

*Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie  
der Universität Würzburg*

*Direktor: Professor Dr. med. Christoph-Thomas Germer*

**Die Bedeutung des neurotrophen Faktors Glial cell line-  
derived neurotrophic factor (GDNF) für die Integrität der  
intestinalen Epithelbarriere**

**Inaugural – Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von  
Lisa Bergauer  
aus Lauf an der Pegnitz

Würzburg, Februar 2017



**Referent:** Priv.-Doz. Dr. med. Nicolas Schlegel

**Korreferent:** Prof. Dr. med. Michael Scheurlen

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.2017**

Die Promovendin ist Ärztin

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Bedeutung der Darmbarriere und klinische Bezüge .....	1
1.2. Aufbau der Darmbarriere .....	4
1.2.1. Komponenten der Barriere und histologischer Wandaufbau des Magen-Darm-Trakts.....	4
1.2.2. Molekularer Aufbau der Zellkontakte .....	6
1.2.3. Einflussfaktoren auf die parazelluläre Permeabilität .....	13
1.3. Enterisches Nervensystem.....	16
1.3.1. Anatomie und Funktion .....	16
1.3.2. Bedeutung der Neurone.....	17
1.3.3. Rolle der enterischen Gliazellen .....	18
1.3.4. Glial cell line-derived neurotrophic factor und Multikomplexrezeptor ....	21
1.3.5. Verhalten der enterischen Glia im Rahmen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen .....	24
1.4. Fragestellung.....	25
2. Material und Methoden.....	27
2.1. Material.....	27
2.1.1. Zellkultur .....	27
2.1.2. Testreagenzien .....	29
2.1.3. Antikörper .....	31
2.1.4. Fluoreszenzfarbstoffe .....	33
2.2. Zellbiologische Methoden.....	34
2.2.1. Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie .....	34
2.2.2. Permeabilitätsmessung mittels Transwellfiltersystem .....	35
2.2.3. Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands.....	37

2.2.4.	Proteinanalyse mittels Western Blot .....	37
2.2.5.	cAMP-Aktivierungssassay .....	42
2.2.6.	In vitro-Wundheilungssassay .....	44
2.2.7.	Evaluation der Zellproliferation mittels DAPI- und Ki67-Färbung .....	45
2.3.	Angaben zur Statistik.....	46
3.	Ergebnisse .....	47
3.1.	Caco2- und HT29B6-Zellen und exprimieren GDNF-Rezeptoren .....	47
3.2.	Enterozyten stellen eine neue GDNF-Quelle dar .....	49
3.3.	Applikation von GDNF hat keinen Einfluss auf die Barriereeigenschaften von ausgereiften Interzellularkontakten.....	50
3.4.	Coinkubation von GDNF mit Cytomix verhindert den Zytokin-induzierten Zusammenbruch der intestinalen Epithelbarriere nicht.....	55
3.5.	Inkubation mit GDNF fördert im präkonfluenten Stadium der Epithelzellen die Ausreifung von Adhärens- und Verschlusskontaktproteinen und verbessert funktionelle Barriereeigenschaften .....	57
3.6.	Behandlung mit GDNF steigert den intrazellulären cAMP-Gehalt und reduziert die Phosphorylierung der p38 MAPK in Caco2-Zellen.....	62
3.7.	Artifizieller Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels bedingt eine erhöhte Permeabilität der Epithelbarriere .....	65
3.8.	GDNF vermittelt die Reifung und Stabilisierung der Barriere via Inaktivierung von p38 MAPK .....	66
3.9.	In vitro beschleunigt GDNF die Wundheilung über eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration von cAMP .....	68
4.	Diskussion .....	73
4.1.	Caco2- und HT29B6-Zellen eignen sich zur Untersuchung der Einflussnahme von GDNF auf intestinales Epithel .....	73
4.2.	GDNF wird von Enterozyten exprimiert .....	75

4.3. GDNF induziert Zellproliferation und führt zur Differenzierung der intestinalen Epithelbarriere in vitro.....	79
4.4. Vermittlung der Wirkung von GDNF über cAMP/PKA- und p38 MAPK-abhängige Signalwege .....	82
5. Zusammenfassung der Ergebnisse .....	85
6. Ausblick.....	87
7. Literaturverzeichnis .....	89
8. Anhang.....	106
8.1. Abkürzungsverzeichnis.....	106
8.2. Abbildungsverzeichnis.....	109
8.3. Tabellenverzeichnis.....	110

## **1. Einleitung**

### **1.1. Bedeutung der Darmbarriere und klinische Bezüge**

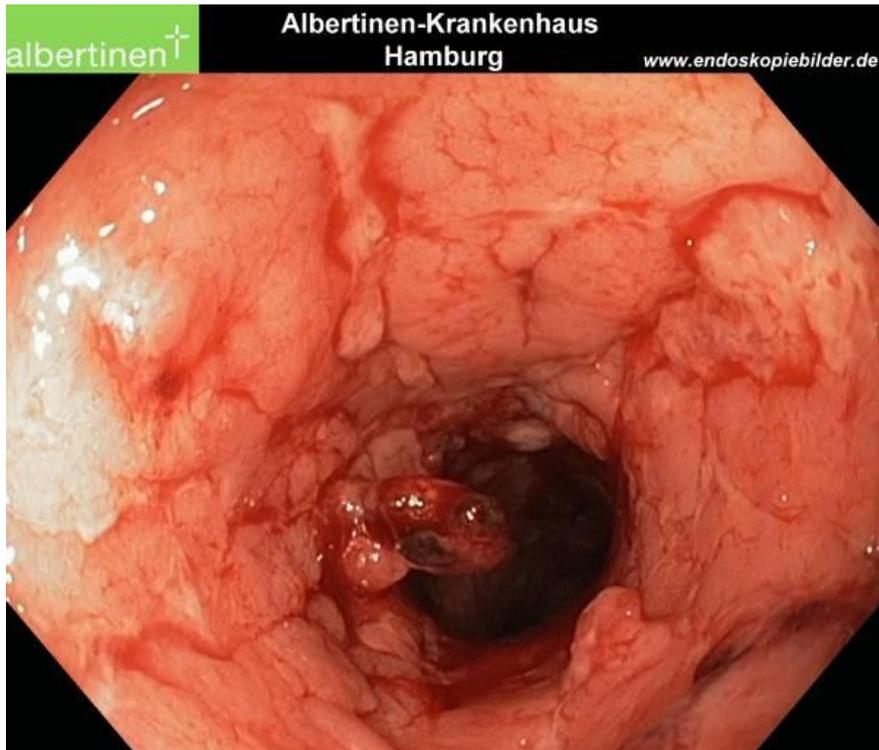
Die größte Grenzfläche zwischen dem Körperinneren und der Umwelt wird durch den Darm gebildet (Neunlist et al., 2013). Diese Grenzfläche ist mit insgesamt 32 Quadratmetern fünfzehnmal größer als die Hautoberfläche und steht im ständigen Kontakt mit der physiologischen Darmflora und Pathogenen, die sich innerhalb des Darmlumens befinden. Es müssen daher über  $10^{14}$  Bakterien, die tausenden Spezies angehören, Pilze, Viren und unzählige Antigene aus der Nahrung an der Passage aus dem Lumen des Darms in das Körperinnere gehindert werden. Diese Barrierefunktion des intestinalen Epithels ist überlebenswichtig und für die Homöostase im Körper entscheidend mitverantwortlich (Helander und Fändriks, 2014, Silbernagl und Despopoulos, 2012).

Zahlreiche Krankheiten wie die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), schwere Verbrennungen, infektiöse Enteritiden oder die nekrotisierende Enterokolitis bei Frühgeborenen (NEC) sind mit einer Störung der intestinalen Barrierefunktion verbunden. Infolge dieser Dysfunktion kann es zunächst zu einer lokalen Entzündung des Gewebes und im Verlauf zu einer Systembeteiligung mit Organschäden kommen (Berkes et al., 2003, Costantini et al., 2009, Kandasamy et al., 2014, Lüllmann-Rauch, 2009, Marchiando et al., 2010, Magnotti und Deitch, 2005).

In Mitteleuropa leiden 100-200 von 100.000 Menschen an einer CED (Gerok et al., 2007), welche in zwei klinische Manifestationsformen eingeteilt werden: Morbus Crohn (MC) und Colitis Ulcerosa (CU) - zwei Erkrankungen für die es keine medikamentöse Heilung gibt. Die Patienten leiden an starken Schmerzen, teils blutigen Durchfällen, Gewichtsverlust und extraintestinalen Manifestationen wie beispielsweise Arthritiden oder Uveitiden. Vor allem CU-Patienten haben ein stark erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms. Zusätzlich wird die Lebensqualität der Patienten bei einer Erkrankung an MC häufig durch rezidivierende Fistelbildung, Abszedierungen und in der Folge auftretende Stenosierungen des Darms massiv reduziert. Trotz intensiver Forschung sind Ätiologie und Pathogenese nicht vollständig aufgeklärt. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass wahrscheinlich sowohl Umweltfaktoren, eine Dysfunktion der Immunantwort als auch genetische

Suszeptibilität in die Pathogenese involviert sind (Edelblum und Turner, 2009, Kirsner, 1991). Interessant ist die Entdeckung, dass Permeabilitätsveränderungen der Darmschleimhaut einer makroskopisch sichtbaren, entzündlichen Veränderung vorausgehen (Peeters et al., 1994, Hollander et al., 1986). Weiterhin ist wichtig, dass die mukosale Abheilung (engl. *mucosal healing*) mit einer deutlichen klinischen Verbesserung der Symptome einhergeht und daher als Therapieziel zur Einleitung einer Remission von CED definiert wurde (Leitlinien zur Behandlung von M. Crohn).

Beide Erkrankungsformen der CED sind charakterisiert durch eine chronische Entzündung verschiedener Abschnitte des Gastrointestinaltrakts. Betroffenes Gewebe zeigt neben einem proinflammatorischen Zytokinmuster, Veränderungen des strukturellen Aufbaus von Tight Junctions (TJ) auch eine veränderte Darmmotilität. Hierdurch kommt es zu einem Verlust der Integrität der Darmbarriere und Ulzerationen (Abb. 1). Dieser pathologische Zustand ermöglicht die Translokation von luminalen Antigenen in die Submukosa. Das führt wiederum zu einer Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrose Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). Diese verstärken den Zusammenbruch der Darmbarriere, sodass es zur weiteren Translokation von Bakterien und anderen Antigenen kommt (Edelblum und Turner, 2009, Salim und Sönderholm, 2011). Es folgt ein sich selbst verstärkender Teufelskreis. Was diesen genau bei CED-Patienten auslöst, ist nicht bekannt. Man muss davon ausgehen, dass es sich um multifaktorielle Ursachen mit großer interindividueller Schwankungsbreite handelt.



**Abbildung 1: Endoskopie-Bild bei florider Colitis Ulcerosa**

Ödematös veränderte Schleimhaut mit Einblutungen und Pseudopolypenbildung als Folge der gestörten Barrierefunktion des intestinalen Epithels.

*Quelle: Dr. med. Joachim Guntau (Albertinen-Krankenhaus, Hamburg); mit freundlicher Genehmigung zur Verwendung.*

Es existieren Hinweise dafür, dass Veränderungen im enterischen Nervensystem als weiterer Faktor an der Pathogenese der intestinalen Barriestörung bei CED beteiligt sein könnten. Insbesondere Gliazellen scheinen eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung einer intakten intestinalen Epithelbarriere im gesunden Darm und deren Modulation im Rahmen einer Inflammation einzunehmen.

## 1.2. Aufbau der Darmbarriere

### 1.2.1. Komponenten der Barriere und histologischer Wandaufbau des Magen-Darm-Trakts

Die Grenze zum Schutz des menschlichen Organismus vor der luminalen Umwelt des Darms besteht aus der lückenlosen Epithelzellschicht der Mukosa und extrazellulären Komponenten. Hervorzuheben ist jedoch, dass die Darmbarriere nicht nur die Aufgabe hat, die Passage von Mikroorganismen und weiteren Antigenen zu verhindern. Vielmehr stellt sie auch die Versorgung der Körpers mit Nährstoffen und Flüssigkeit aus unserer Nahrung sicher. Zur Aufrechterhaltung des sensiblen Gleichgewichts muss das Darmepithel zwei gleichwertige Rollen erfüllen: den Schutz vor schädigenden Einflüssen sowie die selektive Permeabilität.

Der Magen-Darm-Trakt (MDT) ist Teil des Rumpfdarms, dessen Wand in allen Abschnitten grundsätzlich gleich aufgebaut ist (Abb. 2).

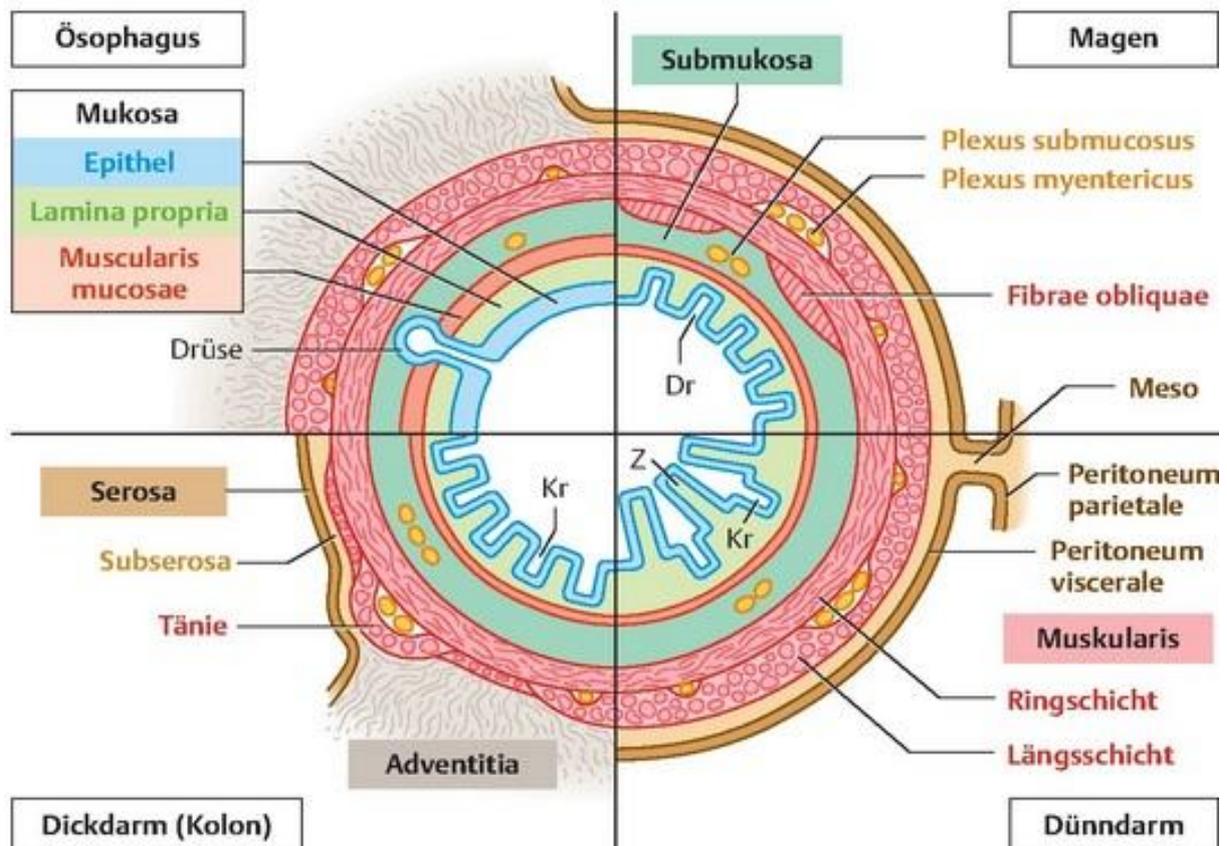


Abbildung 2: Schematische Darstellung des histologischen Aufbaus der Darmwand

Die Querschnitte zeigen den allgemeinen Aufbau der Wand verschiedener Abschnitte des Verdauungskanal. Ösophagus, Dün- und Dickdarm sind regional unterschiedlich entweder von Serosa oder Adventitia umgeben. Der Plexus submucosus und der Plexus myentericus enthalten neben den in Ganglien organisierten neuronalen Zellkörpern auch Nervenfaserbündel, welche die beiden Plexus untereinander verbinden.

Dr: Drüse; Kr: Krypte; Z: Zotte.

Quelle: Taschenlehrbuch Histologie, 4. Auflage, Georg Thieme Verlag

Beginnend im Ösophagus wird der Muskelschlauch bis zum Rektum von einem intramuralen Nervensystem durchzogen, dessen Aufbau und Funktion in der folgenden Arbeit weiter erläutert werden. Daneben finden sich in der Tunica muscularis fibroblastenähnliche Zellen mit elektrischer Spontanaktivität: die interstitiellen Zellen von Cajal (ICC). Sie generieren langsame Depolarisationswellen und steuern so die gastrointestinale Motilität. Regionale Besonderheiten wie beispielsweise Zotten (*Villi intestinales*) im Dünndarm dienen der Oberflächenvergrößerung der Schleimhaut. Vor allem dort finden die Resorptionsvorgänge statt. Zwischen den Basen der Villi münden zahlreiche Krypten. Diese tubulösen Einsenkungen des Epithels gibt es auch im Dickdarm und beherbergen Stammzellen für die Zellregeneration.

Die Darmschleimhaut ist von einer Mukoschicht bedeckt. Muzine, die diese Schicht bilden, sind glykosylierte Proteine, welche von spezialisierten Epithelzellen wie den Becherzellen sezerniert werden und reichlich Wasser binden können. So bildet sich ein visköser Schleimteppich, der den direkten Kontakt von großen Molekülen wie Bakterien mit dem Epithel verhindert. Zudem enthält der Mukos Immunglobulin A (IgA) und weitere antimikrobielle Peptide. Direkt auf der Zelloberfläche befindet sich ein dünner Flüssigkeitsfilm, der sogenannte „*Unstirred layer*“, welcher im Dünndarm die Diffusion von Ionen und kleinen gelösten Stoffen verlangsamt. Die Lamina epithelialis besteht aus einem durchgängigen Monolayer aus einschichtigem Zylinderepithel. Die Plasmamembran der Zellen ist undurchlässig für hydrophile Stoffe. Die parazellulären Zwischenräume sind durch Zell-Zellverbindungen versiegelt. Sogenannte Verschluss- und Adhärenskontakte bilden zusammen mit Desmosomen einen junctionalen Komplex zwischen benachbarten Zellen und

verhindern eine unselektive Passage, sodass die meisten gelösten Stoffe kontrolliert durch Endo- oder Transzytose aufgenommen werden. Jedoch erlauben Verschlusskontakte mit einem bestimmten Proteinmuster einen passiven Übertritt von Molekülen, sodass keine absolute Barriere besteht.

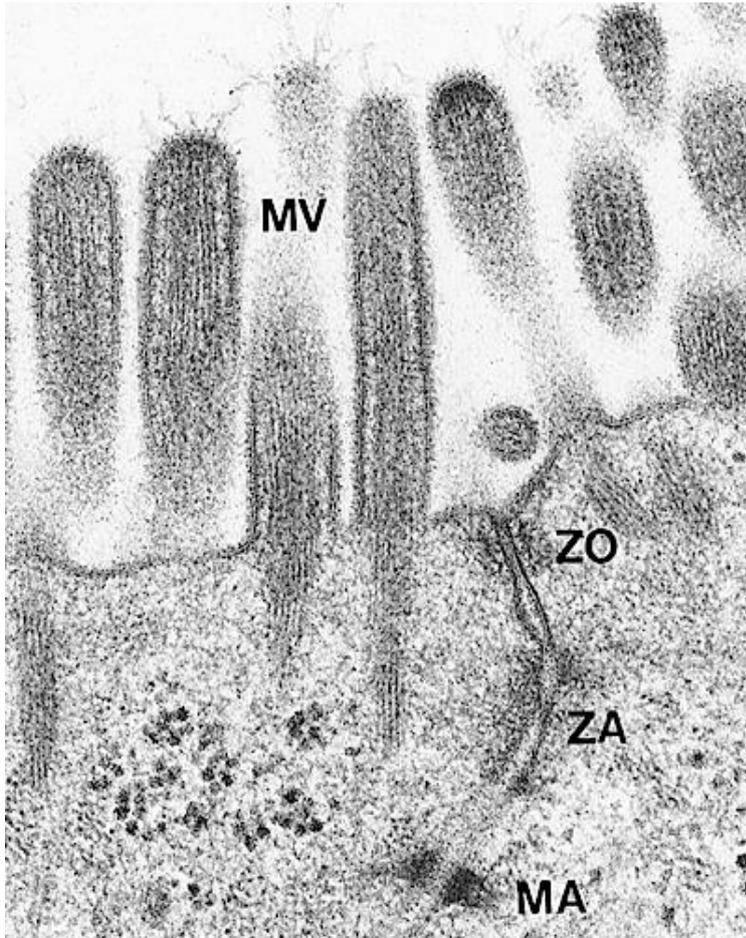
Zudem ist die Epithelzellschicht kein statischer Verbund. Vielmehr besteht ein Gleichgewicht zwischen Neubildung und Aufrechterhaltung, da die Zellen nur eine Lebensdauer von etwa fünf Tagen haben. Orte der Zellerneuerung sind die Krypten. Dort sitzen multipotente Stammzellen, die während ihrer Migration Richtung Villusspitze zu Enterozyten, Becherzellen und endokrinen Zellen differenzieren. Bei Erreichen der Zottenspitze sterben die voll differenzierten Zellen durch Apoptose ab (Drenckhahn und Waschke, 2007, Keita und Sönderholm, 2010, Lüllmann-Rauch, 2009, Marchiando et al., 2010).

### **1.2.2. Molekularer Aufbau der Zellkontakte**

Im folgenden Abschnitt der Arbeit soll die Ultrastruktur und Bedeutung der genannten Zell-Zellkontakte dargestellt werden. Ein Junktionaler Komplex (auch Haft- oder Schlussleistenkomplex genannt) ist typisch für einschichtige Epithelien und setzt sich im MDT von luminal nach basal folgendermaßen zusammen (Abb. 3):

1. Verschlusskontakt/ Tight junction (TJ) zur Versiegelung der Interzellularspalte
2. Adhärenskontakt und
3. Desmosom –

jeweils Haftkontakte für die mechanische Verankerung an der Nachbarzelle.



**Abbildung 3: Schlusleistenkomplex**

Die elektronenmikroskopische Aufnahme eines junctionalen Komplexes zwischen zwei Enterozyten. Deutlich zu erkennen ist die Abfolge der Zell-Zellkontakte von luminal nach basal.

ZO: Zona occludens, Verschlusskontakt; ZA: Zona adherens, Adhärenskontakt; MA: Macula adherens, Desmosom; MV: Mikrovilli.

*Quelle: Roche Lexikon Medizin, 5.Auflage 2006© Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München.*

Diese Kombination von Zellkontakten sichert die Integrität, die mechanische Stabilität und schränkt die parazelluläre Permeabilität der Darmbarriere ein. Zu dem gemeinsamen molekularen Bauprinzip von Tight junctions, Adhärenskontakten und Desmosomen gehört zunächst ein Transmembranprotein, welches mit seiner externen Domäne den Kontakt zur Nachbarzelle herstellt. Intrazellulär ist es über sogenannte Adaptor- oder Plaqueproteine an das Zytoskelett angeschlossen. Sowohl Verschluss- als auch Adhärenskontakte sind im polarisierten Epithel als

„Zonula“ (lat.: Gürtel) ausgebildet. Das bedeutet, dass eine Zelle rundherum mit allen Nachbarzellen verbunden ist.

Ein weiterer Grundtyp von Zellkontakten ist der Kommunikationskontakt oder Gap junction, welcher mehrere Zellindividuen elektrisch und metabolisch zu einer Funktionseinheit koppelt. Im MDT sind die ICCs auf diese Weise mit glatten Muskelzellen verbunden (Benninghoff und Drenckhahn, 2008, Farquhar und Palade 1963, Lüllmann-Rauch, 2009).

#### 1.1.1.1. Verschlusskontakt/ Tight junction

Der Verschlusskontakt in Form der Zonula occludens ist die am weitesten apikal gelegene Komponente des dreiteiligen junctionalen Komplexes. Die benachbarten Plasmamembranen werden durch multiple Transmembranproteine der Claudinfamilie sowie durch Occludin und Junctional Adhesion Molecules (JAMs) eng aneinander adaptiert, sodass der Interzellularspalt auf einen Durchmesser von 0,2 bis 0,8 nm verkleinert wird. Zusätzlich ist dieser durch die seitliche und End-zu-End-Überlappung der extrazellulären Domänen versiegelt. Die Bezeichnung Claudin lässt sich auf das lateinische „*claudere*“ für „verschließen“ zurückführen. So wird ein unselektiver transepithelialer Durchtritt von Darmlumeninhalt über den parazellulären Weg verhindert und submuköses Gewebe vor Pathogenen geschützt.

Die zytoplasmatische Domäne der membranintegralen Proteine ist über die Adaptorproteine Zonula occludens (ZO) 1 und 2 an filamentäres Aktin (F-Aktin) und Myosin II angeschlossen. Damit besteht eine Verankerung am Zytoskelett im Zellinneren. Im gesunden Epithel bestimmen Tight junctions die mukosale Permeabilität. Neben dieser Schrankenfunktion sind Verschlusskontakte essenziell für die Aufrechterhaltung der Polarität von Zellen, indem sie die Diffusion von Proteinen und Lipiden der Zellmembran zwischen apikalen und basalen Kompartiment verhindern (Benninghoff und Drenckhahn, 2008, Mitic und Anderson, 1998, Turner, 2009).

Dennoch wäre eine absolute zu 100% impermeable Barriere nicht mit dem Leben vereinbar, da über das intestinale Epithel Wasser und Nährstoffe aufgenommen

werden müssen. Damit besteht die Hauptfunktion von Verschlusskontakten nicht darin, den kompletten Interzellularraum zu versiegeln, sondern eine kontrollierte Aufnahme sicherzustellen. Das wird durch die Anzahl der TJs und das gewebeabhängige Expressionsmuster der 24 verschiedenen Claudinsubtypen gewährleistet, welche über die Durchlässigkeit bestimmen (Lüllmann-Rauch, 2009, Silbernagl und Despopoulos, 2012). Im menschlichen MDT werden neun verschiedene Unterarten (Claudin 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 12 und 15) exprimiert (Lu et al., 2013). Diese Proteine besitzen vier Transmembranhelices, deren beide Enden in das Zytosol ragen. Das carboxyterminale Stück bindet ZO-1 beziehungsweise -2. Die erste extrazelluläre Schleife bestimmt die spezifischen Eigenschaften des Claudins (Marchiando et al., 2010). Während zum Beispiel Claudin 1, 3, 4, 5 und 8 eine abdichtende Funktion haben, formen Claudin 2, 7 und 12 parazellulär verlaufende Poren (Markov et al., 2010, Schmidt et al., 2007). In vitro-Studien zeigen, dass die Ausprägung von Claudin 2 den parazellulären Fluss von Kationen und kleinen Molekülen mit einem Radius von weniger als vier Angström erlaubt (Van Itallie et al., 2008). Durch unterschiedliche Proteinzusammensetzung entstehen „High-beziehungsweise Low-resistance“ Tight junctions. Letztere findet man in den Schlussleistenkomplexen des intestinalen Epithels. Dagegen sind beispielsweise Verschlusskontakte im Gallenblasenepithel hoch abdichtend, um zu verhindern, dass schädliche Gallenflüssigkeit in die Zirkulation gelangt (Marchiando et al., 2010).

Auch innerhalb von Dün- und Dickdarmschleimhaut finden sich Unterschiede im Expressionsmuster. In den Zottenspitzen, wo sich die voll entwickelten Enterozyten befinden, enthalten Tight junctions vermehrt das versiegelnde Claudin 1. Hingegen wird Claudin 2 in den Verschlusskontakten zwischen den jungen und unreifen Zellen der Krypten gehäuft exprimiert (Lu et al., 2013, Turner, 2009). Das beweist, dass Enterozyten während ihrer Differenzierung das Claudinexpressionsmuster verändern. Interessanterweise zeigen Analysen von Mukosabiopsien bei MC-Patienten eine interleukinvermittelte Hochregulation von Claudin 2 und gleichzeitig eine verminderte Expression von Occludin, Claudin 5 und 8. Dieses Ungleichgewicht könnte eine schlecht kontrollierte Passage von Darmlumeninhalt verursachen und so möglicherweise zur Pathogenese der Barrierestörung beitragen. Zudem fielen eine reduzierte Anzahl von Verschlusskontakten und Diskontinuitäten auf (Zeissig et al.,

2007). Diese Beispiele verdeutlichen, dass die intestinale Permeabilität eine dynamische Eigenschaft ist. Neben den Variationen bei der basalen Barrierefunktion ist auch eine akute Regulation auf Stimuli möglich, was in den folgenden Abschnitten detailliert erläutert wird.

Neben den beschriebenen Claudinen werden Verschlusskontakte auch von Occludin gebildet. Zwar wurde dieses als erstes TJ-Protein entdeckt (Furuse et al., 1993), bis heute ist aber weitaus weniger über dessen Bedeutung bekannt. Im Verschlusskontakt interagiert es direkt mit Aktin und Claudinen (Edelblum und Turner, 2009). Mausmodelle mit einem Knockoutgen für Occludin zeigen keine defekte Epithelbarriere. Elektrophysiologische Messungen des transmuralen Widerstands und die Mukosaarchitektur sind verglichen mit Kontrolltieren unverändert. Auch unter mechanischem oder chemischem Stress fällt kein Permeabilitätsunterschied zwischen den Mäusegruppen auf. Dennoch sind Occludindefiziente Mäuse durch eine Wachstumsretardierung und chronische Gastritis gekennzeichnet, sodass ein Einfluss von Occludin auf Wachstum und Differenzierung vermutet wird (Saitou et al., 2000, Schulzke et al., 2005).

Tight junctions müssen mechanisch abgesichert werden, um deren volle Funktionsfähigkeit zu gewährleisten. Das geschieht zum einen durch die Nachbarschaft mit den Haftkontakten. Zusätzlich finden sich in direkter Nähe sogenannte Junctional Adhesion Molecules, welche zur Immunglobulin-Superfamilie gehören und die Plasmamembran durchspannen. Auch bei diesen Proteinen bilden die extrazellulären Anteile benachbarter Zellen Brücken aus. Im Zytoplasma sind die JAMs über ZO-1 mit dem Aktinzytoskelett verbunden. In Verschlusskontakten epithelialer und endothelialer Zellen wird der Subtyp JAM-A exprimiert. Neben der Stabilisierungsfunktion wurde gezeigt, dass JAMs für die Bildung der Tight junctions und Reifung der Zell-Zellkontakte wichtig sind (Iden et al., 2012). Zudem scheinen sie bei der Regulation von Permeabilität und Entzündung im Darm (Laukoetter et al., 2007), Zellproliferation und Tumprogression (Nava et al., 2011) eine bedeutende Rolle zu spielen.

### 1.2.2.1. Adhärenskontakt

Wie im vorigen Absatz bereits erwähnt wurde, finden sich direkt unterhalb eines Verschlusskontakts die Adhärenskontakte, deren Transmembranproteine zur Familie der Cadherine (*Ca<sup>2+</sup>-dependent adhesion molecules*) gehören und abhängig vom Gewebetyp sind. Im Epithel bildet das E-Cadherin die Grundlage für den Haftkontakt (Lüllmann-Rauch, 2009). E-Cadherin kann dimerisieren und gleiche Adhäsionsmoleküle der Nachbarzelle binden. Calciumionen werden für die Verstärkung der Bindung von benachbarten extrazellulären Domänen benötigt und sind so essenziell für eine stabile homophile Interaktion der Transmembranproteine. Der zytoplasmatische Anteil ist mit einer Reihe intrazellulärer Proteine verbunden, welche elektronenmikroskopisch als dezente Plaques sichtbar sind und die Verbindung mit dem perijunktionalen Aktin-Myosin-Netzwerk der Zelle herstellen (Baum und Georgiou, 2011). Am besten untersucht ist die intrazelluläre Bindung von E-Cadherin an Catenine, die zu den Proteinen der Armadillo-repeat-Familie gehören.

Adhärenskontakte sind für eine korrekte Funktion des Epithels essenziell. Wie der Name bereits andeutet, sind sie für eine starke Verbindung zwischen den Zellen im Gewebe verantwortlich. Dadurch wird die Anordnung der Tight junctions-Proteine gefördert und diese mechanisch abgesichert. So helfen die Cadherin-Catenin-Komplexe den polaren Aufbau der Zellen zu wahren. Die Verknüpfung von E-Cadherin mit  $\beta$ -Catenin findet bereits im endoplasmatischen Retikulum statt und ist für deren Transport zur Plasmamembran erforderlich. Dort angekommen rekrutiert der Cadherin-Catenin-Komplex  $\alpha$ -Catenin, das sich wiederum direkt an Aktin und weitere Aktin-assoziierte Proteine wie Vinculin oder  $\alpha$ -Actinin bindet (Quiros und Nusrat, 2014). Über diesen Multiproteinkomplex können mechanische Stimuli von extrazellulär in den Zellkern übermittelt werden. Dabei spielt das  $\beta$ -Catenin als Transkriptionsfaktor eine zentrale Rolle. Mehrere Arbeiten zeigen die duale Funktion des Proteins. Es existiert eine Cadherin-unabhängiger Pool, welcher eine wesentliche Rolle im Wnt-Signalweg spielt und so in die Embryogenese und Zellproliferation involviert ist (Pronobis und Peifer, 2012, Schneider et al., 1996). Diese Entdeckung verdeutlicht, dass die E-Cadherin-vermittelte Zelladhäsion ein dynamischer Prozess mit einer Signalkaskade von der Plasmamembran zum Zellkern ist. Ein anderes Catenin (p120) stabilisiert den Adhärenskontakt, indem es

das Transmembranprotein vor der Endozytose schützt und an Mikrotubuli koppelt (Quiros und Nusrat, 2014).

#### 1.2.2.2. Desmosome

Desmosome bilden den am basalsten gelegenen Zellkontakt im junctionalen Komplex. Ihr Vorkommen ist jedoch nicht auf diesen beschränkt. Die Kontaktstellen werden als fleckförmig oder knopfartig beschrieben, was deren Bezeichnung als Macula adhaerens erklärt. Im Elektronenmikroskop erkennt man einen 20-40 nm breiten interzellulären Spalt, der von feinfädigem Material durchzogen wird. An der Innenseite der Plasmamembran fällt eine deutliche Verdichtungszone auf. Die desmosomalen Cadherine heißen Desmogleine (Dsg) und Desmocolline (Dsc). Im Darm werden Dsg Typ 2 und Dsc Typ 2 exprimiert. Auch deren C-terminales Ende ist über Adaptorproteine wie Plaktoglobin oder Desmoplakin an das Zytoskelett gebunden, in diesem Fall an die Intermediärfilamente - das passive Stützgerüst der Zelle (Holthöfer et al., 2007).

Die bekannteste Pathologie, welche Desmosomen betrifft, zeigt sich im Krankheitsbild des Pemphigus vulgaris. Dabei werden IgG-Autoantikörper gegen Dsg3 gebildet, sodass sich große intraepitheliale Blasen bilden (Moll, 2010, Spindler und Waschke, 2011). Über die Bedeutung der Desmosomen für die Darmbarriere ist weniger bekannt. In verschiedenen Übersichtsarbeiten (Neunlist, 2013, Keita und Sönderholm, 2010, Edelblum und Turner, 2009) werden sie nur zusammen mit Adhärenskontakten genannt. Die gemeinsame Aufgabe besteht darin, Zellen miteinander zu verankern und die Widerstandskraft des Epithels zu erhöhen. Es wurde jedoch in einem Versuch mit Knockoutmäusen nachgewiesen, dass Dsg 2 essenziell für das Überleben der Tiere im frühen Embryonalstadium ist (Eshkind et al., 2002). Zudem wurde in vitro bestätigt, dass die desmosomale Adhäsion für die Integrität der Darmbarriere von wesentlicher Bedeutung ist (Schlegel et al., 2010). Eine Studie von Spindler et al. zeigt, dass in Mukosabiopsien von MC-Patienten neben den bekannten Veränderungen der TJ-Proteine auch die Expression von Dsg 2 signifikant vermindert ist (Spindler et al., 2015). Diese neue Erkenntnis ist

möglicherweise ein weiterer Faktor, der die Entstehung der Barrierestörung bei CED mit erklären könnte.

### **1.2.3. Einflussfaktoren auf die parazelluläre Permeabilität**

Wie bereits erwähnt, ist zur Aufrechterhaltung der Versorgung des Körpers eine selektive Permeabilität der intestinalen Epithelbarriere nötig. Um auf ein unterschiedliches Nährstoff- und Flüssigkeitsangebot adäquat reagieren zu können, finden kurzfristige Veränderungen der parazellulären Permeabilität statt. Im gesunden Zustand bestimmen Tight junctions über die Barriereeigenschaft des intestinalen Epithels. Bei einer Dysfunktion kommt es zu einem pathologischen transepithelialen Fluss, der mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für CED assoziiert ist. Ein Anstieg der parazellulären Durchlässigkeit findet sich bei MC-Patienten bereits bei inaktiver Krankheit und gilt als prognostischer Indikator für einen Rückfall (Peeters et al., 1994). In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass sich auch bei gesunden Verwandten ersten Grades der Patienten eine erhöhte Permeabilität findet. Ein Case-Report beschreibt die Erkrankung eines Angehörigen acht Jahre nach dieser Feststellung an MC (Hollander et al., 1986). Dennoch konnte bis heute nicht vollständig geklärt werden, ob die veränderte TJ-Struktur und Steigerung der parazellulären Permeabilität Ursache oder Folge der Entzündung sind. Eine isolierte Barrieredysfunktion reicht allerdings nicht dafür aus, die Erkrankung auszulösen (Marchiando et al., 2010). Generell ist jedoch anzumerken, dass in chronisch entzündetem und ulceriertem Gewebe die barrierebildenden Strukturen zerstört sind und kein regelhafter Wandaufbau mehr besteht (Lüllmann-Rauch, 2009).

Hier werden jedoch Einflussfaktoren beschrieben, welche die Dichtheit der Tight junctions verändern. Die Änderung der parazellulären Permeabilität kann rasch über die Kontraktion des Zytoskeletts induziert werden. Langfristige Effekte werden durch eine veränderte Transkription der beteiligten Proteine und Apoptose erzielt. Im Zentrum der akuten Regulationsmechanismen steht die Aktivierung der  $Ca^{2+}$ -Calmodulin-abhängigen Myosinleichtkettenkinase (MLCK). Die Phosphorylierung der leichten Kette von Myosin II führt zur Aktivierung der ATPase-Aktivität und damit zum Übereinandergleiten der Aktin- und Myosinfilamente. Eine Kontraktion des

perijunktionalen Aktinrings ist die Folge. Dieser ist über die Adapterproteine mit den Transmembranproteinen der Tight junctions verbunden, sodass der „Zug“ auf die Verschlusskontakte übertragen und die Permeabilität erhöht wird (Shen et al., 2006, Turner, 2009).

Wie bereits beschrieben wurde, beeinflussen Veränderungen der Claudinexpression die Barriereeigenschaft von Epithelien. Ein erhöhter Claudin 2 Anteil findet sich in Tiermodellen mit Colitis und bei CED-Patienten. Passend dazu reduzieren die proinflammatorischen Interleukine (IL)-13 und -17 in Zellkulturen die Barrierefunktion über eine Zunahme der Expression von Claudin 2. Beide Interleukine sind in der Mukosa bei Colitis ulcerosa überdurchschnittlich nachweisbar (Fujino et al., 2003, Heller et al., 2005). Auch die in vitro-Behandlung von Caco2-Zellen mit dem Entzündungsmediator IL-6 stimuliert den Einbau von porenbildendem Claudin 2 (Suzuki et al., 2011). Mees et al. demonstrierten im Mausmodell, dass die Expression der abdichtenden Claudine 1, 3, 4 und 5 bei akuter Colitis vermindert ist (Mees et al., 2009). Auch TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  aus antigenpräsentierenden Zellen (APC) und T-Helferzellen signalisieren dem Epithel den Durchfluss zu erhöhen. IFN $\gamma$  induziert zeitabhängig bei chronischer Inflammation die Internalisierung der Tight junction-Proteine Claudin 1, Occludin und JAM-A (Utech et al., 2006). Das am besten erforschte Zytokin mit Einfluss auf epitheliale Verschlusskontakte ist TNF $\alpha$ . So zeigen Gefrierschnitte von HT29B6-Zellen nach Behandlung mit TNF $\alpha$  eine reduzierte Anzahl und vermehrte Unterbrechungen der TJ-Stränge (Schmitz et al., 1999). Zudem zeigen andere Arbeitsgruppen, dass durch den Nekrosefaktor die Aktivität des Occludinpromoters inhibiert (Mankertz et al., 2000), die Expression von Claudin 2 hochreguliert (Zeissig et al., 2007) und vermehrt Apoptose der Epithelzellen induziert (Gitter et al., 2000) wird. Der Haupteffektor von TNF $\alpha$  ist jedoch die MLCK. In vivo- und vitro-Modelle zeigen eine erhöhte Transkription und Translation der epithelialen MLCK und damit einen Anstieg der Phosphorylierungen von Myosin II (Graham et al., 2006, Wang F et al., 2005). Interessanterweise korreliert bei CED der Grad der MLCK-Expression und -Aktivität positiv mit dem Ausmaß der Entzündung (Blair et al., 2006). Die klinische Relevanz dieser Ergebnisse zeigt sich in der Zulassung von Antikörpern gegen TNF $\alpha$  in der Therapie des MC (Herold, 2014).

Aber auch andere Moleküle tragen zur MLCK-abhängigen Permeabilitätssteigerung bei. Durch T-Zellaktivierung kommt es zu einem Anstieg von LIGHT (*lymphotoxin-like inducible protein that competes with glycoprotein D for herpes virus entry on T cells*), welches auch über eine MLCK-Aktivierung zur Dysfunktion der Barriere beitragen kann. Zudem fördert dieses Mitglied der TNF-Familie die caveoläre Endozytose von Occludin (Schwarz et al., 2007). Bekannt ist, dass der MLCK-Promoter Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Activator protein-1 und NFκB enthält (Graham et al., 2006). Aufschluss über die molekularen Signaltransduktionswege geben Untersuchungen der Rolle von p38 MAP-Kinasen beim verbrennungsinduzierten Zusammenbruch der intestinalen Barriere. Die proinflammatorischen Zytokine führen über die Aktivierung der p38 MAPK zu mehrfach erhöhter MLCK-Expression und -Aktivität mit folgendem Integritätsverlust der Tight junctions. Signalwege über p38-mitogenaktivierten Proteinkinase (p38 MAPK) beeinflussen die Transkription via DNA-Bindung von Activator protein-1. Folglich kommt es zu einem MLCK-induzierten Anstieg der intestinalen Permeabilität. Über die Fähigkeit von NFκB, Veränderungen der intestinalen Verschlusskontakte zu induzieren, gibt es kaum fundierte Aussagen. Im Rahmen einer Entzündung soll es ebenfalls zu einem Anstieg der Translokation von NFκB in den Zellkern kommen (Costantini et al., 2009).

Nicht nur Entzündungsmediatoren nutzen die MLCK als Endstrecke, um negativen Einfluss auf die Barriere zu nehmen. Neue Daten zeigen, dass sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Zuständen das enterische Nervensystem die Funktion der intestinalen Mukosa reguliert. Zum einen sezernieren die Neurone verschiedene Mediatoren, welche speziell die Permeabilitätssteigerung beeinflussen können. Für Acetylcholin, Substanz P und Neurokinin A wurde nachgewiesen, dass sie einen Anstieg der parazellulären Durchlässigkeit induzieren können (Cameron und Perdue, 2007, Hällgren et al., 1998). Besonders gut untersucht ist das Vasoactive intestinal peptide (VIP), dessen Einfluss barriestabilisierend zu sein scheint. Kurzfristige Modulationen laufen über eine Reduzierung der Aktivität der MLCK (Conlin et al., 2009). Die Langzeiteffekte werden durch eine vermehrte Proteinbiosynthese von ZO-1 vermittelt (Neunlist et al., 2013). Doch auch Effektorproteine der enterischen Glia sind essenziell für die Aufrechterhaltung der

intestinalen Epithelbarriere. In vivo wurde gezeigt, dass die Ablation von Gliazellen eine fulminante hämorrhagische Jejunoileitis auslöst. Ähnliche histopathologische Veränderungen wurden bei MC- Patienten beschrieben (Bush et al., 1998). In weiteren Tiermodellen wurde demonstriert, dass ein moderater Verlust von Gliazellen zu einer erhöhten Permeabilität ohne Entzündung führt (Aube et al., 2006). Anhand von Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass Glial-derived s-nitrosoglutathione (GSNO) die durch Cytomix induzierten Lokalisations- und Expressionsveränderungen von ZO-1 und Occludin wiederherstellen beziehungsweise verhindern kann (Cheadle et al., 2013). Zudem reduziert GSNO die parazelluläre Permeabilität in Biopsieproben von MC-Patienten (Savidge et al., 2007). Auch ein zweiter glialer Mediator, der Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), kann in vivo die Funktion der intestinalen Barriere bei Dextran Sodium Sulfat (DSS)-induzierter Colitis wiederherstellen. In Western Blot-Untersuchungen von Colonepithelzellen zeigte sich nach der Behandlung mit GDNF eine erhöhte Expression von ZO-1 (Zhang et al., 2010).

### **1.3. Enterisches Nervensystem**

#### **1.3.1. Anatomie und Funktion**

Der MDT ist nach dem zentralen Nervensystem (ZNS) das nervenreichste Organ des Körpers. Es umfasst neben enterischen Gliazellen ähnlich viele Neurone wie das Rückenmark. Beide Zelltypen stehen in engem Kontakt mit den ICC. Dieses „Gehirn des Darms“ zieht sich als komplexes Netzwerk in der gesamten Wand des Intestinums vom Ösophagus bis zum Rektum und wird daher auch als „little brain“ dem „big brain“ des ZNS gegenübergestellt. Das enterische Nervensystem (ENS) kontrolliert die Motilität, exo- und endokrine Sekretionsmechanismen und die Mikrozirkulation des Gastrointestinaltrakts. Zunehmend wird auch mehr über die Rolle des ENS bei der Immunregulation und im Entzündungsprozess bekannt (Gershon und Rothman, 1991, Goyal und Hirano, 1996).

Die pluripotenten Vorläuferzellen des ENS stammen aus der Neuralleiste und besiedeln zwischen der fünften bis zwölften Embryonalwoche den Darm in

kraniocaudaler Richtung. Später differenzieren sie zu Nervengewebe oder enterischen Gliazellen (Goldstein et al., 2013). Über 100 Millionen Neurone und circa 400 Millionen Gliazellen sind in zwei ganglienhaltige Plexus gegliedert: einen Plexus myentericus (Auerbach), zwischen äußerer und innerer Schicht der Tunica muscularis, und einen Plexus submucosus in der Tela submucosa, welcher wiederum in einen Plexus submucosus externus (Schabadasch) beziehungsweise submucosus internus (Meissner) unterteilt werden kann. Die Neurone des Auerbachplexus regulieren vor allem Motilität und Peristaltik. Axone und Glia des Plexus submucosus reichen bis in die Mukosa und innervieren dort die sekretorisch und resorptiv aktiven Epithel- und Drüsenzellen. Die Nervenzellkörper sind zu Ganglien zusammengefasst und durch Nervenfaserbündel miteinander vernetzt. Strukturelle Unterstützung erhalten die Neurone samt ihren Ausläufern von den enterischen Gliazellen.

Das ENS besitzt durch seine in sich geschlossenen Regelkreise einen hohen Grad an Autonomie. Wichtige Aufgaben, wie zum Beispiel die Peristaltik und Sekretionstätigkeit der Drüsen, laufen unabhängig vom ZNS auch im denervierten Darm ab. Dennoch ist das ENS über sympathische und parasympathische Fasern mit dem ZNS verbunden. Über diese extrinsische Innervation kann das Gehirn die autonomen Funktionen modulieren und an die Bedürfnisse des Gesamtorganismus anpassen (Drenckhahn und Waschke, 2007, Neunlist et al., 2014, Straub, 2006).

### **1.3.2. Bedeutung der Neurone**

Die Neurone des ENS können funktionell weiter unterklassifiziert werden. Neben den Motorneuronen und Interneuronen finden sich dort auch primär afferente Neurone mit chemo-, mechano- und nozizeptiven Endigungen in der glatten Muskulatur und Schleimhaut. Damit sind alle Komponenten, die für einen Reflexkreis erforderlich sind, vorhanden und das ENS kann autonom beispielweise den peristaltischen Reflex für den Transport eines Nahrungsbolus ausführen (Avetisyan et al., 2015, Straub, 2006).

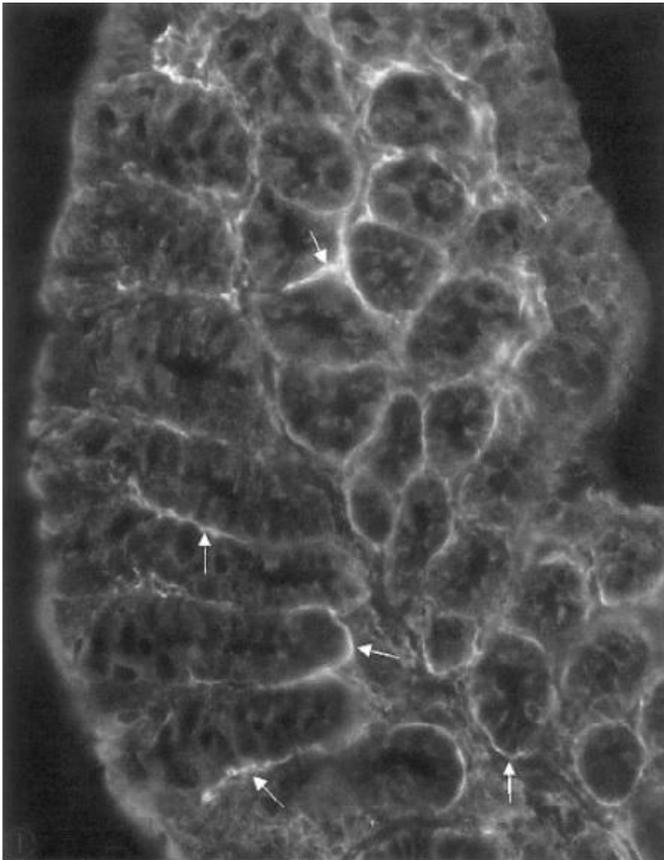
Jede Zotte wird von circa 70-90 Neuronen innerviert (Neunlist et. al. 2003). Über 20 verschiedene Neurotransmitter wurden bis jetzt identifiziert. Oft enthalten die Vesikel der synaptischen Endknöpfchen mehrere von ihnen. Exzitatorische Neurone sezernieren hauptsächlich Acetylcholin und Substanz P, während VIP und Stickstoffmonoxid (NO) vordergründig inhibitorischen Einfluss auf Enterozyten haben. Acetylcholin ist zudem bedeutend für den Elektrolyttransport und folglich den transepithelialen Wasserfluss. Neben diesen Modulatoren dienen unter anderem Somatostatin, Neurokinin A und B, Opioidpeptide oder Neurotensin als Neurotransmitter. Opioidpeptide hemmen beispielsweise die Darmsekretion und propulsive Peristaltik. Neurotensin hingegen fördert die Sekretion von Pankreassaft (Goyal und Hirano, 1996, Grundy et al., 2006, Keita und Söderholm, 2010). Zudem besteht ein spezifischer Einfluss der neuronalen Mediatoren auf die parazelluläre Permeabilität, welcher hier bereits beschrieben wurde.

### **1.3.3. Rolle der enterischen Gliazellen**

Ein besonderes Augenmerk wird in dieser Arbeit auf die sekretorische Funktion der zweiten, weitaus größeren Zellpopulation des ENS gelegt. Gliazellen wurden lange als passive und strukturbildende Zellen, welche der Unterstützung von Neuronen dienen, angesehen. Dieses Konzept wird seit Ende der 90er Jahre überdacht. Seitdem ist mehr über die Bedeutung der Makroglia speziell von Astrozyten (Spinnenzellen) für die Blut-Hirnschranke im ZNS bekannt. Zwischen den zerebralen Spinnenzellen und der enterischen Glia bestehen viele morphologische und funktionelle Ähnlichkeiten, die im Folgenden beschrieben werden. Analog zu ihren Gegenstücken im ZNS ist die enterische Glia vielleicht einer der bedeutendsten Regulatoren der intestinalen Barrierefunktion.

Am Anfang des sogenannten „*Gut-brain disease Paradigma*“ (Savidge et al., 2007) standen verschiedene Tiermodelle, die eindeutig aufzeigen, dass Gliazellen beziehungsweise deren sezernierte Produkte essenziell für die Aufrechterhaltung der Integrität der Darmbarriere sind (Aube et al., 2006, Bush et al., 1998, Cornet et al., 2001). Gliazellen befinden sich in enger Nachbarschaft zu den Darmepithelzellen, wobei gliale Fasern direkten Kontakt mit den Epithelzellen sowohl in den Krypten als

auch in der Spitze der Villi halten (Abb. 4). So erscheint es schlüssig, dass Gliazellen und ihre sezernierten Faktoren GSNO und GDNF protektiven Einfluss auf die parazelluläre Permeabilität nehmen und die Sekretionseigenschaften der Mukosa kontrollieren können (Cabarrocas et al., 2003, Straub, 2006, Zhang et al., 2010).



**Abbildung 4: Direkter Kontakt zwischen glialen Fasern und Epithelzellen**

Die Immunfluoreszenz markiert das GFAP-positive enterische Glianetzwerk im Kolon einer Maus. Pfeile weisen auf die Nähe von Gliazellen und Epithelzellen in der Mukosa hin (100-fache Vergrößerung).

*Mit freundlicher Genehmigung von Julie Cabarrocas et al. (Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris).*

Auch die Vitalität der Neuronen im adulten ENS ist von einem intakten Glianetzwerk abhängig. Bei Ablation von Gliazellen im Tiermodell zeigten sich degenerative Veränderungen der Nervenzellen (vorranging im Plexus myentericus) in Form von

Atrophie und Verlust (Bush et al., 1998). Neben der strukturellen Unterstützung wird das Überleben der Neurone sowohl im fetalen als auch im murenen ENS durch die von der Glia sezernierten neurotrophen Faktoren geschützt. Schon während der embryonalen Entwicklung fördert GDNF die Proliferation von neuronalen und glialen Vorläuferzellen und begünstigt deren Differenzierung und Überleben (Gershon und Rothman, 1991). Im adulten Darm sorgt die Glia für das Überleben der Neurone, indem sie die extrazelluläre Homöostase aufrechterhält. Nährstoffe wie Glukose werden für die Neurone bereitgestellt, während gleichzeitig Abfallmetabolite entsorgt werden. Auch Kaliumionen, die bei neuronaler Aktivität in den Extrazellularraum abgegeben werden, können von Gliazellen gepuffert werden (Cabarrocas et al., 2003).

Weiterhin können Gliazellen über die Expression von Zytokinrezeptoren mit dem Immunsystem der Mukosa kommunizieren, auf Signale reagieren und selbst Zytokine produzieren. Werden enterische Gliazellen in der Zellkultur mit IL-1 $\beta$  behandelt, kommt es über die Bindung an den IL-1-Rezeptor zu einer vermehrten Synthese und Ausschüttung von IL-6 (Von Boyen et al., 2006, Rühl et al., 2001). Über die Sekretion von beispielsweise Substanz P können Gliazellen mit dem angeborenen Immunsystem der Mukosa interagieren. Dieses Neuropeptid kann eine Degranulation der Vesikel in Mastzellen induzieren (Neunlist et al., 2008). Nach mechanischer oder inflammatorischer Verletzung können Gliazellen zudem den Wundheilungsprozess verbessern. Dieser Effekt wird gemäß der Arbeitsgruppe um Van Landeghem über die Freisetzung von Pro-Epidermal growth factor (proEGF) und Aktivierung der Focal-adhesion kinase vermittelt (Van Landeghem et al., 2011).

Enterische Gliazellen synthetisieren, im Gegensatz zu den im restlichen peripheren Nervensystem vorkommenden Schwannzellen, kein Myelin. Sox-10 und wahrscheinlich auch Ran-2 sind allgemeine Gliamarkerproteine. Zudem besitzen sie ein dichtes Netz an Intermediärfilamenten, das reich an saurem Gliafasersprotein (engl. *Glial fibrillary acidic protein*= GFAP) ist und zudem das Calcium-bindende Protein S100 enthält. Beide genannten Proteine werden auch von Astrozyten exprimiert. Eine weitere Gemeinsamkeit ist, dass beide Zellpopulationen via Gap junctions zu einem großen Synzytium gekoppelt sind (Boesmans et al., 2015, Neunlist et al., 2014).

Wie bei ihren Äquivalenten im ZNS können zwei Subpopulationen innerhalb des Glianetzwerks ausgemacht werden. Von Boyen et al. differenzierten GFAP-positive von GFAP-negativen Gliasubtypen. Weiterhin zeigten sie, dass in vitro die Inkubation der Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und Lipopolysaccharid (LPS) zu einem signifikanten Anstieg der GFAP-positiven Gliazellen führt. Diese Zunahme lässt sich nur zum Teil durch eine gesteigerte Proliferation erklären. Vielmehr wird vermehrt GFAP von bis dahin negativen Zellen exprimiert (Von Boyen et al., 2004). So könnten GFAP-negative Gliazellen als Reservepool betrachtet werden, der nach Aktivierung durch Zytokine die Integrität der Darmbarriere im Entzündungszustand schützt. 2006 zeigte die gleiche Arbeitsgruppe, dass in vitro die GDNF-Sekretion der Gliazellen durch die genannten proinflammatorischen Zytokine stimuliert werden kann (Von Boyen et al., 2006). Nach Verletzung oder im Rahmen von Entzündungen reagieren die Astrozyten des ZNS mit einer Hyperplasie und Proliferation. Folglich kommt es zu einer Anreicherung von GFAP. Dieses Phänomen wird als Astroglieose bezeichnet. Die reaktiven Astrozyten begünstigen die Wundheilung, isolieren die Entzündung von nicht betroffenen Arealen und sind so in die Wiederherstellung einer funktionierenden Blut-Hirnschranke involviert (Eddlestone und Mucke, 1993, Hamby und Sofroniew, 2010). Die im Entzündungszustand deutlich erhöhte Anzahl von enterischen Gliazellen im Darm mit GFAP-Produktion wirkt möglicherweise nicht nur als zusätzliche Quelle neuroendokriner Mediatoren wie GDNF, GSNO und Nerve growth factor (NGF), sondern auch im Sinne einer Gliose als schützende morphologische Barriere (Straub, 2006).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass enterische Gliazellen eine Schlüsselrolle beim Schutz der Homöostase im gesunden Darmepithel einnehmen. Außerdem können sie - wohl mit dem Ziel, die Integrität von verletzter Mukosa wiederherzustellen - auf entzündliche Veränderungen des Milieus aktiv reagieren.

#### **1.3.4. Glial cell line-derived neurotrophic factor und Multikomplexrezeptor**

In der vorliegenden Arbeit wird speziell die Wirkungsweise des Proteins GDNF auf die intestinale Epithelbarriere untersucht.

GDNF wurde erstmals 1993 aufgereinigt und als Wachstumsfaktor charakterisiert, der das Überleben von embryonalen dopaminergen Neuronen im Mittelhirn sichert (Lin et al., 1993). Es handelt sich hierbei um ein dimeres glykosyliertes Protein. Ein Monomer, dessen Gen auf dem Chromosom 5 lokalisiert ist, besteht aus 134 Aminosäuren. Die Position von sieben Cysteinresten innerhalb der Primärstruktur ist charakteristisch für die Transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ )-Superfamilie. Daneben bestätigt auch die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur eine hohe Ähnlichkeit von GDNF zu TGF $\beta_2$ . Auch Neurturin, Persephin und Artemin/Neublastin gehören zu dieser neuen Familie neurotropher Faktoren innerhalb der TGF $\beta$ -Superfamilie und werden als GDNF-family ligands (GFL) bezeichnet (Bermingham et al., 1995, Saarma und Sariola, 1999, Takahashi, 2001). Neurotrophe Faktoren unterstützen sowohl das Wachstum und Überleben diverser Neurone im ZNS als auch die peripheren sensorischen und autonomen Nervenzellen. Sie regulieren die Anzahl an Neuronen und beeinflussen das Auswachsen von Neuriten. Nach der Synaptogenese wird zudem die Reifung der elektrophysiologischen Eigenschaften gefördert (Sariola und Saarma, 2003).

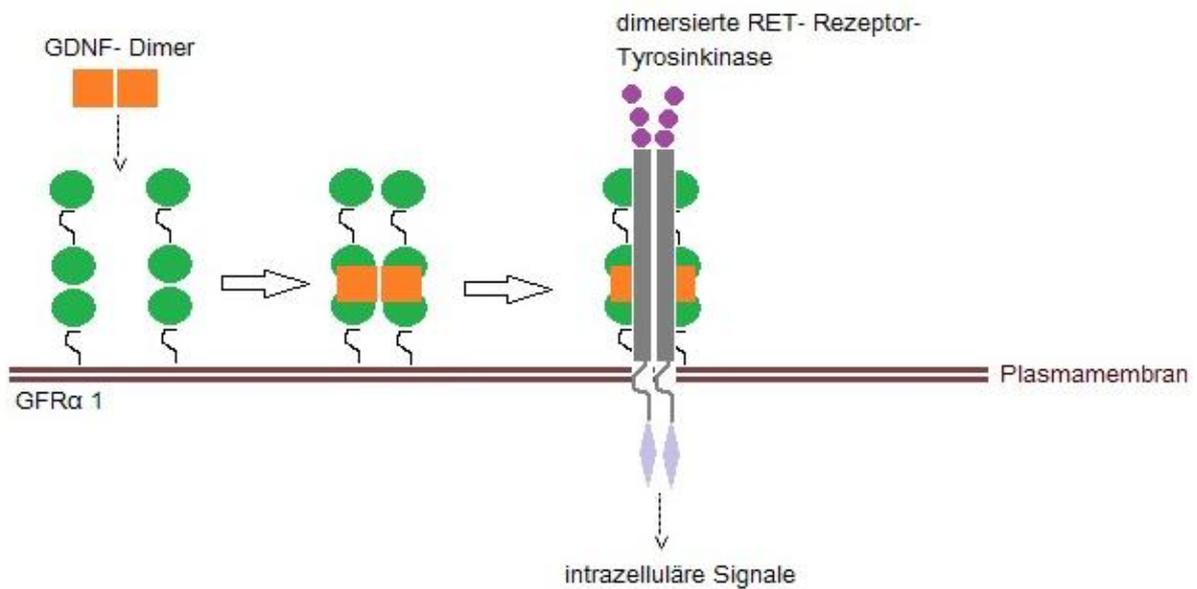
Forschungsergebnisse zeigen, dass Zeitpunkt und Lokalisation der Expression von GDNF während der Entwicklung in utero über die Struktur und Funktion des ENS entscheiden (Wang H et al., 2010). So entwickeln Mäuse mit Knockout im GDNF- oder GDNF-Rezeptorgen kein funktionierendes neuronales Netzwerk im Darm (Cacalano et al., 1998).

GDNF hat zudem Aufgaben außerhalb des Nervengewebes. Berichte verdeutlichen, dass dieser neurotrophe Faktor das Überleben, die Migration und Invasion von verschiedenen Tumorzellen beeinflussen kann (Garnis et al., 2005, Funahashi et al., 2005, Ito et al., 2005, Wiesenhofer et al., 2000). Weiterhin ist GDNF an einer regelhaften Nieren- und Ureterentwicklung im Embryo beteiligt und reguliert die Differenzierung von Spermatogonien (Sariola und Saarma, 2003). Es gibt zudem viele Hinweise, dass GDNF über anti-apoptotische Effekte an der Erhöhung der Zellmobilität und durch Anreicherung von TJ-Proteinen an der Aufrechterhaltung und Wiederherstellung der intestinalen Epithelbarriere beteiligt ist (Steinkamp et al., 2003, Van Landeghem et al., 2009, Zhang et al., 2010). Passend dazu zeigte die Arbeitsgruppe um Shimizu im Jahr 2011, dass GDNF aus Perizyten des

Gefäßendothels im ZNS eine vermehrte Expression von Claudin 5 in der Blut-Hirnschranke induziert und damit den transendothelialen elektrischen Widerstand erhöht (Shimizu et al., 2011).

Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen erschienen in der Vergangenheit mehrere Artikel, die aufzeigen, dass GDNF nicht nur von den zwei Hauptzellpopulationen des Nervengewebes (Neurone und Gliazellen), sondern auch von diversen Tumorzelllinien und im murinen Darm von glatter Muskulatur sezerniert wird (Brun et al., 2015, Lara et al., 2003, Garnis et al., 2005, Funahashi et al., 2005, Ito et al., 2005).

GDNF signalisiert über ein mehrkomponentiges Rezeptorsystem, welches aus einer RET (*rearranged during transformation*)-Rezeptor Tyrosinkinase und einem via Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker in der Plasmamembran fixierten Corezeptor besteht. Die zweite Untereinheit ist als GDNF-Familienrezeptor  $\alpha$  (GFR $\alpha$ ) bekannt und entscheidet über die Ligandenbindungsspezifität des Gesamtrezeptors. Man unterscheidet GFR $\alpha$  1 bis 4. Ein GDNF-Dimer führt zwei GFR $\alpha$ 1-Moleküle zusammen. Dieser Komplex dimersiert wiederum zwei RET-Rezeptor-Tyrosinkinasen, wodurch eine Transphosphorylierung getriggert und folglich eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst wird. RET wurde ursprünglich als Protoonkogen identifiziert, welches eine Tyrosinkinase codiert. So ist RET die signalisierende Komponente des Rezeptorkomplexes und aktiviert verschiedenste Kinasen wie die PI3K/Akt oder p38 MAPK im Zytoplasma der Zellen (Ichihara et al., 2004, Sariola und Saarma, 2003, Abb. 5).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des GDNF-Rezeptors**

Ein Dimer aus GDNF-Molekülen führt zwei GFR $\alpha$ -Moleküle zusammen. Dieser Komplex dimert wiederum zwei RET-Kinasen, welche sich im Anschluss gegenseitig an spezifischen Tyrosinresten phosphorylieren. Die Transphosphorylierung aktiviert mehrere intrazelluläre Signalkaskaden, die beispielsweise das Überleben, die Differenzierung und Proliferation der Zellen regulieren (modifiziert nach Sariola und Saarma, 2003).

### 1.3.5. Verhalten der enterischen Glia im Rahmen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Wie bereits erläutert, gibt es in vivo und in vitro verschiedene Versuchsansätze, welche die Reaktion der enterischen Gliazellen auf Umwelteinflüsse und deren Einflussnahme auf die intestinale Epithelbarriere unter experimentellen Bedingungen beschreiben.

Mausmodelle haben gezeigt, dass eine spezifische Ablation der Gliazellen Pathologien im Intestinaltrakt erzeugt, welche Ähnlichkeiten mit den Veränderungen bei MC aufzeigen. Zudem führt der Verlust an enterischer Glia zu einer erhöhten Anfälligkeit der intestinalen Epithelbarriere für Aggressoren aus dem Darmlumen (Bush et al., 1998, Cornet et al., 2001). Klinisch relevant sind diese Erkenntnisse, da

CED typischerweise von funktionellen und strukturellen Veränderungen im ENS begleitet werden (Villanacci et al., 2008). Die Veränderungen des glialen Phänotyps und das Sekretionsverhalten von GDNF in der Mukosa dieser Patienten wurden durch die Arbeitsgruppe um Von Boyen aufgearbeitet. Der GFAP-Gehalt wurde als Marker für enterische Gliazellen in entzündlich und nicht entzündlich veränderten Darmabschnitten von Morbus Crohn- beziehungsweise Colitis ulcerosa-Patienten bestimmt. Bei Colitis ulcerosa fällt in entzündlich veränderten Proben ein verdichtetes Glianetzwerk mit stark erhöhter GDNF-Expression auf. Auch in den von der Entzündung nicht betroffenen Abschnitten findet sich in ELISA-Analysen ein zweifach erhöhtes GDNF-Level. Damit verglichen zeigten die Darmbiopsien bei Morbus Crohn ein global ausgedünntes Glianetzwerk und verhältnismäßig eine verminderte Sekretion von GDNF (Von Boyen et al., 2011). Dennoch ist fraglich, ob die Veränderungen der Gliazellen nur als Bystander-Effekt der Entzündung auftreten. Es ist auch möglich, dass Anomalien dieser Zellpopulation einen weiteren Faktor der Pathogenese von CED repräsentieren. Diese offenen Fragen weiter aufzuklären und möglicherweise einen neuen Therapieansatz für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zu entwickeln ist ein Ziel der aktuellen Forschung.

#### **1.4. Fragestellung**

In der vorliegenden Arbeit wird die Bedeutung des neurotrophen Faktors GDNF für die Integrität der intestinalen Epithelbarriere untersucht. Hierzu wurden zwei verschiedene intestinale Epithelzelllinien als Modellsystem der Darmbarriere eingesetzt.

Zunächst soll die Hypothese untersucht werden, inwiefern GDNF Einfluss auf die Ausbildung, Reifung und Funktion von intestinalen Epithelzellkulturen unter verschiedenen Differenzierungsbedingungen nimmt. Ferner ist zu testen, ob auch Enterozyten als Ort für die GDNF-Synthese in Frage kommen.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen soll untersucht werden, ob GDNF im Falle protektiver Effekte auf die intestinale Epithelbarriere auch den Zusammenbruch der Barrierefunktion im Entzündungszustand verhindern kann. Ein weiteres Ziel war es,

einen möglichen positiven Einfluss von GDNF auf die Heilungstendenz einer epithelialen Läsion nachzuvollziehen.

Nach Identifizierung der GDNF-induzierten Effekte sollen die zugrunde liegenden zellulären Mechanismen im intestinalen Epithel charakterisiert werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Material**

#### **2.1.1. Zellkultur**

Als Grundlage der Experimente dieser Arbeit dienten zwei verschiedene Zellkulturlinien: Caco2 und HT29B6. Beide Zellreihen wurden in den 70er Jahren ursprünglich aus einem menschlichen kolorektalen Adenokarzinom akquiriert und anschließend als in vitro-Modell für intestinales Epithel etabliert. In der Zellkultur durchlaufen Caco2-Zellen (ATCC, Wesel) spontan einen Differenzierungsprozess, sodass sich ein Monolayer aus dem intestinalen Epithel ähnelnden Zellen bildet. Neben einer zylindrischen und polarisierten Morphologie, bilden diese Zellen apikale Mikrovilli und Verschlusskontakte aus. Dagegen zeigen die von Professor Jörg-Dieter Schulzke (Institut für Klinische Physiologie, Charité Campus Benjamin Franklin, Berlin) bereitgestellten HT29B6-Zellen unter Standardbedingungen ein undifferenziertes Wachstumsmuster. Erst nach dem Entzug von Glukose aus dem Nährmedium kommt es zum Differenzierungsvorgang der Zellen und damit zu morphologischen Ähnlichkeiten mit intestinalen Epithel. Die B6-Zellen stellen einen Subklon dar, welcher eine besonders Enterozyten-ähnliche Differenzierung aufweist (Cohen et al., 1999, Kreusel et al., 1991, Sambuy et al., 2004, Schlegel et al., 2010).

##### **2.1.1.1. Routinekultur**

Die Kultivierung der Caco2-Zellen erfolgte in einem Medium bestehend aus einer Mischung aus Dulbecco`s Modified Eagles Medium (DMEM, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) mit zehnpromzentigem fetalem Kälberserum (FCS, Biochrom, Berlin, Deutschland), sowie 50 U/ml Penicillin-G und 50 µg Streptomycin (P/S, Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland). Für die HT29B6-Kulturen wurde Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI, Genco, Darmstadt, Deutschland) mit den genannten Zusätzen verwendet.

Um eine Kontamination der Kulturen mit Pilzen, Bakterien oder Viren zu vermeiden, erfolgten alle Arbeiten mit Zellen ausschließlich an einer sterilen Werkbank. Zur Gewährung der Keimfreiheit wurde diese regelmäßig mit Terralin Liquid® (Schülke&

Mayr, Norderstedt, Deutschland) gereinigt. Alle mehrfach verwendeten Geräte und Behältnisse, welche direkt mit Zellen in Berührung kamen, wurden bei 180°C im Autoklaven hitzesterilisiert. In einem Brutschrank (Heracell 150, ThermoFisher, Darmstadt, Deutschland) wuchsen die Zellen bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre (80% Luftfeuchte) mit 5% CO<sub>2</sub> in einer Zellkulturflasche bis zum Erreichen der für unsere Experimente nötigen Konfluenz. Währenddessen erfolgte dreimal pro Woche ein Wechsel des Kulturmediums, welches zuvor auf 37°C erwärmt wurde.

#### 2.1.1.2. Passagierung und Aussaat

Anschließend erfolgte die Passagierung (engl. *Splitting*) und Aussaat der Zellen auf T75 Zellkulturflaschen, Petrischalen, Deckgläschen, Transwellfilter und Elektroden. Vor dem Überführen der Zellen wurden diese Behältnisse gelatiniert, da die Zellen besonders gut auf mit Kollagen (=Gelatine) beschichteten Oberflächen wachsen.

Hierfür wurde der Boden der verschiedenen Kulturschalen mit in Wasser gelöster 0,5%-prozentiger Gelatine bedeckt. Nach 45 Minuten wurde die Lösung abgesaugt, das Behältnis mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, von engl. *Phosphate buffered saline*) gespült und das erwärmte Kulturmedium vorgelegt. Um eine Quervernetzung der Gelatineschicht zu erreichen, wurden die Deckgläschen für Immunfluoreszenzen zusätzlich mit einer zweiprozentigen Glutaraldehydlösung behandelt. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurden die Deckgläschen ausgiebig mit PBS gewaschen. Ihre Aufbewahrung erfolgte anschließend bei 4°C in mit P/S (10000 U/l) versetzten PBS.

Die auf T75 Kulturflaschen ausgesäten Caco2-Zellen erreichten nach vier bis fünf Tagen Konfluenz. Für die Versuche wurden sie im Verhältnis 1:6 aufgesplittet und auf die entsprechenden Kulturschalen verteilt. Hierfür wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Danach erfolgte eine 15-minütige Inkubation mit einer einprozentigen Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Lösung bei 37°C im Brutschrank. EDTA entzieht dem Medium durch Chelatbildung Calciumionen, sodass dieser Schritt der Schwächung der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion dient. Nach dem Absaugen von EDTA und einer erneuten Spülung mit PBS wurde der Zellrasen durch die Zugabe der Serinprotease Trypsin (Trypsin/

EGTA, Promocell, Heidelberg, Deutschland) für vier Minuten bei 37°C abgelöst. Schließlich erfolgte nach Zugabe des Nährmediums eine gründliche Resuspension der Zellen, sodass ein homogenes Zellgemisch entstand. Dieses wurde abgemessen und davon definierte Portionen in die gelatinisierten Kulturschalen gefüllt.

## **2.1.2. Testreagenzien**

### **2.1.2.1. GDNF**

Das dimere GDNF besteht aus zwei identischen, über Disulfidbrücken verbundenen Proteinmonomeren. Aufgrund seiner Primärstruktur und Morphologie wird der neurotrophe Faktor der TGF $\beta$ -Superfamilie zugerechnet. Eine Wirkung von GDNF auf die Blut-Hirnschranke und dopaminerge Neurone im Mesencephalon wurde bereits nachgewiesen. Abweichend von den Arbeiten mit Endothel- beziehungsweise Nervenzellen (Shimizu et al., 2011, Lara et al., 2003) musste, um einen Effekt in den Darmzellen zu erzielen, mit 100 ng/ml bei Caco2- und 200 ng/ml bei HT29B6-Zellen gearbeitet werden. Für unsere Versuche verwendeten wir rekombinantes GDNF von PeproTech (Rocky Hill, USA), dessen kalkuliertes molekulares Gewicht laut des Herstellers bei 30,4 kDa liegt.

### **2.1.2.2. Cytomix**

Zur Nachahmung des entzündungsinduzierten Zusammenbruchs der intestinalen Epithelbarriere applizierten wir auf die Zellkulturen eine definierte Kombination aus proinflammatorisch wirkenden Zytokinen, welche Cytomix genannt wird. Diese Mischung enthält neben 10 ng/ml TNF $\alpha$  (Biomol, Hamburg, Deutschland) und 10  $\mu$ g/ml IL-1 $\beta$  (Sigma, St-Louis, Missouri, USA) auch 0,05  $\mu$ g/ml IFN $\gamma$  (Millipore, Darmstadt, Deutschland).

Bei der Bewertung der Barrierefunktion von Caco2-Zellen wurde der permeabilitätssteigernde Effekt von Cytomix bereits im Vorfeld beschrieben (Cheadle et al., 2013).

#### 2.1.2.3. H89

Um die Aktivität der Proteinkinase A (PKA) zu inhibieren, verwendeten wir den selektiven Inhibitor H89 (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) in einer 30  $\mu\text{M}$  Endkonzentration. Proteinkinasen katalysieren den Transfer des  $\gamma$ -Phosphats eines ATP-Moleküls auf eine Hydroxylgruppe von Aminosäuren. H89 blockiert die PKA-Aktivität kompetitiv, indem es sich an die ATP-Bindungsstelle der katalytischen Untereinheit reversibel anlagert. So wird eine Phosphorylierung weiterer Proteine verhindert (Lochner und Moolman, 2006).

#### 2.1.2.4. SB202190

SB202190 ist ein selektiver Hemmstoff der p38-mitogenaktivierten Proteinkinase. Die p38 MAPK ist in Signalkaskaden eingebunden, welche große Bedeutung für Zelldifferenzierung, Zellwachstum und Apoptose haben. Der Inhibitor bindet sowohl die inaktive als auch die aktive Form des Enzyms (Frantz et al., 1998, Sun et al., 2015). Das zellgängige SB202190 (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) wurde in der vorliegenden Arbeit in 30  $\mu\text{M}$  Verdünnung eingesetzt.

#### 2.1.2.5. Anisomycin

Neben seiner Wirkung als Proteinsyntheseinhibitor gilt Anisomycin als potenter Aktivator von mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK). Zu dieser Familie gehören neben den c-Jun N-terminale Kinasen (JNK) auch die für unsere Experimente relevante p38 MAPK (Xiong et al., 2006). Anisomycin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) wurde in der vorliegenden Arbeit in einer Konzentration von 60  $\mu\text{mol/l}$  verwendet.

#### 2.1.2.6. Forskolin/ Rolipram (F/R)

Diese beiden Substanzen führen zu einem intrazellulären Anstieg von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Forskolin vermittelt diesen Effekt durch eine direkte Stimulation der Isoenzyme aus der Adenylatzyklase-Gruppe. Durch deren

Aktivierung wird die Umwandlung von Adenosintriphosphat (ATP) in den sekundären Botenstoff cAMP katalysiert. Dagegen wirkt Rolipram über eine spezifische Hemmung der Phosphodiesterase-4 (PDE-4) (Zimmermann et al., 2012), wodurch der Abbau des Second Messengers reduziert wird. In der Literatur wurde bereits eine protektive Wirkung einer erhöhten cAMP-Konzentration auf die Endothelbarriere beschrieben (Waschke et al., 2004). Wie bereits in anderen Arbeiten vorgeschlagen wurde (Schlegel et al., 2008), verwendeten wir in unseren Experimenten Forskolin und Rolipram (beide Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) in einer Konzentration von 5  $\mu$ M beziehungsweise 10  $\mu$ M.

### **2.1.3. Antikörper**

Antikörper binden nach dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ mit ihrer Antigen-Bindungsstelle an ein spezifisches Epitop eines Proteins (Matissek et al., 2013). Auf dieser Reaktion basiert das Prinzip der Immunmarkierung. Dabei wird das zu untersuchende Molekül durch Bildung eines Immunkonjugats nachgewiesen. Diese Methode wird bei der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie und bei Western Blot-Analysen genutzt. Der spezifische Primärantikörper dient der Detektion des gesuchten Proteins. Dessen F<sub>c</sub>-Teil wird von einem farbstoffmarkierten Sekundärantikörper erkannt. Dessen angekoppeltes Enzym induziert nach der Bindung die Entstehung eines Farbsignals. In der Immunfluoreszenz arbeiteten wir hingegen mit farbstoffgekoppelten Zweitantikörpern, bei denen zur Fluoreszenz keine enzymatische Reaktion, sondern deren Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge notwendig ist. Der Zweitantikörper wird von einem anderen Tier gegen IgG des Tieres hergestellt, welches den Primärantikörper gebildet hat. Wurde beispielsweise der Erstantikörper in einer Maus produziert, könnte der Sekundäre aus einem Kaninchen oder einer Ziege stammen (Mulisch 2013).

In den nachfolgenden Tabellen werden die hier verwendeten Primär- und Sekundärantikörper mit zusätzlichen Informationen aufgelistet.

**Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper**

Antikörper	Typ	Konzentration		Hersteller
		IF	Blot	
<b>a-E-Cadherin</b>	monoklonal, Maus	1: 100	1:1000	BD Transductions Laboratories, USA
<b>a-Occludin</b>	polyklonal, Kaninchen	1:50	1:200	Invitrogen, Darmstadt, D
<b>a-Claudin 1</b>	polyklonal, Kaninchen	1:50	1:400	Invitrogen, Darmstadt, D
<b>a-Claudin 5</b>	monoklonal, Maus	1:100	1:300	Invitrogen, Darmstadt, D
<b>a-S100 beta</b>	monoklonal, Maus	1:100	-	Abcam, Cambridge, UK
<b>a-Ki67</b>	monoklonal, Maus	1:100	-	Dako, Glostrup, Dänemark
<b>a-GDNF</b>	polyklonal, Ziege	-	1:500	R&D Systems, Abingdon, UK
<b>a-p38 MAPK</b>	polyklonal, Kaninchen	-	1:500	Cell Signalling Technology, Cambridge, UK
<b>a-pp38 MAPK</b>	polyklonal, Kaninchen	-	1:500	Cell Signalling Technology, Cambridge, UK
<b>a-GFR<math>\alpha</math>1</b>	polyklonal, Kaninchen	-	1:500	Abcam, Cambridge, UK
<b>a-GFR<math>\alpha</math>2</b>	polyklonal, Kaninchen	-	1:500	Abcam, Cambridge, UK
<b>a-RET</b>	monoklonal, Kaninchen	-	1:500	Abcam, Cambridge, UK

**Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper**

Antikörper	Konzentration		Hersteller
	Cy3-gek./IF	POX-gek./Blot	
<b>Ziege gegen Maus (gam)</b>	1:600	1:4000	Dianova, Hamburg, D
<b>Ziege gegen Kaninchen (garb)</b>	1:600	1:4000	Dianova, Hamburg, D
<b>Ziege gegen Ratte (gart)</b>	-	1: 3000	Santa Cruz, Heidelberg, D
<b>Maus gegen Ziege (mag)</b>	1:600	-	Dianova, Hamburg, D

#### **2.1.4. Fluoreszenzfarbstoffe**

##### **2.1.4.1. DAPI**

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der bei der Fluoreszenzmikroskopie zur Visualisierung der DNA im Zellkern eingesetzt wird. Die Verbindung lagert sich an Arginin-Thymidin-reiche DNA-Sequenzen an. Bei Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert DAPI im sichtbaren Bereich mit blauer Farbe (Kapuscinski, 1995).

##### **2.1.4.2. Alexa Fluor 488 phalloidin**

Zur Färbung von Aktin wurde das Fluorophor Alexa phalloidin 488 (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Phalloidin gehört zur Gruppe der Phallotoxine, welche spezifisch an filamentäres Aktin binden. Der angekoppelte Farbstoff Alexa Fluor emittiert nach Anregung grünes Licht (Haugland, 2002).

## **2.2. Zellbiologische Methoden**

### **2.2.1. Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie**

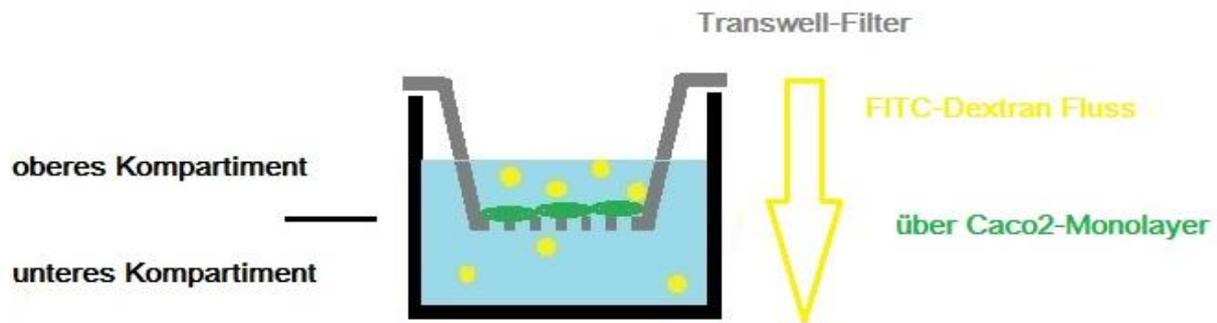
Diese Methode dient der Identifizierung und Lokalisierung bestimmter zellulärer Strukturen. Zudem können intrazelluläre Vorgänge, welche beispielsweise durch Testreagenzien getriggert wurden, visualisiert und damit verfolgt werden. Hierbei wurden die untersuchten Antigene mittels eines primären Antikörpers markiert und durch den Zweitantikörper sichtbar gemacht. Angeregt durch Licht bestimmter Wellenlänge emittieren die angekoppelten Fluorophore sichtbares Licht. So leuchtet der Carbocyanin-Farbstoff Cy3 als charakteristische Eigenschaft rot.

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen auf runde gelatinierte Deckgläschen ( $\varnothing$  12 mm) im Verhältnis 1:6 ausgesät und nach Konfluenz mit den jeweiligen Testreagenzien behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit zweiprozentiger Paraformaldehyd (PFA)-Lösung für zehn Minuten bei Raumtemperatur fixiert, dreimal mit PBS gewaschen und daraufhin zur Permeabilisierung für 15 Minuten in 0,1-prozentiger (v/v) Triton-X 100 (in PBS) inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die einzelnen Deckgläschen auf Objektträger transferiert und zur Absättigung unspezifischer Antikörperbindungsstellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit jeweils 20  $\mu$ l BSA-NGS (Bovine serum albumine- Normal goat serum: 0,1-prozentiges Rinderserumalbumin mit 10%igem Ziegenserum in PBS) bedeckt. Im Anschluss wurde das BSA-NGS von den Deckgläschen vorsichtig abgesaugt, 25  $\mu$ l des Primärantikörpers in den zuvor aufgeführten Verdünnungen aufgetragen und die Zellen in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht inkubiert. Am Folgetag entfernten wir die nicht gebundenen Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS. Anschließend wurde der passende Sekundärantikörper aufgetropft und für eine Stunde bei Raumtemperatur belassen. Gleichzeitig kann bei diesem Schritt Alexa Phalloidin 488 beigelegt werden. DAPI (1:3000 in PBS) wurde bei den entsprechenden Experimenten zehn Minuten vor Inkubationsende dazu pipettiert. Nun wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen und einmalig kurz in destilliertes Wasser getaucht. Zuletzt wurden die Deckgläschen mit der zellbedeckten Seite nach unten auf saubere Objektträger überführt. Auf diesen

wurde zuvor ein Tropfen Vector Shield Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) aufgebracht. Vector Shield vermindert das Ausbleichen der fluoreszierenden Proteine (Florijn et al., 1995). Repräsentative Präparate wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop BZ-9000 BIOREVO (Keysence, Osaka, Japan) fotografiert und digitalisiert. Die Bearbeitung und Schaubilderstellung erfolgte mittels Adobe Photoshop CS2 (Adobe Systems Inc, 2005, USA).

### **2.2.2. Permeabilitätsmessung mittels Transwellfiltersystem**

Eine Möglichkeit, die Permeabilität einer Epithelzellschicht zu quantifizieren, ist die Bestimmung des transepithelialen Flusses des Fluoreszenzfarbstoffs FITC-Dextran (Fluorescein isothiocyanate-dextran). Hierfür wurden Caco2- beziehungsweise HT29B6-Zellen auf semipermeablen Filtern mit einem Porendurchmesser von 0,4 µm (Falcon, Heidelberg, Deutschland) ausgesät und bis zum Erreichen des gewünschten Konfluenzstadiums kultiviert. Die einzelnen Filter wurden mit ihrem überstehenden Rand in einer 12-Well Platte aufgehängt, sodass ein oberes und ein unteres Flüssigkeitskompartiment entstand (Abb. 6). Für die Inkubation wurden die Testreagenzien in Kulturmedium verdünnt. Von diesem Ansatz wurde dem oberen Kompartiment 500 µl beziehungsweise 1600 µl in das untere Abteil beigefügt und für 24 Stunden belassen. Anschließend wurde dieser abgesaugt und die Zellen beziehungsweise Wells vorsichtig mit PBS gespült. Mit diesem Schritt entfernten wir alle Reste des Phenolrot-haltigen Kulturmediums, um so eine falsch positive Beeinflussung der späteren Fluoreszenzmessung zu vermeiden. Für die anschließende Messung wurden die Filter mit äquivalenten Mengen von Testreagenz in DMEM ohne Phenolrot (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und FCS befüllt. Zusätzlich wurde in das obere Kompartiment 100 µl FITC-Dextran (4kDA) in der Verdünnung 10 mg/ml (in PBS) beigefügt.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Transwellfiltersystems**

Caco2-Zellen wurden auf 12-Well Transwellfiltern kultiviert. Der mit Zellen beschichtete Filter wird in eine 12-Well Platte eingehängt und bildet im Experiment die Grenze zwischen oberem und unterem Flüssigkeitskompartiment. Das fluoreszierende FITC-Dextran wird in das obere Kompartiment gegeben. Anschließend fanden, um die Durchlässigkeit der Zellschicht zu evaluieren, Probenentnahmen aus dem unteren Abteil statt.

Für die Nullwertbestimmung erfolgte umgehend die erste Probenentnahme von 50 µl aus dem oberen Kompartiment. Diese wurde in eine 96-Loch Platte überführt, wo im Vorfeld in den entsprechenden Wells 50 µl klares Medium vorgelegt wurde. Danach wurde die 12-Well Platte mit den Filtern in einem 37°C warmen Inkubator auf einer horizontalen Schüttelplatte (Typ 3017, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland) abgestellt. Nach 30, 60, 90 und 120 Minuten wurden aus den unteren Kompartimenten jeweils 100 µl entnommen und ebenfalls auf die 96-Well Platte transferiert. Nach jeder einzelnen Entnahme erfolgte ein Pipettenspitzenwechsel. Zwischen den Abnahmen wurde das Transwellssystem zurück in den Inkubator gebracht und dort weiter gleichmäßig geschwenkt. Die 96-Well Platte wurde in einer Dunkelbox bei 4°C verwahrt. Nach Gewinnung des 120min-Wertes erfolgte die photometrische Messung der Aliquots mittels Fluoreszenzspektrometer (Wallac Victor2, Perkin-Elmer, Überlingen, Deutschland) bei einer Exzitation von 485 nm und der Emission von 535 nm. Für alle Experimente wurde der Permeabilitätskoeffizient ( $P_E$ ) in cm/s über die Formel  $P_E = [(\Delta C_A / \Delta t) \cdot V_A] / S \cdot \Delta C_L$  bestimmt ( $\Delta C_A$ = Änderung der FITC-Dextran Konzentration,  $\Delta t$ = Zeitdifferenz [s],  $V_A$ = Volumen des abluminalen Medium [µl],  $S$ = Oberfläche [cm<sup>2</sup>],  $\Delta C_L$ = konstante luminale Konzentration).

### **2.2.3. Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands**

Eine weitere Methode, um funktionelle Veränderungen einer Epithelbarriere zu detektieren, stellt die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (*transepithelial electric resistance*, TER) eines Monolayers aus Caco2-Zellen dar. Zusätzlich kann hierbei, im Gegensatz zu Endpunktassays wie dem Transwellversuch, eine kontinuierliche Quantifizierung der Barrierefunktion im Zeitverlauf nach Mediatorgabe erfolgen. Das hierfür verwendete ECIS (*Electric Cell-substrate Impedance Sensing*) 1600R-Gerät (Applied BioPhysics Inc., USA) misst zeitaufgelöst die Spannung über zellbedeckten Impedanzelektroden bei einem angelegten Strom von 1  $\mu\text{A}$  bei 400 Hz. Caco2-Zellen wurden auf einer ECIS 8-Well Platte ausgesät und auf der Goldfilmelektrode kultiviert. Die Messung erfolgt über insgesamt 40 im Well verarbeitete Elektroden.

Adhärenzen der Zellen beziehungsweise bilden diese vermehrt Zell-Zellkontakte aus, steigt der Wechselstromwiderstand, da die Anwesenheit der Zellkörper und extrazellulären Proteinbrücken den Stromfluss zwischen Elektrode und Medium erschweren. So werden Änderungen der parazellulären Permeabilität in Varianzen der gemessenen Impedanz abgebildet (Rädler und Wegener, 2009). Im Vorfeld einer Messreihe fand zunächst ein Mediumswechsel statt und exakt 200  $\mu\text{l}$  wurden in jede Vertiefung gegeben. Anschließend wurde die Lochplatte in die Messkammer eingespannt. Nach einer zehnmütigen Äquilibration zur Bestimmung der Ausgangswerte (Baseline), wurde den Wells erneut 200  $\mu\text{l}$  Medium wahlweise mit Mediator beigefügt. Die Endkonzentration von GDNF betrug in der Interventionsgruppe 100 ng/ml. Nach der Zugabe wurde die Messung sofort wieder gestartet und über 24 Stunden weitergeführt. Die Messreihen wurden mit Microsoft Excel ausgewertet und graphisch dargestellt.

### **2.2.4. Proteinanalyse mittels Western Blot**

Mithilfe der Western Blot (engl. für „Abklatsch/ Übertragung“)-Untersuchung können bestimmte Proteine in einem Zelllysat nachgewiesen werden. Gleichzeitig besteht die Möglichkeit Mengenveränderungen derselben darzustellen. Auftrennung, Transfer

und letztendlich der spezifische Nachweis von Proteinen stellen die grundlegenden Schritte der Blotting-Technik dar (Renart et al., 1979).

#### 2.2.4.1. Herstellung der Zelllysate

Zunächst wurden die Epithelzellen in Petrischalen ( $\varnothing$  3,5 cm) ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Im Anschluss folgte die Inkubation der Zellen mit dem Mediator über 24 Stunden im Brutschrank. Nach Ablauf der Zeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Nach Beigabe von 300  $\mu$ l Lysepuffer, welcher 25 mmol/L HEPES-Puffer (pH 7,6), 2 mmol/L EDTA, 25 mmol/L einprozentiges Sodium dodecyl sulfate (SDS) und zusätzlich für die Hemmung endogener Proteasen Natriumfluorid enthält, konnten die Zellen abgeschabt und in ein Mikroreaktionsgefäß von Eppendorf (Hamburg, Deutschland) überführt werden. Vor Weiterverwendung wurden die Proben sonifiziert und mit dem Vortexgerät bearbeitet.

#### 2.2.4.2. Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

Um bei der später folgenden Gelelektrophorese äquivalente Proteinmengen pro Tasche auftragen zu können, muss zunächst der Proteingehalt jedes einzelnen Zelllysats ermittelt werden. Diese quantitative Proteinbestimmung wurde nach der Bicinchonon-Säure-Methode (engl. *Bicinchoninic Acid*, BCA) mithilfe eines Kits der Firma ThermoFisher (Darmstadt, Deutschland) vorgenommen.

Der Nachweis beruht auf einer Kombination aus der Biuret- und einer nachfolgenden Komplexbildungsreaktion mit BCA. Beim ersten Reaktionsschritt werden  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in alkalischer Lösung von Peptidbindungen komplexiert und zu  $\text{Cu}^{1+}$  reduziert.

Im zweiten Schritt bildet das Kation mit BCA violette Farbkomplexe, die über ihr Absorptionsmaximum bei 595 nm photometrisch quantifiziert werden können. Der Proteingehalt der Proben wird anschließend über eine Kalibriergerade berechnet. Diese wurde über Standardreagenzien, welche Rinderserumalbumin (BSA) in verschiedenen, definierten Konzentrationen enthalten, erstellt. Hierbei arbeiteten wir

exakt nach Herstellerangaben und trugen 10 µl der einzelnen Proteinstandards pro Well in eine 96-Lochplatte auf.

Um die Eiweißdichte in unseren Proben zu reduzieren, verdünnten wir diese im Verhältnis 1:5. Hierfür legten wir 8 µl destilliertes Wasser vor und ergänzten anschließend 2 µl des jeweiligen Zellysats. Sowohl die BSA-Standards als auch die zu untersuchenden Proben trugen wir zweifach auf, um mögliche Varianzen beim Pipettieren durch nachfolgende Durchschnittsberechnung zu reduzieren. Nach dem Mischen der im Set enthaltenen BCA-Reagenzien A und B fügten wir jedem Well 200 µl der Lösung bei und ließen die Platte bei 37°C für 30 Minuten ruhen. Im Anschluss erfolgte die Messung mittels Spektralphotometer (Dynatech Laboratories MRX Microplate Reader, El Paso, USA).

#### 2.2.4.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der im Zellysat enthaltenen Proteine erfolgte mittels eindimensionaler Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970).

Das Prinzip beruht auf der unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit von Proteinen - abhängig von ihrer Größe - durch eine Gelmatrix aus Acrylamid und Bisacrylamid im elektrischen Feld. Hierbei bindet das zugesetzte anionische Detergenz SDS an die Proteine der Probe und überdeckt deren Eigenladung. Gleichzeitig kommt es zu einer Auflösung der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Aminosäureketten. Zusätzlich wird die Denaturierung der Proteine durch das Erhitzen der Proben unterstützt. Die einheitlich negative Ladung ist zum Molekulargewicht proportional, sodass die SDS-Protein-Komplexe in der polymerisierten Gelmatrix nach Anlegen der Spannung zur Anode wandern und nach ihrer molaren Masse aufgetrennt werden. Dabei bewegen sie sich umso schneller, je geringer ihr Eigengewicht ist.

Gemäß der Methode nach Laemmli verwendeten wir vorgegossene Zwei-Komponenten-Gele (NuPage 4-12% Bis-Tris Gel) der Firma ThermoFisher (Darmstadt, Deutschland). Die Gelplatten spannten wir in die mit einfach konzentriertem MOPS SDS Running Buffer (ThermoFisher, Darmstadt, Deutschland) gefüllte Elektrophoresekammer (Novex MiniCell, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)

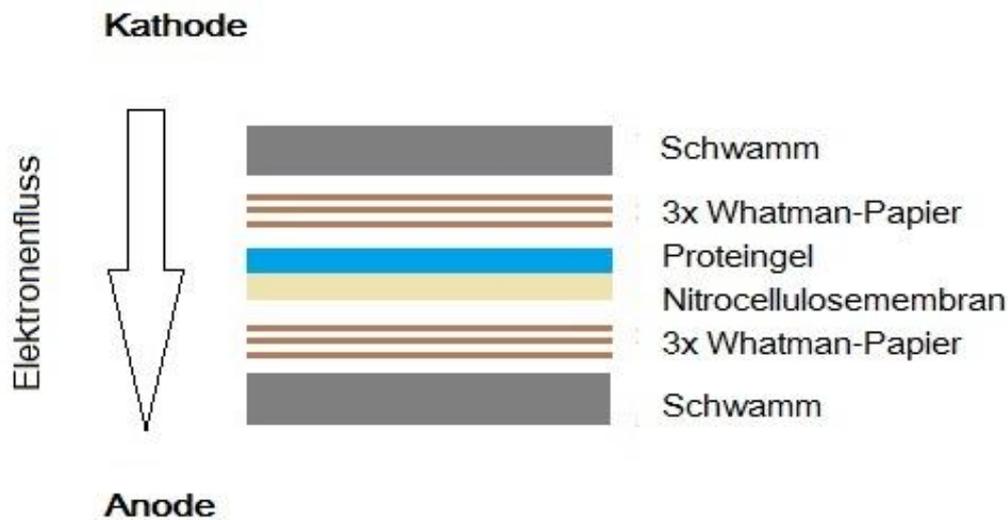
ein. Zunächst werden in einem solchen Gelsystem die Proteine der Probe konzentriert, während im Anschluss die Proteinfractionen mithilfe des Trenngels separiert werden. Zur Vorbereitung wurden die Zellysate mit vierfach konzentriertem Probenpuffer im Verhältnis 1:1 vermischt. Neben SDS enthält der Probenpuffer Glycerin, das über eine Dichteerhöhung die Proben in den Geltaschen absinken lässt. Zusätzlich wurde der Farbstoff Bromphenolblau zur Visualisierung der Proteinmigration im Gel und das reduzierende Dithiothreitol (DTT) beigefügt. Durch Reduktion können Disulfidbrücken zwischen Aminosäuren gespalten werden. Nach dreiminütigem Kochen bei 95°C pipettierten wir jede Probe in eine Tasche des Sammelgels. Daneben wurde ein Marker für die Größenordnung der getrennten Proteine aufgetragen (PPL-Marker für engl. *prestained protein ladder*, 10-180 kDa, ThermoFisher, Darmstadt, Deutschland). Zu Beginn der Elektrophorese wurde eine Spannung von 80 Volt angelegt. Nach circa einer Stunde, nachdem die farblich markierte Lauffront in das Trenngel übergetreten war, wurde die Spannung auf 120 Volt erhöht und abgewartet bis der Farbstoff aus dem Gel herausgelaufen war. Danach wurde die Gelplatte aus der Kammer genommen und für den Immunoblot weiterverarbeitet.

#### 2.2.4.4. Proteintransfer durch Western Blot

Anschließend wurden die nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine aus dem Gel positionsgenau auf eine Nitrocellulosemembran übertragen ("geblottet") und dadurch immobilisiert. Bei der Western-Technik nach Towbin erfolgt dieser Transfer mittels einer zweiten Elektrophorese, also durch das erneute Anlegen einer Spannung, in einer horizontalen Blotkammer als Nassblot-Verfahren (Towbin et al., 1979). Hierfür wurden zunächst eine Nitrocellulosemembran und sechs Filterpapiere (sogenannte Whatman-Paper) für drei Minuten in Blotpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol) getränkt.

Im Anschluss wurde das Proteingel luftblasenfrei auf der Membran positioniert und die beiden Lagen zwischen je drei feuchten Filterpapieren deponiert. Dieses Paket wurde zwischen zwei Schwämmen mithilfe der Siebvorrichtung in die Blotkammer (Peqlab, Erlangen, Deutschland) geklemmt (Abb. 7). Der Wanderungsrichtung der negativ geladenen Proteine entsprechend richteten wir das Polyacrylamidgel zur

Kathode beziehungsweise die Cellulosemembran zur Anode hin aus. Nach Anlegen einer Stromstärke von 170 mA wanderten die Proteine aus dem Gel entlang des elektrischen Felds auf die Membran und blieben dort haften. Während dieses eineinhalbstündigen Vorgangs wurde die Blotkammer im Kühlraum bei 4°C gelagert.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des Nassblotverfahrens**

#### 2.2.4.5. Proteindetektion mittels spezifischer Antikörper

Nach dem Transfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockierungslösung (hier fünfprozentiger Magermilchpuffer in PBS mit 0,05-prozentigem Tween) unter ständigem Schwenken auf einem Schüttler inkubiert. Auf diese Weise wird die unspezifische Antikörperbindung reduziert und der hochspezifische Antigennachweis ermöglicht.

Anschließend folgte, analog zur indirekten Immunfluoreszenzfärbung, die Inkubation der Nitrocellulosemembran mit den verschiedenen Primärantikörpern über Nacht im Kühlraum (4°C) auf einem Schüttler (Verdünnungen in Magermilchpuffer siehe Tabelle 1 und 2). Nach dreimal achtminütigem Waschen der Membran in PBS mit 0.05-prozentigem Tween 20 wurden diese mit dem passenden, an Meerrettich-Peroxidase (POX) gekoppelten, Sekundärantikörper bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Auch hier wurden die Membranen auf einem Schüttler inkubiert, um

eine gleichmäßige Benetzung der Folien zu gewährleisten. Nach Wiederholung der Waschschriffe erfolgte die Detektion der Enzym-Antikörper-Konjugate mittels einer Chemilumineszenzreaktion (engl. *enhanced chemiluminescence*, ECL). Dazu wurden die Membranen für eine Minute in einer Luminol und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-haltigen Belichtungslösung (ECL-Lösung 1 und 2 im Verhältnis 1:1 von AppliChem, Darmstadt, Deutschland) geschwenkt. Im Rahmen dieser Methode katalysiert die gebundene POX in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form: ein lichtemittierendes Carbonyl.

Die Membran wurde anschließend in einer automatisierten Entwicklermaschine (FluorChem FC2, Alpha Innotech, Biozym, Oldenburg, Deutschland) belichtet, digitalisiert und mithilfe der ImageJ Software (Rasband, NIH, USA) ausgewertet.

Neben der qualitativen Proteinbestimmung können hierbei anhand der Breite und Intensität der Banden Unterschiede in der Proteinmenge ausgemacht werden. Um sicherzustellen, dass initial alle Geltaschen mit äquivalenten Proteinmengen beladen wurden, führten wir zusätzlich eine sogenannte Ladungskontrolle durch. Dazu wurden die Membranen mit einem Primärantikörper gegen das Strukturprotein  $\beta$ -Aktin beziehungsweise GAPDH, wie oben beschrieben, behandelt und entwickelt.

### **2.2.5. cAMP-Aktivierungssassay**

Um die vorher beschriebene Beeinflussung des cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP)-Levels durch GDNF (Lara et al., 2003) auf die von uns verwendeten Caco2-Zellen zu projizieren, quantifizierten wir, wie bereits beschrieben (Baumer et al., 2008), die intrazelluläre Menge von cAMP mittels eines handelsüblichen cAMP-*Enzym-linked Immunosorbent Assay* (ELISA)-Kits (Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland). Das Testprinzip beruht auf der Konkurrenz zwischen dem zu bestimmenden cAMP aus der Probe und einer definierten Menge an cAMP-Phosphatase-Konjugat um die Bindung an einer limitierten Anzahl von cAMP-spezifischen Antikörpern. Die spätere Reaktion zwischen der cAMP-gekoppelten alkalischen Phosphatase und einer Substratlösung führt zu einer Farbreaktion, die umso stärker ausfällt, je weniger cAMP aus den Proben an die Antikörper gebunden hat. Diese kann mithilfe eines Photometers quantifiziert werden.

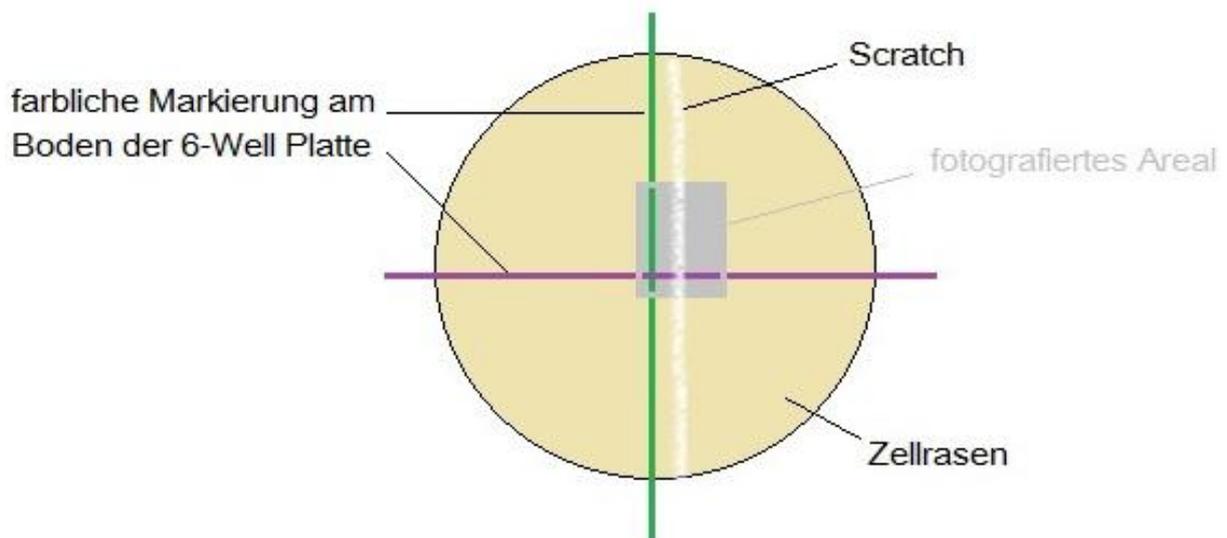
Die nach Standard in Petrischalen ( $\varnothing$  3,5 cm) kultivierten Caco2-Zellen wurden nach 24-stündiger Stimulation mit 100 ng/ml GDNF lysiert. Abweichend von dem bereits beschriebenen Protokoll (siehe 2.2.4.1. Herstellung der Zelllysate) wurde hier zusätzlich 0,1 M Chlorwasserstoff (HCl) beigefügt. Die Behandlung der Zellen mit HCl blockiert die Aktivität der endogenen Phosphodiesterasen und verhindert damit eine Verfälschung der Messergebnisse durch einen fortschreitenden Abbau von cAMP während der Verarbeitung der Proben. Anschließend wurde der Zelldebris durch Zentrifugation gesammelt, der Überstand abpipettiert und weiterverarbeitet. Im verwendeten Kit ist eine 96-Well Mikrotiter Platte enthalten, welche mit einem polyklonalen Antikörper (Ziege gegen Kaninchen) überzogen ist. Nach Ansetzen der cAMP-Verdünnungsreihe nach Herstellerangaben aus dem Standard Stock wurden die ersten Wells der Platte mit 100  $\mu$ l der verschiedenen Standardlösungen befüllt. Anschließend wurden jeweils 100  $\mu$ l der einzelnen Proben in Duplikaten aufgetragen. Daraufhin wurde sowohl den Standards als auch den Zelllysaten 50  $\mu$ l der „blauen“ Lösung beigefügt, welche an alkalische Phosphatase gebundenes cAMP enthält. Zusätzlich pipettierten wir 50  $\mu$ l der „gelben“ cAMP-Antikörper (Kaninchen, polyklonal)-haltigen Lösung in die Wells.

Während der simultanen Inkubation für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler bindet der Antikörper kompetitiv an das cAMP der Proben und das konjugierte cAMP. Nach dreimaligem Waschen der Platte mit dem Waschpuffer des Kits bleibt nur das cAMP zurück, welches antikörpergebunden über den  $F_c$ -Teil an die Antikörperbeschichtung der Mikrotiterplatte geheftet wurde. Nach Beifügen von 200  $\mu$ l P-Nitrophenyl-Phosphat-haltiger Substrat-Lösung kommt es innerhalb einer Stunde zu einer - durch die alkalische Phosphatase katalysierten - gelben Farbbildung. Unmittelbar nach hinzufügen von 50  $\mu$ l der Stop-Lösung in alle Wells wurde photometrisch die Farbintensität bestimmt (Genios Pro Fluorescence, Tecan, Crailsheim, Deutschland). Über die gemessene optische Dichte kann anschließend, mithilfe der Extinktionswerte der Standardverdünnungsreihe, die Konzentration von cAMP (pmol/ml) in den einzelnen Proben berechnet werden. Die cAMP-Konzentration der Kontrollen wurde im jeweiligen Experiment als 100%-Wert gesetzt und mit den Werten der mit GDNF behandelten Zelllysate verglichen.

### 2.2.6. In vitro-Wundheilungsassay

Der sogenannte Scratch-Assay (engl. für „Kratzer“-Untersuchung) ist eine häufig verwendete in vitro-Technik zur Untersuchung von Wundheilungsprozessen. Hierbei wird nach manueller Verletzung einer Zellfläche deren Verschluss durch Migration und Proliferation fotografisch festgehalten (Liang et al., 2007).

Zunächst wurden wie oben beschrieben Caco2-Zellen in 6-Well Platten ausgesät. Deren Böden wurden zuvor mit zweifarbigen Kreuzen markiert, um die Wiedererkennung eines definierten Bereichs bei mikroskopischer Betrachtung zu gewährleisten. Bei Konfluenz der ausplattierten Zellen wurde eine standardisierte Wunde mit einer sterilen 100 µl-Pipettenspitze in den intakten Zellfilm gesetzt (Abb. 8). Zum Entfernen von Zelldebris wurden die Kulturschalen einmalig mit Kulturmedium gewaschen. Unmittelbar im Anschluss erfolgte die Zugabe von jeweils 1500 µl Medium mit oder ohne Mediator und der Zustand der Wunde im Zellrasen wurde mithilfe eines digitalen BZ-9000 Bioevo Mikroskops (Keyence, Osaka, Japan) dokumentiert. In der Folge wurde in 24-stündigem Abstand das Kulturmedium gewechselt, der Interventionsgruppe frisches GDNF beigefügt und anschließend der definierte Bereich des verletzten Zellmonolayer fotografiert.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der Wundsetzung im markierten Well**

Um den zeitlichen Verlauf des Wundverschlusses unter Kontrollbedingungen dem des nach GDNF-Inkubation gegenüberzustellen, bestimmten wir das Verhältnis der

Größe des Wundareals nach 24, 48 und 72 Stunden verglichen mit der initialen Fläche. Zur Vermessung der Wundflächen nutzen wir das Programm ImageJ (Wayne Rasband, NIH, USA). Um die Reproduzierbarkeit unserer Experimente zu gewährleisten, wurde jeder Scratch nach dem gleichen Schema durch einen Mitarbeiter gesetzt und die Vermessung der Wundfläche von einem zweiten, unabhängigen Untersucher verblindet durchgeführt. Ob es sich bei mediatorbedingten Unterschieden im Zeitverlauf der Wundheilung um ein proliferatives oder auf Migration beruhendes Phänomen handelt, untersuchten wir in einem weiteren Arbeitsschritt, welcher nachfolgend beschrieben wird.

### **2.2.7. Evaluation der Zellproliferation mittels DAPI- und Ki67-Färbung**

Zur Beurteilung des Einflusses von GDNF auf die Zellproliferation visualisierten wir die Anzahl der sich teilenden Zellen in unreifen Zellmonolayern aus Caco2-Zellen. Hierfür bearbeiteten wir Caco2-Zellen im präkonfluenten Stadium (c-1), wie für die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie bereits beschrieben wurde. Zur Detektion der Zellen, welche sich in der Inter- beziehungsweise Mitosephase des Zellzyklus befinden, nutzten wir einen Primärantikörper gegen das humane proliferationsassoziierte Kernantigen Ki67.

Hierbei handelt es sich um einen etablierten Referenzmarker zur Bestimmung der Proliferation in einer Zellkultur. Während der G<sub>1</sub>, S, und G<sub>2</sub>-Phase ist Ki67 im Nukleoplasma zu detektieren, wohingegen sich das Protein im Verlauf der Mitose als Netzwerk um das kondensierende Chromatin legt. Befindet sich eine Zelle im proliferatorischen Ruhestand (G<sub>0</sub>-Phase), lässt sich das Antigen nicht darstellen (Scholzen und Gerdes, 2000). DAPI wurde für die optische Darstellung aller Zellkerne beigefügt. Anschließend erfolgte die Quantifizierung des Anteils von Ki67-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl pro definierte Fläche. Hierfür wurden je Experiment stichprobenartig drei Felder ausgewählt und diese verblindet analysiert. Das variable Verhältnis von sich teilenden Zellen zu allen dargestellten Zellkernen demonstriert den Einfluss der unterschiedlichen Inkubationsbedingungen.

### 2.3. Angaben zur Statistik

Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung der Rohdaten diente die Software Prism (GraphPad, La Jolla, USA). Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Als statistisch signifikant wurden Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5% ( $p < 0,05$ ) erachtet und in den Diagrammen mit  $*p < 0,05$  gekennzeichnet. Nach Überprüfung der Gaußschen-Verteilung, wurden zum Vergleich zweier Ergebnisse der gepaarte Students t-test verwendet (Microsoft Excel, 2007, USA).

Zur Verifizierung der Unterschiede zwischen mehreren Versuchsgruppen nutzen wir nach einer Varianzanalyse (ANOVA, *analysis of the variance*) die Bonferroni Korrektur zur Elimination des  $\alpha$ -Fehlers. Die erhobenen Daten basieren auf mindestens fünf voneinander unabhängigen Experimenten ( $n \geq 5$ ).

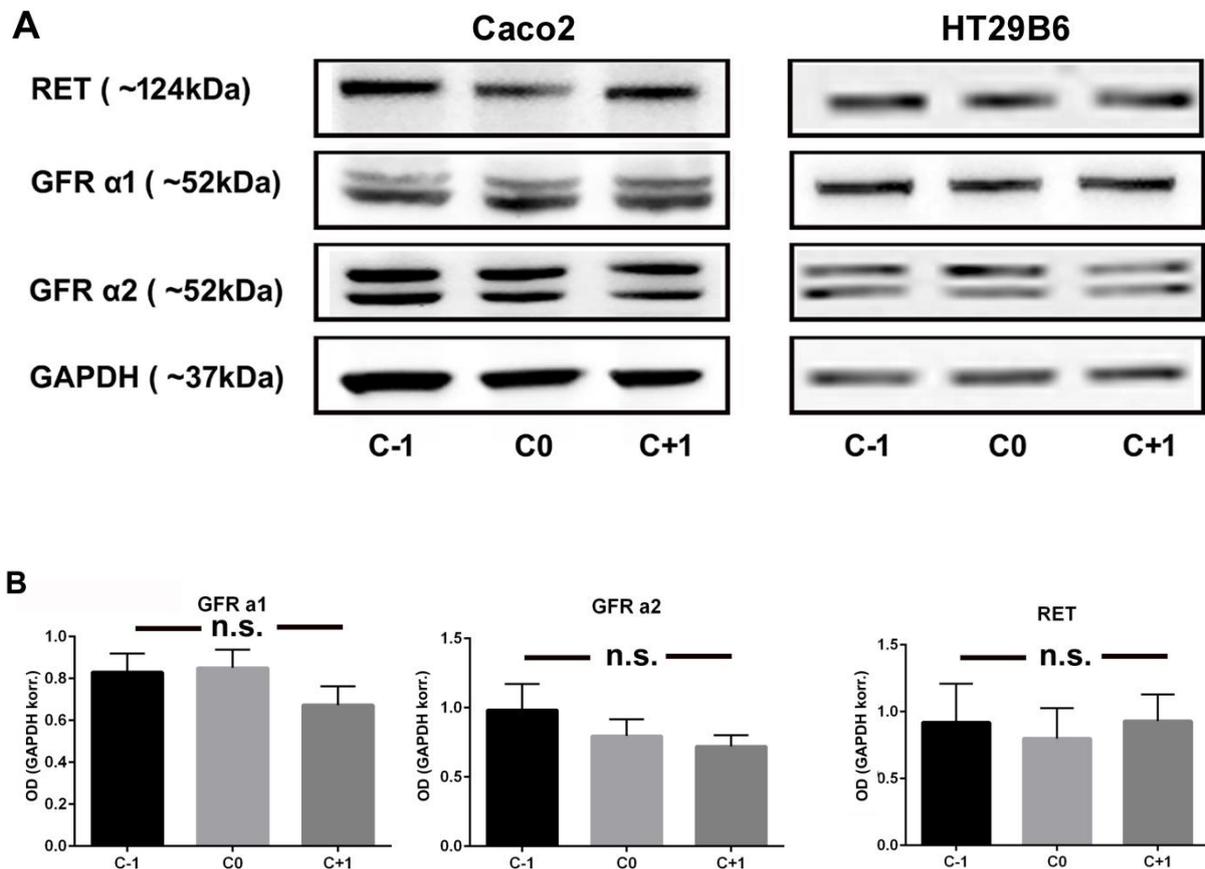
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Caco2- und HT29B6-Zellen und exprimieren GDNF-Rezeptoren

Zu Beginn wurde untersucht, ob die für die Experimente geplanten Zellkulturen GDNF-spezifische Rezeptoren exprimieren und sich damit grundsätzlich für Versuche mit diesem neurotrophen Faktor eignen. Um Ergebnisse zu verifizieren, führten wir unsere in vitro-Versuche prinzipiell mit zwei unterschiedlichen Zelltypen durch. Hierfür verwendeten wir mit Caco2- beziehungsweise HT29B6-Zellen etablierte und für intestinales Epithel repräsentative Zelllinien. Da im humanen Gastrointestinaltrakt physiologischerweise immer verschiedene Differenzierungsstadien der Enterozyten vorliegen, wurden unsere Versuchsansätze in mehreren Reifestadien überprüft. So wurden die Zellkulturen hinsichtlich ihrer Konfluenz täglich beurteilt. Eine Zellkultur gilt als konfluent, wenn die einzelnen Zellen so weit proliferiert haben und in so engem Zell-Zellkontakt stehen, dass keine Wachstumsoberfläche in der Kulturschale mehr frei ist. Durch das Phänomen der Kontakthemmung kommt es dann zum Sistieren der Zellteilung. Nach intensivem Studium der Entwicklungsstadien entschieden wir uns für die Untersuchung der Zellen einen Tag vor 100%iger Konfluenz (c-1) und an dem darauffolgenden Tag (c1). Unter c1-Bedingungen formten die Epithelzellen einen stabilen und voll differenzierten Monolayer (Nachweis der Differenzierung, siehe folgende Abschnitte).

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen wie beschrieben aufgearbeitet, um mittels Western Blot-Analysen die Proteinexpression von GFR $\alpha$ 1, GFR $\alpha$ 2 und RET in Caco2 und HT29B6 nachzuweisen. Zu allen genannten Zeitpunkten zeigten beide Zelllinien eine Expression der untersuchten Proteine. In einem zweiten Schritt eruierten wir, ob abhängig von der Konfluenz und damit der Reife der Zellen quantitative Unterschiede der Proteinexpression zu finden sind. Dafür wurde die optische Dichte der rezeptorspezifischen Proteinbanden in verschiedenen Stadien (von c-1 bis c1) der Zellreifung analysiert. Um sicherzustellen, dass mögliche Unterschiede nicht aus einer ungleichmäßigen Auftragung der Proben resultierten, wurde zur Ladungskontrolle die Nitrocellulosemembranen mit Antikörpern gegen die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GADPH) inkubiert (siehe Abb. 9).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass es sowohl in Caco2- als auch in HT29B6-Zellen während der Differenzierung zu keinen signifikanten Veränderungen der Proteinkonzentration von GFR $\alpha$ 1, GFR $\alpha$ 2 und RET kommt.



**Abbildung 9: GDNF-Rezeptorexpression (RET, GFR $\alpha$ 1, GFR $\alpha$ 2) durch Caco2 und HT29B6**

**A** Western Blot-Untersuchungen zeigen die Proteinexpression von RET, GFR $\alpha$ 1 und GFR $\alpha$ 2 in Lysaten der genannten Epithelzelllinien während verschiedener Phasen der Differenzierung (c-1, c0, c1). GAPDH diente als Ladungskontrolle (Anzahl der Versuche n= 6).

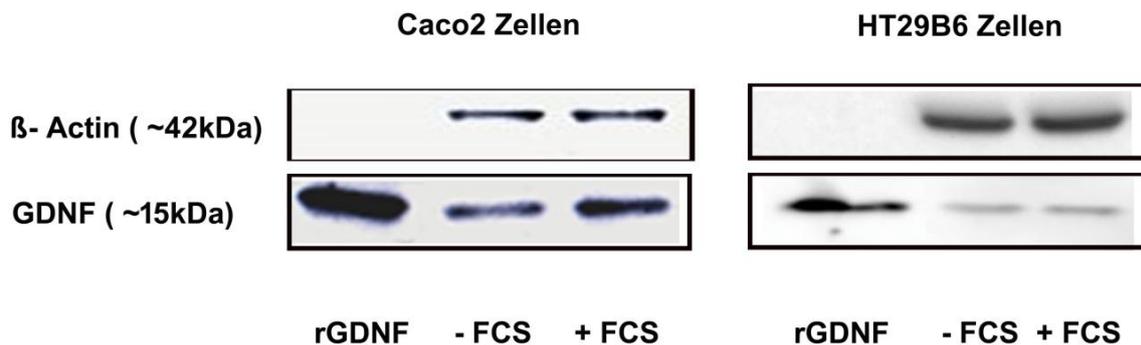
**B** Messung und Auswertung der optischen Dichte der Western Blot-Banden ergaben keine signifikanten Änderungen der Konzentration von GDNF-Rezeptorproteinen während des Differenzierungsvorgangs von Caco2-Zellen (Anzahl der Versuche n= 6, n.s.= nicht signifikant).

### 3.2. Enterozyten stellen eine neue GDNF-Quelle dar

Enterische Gliazellen sind nicht die einzige Quelle für die Synthese und Sekretion von GDNF (Lara et al., 2003, Meir et al., 2015). Zunächst wurde die Hypothese untersucht, dass, aufgrund der potentiellen Bedeutung dieses Faktors für die Integrität der Darmbarriere, humane Enterozyten selbst als mögliche Ursprungszellen von GDNF anzusehen sind. Diese Annahme beruhte auf der Detektion von GDNF in der Mukosa von humanen Gewebeproben (Meir et al., 2015).

Um dies *in vitro* zu überprüfen, evaluierten wir den GDNF-Gehalt in kultivierten intestinalen Epithelzelllinien. Auch für diese Versuche nutzten wir Caco2- und HT29B6-Zellen. Mittels Western Blot-Analysen prüften wir, ob deren Zelllysate im FCS-haltigen beziehungsweise kälberserumfreien Medium GDNF beinhalten. Tatsächlich zeigte sich in beiden Versuchsettings - auf Höhe der 15 kDa-Markierung - die für den neurotrophen Faktor GDNF spezifische Bande. Zudem ließ sich im Überstand der Caco2-Zellen, welche vor der Lysierung für 24 Stunden in serumfreien Medium kultiviert wurden, GDNF nachweisen. Im Anschluss führten wir die standardmäßige Ladungskontrolle mit  $\beta$ -Aktin und zusätzlich eine Positivkontrolle für GDNF durch.

Explizit zu betonen ist, dass es sich bei unserem Versuchsaufbau nicht um eine Cokultur mit Gliazellen handelte, wie sie von anderen Forschungsgruppen (Neunlist et al., 2003, Van Landeghem et al., 2009) benutzt wurde. Somit ist ausgeschlossen, dass dieser *in vitro*-Nachweis von GDNF auf die Sekretion einer anderen Zellpopulation zurückzuführen ist (Abb. 10). Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass beide Zelllinien ohne einen zugeführten Stimulus, wie zum Beispiel in Form eines proinflammatorischen Zytokins, erhebliche Mengen an GDNF synthetisieren und somit Enterozyten als nicht-gliale Quelle von GDNF in Betracht zu ziehen sind.



**Abbildung 10: Positiver Nachweis von GDNF in Caco2- und HT29B6-Zelllysaten**

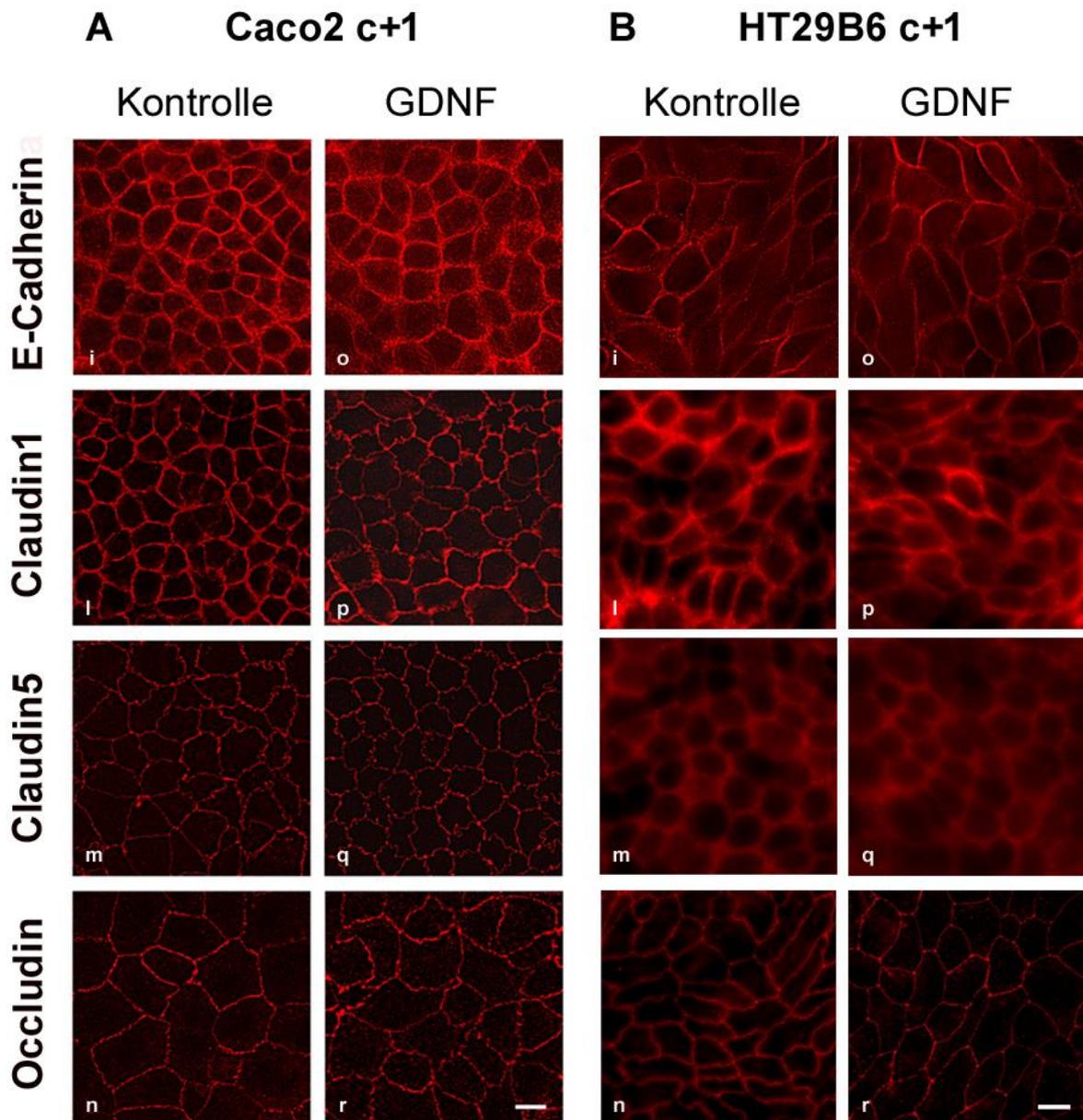
Mittels Western Blot-Untersuchungen erfolgte der Nachweis von GDNF sowohl in den Lysaten von Caco2- als auch in den der HT29B6-Zellen. Die Versuche wurden mit einem FCS-haltigen und kälberserumfreien Medium durchgeführt. Anschließend wurden die Membranen mit  $\beta$ -Aktin zur Ladungskontrolle behandelt. Rekombinantes GDNF (rGDNF) diente als Positivkontrolle (Anzahl der Versuche n= 6).

### **3.3. Applikation von GDNF hat keinen Einfluss auf die Barriereigenschaften von ausgereiften Interzellularkontakten**

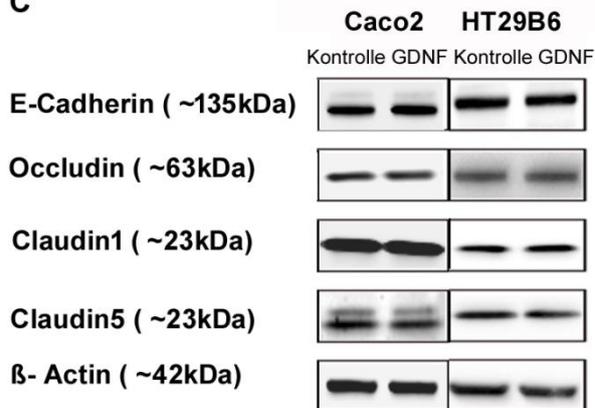
Um den Einfluss des neurotrophen Faktors GDNF auf das Epithel im MDT weiter zu evaluieren, führten wir nach Inkubation kultivierter intestinaler Epithelzellen mit 100 ng/ml beziehungsweise 200 ng/ml GDNF verschiedene in vitro-Versuche durch. Auch für diese Testreihen verwendeten wir Caco2- und HT29B6-Zellen.

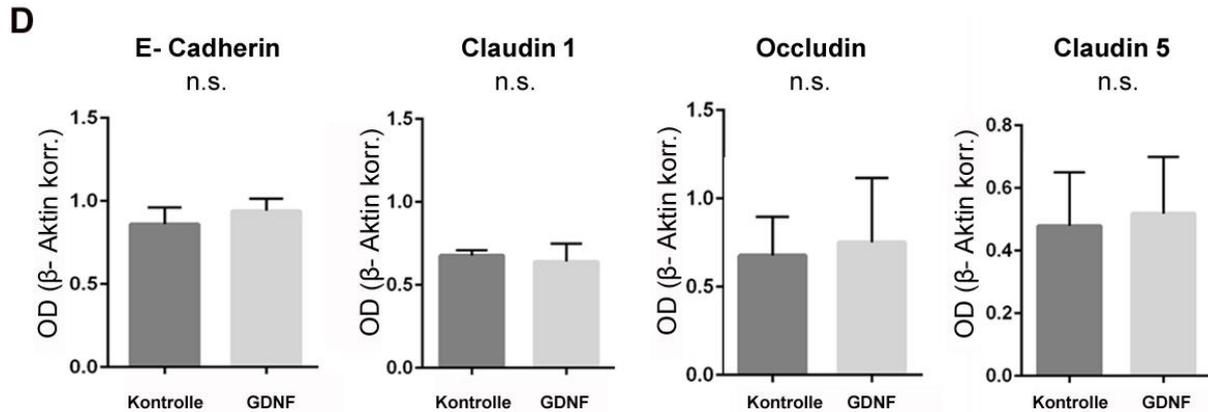
Zunächst fertigten wir unter verschiedenen Konfluenzbedingungen (c-1 und c1) Immunfluoreszenzfärbungen an, um Zellkontaktproteine der Tight junctions und Adhärenskontakte zur Darstellung zu bringen. Einen Tag nach Erreichen der Konfluenz (c1) stellte sich ein regelmäßiges und deutlich ausgeprägtes Färbungsmuster von Claudin 1, Claudin 5, Occludin und E-Cadherin an den Zellgrenzen dar (Abb. 11a&b, Abb. 15a&b). Aufgrund der ausgereiften junctionalen Komplexe definierten wir Zellen im c1-Stadium als ausdifferenziert und somit als repräsentatives in vitro-Modell für die Enterozyten der Villi im Säugetierdarm.

Mit diesen Zellen im c1-Stadium fertigten wir anschließend erneut Immunfärbungen an. Eine Gruppe wurde einen Tag vor Erreichen der 100%-igen Konfluenz für weitere 24 Stunden mit frischem Nährmedium inkubiert. Der Interventionsgruppe wurde dahingegen ein mit 100 ng/ml GDNF versetztes Kulturmedium beigefügt. Jedoch veränderte sich das Bild der Zellkontaktproteine Claudin 1, Claudin 5, Occludin und E-Cadherin an den Zellgrenzen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen durch die Inkubation nicht. Zudem führten wir Western Blot-Analysen durch, um eventuelle, minimale Modulationen der Proteinexpression, die visuell in Färbungen nicht fassbar waren, zu detektieren. Doch auch diese Versuche zeigten keine relevante Mengenänderung der genannten Junctionsproteine durch GDNF (Abb. 12). Aus den beschriebenen Experimenten lässt sich schlussfolgern, dass GDNF keinen positiven Einfluss auf die Morphologie einer ausdifferenzierten Epithelbarriere hat.



C





**Abbildung 11: GDNF führt nicht zu einer morphologischen und quantitativen Veränderung der Tight junction-Proteine und E-Cadherin von ausgereiften Caco2- und HT29B6-Zellen**

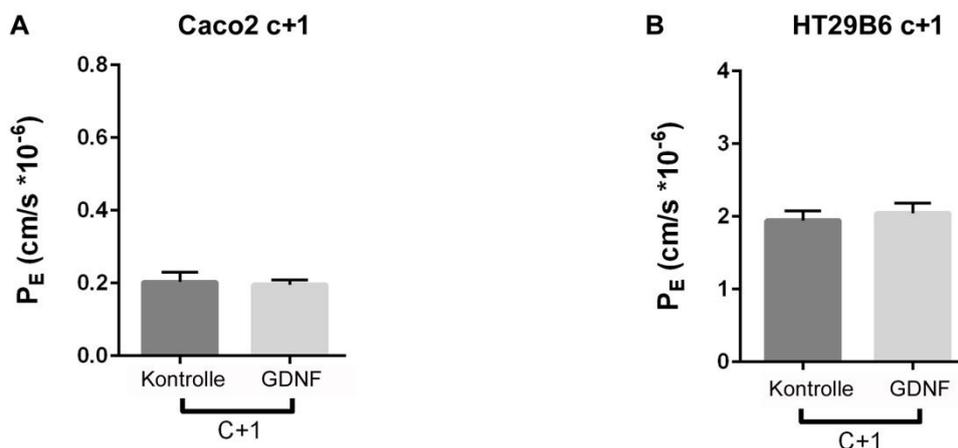
**A und B** Immunfluoreszenzfärbungen von Caco2 und HT29B6 wurden unter c1-Konfluenzbedingungen angefertigt. Die Applikation von GDNF über 24 Stunden führte zu keiner visuell fassbaren morphologischen Veränderung der Zellkontaktproteine (Anzahl der Versuche  $n > 5$ ; Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$ ).

**C** Western Blot-Analysen der Zelljunktionsproteine Claudin 1, Claudin 5, Occludin und E-Cadherin zeigten weder in reifen Caco2- noch in HT29B6-Zellen nach 24-stündiger GDNF-Inkubation einen signifikanten Konzentrationsunterschied.  $\beta$ -Aktin diente als Ladungskontrolle (Anzahl der Versuche  $n = 5$ ).

**D** Die graphische Darstellung der optischen Dichte der Blotbanden von E-Cadherin, Claudin 1, Claudin 5 und Occludin zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen und der Interventionsgruppe (Anzahl der Versuche  $n = 5$ ).

In einem weiteren Schritt wurde mittels des zur Messung der Permeabilität von Epithelkulturen etablierten Transwellassays untersucht, ob GDNF Veränderungen der Barrierefunktion induziert. Hierbei wurde - wie oben im Detail beschrieben - der transepitheliale Durchfluss von 4 kDa FITC-Dextran über einen mit ausgereiften Caco2- beziehungsweise HT29B6-Zellen bewachsenen Transwellfilter gemessen. Aus diesen Werten berechneten wir unter Kontrollbedingungen einen Permeabilitätskoeffizienten ( $P_E$ ) von  $1.73 \pm 0.27 \text{ cm/s} \cdot 10^{-7}$  des Caco2-Zellrasens. Die nach 24-stündiger Applikation des neurotrophen Faktors GDNF ermittelten  $P_E$ -Werte bestätigten die Hypothese einer Stabilisierung der bereits differenzierten Epithelbarriere nicht. Vergleichbare Daten gewannen wir aus den

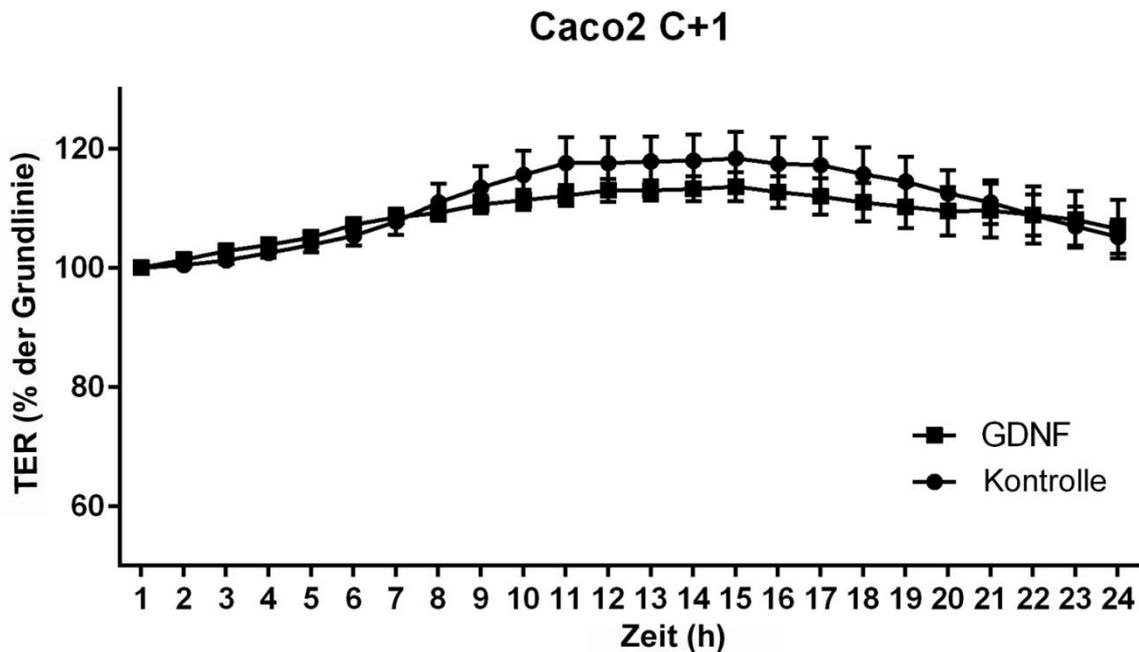
Permeabilitätsmessungen mit ausdifferenzierten HT29B6. Auch hier zeigte sich im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen ( $P_E = 1.94 \pm 0.14 \text{ cm/s} \cdot 10^{-6}$ ) keine signifikante Veränderung des transepithelialen Durchflusses nach Inkubation mit GDNF ( $P_E = 2.05 \pm 0.14 \text{ cm/s} \cdot 10^{-6}$ ) (Abb.12).



**Abbildung 12: GDNF induziert in vitro keine Änderung des Permeabilitätskoeffizienten ( $P_E$ ) im ausgereiften Zustand der Epithelbarriere**

**A und B** Nach Applikation von GDNF auf ausgereifte Zellmonolayer aus Caco2-beziehungsweise HT29B6-Zellen konnte keine signifikante Veränderung des  $P_E$  für 4kDa FITC-Dextran beobachtet werden (Anzahl der Versuche  $n > 10$ ).

Um diese Ergebnisse weiter zu bestätigen, untersuchen wir zusätzlich den transepithelialen elektrischen Widerstand der Epithelzellschicht. Mit dieser Methode können funktionelle Barriereveränderungen kontinuierlich über einen längeren Zeitraum quantifiziert werden. In der graphischen Darstellung der Messwerte wurden registrierte Barriereveränderungen in Prozent der Grundlinie aufgetragen. Doch auch in diesem Versuchsaufbau konnte bei ausdifferenzierten Caco2-Zellen keine signifikante Veränderung des TER-Werts durch Applikation von GDNF beobachtet werden. Wie die Kontrollen blieb der transepitheliale Widerstand der mit GDNF inkubierten Zellen über den gesamten Messzeitraum von 24 Stunden konstant auf Grundlinienniveau (Abb. 13).



**Abbildung 13: GDNF induziert in vitro keine Änderung des transepithelialen elektrischen Widerstands im ausgereiften Zustand der Epithelbarriere**

Caco2-Zellen wurden während der 24-stündigen TER-Messung mit 100 ng/ml GDNF behandelt. Es zeigte sich keine signifikante Änderung des TER-Werts im Vergleich zu den Kontrollen (Anzahl der Versuche  $n > 6$ ).

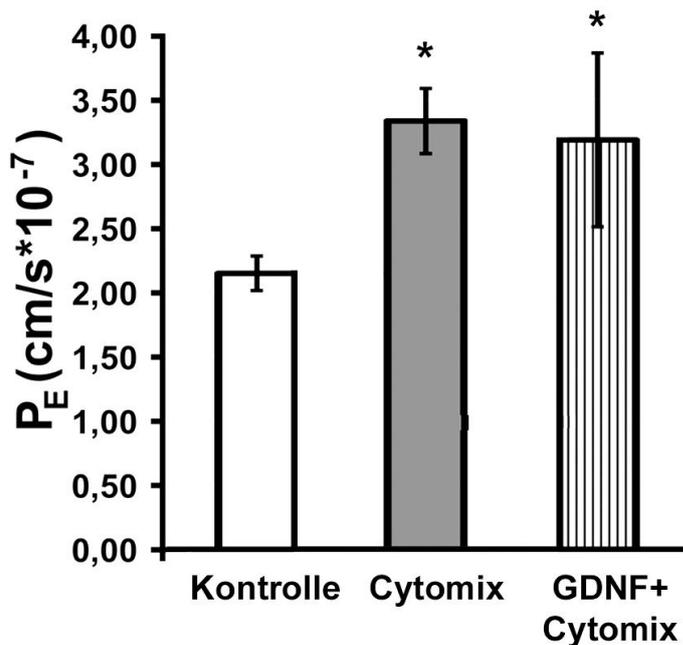
Zusammenfassend geht aus diesen Ergebnissen hervor, dass GDNF auf ausgereifte Zellkontakte im differenzierten Gewebe keine modulierende Wirkung hat und somit in diesem Reifestadium der Zellen die parazelluläre Permeabilität nicht reduziert.

### **3.4. Coinkubation von GDNF mit Cytomix verhindert den Zytokin-induzierten Zusammenbruch der intestinalen Epithelbarriere nicht**

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, können proinflammatorische Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$  oder der bakterielle Zellmembranbestandteil LPS über zahlreiche Effektormoleküle eine Erhöhung der parazellulären Permeabilität induzieren und damit die Integrität der intestinalen Epithelbarriere schädigen.

Um nachzuvollziehen, ob eine GDNF-bedingte Stabilisierung der Barriere in einem entzündlich veränderten Milieu zu tragen kommt, imitierten wir zunächst in vitro einen inflammatorisch bedingten Zusammenbruch des Epithelverbands aus reifen Caco2-Zellen. Dafür inkubierten wir die Interventionszellgruppe mit Cytomix, einer fixen Kombination der Entzündungsmediatoren  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{IFN}\gamma$ . Zur Überprüfung des Effekts der Zytokinkombination auf die Zellkultur wählten wir den Transwellversuch. Während die unbehandelten Kontrollen stabile und mit den Vorversuchen vergleichbare Durchflussraten von  $2.0 \pm 2.5 \text{ cm/s} \cdot 10^{-7}$  aufwiesen, kam es nach der Behandlung mit Cytomix zu einer signifikanten Zunahme des Permeabilitätskoeffizienten von FITC-Dextran auf  $3.33 \pm 0.25 \text{ cm/s} \cdot 10^{-7}$ .

Im Anschluss führten wir eine Coinkubation der Zellen mit Cytomix und GDNF durch, um die Auswirkung des neurotrophen Faktors auf die Zytokin-induzierte Permeabilitätserhöhung zur Darstellung zu bringen. Jedoch veränderte die parallele Applikation der zwei Testreagenzien die Permeabilität im Vergleich zur Cytomix-Inkubation kaum. Wie bei alleiniger Behandlung der Epithelzellen mit den Entzündungsmediatoren kam es zu einem signifikanten Anstieg der Permeabilität ( $P_E = 3.18 \pm 0.67 \text{ cm/s} \cdot 10^{-7}$ ) (Abb. 14). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in unserem Versuchsaufbau GDNF nicht im Stande war, die Zytokin-induzierte Verschlechterung der Barrierefunktion zu verhindern.



**Abbildung 14: GDNF verhindert bei Coinkubation mit Cytomix den Zytokin-induzierten Barriereverlust in vitro nicht**

Messungen des Fluxes von 4kDa schweren FITC-Dextran nach Inkubation von Caco2-Zellen mit Cytomix zeigten verglichen mit den Kontrollen einen signifikant erhöhten  $P_E$ . Diese Erhöhung bestand unverändert, nachdem die Monolayer mit Cytomix und GDNF coinkubiert wurden (Anzahl der Versuche n= 5; \*= Signifikanz gegenüber Kontrollen, Student's t-test,  $p < 0,05$ ).

### **3.5. Inkubation mit GDNF fördert im präkonfluenten Stadium der Epithelzellen die Ausreifung von Adhärens- und Verschlusskontaktproteinen und verbessert funktionelle Barriereigenschaften**

Aufgrund der hohen Dynamik des Zellumsatzes im humanen Gastrointestinaltrakt untersuchen wir als nächstes die Hypothese, dass GDNF einen Effekt auf die Ausdifferenzierung der intestinalen Epithelzellen haben könnte. Diese Bedingungen liegen üblicherweise in den Krypten von Dünndarm und Dickdarm vor. Für diese Untersuchungen verwendeten wir kultivierte Caco2- und HT29B6-Zellen einen Tag vor erwarteter Konfluenz (c-1). Unter diesen Versuchsbedingungen wies der Permeabilitätskoeffizient in Transwellversuchen um mehr als zwei Standardabweichungen von den Werten der ausgereiften Zellmonolayer ( $2.0 \pm 2.5$

cm/s\*10<sup>-7</sup> bei Caco2 beziehungsweise  $1.7 \pm 2.2$  cm/s\*10<sup>-6</sup> in HT29B6-Kulturen) ab. Um Unterschiede der Morphologie der Junctionen im Vergleich zu c1-Zellen darzustellen, fertigten wir - wie bereits beschrieben wurde - immunzytochemische Färbungen der unreifen Zellen an. Nach standardmäßiger Aufbereitung der auf Deckgläschen gewachsenen Zelllinien färbten wir das enthaltene Claudin 1, Claudin 5, Occludin und E-Cadherin mit dem jeweils spezifischen Antikörper an. Tatsächlich zeigten die Plasmamembranen der unreifen Caco2-Zellen eine allumfassende Reduzierung der Tight junction-Proteine Occludin, sowie Claudin 1 und 5 im Vergleich zu voll ausgereiften Zellen (c1-Stadium). Dahingegen war das Signal von E-Cadherin bereits im nicht-konfluenten Stadium regelmäßig entlang der Zellgrenzen ausgebildet und in Bezug auf die Intensität mit reifen Zellen vergleichbar. Analoge Ergebnisse zeigten Immunfluoreszenzen mit der HT29B6-Zellkultur.

Nun führten wir nach 24-stündiger GDNF-Applikation erneut Immunfärbungen durch, um einen möglichen Effekt von 100 ng/ml dieses Faktors auf nicht-ausdifferenzierte Verschlusskontakte zu visualisieren. Sowohl bei den Caco2- als auch bei den HT29B6-Zellen beobachteten wir nach der Inkubation eine Verstärkung der Tight Junction-Proteinfärbungen an den Zellgrenzen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Ein ähnlich gearteter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen fand sich auch bei genauer Betrachtung im Färbemusters von E-Cadherin. In den Plasmamembranen der Caco2-Zellen fand sich optisch eine Zunahme des E-Cadherin-Signals. Hingegen zeigte sich das Transmembranprotein der Adhärenskontakte in HT29B6 nach Behandlung mit GDNF verglichen mit den Kontrollfärbungen unverändert. Die Auswertung dieser Färbeversuche gaben uns erste Hinweise darauf, dass die Inkubation von intestinalen Epithelzellen mit GDNF in vitro die Reifung der Verschlusskontakte fördert. Speziell in Caco2-Monolayern zeigte sich zudem eine fortgeschrittene Ausreifung der Adhärenskontakte (Abb. 15a &b).

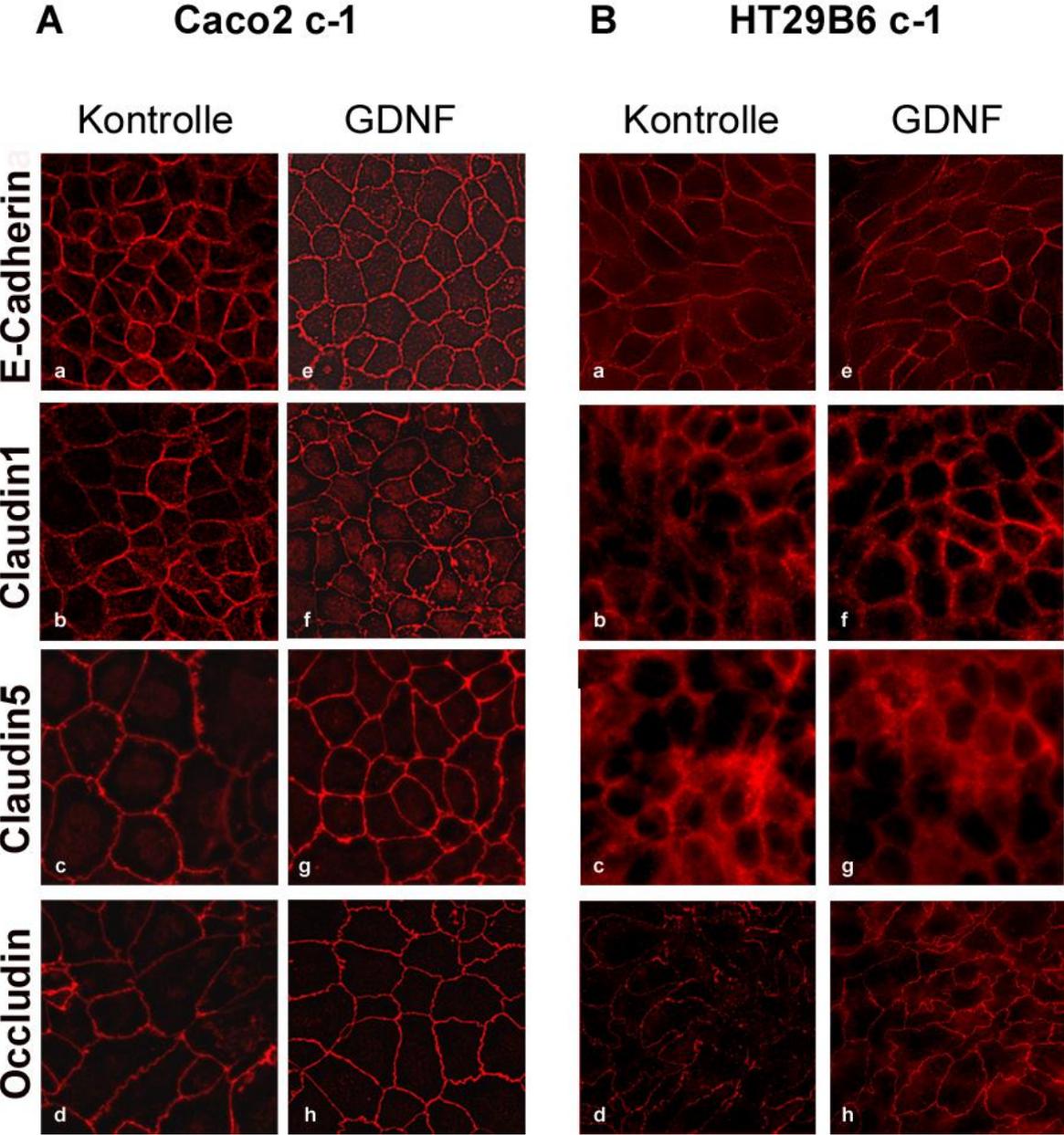
Auf diesen Beobachtungen aufbauend wurden Western Blots gegen die junctionalen Eiweiße durchgeführt, um mögliche quantitative Änderungen der Proteinkonzentrationen darzustellen. Jedoch war hier keine veränderte Expression von Claudin 1, Claudin 5, Occludin sowie von E-Cadherin nach Inkubation der Proben mit GDNF für 24 Stunden nachweisbar. Auch in den Ladungskontrollen mit  $\beta$ -

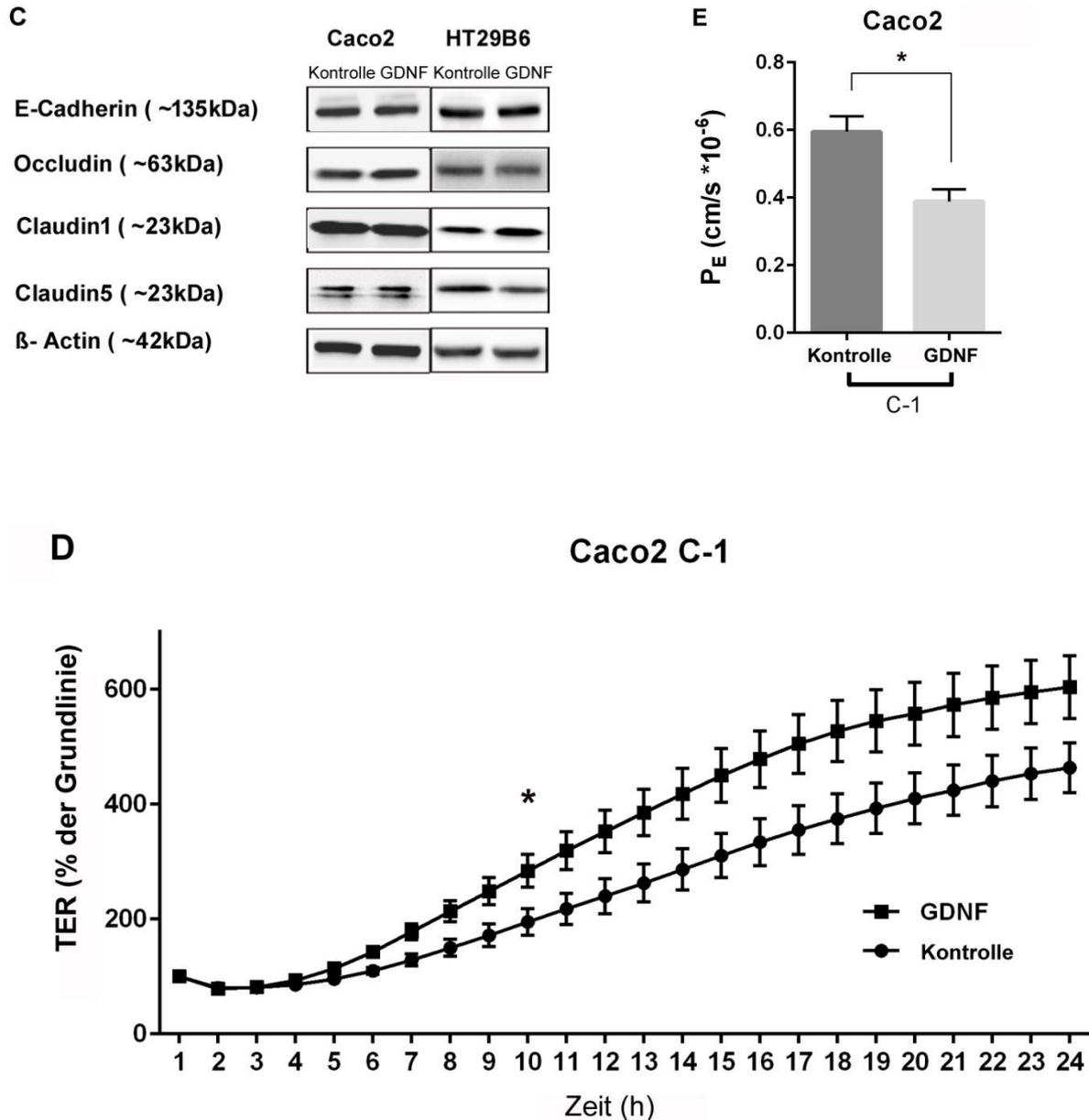
Aktin unterschied sich die Bandenstärke der einzelnen Proteine nicht von denen unter Kontrollbedingungen (Abb. 15c).

Um zu überprüfen, ob die beobachteten morphologischen Veränderungen der Zellkontaktproteine in der Immunfluoreszenz von einer funktionellen Änderung der Barriereeigenschaft begleitet werden, führten wir mit Caco2-Zellen im c-1-Stadium TER-Messungen durch. Hierfür wurde die Zelllinie beim Splitting auf ECIS-Elektroden ausgesät. Einen Tag vor Erreichen der Konfluenz wurde den Wells der Kontrollen reines Kulturmedium beigefügt. Das Medium der Interventionsgruppe enthielt 100 ng/ml GDNF. Im Anschluss wurde umgehend mit der 24-stündigen Messung begonnen. In der graphischen Auswertung der Ergebnisse fiel auf, dass es nach fünf Stunden zu einem kontinuierlichen Anstieg des transepithelialen Widerstands kam. Dieser zeigte bei den mit GDNF behandelten Zellen einen steileren Verlauf. So war nach acht Stunden ein statistisch signifikanter Unterschied der TER zwischen den Kontrollen und der Interventionsgruppe auszumachen. Ein hoher elektrischer Widerstand steht für eine niedrige ionische Permeabilität und spiegelt die Qualität der Barriere wieder (Abb. 15d). Damit konnten wir nachweisen, dass GDNF nicht nur die Morphologie der Zellkontakte beeinflusst, sondern dass diese Veränderungen auch für die Funktion des Caco2-Zellmonolayers relevant sind und in vitro eine Stabilisierung der Epithelbarriere bewirken.

Um diese Beobachtung weiter zu festigen, bestimmten wir ergänzend den Permeabilitätskoeffizienten unreifer Zellmonolayer für 4 kDa FITC-Dextran unter Kontrollbedingungen und nach 24-stündiger Inkubation mit GDNF. Hierfür maßen wir den Flux des Fluoreszenzfarbstoffs über die Zellschicht bestehend aus Caco2-beziehungsweise HT29B6-Zellen einen Tag vor Erreichen ihrer vollständigen Konfluenz. An dieser Stelle zeigte sich nach Applikation von GDNF in beiden Zelllinien eine signifikante Abnahme des transepithelialen Durchflusses. Unter Kontrollbedingungen lag der  $P_E$  der c-1-Caco2-Zellen bei  $4.13 \pm 0.38 \text{ cm/s} \cdot 10^{-7}$ . Dieser fiel nach der Applikation von GDNF signifikant auf Werte von  $2.99 \pm 0.26 \text{ cm/s} \cdot 10^{-7}$  ab. Auch bei den Messungen mit unreifen HT29B6 führte der neurotrophe Faktor zu einer statistisch signifikanten Reduktion der  $P_E$ -Werte von  $3.39 \pm 0.32 \text{ cm/s} \cdot 10^{-6}$  auf  $2.68 \pm 0.18 \text{ cm/s} \cdot 10^{-6}$  auf (Abb. 15e). Damit bestätigte sich unsere Hypothese erneut und es lässt sich schlussfolgern, dass GDNF in vitro die

Ausreifung von Adhärens- und Verschlusskontakten und damit die Barriereigenschaften unreifer intestinaler Epithelzellen fördert.





**Abbildung 15: Inkubation mit GDNF fördert die Ausreifung von Zellkontaktproteinen und induziert eine Stabilisierung der Barriereigenschaften von unreifen Zellmonolayern**

**A, B und C** Die 24-stündige Inkubation von Caco2 beziehungsweise HT29B6 mit GDNF führte zu einer Verstärkung des Immunfluoreszenzsignals der TJ-Proteine Claudin 1, Claudin 5 und Occludin. Im Gegensatz zu den Kontrollen zeigte sich nach der Applikation von GDNF ein angereichertes und verdeutlichtes linienförmiges Färbemuster an den Zellgrenzen. In den Immunmarkierungen von E-Cadherin der Caco2-Zellen induzierte GDNF eine Zunahme der Signalintensität. Diese Beobachtung war in HT29B6 nicht nachvollziehbar. In anschließend durchgeführten Western Blot-Analysen konnten jedoch keine Konzentrationsänderungen der TJ-Proteine nach GDNF-Inkubation nachgewiesen werden. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für  $n > 5$  Experimente. Maßstab: 20  $\mu\text{m}$ .

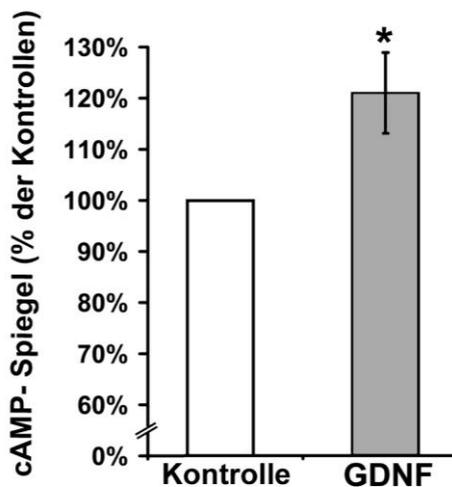
**D** Kontinuierliche Messungen der TER mittels ECIS-Gerät zeigten nach achtstündiger GDNF-Applikation eine signifikante Zunahme des Widerstands der unreifen Zellmonolayer. Nach 24 Stunden stieg die TER - verglichen mit den Kontrollwerten ( $525\% \pm 27\%$ ) - auf  $636\% \pm 45\%$  (Anzahl der Versuche  $n > 6$ ,  $*p < 0,05$ ).

**E** Unter Kontrollbedingungen wich der  $P_E$  von unreifen Caco2- bzw. HT29B6-Zellen im Transwellversuch um zwei Standardabweichungen von den Werten ausdifferenzierter Zellkulturen ab. Der transepitheliale Flux von FITC-Dextran über die unreife Barriere war nach GDNF-Behandlung in beiden Zellreihen signifikant reduziert; hier gezeigt für Caco2-Zellen (Anzahl der Versuche  $n > 10$ ,  $*p < 0,05$ ).

### **3.6. Behandlung mit GDNF steigert den intrazellulären cAMP-Gehalt und reduziert die Phosphorylierung der p38 MAPK in Caco2-Zellen**

Um den zugrunde liegenden Mechanismus für die beschleunigte intestinale Barrieraldifferenzierung aufzuklären, prüften wir den Einfluss von GDNF auf verschiedene intrazelluläre Signalwege. Es wurde im Vorfeld postuliert, dass GDNF in Neuronen des Mesencephalon Signalkaskaden aktiviert, in welche die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) und p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK) involviert sind (Lara et al., 2003). Basierend auf diesen Ergebnissen untersuchten wir, ob diese Signalwege auch in Enterozyten beziehungsweise stellvertretend in unserer Caco2-Zelllinie durch die Behandlung mit GDNF verändert werden.

Zunächst ermittelten wir die Menge an cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in den Zellen, welche mit 100 ng/ml GDNF behandelt wurden, und verglichen die erhobenen Werte mit der Kontrollgruppe. cAMP wird durch die Adenylatzyklase aus Adenosintriphosphat (ATP) gebildet und fungiert in den Zellen als Second Messenger. Die Wirkung von cAMP beruht hauptsächlich auf der Aktivierung der PKA. Für eine solche quantitative Bestimmung eignet sich das sogenannte ELISA-Testverfahren. Die Konzentration von cAMP in den Kontrollen wurde auf 100% gesetzt. Tatsächlich fanden wir in Versuchen mit unreifen Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit GDNF signifikant erhöhte Werte im Unterschied zu deren Kontrollen (Abb. 16). Dagegen konnte in ausdifferenzierten Caco2-Zellen keine Veränderung des cAMP-Gehalts nach Inkubation festgestellt werden.



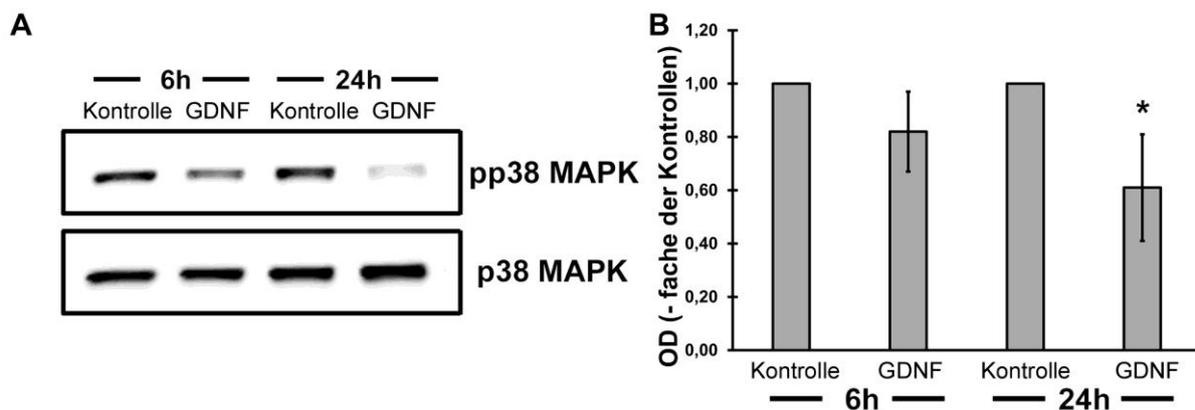
**Abbildung 16: GDNF bewirkte eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehalts in nicht-ausdifferenzierten Caco2-Zellen**

Die Quantifizierung von cAMP in Caco2-Lysaten mittels ELISA-Messungen wurde unter Kontrollbedingungen und nach Inkubation mit GDNF durchgeführt. In der Interventionsgruppe war eine signifikant größere Menge ( $122 \pm 8\%$ ) des Second Messengers nachweisbar ( $n= 6$ ,  $*p < 0,05$ ).

Daraufhin führten wir Western Blot-Analysen durch, um die Auswirkung einer Inkubation mit GDNF auf die Phosphorylierung von p38 MAPK darzustellen. p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen gehören zur Familie der MAPK und sind damit in Signalkaskaden eingebunden, die Einfluss auf Zelldifferenzierung, Zellwachstum und Apoptose haben. Die MAP-Kinasen sind Proteinkinasen mit einer Molekülmasse von 36.000-44.000 Da, welche andere Proteine an spezifischen Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Resten phosphorylieren können. Sie selbst werden durch eine Phosphorylierung an zwei verschiedenen Orten aktiviert. Ist an beiden Stellen ein Phosphatmolekül gebunden, werden ihre Effektor-Transkriptionsfaktoren phosphoryliert und in den Zellkern transportiert. Dadurch wird die Transkription einer Vielzahl von Zielgenen aktiviert. Durch Dephosphorylierung werden die MAP-Kinasen inaktiviert (Cargnello und Roux, 2011, Cuadrado und Nebreda, 2010).

Nach 6 und 24 Stunden langer Inkubation von Caco2-Zellen im c-1-Stadium mit GDNF beziehungsweise reinem Kulturmedium verarbeiteten wir diese und stellten Zelllysate für den Immunoblot her. Nach Auftrennung des Proteingemisches und

Behandlung der Membranen mit einem spezifischen Antikörper gegen die phosphorylierte p38 MAPK (pp38 MAPK) zeigte sich bei den unreifen, mit GDNF behandelten Proben eine schwächere phospho-p38 MAPK-Bande. Die Phosphorylierung der p38 MAPK war bereits nach 6 Stunden abgeschwächt und zeigte nach 24 Stunden eine signifikante Reduktion im Vergleich zu Kontrollen. Den gleichen Versuchsaufbau wählten wir auch für ausdifferenzierte Caco2-Zellen. Hier konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt eine Änderung der Konzentration von pp38 MAPK detektiert werden (Abb. 17).



**Abbildung 17: GDNF induziert eine Reduktion der Phosphorylierung der p38 MAPK**

**A** Western Blots von unreifen Caco2-Zellysaten wurden angefertigt, um Veränderungen des Phosphorylierungsstatus der p38 MAPK nach Applikation von GDNF zu untersuchen. Hier ließ sich abhängig von der Inkubationszeit eine kontinuierliche Verminderung des phosphorylierten Anteils darstellen. Man erkennt eine weiter abnehmende Signaldichte der pp38 MAPK-spezifischen Proteinbande vom Zeitpunkt 1 (6 Stunden Inkubation) bis zum zweiten Messpunkt nach 24-stündiger Inkubation mit GDNF. Die Gesamt-p38 MAPK-spezifische Bande zeigte sich unverändert. Der gezeigte Immunoblot ist repräsentativ für n= 5 Experimente.

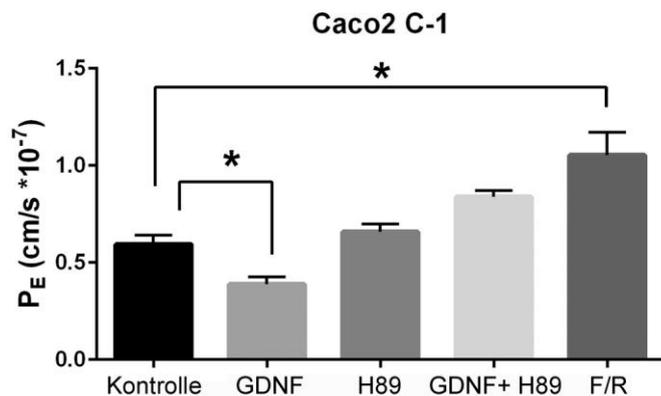
**B** Um die visuell fassbaren Unterschiede der Bandenstärke genau zu quantifizieren, wurde die optische Dichte (OD) aller in unseren Versuchen erhobenen Proteinbanden gemessen. Hier zeigte sich eine statistisch signifikante Abnahme der OD der pp38 MAPK-Bande nach 24-stündiger Inkubation mit GDNF (n= 5, \*p< 0,05 verglichen mit Kontrollen).

Da auch andere Vorversuche gezeigt hatten, dass GDNF nur unreife Zellen beeinflusst, arbeiteten wir im Anschluss ausschließlich mit nicht-konfluenten (c-1) Zellen.

### **3.7. Artificieller Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels bedingt eine erhöhte Permeabilität der Epithelbarriere**

Um nachzuvollziehen, welche Veränderung der genannten intrazellulären Signalmoleküle für die Barrierereifung beziehungsweise für die Abnahme der Permeabilität verantwortlich ist, untersuchten wir zunächst den cAMP-abhängigen Signalweg. Dafür behandelten wir unreife Caco2-Zellen parallel mit dem Adenylatzyklasehemmer Forskolin und dem Phosphodiesterase-4-Hemmer Rolipram. Folglich kam es zu einem Anstieg von cAMP in den Zellen, welchen wir mittels ELISA-Test nachwiesen. So erhöhte sich der intrazelluläre cAMP-Gehalt in der Interventionsgruppe um 122% von  $3,8 \pm 0,2$  pmol/ml auf  $4,7 \pm 0,7$  pmol/ml verglichen mit den Kontrollen. Bei der funktionellen Prüfung der Barriere von Caco2-Kulturen im Transwellassay führte die Inkubation mit F/R zu einem signifikanten Anstieg des Permeabilitätskoeffizienten von  $0,58 \pm 0,52$  cm/s\* $10^{-7}$  auf  $1,05 \pm 0,11$  cm/s\* $10^{-7}$ . Damit resultierte die artifizielle cAMP-Erhöhung sogar in einer vermehrten Durchlässigkeit des Zellrasens. Anschließend inhibierten wir die cAMP-abhängige Proteinkinase PKA mit H89, was verglichen mit den Kontrollen zu keinerlei Änderungen der Permeabilität im Transwellassay führte.

Ergänzend wurde zudem überprüft, welchen Einfluss die Blockade der PKA auf die GDNF-vermittelte Barrierestabilisierung hat. Nach Coinkubation von unreifen Caco2-Zellen mit H89 und GDNF zeigte sich ein signifikant erhöhter Permeabilitätskoeffizient (Abb. 18). Hieraus lässt sich folgern, dass H89 die GDNF-induzierte Barrierereifung verhindert. Allerdings kommt es nach experimenteller Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels zu einer statistisch relevanten Zunahme der Permeabilität, sodass sich der barrierestabilisierende Effekt von GDNF nicht durch Veränderungen des cAMP/PKA-Signalwegs erklären lässt. So waren weitere Untersuchungen zur Klärung der Bedeutung der durch GDNF induzierten cAMP-Erhöhung nötig.



**Abbildung 18: Einfluss des cAMP-Gehalts von unausgereiften Caco2-Zellen auf die Permeabilität im Transwellversuch**

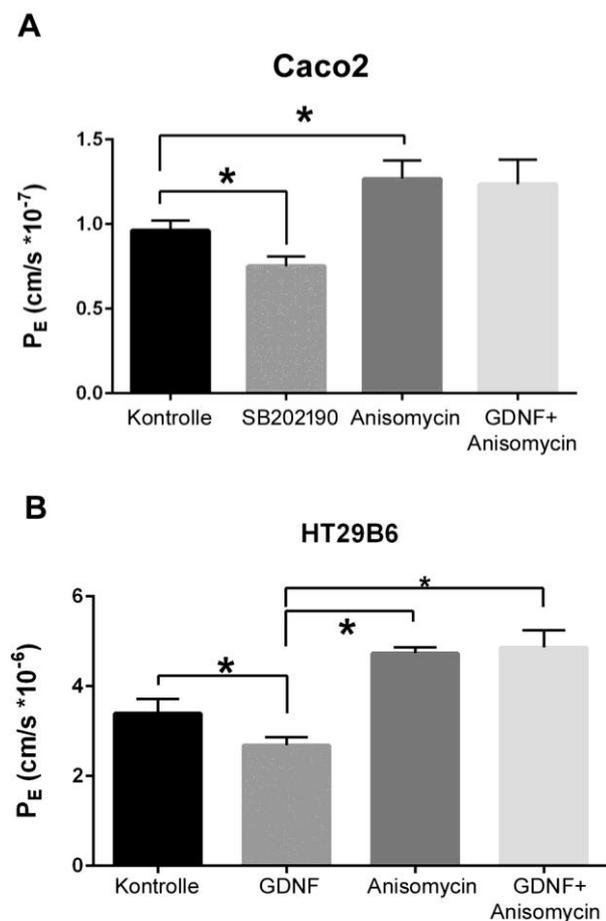
Der  $P_E$  von 4 kDa FITC-Dextran zeigte sich nach Applikation von GDNF signifikant vermindert. Keine Änderung wurde nach Behandlung der Zellen mit dem PKA-Inhibitor H89 festgestellt. Die Coinkubation von GDNF und H89 blockierte hingegen die GDNF-induzierte Barrierestabilisierung. Eine signifikante Zunahme des transepithelialen Flux erfassten wir nach der Zugabe von Forskolin und Rolipram (F/R) (Anzahl der Versuche  $n=8$ ,  $*p < 0,05$  verglichen mit Kontrollen).

### **3.8. GDNF vermittelt die Reifung und Stabilisierung der Barriere via Inaktivierung von p38 MAPK**

Nach diesen Beobachtungen evaluierten wir unsere Vermutung, dass die p38 MAPK in den Reifungsprozess von Adhärens- und Verschlusskontaktproteinen involviert ist. Konkret versuchten wir nachzuvollziehen, ob eine Blockierung, also ein erhöhter dephosphorylierter Anteil an der Gesamtmenge von p38 MAPK, zu einer Verbesserung der funktionellen Barriereigenschaften undifferenzierter Caco2-beziehungsweise HT29B6-Zellen führt.

Zunächst simulierten wir die GDNF-vermittelte Reduktion an p38 MAPK mittels Zugabe des direkten Inhibitors SB202190. Unter diesen Bedingungen zeigte sich in Transwellversuchen eine signifikante Abnahme der transepithelialen Permeabilität. Passend dazu führte eine künstliche Aktivierung der p38 MAPK mittels Anisomycin zu einer relevanten Zunahme des Permeabilitätskoeffizienten. In einem weiteren Versuch untersuchten wir den Durchfluss von 4 kDa FITC-Dextran nach 24-stündiger

Behandlung der Zellkulturen mit GDNF und Anisomycin. Hier ließ sich bei den Caco2-Zellen verglichen mit den Kontrollen keine Änderung der Permeabilität beobachten. In den Versuchen mit HT29B6-Zellen zeigte sich sogar ein signifikanter Anstieg der Durchlässigkeit für den 4 kDa großen Fluoreszenzfarbstoff. Damit wurde die GDNF-vermittelte Barrierestabilisierung durch die Applikation von Anisomycin inhibiert. Bei den restlichen Untersuchungen wurden in beiden Zelllinien immer vergleichbare Ergebnisse gefunden (Abb. 19).



**Abbildung 19: Abhängigkeit des  $P_E$  in Transwellversuchen mit unreifen Caco2- und HT29B6-Zellen von der p38 MAPK-Aktivität**

**A** Der transepitheliale Fluss von 4 kDa FITC-Dextran über unausgereifte Caco2-Monolayer wurde durch die Inkubation der Zellen mit SB202190, einem direkten p38MAPK-Inhibitor, signifikant vermindert. Die Aktivierung der Kinase mittels Anisomycin führte zu einer Zunahme des  $P_E$ . Zudem blockierte Anisomycin die bereits beschriebene GDNF-induzierte Barrierestabilisierung (n= 6, \*p< 0,05 verglichen mit Kontrollen).

**B** In HT29B6-Zellen resultierte die Aktivierung der p38 MAPK durch Anisomycin in einer signifikanten Zunahme des  $P_E$ . Die Inkubation der Zellen von GDNF zusammen mit Anisomycin hob nicht nur die durch GDNF bewirkte Barrierestabilisierung auf, sondern erhöhte den  $P_E$  sogar ( $n=8$ ,  $*p<0,05$  verglichen mit Kontrollen).

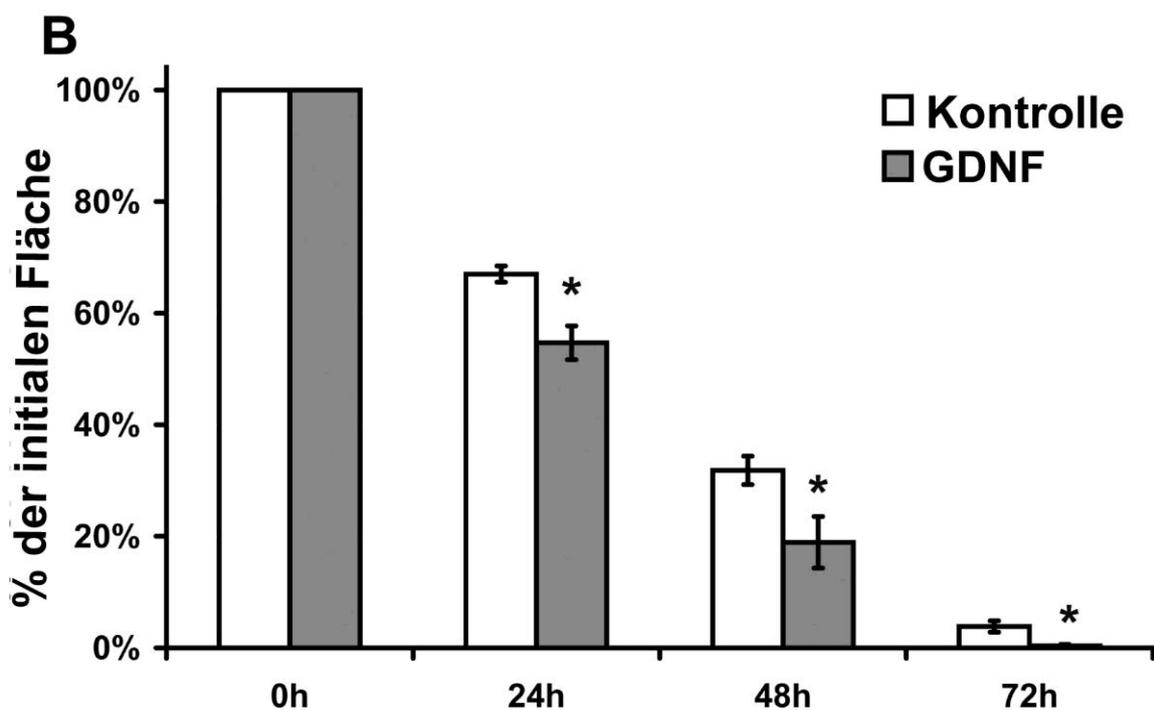
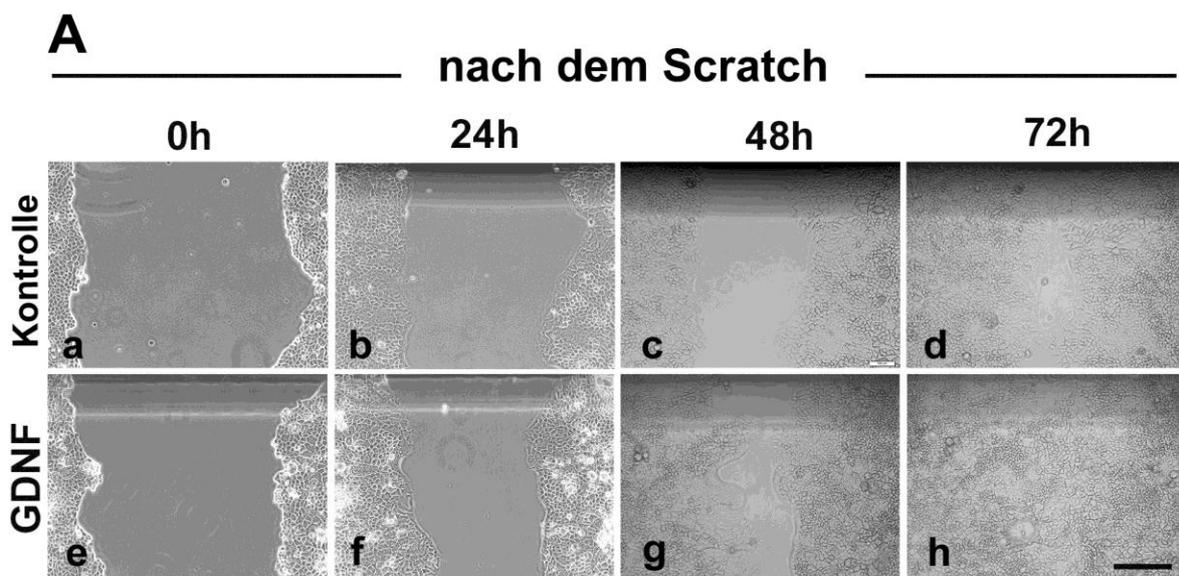
Aus dieser Versuchsreihe lässt sich ableiten, dass die durch GDNF induzierte Verbesserung der funktionellen Barriereeigenschaft von intestinalen Epithelzellen hauptsächlich über die Reduktion des aktiven Anteils von p38 MAPK vermittelt werden könnte.

### **3.9. In vitro beschleunigt GDNF die Wundheilung über eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration von cAMP**

In vielen Geweben des menschlichen Organismus findet ein ständiger Zellumsatz statt. Speziell in der Mukosa des humanen Gastrointestinaltrakts werden die ausgereiften Enterozyten schnell durch Proliferation und Ausreifung von undifferenzierten Zellen ersetzt. Dieser kontinuierlich ablaufende Prozess wird als Zellmauserung (engl. *cell turnover*) bezeichnet. Vor dem Hintergrund, dass es im Rahmen von CED zu Ulzerationen der Darmschleimhaut kommt und deren Abheilung gestört ist (Lüllmann-Rauch, 2009, Turner, 2009), interessierte uns, ob GDNF die epitheliale Wundheilung in vitro beeinflussen kann. Um diese Frage zu evaluieren, führten wir mit Caco2-Zellen sogenannte Scratch-Assays durch. Nach Herbeiführen eines Risses im Zellmonolayer dokumentierten wir über eine Zeitspanne von 72 Stunden den Verschluss der künstlich gesetzten Wundfläche. Wie in den Vorversuchen wurde das Medium der Interventionsgruppe mit 100 ng/ml GDNF versetzt. Als Kontrollen dienten Zellkulturen, welche nur mit Kulturmedium behandelt wurden.

Die Läsionen wurden zu vier verschiedenen Zeitpunkten im Mikroskop fotografiert und deren Ausdehnung gemessen. Zur Quantifizierung der Flächenunterschiede im Zeitverlauf setzten wir die ausgemessenen Wundflächen jeweils in Verhältnis zu ihrer initialen Fläche zum Zeitpunkt Null. Sowohl nach 24, 48 als auch nach 72 Stunden stellten wir signifikante Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen fest. In

unbehandelten Kontrollen konnte nach 24 Stunden ein  $33 \pm 3\%$ iger Verschluss der Läsion festgehalten werden. Dahingegen zeigte die Auswertung von Fotografien, welche nach 24-stündiger GDNF-Inkubation angefertigt wurden, dass hier bereits  $45 \pm 3\%$  der initialen Wundfläche wieder mit Zellen bedeckt war. Nach 72 Stunden war die Wundheilung in der Interventionsgruppe abgeschlossen. Zur selben Zeit fanden sich bei den Kontrollen noch zellfreie Areale, welche insgesamt  $4 \pm 1\%$  der Ausgangsläsion entsprachen (Abb. 20). So konnten wir eine schnellere und damit verbesserte Wundheilung durch die Inkubation mit GDNF demonstrieren.



## Abbildung 20: GDNF fördert die Wundheilung in vitro

**A** Die gezeigte Bilderreihe veranschaulicht den Ablauf der Wundheilung unter Kontrollbedingungen (a-d) und nach GDNF-Inkubation (e-h) im Scratch-Assay. Die Wundfläche im Caco2-Zellrasen wurde direkt nach Setzen dieser Läsion (a, e), nach 24 Stunden (b, f), 48 Stunden (c, g) und 72 Stunden (d, h) fotografiert. Hier zeigte sich ein verbesserter Wundverschluss in der Interventionsgruppe. Das gezeigte Experiment ist repräsentativ für  $n > 9$ , Maßstab: 250  $\mu\text{m}$ .

**B** Die Quantifizierung aller Scratch-Assay-Experimente demonstrierte, dass die Applikation von GDNF zu allen Messpunkten einen beschleunigten Wundverschluss bewirkt. Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil der verletzten Fläche des Zellrasens nach 24, 48 und 72 Stunden im Verhältnis zur initialen Fläche (\* $p < 0,05$  verglichen mit Kontrollen).

Zur Differenzierung, ob diese Beschleunigung auf proliferativen Effekten oder einer vermehrten Zellmigration beruht, führten wir mit unreifen Caco2-Zellen DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)- und Ki67 (Ki= Kiel)-Färbungen durch, da Letztere ein etablierter Proliferationsmarker ist. Der Umstand, dass das Ki67-Protein nur während der aktiven Phasen des Zellzyklus vorhanden ist, eignet es für die Markierung von sich teilenden Zellen. Die direkte Fluoreszenzfärbung mit DAPI dient der Visualisierung aller Zellkerne. Mithilfe dieser beiden Färbemethoden kann der Anteil mitotisch aktiver Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl ermittelt werden. Zur Evaluation potentieller Effekte von GDNF auf die Zellproliferation analysierten wir den Prozentsatz an Ki67-positiven Zellen nach 24-stündiger Applikation von GDNF in einer Konzentration von 100 ng/ml verglichen mit unbehandelten Kontrollen. Die Inkubation steigerte den prozentualen Anteil sich teilender Zellen verglichen mit Kontrollen ( $11.3 \pm 1.7\%$ ) um 214% auf  $24.4 \pm 3.6\%$ . Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass die verkürzte Zeit bis zur Wiederherstellung eines intakten Zellmonolayers durch eine signifikant verstärkte Proliferation bedingt ist. Da aus der Literatur und aus den oben aufgeführten Versuchen bekannt war, dass GDNF den cAMP-Gehalt von Zellen steigern kann, verifizierten wir eine mögliche Beteiligung von cAMP-abhängigen Signalwegen an diesem Prozess. Zunächst stellten wir anhand der Auswertung von Immunfluoreszenzen fest, dass die Zugabe des PKA-Inhibitors H89 während der Inkubation mit GDNF dessen stimulierende Wirkung auf die Zellproliferation aufhob. Durch die Coinkubation verringerte sich die Anzahl Ki67-positiver Zellen signifikant auf  $13.4 \pm 2.0\%$ . Anschließend überprüften wir, ob sich

eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels positiv auf die Vermehrung der Zellen auswirkt. Tatsächlich zeigten Zellkulturen nach einem künstlich herbeigeführten Anstieg des Second Messengers mittels Forskolin und Rolipram einen signifikanten Anstieg der Ki67-positiven Zellen auf  $35.9 \pm 6.8\%$  (Abb. 21).

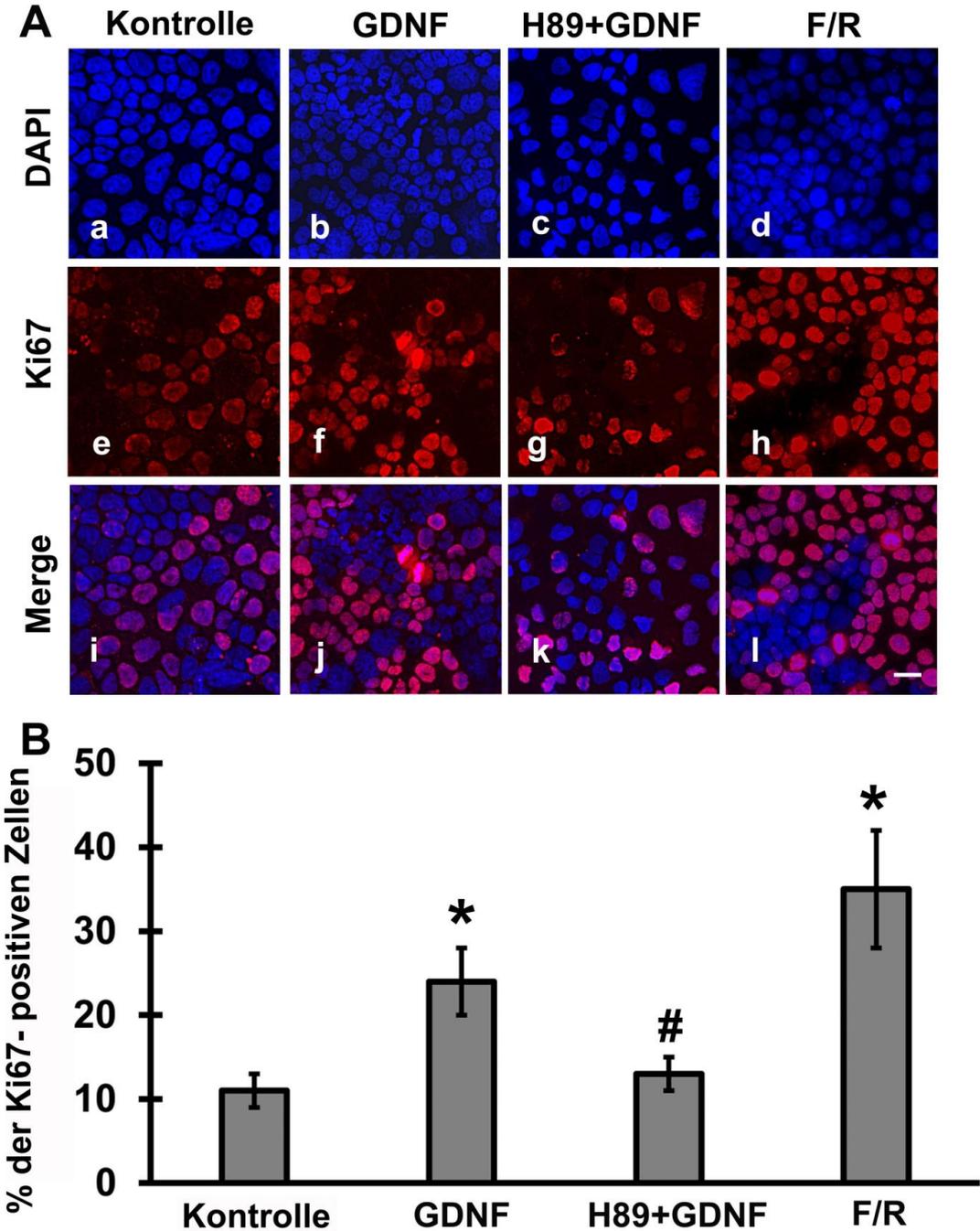


Abbildung 21: GDNF induziert über cAMP/PKA-Signalwege eine gesteigerte Proliferation von unreifen Caco2-Zellen

**A** Die Abbildung zeigt unausgereifte Caco2-Zellen unter Kontrollbedingungen (a, e, i), nach Inkubation mit GDNF (b, f, j), GDNF zusammen mit H89 (c, g, k) und nach Behandlung der Zellen mit Forskolin und Rolipram (d, h, l). Die Zellkerne wurden mit DAPI (a-d) und Antikörpern gegen Ki67 (e-h) markiert und das Verhältnis von proliferierenden Zellen zu der Gesamtzellzahl bestimmt (Maßstab ist 20 µm).

**B** Die Quantifizierung des Anteils von Ki67-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl in einem definierten Bildbereich ergab einen signifikanten Anstieg der mitotisch aktiven Zellen nach Applikation von GDNF beziehungsweise Forskolin und Rolipram. Der PKA-Inhibitor H89 hob den Effekt von GDNF auf (Anzahl der Versuche n= 6, \*p< 0,05 verglichen mit Kontrollen, # zeigt den signifikanten Unterschied zu GDNF).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass GDNF in vitro den Wundheilungsprozess beschleunigen kann und dass sich diese Beobachtung durch den GDNF-induzierten Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration erklären lässt.

## **4. Diskussion**

Ziel der vorliegenden Arbeit war die systematische Untersuchung der Bedeutung des neurotrophen Faktors GDNF für die Integrität und Differenzierung der Darmbarriere. Hierzu wurden zwei etablierte, intestinale epitheliale Zellkulturlinien (Caco2 und HT29B6) in verschiedenen Differenzierungsstadien verwendet. Im ersten Schritt wurde nachgewiesen, dass diese Zelllinien in den Differenzierungsstufen von c-1 (undifferenziert) bis c1 (differenziert) ein GDNF-spezifisches Rezeptorsystem exprimieren und damit ein geeignetes Modellsystem für die Untersuchungen dieser Arbeit darstellen. Weiterhin zeigen unsere Daten erstmals, dass die Enterozyten selbst als zusätzliche nicht-gliale Quelle für GDNF anzusehen sind. GDNF führt zur schnelleren Differenzierung der intestinalen Epithelzellen, was in dieser Arbeit durch eine Stabilisierung der Permeabilität über FITC-Dextran-Fluxbestimmungen und Messungen der TER an nicht-ausdifferenzierten Monolayern beider Zelllinien gezeigt wurde. Mechanistisch ist die verbesserte Barrierefunktion über die Verminderung der Aktivität von p38 MAPK durch deren Dephosphorylierung zu erklären. Die nach GDNF-Applikation erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel führen über eine vermehrte Proliferation zu einer Beschleunigung der epithelialen Wundheilung. Damit konnten in der vorliegenden Arbeit erstmals direkte Effekte des neurotrophen Faktors GDNF auf die Barrieredifferenzierung und epitheliale Wundheilung gezeigt werden. Die Tatsache, dass GDNF von Enterozyten selbst sezerniert wird, legt einen neuen para- oder autokrinen Mechanismus nahe, über den der neurotrophe Faktor die Stabilität der Darmepithelbarriere regulieren könnte.

### **4.1. Caco2- und HT29B6-Zellen eignen sich zur Untersuchung der Einflussnahme von GDNF auf intestinales Epithel**

Zum besseren Verständnis der Vorgänge im intestinalen Epithel ist ein geeignetes in vitro-Modellsystem essenziell. Für unsere Untersuchungen nutzten wir Caco2- und HT29B6-Zellen, welche beide ursprünglich aus Kolonkarzinomen extrahiert wurden. Grundsätzlich arbeiteten wir mit zwei verschiedenen Zelllinien, um gewonnene Ergebnisse in der jeweils anderen Zellpopulation verifizieren zu können und damit unsere Aussagen zu generalisieren und zu festigen.

Caco2-Zellen dienen seit über 30 Jahren als Modell der humanen intestinalen Epithelbarriere. Die adulten Zellen durchlaufen in der Zellkultur einen spontanen Differenzierungsprozess. Dadurch formt sich ein Zellmonolayer, der sowohl morphologische als auch funktionelle Eigenschaften ausdifferenzierter Enterozyten des humanen GIT exprimiert. Die zylindrisch geformten Zellen zeigen einen polaren Aufbau und apikale Mikrovilli (Sambuy et al., 2005). Ähnliche Beschreibungen gibt es für HT29B6-Zellen (Kreusel et al., 1991). Auch diese undifferenzierte Kolonkarzinomzelllinie wächst in vitro zu einem Monolayer aus polarisierten und differenzierten Zellen, der mit dem barrierebildenden Kolonepithel vergleichbar ist. Weiterhin wurde für beide Zellreihen gezeigt, dass sie vor Erreichen der lückenlosen Konfluenz in einer Petrischale zahlreiche Charakteristika mit undifferenzierten Enterozyten gemeinsam haben (Nguyen et al., 2010). In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bestätigte sich, dass sich beide Zelllinien mit fortdauernder Kultur zu enterozytenähnlichen Zellen entwickeln. Dies wurde zunächst durch die Visualisierung des Differenzierungsprozesses von Tight Junctions und der Adhärenskontakte verifiziert. Diese sind für die Polarisierung der Epithelzellen verantwortlich (Lüllmann-Rauch, 2009) und waren auch in unseren Kulturen regelmäßig und linear verteilt an den Zellgrenzen zu finden. Zum anderen zeigte sich in unseren Untersuchungen, dass die Ausbildung der Junktionskomplexe mit einer Stabilisierung der epithelialen Barriere korreliert, was sowohl in Messungen der TER als auch in direkten Permeabilitätsmessungen des 4 kD-FITC-Dextran Flux zu sehen war.

Neben der Feststellung, dass es sich bei Caco2- und HT29B6-Zellen um ein geeignetes Modellsystem handelt, war der Expressionsnachweis von GDNF-Rezeptoren in den genannten Zelllinien elementar für die folgenden Experimente. Nachdem in der Literatur der direkte Einfluss von GDNF auf intestinale Epithelzellen bereits mehrfach beschrieben und der GFR $\alpha$ 1-Rezeptor in vivo und in vitro nachgewiesen wurde (Steinkamp et al., 2003), bestätigten unsere Daten den positiven Nachweis des GDNF-spezifischen Rezeptorsystems auf unseren Epithelkulturen. Mittels Western Blot-Analysen wurde gezeigt, dass sowohl Caco2- als auch HT29B6-Zellen in allen untersuchten Konfluenz- und damit Differenzierungsstadien die Rezeptoren GFR $\alpha$ 1, GFR $\alpha$ 2 und RET ausbilden. GFR $\alpha$ 1,

GFR $\alpha$ 2 sind entscheidend für die GDNF-Spezifität des Multirezeptorkomplexes, wohingegen das RET-Element als Tyrosinkinase die signalisierende Komponente bildet (Sariola und Saarma, 2003). Densitometrische Messungen zur genauen Quantifizierung der Proteinmengen zeigten keine Veränderung während des Differenzierungsvorgangs. GDNF-Rezeptoren scheinen konstitutiv im intestinalen Epithel exprimiert zu werden, ohne dass deren Anzahl durch Wachstums- oder Differenzierungsmediatoren variiert wird. Diese Interpretation passt zu Ergebnissen einer Studie, welche bezeugen, dass auch entzündliche Stimuli keine Änderung der Proteinmenge von GFR $\alpha$ 1 im humanen Kolonepithel und in dem von Ratten bewirken können (Steinkamp et al., 2003).

Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen der Caco2- und HT29B6-Linie für die Bearbeitung der Fragestellungen geeignet sind, da sie als dynamisches Modell für die heterogenen Bedingungen im humanen Gastrointestinaltrakt gut etabliert sind. Anhand der Kulturzellen kann der durchlaufende Differenzierungsprozess der Barriere nachvollzogen werden. Zudem wird der für unsere Untersuchungen notwendige GDNF-Multirezeptorkomplex durch das in vitro-Zellmodell exprimiert.

#### **4.2. GDNF wird von Enterozyten exprimiert**

Die Gliazellen des enterischen Nervensystems sind nicht nur die bedeutendste GDNF-Quelle. Bemerkenswert ist zudem, dass die kontinuierlich stattfindende Sekretion des neurotrophen Faktors durch Einflüsse aus dem Umgebungsmilieu moduliert werden kann. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die Expression des Toll-like Rezeptors (TLR)-2 durch enterische Gliazellen für deren regelhafte Sekretion von GDNF erforderlich ist (Brun et al., 2013). TLR-2 werden der Gruppe der Pattern recognition receptors (PRRs) zugeordnet. Diese sind für die Detektion von Pathogen associated molecular patterns (PAMPs) beziehungsweise Damage associated molecular patterns (DAMPs) und Induktion einer proinflammatorischen Immunabwehrreaktion verantwortlich. Eine fehlerhafte Aktivierung von PRRs scheint nach neuen Erkenntnissen bei der Pathogenese von CED eine elementare Rolle zu spielen (Walsh et al., 2013). Zudem kommt es sowohl

in vitro als auch in vivo im Entzündungszustand zu einer vermehrten Expression des Gliamarkers GFAP, wobei jedoch keine Proliferation der GFAP-positiven Zellen stattfindet. Vielmehr werden durch den Einfluss der proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und LPS aus dem parallel vorhandenen GFAP-negativen Reservepool Zellen rekrutiert. Es ist bekannt, dass nur die GFAP-positive Subpopulation sekretorisch aktiv ist und über die Abscheidung von GDNF die Integrität der Darmbarriere unterstützt (Steinkamp et al., 2003, Von Boyen et al., 2004, 2006, 2011, Zhang et al., 2010). Jedoch gibt es auch GDNF-synthetisierende Zellen, welche nicht-glialen Ursprungs sind. Vorangegangene Arbeiten zeigten, dass auch die glatte Muskulatur im murinen Darm, Tumorzellen verschiedener Entitäten und dopaminerge Neurone im ZNS den neurotrophen Faktor GDNF sezernieren können (Brun et al., 2015, Garnis et al., 2005, Funahashi et al., 2005, Ito et al., 2005). In immunhistochemischen Färbungen von humanen Gewebeproben aus gesundem terminalem Ileum wurde in unserer Arbeitsgruppe zudem innerhalb der Lamina epithelialis ein positives Signal für GDNF nachgewiesen. Ebenso wurde im Western Blot nach Mukosadisektion, also nach der Entfernung glialen Gewebes, ein positives Signal für GDNF in der Schleimhaut bestätigt (Meir et al., 2015). Dies führte zur Hypothese, dass Enterozyten möglicherweise selbst GDNF exprimieren. Jedoch stehen diese Erkenntnisse in Diskrepanz zu Ergebnissen von Steinkamp et al. aus dem Jahre 2003. Abweichend von unseren Daten fand diese Forschungsgruppe in ihren Färbungen keine GDNF-spezifische Immunreaktivität im gesunden humanen Kolonepithel. Vielmehr war die Expression von GDNF unter nicht-entzündlichen Bedingungen auf den submukösen und myenterischen Nervenplexus beschränkt (Steinkamp et al., 2003). Grundsätzlich könnten sich die unterschiedlichen Beobachtungen durch die Verwendung von Gewebe aus verschiedenen Darmabschnitten (Colon versus terminales Ileum) erklären.

Allerdings zeigten immunhistochemische und Western Blot-Analysen der Arbeitsgruppe um Steinkamp eine Hochregulation von GDNF im Kolonpithel von CED-Patienten (Steinkamp et al., 2013). Bei diesen Patienten besteht ein chronischer Entzündungszustand des MDT, welcher von einer generalisierten inflammatorischen Reaktion des Körpers begleitet wird (Soufli et al., 2016). Zu einer ähnlichen Abwehrreaktion des Immunsystems kommt es im Rahmen eines

Tumorleidens. Durch T-Helferzellen kommt es bei Erkrankung an einem kolorektalem Karzinom zu einer vermehrten Ausschüttung von proinflammatorischem TNF $\alpha$ , IL-1 und IL-8 (Matsushima und Oppenheim, 1989, Ning und Lenz, 2012). Dieser Aspekt ist zu bedenken, da die Gewebeproben unserer Arbeitsgruppe aus Hemikolektomiepräparaten von Kolonkarzinompatienten gewonnen wurden (Meir et al., 2015). Zwar wurde das terminale Ileum als makroskopisch gesund klassifiziert, dennoch ist es möglich, dass die systemische Entzündung und damit verbundene Zytokinausschüttung eine Hochregulation von GDNF im Epithel der Gewebeproben bedingte.

Folglich besteht generell die Möglichkeit, dass das in der Immunfärbung beziehungsweise durch Western Blot-Analysen nachgewiesene GDNF in Mukosapräparaten nicht von den Enterozyten selbst synthetisiert wurde. Stattdessen könnte es an membranständige Rezeptoren Gebundenes repräsentieren, welches primär aus dem umgebenden neuronalen Gewebe nach entzündlicher Stimulation sezerniert wurde. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde in der vorliegenden Arbeit im Kultursystem untersucht, ob GDNF durch Caco2- und HT29B6-Zellen in vitro exprimiert wird. In Proteinanalysen der Lysate dieser kultivierten Zellen gelang uns der eindeutige Nachweis des 15 kDa schweren Proteins. Zudem war GDNF im Überstand von Caco2-Zellen nachweisbar, was eine aktive Sekretion des Proteins durch die Enterozyten zeigt. Hierbei ist hinzuzufügen, dass dies auch bei Depletion von FCS nachzuweisen war, was eine Kontamination des Kulturmediums mit GDNF ausschließt. Insgesamt deuten all diese Ergebnisse darauf hin, dass GDNF nicht nur von Enterozyten synthetisiert, sondern auch in das Interstitium abgegeben wird. Dieses Phänomen - dass Enterozyten neurotrophe Faktoren sezernieren - war in ähnlicher Weise bereits beobachtet worden. In jener Studie wurde gezeigt, dass der Nerve growth factor (NGF) von Caco2-Zellen synthetisiert wird und im Rahmen einer Entzündung über IL1 hochreguliert werden kann (Varilek et al., 1995, Reinshagen et al., 2000).

Zusammenfassend deutet die Identifikation einer weiteren Quelle für GDNF im Gastrointestinaltrakt auf die Bedeutsamkeit der protektiven und stabilisierenden Eigenschaften dieses neurotrophen Faktors für die Homöostase der Darmbarriere hin. Hier ist zum einen denkbar, dass die Stabilisierung der Integrität des

Epithelzellverbands indirekt über die trophische Wirkung von GDNF auf Neurone vermittelt wird. Neuronale Sekretionsprodukte wie VIP, Substanz P oder Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) können die Permeabilität der Barriere regulieren und Entzündungsvorgänge zum Schutz der Mukosa modulieren (Neunlist et al., 2003, Reinshagen et al., 2000).

Ergänzend ist aus diversen in vivo- und in vitro-Versuchen ein protektiver Einfluss von GDNF auf das Darmepithel bekannt (Bush et al., 1998, Steinkamp et al., 2003, Xiao et al., 2014, Zhang et al., 2010). Ob dieser durch eine direkte Wirkung zu erklären ist, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit genauer untersucht. Für einen unmittelbaren Effekt von GDNF auf Enterozyten spricht, dass diese nicht nur GDNF sezernieren, sondern auch den spezifischen Multirezeptorkomplex exprimieren. Dies lässt die Hypothese zu, dass sich die Epithelzellen durch auto- und parakrine Mechanismen selbst vor barriereschädigenden Einflüssen schützen. Auch unter physiologischen Bedingungen ist, aufgrund der ständigen Exposition der Mukosa mit dem Darmlumeninhalt, zur Aufrechterhaltung der Barriere eine kontinuierliche Stärkung der Zell-Zellkontakte nötig. Diese wurde für das Gliaprodukt GSNO bereits nachgewiesen (Cheadle et al., 2013, Savidge et al., 2007). So scheint es folglich möglich, dass es sich um eine basale GDNF-Sekretion der Enterozyten handelt, welche für eine regelhafte Differenzierung innerhalb der Mukosa mitverantwortlich ist. Ein äquivalenter Mechanismus wurde bereits im ZNS beschrieben. Dort ist das Überleben und Wachstum der dopaminergen Neurone im Mesencephalon von BDNF und GDNF abhängig. Gleichzeitig findet in deren Zellsomata die Synthese der beiden Faktoren statt. Weiterhin wurde in vitro ein direkter anti-apoptotischer Effekt von GDNF auf Enterozyten durch die Aktivierung von MAPK-Kaskaden und des PI3K-Signalwegs nachgewiesen (Lara et al., 2003). Innerhalb des Kolonepithels ist die Balance zwischen Apoptose und Restitution essenziell für die Aufrechterhaltung der intestinalen Barrierefunktion (Steinkamp et al., 2003).

Zusammenfassend kann aus diesen Beobachtungen die Hypothese abgeleitet werden, dass von Enterozyten synthetisiertes GDNF in auto- und parakrine Prozesse zur Bildung einer effektiven Barriere innerhalb der Mukosa involviert ist.

#### **4.3. GDNF induziert Zellproliferation und führt zur Differenzierung der intestinalen Epithelbarriere in vitro**

In vivo führt die experimentelle Ablation von enterischen Gliazellen zu einer fulminanten Jejunoileitis, was darauf hindeutet, dass diese Zellen für die Aufrechterhaltung der Integrität der intestinalen Epithelbarriere essenziell sind (Bush et al., 1998). In den folgenden Jahren erschienen mehrere Artikel, die den positiven Einfluss von Gliazellen beziehungsweise deren löslichen Faktoren wie GSNO auf die Funktion der Darmbarriere bestätigten (Cheadle et al., 2013, Savidge et al., 2007). Zudem gibt es in vivo- (Zhang et al., 2010) und in vitro-Studien (Steinkamp et al., 2003), die eine stabilisierende Wirkung von GDNF auf das Darmepithel suggerieren. Zu hinterfragen gilt es jedoch, ob es sich um einen direkten Einfluss von GDNF auf die Enterozyten handelt oder ob die beschriebenen Veränderungen sekundär, über den Einfluss des neurotrophen Faktors auf die enterischen Nervenzellen, induziert werden. In Modellen neurodegenerativer Erkrankungen zeigte sich, dass GDNF für die Aufrechterhaltung der neuronalen Morphologie und Integrität unerlässlich ist (Boado und Pardridge, 2009). Eine experimentelle Ablation von enterischen Gliazellen im Mausmodell führt wiederum zu einem Funktionsverlust der intestinalen Epithelbarriere (Bush et al., 1998, Cornet et al., 2001). Reinshagen und seine Coautoren zeigten zudem eine - durch Modulation der Zytokinantwort bedingte - protektive Rolle des Neurotrophins im Rahmen des Entzündungsvorgangs (Reinshagen et al., 2000). Auch im Mausmodell der Arbeitsgruppe um Zhang können die barrierschützenden Effekte von GDNF über anti-inflammatorische Mechanismen erklärt werden (Zhang et al., 2010). Dementsprechend veränderte GDNF in unserem in vitro-Entzündungsmodell die Barriereeigenschaft der Zellmonolayer nicht. Hierbei führte die Applikation von Cytomix zu einem signifikanten Anstieg der Permeabilität im Transwellversuch, welcher durch die Coinkubation mit GDNF nicht verhindert werden konnte. Darüber hinaus resultierte die Zugabe des neurotrophen Faktors in keiner funktionellen oder visuell fassbaren Modulation der Epithelbarriere aus reifen Caco2- und HT29B6-Zellen. Diesen Erkenntnissen zur Folge erschien es zunächst wahrscheinlicher, dass eher indirekte als direkte Effekte als Ursache der beschriebenen Schutzfunktion von GDNF für das intestinale Epithel anzusehen sind. Da neben uns auch Steinkamp et al. nachweisen konnten, dass Enterozyten für

GDNF spezifische Rezeptoren exprimieren (Steinkamp et al., 2003), liegt jedoch nahe, dass dessen beschriebener positiver Effekt auf die Barrierefunktion nicht nur über die Modulation des Zytokinmusters vermittelt wird. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese einer direkten Wirkung von GDNF auf intestinale Epithelzellen näher untersucht.

Unter physiologischen Bedingungen erneuert sich der Epithelzellmonolayer im Gastrointestinaltrakt alle fünf bis sieben Tage (Sato et al., 2009). Mit diesem Hintergrundwissen über die hohe Dynamik des Zellumsatzes entschlossen wir uns zur Untersuchung der Zellmonolayer einen Tag vor Erreichen der vollständigen Konfluenz - also zu einem Zeitpunkt, an dem die Zellen noch nicht voll ausdifferenziert und Verschlusskontaktproteine reduziert ausgeprägt sind. Unter unreifen Bedingungen zeigten sich die genannten Proteine nach Inkubation mit GDNF in ihrer Morphologie signifikant verändert. Bei Betrachtung der Fluoreszenzfärbungen war in der Interventionsgruppe ein verstärktes und schärferes Signal der Claudine und von Occludin visuell fassbar. Diese Beobachtung wurde durch entsprechende funktionelle Veränderungen im Transwellversuch und in TER-Messungen verifiziert, sodass zusammenfassend ein positiver Einfluss von GDNF auf die Zellreifung wahrscheinlich ist. Ein vergleichbares Phänomen wurde bereits im ZNS beschrieben. Shimizu und Mitarbeiter zeigten im Jahr 2012, dass GDNF in zwei Endothelzelllinien über eine Hochregulation von Claudin 5, einem substanziellen Baustein der Blut-Hirnschranke, eine Steigerung des transendothelialen elektrischen Widerstands induziert (Shimizu et al., 2012). Die nach GDNF-Inkubation unveränderte Quantität der genannten TJ- und Adhärenskontaktproteine, welche sich uns in Auswertungen der Western Blots darstellte, lässt sich durch eine Umverteilung erklären. Durch die Stimulation des neurotrophen Faktors scheint es zu einer Mobilisierung der sich im Plasma befindenden Transmembranproteine zu kommen, welche anschließend in die Zellmembran eingebaut werden. Dieser Einbau ist wiederum visuell und funktionell fassbar.

Unter Einbezug von Transkriptomuntersuchungen lässt sich ein fördernder Effekt von GDNF auf die Reifung der intestinalen Epithelbarriere postulieren. Dort wurde mittels eines Cokulturmodells gezeigt, dass Sekretionsprodukte der Glia eine Hochregulation von Genen bewirken, welche den Differenzierungsvorgang von

Enterozyten verstärken (Van Landeghem et al., 2009). Die Verhinderung der Apoptose durch GDNF als ein weiterer direkter Effekt wurde in dieser Arbeit bereits zitiert (Steinkamp et al., 2003). In Ergänzung zu dem beschriebenen anti-apoptotischen Einfluss fanden wir in Scratch-Assays eine durch Applikation von GDNF verbesserte epitheliale Wundheilung. Aufgrund der ständigen Antigenexposition des Darmepithels münden kleine Störungen der Homöostase häufig in oberflächliche bis tiefe Epithelläsionen, über die es zu einer systemischen Entzündung kommen kann. So erfordern selbst kleinste Schäden die sofortige Wiederherstellung eines intakten Zellverbands (Costantini et al., 2009, Iizuka und Konno, 2011, Turner, 2009). Die intestinale Wundheilung ist abhängig von einem empfindlichen Gleichgewicht aus Migration, Proliferation und Differenzierung. Im Rahmen der Rekonvaleszenz von kleinen Defekten kommt es innerhalb von Minuten über eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts zu einer Ausbreitung der vorhandenen Zellen. Nach Stunden beziehungsweise Tagen setzen dann vor allem bei größeren Läsionen Proliferations- und Differenzierungsvorgänge ein (Dignass, 2001, Iizuka und Konno, 2011, Mammen und Matthews, 2003). Durch Ki67-Färbungen zeigte sich uns nach GDNF-Inkubation eine signifikant gesteigerte Zellproliferation im Verhältnis zu den unbehandelten Kontrollen. Diese Daten unterstützen vorhergegangene Forschungsergebnisse. Dort konnte mit Hilfe eines Cokulturmodells (bestehend aus Glia- und Caco2-Zellen) über Veränderungen im Transkriptom der Enterozyten unter anderem eine verstärkte Expression von Genen detektiert werden, deren codierte Proteine Migrations- und Proliferationsvorgänge einer Zelle stimulieren können (Van Landeghem et al., 2009). Abweichend von dieser Beobachtung beschrieben Neunlist et al. in ihrem transgenen Mausmodell nach Ablation der Gliazellen einen Rückgang der Thymidin-Inkorporation, was eine Proliferationsabnahme anzeigt. Die selbige Arbeitsgruppe demonstrierte, dass Gliazellen via Sekretion von TGF $\beta$  in vitro die Zellproliferation hemmen können. Respektive postulierten sie eine Migrationszunahme als Ursache des rascheren *Sealings* (engl. für Versiegelung) der Filter mit Caco2-Zellen in ihrem Cokulturmodell mit Gliazellen (Neunlist et al., 2007). Für TGF $\beta$  wurde bereits ein anti-proliferativer Effekt nachgewiesen (Kurokawa et al., 1987), während es die Zellmigration fördert (Ciacci et al., 1993). Zudem gibt es eine weitere französische Forschungsgruppe, die eine verbesserte Wundheilung durch Sekretionsprodukte der Glia postuliert. Auch

deren Veröffentlichung sieht jedoch nicht die Proliferation als Ursache, sondern dass die Rekonvaleszenz der Epithelbarriere via Freisetzung von proEGF und Aktivierung der Focal adhesion kinase (FAK) - also einer gesteigerten Migration - vermittelt wird (Van Landeghem et al., 2011). Allerdings ist anzumerken, dass in dieser Arbeit ein möglicher proliferationsfördernder Effekt nicht ausgeschlossen wurde. Dieser liegt eigentlich für proEGF nahe, da der Wachstumsfaktor direkt den Epidermal growth factor-Rezeptor (EGFR) aktivieren und damit in einer Vielzahl von Zelllinien die Proliferation und Differenzierung stimulieren kann (Gospodarowicz, 1983, Oda et al., 2005). Diese Auffassung würde wiederum unsere Hypothese der proliferationsanregenden Wirkung von Gliazellen beziehungsweise ihrer löslichen Mediatoren - speziell GDNF - auf Enterozyten bestätigen.

Letztendlich besteht der Wundheilungsprozess aus mehreren Schritten, die in vivo nicht strikt in einer Reihenfolge ablaufen. Vielmehr ist es für die effektive Wiederherstellung einer Epithelbarriere essenziell, dass mehrere Stufen parallel ablaufen und die Wundfläche schnellstmöglich verschlossen wird (Dignass, 2001). Bei Betrachtung dieses Aspekts scheint es schlüssig, dass verschiedene Sekretionsprodukte, die für sich gesehen antagonistisch wirken, im übergeordneten Gesamtprozess der Heilung synergistische Effekte erzielen. Zu einem ähnlichen Schluss kommt auch die bereits diskutierte Transkriptomuntersuchung von Enterozyten in einer Cokultur mit Gliazellen. In dieser Studie schienen Gliazellen die Expression von sowohl anti- als auch pro-proliferativen Genen zu modulieren (Van Landeghem et al., 2009).

#### **4.4. Vermittlung der Wirkung von GDNF über cAMP/PKA- und p38 MAPK-abhängige Signalwege**

Zuletzt stellte sich uns die Frage, welche phänotypische Veränderung welchem der durch GDNF modifizierten intrazellulären Signalwege zuzuordnen ist. GDNF vermittelt seine Effekte über den bereits beschriebenen Multirezeptorkomplex, dessen Aktivierung zu einer Modulation von diversen intrazellulären Signalwegen wie MAPK, ERK, PI3K/AKT und cAMP/PKA führen kann (Lara et al., 2003, Takahashi, 2001). Das Vorhandensein der GDNF-suszeptiblen Rezeptoren in den verwendeten

Epithelzelllinien veranschaulichten wir mittels Western Blot-Untersuchungen. Zuvor wurde bereits demonstriert, dass GDNF in Neuronen einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration bedingt (Lara et al., 2003). Daraus ergibt sich über die Aktivierung von PKA-Kaskaden eine Verstärkung des ERK-Signalwegs, was wiederum zu einem Auswuchs von Neuriten führt (Wan et al., 2011). Da die lokale Zunahme von cAMP in Endothelzellen zu einer Stabilisierung von Zellkontakten führt (Schlegel und Waschke, 2014), fokussierten wir zunächst die Bedeutung der cAMP-abhängigen Mechanismen für die durch GDNF induzierte Epithelzellreifung. Tatsächlich zeigten sich uns, nach Inkubation von Caco2-Zellen im c-1-Stadium, erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel der Enterozyten.

Nach der Inhibition des cAMP/PKA-Signalwegs mittels H89 konnte keine Veränderung der Permeabilität festgestellt werden. Jedoch zeigte sich uns nach Applikation von H89 zusammen mit GDNF ein unveränderter Permeabilitätskoeffizient, was eine Blockierung der GDNF-Wirkung widerspiegelt. In Diskrepanz zu den Erkenntnissen im Endothel (Schlegel und Waschke, 2014) beobachteten wir in den Enterozytenkulturen nach artifizieller Steigerung des intrazellulären cAMPs mittels Forskolin und Rolipram einen nachteiligen Effekt auf den Reifungsprozess und eine erhöhte epitheliale Permeabilität. Dieses Versuchsergebnis entspricht der Hypothese, dass sich hohe cAMP-Konzentrationen negativ auf die Integrität von Adhärenskontakten auswirken. Durch den Anstieg des Second Messengers kommt es zu einer vermehrten PKA-abhängigen Phosphorylierung von Cadherinen, die damit ihre adhäsiven Eigenschaften verlieren (Boucher et al., 2005). Nach diesen Zwischenergebnissen evaluierten wir einen möglichen vorteilhaften Einfluss der erhöhten cAMP-Werte auf die Proliferation im Rahmen der Wundheilung. Tatsächlich zeigte sich nach Behandlung der unreifen Caco2-Zellen mit Forskolin und Rolipram ein heraufgesetzter Proliferationsindex. Dementsprechend inhibierte der PKA-Hemmstoff H89 die GDNF-induzierte Zellteilung und festigte die Annahme, dass hauptsächlich cAMP/PKA-abhängige Signalwege in die Förderung der Wundheilung involviert sind. Die Komplexität der intrazellulären Vorgänge wird deutlich, da andere Studien einen negativen Einfluss von cAMP auf die Rekonvaleszenz nach einer Verletzung des intestinalen Epithels postulieren (Zimmermann et al., 2012). Jedoch ist anzumerken, dass in dieser Arbeit

der Fokus auf den Einfluss von cAMP auf die Migration gelegt wurde. Über eventuelle Proliferationsveränderungen wurde keine explizite Aussage getroffen. Zudem wurde bei diesen in vitro-Versuchen mit zwei anderen Epithelzelllinien gearbeitet. In Zusammenschau aller Fakten folgern wir, dass die durch cAMP/PKA-Signale vermittelte Störung der Adhärenskontakte die Kontaktinhibition der Epithelzellen möglicherweise aufhebt und es dadurch zur Wiederaufnahme der mitotischen Aktivität kommt.

In Anlehnung an die Studien über den Einfluss von GDNF auf dopaminerge Neurone im ZNS (Lara et al., 2003) untersuchten wir in einem zweiten Schritt den Einfluss von GDNF auf p38 MAPK-Signalwege. Interessanterweise führte die Inkubation von Enterozyten mit GDNF zu einer signifikanten Verringerung des phosphorylierten Anteils der p38 MAPK. Die Phosphorylierung von p38 MAPK bedingt nachfolgend eine Aktivierung der MLCK. Das führt wiederum zu einer Kontraktion des perijunktionalen Aktin-Myosinrings, der über Adaptorproteine mit den Verschlusskontakten verbunden ist. Somit kommt es zu einer Übertragung der Kontraktion und folglich zu einem Zug auf die Zell-Zellkontaktproteine und deren Destabilisierung (Turner, 2009). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung zeigte sich uns, nach Applikation des p38 MAPK-Hemmstoffs SB202190, eine Stärkung der Epithelbarriere aus unreifen Enterozyten. Im Gegensatz dazu führte eine experimentelle Aktivierung des Signalwegs mittels Anisomycin neben einer gesteigerten Permeabilität zu einer Blockade der GDNF-vermittelten Stabilisierung des Epithelzellverbands. Nach Zusammenschau unserer Ergebnisse scheint die durch GDNF induzierte Hemmung von p38 MAPK der dominante Mechanismus für die Ausreifebeschleunigung der Barriere zu sein. Diese Hypothese bestätigen auch Beobachtungen der Verbrennungsforschung. Dort zeigen in vivo-Versuche mit Mäusen, dass eine Behandlung mit dem p38 MAPK-Inhibitor die verbrennungsinduzierte Permeabilitätszunahme im Intestinum signifikant abschwächt (Costantini et al., 2009). Weiterhin suggerieren neuere Daten die Vermittlung des destabilisierenden Effekts von TNF $\alpha$  auf die intestinale Epithelbarriere über eine erhöhte Aktivität der p38 MAPK (Spindler et al., 2015).

Wie eng die beiden untersuchten Signalwege, cAMP/PKA und p38 MAPK, miteinander verzahnt sind, wird auch in der Veröffentlichung von Lara et al. deutlich.

Zwar wird dort der Einfluss von GDNF auf Neurone analysiert, dennoch trifft die Arbeitsgruppe generelle Aussagen über Signalwege, die über den gleichen Rezeptorkomplex, wie er auf Enterozyten zu finden ist, moduliert werden. Die Arbeit beschreibt, dass die Aktivierung von MAP-Kinasen und PKA-Signalwegen zusammen das Wachstum und Überleben der Nervenzellen maximal fördert. Letztendlich wird gezeigt, dass die cAMP-abhängige Induktion der PKA über Phosphorylierungen die Proteinkinase B-raf aktiviert, welche wiederum Enzyme der MAPK-Familie anregt (Lara et al., 2003). Die aktivierten MAP-Kinasen bilden eine gemeinsame Endstrecke der Einwirkung von GDNF auf intrazelluläre Signalwege und können Zellwachstum, Zellproliferation und Differenzierung induzieren (Cargnello und Roux, 2011, Cuadrado und Nebreda, 2010).

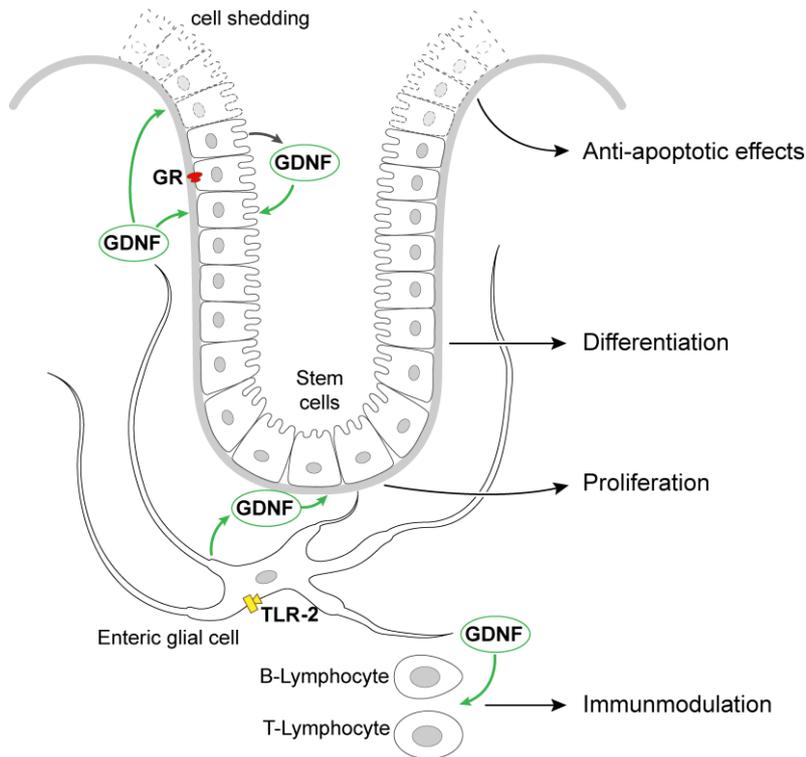
Zusammenfassend zeigen die Daten der vorliegenden Dissertation, dass GDNF einen signifikanten Einfluss auf die Differenzierung der Darmbarriere sowie auf die epitheliale Wundheilung hat. Eine mögliche Relevanz dieser Beobachtungen im Kontext mit Erkrankungen, die mit einer gestörten intestinalen Epithelbarriere einhergehen, sowie die detaillierten zellbiologischen Mechanismen, werden Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

## **5. Zusammenfassung der Ergebnisse**

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte des neurotrophen Faktors GDNF auf die Struktur und Funktion der intestinalen Epithelbarriere untersucht. Zellkulturen mit Caco2 beziehungsweise HT29B6 dienten als Modellsysteme für die Epithelschicht der Darmschleimhaut. Transwellsassays und TER-Messungen mittels ECIS-Gerät fungierten als zentrale Untersuchungsmethoden zur Evaluation der funktionellen Barriereeigenschaft der Zellmonolayer. Die morphologischen und quantitativen Veränderungen von Zelljunctionsproteinen wurden mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbungen beziehungsweise Western Blot-Untersuchungen dargestellt. Um Migration- und Proliferationsverhalten nach Verletzung des Zellmonolayers zu untersuchen, führten wir in vitro-Scratch-Assays durch.

Zunächst wurde bestätigt, dass intestinale Epithelzellen die GDNF-Rezeptoren GFR $\alpha$ 1, GFR $\alpha$ 2 und RET exprimieren. Es zeigte sich sowohl in Immunfärbungen gegen Junctionsproteine als auch in Permeabilitätsmessungen, dass GDNF zu einer verstärkten Differenzierung der intestinalen Epithelbarriere führt. In Inhibitions- und Aktivierungsexperimenten mit verschiedenen Mediatoren wurde als zugrunde liegender Mechanismus die Inaktivierung der p38 MAPK durch GDNF identifiziert. Weiterhin zeigten Versuche mit epithelialen Wundheilungsassays, dass GDNF, über eine cAMP/PKA-abhängige Induktion der Proliferation, zu einer Verbesserung der Wundheilung führt. In Immunfärbungen und Western Blot-Analysen wurde beobachtet, dass auch intestinale Epithelzelllinien in der Lage sind GDNF zu synthetisieren.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass der neurotrophe Faktor GDNF direkt auf die Differenzierung und Proliferation von kultivierten Enterozyten Einfluss nehmen kann. Die Tatsache, dass intestinale Epithelzellen selbst GDNF synthetisieren und sezernieren können, weist auf einen neuen autokrinen- oder parakrinen Wirkmechanismus des neurotrophen Faktors hin (Abb. 22).



**Abbildung 22: Illustration der Effekte von GDNF auf die intestinale Epithelbarriere**

GDNF wird TLR-2-vermittelt von enterischen Gliazellen und Enterozyten synthetisiert. Letztere exprimieren den GDNF-spezifischen Multikomplexrezeptor (GR). Über proliferationsstimulierende Effekte fördert der neurotrophe Faktor die Wundheilung. Zusätzlich bewirkt GDNF eine beschleunigte Ausreifung von Tight Junction-Proteinen.

## 6. Ausblick

Jahrzehntelang wurden Gliazellen nur als supportives und passives Gerüst der Neuronen des ENS wahrgenommen. Aktuelle Daten weisen eindeutig auf eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung und Regulation der Homöostase der Darmbarriere hin (Neunlist et al., 2014). Auch die aus der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse entsprechen diesem neuen, grundlegend veränderten Bild der Funktion von Gliazellen. Im adulten Darm hat GDNF regenerative und schützende Eigenschaften auf Enterozyten. Zudem zeigt der neurotrophe Faktor ein großes, die epitheliale Wundheilung förderndes Potential.

Die Reaktion der Glia wurde besonders bei Entzündungen im Rahmen von CED erforscht. Hier fanden sich eindeutige Nachweise, dass diese Zellen nicht nur durch

die Inflammation geschädigt werden, sondern vielmehr aktiv auf Signale aus dem umliegenden Milieu reagieren können (Von Boyen et al., 2004 und 2009). Jedoch ist die generelle Frage noch nicht geklärt, zu welchem Zeitpunkt des Erkrankungsverlaufs es zu den Aberrationen des Glianetzwerks kommt. Einerseits kann es sich um eine durch proinflammatorische Zytokine vermittelte, sekundäre Veränderung handeln, welche der Protektion der Darmbarriere dient. Dieser Gedanke bietet eine Grundlage für einen neuen potentiellen Therapieansatz. Es ist jedoch auch denkbar, dass Störungen der Gliafunktion, beispielsweise genetisch bedingt, diese Erkrankungen mitverursachen. Damit wäre ein weiteres Puzzleteil der komplexen Pathogenese der CED gefunden, das helfen könnte diese besser zu verstehen.

Um zu beantworten, ob beziehungsweise inwieweit bereits etablierte Therapiekonzepte der CED zukünftig durch GDNF - beispielsweise als lokale Gabe, ähnlich wie im Mausmodell der Arbeitsgruppe um Zhang (Zhang et al., 2010) - ergänzt werden können, bedarf es noch ausgedehnte in vitro- und in vivo-Forschungsreihen und bleibt somit abzuwarten. Jedoch ergibt sich hier ein neuer Ansatzpunkt, dessen Erforschung dazu beitragen könnte, das Leben Betroffener in Zukunft positiv zu beeinflussen.

## 7. Literaturverzeichnis

Ananthakrishnan AN (2015) Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 12: 205-17.

Anniko M, Bagger-Sjoberg D (1982) Maturation of junctional complexes during embryonic and early postnatal development of inner ear secretory epithelia. *American journal of otolaryngology* 3: 242-253.

Aubé AC, Cabarrocas J, Bauer J, Philippe D, Aubert P, Doulay F, Liblau R, Galmiche JP, Neunlist M (2006) Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut* 55: 630-7.

Avetisyan M, Schill EM, Heuckeroth RO (2015) Building a second brain in the bowel. *J Clin Invest* 125: 899-907.

Baum B, Georgiou M (2011) Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J Cell Biol* 192: 907-17.

Baumer Y, Drenckhahn D, and Waschke J (2008) cAMP induced Rac 1-mediated cytoskeletal reorganization in microvascular endothelium. *Histochem Cell Biol* 129: 765-778.

Barmeyer C, Schulzke JD, Fromm M (2015) Claudin-related intestinal diseases. *Semin Cell Dev Biol* 42: 30-8.

Benninghoff A und Drenckhahn D (2008) Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 1, 17. Auflage, München; Jena: Urban&Fischer Verlag/ Elsevier GmbH.

Berkes J, Viswanathan VK, Savkovic SD, Hecht G (2003) Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* 52: 439-51.

Birmingham N, Hillermann R, Gilmour F, Martin JE, Fisher EM (1995) Human glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) maps to chromosome 5. *Human Genet* 96: 671-3.

Blair SA, Kane SV, Clayburgh DR, Turner JR (2006) Epithelial myosin light chain kinase expression and activity are upregulated in inflammatory bowel disease. *Lab Invest* 86: 191-201.

Boado RJ, Pardridge WM (2009) Comparison of blood-brain barrier transport of glial-derived neurotrophic factor (GDNF) and an IgG-GDNF fusion protein in the rhesus monkey. *Drug Metab Dispos* 37: 2299-304

Boesmans W, Lasrado R, Vanden Berghe P, Pachnis V (2015) Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system. *Glia* 63: 229-41.

Boucher MJ, Laprise P, Rivard N (2005) Cyclic AMP-dependent protein kinase A negatively modulates adherens junction integrity and differentiation of intestinal epithelial cells. *J Cell Physiol* 202: 178-190.

Brun P, Giron MC, Qesari M, Porzionato A, Caputi V, Zoppellaro C, Banzato S, Grillo AR, Spagnol L, De Caro R, Pizzuti D, Barbieri V, Rosato A, Sturniolo GC, Martines D, Zaninotto G, Palu G, Castagliuolo I (2013) Toll-like receptor 2 regulates intestinal inflammation by controlling integrity of the enteric nervous system. *Gastroenterology* 145: 1323-1333.

Brun P, Gobbo S, Caputi V, Spagnol L, Schirato G, Pasqualin M, Levorato E, Palù G, Giron MC, Castagliuolo I (2015) Toll like receptor-2 regulates production of glial-derived neurotrophic factors in murine intestinal smooth muscle cells. *Mol Cell Neurosci* 68: 24-35.

Bush TG, Savidge TC, Freeman TC, Cox HJ, Campbell EA, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV (1998) Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* 93: 189-201.

Cabarrocas J, Savidge TC, Liblau RS (2003) Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* 41: 81-93.

Cacalano G, Fariñas I, Wang LC, Hagler K, Forgie A, Moore M, Armanini M, Phillips H, Ryan AM, Reichardt LF, Hynes M, Davies A, Rosenthal A (1998) GFRalpha1 is an essential receptor component for GDNF in the developing nervous system and kidney. *Neuron* 21: 53-62.

Cameron HL, Perdue MH (2007) Muscarinic acetylcholine receptor activation increases transcellular transport of macromolecules across mouse and human intestinal epithelium in vitro. *Neurogastroenterol Motil* 19: 47-56.

Cargnello M, Roux PP (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75: 50-83.

Cheadle GA, Costantini TW, Lopez N, Bansal V, Eliceiri BP, Coimbra R (2013) Enteric glia cells attenuate cytomix-induced intestinal epithelial barrier breakdown. *PloS one* 8: e69042.

Chuang JY, Tsai CF, Chang SW, Chiang IP, Huang SM, Lin HY, Yeh WL, Lu DY (2013) Glial cell line-derived neurotrophic factor induces cell migration in human oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology* 49: 1103-1112.

Ciacci C, Lind SE, Podolsky DK (1993) Transforming growth factor beta regulation of migration in wounded rat intestinal epithelial monolayers. *Gastroenterology* 105: 93-101.

Cohen E, Ophir I, Shaul YB (1999) Induced differentiation in HT29, a human colon adenocarcinoma cell line. *J Cell Sci* 112: 2657-66.

Conlin VS, Wu X, Nguyen C, Dai C, Vallance BA, Buchan AM, Boyer L, Jacobson K (2009) Vasoactive intestinal peptide ameliorates intestinal barrier disruption associated with *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297: G735-50.

Cornet A, Savidge TC, Cabarrocas J, Deng WL, Colombel JF, Lassmann H, Desreumaux P, Liblau RS (2001) Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 13306-13311.

Costantini TW, Peterson CY, Kroll L, Loomis WH, Eliceiri BP, Baird A, Bansal V, Coimbra R (2009) Role of p38 MAPK in burn-induced intestinal barrier breakdown. *J Surg Res* 156: 64-69.

Cuadrado A, Nebreda AR (2010) Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* 429: 403-17.

Dignass AU (2001) Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair. *Inflamm Bowel Dis* 7: 68-77.

Drenckhahn D und Waschke J (2007) Taschenbuch Anatomie, 1. Auflage, München; Jena: Urban & Fischer Verlag/ Elsevier GmbH.

Eddleston M, Mucke L (1993) Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54: 15-36.

Edelblum KL, Turner JR (2009) The tight junction in inflammatory disease: communication breakdown. *Curr Opin Pharmacol* 9: 715-20.

Eshkind L, Tian Q, Schmidt A, Franke WW, Windoffer R, Leube RE (2002) Loss of desmoglein 2 suggests essential functions for early embryonic development and proliferation of embryonal stem cells. *Eur J Cell Biol* 81: 592-8.

Farquhar MG, Palade GE (1963) Junctional complexes in various epithelia. *The Journal of cell biology* 17: 375-412.

Florijn RJ, Slats J, Tanke HJ, Raap AK (1995) Analysis of antifading reagents for fluorescence microscopy. *Cytometry* 19: 177-82.

Fogh J, Orfeo T, Tiso J, Sharkey FE, Fogh JM, Daniels WP (1980) Twenty-three new human tumor lines established in nude mice. *Experimental cell biology* 48: 229-239.

Frantz B, Klatt T, Pang M, Parsons J, Rolando A, Williams H, Tocci MJ, O'Keefe SJ, O'Neill EA (1998) The activation state of p38 mitogen-activated protein kinase determines the efficiency of ATP competition for pyridinylimidazole inhibitor binding. *Biochemistry* 37: 13846-53.

- Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y (2003) Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52: 65-70.
- Funahashi H, Okada Y, Sawai H, Takahashi H, Matsuo Y, Takeyama H, Manabe T (2005) The role of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and integrins for invasion and metastasis in human pancreatic cancer cells. *J Surg Oncol* 91: 77-83.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123: 1777-88.
- Garnis C, Davies JJ, Buys TP, Tsao MS, MacAulay C, Lam S, Lam WL (2005) Chromosome 5p aberrations are early events in lung cancer: implication of glial cell line-derived neurotrophic factor in disease progression. *Oncogene* 24: 4806-12.
- Gassler N, Newrzella D, Bohm C, Lyer S, Li L, Sorgenfrei O, van Laer L, Sido B, Mollenhauer J, Poustka A, Schirmacher P, Gretz N (2006) Molecular characterisation of non-absorptive and absorptive enterocytes in human small intestine. *Gut* 55: 1084-1089.
- Gerok W, Huber C, Meinertz T und Zeider H (2007) Die Innere Medizin, 11. Auflage, Stuttgart: Schattauer Verlag.
- Gershon MD, Rothman TP (1991) Enteric glia. *Glia* 4: 195-204.
- Gitter AH, Bendfeldt K, Schulzke JD, Fromm M (2000) Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis. *FASEB J* 14: 1749-53.
- Goldstein AM, Hofstra RM, Burns AJ (2013) Building a brain in the gut: development of the enteric nervous system. *Clin Genet* 83: 307-16.
- Gospodarowicz D (1983) Growth factors and their action in vivo and in vitro. *J Pathol* 141: 201-33.
- Goyal RK, Hirano I (1996) The enteric nervous system. *N Engl J Med* 334: 1106-15.

Graham WV, Wang F, Clayburgh DR, Cheng JX, Yoon B, Wang Y, Lin A, Turner JR (2006) Tumor necrosis factor-induced long myosin light chain kinase transcription is regulated by differentiation-dependent signaling events. Characterization of the human long myosin light chain kinase promoter. *J Biol Chem* 281: 26205-15.

Grundy D, Al-Chaer ED, Aziz Q, Collins SM, Ke M, Taché Y, Wood JD (2006) Fundamentals of neurogastroenterology: basic science. *Gastroenterology* 130: 1391-411.

Hällgren A, Flemström G, Nylander O (1998) Interaction between neurokinin A, VIP, prostanoids, and enteric nerves in regulation of duodenal function. *Am J Physiol* 275: G95-103.

Hamby ME, Sofroniew MV (2010) Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. *Neurotherapeutics* 7:494-506.

Haugland RP (2002) Handbook of Fluorescent Probes and Research Products. 9th edition, Eugene/ Oregon, USA: Molecular Probes, Inc.

Helander HF, Fändriks L (2014) Surface area of the digestive tract – revisited. *Scand J Gastroenterol* 49: 681-9.

Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Bürgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, Schulzke JD (2005) Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 129: 550-64.

Hering NA, Richter JF, Fromm A, Wieser A, Hartmann S, Gunzel D, Bucker R, Fromm M, Schulzke JD, Troeger H (2014) TcpC protein from E. coli Nissle improves epithelial barrier function involving PKCzeta and ERK1/2 signaling in HT-29/B6 cells. *Mucosal immunology* 7: 369-378.

Herold G und Mitarbeiter (2014) Innere Medizin, Köln: Verlag Herold.

Hirota CL, McKay DM (2006) Cholinergic regulation of epithelial ion transport in the mammalian intestine. *British journal of pharmacology* 149: 463-479.

Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, Petersen GM, Delahunty T, Rotter JI (1986) Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann Intern Med* 105: 883-5.

Holthöfer B, Windoffer R, Troyanovsky S, Leube RE (2007) Structure and function of desmosomes. *Int Rev Cytol* 264: 65-163.

Ichihara M, Murakumo Y, Takahashi M (2004) RET and neuroendocrine tumors. *Cancer Lett* 204: 197-211.

Iden S, Misselwitz S, Peddibhotla SS, Tuncay H, Rehder D, Gerke V, Robenek H, Suzuki A, Ebnet K (2012) aPKC phosphorylates JAM-A at Ser285 to promote cell contact maturation and tight junction formation. *J Cell Biol* 196: 623-39.

Iizuka M, Konno S (2011) Wound healing of intestinal epithelial cells. *World J Gastroenterol* 17: 2161-2171.

Ito Y, Okada Y, Sato M, Sawai H, Funahashi H, Murase T, Hayakawa T, Manabe T (2005) Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor family members and their receptors in pancreatic cancers. *Surgery* 138: 788-94.

Kandasamy J, Huda S, Ambalavanan N, Jilling T (2014) Inflammatory signals that regulate intestinal epithelial renewal, differentiation, migration and cell death: Implications for necrotizing enterocolitis. *Pathophysiology* 21: 67-80.

Kapuscinski J (1995) DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem* 70: 220-33.

Keita AV und Söderholm JD (2010) The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterol Motil* 22: 718-33.

Kirsner JB (1991) Inflammatory bowel disease. Part I: Nature and pathogenesis. *Dis Mon* 37: 605-66.

Kreusel KM, Fromm M, Schulzke JD, Hegel U (1991) Cl<sup>-</sup> secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6). *Am J Physiol* 261: C574-582.

Kurokawa M, Lynch K, Podolsky DK (1987) Effects of growth factors on an intestinal epithelial cell line: transforming growth factor beta inhibits proliferation and stimulates differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 142: 775-82.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lara J, Kusano K, House S, Gainer H (2003) Interactions of cyclic adenosine monophosphate, brain-derived neurotrophic factor, and glial cell line-derived neurotrophic factor treatment on the survival and growth of postnatal mesencephalic dopamine neurons in vitro. *Experimental neurology* 180: 32-45.

Laukoetter MG, Nava P, Lee WY, Severson EA, Capaldo CT, Babbin BA, Williams IR, Koval M, Peatman E, Campbell JA, Dermody TS, Nusrat A, Parkos CA (2007) JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J Exp Med* 204: 3067-76.

Liang CC, Park AY, Guan JL (2007) In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols* 2: 329-333.

Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260: 1130-2.

Lochner A, Moolman JA (2006) The many faces of H89: a review. *Cardiovasc Drug Rev* 24: 261-74.

Loftus EV Jr (2004) Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 126: 1504-17.

Lu Z, Ding Lu Z, Ding L, Lu Q, Chen YH (2013) Claudins in intestines: Distribution and functional significance in health and diseases. *Tissue Barriers* 1: e24978.

Lüllmann-Rauch R (2009) Taschenlehrbuch Histologie, 3. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Magnotti LJ, Deitch EA (2005) Burns, bacterial translocation, gut barrier function, and failure. *J Burn Care Rehabil* 26: 383-91.

- Mahraoui L, Rodolosse A, Barbat A, Dussaulx E, Zweibaum A, Rousset M, Brot-Laroche E (1994) Presence and differential expression of SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT3 and GLUT5 hexose-transporter mRNAs in Caco-2 cell clones in relation to cell growth and glucose consumption. *Biochem J Pt 3*: 629-33.
- Mammen JM, Matthews JB (2003) Mucosal repair in the gastrointestinal tract. *Crit Care Med* 31: S532-7.
- Mankertz J, Tavalali S, Schmitz H, Mankertz A, Riecken EO, Fromm M, Schulzke JD (2000) Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. *J Cell Sci* 113: 2085-90.
- Marchiando AM, Graham WV, Turner JR (2010) Epithelial barriers in homeostasis and disease. *Annu Rev Pathol* 5: 119-44.
- Markov AG, Veshnyakova A, Fromm M, Amasheh M, Amasheh S (2010) Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine. *J Comp Physiol B* 180: 591-8.
- Matissek R, Steiner G, Fischer M (2013) Lebensmittelanalytik (Springer-Lehrbuch) Taschenbuch, 5. Auflage, Wiesbaden: Springer Spektrum.
- Matsushima K, Oppenheim JJ (1989) Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF. *Cytokine* 1: 2-13.
- McEwen AE, Escobar DE, Gottardi CJ (2012) Signaling from the adherens junction. *Subcell Biochem* 60: 171-96.
- Mees ST, Mennigen R, Spieker T, Rijcken E, Senninger N, Haier J, Bruewer M (2009) Expression of tight and adherens junction proteins in ulcerative colitis associated colorectal carcinoma: upregulation of claudin-1, claudin-3, claudin-4, and beta-catenin. *Int J Colorectal Dis* 24: 361-8.
- Meir M, Flemming S, Burkard N, Bergauer L, Metzger M, Germer CT, Schlegel N (2015) Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes barrier maturation and wound healing in intestinal epithelial cells in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 309: G613-24.

- Mills JC, Andersson N, Hong CV, Stappenbeck TS, Gordon JI (2002) Molecular characterization of mouse gastric epithelial progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 14819-14824.
- Mitic LL, Anderson JM (1998) Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol* 60: 121-42.
- Moll I (2010) Duale Reihe Dermatologie, 7. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Mulisch M (2013) Verfahren der Immunlokalisation- Ein Überblick, 1. Auflage, Wiesbaden: Springer Fachmedien.
- Nava P, Capaldo CT, Koch S, Kolegraff K, Rankin CR, Farkas AE, Feasel ME, Li L, Addis C, Parkos CA, Nusrat A (2011) JAM-A regulates epithelial proliferation through Akt/ $\beta$ -catenin signalling. *EMBO Rep* 12: 324-20.
- Neunlist M, Toumi F, Oreschkova T, Denis M, Leborgne J, Laboisie CL, Galmiche JP, Jarry A (2003) Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 285: G1028-1036.
- Neunlist M, Aubert P, Bonnaud S, Van Landeghem L, Coron E, Wedel T, Naveilhan P, Ruhl A, Lardeux B, Savidge T, Paris F, Galmiche JP (2007) Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: G231-41.
- Neunlist M, Van Landeghem L, Bourreille A, Savidge T (2008) Neuro-glial crosstalk in inflammatory bowel disease. *J Intern Med* 263: 577-83.
- Neunlist M, Van Landeghem L, Mahé MM, Derkinderen P, des Varannes SB, Rolli-Derkinderen M (2013) The digestive neuronal-glial-epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10: 90-100.
- Neunlist M, Rolli-Derkinderen M, Latorre R, Van Landeghem L, Coron E, Derkinderen P, De Giorgio R (2014) Enteric glial cells: recent developments and future directions. *Gastroenterology* 147: 1230-7.

- Nguyen HT, Dalmaso G, Yan Y, Laroui H, Dahan S, Mayer L, Sitaraman SV, Merlin D (2010) MicroRNA-7 modulates CD98 expression during intestinal epithelial cell differentiation. *The Journal of biological chemistry* 285: 1479-1489.
- Ning Y, Lenz HJ (2012) Targeting IL-8 in colorectal cancer. *Expert Opin Ther Targets* 16: 491-7.
- Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H (2005) A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol* 1: 2005.0010. doi: 10.1038/msb4100014.
- Peeters M, Ghoois Y, Maes B, Hiele M, Geboes K, Vantrappen G, Rutgeerts P (1994) Increased permeability of macroscopically normal small bowel in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 39: 2170-6.
- Pronobis MI, Peifer M (2012) Wnt signaling: the many interfaces of  $\beta$ -catenin. *Curr Biol* 22: R137-9.
- Quiros M und Nusrat A (2014) Rho GTPases, actomyosin signaling and regulation of the epithelial Apical Junctional Complex. *Semin Cell Dev Biol* 36: 194-203.
- Rädler U, Wegener J (2009) Impedanzbasiertes Screening adhärenter Zellen, *BIOspektrum*, 15. Jahrgang: 535-537.
- Reinshagen M, Rohm H, Steinkamp M, Lieb K, Geerling I, Von Herbay A, Flamig G, Eysselein VE, Adler G (2000) Protective role of neurotrophins in experimental inflammation of the rat gut. *Gastroenterology* 119: 368-376.
- Renart J, Reiser J, Stark GR (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 3116–3120.
- Richter JF, Gitter AH, Gunzel D, Weiss S, Mohamed W, Chakraborty T, Fromm M, Schulzke JD (2009) Listeriolysin O affects barrier function and induces chloride secretion in HT-29/B6 colon epithelial cells. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 296: G1350-1359.

Rühl A, Franzke S, Stremmel W (2001) IL-1beta and IL-10 have dual effects on enteric glial cell proliferation. *Neurogastroenterol Motil* 13: 89-94.

Saarma M, Sariola H (1999) Other neurotrophic factors: glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). *Microsc Res Tech* 45: 292-302.

Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S (2000) Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 11: 4131-42.

Salim SY, Söderholm JD (2011) Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 17: 362-81.

Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stamatii A, Zucco F (2005) The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* 21: 1-26.

Sariola H, Saarma M (2003) Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci* 116: 3855-62.

Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H (2009) Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459: 262-5.

Savidge TC, Newman P, Pothoulakis C, Ruhl A, Neunlist M, Bourreille A, Hurst R, Sofroniew MV (2007) Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* 132: 1344-58.

Savidge TC, Sofroniew MV, Neunlist M (2007) Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain. *Lab Invest* 87: 731-6.

Schlegel N, Burger S, Golenhofen N, Walter U, Drenckhahn D, Waschke J (2008) The role of VASP in regulation of cAMP- and Rac 1-mediated endothelial barrier stabilization. *Am J Physiol Cell Physiol* 294: C178-188.

Schlegel N, Meir M, Heupel W-M, Holthöfer B, Leube RE, Waschke J (2010) Desmoglein 2-mediated adhesion is required for intestinal epithelial barrier integrity. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 298: G774-G783.

Schlegel N, Meir M, Heupel WM, Holthofer B, Leube RE, Waschke J (2010) Desmoglein 2-mediated adhesion is required for intestinal epithelial barrier integrity. *American Journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 298: G774-783.

Schlegel N, Meir M, Spindler V, Germer CT, Waschke J (2011) Differential role of Rho GTPases in intestinal epithelial barrier regulation in vitro. *J Cell Physiol* 226: 1196-1203.

Schlegel N, Waschke J (2014) cAMP with other signaling cues converges on Rac1 to stabilize the endothelial barrier- a signaling pathway compromised in inflammation. *Cell Tissue Res* 355: 587-596.

Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ, Scholz P, Detjen K, Mankertz J, Bode H, Epple HJ, Riecken EO, Schulzke JD (1999) Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci* 112: 137-46.

Schneider S, Steinbeisser H, Warga RM, Hausen P (1996) Beta-catenin translocation into nuclei demarcates the dorsalizing centers in frog and fish embryos. *Mech Dev* 57: 191-8.

Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology* 182: 311-322.

Schulzke JD, Bentzel CJ, Schulzke I, Riecken EO, Fromm M (1998) Epithelial tight junction structure in the jejunum of children with acute and treated celiac sprue. *Pediatric research* 43: 435-441.

Schulzke JD, Gitter AH, Mankertz J, Spiegel S, Seidler U, Amasheh S, Saitou M, Tsukita S, Fromm M (2005) Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim Biophys Acta* 1669: 34-42.

Schwarz BT, Wang F, Shen L, Clayburgh DR, Su L, Wang Y, Fu YX, Turner JR (2007) LIGHT signals directly to intestinal epithelia to cause barrier dysfunction via cytoskeletal and endocytic mechanisms. *Gastroenterology* 132: 2383-94.

Shen L, Black ED, Witkowski ED, Lencer WI, Guerriero V, Schneeberger EE, Turner JR (2006) Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure. *J Cell Sci* 119: 2095-106.

Shimizu F, Sano Y, Saito K, Abe MA, Maeda T, Haruki H, Kanda T (2012) Pericyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor increase the expression of claudin-5 in the blood-brain barrier and the blood-nerve barrier. *Neurochem Res* 37: 401-409.

Silbernagl S und Despopoulos A (2012) Taschenatlas Physiologie, 8. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Sokol H, Polin V, Lavergne-Slove A, Panis Y, Treton X, Dray X, Bouhnik Y, Valleur P, Marteau P (2009) Plexitis as a predictive factor of early postoperative clinical recurrence in Crohn's disease. *Gut* 58: 1218-25.

Soufli I, Toumi R, Rafa H, Touil-Boukoffa C (2016) Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immuno-pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 7: 353-60.

Spindler V, Meir M, Vigh B, Flemming S, Hütz K, Germer CT, Waschke J, Schlegel N (2015) Loss of Desmoglein 2 Contributes to the Pathogenesis of Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis* 21: 2349-59.

Spindler V, Waschke J (2011) Role of Rho GTPases in desmosomal adhesion and pemphigus pathogenesis. *Ann Anat* 193: 177-80.

Steinkamp M, Geerling I, Seufferlein T, von Boyen G, Egger B, Grossmann J, Ludwig L, Adler G, Reinshagen M (2003) Glial-derived neurotrophic factor regulates apoptosis in colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 124: 1748-1757.

Straub RH (2006) Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen: Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 2, 1. Auflage, Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht Verlag.

Sun Y, Liu WZ, Liu T, Feng X, Yang N, Zhou HF (2015) Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J Recept Signal Transduct Res* 35: 600-4.

Suzuki T, Yoshinaga N, Tanabe S (2011) Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. *J Biol Chem* 286: 31263-71.

Takahashi M (2001) The GDNF/RET signaling pathway and human diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 12: 361-373.

Towbin H, Staehelin T und Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350–4354.

Turner JR (2009) Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature reviews* 9: 799-809.

Utech M, Brüwer M, Nusrat A (2006) Tight junctions and cell-cell interactions. *Methods Mol Biol* 341: 185-95.

Van Itallie CM, Holmes J, Bridges A, Gookin JL, Coccaro MR, Proctor W, Colegio OR, Anderson JM (2008) The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2. *J Cell Sci* 121: 298-305.

Van Landeghem L, Mahe MM, Teusan R, Leger J, Guisle I, Houlgatte R, Neunlist M (2009) Regulation of intestinal epithelial cells transcriptome by enteric glial cells: impact on intestinal epithelial barrier functions. *BMC Genomics* 10: 507.

Van Landeghem L, Chevalier J, Mahé MM, Wedel T, Urvil P, Derkinderen P, Savidge T, Neunlist M (2011) Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300: G976-87.

Varilek GW, Neil GA, Bishop WP, Lin J, Pantazis NJ (1995) Nerve growth factor synthesis by intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* 269: G445-52.

- Villanacci V, Bassotti G, Nascimbeni R, Antonelli E, Cadei M, Fisogni S, Salerni B, Geboes K (2008) Enteric nervous system abnormalities in inflammatory bowel diseases. *Neurogastroenterol Motil* 20: 1009-16.
- Von Boyen GB, Steinkamp M, Reinshagen M, Schafer KH, Adler G, Kirsch J (2004) Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. *Gut* 53: 222-228.
- Von Boyen GB, Steinkamp M, Geerling I, Reinshagen M, Schäfer KH, Adler G, Kirsch J (2006) Proinflammatory cytokines induce neurotrophic factor expression in enteric glia: a key to the regulation of epithelial apoptosis in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 12:346-54.
- Von Boyen GB, Schulte N, Pfluger C, Spaniol U, Hartmann C, Steinkamp M (2011) Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. *BMC gastroenterology* 11: 3.
- Walsh D, McCarthy J, O'Driscoll C, Melgar S (2013) Pattern recognition receptors--molecular orchestrators of inflammation in inflammatory bowel disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 24: 91-104.
- Wan G, Zhou L, Lim Q, Wong YH, Too HP (2011) Cyclic AMP signalling through PKA but not Epac is essential for neurturin-induced biphasic ERK1/2 activation and neurite outgrowths through GFRalpha2 isoforms. *Cellular signalling* 23: 1727-1737.
- Wang F, Graham WV, Wang Y, Witkowski ED, Schwarz BT, Turner JR (2005) Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *Am J Pathol* 166: 409-19.
- Wang H, Hughes I, Planer W, Parsadanian A, Grider JR, Vohra BP, Keller-Peck C, Heuckeroth RO (2010) The timing and location of glial cell line-derived neurotrophic factor expression determine enteric nervous system structure and function. *J Neurosci* 30: 1523-1538.

Waschke J, Drenckhahn D, Adamson RH, Barth H, Curry FE (2004) cAMP protects endothelial barrier functions by preventing Rac-1 inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H2427-33.

Wiesenhofer B, Weis C, Humpel C (2000) Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is a proliferation factor for rat C6 glioma cells: evidence from antisense experiments. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 10: 311-21.

Xiao W, Wang W, Chen W, Sun L, Li X, Zhang C, Yang H (2014) GDNF is Involved in the Barrier-Inducing Effect of Enteric Glial Cells on Intestinal Epithelial Cells Under Acute Ischemia Reperfusion Stimulation. *Mol Neurobiol* 50: 274-89.

Xiong W, Kojic LZ, Zhang L, Prasad SS, Douglas R, Wang Y, Cynader MS (2006) Anisomycin activates p38 MAP kinase to induce LTD in mouse primary visual cortex. *Brain Res* 1085: 68-76.

Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD (2007) 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* 65: 61-72.

Zhang DK, He FQ, Li TK, Pang XH, Cui de J, Xie Q, Huang XL, Gan HAT (2010) Glial-derived neurotrophic factor regulates intestinal epithelial barrier function and inflammation and is therapeutic for murine colitis. *J Pathol* 222: 213-222.

Zimmermann NP, Kumar SN, Turner JR, Dwinell MB (2012) Cyclic AMP dysregulates intestinal epithelial cell resititution through PKA and RhoA. *Inflamm Bowel Dis* 18: 1081-1091.

Zur Literatursuche diene folgende Internetseite:

PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)

## 8. Anhang

### 8.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
CU	Colitis ulcerosa
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DAMP	Damage associated molecular pattern
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dsg	Desmoglein
DTT	Dithiothreitol
ECIS	Electric Cell-substrate Impedance Sensing
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ENS	Enterisches Nervensystem
FITC-Dextran	Fluorescein isothiocyanate–dextran
F/R	Forskolin und Rolipram
GADPH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDNF	Glia cell line-derived neurotrophic factor
GFAP	Glial fibrillary acidic protein= saures Gliafaserprotein
GFL	GDNF family ligand
GFR $\alpha$	GDNF-Familienrezeptor $\alpha$
GSNO	Glial-derived s-nitrosoglutathione
GR	GDNF-spezifischer Multikomplexrezeptor

h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
ICC	Interstitielle Zellen von Cajal
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IgA/ G	Immunglobulin A/ G
JAM	Junctional adhesion molecule
kDa	Kilodalton
korr.	korrigiert
LIGHT	lymphotoxin-like inducible protein that competes with glycoprotein D for herpes virus entry on T cells
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MC	Morbus Crohn
MDT	Magen-Darm-Trakt
NGF	nerve growth factor
MLCK	Myosinleichtkettenkinase
NEC	Nekrotisierende Enterokolitis
n.s.	nicht signifikant
OD	optische Dichte
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffered saline
P <sub>E</sub>	Permeabilitätskoeffizient
PFA	Paraformaldehyd
PI3K/Akt	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
POX	Meerrettich-Peroxidase
ProEGF	Vorläuferprotein des Epidermal growth factor
PRR	Pattern recognition receptor
P/S	Penicillin-G und Streptomycin
p38 MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase

rGDNF	rekombinantes GDNF
TER	transepithelial electric resistance
TGF $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TJ	Tight junction= Verschlusskontakt
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF $\alpha$	Tumornekrose Faktor $\alpha$
VIP	Vasoactive intestinal peptide
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO	Zonula occludens

## 8.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Endoskopie-Bild bei florider Colitis Ulcerosa

Abbildung 2: Schematische Darstellung des histologischen Aufbaus der Darmwand

Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Abbildung des Schlussleistenkomplexes

Abbildung 4: Direkter Kontakt zwischen glialen Fasern und Epithelzellen

Abbildung 5: Schematische Darstellung des GDNF-Rezeptors

Abbildung 6: Schematische Darstellung des Transwellfiltersystems

Abbildung 7: Schematische Darstellung des Nassblotverfahrens

Abbildung 8: Schematische Darstellung der Wundsetzung im markierten Well

Abbildung 9: GDNF-Rezeptorexpression (RET, GFR $\alpha$ 1, GFR $\alpha$ 2) durch Caco2 und HT29B6

Abbildung 10: Positiver Nachweis von GDNF in Caco2- und HT29B6-Zelllysaten

Abbildung 11: GDNF führt nicht zu einer morphologischen und quantitativen Veränderung der Tight junction-Proteine und E-Cadherin von ausgereiften Caco2- und HT29B6-Zellen

Abbildung 12: GDNF induziert in vitro keine Änderung des Permeabilitätskoeffizienten ( $P_E$ ) im ausgereiften Zustand der Epithelbarriere

Abbildung 13: GDNF induziert in vitro keine Änderung des transepithelialen elektrischen Widerstands im ausgereiften Zustand der Epithelbarriere

Abbildung 14: GDNF verhindert bei Coinkubation mit Cytomix den Cytokin-induzierten Barriereverlust in vitro nicht

Abbildung 15: Inkubation mit GDNF fördert die Ausreifung von Zellkontaktproteinen und induziert eine Stabilisierung der Barriereigenschaften von unreifen Zellmonolayern

Abbildung 16: GDNF bewirkte eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehalts in nicht-ausdifferenzierten Caco2-Zellen

Abbildung 17: GDNF induziert eine Reduktion der Phosphorylierung der p38 MAPK

Abbildung 18: Einfluss des cAMP-Gehalts von unausgereiften Caco2-Zellen auf die Permeabilität im Transwellversuch

Abbildung 19: Abhängigkeit des  $P_E$  in Transwellversuchen mit unreifen Caco2- und HT29B6-Zellen von der p38 MAPK-Aktivität

Abbildung 20: GDNF fördert die Wundheilung in vitro

Abbildung 21: GDNF induziert über cAMP/PKA-Signalwege eine gesteigerte Proliferation von unreifen Caco2-Zellen

Abbildung 22: Illustration der Effekte von GDNF auf die intestinale Epithelbarriere

### **8.3. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper

Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper

## Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, deshalb möchte ich mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die mir die Erstellung meiner Promotionsarbeit ermöglicht haben.

An erster Stelle ist Priv.-Doz. Dr. Nicolas Schlegel zu nennen. Ihm möchte ich für die Vergabe des Promotionsthemas, die Möglichkeit diese Arbeit in der AG Inflammation&Sepsis durchzuführen zu können und seine Unterstützung danken. Ohne die vielen Erklärungen, Ideen und vor allem seine Freude an der Forschung, die jeden missglückten Versuch oder  $p\text{-Wert} > 0,05$  überstrahlt, wäre diese Arbeit nicht gelungen.

Meinen Betreuern Dr. Michael Meir und Dr. Sven Flemming danke ich von Herzen, dass die jede Phase dieser Arbeit sowohl mit Engagement als auch mit Geduld begleitet haben. Auf ihren kompetenten Rat und ihre Hilfe konnte ich bei Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Dissertation zu jeder Zeit zählen.

Besonders bedanken möchte ich mich zudem bei Veronica Heimbach und Alexia Witchen für die Weitergabe ihrer Tipps und Tricks, ihre Hilfe und vor allem für ihre Herzlichkeit mit der sie mich in das Labor aufgenommen haben.

Dr. Marco Metzger und Dr. Corinna Moll vom Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin der Universität Würzburg danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung ihres Laborinventars.

Auch bei Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke aus dem Institut für Klinische Physiologie, Charité Campus Benjamin Franklin möchte ich mich an dieser Stelle für die Bereitstellung HT29B6-Zelllinie bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern und meine Schwester Annika. Ohne sie wären das Studium und meine Promotion nicht möglich gewesen. Während der Zeit standen sie mir immerzu unterstützend zur Seite, obwohl sie oft auf mich verzichten mussten. Vor allem bei meiner Mama - mit ihrer unendlichen Energie und unübertroffenen Herzlichkeit, für die ich sie sehr bewundere - möchte ich an dieser Stelle bedanken.

Zuletzt sind natürlich noch meine wunderbaren Mädels aus Lauf zu erwähnen, die mich nun schon seit fast zwei Jahrzehnten begleiten und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stehen.