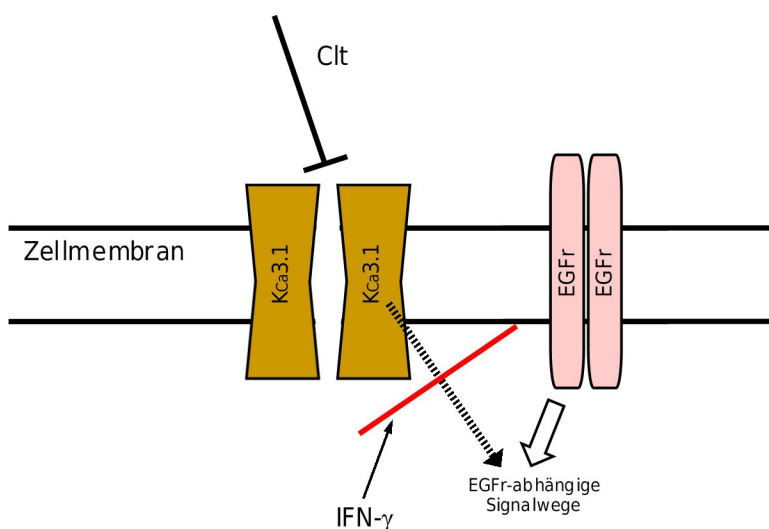
Ausgehend von der Hypothese des Einflusses EGFr-abhängiger Signalwege im Rahmen der kaliumkanalabhängigen Migration von IEC legen die Verwundungsexperimente nahe, dass auch die gegensätzliche Regulation im entzündlichen Milieu auf eine Modulation des EGFr zurückgeführt werden könnte.

Da EGF auch nach Vorinkubation mit IFN- $\gamma$  die Wundheilung signifikant steigert, CIt sie aber senkt, muss eine Aktivierung EGFr-abhängiger Signalwege durch  $K_{Ca}3.1$ -Hemmung –

wie sie weiter oben für nicht entzündliche Bedingungen postuliert wurde – unter entzündlichen Bedingungen ausgeschlossen werden. Die Kombination von EGF und Clt sorgte unter entzündlichen Verhältnissen jedoch für eine Steigerung der Wundheilung sowohl gegenüber den in Abhängigkeit von Clt beobachteten erniedrigten Werten als auch gegenüber Kontrollbedingungen. Das absolute Ausmaß der Migration lag dabei in einer ähnlichen Dimension wie unter nicht entzündlichen Bedingungen in Abhängigkeit von Clt alleine sowie Clt und EGF zusammen.

Es wäre daher denkbar, dass unter nicht entzündlichen Bedingungen die Hemmung von  $K_{Ca3.1}$  über eine aktuell nicht näher identifizierbare Verbindung für eine Aktivierung EGFr-abhängiger Signalwege sorgt. EGFr müsste dabei nicht zwangsläufig Bestandteil der Signalkaskade sein müssen. Entzündliche Bedingungen – wie sie nach 24-stündiger Vorinkubation mit  $IFN-\gamma$  auftreten – könnten diesen Zusammenhang jedoch entkoppeln, sodass eine Aktivierung EGFr-abhängiger Signalwege nicht stattfindet und  $K_{Ca3.1}$ -Inhibition wie in den meisten anderen Zellen auch die Migration bremst. Hierbei ist die zusätzliche Zugabe von EGF in der Lage, die EGFr-abhängigen Signalwege zu aktivieren und so die Migration wieder zu steigern.

Die Western-Blot-Untersuchungen des Phosphorylierungsstatus von PKB/Akt sowie MAPK/ERK machen dies nicht nur plausibler, sondern liefern auch erste Hinweise dafür, dass der PKB/Akt-Signalweg dafür verantwortlich sein könnte (s.u.).



### Abb. 5.3: Mögliche Mechanismen der Beeinflussung EGFr-abhängiger Signalwege durch $K_{Ca3.1}$ -Hemmung II:

Im Gegensatz zu normalen Bedingungen ist nach Vorinkubation mit  $IFN-\gamma$  die Wundheilung Clt-abhängig erniedrigt und EGF kann diese wieder auf erhöhte Werte steigern.  $IFN-\gamma$  könnte daher den möglichen Zusammenhang zwischen  $K_{Ca3.1}$  und EGFr-abhängigen Signalwegen entkoppeln.

Zum Einfluss von  $IFN-\gamma$  auf die intestinale Wundheilung *in vitro* liegen unterschiedliche Daten vor. Hoffmann et al. beobachteten eine durch  $TGF-\beta$  vermittelte Zunahme der Migration sowie eine Abnahme der Proliferation<sup>238)</sup>, vgl. auch<sup>239)</sup>. Demgegenüber fanden Leaphart et al. eine gegenüber Kontrollbedingungen reduzierte Migration von IEC 6-Zellen bei Zugabe von 1000 U/ml  $IFN-\gamma$  und identifizierten das in Gap junctions enthaltene

Connexin 43 als Mittler dieses Effekts<sup>240),241)</sup>. Auch Tong et al. beschrieben an T84-Zellen eine reduzierte Wundheilung in Abhängigkeit von IFN- $\gamma$ , die mit einer verminderten Bildung von Fokalkomplexen an der Zellfront sowie einer gesteigerten Internalisierung von  $\beta$ 1-Integrin einherging<sup>135)</sup>. In allen drei Fällen wurde jedoch untersucht, wie die Migration beeinflusst wird, wenn IFN- $\gamma$  nach Verwundung zugegeben wird und nicht wie im Rahmen dieser Arbeit, welchen Einfluss eine Vorinkubation mit diesem Zytokin hat.

Bereits mehrfach konnte gezeigt werden, dass IFN- $\gamma$  neben der Aktivierung seiner eigenen proentzündlichen Signalkaskade auch im Crosstalk mit anderen Signalwegen steht und sich diese wechselseitig beeinflussen. So wurde demonstriert, dass eine 24-stündige Vorinkubation mit IFN- $\gamma$  in T84-Zellen zu einer Transaktivierung des EGFr führt. Hierbei spielen die Freisetzung von TGF- $\alpha$  sowie die Kinase Src eine entscheidende Rolle<sup>231)</sup>. Auch kurzfristige Effekte von IFN- $\gamma$  auf den EGFr wurden bereits gezeigt<sup>242)</sup>.

### 5.2.3 Rolle EGFr-abhängiger Signalwege

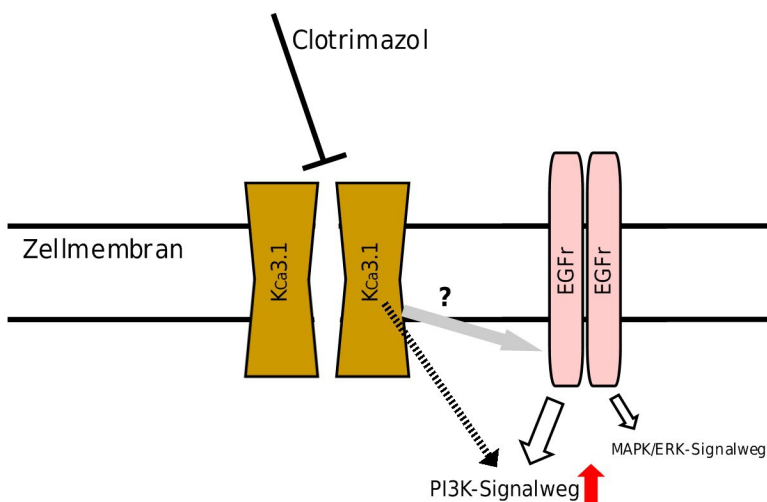
Aufgrund der Verwundungsexperimente lagen Hinweise für eine Beteiligung EGFr-abhängiger Signalwege an den über  $K_{Ca}3.1$  vermittelten Einflüssen auf die intestinale Restitution nach mechanischer Verwundung *in vitro* vor. Daher wurde die Aktivierung zweier wichtiger EGFr-abhängiger Signalwege, des MAPK/ERK-Signalwegs und des PI3K-Signalwegs anhand des Phosphorylierungsstatus der Kinasen ERK und Akt untersucht. Zellen mit und ohne IFN- $\gamma$ -Vorinkubation wurden dazu unter Kontrollbedingungen sowie nach Zugabe von Clt oder 1-EBIO jeweils mit oder ohne zusätzliche Applikation von EGF wie beschrieben verwundet, Zelllysate bis 480 Minuten nach Verwundung hergestellt und im Western Blot untersucht.

Das beschriebene Migrationsverhalten von IEC 18 ist nicht auf die Aktivierung von ERK zurückzuführen. Weder nach Zugabe von Clt oder 1-EBIO, noch nach Vorinkubation mit IFN- $\gamma$  unterschied sich der Phosphorylierungsstatus von ERK von dem unter Kontrollbedingungen. Auch die zusätzliche Zugabe von EGF zeigte unter nicht entzündlichen wie entzündlichen Bedingungen keine Effekte auf die ERK-Aktivierung, die mit dem Migrationsverhalten korrelieren.

Eigene Daten sowie publizierte Daten anderer Gruppen lassen vermuten, dass Verwundung ganz allgemein zu einer präferenziellen Aktivierung des PI3K-Wegs und geringerem Aktivierungspotenzial im MAPK/ERK-Weg in IEC führt. Paul et al. konnten

bereits zeigen, dass dies nach langer Vorinkubation von IEC mit IFN- $\gamma$  der Fall ist, was zumindest die Werte unter entzündlichen Bedingungen erklärt<sup>230</sup>). Dass die ERK-Phosphorylierung insbesondere unter Kontrollbedingungen ohne vorherige IFN- $\gamma$ -Inkubation EGF-abhängig sowohl nach 30 als auch nach 120 min leicht, aber signifikant gesteigert war zeigt, dass ERK auch nach Verwundung in geringem Maße aktiviert wird.

Wie anhand von Verlaufsgrafiken und statistischen Analysen gezeigt werden konnte, korreliert jedoch die Clt-vermittelte Restitution im Verlauf nach Verwundung in allen Konstellationen verblüffend exakt mit der jeweiligen Akt-Phosphorylierung nach zwei Stunden. Dies untermauert zum einen die aufgrund der scratch-assay-Ergebnisse aufgestellte Vermutung, dass EGFr-abhängige Signalwege an der Vermittlung der Effekte von  $K_{Ca}3.1$  beteiligt sind. Zum anderen legen diese Ergebnisse nahe, dass es sich beim beeinflussten Signalweg um die PI3K-Kaskade handelt.



### Abb. 5.4: Mögliche Mechanismen der Beeinflussung EGFr-abhängiger Signalwege durch $K_{Ca}3.1$ -Hemmung III:

Die sehr starke Korrelation der Akt-Phosphorylierung mit der Clt-abhängigen Wundheilung in allen Konstellationen untermauert die These des Einflusses EGFr-abhängiger Signalwege auf die Regulation der Migration durch  $K_{Ca}3.1$  und legt nahe, dass es sich dabei vor allem um den PI3K-Signalweg handelt.

Aus der demonstrierten Korrelation kann nicht unmittelbar ein kausaler Zusammenhang zwischen dem PI3K-Signalweg und  $K_{Ca}3.1$  sowie dessen unterschiedlichen Effekten auf die Zellmigration abgeleitet werden – dafür wären in zukünftigen Studien Experimente mit spezifischen Inhibitoren dieses Signalwegs notwendig. Jedoch zeigen diese Ergebnisse, dass ein solcher Zusammenhang möglich ist und stellen somit einen weiteren Schritt hin zum anzustrebenden besseren Verständnis von Regulationsprozessen im Rahmen der intestinalen epithelialen Wundheilung dar.

In diesem Zusammenhang zeigten Paul et al., dass eine prolongierte Vorinkubation mit IFN- $\gamma$  die Expression von EGFr steigert, die Autophosphorylierung des EGFr nach

Ligandbindung aber nicht verändert ist. Interessanterweise wurde in dieser Studie im Weiteren nachgewiesen, dass derartige entzündliche Bedingungen jedoch sehr wohl die Phosphorylierung bestimmter Tyrosinreste modulieren: die Tyrosinreste an Position 1068 und 1086 weisen nach EGF-Stimulation eine deutlich geringere Phosphorylierung auf als unter Kontrollbedingungen. Dies ging mit erhöhter grundlegender Phosphorylierung von ERK, aber einer reduzierten Aktivierung der Kinase einher, während der PI3K-Signalweg nicht beeinflusst war. Daher konnte – auch aufgrund von Daten aus zwei Tiermodellen – auf eine präferenzielle Aktivierung letzterer Kaskade in der Entzündung geschlossen werden <sup>230</sup>). Zum einen könnte dies Ausdruck einer funktionellen Anpassung an die bei Entzündung in verstärktem Maße notwendige PI3K-abhängige intestinale Restitution sein, zum anderen zeigt dies aber auch, dass ein IFN- $\gamma$ -induziertes entzündliches Milieu zelluläre Signalwege und Ionentransportprozesse grundlegend und selektiv verändern kann.

Die herausragende Rolle des PI3K-Signalwegs im Rahmen der Zellmigration wurde bereits vielfach demonstriert. Karrasch et al. zeigten an IEC 18, dass seine Inhibition eine beinahe halbierte Wundheilung nach sich zieht und dass PI3K-Signale zudem für die durch Verwundung induzierte Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  verantwortlich sind <sup>50</sup>). Die Wundheilung muriner Kolonepithelzellen wird durch EGF gesteigert, indem Rac an den Wundrand transloziert und aktiviert wird. In diesen Vorgang sind die Signalkaskaden über PI3K und Src involviert, während MAPK/ERK für die Migration keine Rolle spielt <sup>54,243</sup>). An humanen Kornealepithelzellen bewirkt Verwundung eine Erhöhung der pAkt-Spiegel, was mit reduzierter Expression des endogenen Inhibitors des PI3K-Signalwegs PTEN einhergeht. Pharmakologische Hemmung von PTEN resultierte in einer gesteigerten Wundheilung, die durch PI3K-Inhibitoren wieder reduziert wurde <sup>244</sup>). Auch für die Gab2-vermittelte Migration von Ovarialkarzinomzellen <sup>245</sup>) und malignen Melanom-Zellen <sup>246</sup>) ist der PI3K-Signalweg essentiell. Darüber hinaus ist im Rahmen der Zellpolarisierung bei der Migration der PI3K-Signalweg an der Zellfront verstärkt aktiv, während er am hinteren Rand durch PTEN unterdrückt wird <sup>247,248</sup>).

Einschränkend muss erwähnt werden, dass die Aktivierung von K<sub>Ca</sub>3.1 mittels 1-EBIO und die dabei beobachtete verminderte Migration nicht zu erniedrigter Akt-Phosphorylierung führte. Es müssen also auch noch andere Mechanismen an der Vermittlung der Effekte von K<sub>Ca</sub>3.1 beteiligt sein. Dafür kämen zum einen weitere EGFr-abhängige Signalwege in Frage, die in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden, z.B. PLC $\gamma$ , Src oder STAT. Zum anderen sind Einflüsse auf weitere Signalmoleküle, z.B. Integrine, oder natürlich des Membranpotenzials denkbar. Des Weiteren könnten auch die erwähnten alternativen



Wirkungen von 1-EBIO dafür verantwortlich sein.

### 5.3 Expression von $K_{Ca}3.1$ in IEC 18 nach 24 h IFN- $\gamma$ -Vorinkubation

Um die Expression von  $K_{Ca}3.1$  in IEC nach 24-stündiger IFN- $\gamma$ -Vorinkubation zu bestimmen, wurden unverwundete Zellen nach 24 h Inkubation mit starving medium mit oder ohne 100 ng/ml IFN- $\gamma$  lysiert und im Western Blot auf  $K_{Ca}3.1$  untersucht. Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der Expression unter entzündlichen Bedingungen um über 70 %.

Über die Relevanz dieses Befundes kann anhand der vorliegenden Daten nur spekuliert werden, im Hinblick auf die Zellmigration scheint es jedoch möglich, dass es sich dabei um den Versuch einer Gegenregulation handelt. Da die Hemmung des Kanals sich unter entzündlichen Bedingungen negativ auf die Wundheilung auswirkt, könnte somit eine mit verstärkter Expression einhergehende verstärkte Aktivität dem entgegenwirken.

Auch in anderen Modellen wirkte sich längere Behandlung mit IFN- $\gamma$  auf die Expression von Kalium- und anderen Kanälen aus. An Nierenzellen wurde *in vivo* und *in vitro* eine reduzierte Expression unter anderem eines Einwärtsgleichrichter-Kaliumkanals nach 12 h IFN- $\gamma$  beschrieben <sup>249</sup>. An intestinalen Zellen konnte eine verminderte Expression von NKCC2 und  $Na^+/K^+$ -ATPase als Antwort auf 24 h IFN- $\gamma$  beobachtet werden <sup>250</sup>.

Die grundlegende Expression von  $K_{Ca}3.1$  in IEC 18 ist gut charakterisiert, an dieser Zelllinie gelang es erstmals  $K_{Ca}3.1$  auch in der apikalen Membran von intestinalen Epithelzellen nachzuweisen. Während sich in der basolateralen Membran die Splicevariante KCNN4b findet, kommt apikal die Variante KCNN4a vor, die eine Transmembrandomäne weniger enthält und gegenüber TRAM-34 weniger sensibel ist – die in dieser Arbeit eingesetzte Konzentration lag aber über der  $IC_{50}$  <sup>130),154</sup>.

### 5.4 Expression von $K_{Ca}3.1$ -mRNA in IEC

Mittels TaqMan® -Real Time PCR wurde an Lysaten humaner intestinaler Epithelzellen, die aus chirurgischen Resektaten und endoskopischen Biopsien gewonnen wurden, untersucht, ob sich die mRNA-Expression des Kaliumkanals  $K_{Ca}3.1$  bei Patienten mit CED gegenüber Kontrollpatienten mit CRC oder SD unterscheidet. Nachdem  $K_{Ca}3.1$  in den vorhergehenden Versuchen *in vitro* als interessanter Kandidat für ein weitergehendes

Verständnis der unter entzündlichen Bedingungen fehlregulierten Vorgänge im Rahmen der Wundheilung identifiziert wurde, sollten so Hinweise auf eine mögliche Bedeutung *in vivo* gewonnen werden.

Es zeigte sich sowohl bei CU als auch bei MC eine gesteigerte Expression von  $K_{Ca3.1}$ , nicht aber von  $K_v7.1$  gegenüber der Kontrollgruppe. Die gesteigerte Expression bei MC war auf eine vermehrte Expression in makroskopisch entzündeten, nicht aber in makroskopisch nicht entzündeten Bereichen zurückzuführen.

Es handelt sich dabei zunächst einmal lediglich um eine Korrelation, sodass davon ausgehend weder ein ätiologischer oder pathogenetischer Einfluss von  $K_{Ca3.1}$  bei CED bewiesen, noch auf die zugrunde liegenden Ursachen oder die daraus resultierenden Folgen geschlossen werden kann. Zudem kann von einer gesteigerten mRNA-Expression nicht automatisch auf ebenso erhöhte Proteinspiegel geschlossen werden, da die mRNA vor der Translation umfangreichen posttranskriptionalen Regulationsvorgängen ausgesetzt ist <sup>251</sup>). Eine direkte Untersuchung der Expression von  $K_{Ca3.1}$  auf Proteinebene war allerdings aufgrund zu geringer Gewebemengen nicht möglich – endoskopische Biopsien haben naturgemäß ein sehr kleines Volumen und im Hinblick auf die bei CED erhöhte Inzidenz von Karzinomen und der sich daraus ergebenden Notwendigkeit einer exakten pathologischen Untersuchung konnte auch aus OP-Resektaten nur sehr wenig Material verwendet werden. Vor dem Hintergrund der *in vitro* erzielten Ergebnisse an IEC, die nach IFN- $\gamma$ -Inkubation – also unter entzündlichen Bedingungen – eine erhöhte Expression von  $K_{Ca3.1}$  zeigten, sollten diese Daten aber dennoch Anlass für weitergehende Untersuchungen *in vitro*, *in* und *ex vivo* geben, um die Rolle des Kanals unter chronisch entzündlichen Bedingungen am intestinalen Epithel weiter aufzuklären.

Auf eine klinische Relevanz des Kaliumkanals  $K_{Ca3.1}$  im Zusammenhang mit CED deuten auch weitere Daten hin: So gelang es Ayabe et al. zu zeigen, dass die Blockade von  $K_{Ca3.1}$  durch verschiedene Inhibitoren eine reduzierte Sekretion von  $\alpha$ -Defensin durch Paneth-Zellen nach sich zieht <sup>252</sup>). Dies verdient angesichts der zunehmend diskutierten Rolle von antimikrobiellen Substanzen der angeborenen Immunität bei der Entstehung und Unterhaltung von CED <sup>17</sup>) besondere Aufmerksamkeit. In einer australischen Studie wurde zudem die Assoziation eines Single Nucleotide Polymorphism im  $K_{Ca3.1}$ -Gen mit Morbus Crohn und insbesondere mit dessen Lokalisation im Ileum nachgewiesen. Zudem war die Expression der mRNA des Kaliumkanals in nicht entzündeter Mukosa von Patienten mit NOD2-Mutationen signifikant erniedrigt <sup>253</sup>).

Als in der Zellmembran gelegene und damit gut erreichbare Struktur stellt der kalziumabhängige Kaliumkanal  $K_{Ca3.1}$  daher ein interessantes potenzielles

## Diskussion

---

therapeutisches Ziel dar. Weitere Forschung ist nötig, um seine Rolle und Bedeutung bei CED, vor allem im Hinblick auf Ulzerationen oder die Genese von Diarrhoe näher zu untersuchen.

## 6 Zusammenfassung

Die Pathogenese von CED ist nach wie vor nur unzureichend verstanden. Als gesichert gilt jedoch, dass an ihrer Entstehung und Unterhaltung eine genetische Prädisposition verbunden mit einer Störung der epithelialen Permeabilität des Darmes und einer fehlregulierten Immunantwort auf translozierte – insbesondere bakterielle – Antigene beteiligt sind.

Sowohl primär als auch sekundär können auch kleine, rein epitheliale Wunden zur gestörten epithelialen Barriere bei CED beitragen. Solche Epithelläsionen werden durch einen Restitution genannten Vorgang wieder geschlossen, der vorwiegend durch Migration von am Wundrand liegenden Zellen in das Wundareal geprägt ist.

Bei der Zellmigration handelt es sich um einen komplexen Prozess, im Laufe dessen sich die migrierende Zelle polarisiert und abwechselnd die Zellfront vorschiebt und den Zellschwanz nachzieht. Zahlreiche Regulationsmechanismen beeinflussen den Ablauf von Restitution bzw. Migration. Unter anderem sind daran auch Kaliumkanäle sowie von EGFr ausgehende Signalkaskaden beteiligt.

Vorrangiges Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, in zwei Migrationsassays die Regulation der intestinalen epithelialen Restitution unter nicht entzündlichen sowie entzündlichen Bedingungen durch verschiedene Kaliumkanäle und durch EGF zu untersuchen. Des Weiteren wurde mittels WB-Experimenten versucht, bestimmte intrazelluläre Signalkaskaden als Vermittler der gefundenen Effekte zu identifizieren. Schließlich wurde aus IEC von Patienten mit CED sowie von Kontrollpatienten mRNA isoliert und die Expression des Kaliumkanals  $K_{Ca3.1}$  gemessen.

### 6.1 Einfluss von Kaliumkanälen auf die intestinale Restitution

Die intestinale Restitution bzw. Migration wurde anhand der aus der Ratte stammenden, nicht transformierten Zelllinie IEC 18 in scratch assays sowie Boyden-Kammer assays untersucht.

In den scratch assays konnte eine Steigerung der Zellmigration durch Hemmung der kalziumabhängigen Kaliumkanäle  $K_{Ca3.1}$  und  $K_{Ca1.1}$  sowie eine Reduktion der Migration durch Aktivierung von  $K_{Ca3.1}$  gezeigt werden. Die Hemmung anderer Kaliumkanäle zeigte

keinen Effekt. Zusätzliche Zugabe von EGF konnte die  $K_{Ca3.1}$ - und  $K_{Ca1.1}$ -abhängig gesteigerte Wundheilung nicht weiter steigern.

Entzündliche Bedingungen wurden durch 24-stündige Vorinkubation der Zellen mit IFN- $\gamma$  simuliert.  $K_{Ca3.1}$ -Blockade führte unter diesen Umständen zu einer Reduktion der Restitution. Die Zugabe von EGF hob dies jedoch wieder auf und steigerte die  $K_{Ca3.1}$ -abhängige Migration auf Werte wie sie unter nicht entzündlichen Bedingungen gemessen wurden.

Auch in Boyden-Kammer assays war unter nicht entzündlichen Bedingungen die Zellmigration durch  $K_{Ca3.1}$ -Hemmung gesteigert, während entzündliche Bedingungen zum gegenteiligen Effekt führten.

Aufgrund dieser Daten ist eine gegensätzliche Regulation der intestinalen epithelialen Restitution unter nicht entzündlichen bzw. entzündlichen Bedingungen wahrscheinlich. Zudem kann eine Beteiligung EGFr-abhängiger Signalwege am Regulationsmechanismus vermutet werden.

## 6.2 Rolle EGFr-abhängiger Signalwege

Mittels WB wurde die Phosphorylierung von PKB/Akt und ERK bis acht Stunden nach Verwundung in Abhängigkeit von Kaliumkanalmodulatoren und/oder EGF unter nicht entzündlichen und entzündlichen Bedingungen gemessen.

Während die ERK-Phosphorylierung kaum verändert war und die Effekte auf die Restitution nicht erklärt, führte  $K_{Ca3.1}$ -Inhibition unter nicht entzündlichen, nicht aber unter entzündlichen Bedingungen zu einer nach zwei Stunden signifikant erhöhten Akt-Phosphorylierung. Zusätzliche Zugabe von EGF konnte den Wert unter nicht entzündlichen Bedingungen nicht weiter anheben, jedoch unter entzündlichen Bedingungen die Phosphorylierung signifikant steigern.

Wie durch Gegenüberstellung der Akt-Phosphorylierung nach zwei Stunden mit dem Wachstumsverlauf in den scratch-assays sowie durch statistische Analysen gezeigt werden konnte, besteht bei  $K_{Ca3.1}$ -Hemmung über alle Konstellationen hinweg eine sehr starke und signifikante Korrelation zwischen der Akt-Phosphorylierung und der Zellmigration in den scratch-assays 60-240 Minuten nach Verwundung. In diesem Zeitraum werden auch die höchsten Wundschlussraten gemessen.

Diese Daten legen nahe, dass tatsächlich EGFr-abhängige Signalwege an der Vermittlung

der Effekte von  $K_{Ca}3.1$ -Inhibition auf die intestinale Zellmigration beteiligt sind und der PI3K-Signalweg mit Akt als zentraler Kinase hierbei eine Schlüsselrolle einnimmt.

### **6.3 $K_{Ca}3.1$ -Expression bei Patienten mit CED**

Aus OP-Resektaten und endoskopischen Biopsien von Patienten mit CED sowie von Kontrollpatienten mit kolorektalem Karzinom (CRC) oder Sigmadivertikulitis (SD) wurde mRNA isoliert und im TaqMan® die Expression von  $K_{Ca}3.1$  sowie  $K_v7.1$  bestimmt.

Sowohl bei Colitis ulcerosa (CU) als auch bei Morbus Crohn (MC) war die Expression von  $K_{Ca}3.1$ , nicht aber von  $K_v7.1$  gegenüber beiden Kontrollgruppen gesteigert. Wurde für MC nach Proben aus makroskopisch entzündeter und makroskopisch nicht entzündeter Schleimhaut unterschieden, so ließ sich eine vermehrte Expression nur für entzündete Bereiche nachweisen.

Diese Erkenntnisse unterstreichen, dass  $K_{Ca}3.1$  und die Regulation der intestinalen Restitution durch diesen Kaliumkanal durchaus klinisch relevant sein können.

## 7 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde *in vitro* an der Zelllinie IEC 18 eine gegensätzliche Regulation der intestinalen epithelialen Wundheilung durch  $K_{Ca}3.1$  unter nicht entzündlichen und entzündlichen Bedingungen gezeigt und der EGFr-abhängige PI3K-Signalweg als wahrscheinlicher Vermittler dieses Effekts identifiziert.

Bevor aus diesen Erkenntnissen konkrete Schlussfolgerungen für unser Verständnis der Pathogenese von CED oder gar für zukünftige Therapieansätze gezogen werden können, ist eine weitergehende Erforschung dieser Zusammenhänge notwendig. Zunächst sollten entsprechende Experimente auch an anderen Zelllinien, insbesondere humanen Zellen durchgeführt werden. Um die aufgrund der gefundenen Korrelation von Akt-Phosphorylierung und Zellmigration postulierte Rolle des PI3K-Signalwegs für die Vermittlung der  $K_{Ca}3.1$ -abhängigen Effekte als kausal zu belegen, müssten zudem Experimente mit Inhibitoren dieses Signalwegs – z.B. Wortmannin oder API-1 – erfolgen. Schließlich müssten die so gewonnenen Vorstellungen auch in ein geeignetes Tiermodell übertragen werden, um diese Zusammenhänge *in vivo* zu untersuchen und realitätsnähere Aussagen treffen zu können. Beispielsweise könnte in chemisch induzierten oder spontanen murinen Colitis-Modellen getestet werden, wie sich  $K_{Ca}3.1$ -Hemmung oder -Aktivierung auf die Wundheilung auswirken.

Hinsichtlich eines potenziell denkbaren therapeutischen Einsatzes von  $K_{Ca}3.1$ -Modulatoren in der Therapie von CED ist zu bedenken, dass der Kaliumkanal nicht nur im Rahmen der intestinalen epithelialen Wundheilung von Bedeutung ist, sondern auch das Membranpotenzial beeinflusst, so Absorption und Sekretion von Ionen direkt beeinflusst und damit auch CED-assoziierte Diarrhoen regulieren kann<sup>88)</sup>. Zudem wird die Funktion von T-Helfer-Zellen von  $K_{Ca}3.1$  beeinflusst<sup>254)</sup>. Aufgrund dessen wären auch weitere Experimente *in vitro* und *in vivo* notwendig, um zu klären, welche Einzel- und Summeneffekte systemische und/oder lokale  $K_{Ca}3.1$ -Modulation diesbezüglich nach sich ziehen und welche Mechanismen diesen zugrunde liegen.

Obwohl es sich also bei der vorliegenden Arbeit um Grundlagenforschung handelt, deren klinische Relevanz erst noch gezeigt werden muss, steht dennoch fest, dass die  $K_{Ca}3.1$ -abhängige Zellmigration bei chronischer intestinaler Entzündung interessante neue Aspekte für das Verständnis und die Therapie von CED birgt.

Sollte sich in Zukunft tatsächlich ein therapeutischer Wert für  $K_{Ca}3.1$ -Modulatoren zeigen, so könnten z.B. Inhibitoren relativ schnell in die klinische Anwendung gelangen, da für Clt

## Ausblick

---

als schon lange eingesetztes Antimykotikum bereits Sicherheits- und Verträglichkeitsdaten existieren und auch bei anderen Erkrankungen ein therapeutischer Einsatz interessant erscheint und erforscht wird <sup>255), 256)</sup>.



## 8 Literaturverzeichnis

1. Welsch, U. *Sobotta Lehrbuch Histologie*. (Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH: 2005).
2. Ochsenkühn, T., Sackmann, M. & Göke, B. [Inflammatory bowel diseases (IBD) -- critical discussion of etiology, pathogenesis, diagnostics, and therapy]. *Radiologe* **43**, 1–8 (2003).
3. Spehlmann, M. E. *et al.* Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflamm. Bowel Dis.* **14**, 968–976 (2008).
4. Halfvarson, J., Bodin, L., Tysk, C., Lindberg, E. & Järnerot, G. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* **124**, 1767–1773 (2003).
5. Orholm, M., Binder, V., Sørensen, T. I., Rasmussen, L. P. & Kyvik, K. O. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand. J. Gastroenterol.* **35**, 1075–1081 (2000).
6. Thompson, N. P., Driscoll, R., Pounder, R. E. & Wakefield, A. J. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ* **312**, 95–96 (1996).
7. Halme, L. *et al.* Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* **12**, 3668–3672 (2006).
8. Kenny, E. E. *et al.* A Genome-Wide Scan of Ashkenazi Jewish Crohn's Disease Suggests Novel Susceptibility Loci. *PLoS Genet* **8**, (2012).
9. Ogura, Y. *et al.* A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**, 603–606 (2001).
10. Hugot, J.-P. *et al.* Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**, 599–603 (2001).
11. Duerr, R. H. *et al.* A Genome-Wide Association Study Identifies IL23R as an Inflammatory Bowel Disease Gene. *Science* **314**, 1461–1463 (2006).
12. Cho, J. H. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology* **8**, 458–466 (2008).
13. Kaser, A., Zeissig, S. & Blumberg, R. S. Inflammatory bowel disease. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 573–621 (2010).
14. Loftus Jr, E. V. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* **126**, 1504–1517 (2004).
15. Taurog, J. D. *et al.* The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med* **180**, 2359–2364 (1994).
16. Round, J. L. & Mazmanian, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology* **9**, 313–323 (2009).
17. Wehkamp, J. & Stange, E. F. Is there a role for defensins in IBD? *Inflammatory Bowel*

- Diseases* **14**, S85–S87 (2008).
18. Schroeder, B. O. *et al.* Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human [bgr]-defensin 1. *Nature* **469**, 419–423 (2011).
  19. Braun, A. *et al.* Alterations of phospholipid concentration and species composition of the intestinal mucus barrier in ulcerative colitis: A clue to pathogenesis. *Inflammatory Bowel Diseases* **15**, 1705–1720 (2009).
  20. Treede, I. *et al.* TNF- $\alpha$ -induced up-regulation of pro-inflammatory cytokines is reduced by phosphatidylcholine in intestinal epithelial cells. *BMC Gastroenterol* **9**, 53 (2009).
  21. Stremmel, W. *et al.* Delayed release phosphatidylcholine as new therapeutic drug for ulcerative colitis – a review of three clinical trials. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **19**, 1623–1630 (2010).
  22. McGuckin, M. A., Eri, R., Simms, L. A., Florin, T. H. J. & Radford-Smith, G. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases* **15**, 100–113 (2009).
  23. Miron, N. & Cristea, V. Enterocytes: active cells in tolerance to food and microbial antigens in the gut. *Clinical & Experimental Immunology* **167**, 405–412 (2012).
  24. Welsch, U. *Sobotta Atlas Histologie: Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie.* (Elsevier, Urban&FischerVerlag: 2005).
  25. Strober, W. & Fuss, I. J. Proinflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* **140**, 1756–1767.e1 (2011).
  26. Matricon, J., Barnich, N. & Ardid, D. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Self Nonself* **1**, 299–309 (2010).
  27. Sasaki, T., Hiwatashi, N., Yamazaki, H., Noguchi, M. & Toyota, T. The role of interferon; in the pathogenesis of Crohn's disease. *Journal of Gastroenterology* **27**, 29–36 (1992).
  28. Torres, M. & Ríos, A. Current view of the immunopathogenesis in inflammatory bowel disease and its implications for therapy. *World J Gastroenterol* **14**, 1972–1980 (2008).
  29. Mangan, P. R. *et al.* Transforming growth factor- $\beta$  induces development of the TH17 lineage. *Nature* **441**, 231–234 (2006).
  30. Yen, D. *et al.* IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* **116**, 1310–1316 (2006).
  31. Fujino, S. *et al.* Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* **52**, 65–70 (2003).
  32. Vavricka, S. R. & Rogler, G. New insights into the pathogenesis of Crohn's disease: are they relevant for therapeutic options? *Swiss Med Wkly* **139**, 527–534 (2009).
  33. Classen, M. *et al.* *Innere Medizin: Herausgegeben von M. Böhm, M. Hallek, W. Schmiegel.* (Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH: 2009).
  34. Baumgart, D. C. & Sandborn, W. J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *The Lancet* **369**, 1641–1657 (12).

35. Ott, C. *et al.* The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* **20**, 917–923 (2008).
36. Faubion, W. A., Jr, Loftus, E. V., Jr, Harmsen, W. S., Zinsmeister, A. R. & Sandborn, W. J. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology* **121**, 255–260 (2001).
37. Peyrin-Biroulet, L., Loftus, E. V., Jr, Colombel, J.-F. & Sandborn, W. J. The natural history of adult Crohn's disease in population-based cohorts. *Am. J. Gastroenterol.* **105**, 289–297 (2010).
38. Bernstein, C. N., Blanchard, J. F., Rawsthorne, P. & Yu, N. The prevalence of extraintestinal diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. *The American Journal of Gastroenterology* **96**, 1116–1122 (2001).
39. Eaden, J., Abrams, K. & Mayberry, J. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* **48**, 526–535 (2001).
40. Bernstein, C. N., Blanchard, J. F., Kliever, E. & Wajda, A. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer* **91**, 854–862 (2001).
41. Lukas, M. Inflammatory Bowel Disease as a Risk Factor for Colorectal Cancer. *Digestive Diseases* **28**, 619–624 (2010).
42. Karrasch, T. & Jobin, C. Wound healing responses at the gastrointestinal epithelium: a close look at novel regulatory factors and investigative approaches. *Z Gastroenterol* **47**, 1221–1229 (2009).
43. Playford, R. & Ghosh, S. Cytokines and growth factor modulators in intestinal inflammation and repair. *The Journal of Pathology* **205**, 417–425 (2005).
44. Dignass, A. U. Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair. *Inflamm. Bowel Dis.* **7**, 68–77 (2001).
45. Baumgart, D. C. & Dignass, A. U. Intestinal barrier function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **5**, 685–694 (2002).
46. Dignass, A. U., Baumgart, D. C. & Sturm, A. The aetiopathogenesis of inflammatory bowel disease — immunology and repair mechanisms. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **20**, 9–17 (2004).
47. Egan, L. J. *et al.* Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation Promotes Restitution of Wounded Intestinal Epithelial Monolayers. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**, C1028–C1035 (2003).
48. Dieckgraefe, B. K., Weems, D. M., Santoro, S. A. & Alpers, D. H. ERK and p38 MAP Kinase Pathways Are Mediators of Intestinal Epithelial Wound-Induced Signal Transduction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **233**, 389–394 (1997).
49. Karrasch, T., Steinbrecher, K. A., Allard, B., Baldwin, A. S. & Jobin, C. Wound-induced p38MAPK-dependent histone H3 phosphorylation correlates with increased COX-2

- expression in enterocytes. *J. Cell. Physiol.* **207**, 809–815 (2006).
50. Karrasch, T., Spaeth, T., Allard, B. & Jobin, C. PI3K-dependent GSK3 $\beta$ (Ser9)-phosphorylation is implicated in the intestinal epithelial cell wound-healing response. *PLoS ONE* **6**, e26340 (2011).
  51. Ciacci, C., Lind, S. E. & Podolsky, D. K. Transforming growth factor beta regulation of migration in wounded rat intestinal epithelial monolayers. *Gastroenterology* **105**, 93–101 (1993).
  52. Dignass, A. U., Tsunekawa, S. & Podolsky, D. K. Fibroblast growth factors modulate intestinal epithelial cell growth and migration. *Gastroenterology* **106**, 1254–1262 (1994).
  53. Riegler, M. *et al.* Epidermal growth factor promotes rapid response to epithelial injury in rabbit duodenum in vitro. *Gastroenterology* **111**, 28–36 (1996).
  54. Dise, R. S., Frey, M. R., Whitehead, R. H. & Polk, D. B. Epidermal Growth Factor Stimulates Rac Activation Through Src and Phosphatidylinositol 3-Kinase to Promote Colonic Epithelial Cell Migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**, G276–G285 (2008).
  55. Kato, K. *et al.* Effects of growth factors and trefoil peptides on migration and replication in primary oxyntic cultures. *Am. J. Physiol.* **276**, G1105–1116 (1999).
  56. Rieder, F., Brenmoehl, J., Leeb, S., Schölmerich, J. & Rogler, G. Wound healing and fibrosis in intestinal disease. *Gut* **56**, 130–139 (2007).
  57. Lacy, E. R. Epithelial Restitution in the Gastrointestinal Tract. *Journal of Clinical Gastroenterology December 1988* 72–77 (1988).
  58. Ridley, A. J. *et al.* Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**, 1704–1709 (2003).
  59. Schwab, A., Hanley, P., Fabian, A. & Stock, C. Potassium channels keep mobile cells on the go. *Physiology (Bethesda)* **23**, 212–220 (2008).
  60. Knight, B. *et al.* Visualizing muscle cell migration in situ. *Current Biology* **10**, 576–585 (2000).
  61. Itoh, R. E. *et al.* Activation of Rac and Cdc42 Video Imaged by Fluorescent Resonance Energy Transfer-Based Single-Molecule Probes in the Membrane of Living Cells. *Mol Cell Biol* **22**, 6582–6591 (2002).
  62. Srinivasan, S. *et al.* Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol* **160**, 375–385 (2003).
  63. Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629–635 (2002).
  64. Rodriguez, O. C. *et al.* Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* **5**, 599–609 (2003).
  65. Schwab, A. Ion channels and transporters on the move. *News Physiol. Sci.* **16**, 29–33 (2001).

66. Welch, M. D. & Mullins, R. D. Cellular Control of Actin Nucleation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **18**, 247–288 (2002).
67. Geiger, B. & Bershadsky, A. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Current Opinion in Cell Biology* **13**, 584–592 (2001).
68. Katoh, H. & Negishi, M. RhoG activates Rac1 by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo. *Nature* **424**, 461–464 (2003).
69. Schwab, A. Function and spatial distribution of ion channels and transporters in cell migration. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **280**, F739–747 (2001).
70. Xu, J. *et al.* Divergent Signals and Cytoskeletal Assemblies Regulate Self-Organizing Polarity in Neutrophils. *Cell* **114**, 201–214 (2003).
71. Worthylake, R. A. & Burridge, K. RhoA and ROCK Promote Migration by Limiting Membrane Protrusions. *J. Biol. Chem.* **278**, 13578–13584 (2003).
72. Schmidt, R. F., Lang, F. & Heckmann, M. *Physiologie des Menschen*. (Springer Verlag: 2011)
73. Doyle, D. A. *et al.* The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K<sup>+</sup> Conduction and Selectivity. *Science* **280**, 69–77 (1998).
74. Kubo, Y. *et al.* International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and Molecular Relationships of Inwardly Rectifying Potassium Channels. *Pharmacol Rev* **57**, 509–526 (2005).
75. Goldstein, S. A. N. *et al.* International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and Molecular Relationships of Two-P Potassium Channels. *Pharmacol Rev* **57**, 527–540 (2005).
76. Gutman, G. A. *et al.* International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. *Pharmacol Rev* **57**, 473–508 (2005).
77. Wei, A. D. *et al.* International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and Molecular Relationships of Calcium-Activated Potassium Channels. *Pharmacol Rev* **57**, 463–472 (2005).
78. Lotz, M. M., Wang, H., Song, J. C., Pories, S. E. & Matthews, J. B. K<sup>+</sup> channel inhibition accelerates intestinal epithelial cell wound healing. *Wound Repair Regen* **12**, 565–574 (2004).
79. Shao, Z., Makinde, T. O. & Agrawal, D. K. Calcium-activated potassium channel KCa3.1 in lung dendritic cell migration. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **45**, 962–968 (2011).
80. Rao, J. N. *et al.* Activation of K(+) channels and increased migration of differentiated intestinal epithelial cells after wounding. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **282**, C885–898 (2002).
81. Trinh, N. T. N. *et al.* Involvement of KATP and KvLQT1 K<sup>+</sup> Channels in EGF-Stimulated Alveolar Epithelial Cell Repair Processes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **293**, L870–

- L882 (2007).
82. Weaver, A. K., Bomben, V. C. & Sontheimer, H. Expression and Function of Calcium-Activated Potassium Channels in Human Glioma Cells. *Glia* **54**, 223–233 (2006).
  83. Gómez-Varela, D. *et al.* Monoclonal Antibody Blockade of the Human Eag1 Potassium Channel Function Exerts Antitumor Activity. *Cancer Res* **67**, 7343–7349 (2007).
  84. Bowley, K. A., Morton, M. J., Hunter, M. & Sandle, G. I. Non-genomic regulation of intermediate conductance potassium channels by aldosterone in human colonic crypt cells. *Gut* **52**, 854–860 (2003).
  85. Kunzelmann, K. & Mall, M. Electrolyte Transport in the Mammalian Colon: Mechanisms and Implications for Disease. *Physiol Rev* **82**, 245–289 (2002).
  86. Barrett, K. E. Positive and negative regulation of chloride secretion in T84 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **265**, C859–C868 (1993).
  87. Seidler, U. *et al.* Molecular Mechanisms of Disturbed Electrolyte Transport in Intestinal Inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1072**, 262–275 (2006).
  88. Al-Hazza, A. *et al.* Potential role of reduced basolateral potassium (IKCa3.1) channel expression in the pathogenesis of diarrhoea in ulcerative colitis. *The Journal of Pathology* **226**, 463–470 (2012).
  89. Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. Cell signaling by receptor-tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117–1134 (2010).
  90. Löffler, G., Petrides, P. E. & Heinrich, P. C. *Biochemie und Pathobiochemie*. (Springer Verlag: Heidelberg, 2007)
  91. Sibilina, M. *et al.* The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Differentiation* **75**, 770–787 (2007).
  92. Hers, I., Vincent, E. E. & Tavaré, J. M. Akt signalling in health and disease. *Cellular Signalling* **23**, 1515–1527 (2011).
  93. Manning, B. D. & Cantley, L. C. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* **129**, 1261–1274 (2007).
  94. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. & Sabatini, D. M. Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science* **307**, 1098–1101 (2005).
  95. Frias, M. A. *et al.* mSin1 Is Necessary for Akt/PKB Phosphorylation, and Its Isoforms Define Three Distinct mTORC2s. *Current Biology* **16**, 1865–1870 (2006).
  96. Haar, E. V., Lee, S., Bandhakavi, S., Griffin, T. J. & Kim, D.-H. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nature Cell Biology* **9**, 316–323 (2007).
  97. Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J. & Guan, K.-L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology* **4**, 648–657 (2002).
  98. Zhang, Y. *et al.* Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nature Cell Biology* **5**, 578–581 (2003).
  99. Yoeli-Lerner, M. & Toker, A. Akt/PKB Signaling in Cancer: A Function in Cell Motility and

- Invasion. *Cell Cycle* **5**, 603–605 (2006).
- 100.** Irie, H. Y. *et al.* Distinct Roles of Akt1 and Akt2 in Regulating Cell Migration and Epithelial–mesenchymal Transition. *J Cell Biol* **171**, 1023–1034 (2005).
- 101.** Zhou, G.-L. *et al.* Opposing Roles for Akt1 and Akt2 in Rac/Pak Signaling and Cell Migration. *J. Biol. Chem.* **281**, 36443–36453 (2006).
- 102.** Chang, L. & Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**, 37–40 (2001).
- 103.** Pearson, G. *et al.* Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Reviews* **22**, 153–183 (2001).
- 104.** Schlessinger, J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* **103**, 211–225 (2000).
- 105.** Seki, E., Brenner, D. A. & Karin, M. A liver full of JNK: signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches. *Gastroenterology* **143**, 307–320 (2012).
- 106.** Sabapathy, K. Role of the JNK pathway in human diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci* **106**, 145–169 (2012).
- 107.** Feng, Y. J. & Li, Y. Y. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *J Dig Dis* **12**, 327–332 (2011).
- 108.** Bonni, A. *et al.* Cell Survival Promoted by the Ras-MAPK Signaling Pathway by Transcription-Dependent and -Independent Mechanisms. *Science* **286**, 1358–1362 (1999).
- 109.** Seger, R. & Krebs, E. G. The MAPK Signaling Cascade. *FASEB J* **9**, 726–735 (1995).
- 110.** Ghoreschi, K., Laurence, A. & O’Shea, J. J. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunological Reviews* **228**, 273–287 (2009).
- 111.** Haura, E. B., Zheng, Z., Song, L., Cantor, A. & Bepler, G. Activated Epidermal Growth Factor Receptor–Stat-3 Signaling Promotes Tumor Survival In Vivo in Non–Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* **11**, 8288–8294 (2005).
- 112.** Harrison, D. A. The JAK/STAT Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, (2012).
- 113.** Jorissen, R. N. *et al.* Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Experimental Cell Research* **284**, 31–53 (2003).
- 114.** Scaltriti, M. & Baselga, J. The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway: A Model for Targeted Therapy. *Clin Cancer Res* **12**, 5268–5272 (2006).
- 115.** Pandiella, A., Magni, M., Lovisolo, D. & Meldolesi, J. The effect of epidermal growth factor on membrane potential. Rapid hyperpolarization followed by persistent fluctuations. *J. Biol. Chem.* **264**, 12914–12921 (1989).
- 116.** Bowlby, M. R., Fadool, D. A., Holmes, T. C. & Levitan, I. B. Modulation of the Kv1.3 potassium channel by receptor tyrosine kinases. *J. Gen. Physiol.* **110**, 601–610 (1997).
- 117.** Wang, L., Xu, B., White, R. E. & Lu, L. Growth factor-mediated K<sup>+</sup> channel activity associated with human myeloblastic ML-1 cell proliferation. *Am. J. Physiol.* **273**, C1657–

- 1665 (1997).
118. Roderick, C., Reinach, P. S., Wang, L. & Lu, L. Modulation of rabbit corneal epithelial cell proliferation by growth factor-regulated K(+) channel activity. *J. Membr. Biol.* **196**, 41–50 (2003).
119. Quaroni, A. & Isselbacher, K. J. Cytotoxic effects and metabolism of benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in duodenal and ileal epithelial cell cultures. *J. Natl. Cancer Inst.* **67**, 1353–1362 (1981).
120. Znalesniak, E. B., Dürer, U. & Hoffmann, W. Expression profiling of stationary and migratory intestinal epithelial cells after in vitro wounding: restitution is accompanied by cell differentiation. *Cell. Physiol. Biochem.* **24**, 125–132 (2009).
121. Bulut, K. *et al.* Glucagon like peptide-2 induces intestinal restitution through VEGF release from subepithelial myofibroblasts. *Eur. J. Pharmacol.* **578**, 279–285 (2008).
122. McCormack, S. A., Viar, M. J. & Johnson, L. R. Migration of IEC-6 Cells: A Model for Mucosal Healing. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **263**, G426–G435 (1992).
123. Dignass, A., Lynch-Devaney, K., Kindon, H., Thim, L. & Podolsky, D. K. Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway. *Journal of Clinical Investigation* **94**, 376–383 (1994).
124. Scharl, M. *et al.* Protection of epithelial barrier function by the Crohn's disease associated gene, protein tyrosine phosphatase N2. *Gastroenterology* **137**, 2030–2040.e5 (2009).
125. Scharl, M., Paul, G., Barrett, K. E. & McCole, D. F. AMP-activated Protein Kinase Mediates the Interferon- $\gamma$ -induced Decrease in Intestinal Epithelial Barrier Function. *J Biol Chem* **284**, 27952–27963 (2009).
126. Dürer, U., Hartig, R., Bang, S., Thim, L. & Hoffmann, W. TFF3 and EGF induce different migration patterns of intestinal epithelial cells in vitro and trigger increased internalization of E-cadherin. *Cell. Physiol. Biochem.* **20**, 329–346 (2007).
127. Znalesniak, E. B. & Hoffmann, W. Modulation of cell-cell contacts during intestinal restitution in vitro and effects of epidermal growth factor (EGF). *Cell. Physiol. Biochem.* **25**, 533–542 (2010).
128. Hoeck, K. Die fibroblastenvermittelten Effekte sensorischer Neuropeptide auf die intestinale Epithelzellrestitution in vitro.  
<<http://www-brs.ub.ruhr-uni-bochum.de/netahtml/HSS/Diss/HoeckKaroline/>>
129. Vincentini, O., Ciotta, C., Bignami, M., Stamatii, A. & Zucco, F. Normal rat intestinal cells IEC-18: characterization and transfection with immortalizing oncogenes. *Cytotechnology* **21**, 11–19 (1996).
130. Barmeyer, C. *et al.* Cloning and identification of tissue-specific expression of KCNN4 splice variants in rat colon. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **299**, C251–263 (2010).
131. Schultheiss, G., Ribeiro, R., Schäfer, K. H. & Diener, M. Activation of Apical K+ Conductances by Muscarinic Receptor Stimulation in Rat Distal Colon: Fast and Slow



- Components. *Journal of Membrane Biology* **195**, 183–196 (2003).
- 132.** Vallon, V. *et al.* KCNQ1-dependent transport in renal and gastrointestinal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17864–17869 (2005).
- 133.** MacVinish, L. J., Keogh, J. & Cuthbert, A. W. EBIO, an agent causing maintained epithelial chloride secretion by co-ordinate actions at both apical and basolateral membranes. *Pflugers Arch.* **443 Suppl 1**, S127–131 (2001).
- 134.** Trinh, N. T. N., Privé, A., Maillé, E., Noël, J. & Brochiero, E. EGF and K<sup>+</sup> channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **295**, L866–880 (2008).
- 135.** Tong, Q. *et al.* Interferon- $\gamma$  Inhibits T84 Epithelial Cell Migration by Redirecting Transcytosis of B1 Integrin from the Migrating Leading Edge. *J Immunol* **175**, 4030–4038 (2005).
- 136.** Chen, H.-C. Boyden chamber assay. *Methods Mol. Biol.* **294**, 15–22 (2005).
- 137.** Smith, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**, 76–85 (1985).
- 138.** Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. , *Published online: 15 August 1970; | doi:10.1038/227680a0* **227**, 680–685 (1970).
- 139.** Hachmann, J. P. & Amshey, J. W. Models of protein modification in Tris–glycine and neutral pH Bis–Tris gels during electrophoresis: Effect of gel pH. *Analytical Biochemistry* **342**, 237–245 (2005).
- 140.** Blum, L. J. *Bio- and Chemi-Luminescent Sensors* 51–53 (1997).
- 141.** Mullis, K. B. & Faloona, F. A. [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Recombinant DNA Part F Volume* **155**, 335–350 (1987).
- 142.** Da Violante, G. *et al.* Evaluation of the Cytotoxicity Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 Colon Tumor Cell Cultures. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **25**, 1600–1603 (2002).
- 143.** Brown, K. D. The epidermal growth factor/transforming growth factor-alpha family and their receptors. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **7**, 914–922 (1995).
- 144.** Beck, P. L. & Podolsky, D. K. Growth factors in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **5**, 44–60 (1999)
- 145.** Wong, W.-M. & Wright, N. A. Epidermal Growth Factor, Epidermal Growth Factor Receptors, Intestinal Growth, and Adaptation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **23**, S83–S88 (1999).
- 146.** Sturm, A. & Dignass, A. U. Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* **14**, 348–353 (2008).
- 147.** Madara, J. L. & Stafford, J. Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *Journal of Clinical Investigation* **83**, 724–727 (1989).

148. Sugi\*, K., Musch\*, M. W., Field†, M. & Chang\*, E. B. Inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase by interferon  $\gamma$  down-regulates intestinal epithelial transport and barrier function. *Gastroenterology* **120**, 1393–1403 (2001).
149. Wang, F. *et al.* IFN- $\gamma$ -Induced TNFR2 Expression Is Required for TNF-Dependent Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction. *Gastroenterology* **131**, 1153–1163 (2006).
150. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H. & Tomic-Canic, M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* **16**, 585–601 (2008).
151. Gordon, P. V., Paxton, J. B. & Fox, N. S. A methodology for distinguishing divergent cell fates within a common progenitor population: adenoma- and neuroendocrine-like cells are confounders of rat ileal epithelial cell (IEC-18) culture. *BMC Cell Biol* **6**, 2 (2005).
152. Quaroni, A., Tian, J. Q., Göke, M. & Podolsky, D. K. Glucocorticoids Have Pleiotropic Effects on Small Intestinal Crypt Cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **277**, G1027–G1040 (1999).
153. Shintani, T., Fushiki, T., Fukuoka, S., Takahashi-Iwanaga, H. & Sugimoto, E. Differentiation of intestinal epithelial cell line (IEC-18) by an acid extract of rat small intestine. *FEBS Letters* **255**, 423–426 (1989).
154. Basalingappa, K. M., Rajendran, V. M. & Wonderlin, W. F. Characteristics of Kcnn4 Channels in the Apical Membranes of an Intestinal Epithelial Cell Line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **301**, G905–G911 (2011).
155. Sutherland, D. B., Varilek, G. W. & Neil, G. A. Identification and Characterization of the Rat Intestinal Epithelial Cell (IEC-18) Interleukin-1 Receptor. *Am J Physiol Cell Physiol* **266**, C1198–C1203 (1994).
156. Ma, T. Y., Hollander, D., Bhalla, D., Nguyen, H. & Krugliak, P. IEC-18, a nontransformed small intestinal cell line for studying epithelial permeability. *J. Lab. Clin. Med.* **120**, 329–341 (1992).
157. Poritz, L. S., Harris, L. R., 3rd, Kelly, A. A. & Koltun, W. A. Increase in the tight junction protein claudin-1 in intestinal inflammation. *Dig. Dis. Sci.* **56**, 2802–2809 (2011).
158. Basavappa, S. *et al.* Chloride channels in the small intestinal cell line IEC-18. *Journal of Cellular Physiology* **202**, 21–31 (2005).
159. Coon, S., Kekuda, R., Saha, P. & Sundaram, U. Reciprocal regulation of the primary sodium absorptive pathways in rat intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **300**, C496–C505 (2011).
160. Hao, F. *et al.* Protein Kinase C $\alpha$  Signaling Regulates Inhibitor of DNA Binding 1 in the Intestinal Epithelium. *J. Biol. Chem.* **286**, 18104–18117 (2011).
161. Sinnott-Smith, J. *et al.* Protein Kinase D1 Mediates Stimulation of DNA Synthesis and Proliferation in Intestinal Epithelial IEC-18 Cells and in Mouse Intestinal Crypts. *J. Biol. Chem.* **286**, 511–520 (2011).
162. López-Posadas, R. *et al.* Flavonoids exert distinct modulatory actions on cyclooxygenase

- 2 and NF- $\kappa$ B in an intestinal epithelial cell line (IEC18). *Br J Pharmacol* **160**, 1714–1726 (2010).
- 163.** Nakajima, M. *et al.* Lactoferrin as a suppressor of cell migration of gastrointestinal cell lines. *J. Cell. Physiol.* **170**, 101–105 (1997).
- 164.** Bulut, K. *et al.* Glucagon-like peptide 2 improves intestinal wound healing through induction of epithelial cell migration in vitro—evidence for a TGF- $\beta$ -mediated effect. *Regulatory Peptides* **121**, 137–143 (2004).
- 165.** Bulut, K. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) ameliorates intestinal epithelial injury in vitro in IEC-18 and Caco-2 monolayers via induction of TGF- $\beta$  release from epithelial cells. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **41**, 687–692 (2006).
- 166.** Felderbauer, P. *et al.* Substance P induces intestinal wound healing via fibroblasts—evidence for a TGF- $\beta$ -dependent effect. *Int J Colorectal Dis* **22**, 1475–1480 (2007).
- 167.** Göke, M., Zuk, A. & Podolsky, D. K. Regulation and Function of Extracellular Matrix Intestinal Epithelial Restitution in Vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **271**, G729–G740 (1996).
- 168.** Göke, M., Kanai, M., Lynch–Devaney, K. & Podolsky, D. K. Rapid mitogen-activated protein kinase activation by transforming growth factor  $\alpha$  in wounded rat intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **114**, 697–705 (1998).
- 169.** Liang, C.-C., Park, A. Y. & Guan, J.-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols* **2**, 329–333 (2007).
- 170.** Yarrow, J. C., Perlman, Z. E., Westwood, N. J. & Mitchison, T. J. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. *BMC Biotechnol* **4**, 21 (2004).
- 171.** Menon, M. B., Ronkina, N., Schwermann, J., Kotlyarov, A. & Gaestel, M. Fluorescence-based quantitative scratch wound healing assay demonstrating the role of MAPKAPK-2/3 in fibroblast migration. *Cell Motil. Cytoskeleton* **66**, 1041–1047 (2009).
- 172.** Göke, M. N. *et al.* Trefoil Peptides Promote Restitution of Wounded Corneal Epithelial Cells. *Experimental Cell Research* **264**, 337–344 (2001).
- 173.** Matsubayashi, Y., Razzell, W. & Martin, P. ‘White wave’ analysis of epithelial scratch wound healing reveals how cells mobilise back from the leading edge in a myosin-II-dependent fashion. *J Cell Sci* **124**, 1017–1021 (2011).
- 174.** Friedl, P. Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Current Opinion in Cell Biology* **16**, 14–23 (2004).
- 175.** Dong, H., Smith, A., Hovaida, M. & Chow, J. Y. Role of Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels in Duodenal Mucosal Ion Transport and Bicarbonate Secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**, G1120–G1128 (2006).
- 176.** Rufo, P. A. *et al.* The antifungal antibiotic, clotrimazole, inhibits chloride secretion by

- human intestinal T84 cells via blockade of distinct basolateral K<sup>+</sup> conductances. Demonstration of efficacy in intact rabbit colon and in an in vivo mouse model of cholera. *J Clin Invest* **100**, 3111–3120 (1997).
- 177.** Devor, D. C., Singh, A. K., Gerlach, A. C., Frizzell, R. A. & Bridges, R. J. Inhibition of Intestinal Cl<sup>-</sup> Secretion by Clotrimazole: Direct Effect on Basolateral Membrane K<sup>+</sup> Channels. *Am J Physiol Cell Physiol* **273**, C531–C540 (1997).
- 178.** Fowler, S. M. *et al.* Amino Acid 305 Determines Catalytic Center Accessibility in CYP3A4. *Biochemistry* **39**, 4406–4414 (2000).
- 179.** Wulff, H. *et al.* Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel, IKCa1: A potential immunosuppressant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8151–8156 (2000).
- 180.** Pillozzi, S. *et al.* VEGFR-1 (FLT-1), B1 Integrin, and hERG K<sup>+</sup> Channel for a Macromolecular Signaling Complex in Acute Myeloid Leukemia: Role in Cell Migration and Clinical Outcome. *Blood* **110**, 1238–1250 (2007).
- 181.** Levite, M. *et al.* Extracellular K<sup>+</sup> and Opening of Voltage-Gated Potassium Channels Activate T Cell Integrin Function. *J Exp Med* **191**, 1167–1176 (2000).
- 182.** Artym, V. V. & Petty, H. R. Molecular Proximity of Kv1.3 Voltage-gated Potassium Channels and  $\beta$ 1-Integrins on the Plasma Membrane of Melanoma Cells. *J Gen Physiol* **120**, 29–37 (2002).
- 183.** Cherubini, A. *et al.* Human ether-a-go-go-related Gene 1 Channels Are Physically Linked to  $\beta$ 1 Integrins and Modulate Adhesion-dependent Signaling. *Mol Biol Cell* **16**, 2972–2983 (2005).
- 184.** Rezzonico, R. *et al.* Focal Adhesion Kinase pp125FAK Interacts With the Large Conductance Calcium-Activated hSlo Potassium Channel in Human Osteoblasts: Potential Role in Mechanotransduction. *Journal of Bone and Mineral Research* **18**, 1863–1871 (2003).
- 185.** deHart, G. W., Jin, T., McCloskey, D. E., Pegg, A. E. & Sheppard, D. The  $\alpha$ 9 $\beta$ 1 integrin enhances cell migration by polyamine-mediated modulation of an inward-rectifier potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 7188–7193 (2008).
- 186.** Arcangeli, A. & Becchetti, A. Complex functional interaction between integrin receptors and ion channels. *Trends in Cell Biology* **16**, 631–639 (2006).
- 187.** Tahara, S. *et al.* Potassium channel blocker activates extracellular signal-regulated kinases through Pyk2 and epidermal growth factor receptor in rat cardiomyocytes. *J. Am. Coll. Cardiol.* **38**, 1554–1563 (2001).
- 188.** Jin, M., Defoe, D. M. & Wondergem, R. Hepatocyte growth factor/scatter factor stimulates Ca<sup>2+</sup>-activated membrane K<sup>+</sup> current and migration of MDCK II cells. *J. Membr. Biol.* **191**, 77–86 (2003).
- 189.** Sones, W., Leblanc, N. & Greenwood, I. Inhibition of vascular calcium-gated chloride

- currents by blockers of KCa1.1, but not by modulators of KCa2.1 or KCa2.3 channels. *Br J Pharmacol* **158**, 521–531 (2009).
- 190.** Nechyporuk-Zloy, V., Stock, C., Schillers, H., Oberleithner, H. & Schwab, A. Single plasma membrane K<sup>+</sup> channel detection by using dual-color quantum dot labeling. *Am J Physiol Cell Physiol* **291**, C266–C269 (2006).
- 191.** Schwab, A. *et al.* Subcellular distribution of calcium-sensitive potassium channels (IK1) in migrating cells. *J. Cell. Physiol.* **206**, 86–94 (2006).
- 192.** Schwab, A. *et al.* Dynamic redistribution of calcium sensitive potassium channels (hK(Ca)3.1) in migrating cells. *J. Cell. Physiol.* **227**, 686–696 (2012).
- 193.** Brundage, R. A., Fogarty, K. E., Tuft, R. A. & Fay, F. S. Calcium gradients underlying polarization and chemotaxis of eosinophils. *Science* **254**, 703–706 (1991).
- 194.** Xu, H. *et al.* Calcium signaling in chemorepellant Slit2-dependent regulation of neuronal migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4296–4301 (2004).
- 195.** Sánchez-Madrid, F. & del Pozo, M. A. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J* **18**, 501–511 (1999).
- 196.** Wei, C. *et al.* Calcium flickers steer cell migration. *Nature* **457**, 901–905 (2008).
- 197.** Evans, J. H. & Falke, J. J. Ca<sup>2+</sup> influx is an essential component of the positive-feedback loop that maintains leading-edge structure and activity in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 16176–16181 (2007).
- 198.** Sciacaluga, M. *et al.* CXCL12-induced glioblastoma cell migration requires intermediate conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel activity. *Am J Physiol Cell Physiol* **299**, C175–C184 (2010).
- 199.** Schwab, A., Schuricht, B., Seeger, P., Reinhardt, J. & Dartsch, P. C. Migration of transformed renal epithelial cells is regulated by K<sup>+</sup> channel modulation of actin cytoskeleton and cell volume. *Pflugers Arch.* **438**, 330–337 (1999).
- 200.** Tharp, D. L., Wamhoff, B. R., Turk, J. R. & Bowles, D. K. Upregulation of intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel (IKCa1) mediates phenotypic modulation of coronary smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H2493–H2503 (2006).
- 201.** Schwab, A., Reinhardt, J., Schneider, S. W., Gassner, B. & Schuricht, B. K(+) channel-dependent migration of fibroblasts and human melanoma cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **9**, 126–132 (1999).
- 202.** Schneider, S. W. *et al.* Volume dynamics in migrating epithelial cells measured with atomic force microscopy. *Pflugers Arch.* **439**, 297–303 (2000).
- 203.** Wang, J.-Y. *et al.* Role of K<sup>+</sup> channel expression in polyamine-dependent intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**, C303–C314 (2000).
- 204.** Nelson, M. T. & Quayle, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **268**, C799–822 (1995).
- 205.** Gray, L. S., Gnarr, J. R., Russell, J. H. & Engelhard, V. H. The role of K<sup>+</sup> in the

- regulation of the increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> mediated by the T lymphocyte antigen receptor. *Cell* **50**, 119–127 (1987).
- 206.** Lomax, R. B., Warhurst, G. & Sandle, G. I. Characteristics of two basolateral potassium channel populations in human colonic crypts. *Gut* **38**, 243–247 (1996).
- 207.** Sandle, G. I., McNicholas, C. M. & Lomax, R. B. Potassium channels in colonic crypts. *The Lancet* **343**, 23–25 (1994).
- 208.** Nelson, M. T., Patlak, J. B., Worley, J. F. & Standen, N. B. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol Cell Physiol* **259**, C3–C18 (1990).
- 209.** McCaig, C. D., Rajnicek, A. M., Song, B. & Zhao, M. Controlling Cell Behavior Electrically: Current Views and Future Potential. *Physiol Rev* **85**, 943–978 (2005).
- 210.** Wang, Q. *et al.* Salt- And Angiotensin II-Dependent Variations In Amiloride-Sensitive Rectal Potential Difference In Mice. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **27**, 60–66 (2000).
- 211.** Kraft, R. *et al.* BK channel openers inhibit migration of human glioma cells. *Pflugers Arch.* **446**, 248–255 (2003).
- 212.** Meyer, R., Schönherr, R., Gavrilo-Ruch, O., Wohlrab, W. & Heinemann, S. H. Identification of ether à go-go and calcium-activated potassium channels in human melanoma cells. *J. Membr. Biol.* **171**, 107–115 (1999).
- 213.** Syme, C. A., Gerlach, A. C., Singh, A. K. & Devor, D. C. Pharmacological activation of cloned intermediate- and small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**, C570–C581 (2000).
- 214.** Joiner, W. J. *et al.* Active K<sup>+</sup> secretion through multiple KCa-type channels and regulation by IKCa channels in rat proximal colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **285**, G185–196 (2003).
- 215.** Potier, M. *et al.* Identification of SK3 channel as a new mediator of breast cancer cell migration. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 2946–2953 (2006).
- 216.** Zizzo, M. G., Bonomo, A., Belluardo, N., Mulè, F. & Serio, R. A1 receptors mediate adenosine inhibitory effects in mouse ileum via activation of potassium channels. *Life Sciences* **84**, 772–778 (2009).
- 217.** Grissmer, S. *et al.* Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K<sup>+</sup> channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol. Pharmacol.* **45**, 1227–1234 (1994).
- 218.** Freeman, L. *et al.* Depolarization and decreased surface expression of K<sup>+</sup> channels contribute to NSAID-inhibition of intestinal restitution. *Biochem Pharmacol* **74**, 74–85 (2007).
- 219.** Natile-McMenemy, N., Eifenbein, A. & DeLeo, J. A. Minocycline decreases in vitro microglial motility,  $\beta$ 1-integrin, and Kv1.3 channel expression. *Journal of Neurochemistry*

- 103**, 2035–2046 (2007).
- 220.** Veeravalli, K. K. *et al.* Integrin  $\alpha 9\beta 1$ -mediated cell migration in glioblastoma via SSAT and Kir4.2 potassium channel pathway. *Cell. Signal.* **24**, 272–281 (2012).
- 221.** Yamaguchi, H., Pixley, F. & Condeelis, J. Invadopodia and podosomes in tumor invasion. *Eur. J. Cell Biol.* **85**, 213–218 (2006).
- 222.** von Andrian, U. H. & Mackay, C. R. T-Cell Function and Migration — Two Sides of the Same Coin. *New England Journal of Medicine* **343**, 1020–1034 (2000).
- 223.** Luster, A. D., Alon, R. & Andrian, U. H. von Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nature Immunology* **6**, 1182–1190 (2005).
- 224.** Matzner, N. *et al.* Ion Channels Modulating Mouse Dendritic Cell Functions. *J Immunol* **181**, 6803–6809 (2008).
- 225.** Hart, A. L. *et al.* Homing of immune cells: Role in homeostasis and intestinal inflammation. *Inflammatory Bowel Diseases* **16**, 1969–1977 (2010).
- 226.** Grishin, A. *et al.* Attenuation of apoptosis in enterocytes by blockade of potassium channels. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **289**, G815–821 (2005).
- 227.** Bouma, G. & Strober, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology* **3**, 521–533 (2003).
- 228.** Egger, B. *et al.* Characterisation of Acute Murine Dextran Sodium Sulphate Colitis: Cytokine Profile and Dose Dependency. *Digestion* **62**, 240–248 (2000).
- 229.** Ito, R. *et al.* Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice. *Clin Exp Immunol* **146**, 330–338 (2006).
- 230.** Paul, G., Marchelletta, R. R., McCole, D. F. & Barrett, K. E. Interferon- $\gamma$  Alters Downstream Signaling Originating from Epidermal Growth Factor Receptor in Intestinal Epithelial Cells FUNCTIONAL CONSEQUENCES FOR ION TRANSPORT. *J. Biol. Chem.* **287**, 2144–2155 (2012).
- 231.** Uribe, J. M., McCole, D. F. & Barrett, K. E. Interferon-gamma activates EGF receptor and increases TGF- $\alpha$  in T84 cells: implications for chloride secretion. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **283**, G923–931 (2002).
- 232.** Watson, C. J., Hoare, C. J., Garrod, D. R., Carlson, G. L. & Warhurst, G. Interferon- $\gamma$  Selectively Increases Epithelial Permeability to Large Molecules by Activating Different Populations of Paracellular Pores. *J Cell Sci* **118**, 5221–5230 (2005).
- 233.** Youakim, A. & Ahdieh, M. Interferon- $\gamma$  Decreases Barrier Function in T84 Cells by Reducing ZO-1 Levels and Disrupting Apical Actin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **276**, G1279–G1288 (1999).
- 234.** Utech, M. *et al.* Mechanism of IFN- $\gamma$ -Induced Endocytosis of Tight Junction Proteins: Myosin II-Dependent Vacuolarization of the Apical Plasma Membrane. *Mol. Biol. Cell* **16**, 5040–5052 (2005).
- 235.** McKay, D. M. *et al.* Phosphatidylinositol 3'-Kinase Is a Critical Mediator of Interferon- $\gamma$ -

- Induced Increases in Enteric Epithelial Permeability. *J Pharmacol Exp Ther* **320**, 1013–1022 (2007).
- 236.** Boivin, M. A. *et al.* Mechanism of Interferon- $\gamma$ -Induced Increase in T84 Intestinal Epithelial Tight Junction. *J Interferon Cytokine Res* **29**, 45–54 (2009).
- 237.** Zeissig, S. *et al.* Changes in Expression and Distribution of Claudin 2, 5 and 8 Lead to Discontinuous Tight Junctions and Barrier Dysfunction in Active Crohn's Disease. *Gut* **56**, 61–72 (2007).
- 238.** Hoffmann, P., Sturm, A., Stein, J. & Dignass, A. U. Interferon- $\gamma$  modulates intestinal epithelial cell function in-vitro through a TGF $\beta$ -dependent mechanism. *Regul. Pept.* **168**, 27–31 (2011).
- 239.** Dignass, A. U. & Podolsky, D. K. Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor beta. *Gastroenterology* **105**, 1323–1332 (1993).
- 240.** Leaphart, C. L. *et al.* Interferon- $\gamma$  inhibits Intestinal Restitution by Preventing Gap Junction Communication Between Enterocytes. *Gastroenterology* **132**, 2395–2411 (2007).
- 241.** Leaphart, C. L. *et al.* Interferon- $\gamma$  Inhibits Enterocyte Migration by Reversibly Displacing Connexin43 from Lipid Rafts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **295**, G559–G569 (2008).
- 242.** Burova, E., Vassilenko, K., Dorosh, V., Gonchar, I. & Nikolsky, N. Interferon gamma-dependent transactivation of epidermal growth factor receptor. *FEBS Lett.* **581**, 1475–1480 (2007).
- 243.** Frey, M. R., Golovin, A. & Polk, D. B. Epidermal Growth Factor-Stimulated Intestinal Epithelial Cell Migration Requires Src Family Kinase-Dependent P38 MAPK Signaling. *J. Biol. Chem.* **279**, 44513–44521 (2004).
- 244.** Cao, L. *et al.* Downregulation of PTEN at Corneal Wound Sites Accelerates Wound Healing through Increased Cell Migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**, 2272–2278 (2011).
- 245.** Wang, Y., Sheng, Q., Spillman, M. A., Behbakht, K. & Gu, H. Gab2 regulates the migratory behaviors and E-cadherin expression via activation of the PI3K pathway in ovarian cancer cells. *Oncogene* (2011).doi:10.1038/onc.2011.435
- 246.** Horst, B. *et al.* Gab2-Mediated Signaling Promotes Melanoma Metastasis. *The American Journal of Pathology* **174**, 1524–1533 (2009).
- 247.** Chen, L. *et al.* PLA2 and PI3K/PTEN pathways act in parallel to mediate chemotaxis. *Dev. Cell* **12**, 603–614 (2007).
- 248.** Merlot, S. & Firtel, R. A. Leading the way: Directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways. *J. Cell. Sci.* **116**, 3471–3478 (2003).
- 249.** Schmidt, C., Höcherl, K., Schweda, F., Kurtz, A. & Bucher, M. Regulation of Renal Sodium Transporters During Severe Inflammation. *JASN* **18**, 1072–1083 (2007).



- 250.** Bertelsen, L. S., Eckmann, L. & Barrett, K. E. Prolonged Interferon- $\gamma$  Exposure Decreases Ion Transport, NKCC1, and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase Expression in Human Intestinal Xenografts in Vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**, G157–G165 (2004).
- 251.** Arraiano, C. M. *et al.* The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression. *FEMS Microbiology Reviews* **34**, 883–923 (2010).
- 252.** Ayabe, T. *et al.* Modulation of mouse Paneth cell alpha-defensin secretion by mlKCa1, a Ca<sup>2+</sup>-activated, intermediate conductance potassium channel. *J. Biol. Chem.* **277**, 3793–3800 (2002).
- 253.** Simms, L. A. *et al.* KCNN4 gene variant is associated with ileal Crohn's Disease in the Australian and New Zealand population. *Am. J. Gastroenterol.* **105**, 2209–2217 (2010).
- 254.** Di, L. *et al.* Inhibition of the K<sup>+</sup> channel KCa3.1 ameliorates T cell-mediated colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 1541–1546 (2010).
- 255.** Köhler, R. *et al.* Blockade of the intermediate-conductance calcium-activated potassium channel as a new therapeutic strategy for restenosis. *Circulation* **108**, 1119–1125 (2003).
- 256.** Madsen, L. S., Christophersen, P. & Olesen, S.-P. Blockade of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in T cells: an option for the treatment of multiple sclerosis? *European Journal of Immunology* **35**, 1023–1026 (2005).

## 9 Anhang

### 9.1 Vorträge und Posterpräsentationen

#### Vorträge:

- **S. Zundler**, M. Caioni, C. Hofmann, G. Paul: Potassium ( $K^+$ ) channel inhibition impairs epithelial wound healing in inflammation mediated by epidermal growth factor (EGF) receptor (r) signaling; Digestive Disease Week (DDW); San Diego (05/2012).
- **S. Zundler**: Basolaterale Kaliumkanäle und intestinale Wundheilung von Epithelzellen: EGFr vermittelt gegensätzliche Effekte bei intestinaler Entzündung. Deutsche Arbeitsgemeinschaft Chronische Entzündliche Darmerkrankungen (DACHED); Mainz (06/2011).

#### Poster:

- **S. Zundler**, M. Caioni, C. Hofmann, G. Paul: Modulation der Kaliumkanalaktivität durch epidermalen Wachstumsfaktorezeptor (EGFr) abhängige intrazelluläre Signalwege beeinflusst die intestinale epitheliale Wundheilung im entzündlichen Milieu. 118. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM); Wiesbaden (04/2012)
- **S. Zundler**, M. Caioni, C. Hofmann, G. Paul: Basolaterale Kaliumkanäle und intestinale Wundheilung von Epithelzellen: Der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF)-rezeptor (EGFr) vermittelt gegensätzliche Effekte bei intestinaler Entzündung. 40. Jahrestagung der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern (GFGB); Regensburg (10/2011).
- **S. Zundler**, M. Caioni, C. Hofmann, G. Paul: Basolaterale Kaliumkanäle und intestinale Wundheilung von Epithelzellen: Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF)-rezeptor (EGFr) vermittelt gegensätzliche Effekte bei intestinaler Entzündung. 66. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS); Leipzig (09/2011)

- G. Paul, M. Caioni, **S. Zundler**, K. Brandl, C. Hofmann: Mögliche Rolle von Kaliumkanälen für die erhöhte Suszeptibilität des ENU-induzierten Mausstamms „Velvet“ in Bezug auf die Dextran Natriumsulfat (DSS) induzierte Kolitis. 117. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM); Wiesbaden (05/2011)

## 9.2 Danksagungen

Zum Gelingen meiner Dissertation haben viele Personen beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle sehr herzlich bedanken möchte:

Ich danke Frau Prof. Dr. Martina Müller-Schilling, die mir als Direktorin der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit gegeben und die geplante Publikation der Daten mit wertvollen Tipps unterstützt hat. Auch ihrem Vorgänger Prof. Dr. Jürgen Schölmerich, Lehrstuhlinhaber während der Anfangszeit meiner Doktorarbeit, gebührt an dieser Stelle mein Dank.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Gisela Paul, die meine Dissertation im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Tätigkeit konzipiert, betreut und begleitet hat und mir dabei sowohl große Freiräume gewährt hat als auch bei Fragen und Problemen jederzeit mit Anregungen und Hinweisen hilfreich war.

Ebenfalls danke ich ganz speziell Frau PD Dr. Ulrike Strauch für Ihre Betreuung, die Gutachtertätigkeit sowie die wertvollen Impulse im Rahmen dieser Dissertation.

Herrn PD Dr. Thomas Karrasch möchte ich dafür danken, dass er mir freundlicherweise die verwendete Zelllinie zur Verfügung gestellt und mir viele Tipps gegeben hat.

Des Weiteren sei allen Kollegen aus dem Forschungsbau H1 gedankt. Sie standen mir bei Fragen stets zur Seite und haben immer für eine angenehme Atmosphäre gesorgt. Besonders hervorheben möchte ich Massimiliano Caioni, mit dem gemeinsam ich mir viele Techniken erarbeitet habe, Manuela Stieber-Gunckel, der ich einige CED-Proben verdanke, Dr. Philipp Groß, der mir wichtige Vortrags-Tipps gegeben hat und PD Dr. Claudia Kunst (geb. Hofmann), die bei technischen und wissenschaftlichen Fragen stets ansprechbar war.

Ein weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern aus der Chirurgie und Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg für die Bereitstellung von primärem Darmgewebe.

Zudem danke ich meinen Eltern für deren Unterstützung und die Ermöglichung meines Studiums sowie meiner Frau Mirjam, die trotz der vielen Zeit, die ich in diese Arbeit gesteckt habe, nie die Geduld verloren hat und immer hinter mir stand.

### **9.3 Erklärung zur Promotion**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt

Regensburg, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Sebastian Zundler