Die kurzkettige Fettsäure Butyrat stabilisiert die epitheliale Barrierefunktion des Darmes durch HNF-4α-abhängige Herabregulierung der Claudin-2-Expression

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Svenja Plöger
aus Berlin

März 2011

Diese Arbeit wurde von Januar 2007 bis März 2011 unter der Leitung von Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke in der Medizinischen Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke, Charité – Universitätsmedizin Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel, Freie Universität Berlin

Disputation am 17.06.2011

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 1

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen 1

1.1.1 Morbus Crohn 2

1.1.2 Colitis ulcerosa 2

1.2 Das intestinale Epithel 2

1.2.1 Tight Junctions 4

1.2.1.1 Occludin 5

1.2.1.2 Tricellulin 6

1.2.1.3 Claudine 7

1.21.1.3.a. Claudin-2 9

1.3 Kurzkettige Fettsäuren (SCFA = Short chain fatty acids) 11

1.3.1 Transport von SCFA 13

1.3.2 Butyrat 15

1.3.2.1 Genregulatorische Eigenschaften von Butyrat 16

1.3.2.2 Butyrat und sein Einfluss auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen 17

2 ZIELSETZUNG 19

3 MATERIAL UND METHODEN 20

3.1 Geräte 20

3.2 Verbrauchsmaterialien 21

3.3 Substanzen und Chemikalien 21

3.4 Enzyme 23

3.5 Antisera 24

3.6 Gebrauchsfertige Kits 24

3.7 Primer 25

3.8 Puffer und Lösungen 26

3.8.1 Ussing-Kammer 26

3.8.1.1 Ringerlösung (#111) 26

3.8.2 Proteinlysepuffer 26

3.8.2.1 Gesamtlysepuffer: 26

3.8.2.2 RIPA-Puffer: 26

3.8.3 Western Blot 27
3.8.3.1 Elektrophorese-Puffer 27
3.8.3.2 5x Lämmli-Proben-Puffer 27
3.8.3.3 Transferpuffer 27
3.8.3.4 PBS/T (1l) 27
3.8.3.5 1x TBS/T 27
3.8.3.6 BSA-Lösung in PBS/T 27
3.8.3.7 Blockingreagenz in TBS/T 27
3.8.3.8 Lumi-Light^{Plus} Reagenz 27
3.8.4 ChIP 28
3.8.4.1 Zell-Lyse-Puffer 28
3.8.4.2 Nuclei-Lyse-Puffer 28
3.8.4.3 ChIP-Dilutions-Puffer 28
3.8.4.4 Low-Salt-Puffer 28
3.8.4.5 High-Salt-Puffer 28
3.8.4.6 LiCl-Wasch-Puffer 28
3.8.4.7 TE-Puffer 29
3.8.4.8 Elutions-Puffer (immer frisch angesetzt) 29
3.8.4.9 PK-Puffer 29
3.9 Zellbiologische Methoden 30
3.9.1 Kultivierung von humanen Zellen 30
3.9.1.1 Kultivierung von HT-29/B6-Zellen 30
3.9.1.2 Kultivierung des HT-29/B6-GR/MR Klons 30
3.9.2 Zellkultivierung auf Filtern 31
3.9.3 Zellkultivierung auf Schalen 31
3.10 Elektrophysiologische Messungen 31
3.10.1 Manuelle Messung des transepithelialen Widerstands 31
3.10.2 Die Ussing-Kammer 32
3.10.3 Impedanzmessungen an humanen Patientenbiopsien 33
3.10.3.1 Impedanzspektroskopie 34
3.10.3.2 Methode der Impedanzmessung 36
3.10.4 Bestimmung von NaCl-Dilutionspotentialen 37
3.11 Biochemische Methoden 39
3.11.1 Western Blot-Analysen 39

3.11.1.1 Gesamt-Proteinextraktion aus eukaryotischen Zellen 39
3.11.1.2 Proteinbestimmung 39
3.11.1.3 Proteinauftrennung durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese 40
3.11.1.4 Proteintransfer auf PVDF-Membrane 41
3.11.1.5 Immundetektion von Proteinen 42
3.11.2 Immunfluoreszenzfärbung von Epithelzellen 42
3.11.2.1 Immunfluoreszenzfärbung von Zellfiltern 43
3.11.2.2 Zellkern-Färbung mit DAPI 43
3.11.2.3 Prinzip des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops 44
3.11.2.4 Graphische Darstellung von konfokalen z-Stack Aufnahmen 44
3.12 Molekularbiologische Methode 45
3.12.1 Quantitative Bestimmung der relativen Genexpression in eukaryotischen Zellen 45
3.12.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 45
3.12.1.2 Agarose-Gelelektrophorese 46
3.12.1.3 RNA-Isolierung 46
3.12.1.4 Reverse Transkription 47
3.12.1.5 Quantitative Real-Time-PCR 48
3.12.1.5.a. TaqMan-Sonde 49
3.12.1.5.b. Real Time-Messung mittels SYBR green 50
3.12.2 Nachweis der mRNA- und Proteinstabilität 51
3.12.3 ChIP (Chromatin Immunopräzipitation) 52
3.12.3.1 Fixierung und Chromatin-Isolierung 53
3.12.3.2 Fragmentierung der DNA-Protein-Komplexe 53
3.12.3.3 Phenolextraktion zur Bestimmung der DNA-Konzentration 54
3.12.3.4 Immunopräzipitation zwischen dem anti-acetyl-H3-Antikörper und dem Protein-DNA-Komplex 54
3.12.4 Bestimmung von Protein-DNA-Interaktionen mittels EMSA 55
3.12.4.1 Präparation des Nuklearen Extraktes 56
3.12.4.2 Annealing der Bindesequenzen 56
3.12.4.3 Shift Assay 56
3.12.4.4 Gelelektrophorese und Transfer 57
3.12.4.5 Detektion der Membranen 57
4 ERGEBNISSE 59

4.1 Physiologische Änderungen in HT-29/B6-GR/MR-Zellen unter dem Einfluss von Butyrat 59

4.1.1 Veränderungen des epithelialen Widerstandes und der Permeabilität im Kolonkarzinom-Zellklon HT-29/B6-GR/MR 59

4.1.2 Einfluss von Butyrat auf die Na^+- und Cl^--Permeabilitäten bei HT-29/B6-GR/MR-Zellen 62

4.2 Molekulare Veränderungen durch Butyrat auf parazellulärer Ebene 64

4.2.1 Proteinexpression barrierererelevanter Claudine unter Butyrat in HT-29/B6-GR/MR-Zellen 64

4.2.2 Claudin-2-Expression verschiedener Zelllinien unter Butyrat-Einfluss ... 65

4.2.3 Abhängigkeit der Widerstandserhöhung von verschiedenen Konzentrationen des Butyrats 66

4.2.4 Veränderungen des epithelialen Widerstandes und der Permeabilität im Kolonkarzinom-Zellklon HT-29/B6-GR/MR 68

4.2.5 Lokalisation von Claudin-2 in der Tight Junction unter Butyrat 69

4.2.6 Butyrat-Einfluss bei subkonfluenten Zellen 72

4.2.7 Einfluss von Butyrat und Trichostatin A (TSA) auf die Genexpression von Claudin-2 73

4.3 Durch Butyrat induzierte Mechanismen zur Reduzierung der Claudin-2-Expression 75

4.3.1 Proteinstabilität von Claudin-2 unter Butyrat Einfluss 75

4.3.2 mRNA-Stabilität von Claudin-2 unter Butyrat-Einfluss 76

4.3.3 Bindungsaffinität verschiedener Claudin-2-Promotorabschnitte an Acetyl-Histon-3 77

4.3.4 Bindeverhalten von Transkriptionsfaktoren an verschiedene Transkriptionsfaktor-Bindestellen im Claudin-2-Promotor 80

4.4 Einfluss von Butyrat auf das distale Kolon bei Patienten mit CED 85

5 DISKUSSION 86

5.1 Butyrat und sein Einfluss auf die Elektrophysiologie von Darmepithelzellen 86

5.2 Erhöhung von R^t und R^{para} mittels Butyrat durch eine Reduktion der Claudin-2-Expression 89

5.2.1 Butyrat induziert keine Umverteilung von Claudin-2, aber eine Reduzierung innerhalb der Tight Junction 90

5.3 Beeinflussung transkriptioneller Prozesse durch Butyrat 91

5.3.1 Butyrat nimmt keinen Enfluss auf die Bindung von ac-H3 im Claudin-2-Promotor 91

5.3.2 Butyrat induziert eine universelle Verminderung der Bindeaffinität von Transkriptionsfaktoren im Claudin-2-Promotor 92

5.4 Einfluss von Butyrat auf den nativen Darm von CED-Patienten 94

6 ZUSAMMENFASSUNG 98

7 SUMMARY 100

8 LITERATUR 102

9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 114

10 ANHANG 117

10.1 Publikationen 117

10.2 Lebenslauf 118

10.3 Danksagung 119

1 EINLEITUNG

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn (*engl. crohns disease* = CD) und Colitis ulcerosa (*engl. ulcerative colitis* = UC) zeichnen sich durch eine Leckflux-Diarrhoe aus. Verursacht wird sie durch einen Verlust an im Blut bzw. Serum gelösten Teilchen hinein ins Darmlumen aufgrund einer gestörten epithelialen Barrierefunktion, was in Abhängigkeit steht mit der Zusammensetzung der Tight Junction-Proteine der Enterozyten. Während bei der Colitis ulcerosa eine Reduktion der Tight Junction-Stränge zu verzeichnen ist, zeigen sich beim Morbus Crohn zusätzlich Brüche im Tight Junction-Strandnetzwerk (Marin et al. 1983; Schmitz et al. 1999).

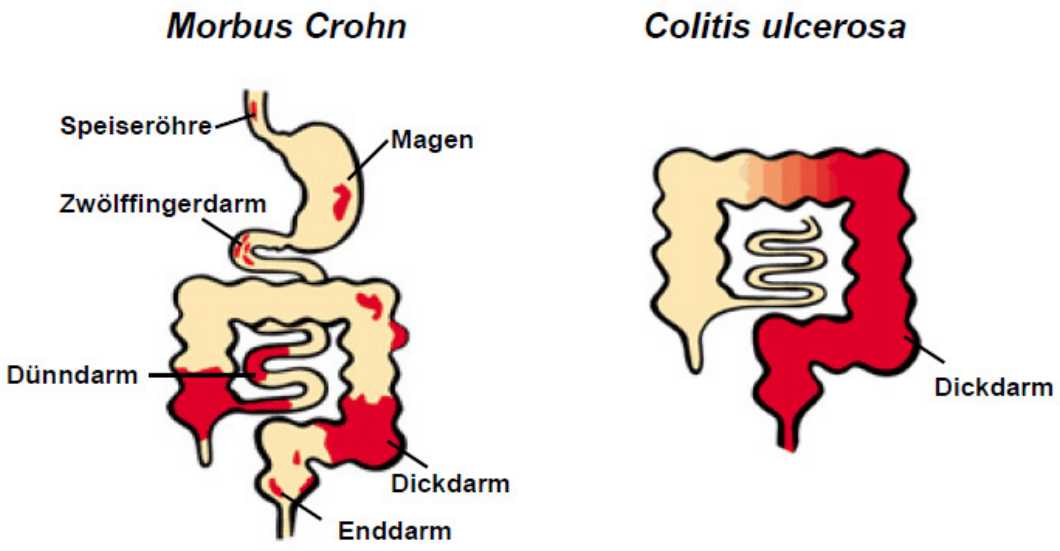


Abb. 1.1 Verteilung der entzündlichen Bereiche bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa
Der Entzündungsherd (rot) bei Morbus Crohn ist über viele Teile des Darms verteilt und beschränkt sich nicht nur auf den Dickdarm (Kolon), sondern kann auch in Speiseröhre und Magen zu finden sein. Bei Colitis ulcerosa hingegen ist der Entzündungsherd auf das Kolon beschränkt und breitet sich kontinuierlich von distal nach proximal aus und zwar unter Einbeziehung des Rektums (Quelle: *www.kompetenznetz-ced.de*)

1.1.1 Morbus Crohn

Bei Morbus Crohn sind die Entzündungen im GI-Trakt diskontinuierlich angeordnet, hauptsächlich im unteren Dünndarm und auch im Dickdarm lokalisiert (Abb. 1.1). Entzündete Segmente des Darms von Crohn-Patienten mit einer leichten bis mittelschweren Erkrankung zeigen einen verminderten epithelialen Widerstand (Zeissig et al. 2004). In Korrelation dazu sind sowohl Strukturen der Tight Junction als auch die epitheliale Apoptoserate verändert (Zeissig et al. 2004; Zeissig et al. 2006), was mit einer reduzierten Komplexität der Tight Junction mit weniger Strands, einer verminderten Höhe des Tight Junction-Netzwerkes und dem Auftauchen von Strangbrüchen verbunden ist. Es wird vermutet, dass diese Strangbrüche Einfluss auf die Aufnahme von mittelgroßen Molekülen wie kleinen Antigenen und bakteriellen Lipopolysacchariden haben. Zudem konnte eine starke Verminderung der Barriere-bildenden Tight Junction-Proteine Claudin-5 und -8 bei M. Crohn-Patienten ermittelt werden, während der Kationenkanal Claudin-2 eine erhöhte Expression aufweist. Zusätzlich konnte anhand von immunhistochemischen Färbungen gezeigt werden, dass Claudin-5 und -8 eine Umverteilung aus dem Tight Junction-Netz heraus in die basolaterale Membran bzw. ins Zytoplasma aufweisen (Zeissig et al. 2006).

1.1.2 Colitis ulcerosa

Colitis ulcerosa ist durch einen entzündlichen Befall des Mastdarms und Dickdarms gekennzeichnet (Abb. 1.1). Anders als beim Morbus Crohn breitet sich die Entzündung kontinuierlich vom Mastdarm beginnend aus und ist auf die Darmschleimhaut (Mukosa und Submukosa) beschränkt. Wie bei Morbus Crohn findet sich auch bei Colitis ulcerosa eine Veränderung der Tight Junction-Struktur und Funktion, was sich z.B. durch eine erhöhte Claudin-2-Expression auszeichnet (Schmitz et al. 1999). Zusätzlich trägt eine erhöhte epitheliale Apoptoserate zu dem Barrieredefekt bei (Schmitz et al. 1999). Eine tragende Rolle für diesen Effekt bei Colitis ulcerosa konnte dem Th2-Zytokin IL-13 zugewiesen werden, das als potentieller Induktor für Apoptose in HT-29/B6-Zellen gilt (Schmitz et al. 1999).

1.2 Das intestinale Epithel

Bei Eukaryonten werden innere und äußere Organe von einem Epithel ausgekleidet. Dabei handelt es sich beim intestinalen Epithel um einschichtige Zellen, die das Darmlumen ausbauen. Es fungiert als Barriere zum Schutz vor schädlichem

intraluminalen Eintritt fremder Antigene, Mikroorganismen und deren Toxinen (Blikslager et al. 2007) (Podolsky 1999), aber auch als selektiver Filter, welcher die Übertragung essentieller Nährstoffe, Elektrolyte und Wasser vom intestinalen Lumen in den Blutkreislauf gewährleistet (Kunzelmann and Mall 2002; Broer et al. 2008; Ferraris and Diamond 1997).

Substanzen können auf transzellulärem oder parazellulärem Wege durch das Darmepithel transportiert werden (Tsukita et al. 2001). Über den transzellulären Transport werden aktiv lösliche Moleküle durch das Epithel befördert, was größtenteils über selektive Transporter wie z.B. für Aminosäuren, Elektrolyte, kurzkettige Fettsäuren oder Zuckermoleküle bewerkstelligt wird (Kunzelmann and Mall 2002; Broer et al. 2008; Ferraris and Diamond 1997).

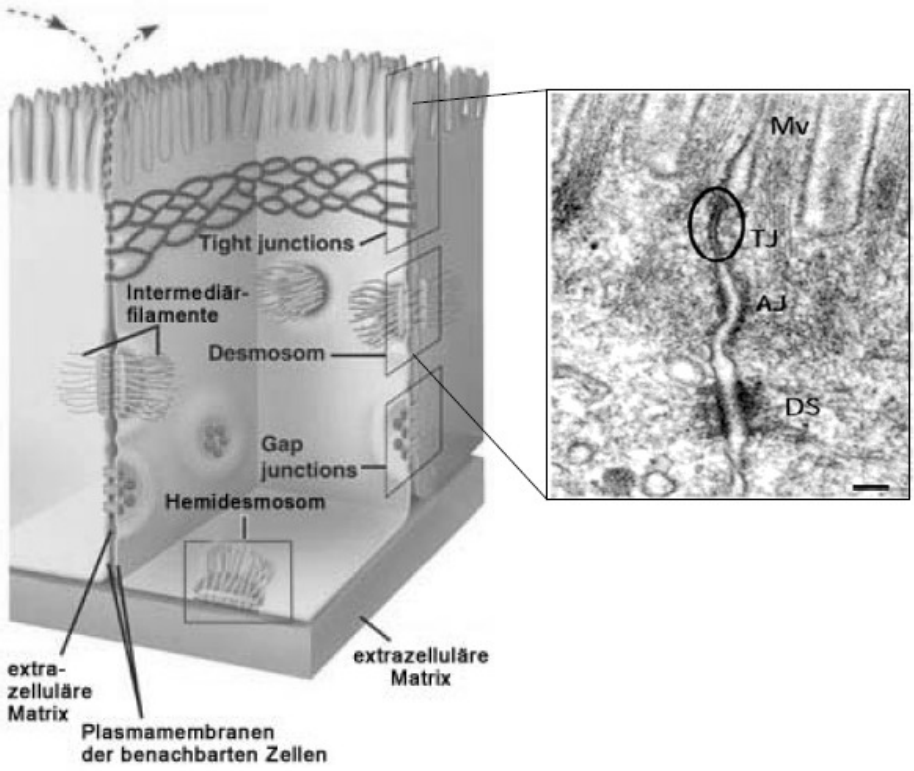


Abb. 1.2 Aufbau einer Darmepithelzelle
Die Epithelzelle zeigt im apikalen Bereich die typische Tight Junction-Struktur und im basalen Bereich die Gap Junction. Des Weiteren sind die Zell-Zellkontakte durch Desmosomen (DS) und intermediäre Filamenten realisiert. Der Ausschnitt (rechts) zeigt einen elektronenmikroskopisch vergrößerten Bereich der verschiedenen Zell-Zellkontakte, der zusätzlich die Adherens Junction (AJ) berücksichtigt (von *www.biologie.uni-erlangen.de* und modifiziert nach Tsukita et al. 2001)

Im Gegensatz dazu erfolgt der parazelluläre Transport über die lateralen interzellulären Spalträume (LIS) zwischen Epithelzellen und ist durch interzelluläre Komplexe reguliert, die an der apikal-lateralen Membrangrenze und an der lateralen Membran lokalisiert sind (Abb. 1.2, Abb. 1.3) (Van Itallie and Anderson 2006). Die Kontakte zwischen den Epithelzellen werden durch die verschiedene Komponenten, wie Desmosomen, Adherens Junctions (AJ), Gap Junctions (GJ) und Tight Junctions (TJ) gebildet (Farquhar and Palade 1963) (Abb. 1.2). Während die parazelluläre Permeabilität, die von der Größe und der Ladung des Moleküls abhängig ist, maßgeblich durch die Tight Junction bestimmt wird (Fanning et al. 1999) (Abb. 1.3), wird den anderen Zellkomponenten die Funktion der mechanischen Stabilisierung, wie im Falle der Adherens Junction und der Desmosomen oder die Funktion der Kommunikation zwischen den Zellen wie im Falle der Gap Junctions zugeschrieben.

1.2.1 Tight Junctions

Tight Junction-Proteine sind apikal lokalisiert und gehören zu den adhäsiven, abgrenzenden Komplexen in epithelialen Zellen (Abb. 1.3). Sie formen eine kontinuierliche netzartige Ringstruktur zwischen der lateralen und apikalen Grenze der Membran-Regionen um die Epithelzellen herum (Farquhar et al. 1963).

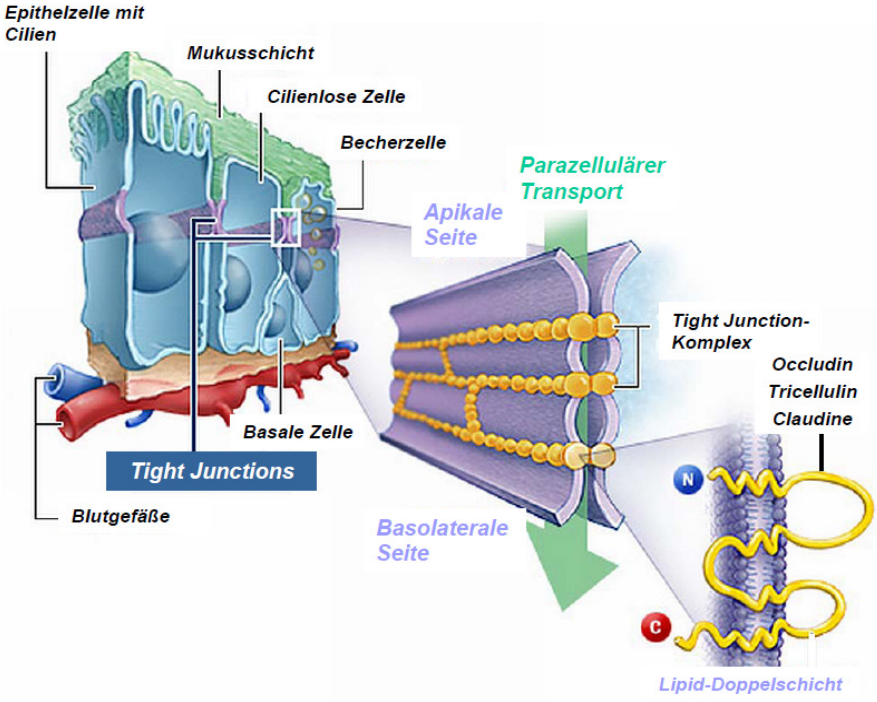


Abb. 1.3 Feinstruktur des Darmepithels
Aufbau des Darmepithels, mit genauerer Betrachtung zu der apikal lokalisierten Tight Junction-Struktur, dem Aufbau der einzelnen Tight Junction-Moleküle in der Lipid-Doppelschicht und dem entsprechenden parazellulären Transport (Quelle: nach *www.nastech.com* [letzter Abruf 2009])

Dabei handelt es sich bei den Tight Junction-Molekülen um Multi-Protein-Komplexe, welche eine selektive und semipermeable Barriere bilden (engl. *barrier function*). Sie regulieren den Durchfluss von Ionen und Soluten durch den intrazellulären Raum und können den Durchtritt schädlicher Substanzen begrenzen (Schneeberger and Lynch 1992). Zusätzlich gewährleistet die TJ auch die Polarität der Epithelzellen, was für den gerichteten Stofftransport ebenfalls essentiell ist (Turksen and Troy 2004) (Schneeberger and Lynch 1992), indem sie Membranbestandteile wie Membranproteine an der freien Bewegung, der sog. lateralen Membrandiffusion, hindern (engl. *fence function*). Bisher sind 4 Familien von transmembranalen Proteinen der Tight Junction bekannt geworden, zu denen Occludin, Claudine, junktionale Adhäsions-Moleküle (JAMs) und Tricellulin gehören (Abb. 1.3).

1.2.1.1 Occludin

Anfang der 90er Jahre ist zum ersten Mal ein Tight Junction-Molekül strukturell beschrieben worden, Occludin. Es besitzt eine Größe von 65 kDa (Furuse et al. 1993). Auffällig sind die beachtlichen Homologien in der Aminosäuresequenz des Occludins zwischen verschiedenen Organismen, die bei ca. 90% liegen (Ando-Akatsuka et al. 1996). Dabei handelt es sich bei Occludin um ein integrales Membranprotein mit zwei extrazellulären Loops, einem intrazellulären Loop und 4 transmembranen Domänen, sowie einem intrazellulären N- und C-Terminus (Furuse et al. 1993) (Abb. 1.4). Während der intrazelluläre N-Terminus etwa 60 Aminosäuren besitzt, weist die C-terminale Region 250 Aminosäuren auf (Furuse et al. 1993). Der C-Terminus ist unter anderem für den Einbau von Occludin in die TJ und durch seine Anhäufung an geladenen Aminosäuren für die Bindung an die PDZ-Domäne der Strukturproteine ZO-1 und ZO-2 notwendig (Furuse et al. 1994).
Bisherige Erkenntnisse lassen vermuten, dass jeweils zwei extrazelluläre Loops von Occludin und/oder Claudinen benachbarter Zellmembranen eine Affinität zueinander aufweisen (Citi and Cordenonsi 1998; Anderson 2001). Aufgrund des hohen Gehaltes Glycin und Tyrosin von 60% in der ersten extrazellulären Schleife, wird ihr die Rolle der Zell-Zell-Verbindung zugesagt, während die zweite extrazelluläre Domäne an der parazellulären Barriere beteiligt zu sein scheint (Balda et al. 1996; Van Itallie and Anderson 1997; Chung et al. 2001; Medina et al. 2000). Bei Überexpression von Occludin in MDCK-Zellen (Madin-Darby Canine Kidney-Zellen) kann eine Steigerung des transepithelialen Widerstandes beobachtet werden, was

unter anderem Hinweise auf die Dichte eines Epithels gibt, so dass über die Funktion des Occludins als wesentlichem Bestandteil der Barriere eines Epithels diskutiert wird (McCarthy et al. 1996). Trotzdem muss betont werden, dass ein Fehlen von Occludin in Mäusen im sog. Knockout-Mausmodell zu keinen Veränderungen in der Tight Junction-Struktur oder in der Barrierefunktion des intestinalen Gewebes führt, auch wenn diese Mäuse einen veränderten Phänotypen aufweisen. So gibt es eine Verzögerung im postnatalen Wachstum und es konnten zahlreiche Abnormitäten in verschiedenen Organen beobachtet werden, wie die Kalzifizierung des Gehirns, Testiatrophie oder chronische Entzündungen und Hyperplasien des Magenepithels.
Verschiedene Spleißvarianten von Occludin im humanen Kolon und in der Plazenta weisen zum Teil starke Unterschiede in der Aminosäuresequenz und im Lokalisationsmuster auf (Mankertz et al. 2002), so dass Occludin eine höhere funktionelle Komplexität zugesagt wird (Saitou et al. 2000). Weitere Versuche an Mausmodellen zeigten, dass sein Fehlen eine starke Veränderung in der gastralen Morphologie hervorruft, die mit einem Verlust der Magensäure-Sekretion einhergeht, obwohl Occludin keinen essentiellen Einfluss auf die Barrierefunktion hat. Occludin spielt somit offensichtlich eher eine wichtige Rolle bei der Differenzierung des Magenepithels (Schulzke et al. 2005).

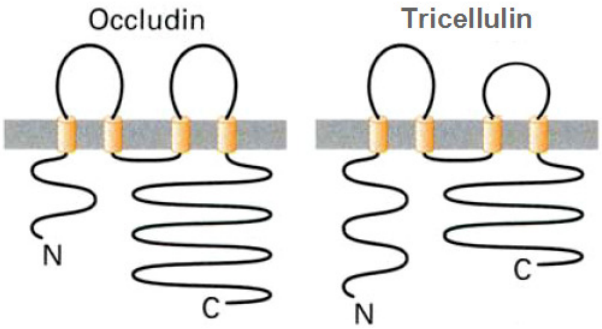


Abb. 1.4 Die Tight Junction Moleküle Occludin und Tricellulin
Trotz der unterschiedlichen Längen der intrazellulären C- und N-terminalen Domänen weisen Occludin und Tricellulin starke Homologien auf, die auf eine ähnliche Funktion hindeuten könnten (nach Tsukita et al., 2001)

1.2.1.2 Tricellulin

2005 wurde das Tight Junction-Molekül Tricellulin das erste Mal beschrieben (Ikenouchi et al. 2005), welches sich durch eine bevorzugte Lokalisation in der trizellulären Tight Junction auszeichnet, aber auch in der bizellulären Tight Junction nachgewiesen werden konnte. Bisher wurden vier humane Isoformen von Tricellulin beschrieben (Riazuddin et al. 2006), wobei Tricellulin-a (TRIC-a) mit einer Größe von

64 kDa die längste Form darstellt und starke Homologien zu Occludin aufweist. Wie schon für Occludin beschrieben enthält auch der erste extrazelluläre Loop von TRIC-a viel Glycin und Tyrosin (49,5%), was darauf hinweisen könnte, dass er ebenfalls zur Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte nötig ist. Wie andere Tight Junction-Proteine besitzt TRIC-a vier Transmembranbereiche, zwei extrazelluläre Loops und drei intrazelluläre Bereiche, bestehend aus einer kurzen Schleife, einem kurzen N-terminalen Ende und einem langen C-terminalen Bereich (Abb.1.4).
Über die Funktion von Tricellulin ist bisher immer noch relativ wenig bekannt, allerdings wird gemutmaßt, dass Tricellulin eine Barriere-bildende Funktion, speziell in den trizellulären Kontakten innerhalb der Tight Junction besitzt. So konnte in unserem Labor nachgewiesen werden, dass Tricellulin bei erhöhter Expression als Barriere für Makromoleküle in der trizellullären Tight Junction und für gelöste Stoffe jeglicher Größe in der bizellulären Tight Junction fungiert (Krug et al. 2009). Tricellulin scheint also eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Tight Junction im Bereich trizellulärer Zellkontakte zu spielen, wobei es auch die bizelluläre Tight Junction beeinflusst. In Occludin-Knockout-Mäusen kann Tricellulin die Rolle des Occludins in der bizellulären Tight Junction übernehmen, was auf deren Homologien zurückgeführt wird (Ikenouchi et al. 2008). Im medizinischen Kontext ist TRIC-a für die nicht-syndromalen Taubheiten von Bedeutung, da diese mit einer Mutation von TRIC-a verbunden sein können (Riazuddin et al. 2006) (Chishti et al. 2008).

1.2.1.3 Claudine

Claudine bilden die größte Familie der Tight Junction-Proteine. Lange waren beim Menschen 24 verschiedene Claudine mit einem Molekulargewicht von 20-27 kDa bekannt (Tsukita et al. 2001), kürzlich sind jedoch noch weitere drei Claudine identifiziert worden (Mineta et al. 2011). Alle Claudine zeichnen sich durch 4 hydrophobe Transmembrandomänen aus, die wiederum aus 2 extrazellulären Loops und je einer N- sowie einer C-terminalen zytoplasmatischen Domäne bestehen (Harhaj and Antonetti 2004; Schneeberger and Lynch 2004; Turksen and Troy 2004; Van Itallie and Anderson 2006) (Abb. 1.5). Die intrazelluläre C-terminale Domäne ist an der Verankerung der Claudine mit dem Zytoskelett durch Proteine mit PDZ-Bindedomäne wie ZO-1, ZO-2 und ZO-3 involviert (McCarthy et al. 1996; Itoh et al. 1999; Ma et al. 1999; Morita et al. 1999).

Viele Claudine konnten noch nicht funktionell charakterisiert werden, weisen allerdings in den bisherigen Studien ein großes Funktionsspektrum auf. Auf der einen Seite gibt es Claudine wie Claudin-1, Claudin-3, Claudin-4 oder Claudin-5, die eine abdichtende Funktion innerhalb der Tight Junction haben.

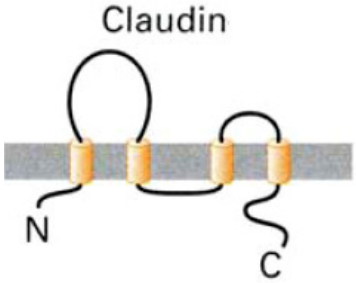


Abb. 1.5 Das Tight Junction-Molekül Claudin
Bisher sind beim Säuger 27 verschiedene Claudine bekannt, die sich durch ihre 4 Transmembrandomänen, 2 extrazelluläre Loops und im Vergleich zum Occludin kürzere N- und C-Termini auszeichnen (nach Tsukita et al., 2001)

Ein Fehlen von Claudin-1 im Knockout-Modell verursacht beispielsweise einen tödlichen Wasserverlust, was auf eine abdichtende Funktion von Claudin-1 im Bereich der Epidermis der Haut zurückzuführen ist (Furuse et al. 2002). Claudin-4 erhöht die Tight Junction Komplexität (Colegio et al. 2002) und kann bei einer Überexpression zu einer verminderten Kationen-Durchlässigkeit bei gleichbleibender Permeabilität für Anionen führen (Van Itallie et al. 2001). Claudin-5 konnte wiederum als Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke eine Barriere-bildende Rolle zugewiesen werden (Nitta et al. 2003; Amasheh et al. 2005). Für Claudin-3 konnte ebenfalls eine barrierefördernde Funktion nachgewiesen werden. So ist der parazelluläre Widerstand in Claudin-3 transfizierten MDCK-Zellen erhöht und die Permeabilität für geladene und ungeladene kleine Ionen bei einer Überexpression eingeschränkt (Milatz et al. 2010).

Auf der anderen Seite gibt es Claudine, denen eine Funktion als parazelluläre Pore zugeordnet wird. Claudin-2 verringert den transepithelialen Widerstand (Furuse et al. 2001), indem es parazelluläre Kanäle für kleine Kationen ausbildet (Amasheh et al. 2002). In diesem Kontext wird es meist in lecken proximalen Segmenten röhrenförmiger Epithelien wie dem proximalen Tubulus der Niere (Kiuchi-Saishin et al. 2002) und dem Dünndarm (Markov et al. 2007) exprimiert. Claudin-6 gilt als embryonaltypisches Claudin, dessen Überexpression zu einer erhöhten Wasserpermeabilität führt (Turksen and Troy 2002). Abhängig von der Spleißvariante konnte Claudin-10 als porenbildendes Claudin für die Selektion von Anionen (Van

Itallie and Anderson 2006) oder Kationen (Günzel et al. 2009) beschrieben werden. Zudem können Claudine auch durch Interaktionen untereinander die Barrierefunktion verändern. So konnte gezeigt werden, dass in einem System, in dem viel Claudin-2 exprimiert wird, die durch Claudin-2 induzierte Kationen-Selektivität durch Claudin-3 reduziert wird (Milatz et al. 2010).

1.2.1.3.a. Claudin-2

Eines von bisher >24 detektierten Claudinen ist das Claudin-2 mit einer Größe von 22-23 kDa. Es ist vorzugsweise in sehr durchlässigen Geweben wie der Leber, der Niere und dem Ileum lokalisiert (Furuse et al. 1998) (Rahner et al. 2001). Durch Immunregulatoren ist Claudin-2 in die Regulation der intestinalen Barrierefunktion involviert (Kinugasa et al. 2000). Im Kolon wird Claudin-2 hauptsächlich in den undifferenzierten Kryptenzellen exprimiert und nimmt zu den differenzierten Villi hin immer weiter ab. Ähnliche Beobachtungen sind auch in Caco-2-Zellen gemacht worden, wo Claudin-2 im ausdifferenzierten Zustand der Zellen gänzlich verschwindet, so dass man annimmt, das Claudin-2 differenzierungsabhängig exprimiert wird (Escaffit et al. 2005). Es bestimmt die Widerstandseigenschaften in einschichtigen Zellverbänden (Furuse et al. 2001) und induziert negative Effekte auf die „Dichte“ der Tight Junction durch eine Änderung der Kationen-Selektivität (Amasheh et al. 2002). Außerdem konnte für Claudin-2 vor kurzer Zeit die Funktion eines Kanal für Wasser nachgewiesen werden (Rosenthal et al. 2010).

Abb. 1.6 Promotorregion des humanen Claudin 2
Dargestellt ist die humane Promotorregion von Claudin-2 mit den Konsensussequenzen für verschiedene Transkriptionsfaktoren (grau). Zudem sind der Transkriptionsstart (TS) und der Translationsstart (TL) angegeben (nach Sakaguchi et al. 2002 und Mankertz et al. 2003)

Die Regulation der Claudin-2-Expression erfolgt über verschiedene Transkriptionsfaktoren, deren spezifische Bindestellen im Claudin-2-Promotor lokalisiert sind (Abb. 1.6).

Der Einfluss auf die Claudin-2-Expression der jeweiligen Transkriptionsfaktoren kann je nach Gewebe unterschiedlich sein (Tab. 1.1). So konnte HNF-1α eine Schlüsselrolle in der Aktivierung der Claudin-2-Expression in den Villi des Ileums und in der Leber zugesprochen werden, aber nicht in der Niere (Sakaguchi et al. 2002).

Tab. 2.1 Transkriptionsfaktoren die maßgeblich an der Claudin-2-Regulation beteiligt sind
Aufgelistet sind die bisher bekannten Transkriptionsfaktoren, die entsprechende Bindestellen im Claudin-2-Promoter aufweisen. Aufgelistet ist weiterhin die Funktion für den entsprechend untersuchten Organismus.

Transkriptionsfaktor	Organismus	Funktion	Quelle
HNF-1α	Maus	Aktivator in den Villi des Ileums und in der Leber, aber nicht in der Niere ➔ Organspez. Regulation	*Takanori et al 2002, Escaffit et al 2005*
	Human	Steigert Cdx-2 aber nicht Cdx-1 induzierte Aktivierung	
GATA-4	Caco-2	Aktivator bei undifferenzierten Zellen	*Escaffit et al 2005*
	Human	Aktivator im Dünndarm ➔ Fehlen in den Krypten des Colons	
Cdx1	Human Caco-2	Aktivator im Intestinum Aktivator	*Takanori et al 2002*
Cdx2	Human Caco-2	Aktivator im Intestinum Aktivator	*Takanori et al 2002, Escaffit et al 2005*
LEF	C57	Aktivator über Wnt-Signalweg	*Mankertz et al 2003*
TCF-4/β-Catenin	C57	Aktivator	*Mankertz et al 2003*
NF-κB	Caco-2	leichter Aktivator	*Takanori et al 2002*
AP-1	Caco-2	leichter Aktivator	*Takanori et al 2002*

Sowohl Cdx1 und Cdx2 induzieren die Aktivierung des Claudin-2-Promotors im humanen intestinalen Gewebe und in der Zelllinie Caco-2 (Sakaguchi et al. 2002). In der Wnt-exprimierenden Zelllinie C57 ist die Claudin-2-Expression zusätzlich über LEF-1 und den TCF/ß-Catenin-Komplex reguliert. Der Wnt-Signalweg steht wiederum in Interaktion mit der Cdx aktivierten Claudin-2-Expression (Mankertz et al. 2004).

Im Gegensatz dazu konnte den Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1 nur eine untergeordnete Rolle für die Claudin-2-Regulation zugeschrieben werden (Sakaguchi et al. 2002), obwohl das proinflammatorische Zytokin TNF-α, welches NF-κB induziert, für eine verstärkte Expression von Claudin-2 verantwortlich ist. Diese TNF-

α-induzierte Claudin-2-Expression wird allerdings über die Phosphatidylinositol-3 (PI3)-Kinase-Signaltransduktionskaskade reguliert (Mankertz et al. 2009). Während TNF-α eine Schlüsselrolle bei Morbus Crohn zugesprochen werden konnte, kommt dem proinflammatorischen Interleukin-13 bei Colitis ulcerosa eine solche Schlüsselrolle zu. Auch Interleukin-13 sorgt für eine Induktion der Claudin-2-Expression (Heller et al. 2005), auch wenn der Mechanismus in diesem Fall bisher ungeklärt ist.

1.3 Kurzkettige Fettsäuren (SCFA, Short chain fatty acids)

Bei kurzkettigen Fettsäuren (SCFA *engl. short chain fatty acids*) handelt es sich um flüchtige, organische Monokarbonsäuren, welche zum größten Teil Anionen sind und aus einer Kette von 1-6 C-Atomen bestehen (Bugaut 1987). Sie werden durch bakterielle Fermentation von nicht hydrolysierbaren, komplexen Kohlenhydraten, Polysacchariden, Oligosacchariden, Proteinen oder Peptiden im Kolon monogastrischer Säuger produziert (Miller and Wolin 1979; Cummings 1983; Cummings and Macfarlane 1991; Wolin 1981; Topping and Clifton 2001). Kohlenhydrate stellen dabei die wichtigste Substrat-Quelle für die Produktion von SCFAs dar (Macfarlane and Macfarlane 2003) und werden größtenteils im proximalen Kolon von saccharolytischen Bakterien zu SCFAs, H_2 und CO_2 fermentiert (Macfarlane and Macfarlane 2003; Roberfroid 2005), während Proteine und Aminosäuren von proteolytischen Bakterien zusätzlich in CH_4, Phenole und Amine umgesetzt werden (Roberfroid 2005). Im humanen System findet diese Fermentation überwiegend im Kolon statt, während sich die SCFA-Bildung bei Wiederkäuern zusätzlich im Pansen (Rind, Schaf) sowie im Blinddarm (Kaninchen, Pferd) ereignet. Mit einer Gesamtmenge von 1×10^{11} Zellen pro 1 g Feuchtmasse in den Faeces sind anaerobe Bakterien der Darmflora für diese Prozesse unerlässlich (Wolin 1981). Zu den häufig vorkommenden Faecesbakterien zählen u.a. Vertreter der Gattungen *Bacteroides, Bifidobacterium, Clostridium, Escherichia, Eubacterium, Lactobacillus, Peptococcus, Propionibacterium* und *Streptococcus*. Zu den für das Kolon bedeutendsten kurzkettigen Fettsäuren gehören Essigsäure (Acetat), Propionsäure (Propionat) und Buttersäure (Butyrat) (Abb. 1.7).

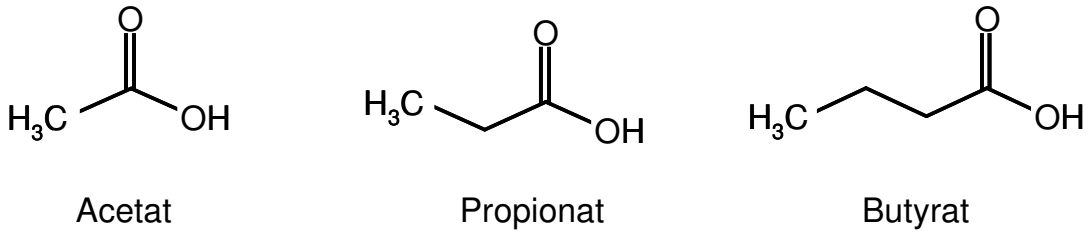


Abb. 1.7 Essentielle kurzkettige Fettsäuren für das intestinale Epithel
Durch bakterielle Fermentation entstehen kurzkettige Fettsäuren wie Acetat Propionat und Butyrat, die sich durch eine kurze Kohlenstoffkette und eine Mono-Carboxylgruppe auszeichnen

Genaue Konzentrationsangaben sind schwierig, da die Aufnahme von SCFAs sehr schnell erfolgt. Außerdem sind sie stark von der Zusammensetzung der Kohlenstoffquelle abhängig. Die Konzentrationsangaben variieren somit von 70 - 140 mM im proximalen Kolon (Cook and Sellin 1998; Topping and Clifton 2001; Roberfroid 2005) bis auf 20 – 70 mM fallend im distalen Kolon (Topping and Clifton 2001). Das Konzentrationsverhältnis der 3 Hauptfettsäuren kann auch je nach Kohlenstoffquelle variieren, liegt aber ungefähr in einem Verhältnis von 3:1:1 vor: Acetat (60-75%), Propionat (15-25%) und Butyrat (10-15%) (Hungate et al. 1959; Wolin 1981; Charney et al. 1998).

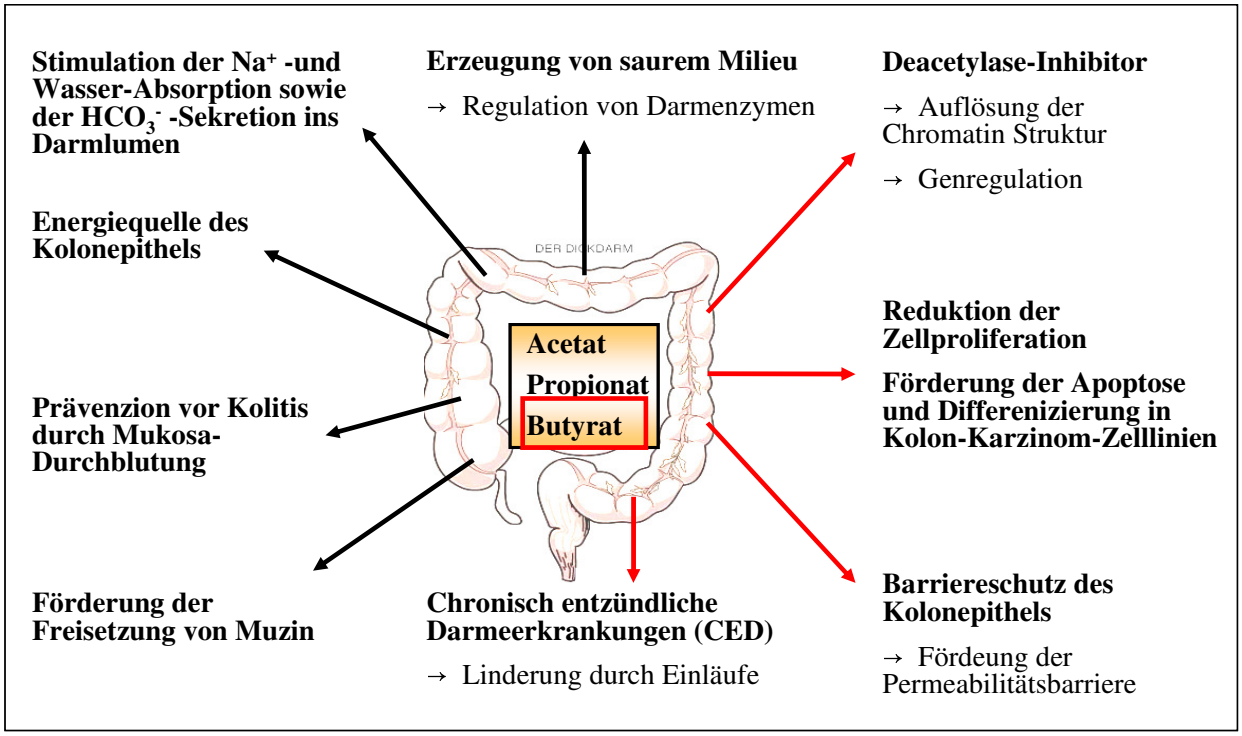


Abb. 1.8 Physiologische Bedeutung von SCFAs für das Kolonepithel (schwarze Pfeile), mit besonderem Augenmerk auf Butyrat (rote Pfeile)

$SCFA^-$ gehören neben Chlorid und Bikarbonat zu den Hauptquellen an Anionen im Lumen des menschlichen Kolons und haben großen Einfluss auf das Kolonepithel, in Form der Aufrechterhaltung des sauren Milieus und in der Mukusbildung als Schutz vor Pathogenen, als Energiequelle für Kolonozyten oder im Stofftransport (Abb. 1.8) (Cummings et al. 1987; Gamet et al. 1992; McIntyre et al. 1993; Scheppach et al. 1995). Besonders interessant und erforscht ist dabei Butyrat, auf das in späteren Kapiteln genauer eingegangen wird.

1.3.1 Transport von SCFA

SCFA, insbesondere Butyrat, werden schnell und fast vollständig aus dem Darm des Menschen resorbiert und durch Oxidation metabolisiert, so dass sie zur Versorgung der Kolonozyten beitragen (Cummings and Englyst 1987). *In vivo* werden bei diesem Prozess sowohl die Na^+ als auch die HCO_3^- Sekretion stimuliert. Es gibt verschiedene Mechanismen der SCAF-Resorption (Abb. 1.9). Obwohl ein deutlicher Gradient vom Lumen zur serosalen Seite auszumachen ist, gibt es nur eine minimale parazelluläre Diffusion von SCAF. Der transzelluläre Transport erfolgt über spezifische Transporter, die Protonen liefern, welche die SCFA Aufnahme stimulieren. Im proximalen Kolon wird die SCFA Absorption durch die Stimulation des apikalen NA^+/H^+-Austauschs und durch die elektroneutrale Na^+-Resorption erhöht (Sellin and DeSoignie 1990). Die Inhibition des Na^+/H^+-Austauschers (NHE) durch Amilorid oder Theophyllin bewirkt eine Verminderung der Resorption von SCFA. Im distalen Kolon gibt es die gleiche Korrelation zwischen der Aktivität der K^+H^+-ATPase und der SCFA-Resorption (von Engelhardt et al. 1994). Auch der physiologische pH-Gradient entlang der Mukosa treibt die SCFA-Resorption an. Die pKa-Werte der kurzkettigen Fettsäuren liegen unter 4,8, so dass sie bei den physiologischen pH-Werten im Kolon (pH 6,0 – 7,5) bis zu 99% in ihrer anionischen Form vorkommen (Rechkemmer and von Engelhardt 1988; Mortensen und Clausen 1996). Die rasche Resorption der im Lumen befindlichen SCFA wird durch das saure Mikroklima der Epithelzellen begünstigt, gilt aber für Butyrat als eher unabhängig vom luminalen pH-Wert (Rechkemmer and von Engelhardt 1988). Dieses Mikroklima trägt zur Bildung der ungeladenen, protonierten SCFA (SCFAH) bei, welche die Zellmembran durch passive Diffusion schnell durchdringen können. Auch der Austausch von $SCAF^-$ gegen Bicarbonat ist denkbar, da parallel zur SCFA-

Resorption eine Bikarbonat-Sekretion stattfindet (Argenzio et al. 1975; Argenzio and Whipp 1979; Ruppin et al. 1980).

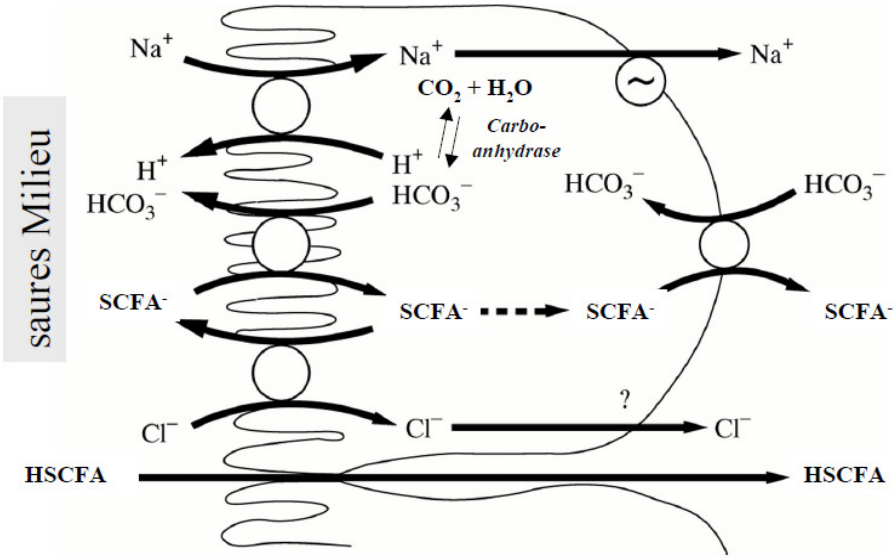


Abb. 1.9 Modell des SCFA-Durchtritts durch die apikale Membran
Verschiedene Wege der SCFA-Aufnahme, z.B. durch einen Anionen-Austauscher mit gleichzeitiger Ausfuhr von HCO_3^- in das Lumen; oder durch Diffusion, in der geladene SCFAs abhängig vom Transporter passieren. Ein weiteres Modell vermittelt die Regulation über Protonen-Sekretoren [Na^+/H^+-Austauscher (NHE)] oder Veränderungen im luminalen pH-Wert. Beide Modelle weisen auf einen erniedrigten pH-Wert und eine Anhäufung von ionisierten SCFAs in der Zelle hin. (modifiziert nach Sandle et al., 1998)

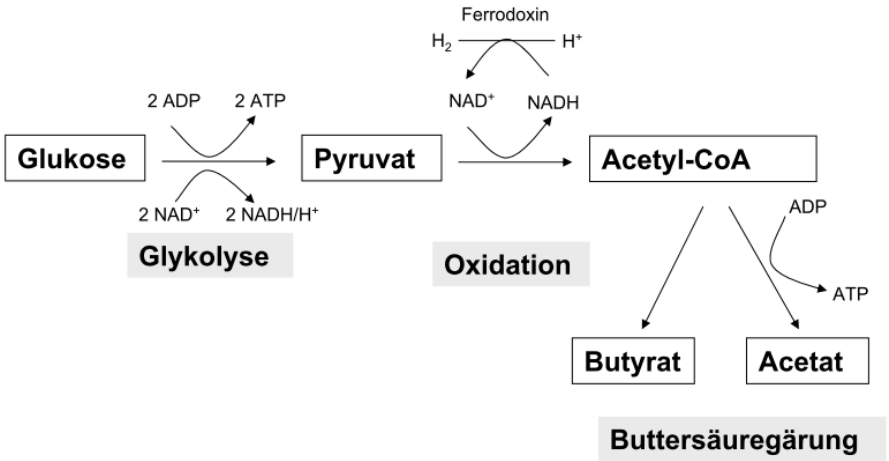
Ein $SCFA^-/HCO_3^-$-Austauscher wurde beispielsweise als Haupttransportweg der SCFA im proximalen Kolon des Meerschweinchens (von Engelhardt et al. 1994), in apikalen (Mascolo et al. 1991) und basolateralen (Reynolds et al. 1993) Vesikeln des Ratten Kolons und in luminalen Vesikeln des menschlichen Kolons (Harig et al. 1996; Ritzhaupt et al. 1998) und des Schweinekolons (Ritzhaupt et al. 1998) ausgemacht. Der Transport der SCFA ist elektroneutral und hat somit keinen Einfluss auf das transepitheliale Potential (Jackson 1974; von Engelhardt et al. 1994; Gonda et al. 1999). Des Weiteren wird mit Hilfe der zytoplasmatischen Carboanhydrase aus CO_2, das beim $SCFA^-$-Metabolismus entsteht, HCO_3^- gebildet. Ein nach extrazellulär gerichteter Gradient für HCO_3^- vermittelt den elektroneutralen Antiport von Cl^- durch einen HCO_3^-/Cl^--Antiporter, welcher durch Stilbene (z.B. DIDS) hemmbar ist (Kottgen et al. 1994).

Während Butyrat zu einem großen Teil direkt in der Kolonzelle metabolisiert wird, wird der Anteil an SCFAs, der von den Kolonozyten nicht verstoffwechselt wird, vermutlich mittels eines $SCFA^-/HCO_3^-$-Austauschers über die basolaterale Membran ins Blut abgegeben (Reynolds et al. 1993; Stein et al. 1995). Die SCFAs gelangen

über die Portalvene zur Leber, wo Butyrat als ketoplastisches Substrat und Propionat für die Gluconeogenese verwendet wird. Acetat spielt eine zentrale Rolle bei der Fettsäuresynthese und wird in Leber-, Fett- und Muskelgewebe transportiert, wo es über den Citratzyklus abgebaut wird (Bugaut 1987; Cummings et al. 1987; Bugaut and Bentejac 1993; Stein et al. 1995).

1.3.2 Butyrat

Butyrat entsteht durch Fermentation, welche auch als Buttersäuregärung bekannt ist, und wird unter Verwertung von Kohlenhydraten und Ballaststoffen im Lumen des Kolons zumeist durch verschiedene Bakterien der Gattung *Clostridien* produziert. Vor der eigentlichen Buttersäuregärung werden die Kohlenhydrate über die Glykolyse und das daraus entstehende Pyruvat über eine anschließende Oxidation metabolisiert. Erst das daraus entstehende Acetyl-CoA wird über die Buttersäuregärung zu Butyrat und Acetat verwertet (Abb. 1.10). Bei diesen Prozessen wird Energie in Form von ATP freigesetzt (Abb. 1.10). Dabei hat Butyrat einen großen Einfluss auf verschiedene physiologische Prozesse im Darm (Abb. 1.8).



Glucose + 3 ADP + 3 P_i → Butyrat + 2 CO_2 + 3 ATP

Abb. 1.10 Buttersäuregärung
Stark vereinfachte Darstellung der Buttersäuregärung, mit der entsprechenden Energiebilanz und den darin involvierten Stoffwechselprozessen, wie Glykolyse, Oxidation und der eigentlichen Buttersäuregärung

Butyrat hat beispielsweise eine große Bedeutung als Energiequelle für die Epithelzellen des Darms (Roediger 1980) und hat durch seine regulatorischen Eigenschaften großen Einfluss auf Proliferations-, Differenzierungs- und Apoptose-Prozesse, sowie auf die Maturation im Intestinaltrakt (Augenlicht et al. 2002). Während die Zellproliferation *in vitro* inhibiert wird, wird die Differenzierung und Apoptose in vielen Zelllinien wie z.B. bei Kolonkarzinom-Zellen induziert (Hague and Paraskeva 1995; Csordas 1996; Litvak et al. 1998; Siavoshian et al. 2000)
Kurzkettige Fettsäuren wie Butyrat sind essentiell für den Darm und haben auf verschiedene Weise einen starken Nutzen für die Darmschleimhaut (Abb. 1.8) (Velazquez et al. 1996; Velazquez et al. 1997; Hague et al. 1996; Hodin 2000).

1.3.2.1 Genregulatorische Eigenschaften von Butyrat

Der Einfluss von Butyrat auf Prozesse der Proliferation, Differenzierung und Apoptose basiert zum Teil auf der Genregulation spezifischer Gene, die maßgeblich an diesen Prozessen beteiligt sind. Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass Butyrat solche Gene reguliert (Hague and Paraskeva 1995; Csordas 1996; Siavoshian et al. 2000). Von 19 400 im Microarray getesteten Genen der Zelllinie HT-29 konnte für 1983 Gene eine veränderte Expression unter Butyrat nachgewiesen werden. Das sind 10,2%, von denen 4,1% hochreguliert und 6,1% herunterreguliert werden (Daly and Shirazi-Beechey 2006). Häufig geht diese Regulation auf die Inhibition von Histon-Deacetylasen (HDAC) zurück. HDACs katalysieren die Entfernung von Acetat, das an die Lysinreste der N-terminalen Region der Kern-Histone H2A, H2B, H3 und H4 gebunden ist. Jedes dieser Kern-Histone besteht aus einer N-terminalen Domäne, einer zentralen Histon-Falte und einem C-terminalen Ende (Luger et al. 1997) Die Kern-Histone bilden ein Oktamer, um das sich jeweils 146 bp der DNA wickeln. Histonacetylierung spielt eine große Rolle für die Chromatinstruktur und -funktion (Pogo et al. 1966), so lockert die Acetylierung der Histon-Enden die höher geordnete Faltung des Chromatins auf (Garcia-Ramirez et al. 1995) und ist somit leichter zugänglich für Transkriptionsfaktoren. Bei einer Deacetylierung bekommt das Lysin eine positive elektrische Ladung, so dass die Affinität des Histon-Endes für das negativ geladene Phophat-Gerüst der DNA erhöht ist. DNA-Abschnitte sind dann für Transkriptionsfaktoren blockiert, was zur Folge hat, dass die Transkription betroffener Gene runterreguliert ist.

Neben Butyrat fungiert auch Trichostatin A (TSA) als bekannter Histon-Deacetylase-Inhibitor (HDACi) für HDACs der Klasse I und II. Während bekannt ist, dass die fetthaltige Kette von TSA den hydrophoben Spalt der HDACs belegt und die HDACs auf diese Weise inhibiert, wird Butyrat im Gegensatz dazu als nicht-kompetetiver Inhibitor eingestuft, welcher nicht mit der Substrat-Bindestelle der HDACs interagiert (Cousens et al. 1979). Durch seine Funktion als HDACi verursacht Butyrat in verschiedenen Zelllinien, wie z.B. bei HeLa- (Boffa et al. 1978), Caco-2- (Fusunyan et al. 1999; Nishimura et al. 1998; Mariadason et al. 2001) oder HT-29-Zellen (Wu et al. 2001), eine globale Hyperacetylierung der Histone H3 und H4. Zusätzlich kann Butyrat auch die Modifikation von Chromatin durch Inhibition von H1 und H2 induzieren (Boffa et al. 1981; Kruh 1982), die durch eine erhöhte Phosphorylierung von H3 (Whitlock et al. 1983), eine globale Histonmethylierung (Boffa et al. 1981) und Hypermethylierung von Cystein-Resten in der DNA bewirkt wird (Boffa et al. 1981). Neuere Studien zeigen, dass der Einfluss von Butyrat auch zu einer Deacetylierung bestimmter Gene führen kann. Speziell handelt es sich dabei um Gene, die einer verminderten Transkription durch Butyrat unterliegen (Rada-Iglesias et al. 2007). Der Mechanismus ist allerdings bisher unbekannt.

1.3.2.2 Butyrat und sein Einfluss auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Butyrat hat zunehmend an Bedeutung im Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Krankheiten wie Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn gewonnen. Es konnte gezeigt werden, dass Kolonozyten von inaktiven bis aktiv erkrankten UC Individuen eine reduzierte Butyrat Oxidation aufwiesen (Roediger 1980). SCFA-Einläufe, besonders mit Butyrat, sind in diesem Fall eine mögliche Behandlung der entzündlichen Erkrankung. In Biopsien des Kolons von Patienten mit UC konnte eine Ausbreitung von proliferierenden Zellbereichen entlang der Krypten-Oberflächen-Achse gezeigt werden, die abhängig vom Grad der Entzündung ist (Biasco et al. 1990). Nach 2-wöchiger Behandlung mit Butyrat-Einläufen konnte diese Proliferationszone im oberen Teil der Krypten so stark minimiert werden, dass sie vergleichbar zu nicht erkrankten Kontrollen war (Scheppach et al. 1992).

Zu einem Schlüsselfaktor für CED zählt der Transkriptionsfaktor NF-κB, welcher durch TNF-α, Lipopolysaccharide oder IL-1 aktiviert wird (Schutze et al. 1992; Cogswell et al. 2003). Er ist Regulator bei der Synthese von Entzündungsmediatoren

während der Immunantwort und weist im entzündeten Gewebe eine verstärkte Aktivität auf. Diese lässt sich unter anderem dadurch erklären, dass NF-κB in der Lage ist, die Expression von Zielgenen, welche die Zellproliferation und Apoptose beeinflussen, zu regulieren. NF-κB-Knockout-Mäuse zeigten eine erhöhte Proliferationsrate im Kolonepithel, die mit der vermehrten Expression des Proliferations-fördernden Zytokins TNF-α in Zusammenhang gebracht wird (Inan et al. 2000). Dabei scheint Butyrat in der Lage zu sein, diesen TNF-α-induzierten Effekt zu inhibieren (Inan et al. 2000). In einem *in vitro* Vollblut-Modell wurde die Zytokin-Ausschüttung mittels LPS und PHA induziert. Die stimulierte Ausschüttung von TNF-α, IFN-γ und IL-12 konnte durch Butyrat reduziert werden. Schon bei niedrigen Butyrat-Konzentrationen konnte eine Verminderung der stimulierten Zytokine IL-5, IL-10 und IL-13 detektiert werden. Die Induktion von IFN-γ, IL-12, IL-5 und IL-13 konnte sogar ganz aufgehoben werden (Nancey et al. 2002). Das ist insofern interessant, da IL-13 als Schlüssel-Zytokin für die Colitis ulcerosa gilt.

2 ZIELSETZUNG

Die durch bakterielle Fermentation produzierte kurzkettige Fettsäure Butyrat spielt als wichtigster Energielieferant des Kolons und Regulator von Genen, die in wichtige Zellprozesse wie Differenzierung, Proliferation und Apoptose involviert sind, eine wesentliche Rolle in der Darmfunktion. Butyrat konnten zudem mehrfach positive Effekte in der Behandlung der Inflammation bei Patienten mit Colitis ulcerosa zugeschrieben worden. Das Ziel dieser Arbeit ist es, anhand der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29/B6-GR/MR, die dem nativen Darm physiologisch sehr ähnlich ist, herauszufinden, inwieweit Butyrat einen positiven Einfluss auf die epitheliale Barriere im Darm ausüben kann und welche Mechanismen in diese Prozesse eingebunden sind.

Mittels elektrophysiologischer Experimente sollte zunächst geklärt werden, welchen Einfluss Butyrat auf die epitheliale Barriere von HT-29/B6-GR/MR-Zellen ausübt und zwar auf den transepithelialen Widerstand (R^t), den parazellulären Widerstand (R^{para}) und schließlich die Na^+- und Cl^--Permeabilität. Anschließend wurden diese elektrophysiologischen Ergebnisse in Hinblick auf Veränderungen innerhalb der Tight Junction (TJ) überprüft. Dafür sollten Veränderungen von barriererelevanten TJ-Molekülen auf Protein- und mRNA-Ebene unter dem Einfluss von Butyrat charakterisiert werden. Da Barriereeffekte auch durch eine Umverteilung von TJ-Molekülen innerhalb der Zelle induziert sein können, musste auch überprüft werden, inwieweit Butyrat Einfluss auf die Lokalisation selbiger in der Zelle hat. Es ist bekannt, dass Butyrat als Histon-Deacetylase-Inhibitor (HDACi) fungiert und auf diesem Wege eine Vielzahl von Genen reguliert. Um die genregulatorischen Mechanismen zu charakterisieren, die hinter der Expressions-bedingten Veränderung von TJ-Molekülen durch Butyrat stecken, wurden für Claudin-2 Bindeaffinitätsstudien durchgeführt.

Abschließend sollte die Relevanz dieser Ergebnisse für Colitis ulcerosa-Patienten an Biopsieproben von Patienten mit Diversionscolitis überprüft werden, indem auch hier der Einfluss von Butyrat auf den Widerstand und auf die Claudin-2-Expression untersucht wurde.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Geräte

Agarosegel-Elektrophorese-Kammer	Biorad, München
Begasungsbrutschrank, B5060 EC / CO_2	Heraeus, Hanau
Calculator GeneQuant II	Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA
β-Counter: Tri-Carb2100TR	Packard, Meridan, CT, USA
Crosslinker (UVC 500)	Hoefer, Holliston,USA
GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer, Weiterstadt
Heizblock	Grant, Berlin
Luminiszenzbild Analysator (LAS 1000)	Fuji, Japan
Magnetrührer: IKA-Combimag	Janke & Kunkel, IKA-Werk, Staufen
Mikroskope:	
Laser Scanning-Mikroskop: LSM 510 Meta	Zeiss, Jena
Lichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenz-Mikroskop BX 60	Olympus, Hamburg
Mini-Protean 3 Elektrophorese-System	Biorad, München
Platten-Luminometer: Centro LB 960	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Schüttelinkubator: Aerotron	Infors AG, Bottmingen, CH
Speed Vac Univapo 100 H	Uniequip, Martinsried
Stromversorgungsgerät: Power pac 300	Biorad, München
Taqman: 7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, US
Transilluminator (Quickstore)	Michael Schroeder Laborgeräte, Heidelb
Ussing-Kammer	Institut für Klinische Physiologie, Charité-CBF, Berlin
Vortex-Gerät	Pharmacia Biotech, Freiburg
Widerstandsmessgerät	Institut für Klinische Physiologie, Charité-CBF, Berlin
Wippe WT12	Biometra, Göttingen
Zentrifugen:	
Beckman AvantiJ25	Beckman, Palo Alto, CA, USA
Eppendorf 5414C	Eppendorf, Hamburg

3.2 Verbrauchsmaterialien

Biodyne® B 0,45 µm Transfermembran	Pall Mexico
Deckgläschen (∅ 10 mm)	Menzel, Braunschweig
Einmal-Spritzen (1 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Eppendorf-Gefäße	Eppendorf, Hamburg
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Gel Blotting Papier	Schleicher & Schuell, BioScience, Dasse
Glas-Vials	Perkin Elmer, Weiterstadt
Grainer-Röhrchen: 10 ml	Greiner, Frickenhausen
Injektionskanülen (Sterican)	B. Braun, Melsungen
Objektträger: Menzel Gläser	Menzel, Braunschweig
PCR Reaktionsgefäße 0,2 ml	Perkin Elmer, Weiterstadt
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Stabpipetten	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Sterilhilfen: Millex	Millipore, Eschborn
Transfer Membran: PVDF	Perkin Elmer Las, Rodgau - Jügesheim
Well-Platten:	
6-, 24-, 96-Well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht
Optische schwarze, halbe 96-Well-Platten	Perkin Elmer, Weiterstadt
Weiße 96-Well-Platten	Nunc, Wiesbaden
Zellkutlurgefäße:	
Millicell PCF, 12mm, Poren 3,0 µm	Millipore, Eschborn
Zellkulturflaschen 25 cm^2	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturflaschen 75 cm^2	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturschalen, ∅ 6 cm	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturschalen, ∅ 10 cm	Nunc, Wiesbaden
Zell-Schaber	Coster, Bodenheim

3.3 Substanzen und Chemikalien

Acrylamid-Bis (37,5:1 - 30% (w/v))	Serva, Heidelberg
Actinomycin D	Sigma Aldrich, München
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Albumin Standard	Pierce Perbio Science, Bonn
Aldosteron	Sigma Aldrich,München
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma Aldrich, München

Antibiotika:	
G-418	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Hygromycin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
BCA Protein Assay Reagenz A+B	Pierce Perbio Science, Bonn
Bromphenolblau	LKB-Produkter AB, Bromma, Schweden
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
BSA 100×	NEB, Frankfurt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Complete Mini EDTA-free	Roche, Mannheim
Cycloheximid	
3,4-Dihydroxybenzoesäure (DHBA)	Sigma Aldrich, München
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, München
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich, München
DNA-Marker:	
λ/HindIII	Invitrogen, Karlsruhe
100 bp	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Merck, Darmstadt
EGTA	Roth, Karlsruhe
Fötales Rinderserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Ethidiumbromid	Invitrogen, Karlsruhe
Flüssigstickstoff	Linde, Berlin
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Serva, Heidelberg
Isopropanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Fluka, Buchs SG, CH
Milchpulver: Sucotin	TSI, Zeven
Modified Eagles Medium (MEM)	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Natriumazid (N_3Na)	Sigma Aldrich, München
Natriumbutyrat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, München
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Merck, Darmstadt

Natronlauge	Merck, Darmstadt
Nonidet P-40	Euroclone, ero, Italien
Oligo-dT	Invitrogen, Karlsruhe
PIPES, pH 8,0	Merck, Darmstadt
Phosphatgepufferte saline Lösung (PBS)	PAA Laboratories, Cölbe
PBS-Tabletten	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Poly-L-Lysin (0,1%)	Sigma Aldrich, München
Protein A Agarose	Millipore (Upstate), Schwalbach
Protein Molecular Weight Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
ProTex Mount Flour	Biocyc, Luckenwalde
RNAse Inhibitor	Roche, Mannheim
RNAzol B	Wak-Chemie, Bad Soden
TaqMan Universal Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, CA, US
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMI	Sigma Aldrich, München
TAE-Puffer 50×	Invitrogen, Karlsruhe
TBE-Puffer 10x	Invitrogen, Karlsruhe
Template Supression Reagenz	Applied Biosystems, CA, USA
Trichostatin A	Sigma Aldrich, München
2,4,6-Trihydroxybenzoesäure (THBA)	Sigma Aldrich, München
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck, Darmstadt
Tris-HCl Buffer pH 8,8 (1 M)	Biorad, München
Tris-HCl Buffer pH 7,5 (1 M)	Gibco BRL, Paisley, Scotland
Tris-HCl Buffer pH 6,8 (0,5 M)	Biorad, München
Triton X-100	Boehringer, Mannheim
Trypsin-EDTA (1×)	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Tween-20	Sigma Aldrich, München
Wasser RNase frei	Fluka, Seelze
Ziegen-Serum	Sigma Aldrich, München

3.4 Enzyme

RNAse	Qiagen, Hilden
Proteinase K	

3.5 Antisera

Alexa Fluor 488 / 594 *anti*-Kaninchen-IgG-Antikörper aus der Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 488 / 594 *anti*-Maus-IgG-Antikörper aus der Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Claudin-1, -2, -3, -5, -7-Serum aus Kaninchen	Zymed, San Francisco, CA, USA
Anti-Claudin-4-IgG aus der Maus	Zymed, San Francisco, CA, USA
Anti-ZO-1-IgG aus der Maus	Zymed, San Francisco, CA, USA
Anti- acetyl-Histon 3 -IgG aus dem Kaninc	Becton Dickinson, Heidelberg
Normal rabbit IgG (sc-2027)	Santa Cruz Biotechnologies, CA; USA
Normal goat IgG (sc-2028)	Santa Cruz Biotechnologies, CA; USA
Anti-HNF-1α aus der Ziege (sc-6547)	Santa Cruz Biotechnologies, CA; USA
Anti-HNF-3β aus der Ziege (sc-6554)	Santa Cruz Biotechnologies, CA; USA
Anti-HNF-4α aus der Ziege (sc-6556)	Santa Cruz Biotechnologies, CA; USA
Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase aus dem Schaf (Lumi-Light^{Plus} Western Blotting Kit)	Roche, Mannheim
Anti-Maus-Ig-Peroxidase aus dem Schaf (Lumi-Light^{Plus} Western Blotting Kit)	Roche, Mannheim

3.6 Gebrauchsfertige Kits

Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Madison, USA
In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescir (TUNEL)	Roche, Mannheim
Lipofectamin Plus Transfektionskit	Invitrogen, Karlsruhe
Lumi-Light^{Plus} Western Blotting Kit	Roche, Mannheim
Omniscript Reaction Kit (200)	Qiagen, Hilden
Plasmid Midi Kit (E)	Qiagen, Hilden
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
Power SYBR® Green Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, CA, US
RC DC™ Protein Assay Kit	BIO-RAD, Hercules,CA, USA
High Capacity cDNA Reverse Transcriptio Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, US
TaqMan® Gene Expression Assay	Applied Biosystems, Foster City, CA, US
Nuclear Extraction Kit	Panomics, Fermont, CA, USA
EMSA “Gel Shift” Kit	Pierce

3.7 Primer

Primer	Sequenz 5'-3'
ChIP	
HumCLDN02FOR10	*CAGAGGGTCTTGTAGAGAAT*
HumCLDN02REV09	*GGCTTTGCATGAGGCAGGT*
Hum Cldn2 FOR SP1	*CAAAGGTCAAAAGGCATCCA*
Hum Cldn2 REV SP1	*CAGCCTCAAGAAGGCATCTA*
EMSA	
GATA FOR 3`bio	*GTTATTTCTAAAGATAACAAAGGTC*
GATA REV	*GACCTTTGTTATCTTTAGAAATAAC*
AP-1 FOR 3`bio	*CCAAAGCATTGACTCAGATACCTGC*
AP-1 REV	*GCAGGTATCTGAGTCAATGCTTTGG*
NF-κB FOR 3`bio	*ATGGCCCAGGGAATTTCAGGGCCC*
NF-κB REV	*GGGGCCCTGAAATTCCCTGGGCCAT*
Cdx1 FOR 3`bio	*TTTAATCTGGTTTATGGATTTTTT*
Cdx1 REV	*AAAAAATCCATAAACCAGATTAAA*
Cdx2 FOR 3`bio	*ATGGATTTTTTTTAGGTCTTCTAG*
Cdx2 REV	*CTAGAAGACCTAAAAAAAATCCAT*
HNFs FOR 3`bio	*CTTCTGGTCAATATTTAATCTGGTT*
HNFs REV	*AACCAGATTAAATATTGACCAGAAG*
HNF mut FOR 3´bio	*CTTCTGGCGAAGTCATATCCTGGTT*
HNF mut REV	*AACCAGGATATGACTTCGCCAGAAG*

3.8 Puffer und Lösungen

3.8.1 Ussing-Kammer

3.8.1.1 Ringerlösung (#111)

NaCl	113,6 mM
KCl	5,4 mM
$NaHCO_3$	21 mM
$MgCl_2$	1,2 mM
$CaCl_2$	1,2 mM
NaH_2PO_4	0,6 mM
Na_2HPO_4	2,4 mM
D(+)-Glukose	10 mM
D(+)-Mannose	10 mM
L-Glutamin	2,4 mM
β-Hydroxybutyrat	0,5 mM
Piperacillin	50 mg/l
Imipenem	4 mg/l

3.8.2 Proteinlysepuffer

3.8.2.1 Gesamtlysepuffer:

Tris HCl pH 7,5	10 mM
NaCl	150 mM
SDS	0,1%
Triton X-100	0,5%

3.8.2.2 RIPA-Puffer:

HEPES pH 7,6	25 mM
EDTA	2 mM
NaF	25 mM
SDS	1%

3.8.3 Western Blot

3.8.3.1 Elektrophorese-Puffer

Tris HCl	25 mM
Glycin	190 mM
SDS	0,1%

3.8.3.2 5x Lämmli-Proben-Puffer

Tris pH 6,8	300 mM
DTT	500 mM
SDS	10%
Glycerol	50%

3.8.3.3 Transferpuffer

Tris HCl	25 mM
Glycin	190 mM
Methanol	10%

3.8.3.4 PBS/T (1l)

PBS	2 Tbl.
Tween	1ml

3.8.3.5 1x TBS/T

Tris	20 mM
NaCl	500 mM
Tween	0,1%

3.8.3.6 BSA-Lösung in PBS/T

BSA	5%
N_3Na	0,02%

3.8.3.7 Blockingreagenz in TBS/T

Blockingreagenz	1%

3.8.3.8 Lumi-Light^{Plus} Reagenz

Lumi-Light^{Plus} Luminol/Enhancer Solution	50%
Lumi-Light^{Plus} Stable Peroxide Solution	50%

3.8.4 ChIP

3.8.4.1 Zell-Lyse-Puffer

PIPES, pH 8,0	5 mM
KCl	85 mM
Nonidet P-40	0,5%

3.8.4.2 Nuclei-Lyse-Puffer

TRIS-HCl, pH 8,1	50 mM
EDTA	10 mM
SDS	1%

3.8.4.3 ChIP-Dilutions-Puffer

Tris-HCl, pH 8,1	16,7 mM
NaCl	167 mM
EDTA	0,5 mM
Triton X-100	1,1%
SDS	0,01%

3.8.4.4 Low-Salt-Puffer

Tris-HCl, pH 8,1	1M
NaCl	150 mM
SDS	0,1
Triton X-100	1%
EDTA	2 mM

3.8.4.5 High-Salt-Puffer

Tris-HCl, pH 8,1	20 mM
NaCl	500 mM
SDS	0,1
Triton X-100	1%
EDTA	2 mM

3.8.4.6 LiCl-Wasch-Puffer

Tris-HCl, pH 8,1	1 M
NaCl	150 mM

SDS	0,1
Triton X-100	1%
EDTA	2 mM

3.8.4.7 TE-Puffer

Tris-HCl, pH 8,0	10 mM
EDTA	0,5 M

3.8.4.8 Elutions-Puffer (immer frisch angesetzt)

SDS	1%
$NaHCO_3$	1 M

3.8.4.9 PK-Puffer

Tris-HCl, pH 7,5	50 mM
EDTA	25 mM
SDS	1,25%

3.9 Zellbiologische Methoden

3.9.1 Kultivierung von humanen Zellen

3.9.1.1 Kultivierung von HT-29/B6-Zellen

Die Kultivierung der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29/B6 erfolgt bei 37 °C und 5% CO_2-Gehalt in Begasungs-Brutschränken in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm^2. Bei dem Medium für die Zellen handelt es sich um RPMI 1640 Medium, welches mit 10% fötalen Kälberserum (FKS) und den Antibiotika Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (0,1 mg/ml) versetzt wird und 3x wöchentlich gewechselt wurde. Das Umsetzen von konfluenten Zellen erfolgte 1x wöchentlich mit Hilfe einer 0,05%igen Trypsinlösung-EDTA zur enzymatischen Ablösung der Zellen.

Das Umsetzen einer kleinen Flasche ergab sich folgendermaßen:

- waschen mit 10 ml PBS ohne Mg^{2+}/Ca^{2+}
- Vortrypsinieren mit 3 ml Trypsinlösung-EDTA (ca. 2 min) zum Verwerfen beschädigter Zellen
- Trypsinieren mit 1 m Trypsinlösung-EDTA (ca. 20 min)
- Stoppen der enzymatischen Reaktion durch Zugabe von 10 ml RPMI Medium
- Vereinzelung der Zellen durch mehrmaliges Resuspendieren
- Zugabe von 1,5 ml der Zellsuspension in 5,5 ml Vollmedium in einer neuen Kulturflasche

Für Versuche wurde die Zellezahl mit Hilfe eine Neubauer Kammer bestimmt. Ein Eckquadrant entspricht 0,4 µl, so das die Zellzahl wie folgt bestimmt werden kann:
Zellzahl/ml = gezählte Zellen x 2500

3.9.1.2 Kultivierung des HT-29/B6-GR/MR Klons

Die Kultivierung des Klons HT-29/B6-GR/MR, der sowohl den Glucocorticoid-Rezeptor (GR) als auch den Mineralocorticoid-Rezeptor (MR) stabil transfiziert hat (Bergann et al 2011), erfolgte wie die Kultivierung der Zelllinie HT-29/B6. Das RPMI Medium 1640 (mit 10% FKS, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml

Streptomycin) wurde dabei zusätzlich mit den Antibiotika Hygromycin (200 ng/ml) und G-418 (200 ng/ml) versetzt, um die Selektion des Klons zu gewährleisten.

3.9.2 Zellkultivierung auf Filtern

Eine Woche alte, auf kleinen Flaschen ausgesäte HT-29/B6-GR/MR-Zellen wurden trypsiniert (s.o.) und 500 µl der Zellsuspension auf je einen PCF Filter (3 µm Millipore) ausgesät. Die Kultivierung erfolgte in 3-4 Filtern pro 6 cm^2 Kulturschale bei 37 °C und 5% CO_2-Gehalt in Begasungs-Brutschränken für eine Woche. Die Konfluenz wurde mittels Ermittlung des R^t bestimmt. Für alle weiteren Experimente wurden die Zellen im konfluenten Zustand anschließend mit 2 mM Butyrat behandelt oder blieben als Kontrollen unbehandelt.

3.9.3 Zellkultivierung auf Schalen

Zur ChIP-Analyse wurden je 4 ml der HT-29/B6-GR/MR Zellsuspension auf 10 cm^2 Kulturschalen ausgesät und über 2 Tage kultiviert. Anschließend erfolgte im subkonfluenten Zustand eine Applikation von 2 mM Butyrat.

3.10 Elektrophysiologische Messungen

3.10.1 Manuelle Messung des transepithelialen Widerstands

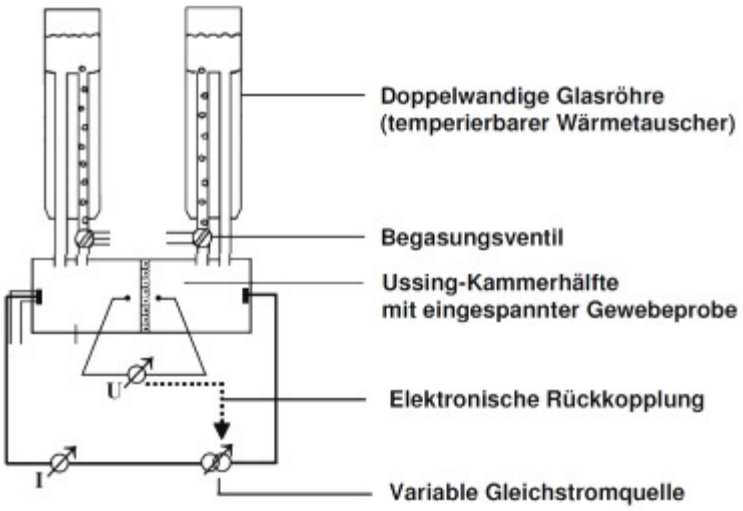
Der transepitheliale Widerstand (R^t) gibt Auskunft über die Barriereeigenschaften von Epithelien. Zur Kontrolle der Konfluenz eines Zelllayers auf PCF-Filtern ist es unerlässlich, den transepithelialen Widerstand regelmäßig zu ermitteln. Außerdem gibt er Aufschluss darüber, inwieweit sich die Barriereeigenschaften eines Monolayers im Zusammenhang mit der Zugabe von verschiedenen Agenzien verändert. Mit Hilfe von zwei fixierten Elektroden, die mit einem Widerstandsmessgerät verbunden sind, konnte der transepitheliale Widerstand von auf PCF-Filtern kultivierten Zellen erfasst werden (Kreusel et al. 1991). Dabei ergibt sich R^t aus dem durch Rechteckströme (± 10 µA, 21 Hz) hervorgerufenen Spannungsänderungen. Eine Korrektur erfolgte durch die Messung eines Leerfilters in Lösung. Um Messungenauigkeiten zu vermeiden, wurden Filterposition und Eintauchtiefe der Elektroden standardisiert und die Temperatur des Mediums durch eine Heizplatte konstant auf 37 °C gehalten.

Um die transepithelialen Widerstandsänderungen zu quantifizieren, wurden diese aufgrund der schwankenden absoluten Widerstandswerte der verschiedenen Zelllinien immer als „R^t in %“ angegeben und auf den Ausgangswiderstand als 100% normiert.

3.10.2 Die Ussing-Kammer

Bei der Ussing-Kammer handelt es sich um ein Messsystem für eine *in vitro* Technik, mit deren Hilfe verschiedene elektrophysiolgische Parameter aufgenommen werden können. Dabei können der aktive Ionentransport, die Leitfähigkeit und der Widerstand eines Zellkulturlayers oder Gewebes bestimmt werden (Ussing and Zerahn 1951), was wiederum Aufschluss über die Barriere- und Transportfunktion selbiger gibt.

Die Ussing-Kammer teilt sich in zwei Halbzellen, zwischen denen ein Epithel oder Zellkulturfilter abgedichtet eingespannt werden kann (Abb. 3.1). Jede Kammerhälfte wird mit 10 ml modifizierter Ringerlösung gefüllt, die mittels Wärmeaustauscher auf 37 °C konstant temperiert bleibt und ständig mit einer Gasmischung von 95% O_2 / 5% CO_2 begast wird. Das gewährleistet dabei auch die Zirkulation der Ringerlösung innerhalb der Ussing-Kammer und die konstante Einstellung eines pH-Wertes von 7,4.



3.1 Ussing-Versuchsstand
Das Epithel wird zwischen die beiden Kammerhälften eingespannt, während die Zirkulation der auf 37 °C temperierten Badlösung für eine konstante Umgebung sorgt. Die Registrierung der Potentialdifferenz und des Kurzschlussstroms erfolgt mit Hilfe zweier Elektrodenpaare (modifiziert nach: (Li et al. 2004))

Die Elektronenpaare bestehen hier aus Agarbrücken, deren Enden in 3 M KCl-Lösung eingeführt sind und die stromleitende Verbindungen bilden. Das andere Ende eines Elektronenpaares befindet sich direkt in der Nähe des eingespannten Epithels und dient zur Messung der Potentialdifferenz über dem Epithel. Durch das Voltmeter kann dann die Potentialdifferenz zwischen den Spannungselektroden gemessen werden. Das zweite Elektronenpaar hingegen befindet sich weiter abstehend vom Epithel und ist an eine variable Gleichstromquelle und ein Amperemeter angeschlossen. Durch den Rechteckgenerator erfolgte die Applikation des Stroms I, so dass sich die Potentialdifferenz U einstellt. Mit Hilfe des ohmschen Gesetzes (R = U/I) lies sich daraus unmittelbar der transepitheliale Widerstand (R^t) ermitteln. Der Quotient aus der gemessenen transepithelialen Spannung (U^e) und R^t ergibt dann auch den Kurzschlussstrom (I_{sc}).
Da die Badlösung zwischen Präparat und Elektroden selbst über einen Widerstand und den Spannungsabfall über dem Epithel beeinflusst, muss eine Korrektur der Messwerte vollzogen werden. Hierfür bedarf es einer Messung des Badwiderstandes und des Asymmetriepotentials der Spannungselektroden. Eine Registrierung der Leerwerte erfolgt durch vorherige Messung an der nur mit Ringerlösung gefüllten Messkammer und wird anschließend jeweils von den späteren Messwerten abgezogen.

3.10.3 Impedanzmessungen an humanen Patientenbiopsien

Im Falle der humanen Patientenbiopsien wurde leicht entzündetes Kolongewebe von CED-Patienten mit doppelläufigem Ileostoma mit einer daraus resultierenden Diversionscolitis verwendet. Durch den Biopsievorgang war das Gewebe bereits quasi „total gestrippt“, d.h. von Serosa und Muscularis propria befreit. Das Gewebe wurde dann auf Plastikringe geklebt und in entsprechende Container eingefügt. Die Container enthalten mittig ein Loch auf Höhe des Gewebes, um eine definierte Flächenexposition des Epithels für die R^t-Messungen zu garantieren. Anschließend wurde der Biopsie-Container zwischen die Halbzellen der Ussing-Kammer eingespannt. Nach analogem Einfüllen von 10 ml Ringerlösung (#111er) auf beiden Seiten der Ussing-Kammer bedurfte es einer Äquilibrierungszeit von 30 min. Anschließend wurde einigen Präparaten beidseitig entweder 3 nM Aldosteron (Kontrollproben) oder mit 3 nM Aldosteron kombiniert mit 1 mM Natrium-Butyrat zugeführt. Dabei wurde der Widerstandsverlauf von R^t für 8 h aufgenommen und

die jeweiligen Gewebeproben für spätere Analysen (mRNA-Isolierung) bei - 80 °C eingefroren und gelagert.

3.10.3.1 Impedanzspektroskopie

Man unterscheidet zwischen der Ein-Wege-Impedanz und der Zwei-Wege-Impendanz. Der transepitheliale Gesamtwiderstand (R^t, TER) von Zellmonolayern und Geweben setzt sich dabei aus zwei Komponenten zusammen, dem epithelialen Widerstand (R^{epi}), bestimmt durch den Zellmonolayer bzw. der Epithelzellschicht der Biopsie, und dem subepithelialen Widerstand (R^{sub}), bestimmt durch den Filter (bei Zellkulturen) bzw. dem subepithelialen Gewebe (bei Biopsien).

$$R^{epi} + R^{sub} = R^t$$

Bei der Ein-Wege-Impedanzspektroskopie liegt der Modellbildung dabei ein Schaltkreis von 3 verschiedenen Parametern zugrunde, bestehend aus R^{epi}, dem ein Kondensator parallel zugeschaltet ist, und dem R^{sub}, der in Reihe zu diesem RC-Element liegt (Abb. 3.2). Die Kapazität des Kondensators C resultiert dabei aus den Kapazitäten der apikalen und basolateralen Zellmembranen.

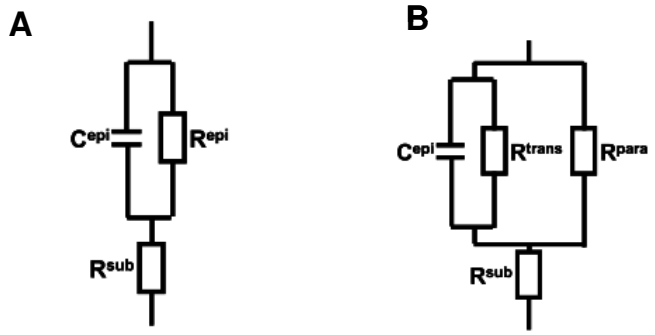


Abb. 3.2 Ersatzschaltkreis des epithelialen Zellmodells
A.) in der Ein-Wege-Impedanzspektroskopie und **B.)** in der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie

Nach Applikation von Wechselströmen unterschiedlicher Frequenzen, ergibt sich für eine Frequenz von 0 ein kapazitiver Blindwiderstand von unendlich, da der Strom durch die parallel geschalteten RC-Glieder und R^{sub} fließt und somit R^t gemessen werden kann. Im Gegensatz dazu tendiert der kapazitive Blindwiderstand für sehr hohe Frequenzen gegen 0, da der Strom über den Kondensator kurzgeschlossen

nur durch R^{sub} fließt, so dass der gemessene Widerstand dem Anteil R^{sub} von R^{t} entspricht.

Mit Hilfe des Nyquist-Diagrammes (Abb. 3.3) können die Impedanzwerte dargestellt werden, wobei die Imaginärteile der komplexen Impedanzen (Z_{im}), wiedergegeben durch die kapazitiven Eigenschaften des Epithels, auf der Ordinatenachse aufgetragen werden und die Realteile (Z_{re}), wiedergegeben durch die ohmschen Widerstandsanteile, auf der Abzissenachse.

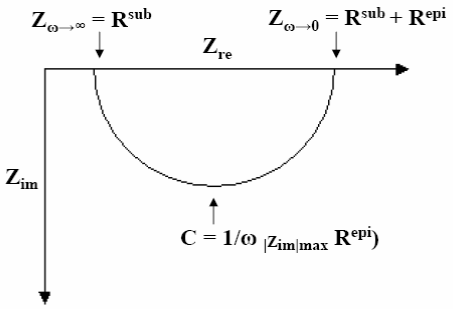


Abb. 3.3 Nyquist-Diagramm einer Modellmessung
Halbkreis der gemessenen Impedanzwerte bei verschiedenen Wechselstrom-Frequenzen. Bei hohen Frequenzen ($\omega \rightarrow \infty$) ergibt der Realteil Z_{re} den subepithelialen Widerstand R^{sub} und bei niedrigen Frequenzen ($\omega \rightarrow 0$) den transepithelialen Widerstand $R^{t} = R^{sup} + R^{epi}$. Die Kapazität C wird anhand der charakteristischen Frequenz des Kreisbogens (Kreisbogenminimum) berechnet

Mit Hilfe der Schnittpunkte des Halbkreises können bei niedrigen Frequenzen der Gesamtwiderstand und bei hohen Frequenzen der subepitheliale Widerstand abgelesen werden, während die Kapazität C über den Imaginärteil der Impedanz berechnet wird.

Bei der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie wird R^{epi} zusätzlich noch in den transzellulären Widerstand (R^{trans}) und den parazellulären Widerstand (R^{para}) des Epithels aufgeteilt, so dass sich die Zellmembraneigenschaften als Kondensator mit parallel geschaltetem R^{trans} darstellt, während parallel dazu wiederum R^{para} angegeben wird (Krug et al, 2009). Mittels Fluxmessungen des Markers Fluoreszein werden hierfür R^{para} und R^{trans} vor und nach Öffnung des parazellulären Weges durch den EGTA vermittelten Calcium-Entzug (Martinez-Palomo et al. 1980) bestimmt. Durch die Fluxverhältnisse vor und nach EGTA-Zugabe kann mit Hilfe der Impedanzmessungen R^{para}, was den Widerstand der Tight Junction darstellt, von R^{trans} unterschieden werden.

3.10.3.2 Methode der Impedanzmessung

Konfluent gewachsene Zellkulturfilter wurden in Ussing-Kammern gespannt, die durch gut abgeschirmte Elektroden auch bei hohen Messfrequenzen kaum Störpotentiale aufweisen (Gitter et al. 1997; Stockmann et al. 1999). Beide Kammerhälften wurde mit je 10 ml Standradringerlösung (in dieser Arbeit ohne Hydroxy-Butyrat) und mit Carbogen begast. Die Impedanzmessung wurde bei sinusförmigem Wechselstrom (35 µA/cm^2) mit Frequenzen von 1,3 Hz bis 16 kHz vorgenommen, während die transepithelialen Potentiale zwischen den eigentlichen Messungen auf 0 mV geklemmt wurden. Gemessen wurden die Spannungsänderungen mit einem phasensensitiven Verstärkersystem (Electrochemical Interface, Typ 1286; Frequency Response Analyser, Typ 1250, Fa. Schlumberger, Gräfelfing) gemessen und die Impedanzwerte (Z_{re}, Z_{im}) aufgezeichnet. Die Impedanzspektren wurden in 10-minütigem Abstand aufgenommen. Der Fluxmarker Fluoreszein wurde nach der ersten Messung apikal zugegeben und in bestimmten Zeitintervallen wurde dann jeweils eine Probe entnommen. Beidseitige Applikation Von 1,3 mM EGTA erfolgte nach der dritten Messung, was einen Widerstandsabfall initiierte. Alle 10 min erfolgte eine weitere Impedanzspektren-Messung.

3.10.4 Bestimmung von NaCl-Dilutionspotentialen

Mit Hilfe des Dilutionspotentials kann die partielle, parazelluläre Leitfähigkeit von Na^+ und Cl^- ermittelt werden. Dabei werden die NaCl-Ionen einer Ussing-Kammerhälfte durch Mannitol ersetzt, was einen osmotischen Ausgleich induziert, woraufhin sich über dem Epithel ein Diffusionspotential einstellt, das sogenannte Diltutionspotential (U_m).

Dabei lässt sich U_m durch die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung folgendermaßen berechnen:

$$U_m = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{P_{Na}\,[Na]^{ap} + P_{Cl}\,[Cl]^{bl}}{P_{Na}\,[Na]^{bl} + P_{Cl}\,[Cl]^{ap}}$$

U_m	Dilutionspotential
R	allgemeine Gaskonstante
T	absolute Temperatur
F	Faradaykonstante
P_{Na}/P_{Cl}	Permeabilitäten von Na^+ bzw Cl^-
$[Na]^{ap}$	apikale, *mucosale* Konzentration für Natrium bzw. Chlorid ($[Cl]^m$)
$[Na]^{bl}$	basale, *serosale* Konzentration für Natrium bzw. Chlorid ($[Cl]^s$)

Nach Umformung der Permeabilitätsgleichung berechnet sich die Leitfähigkeit für Na^+ (P_{Na}) und Cl^- (P_{Cl}) wie folgt:

$$\frac{P_{Na}}{P_{Cl}} = \frac{e^{\frac{U_m F}{R \cdot T}} \cdot [Cl]^{ap} - [Cl]^{bl}}{[Na]^{ap} - e^{\frac{U_m F}{R \cdot T}} \cdot [Na]^{bl}}$$

Durch Zugabe unterschiedlicher Badlösungen (unverdünnt und mit Mannitollösung verdünnt) in die Kammerhälften entsteht ein Potential an den Elektroden, das sich

durch die verschiedene Zusammensetzung beider Seiten einstellt. Dieses so genannte Elektrodenpotential muss dabei zunächst vom Messwert abgezogen werden, um das Dilutionspotential zu ermitteln.

$$\frac{P_{Na}}{P_{Cl}} = \frac{10^{\frac{\Delta E}{s}} \cdot a_{Cl\text{-}ap} - a_{Cl\text{-}bl}}{a_{Na\text{-}ap} - 10^{\frac{\Delta E}{s}} - a_{Na\text{-}bl}}$$

ΔE $\Delta E = E_{bl} - E_{ap}$, unter Berücksichtigung des Liquid Junction Potentials

$$s = 2{,}303 \cdot \frac{R \cdot T}{F}$$

$a_{Na\text{-}ap}$ apikale Ionenselektivität für Natrium, bzw Chlorid ($a_{Cl\text{-}ap}$)

$a_{Na\text{-}ap}$ basale Ionenselektivität für Natrium, bzw Chlorid ($a_{Cl\text{-}bl}$)

($a_{Na\text{-}ap}$ + $a_{Na\text{-}ap}$ berechnet über den modifizierten Debye-Hückel-Formalismus und Meier-Konstante von 1982)

Aus der relativen Permeabilität für Na^+ und der Gesamtleitfähigkeit des Epithels (G^t) kann dann die absolute Permeabilität für Na^+ (P_{Na}) berechnet werden. Dabei entspricht G^t dem Kehrwert des gemessenen transepithelialen Widerstands (R^t):

$$P_{Na} = \frac{R \cdot T}{F^2} \cdot \frac{G^t}{[NaCl]} \cdot \frac{1}{1 + P_{Na}/P_{Cl}} \cdot \frac{P_{Na}}{P_{Cl}}$$

$$P_{Cl} = \frac{R \cdot T}{F^2} \cdot \frac{G^t}{[NaCl]} \cdot \frac{1}{1 + P_{Na}/P_{Cl}}$$

Aufgrund der hohen Aktivität verschiedener Ionenkanäle der Zelle bei 37 °C, wurde die Messung der NaCl-Dilutionspotentiale bei 4 °C durchgeführt, um präferentiell die TJ zu analysieren. Die Befüllung der jeweiligen Kammerhälfte erfolgte durch 10 ml Ringerlösung. Nach der Äquilibrierung erfolgte entweder apikal oder basal der

Austausch von 5 ml Ringerlösung gegen 5 ml isotone NaCl-reduzierte Mannitol-Ringerlösung, wonach die Spannung und R^t bis zur Einstellung eines Potentialplateaus erfasst wurden.

3.11 Biochemische Methoden

3.11.1 Western Blot- Analysen

3.11.1.1 Gesamt-Proteinextraktion aus eukaryotischen Zellen

Mit der Gesamtlysat-Extraktion (für die anschließende Western Blot Analyse von Claudinen) oder RIPA-Puffer (für die anschließende Western Blot Analyse von ZO-1) werden sämtliche Proteine eines Zelllayers isoliert. In dieser Arbeit wurden verschiedene Zelllinien auf PCF Filtern ausgesät. Die Filter wurden 2 x mit PBS+ gewaschen. Anschließend wurde pro Filter ein Volumen von 200 µl Gesamtlysepuffer oder RIPA-Puffer (frisch Complete Mini/ EDTA free) auf die Zellen gegeben. Mittels eines Zellschaber wurden die Zellen vorsichtig von den Filtern oder dem Well gelöst und in vorgekühlte Eppendorfgefäße überführt. Bei den RIPA-Proben wurde zusätzlich für 15 sec Ultraschall behandelt. Mit einer Pipettierhilfe wurden die Zellen resuspendiert. Nach Zentrifugation bei 14000 rpm für 10 min bei 4 °C wurde die Überstände in neue Eppendorfgefäße gegeben und bei -80 °C gelagert.

3.11.1.2 Proteinbestimmung

Für weitere quantitative Analysen (z.B. Western Blot) wurden die Konzentrationen der Proteinlysate ermittelt unter Verwendung des Pierce BCA-Protein-Assay im Mikrotitermaßstab von der Firma Pierce Perbio Science (Smith et al. 1985). Der Prozess basiert auf einer Reduktion von Cu^{2+}-Ionen in Cu^{1+}-Ionen, wenn diese in Kontakt mit Proteinen treten. Die Cu^{1+}-Ionen bilden einen stabilen Komplex mit der BCA-Reagenz (Bicinchoninsäure).

Im Photometer kann anhand einer Eichgeraden mit Proteinen des Rinderserumalbumins (Albuminstandards: 0; 0,2; 0,8; 1,2 mg BSA/ml) die Proteinmenge der Proben durch Doppelbestimmung ermittelt werden. Auf einer 96-Well-Platte wurden je 10 µl oder gegebenenfalls eine Verdünnung der Probe pro Well aufgetragen.

3.11.1.3 Proteinauftrennung durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) dient zur Auftrennung von Proteingemischen. Die Methode basiert auf einem elektrischen Feld, das Moleküle durch eine Gelmatrix aus Acryl-und Bisacrylamid je nach Größe unterschiedlich weit wandern lassen kann. Das im Ladepuffer vorhandene Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich an die Moleküle an, sorgt für deren Denaturierung und bedingt negative Ladung der Moleküle, so dass diese gleichmäßig durch das Gel von der Kathode (-) zur Anode (+) laufen und die Wanderung der Moleküle vorwiegend von der relativen Molekülmasse abhängig ist und nicht von der Gesamtladung oder Konformation der Proteine.

Das Acrylamid bildet durch eine Kettenreaktion lange Polymere, die wiederum durch Bisacrylamid miteinander vernetzt werden. Unterstützt wird diese Reaktion sowohl durch einen Katalysator (N,N,N‘,N‘-Tetramethylethylendiamin - kurz TEMED) als auch durch freie Radikale (Radikalbildner: Ammoniumperoxodisulfat - kurz APS).

Zur Auftrennung der Proteine wurde das Mini-Protean 3 Elektrophorese-System verwendet.

Zum Gießen der Gele bedurfte es eines Halterungssystems, in dem eine große Glasplatte (10`8,2 cm) mit einem 1,5 mm verdicktem Glasrand und eine kleine Glasplatte (10`7,2 cm) mit einer entsprechenden Halterung befestigt wurden.

Die Zusammensetzung des Trenngels ergab sich wie folgt:

- 12,5% Acrylamid-Bis für Claudine; 8,5% für Occludin; 7,5% für PARP
- 0,35 mM Tris-HCl Puffer pH 8,8
- 0,1% SDS
- 0,1% APS
- 0,05% TEMED

Die Gellösung wurde zwischen die Glasplatten gegossen und mit Ethanol überschichtet, um ein Austrocknen zu vermeiden. Nach Auspolymerisierung des Trenngels (ca. 30 min) wurde ein grobporiges Sammelgel mit anderem pH-Wert gegossen, um eine gleichmäßige Auftrennung der Proteine zu erzielen und später eine bessere Bandenschärfe zu erreichen.

Die Zusammensetzung des Sammelgels war wie folgt:

- 5% Acrylamid-Bis
- 125 mM Tris-HCl Puffer pH 6,8
- 0,1% SDS
- 0,1% APS
- 0,1% TEMED

Das Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen und mit einem Trennkamm für die späteren Taschen versehen. Jede Tasche konnte anschließend ein Volumen von 50 µl fassen.

Nach Auspolymerisierung wurden die Gelplatten in die Halterung der Elektrophorese-Kammer eingebaut und mit Elektrophorese-Puffer überschichtet. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der Proteine wurde zusätzlich zu den Proben ein Marker (5 µl Molecular Weight Marker) aufgetragen. 10-25 µg Protein pro Probe wurden pro Tasche für die Claudin-Detektion aufgetragen. Für Volumengleichheit wurden die Proben mit Lysepuffer aufgefüllt und zu 1/5 mit 5 x Lämmli versetzt. Durch anschließendes Kochen für 5 min bei 95 °C im Heizblock wurden die Proteine denaturiert und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V am Stromversorgungsgerät für etwa 90 min, bis die komplette Auftrennung des Farbmarkers zu sehen war.

3.11.1.4 Proteintransfer auf PVDF-Membrane

Mit Hilfe des Tank-Blot-Verfahrens können die denaturierten Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran transferiert werden. Um eine Bindung zwischen den Proteinen und der Membran zu gewährleisten ist in dem Transferpuffer Methanol vorhanden. Methanol löst die Bindung zwischen SDS und den Proteinen, so dass diese an die PVDF-Membran binden können. Vor dem Transfer wurde die PVDF-Membran erst in Ethanol und anschließend in Transferpuffer inkubiert. Des Weiteren wurden auch Schwämme, Gele und Blotting Papiere vor dem Vorgang in Transferpuffer äquilibriert.

Der Aufbau für die einzelnen Blots sah folgendermaßen aus:

Weiße Platte
Schwamm
Gel Blotting Papier
Membran
Gel
Gel Blotting Papier
Schwamm
Schwarze Platte

Obige Blotschichtung wurde in die Transferkammer eingebaut, so dass die Proteine unter Stromzufuhr (1 h, 100 V) und ständiger Kühlung von der Kathode zur Anode und damit auf die PVDF-Membran transferiert wurden.

3.11.1.5 Immundetektion von Proteinen

Nachdem die Proteine auf die Membran transferiert waren, wurden diese mit Hilfe der Immundetektion spezifisch sichtbar gemacht und quantifiziert. Zur Blockierung der freien Protein-Bindungsstellen wurden die Membranen 2 h in einer BSA-Lösung auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde ein spezifischer, gegen das gewünschte Protein gerichteter AK auf die Membran gegeben und über Nacht auf dem Schüttler bei 4 °C inkubiert.
Zugabe des zweiten AKs erfolgte nach Waschen mit PBS/T (2 x 10 min) und TBS/T (1 x 10 min) für 1,5 h auf dem Schüttler. Der zweite AK ist mit einer Peroxidase gekoppelt, welche bei der Detektion durch die Luminol-Reaktion Chemilumineszenz katalysiert. Für diese Reaktion wurde die Membran 5 min in Lumi-Light^{Plus} Reagenz abgedunkelt in einer Küvette inkubiert und anschließend zwischen transparente Folie gelegt. Mit Hilfe eines Analysators (LAS 1000 oder Fusion Fx7) konnten dann Lumineszenzbilder entwickelt werden, die durch das Programm AIDA quantitativ ausgewertet wurden.

3.11.2 Immunfluoreszenzfärbung von Epithelzellen

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung kann eine Kontrasterhöhung von Zielstrukturen, z.B. Proteinen, erzielt werden. Dies basiert auf einer spezifischen Markierung der Zielstrukturen durch spezifische Antikörper, die entweder direkt an

ein Fluorophor gekoppelt sind oder durch die Bindung an einen zweiten Antikörper fluoreszenzmarkiert werden, so dass die Zielstrukturen fluoreszenzoptisch abgebildet werden können.

3.11.2.1 Immunfluoreszenzfärbung von Zellfiltern

Die Fixierung der Zellen erfolgte durch eine 10-minütige Inkubation in eiskaltem Methanol bei -20 °C. Nach mehrmaligem Waschen in $PBS^{+Ca/Mg}$ wurde den Zellen zur Permeabilisierung eine 0,5%ige TritonX-Lösung in $PBS^{+Ca/Mg}$ für 7 min zugegeben, um diese dann nach weiteren Waschgängen mit $PBS^{+Ca/Mg}$ mittels 2%igem Ziegenserum in PBS+ für 45 min bei Raumtemperatur zu blockieren. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Filter ausgeschnitten und mit der Zellseite auf 50 µl des ersten Antikörpers, der als lokaler Marker für die Tight Junction (ZO-1) diente, gelegt und für 1 h bei 37 °C inkubiert.
Die Verdünnungen der ersten Antikörper in Blockierungs-Lösung waren wie folgt:

ZO-1 (mouse)	1:100
Claudine (rabbit)	1:50

Im Folgenden wurden die Filter mit 2%iger Blockierungs-Lösung 3x gewaschen und ein weiterer „erster“ Antikörper für die Zielstruktur (z.B. Claudine bzw. Gata-6) dazugegeben. Dieser Antikörper besitzt Spezifität für ein anderes Antigen als der Antikörper des lokalen Markers, um es nach 3 weiteren Waschgängen mit Blockierungs-Lösung mit verschieden fluoreszierenden sekundären Antikörpern (λ_{EX} = 488 oder 594 nm) optisch sichtbar zu machen. Die Inkubation im, 1:500 in Blockierungs-Lösung verdünnten, sekundären Antikörper fand für die Dauer von 1 h bei 37 °C im Dunkeln statt. Durch anschließende Waschgänge mit Blockierungs-Lösung wurden überschüssige Antikörper entfernt.

3.11.2.2 Zellkern-Färbung mit DAPI

Zellkerne der Epithelien wurden mit dem Nukleinsäurefarbstoff DAPI angefärbt. Dazu wurden die Zellfilter für 10 min im Dunkeln in 1 µg ml^{-1} DAPI in $PBS^{+Ca/Mg}$ (100 µl pro Filter) bei Raumtemperatur inkubiert und danach in $PBS^{+Ca/Mg}$ gewaschen.

3.11.2.3 Prinzip des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops

Zur Erfassung der immunfluoreszenz-markierten Zellfilter wurde ein konfokales Mikroskop (CLSM = confocal laser scanning microscope) verwendet, das optische Schnitte eines dreidimensionalen Objektes, wie z.B. einer Zellschicht, aufnehmen kann. Die Schichtaufnahmen können mit Hilfe eines Computers zu einer dreidimensionalen Darstellung zusammengesetzt werden, so dass die Zellen im Bereich der physikalischen Auflösungsgrenzen repräsentiert werden und eine Lokalisation der Zielstrukturen ermöglicht wird. Zur Reduzierung des Streulichtes kann das Licht, was außerhalb von der Präparationsebene ankommt, mit Hilfe einer Lochblende unterdrückt werden.

In dieser Arbeit wurde unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Präparate das konfokale Laser-Scanning Mikroskop LSM 510 META der Firma Carl Zeiss verwendet. Bei diesem Gerät wird ein Laser-Brennfleck sehr schnell zeilenweise in einer Objektebene bewegt und das aus dem Brennfleck emmitierte Fluoreszenzlicht auf einer kleinen Lochblende (Pinhole) abgebildet, hinter der sich ein lichtempfindlicher Empfänger befindet. Aus dem Empfängersignal wird dann zeilenweise im Computer ein (Schnittbild) zusammengesetzt.

3.11.2.4 Graphische Darstellung von konfokalen z-Stack Aufnahmen

Konfokale Bilder können auch in Form von Stapeln (z-Stacks) aufgenommen werden, so dass man mittels LSM510 META 3D-Datensätze von Präparaten erhält. Diese können dann entweder in Schnittbilddarstellung, 3D-Projektion oder Bildern ausgewählter optischer Schnittebenen dargestellt werden. Dabei kann man die gewünschte Ebene als x/y-Achse wählen, während die Tiefe durch die z-Achse repräsentiert wird, die als aufgeklapptes Bild in Entsprechung zur x- und y- Achse zu sehen ist.

Um Strukturen der Tight Junction besser sichtbar zu machen wurde in dieser Arbeit eine konstante Anzahl von Ebenen über das Programm *LSM Image Browser* in eine Ebene, also in die x/y-Ebene, projektiert.

3.12 Molekularbiologische Methode

3.12.1 Quantitative Bestimmung der relativen Genexpression in eukaryotischen Zellen

3.12.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase-Chain-Reaction) ist eine *in vitro* Methode zur gezielten enzymatischen Amplifikation von DNA-Fragmenten. Dabei dient das Produkt des vorigen Zyklus als Ausgangsprodukt für den nächsten Zyklus, so dass eine exponentielle Vervielfältigung ermöglicht wird.

Ausgangspunkt ist eine thermostabile DNA-Polymerase, die während der Replikation einzelsträngige DNA bindet und mit Hilfe von komplementären Oligonukleotiden (Primern) einen neuen komplementären DNA Strang synthetisiert. Eine der ersten und gebräuchlichsten PCR Polymerasen ist die *Taq*-Polymerase, die aus dem thermostabilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wird.

Ein PCR Zyklus beginnt mit der Denaturierung der Matrizen-DNA bei ca. 95 °C, so dass danach einzelsträngige DNA vorliegt. Im zweiten Schritt, dem Annealing, lagern sich die Primer über Wasserstoffbrücken an die komplementäre Sequenz der DNA. Dabei ist die Annealing-Temperatur von Aufbau und Länge der Primer abhängig. Im dritten Schritt, der Polymerisation, dienen die 3`-OH-Enden der Primer bei 72 °C als Ausgangspunkt für die thermostabile Polymerase zur Komplementierung der DNA-Einzelstränge zu Doppelsträngen.

Anschließend wird die Temperatur erneut auf 95 °C erhöht und die neu synthetisierten DNA-Stränge trennen sich von ihrem Matrizenstrang. Es beginnt ein neuer Zyklus, der etwa 25- bis 40-mal wiederholt wird. Im ersten Zyklus endet die Synthese von neuen DNA-Strängen an einer beliebigen Stelle. Die in diesem Zyklus entstandenen neuen DNA-Moleküle werden in der nächsten Runde neben den ursprünglichen DNA-Strängen ebenfalls amplifiziert. Insgesamt entstehen bei diesem Prozess der PCR DNA-Abschnitte definierter Länge.

In dieser Arbeit wurde die PCR zur Quantifizierung der relativen Genexpression von Claudin-2 unter zur Hilfenahme des Taqman-Systems verwendet und zwar zur Bestimmung von an verschiedene Abschnitte des Claudin-2 Gens gebundenes Acetyl-Histon H3 mittels ChIP (Chromatin-Immunopräzipitation). Um PCR-Produkte

sichtbar zu machen, bediente man sich der Methode der Agarose-Gelelektrophorese.

3.12.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

In einer Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente verschiedener Größe aufgetrennt werden. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern in einem elektrischen Feld in Richtung Anode. Die Laufstrecke linearer, doppelsträngiger DNA ist weitgehend umgekehrt proportional dem Logarithmus ihres Molekulargewichts und somit ihrer Länge. Durch Vergleiche mit einem Marker mit DNA-Fragmenten definierter Größe kann auf die Größe unbekannter DNA-Fragmente zurückgeschlossen werden. Der glycerinhaltige Ladepuffer Bromphenolblau (BPB) erhöht die Dichte der Probe, so dass diese in die Geltaschen sinkt.

Die Auftrennung der DNA-Proben erfolgte bei einer Spannung von ca. 80 V. Dafür wurde die Agarose mit einer Konzentration von 1 - 1,5% in TAE-Puffer (TA-Puffer 1:20000 mit Ethidiumbromid versetzt) in der Mikrowelle aufgekocht und nach kurzem Abkühlen luftblasenfrei in den Gelträger gegossen, der mit einem Kamm für bis zu 15 Probentaschen versehen war. Nach der Auspolymerisierung des Gels wurde der Gelträger in die dafür vorgesehene Gelkammer gesetzt und der Kamm entfernt. Nach anschließendem Begießen mit TAE-Puffer wurden die mit BPB versetzten DNA-Proben in die Taschen pipettiert und der Lauf für die Auftrennung gestartet.

Eine bildliche Analyse der aufgetrennten DNA nach dem Lauf erfolgte durch die Ethidiumbromid-Färbung im Transilluminator.

3.12.1.3 RNA-Isolierung

Zur Quantifizierung der relativen Genexpression von Claudin-2 mittels Taqman-PCR muss zunächst RNA isoliert wird, die anschließend durch eine RT-PCR (*Reverse Transcription* PCR) in cDNA umgewandelt wird. In dieser Arbeit wurde die RNA aus HT-29/B6-GR/MR-Zellen isoliert.

Die RNA-Isolierung erfolgte dabei immer nach dem gleichen Schema. Zellen wurden auf PCF-Filtern ausgesät und bis zur Konfluenz angezogen. Pro RNA-Probe wurde ein Filter verwendet.

Zunächst wurden die Monolayer mit PBS+ gewaschen und anschließend mit 400 µl RNAzol beschichtet, um die Zellen durch das im RNAzol vorhandene Phenol zu lysieren. Nach Ablösen der Zellen durch einen Zellspatel wurden die jeweiligen Proben in ein Eppendorfgefäß überführt und 15 min auf Eis inkubiert. Das Homogenisat wurde nun mit 80 µl Chlorform überschichtet und *gevortext*. Es folgte eine weitere Inkubationszeit von 5 min auf Eis.
Die Proben wurden anschließend für 15 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert und die obere, wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zum Ausfällen der RNA wurde das doppelte Volumen eiskalten Isopropanols (200 µl) auf die Proben gegeben, welche dann stark *gevortext* und 30 min auf Eis inkubiert wurden. Nach einer erneuten Zentrifugation für 15 min bei 14000 rpm und 4 °C konnte der Überstand verworfen und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen werden. Das Ethanol wurde nach einer erneuten Zentrifugation abgegossen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Nach der Resuspension des Pellets in 30 µl RNAse-freiem DEPC-Wasser wurden die RNA-Proben für die spätere Umschreibung in cDNA mittels Reverser Transkriptase bei -80 °C gelagert.

3.12.1.4 Reverse Transkription

Da die für die PCR herkömmlichen Polymerasen nicht in der Lage sind, aus RNA DNA zu produzieren, muss die RNA zunächst in cDNA umgewandelt werden. Hier bedient man sich der reversen Transkription. Ausgangspunkt dieser Methode ist die „Reverse Transkriptase“, bei der es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymarase handelt und als veränderte Enzymvariante aus verschiedenen Retroviren gewonnen wird. Bei der reversen Transkription wird ein so genannter Oligo-d(T)-Primer verwendet, also mehrere Thymin-Basen, welche komplementär sind zum Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA. Auf diese Weise wird ein zur RNA komplementären DNA-Strang synthetisiert.

Die reverse Transkription der RNA-Proben in cDNA-Proben erfolgte durch das High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems).

Zunächst wurde die RNA-Konzentration der Proben mit Hilfe des Nano Drops bestimmt. Eingesetzt wurden jeweils 2 µg RNA pro Probe bei einem Gesamtvolumen von 20 µl für den PCR-Ansatz. Ein PCR-Ansatz war wie folgt zusammengesetzt:

- 2 µl RT-Puffer (10x)
- 0,8 µl dNTPs
- 2 µl Random Hexamer Primers (10x)
- 0,5 µl RNase Out
- 1 µl Reverse Transkriptase
- x µl RNA (entsprechend 2 µg)
- x µl RNase freies Wasser (auf ein Endvolumen von 20 µl)

Für mehrere Proben wurde ein Master-Mix angesetzt, wovon 12,6 µl pro Probe, nach Vorlegen von RNA und Wasser, in die PCR-Gefäße pipettiert wurden. Die Inkubation der Proben wurde 10 min bei 10 °C und 2 h bei 37 °C vollzogen.

Die Kurzzeitlagerung bis 24 h erfolgte bei 4 °C und die Langzeitlagerung bei -20 °C oder -80 °C.

3.12.1.5 Quantitative Real-Time-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR dient zur Ermittelung der quantitativen Menge von RNA oder DNA.
Diese Methode kann beispielsweise dazu genutzt werden, die relative Transkription eines bestimmten Gens zu ermitteln. Es gibt verschiedene Ansätze dieser Technik (Abb. 3.4), die alle auf der Reaktion einer PCR beruhen.
Mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während der PCR-Zyklen ist eine Quantifizierung möglich.

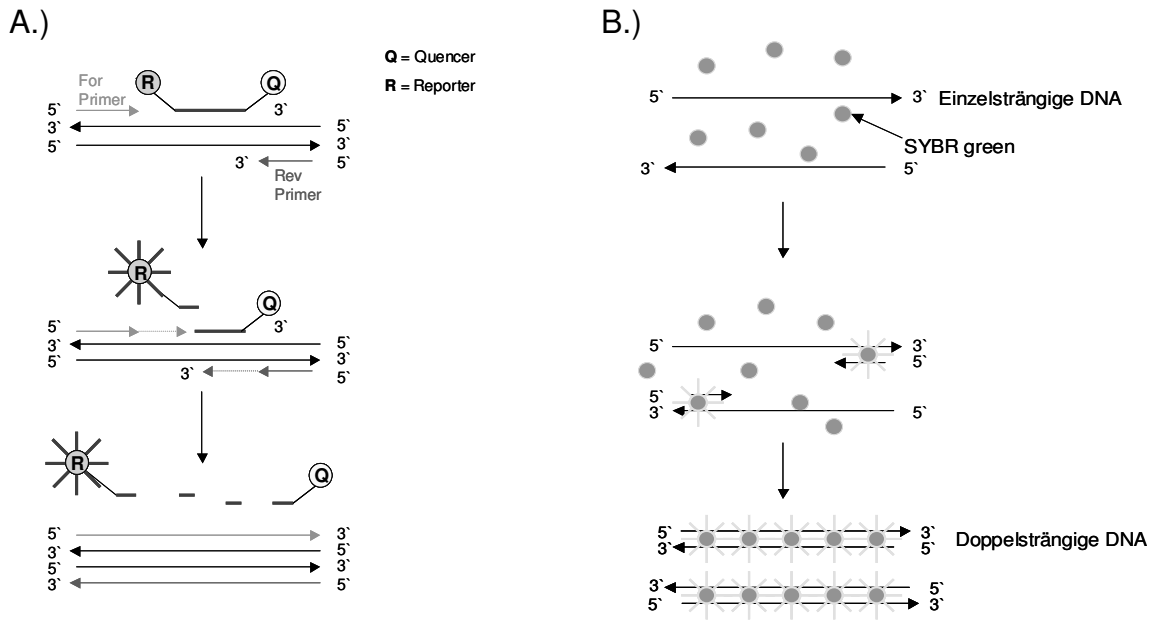


Abb. 3.4 Prinzipien der quantitativen Real Time PCR
Dargestellt sind verschiedene Methoden der qPCR **A.)** qPCR mit Hilfe einer TaqMan Sonde **B.)** qPCR mit Hilfe von SYBR green

3.12.1.5.a. TaqMan-Sonde

Die Real Time Quantifizierung mittels TaqMan-Sonde basiert auf einer zur Zielsequenz komplementären Sonde, die am 5`-Ende mit einem Reporter Farbstoff und am 3`-Ende mit einem Quencher gekoppelt ist.

Die TaqMan-Sonde hybridisiert sequenzspezifisch an dem DNA-Strang zwischen zwei Primern. Solange der Reporter Farbstoff und der Quencher-Farbstoff an die Sonde gekoppelt sind, wird die Fluoreszenzeigenschaft des Reporters vom Quencher supprimiert. Durch die 5'-3' Exonuklease Aktivität der DNA-Polymerase wird die Sonde während der PCR abgebaut, so dass zunächst der Reporter am 5`-Ende verdrängt wird. Die supprimierende Wirkung des Quenchers hebt sich durch die räumliche Distanz auf und der Reporter kann fluoreszierendes Licht abgeben, welches detektiert werden kann. Dabei ist die Zunahme der Intensität der Fluoreszenz proportional zu der Entstehung von PCR-Produkten. In dieser Arbeit wurden der Reporter-Farbstoff FAM und der Quencher-Farbstoff TAMRA verwendet.

Einsatz pro Probe:

- 2 µl cDNA-Probe (aus RT PCR)
- 10 µl 2x TaqMan® Universal PCR Master Mix
- 1 µl TaqMan® Sonde
- 7 µl Wasser

Pro Probe wurde eine Doppelbestimmung vorgenommen. Die PCR erfolgte in einer Fast Optical 96-Well-Platte mit folgenden Einstellungen für das 7500 fast Real-Time PCR Gerät:

	Temperatur	***Zeit***	***Zyklen***
Schritt 1	95 °C	10 min	
Schritt 2	95 °C	15 sec	x 40
	59 °C	1 min	

Diese Form der Real Time RT PCR wurde zur Quantifizierung des mRNA-Levels von Claudin-2 verwendet.

3.12.1.5.b. Real Time-Messung mittels SYBR green

SYBR green I ist ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, der an doppelsträngige DNA-Strukturen bindet. Der resultierende DNA-Fluoeresenz-Farbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge von λ_{max} = 494 nm und emittiert grünes Licht bei einer Wellelänge von λ_{max} = 521 nm. Mit Hilfe des 7500 fast Real-Time PCR Systems (Applied Biosystem) werden zu jedem Zyklus einer PCR die Signale der entstehenden doppelsträngigen DNA aufgenommen, so dass eine sigmoide Kurve für das Amplifikat entsteht. Aus der maximalen Steigung wird der „crossing point“ berechnet, der den Beginn der log-Phase der Amplifikation beschreibt und letzten Endes Aufschluss über die DNA-Menge der Probe gibt.
Pro Probe erfolgte eine Doppelbestimmung. Dafür wurden jeweils 2 µl der Probe in die Vertiefungen mit dem Master Mix gegeben.

Probenvorbereitung pro Probe:

- 2 µl DNA-Probe
- 1 µl je Primer
- 10 µl POWER SYBR® Green Master Mix
- 7,5 µl Fluca-Wasser

Gesamtvolumen pro Ansatz betrug 20 µl.

Nach dem Abdecken der Fast Optical 96-Well-Platte der wurde diese in das 7500 fast Real-Time PCR Gerät geschoben und die PCR unter folgenden Einstellungen vollzogen:

	Temperatur	***Zeit***	***Zyklen***
Schritt 1	95 °C	10 min	
Schritt 2	95 °C	15 sec	x 40
	59 °C	1 min	

Verwendung fand diese Form der Real Time RT PCR im Zusammenhang mit ChIPs (Chromatin-Immunopräzipitationen), die im Folgenden weiter erklärt werden.

3.12.2 Nachweis der mRNA- und Proteinstabilität

Mit Hilfe verschiedener Inhibitoren kann die gesamte mRNA und Protein Synthese von Zellen blockiert werden, so dass sich die mRNA oder Protein Halbwertszeit bestimmter Gene mittels einer Regressionsgeraden bestimmen lässt. In dieser Arbeit wurden HT-29/B6-GR/MR-Zellen konfluent auf Filter ausgesät. Dabei wurde entweder die mRNA Synthese für 1 h mit Hilfe von Actinomycin D (Act D, 7 µg/ml)) oder die Proteinsynthese für 2 h mittels Cycloheximid (Chx, 100 µg/ml) gehemmt. Danach wurden die Präparate zusätzlich mit 2 mM Butyrat behandelt. Die Isolierung und Bestimmung der mRNA bzw. der Proteine erfolgte wie in Punkt (3.12.1. und 3.11.1) beschrieben.

3.12.3 ChIP (Chromatin-Immunopräzipitation)

Mit dem Prinzip der Chromatin-Immunopräzipitation lassen sich mit Hilfe von Antikörpern Interaktionen bestimmter Proteine (z.B. Histone, Transkriptionsfaktoren) an diverse DNA-Abschnitte nachweisen. Eine bildliche Darstellung der ChIP ist in Abb. 3.5 zu finden. Dafür werden zunächst mit Hilfe einer 1%igen PFA-Lösung die Interaktionen zwischen Proteinen und DNA in den Zellen fixiert (Crosslinking). Mittels Ultrabeschallung wird die DNA der Protein-DNA-Komplexe in 500 bis 1000 bp lange DNA-Stücke fragmentiert. Zur Isolierung des zu untersuchenden Protein-DNA-Komplexes behilft man sich mit einem bestimmten Antikörper (AK), der spezifisch mit dem gewünschten Protein interagiert. Dieser bindet an den Protein-DNA-Komplex und kann mittels Protein-Agarose-Beads isoliert werden, so dass nach mehrmaligen Waschen und anschließendem Eluieren einzig das zu analysierende Protein mit der daran gebundenen DNA in der Probe gegenwärtig ist.

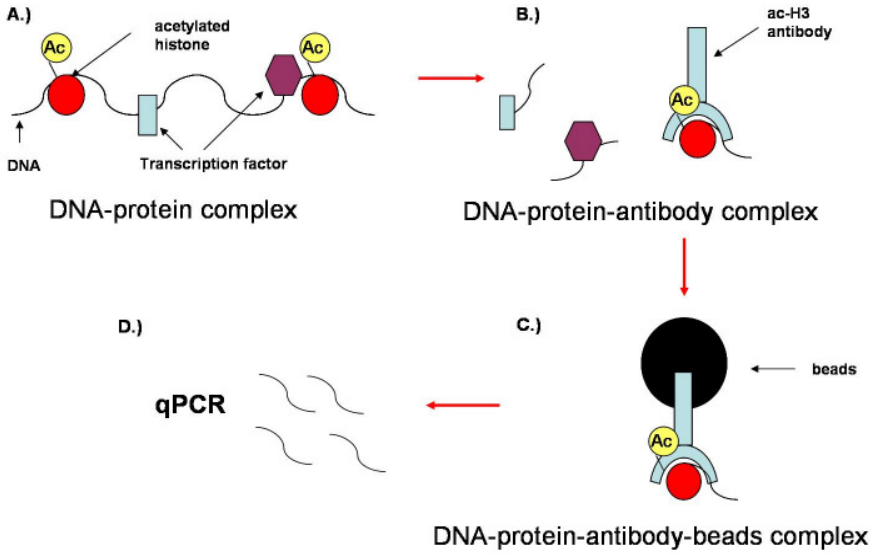


Abb. 3.5 Kurzbeschreibung der Methode zur Chromatin-Immunopräzipitation
A.) an die DNA gebundene Proteine, **B.)** Nach dem „crosslinking“ fragmentierte DNA-Protein-Antikörper-Komplexe, **C.)** Selektion des gewünschten DNA-Protein-Antikörper-Komplexes mit Hilfe von Protein A Agarose und **D.)** Nach dem „reversen crosslinking“ erhaltene spezifische Ziel-DNA zur quantitativen PCR (qPCR)

Die Proteine und verbleibende RNA werden enzymatisch verdaut und die verbleibende DNA mittels Phenolextraktion isoliert. Weitere quantitative Analysen können dann mit Hilfe einer PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction*) ausgeführt werden.

In dieser Arbeit wurde das Bindungsverhalten von acetyliertem Histon 3 an die Promotorsequenz von Claudin-2 unter dem Einfluss von Butyrat untersucht und zwar mit den bisher bekannten Transkriptionsbindestellen,

3.12.3.1 Fixierung und Chromatin-Isolierung

Eine Woche alte HT29/B6-GR-MR-Klone wurden auf 10 cm^2 Schalen ausgesät und nach 2 Tagen mit 2 mM Butyrat versetzt. Zur Fixierung der Protein-DNA-Interaktionen wurden die Zellen nach weiteren 2 h, 6 h, 12 h und 24 h 2x mit Mg^{2+}/Ca^{2+} haltigem PBS (PBS+) gewaschen und anschließend in einer 1%igen, in PBS+ verdünnten PFA-Lösung 15 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach weiterem Waschen mit eiskaltem PBS+ wurden zum Aufhalten der PFA-Reaktion 125 mM Glycin auf die Zellen gegeben und 5 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit eiskalter PBS+ wurden je Schale 1 ml Zell-Lyse-Puffer (frisch Complete/EDTA free) zugesetzt, 10 min bei 4 °C inkubiert, mittels Zell-Scrapern abgeschabt und nach 5fachem Durchziehen durch eine Kanüle in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Proben wurden anschließend bei 3500 x g für 5 min (bei 4 °C) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde daraufhin in 500 µl Nuclei-Lyse-Puffer (frisch Complete/EDTA free) gelöst und je 250 µl in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß überführt und kalt gestellt.

3.12.3.2 Fragmentierung der DNA-Protein-Komplexe

Zur Fragmentierung der DNA erfolgte eine Ultraschallbehandlung der Proben durch das Gerät von Dr. Hielscher UP 50H. Die Einstellungen betrugen: Cycle 0,5, Amplitude 50%. Nach mehrfachen Wiederholungen erwies sich eine Beultraschallung von 3 x 15 sec als sinnvoll, wobei die Proben zwischen den Zyklen 1 min auf Eis kalt gestellt wurden. Die vorher aufgeteilten Proben wurden anschließend wieder in 1,5 ml Eppendorfgefäßen vereinigt und 10 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurde in neue Eppendorfgefäße überführt. Um die Fragmentgröße der DNA zu bestimmen wurden 10 µl der Probe direkt mit BPB (Brom-Phenol-Blau) versetzt, 10 min bei 96 °C gekocht und anschließend zur Gelelektrophorese auf ein 2%iges Agarose-Gel aufgetragen. 50 µl des Lysates wurde zur DNA-Bestimmung verwendet. Der Rest des Lysates wurde für die IP bei -80 °C eingefroren.

3.12.3.3 Phenolextraktion zur Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die DNA mittels einer Phenolextraktion isoliert. Dabei handelt es sich um eine gängige Methode, um genomische DNA zu isolieren.

Zunächst wurden mit Hilfe eines Enzymverdaus die Protein-DNA-Interaktionen unterbrochen. Hierfür wurden die 50 µl Proben mit 12,5 µl 5 x PK-Puffer und 1,25 µl Proteinase K (10 mg/ml) versetzt und 2 h bei 45 °C im Heizblock inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 36,8 µl TE-Puffer und 100 µl Phenol hinzugeführt, stark *gevortext* und bei 14000 rpm 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 100 µl Chloroform versetzt, ein weiteres mal *gevortext* und bei 14000 rpm 1min zentrifugiert. Ein weiteres Mal wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 260 µl 100%igem Ethanol, 10 µl 5 NaCl und 0,25 µl Glycogen (Stocklösung: 20 mg/ml) vermischt, um anschließen 20 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert zu werden. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Pellets mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer gelöst und die DNA-Konzentration mit Hilfe des Nanodrops bestimmt. Bei diesen Proben handelte es sich um die INPUT-DNA, die im weiteren Verlauf noch für die PCR gebraucht wurde. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80 °C.

3.12.3.4 Immunopräzipitation zwischen dem anti-acetyl-H3-Antikörper und dem Protein-DNA-Komplex

Zur Immunopräzipitation wurde bestimmt, in welchem Volumen des Kernlysates 25-50 µg DNA vorhanden sind, und die entsprechenden Mengen für die jeweiligen Proben in neue Eppendorfgefäße gegeben und mit Nuclei-Lyse-Puffer auf 100 µl aufgefüllt. Anschließend wurde den Lysatproben 150 µl ChIP-Dilutions-Puffer (mit Complete Mini/EDTA free versetzt) zugegeben.

Zur Vorreinigung wurden die Proben mit 20 µl Protein-A-Agarose (50% slurry, 0,1% BSA) versetzt und 30 min bei 4 °C im Rotator inkubiert. Nach der darauffolgenden Zentrifugation bei 14000 rpm, 4 °C für 5 min wird der Überstand in neue Eppendorfgefäße überführt und pro Probe 2 µg des polyklonalen Antikörpers anti-Acetyl-Histon H3 (Millipore) zugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Rotator bei 4 °C.

Nach Inkubation der Proben über Nacht wurden sie mit jeweils 35 µl Protein-A-Agarose versetzt und 1 h bei 4 °C im Rotator inkubiert, um die anti-Acetyl-H3-DNA-Komplexe mittels Bindung an die Agarose-Beads zu selektieren.
Durch das Waschen mit verschiedenen Puffern wurden unspezifische Protein-DNA-Komplexe beseitigt. Das Waschen mit den jeweiligen Puffern erfolgte je 2x mit einem Volumen von 250 µl und alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4 °C und 1800x g für 2 min. Zwischen den Zentrifugationsschritten wurden die Proben mit den jeweiligen Puffern im Über-Kopf-Schüttler bei 4 °C für 2 min inkubiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit Hilfe einer Kanüle abgesaugt. Die Pufferreihenfolge ergab sich wie folgt aus Low-Salt-Puffer, High-Salt-Puffer, LiCl-Wasch-Puffer und TE-Puffer. Alle Puffer waren auf 4 °C temperiert und mit einer Tablette Complete mini/ EDTA free versetzt.
Zur Lösung der Bindung des Antikörpers an die Protein-A-Agarose wurde ein frisch angesetzter Elutions-Puffer (1% SDS, $NaHCO_3$) verwendet. Die Protein-A-Agarose-Beads wurden 2x mit 200 µl des Elutions-Puffers 15 min im Rotator bei Raumtemperatur inkubiert und die jeweiligen Eluate in Eppendorfgefäße überführt. Durch die Zugabe von 1 µl RNAse (10mg/ml) und 24 µl 5 M NaCl-Lösung und anschließender Inkubation für 5 h bei 65 °C wurde die Protein-DNA-Bindung aufgelöst.

3.12.4 Bestimmung von Protein-DNA-Interaktionen mittels EMSA

Der EMSA (**E**lecrophoretic-**M**obility-**S**hift-**A**ssay) dient zur Bestimmung der Genregulation über Protein-DNA-Interaktionen, wobei die Bindungsaffinität bestimmter Transkriptionsfaktoren an DNA-Konsesussequenzen innerhalb von Promotorregionen untersucht wird. Die Methode basiert darauf, dass Protein-DNA-Komplexe in der Gelelektrophorese langsamer laufen als ungebundene DNA, so dass eine Interaktion als „*Shift*“ erkennbar ist. Eine Detektion solcher Gele kann über verschiedene Wege stattfinden. Zumeist werden die Oligonukleotide der Konsensussequenzen radioaktiv, durch Fluoreszenzfarbstoffe oder durch Biotin markiert und können durch verschiedene Detektionssysteme sichtbar gemacht werden. Bei einem „*Supershift*“ wird zusätzlich ein Antikörper für einen zu bestimmenden Transkriptionsfaktor genutzt, so dass der AK-Protein-DNA-Komplex noch langsamer in der Gelelektrophorese läuft.

3.12.4.1 Präparation des Nuklearen Extraktes

Um den nuklearen Extrakt für den EMSA aufzuarbeiten, wurde das „Nuclear Extraction Kit“ der Firma *Panomics* verwendet. Dafür wurden HT-29/B6-GR/MR Klone auf 10 cm^2 Platten konfluent angezogen und 1x in kaltem PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml Puffer A wurde die Platte auf Eis gestellt und bei 200 rpm für 10 min auf dem Schüttler inkubiert. Nach anschließendem Abkratzen der Zellen mit dem Scraper und mehrmaligem Resuspendieren wurde die Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß überführt und für 3 min bei 4 °C und 14000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet auf Eis gestellt. Jedem Pellet wurde daraufhin 150 µl Puffer B (Panomics Kit) hinzugegeben und durch Homogenisieren gelöst. Die Proben wurden für 1 h bei 4 °C inkubiert, wobei diese alle 20 min invertiert wurde. Nach anschließender Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 14000 x g konnte der Überstand als nuklearer Extrakt in ein Eppendorfgefäß überführt, ggf. aliquotiert und bei -80 °C eingefroren werden.

3.12.4.2 Annealing der Bindesequenzen

In dieser Arbeit wurden biotinylierte Oligonukleotide von Bindesequenzen verwendet, die mit Hilfe der Interaktion mit Streptavidin über Chemolumineszenz sichtbar gemacht werden können. Das Annealing wurde wie folgt vollzogen:

- 3,5 µl FOR Oligo (100 pmol/µl)
- 3,5 µl REV Oligo (100 pmol/µl)
- 10 µl 0,5M NaCl
- 10 µl 100 mM Tris/HCl pH 7,5
- 2 µl 50 mM EDTA pH 8,0
- 71 µl H_2O

Inkubation im Thermocycler: 5 min bei 95 °C, 45 min bei 25 °C

3.12.4.3 Shift Assay

Der Gel Shift erfolgte wie im EMSA “Gel Shift” Kit von *Pierce* beschrieben. Dabei wurden nuklearer Extrakt (siehe 3.12.4.1) in einer Konzentration von 4 µg und 1 µl der annealten und biotinylierten Oligonukleotide (siehe 3.12.4.2) mit einer Konzentration von 0,35 pmol/µl pro Reaktion eingesetzt.

Pro EMSA-Ansatz:

- 13,5 µl Fluca-Wasser
- 2 µl 10x Binding Buffer
- 1 µl Poly dI·dC
- ca. 2,5 µl nuklearer Extrakt (entsprach 4 µg)
- 1 µl annealtes, biotinyliertes Oligo (Stock: 0,35 pmol/µl)

Das Gesamtvolumen pro Ansatz betrug 20 µl und wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Beim *Supershift* wurde nach der 20 min Inkubation ein Antikörper appliziert unter einer weiteren Inkubation von 1 h bei 4 °C. Die Wassermenge wurde, dem 20 µl Ansatz entsprechend, angepasst.

3.12.4.4 Gelelektrophorese und Transfer

Die Gelelektrophorese der einzelnen Proben erfolgte in einem 6%igem nativen Polyacrylamidgel (1 ml 10x TBE, 4ml 30%iges Acrylamid/Bis, 625 µl 80% Glycerol, 14,375 ml steriles Wasser, 300 µl APS, 20 µl TEMED), eingetaucht in 0,5x TBE Pufferlösung, für ca. 1,5 h bei 100 V bei 10 °C. Vor dem Beladen wurden die Proben mit 5 µl Ladepuffer versetzt und das Gel bei 100 V vorlaufen gelassen. 15 µl der Proben wurden dann für den Gelelektrophorese-Lauf in die Taschen gegeben. Für den Transfer auf die Membran (Biodyne® B 0,45 µm, Pall) wurde die Membran 10 min in 0,5x TBE equilibriert und wie in der Western Blot-Analyse beschrieben in die Western Blot Apparatur eingebaut. Der Transfer erfolgte dabei 50 min bei 380 A (100 V) bei 10 °C. Abschließend wurde die Membran ausgebaut, auf einen Filter gelegt und zur DNA Fixierung im *UV light crosslinker* (Hoefer UVC 500) mit 254 nm bei 120 mJ/cm^2 für 1 min bestrahlt.

3.12.4.5 Detektion der Membranen

Die Detektion der Membranen erfolgte wie im Protokoll von Pierce beschrieben. Dabei wurden die Membranen mit 16 ml 1x Blockierungspuffer pro Membran 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt und 50 µl (1:300) Streptavidin-Horseradisch Peroxidase auf 16 ml neuen „Blocking Buffer“ gegeben und nach Verwerfen des ersten Blocking Buffers auf die Membranen appliziert und wiederum 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. In einer neuen Küvette wurden die Membranen dann

4 x für 5 min mit je 20 ml „1x Wash Solution“ gewaschen. Die Äquilibrierung erfolgte anschließend durch 5 minütiges Schütteln in einer neuen Küvette mit 30 ml Äquilibrierungspuffer. Nach Verwerfen wurde die Chemolumineszenz Substrat Working Solution (6 ml Luminol/Enhancer + 6 ml Stable Peroxide Solution) für 5 min auf die Membran gegeben. Dann wurde die Membran zwischen transparente Folie gelegt und mit Hilfe der *Fusion Fx7* entwickelt.

4 ERGEBNISSE

Es wurde mehrfach gezeigt, dass Butyrat einen positiven Effekt auf die Barrierefunktion bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) hat. Bisher ist allerdings relativ unerforscht, welcher Mechanismus dahinter steckt. Zur Aufschlüsselung dieser Mechanismen bediente ich mich verschiedener Techniken. So wurde zunächst geklärt, welche physiologischen Auswirkungen Butyrat auf Epithelzellen hat. Außerdem wurden Veränderungen auf molekularer Ebene und die entsprechenden Mechanismen dafür untersucht.

4.1 Physiologische Änderungen in HT-29/B6-GR/MR-Zellen unter dem Einfluss von Butyrat

Um Aufschluss über die Mechanismen zu bekommen, wie Butyrat die Barriereeigenschaften beeinflusst, wurde ein Zellmodell verwendet. Hierzu musste zunächst geklärt werden, ob Butyrat auch in diesem Zellmodell positive Effekte auf die Barrierefunktion ausübt. Zu diesem Zweck habe ich mich des Kolonkarzinom-Klons HT-29/B6-GR/MR bedient. Zunächst erfolgte die Messung des transepithelialen Widerstandes (R^t), welcher mit Hilfe der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie in den parazellulären (R^{para}) und transzellulären (R^{trans}) Widerstand differenziert werden konnte. Zudem wurden die Na^+/Cl^--Permeabilität und das Dilutionspotential ermittelt.

4.1.1 Veränderungen des epithelialen Widerstandes und der Permeabilität im Kolonkarzinom-Zellklon HT-29/B6-GR/MR

Mit Hilfe eines Hand-Widerstandmessgerätes wurde ermittelt, inwieweit sich der transepitheliale Widerstand (R^t) von konfluent auf Filtern gewachsenen HT-29/B6-GR/MR-Zellen nach der Applikation von 2 mM Butyrat in Abhängigkeit von der Zeit ändert. Als Kontrolle diente die Messung der Widerstände von unbehandelten Zellen.

In Abbildung 4.1 sind die Widerstandskurven für die Butyrat behandelten und unbehandelten Zellen zu sehen. Der Widerstand für die Kontrollen pendelte zu allen Zeitpunkten um R^t 100% im Vergleich zum Ausgangs-Widerstand zum Zeitpunkt t_0. Wenn zum Zeitpunkt t_0 R^t auf 100 ± 5% normiert wurde, betrug R^t für die Kontrollproben nach 24 h 95 ± 4% und nach 48 h 117 ± 3%. Im Gegensatz

dazu war der Widerstand nach der Zugabe von 2 mM Butyrat, sowohl nach 24 h als auch nach 48 h deutlich erhöht. Nach 24 h lag R^t im Vergleich zum Anfangswert bei 173 ± 3% ($p < 0{,}001$) und nach 48 h sogar bei 274 ± 4% ($p < 0{,}001$). Das ist eine durchschnittliche Steigerung von 73% nach 24 h und von 174% nach 48 h im Vergleich zum Ausgangswiderstand.

Somit konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass Butyrat einen positiven Einfluss auf die Barrierefunktion in Form einer Steigerung des epithelialen Widerstandes in HT-29/B6-GR/MR-Zellen hat, der in Abhängigkeit zu der Inkubationszeit steht.

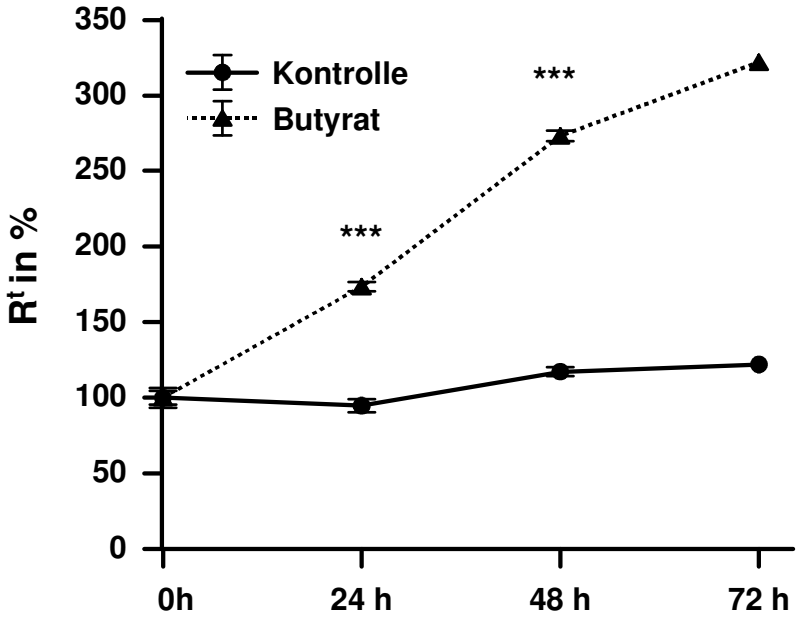


Abb. 4.1 Butyrat-Effekt auf den Widerstand von HT-29/B6-GR/MR-Zellen unter Butyrat
Dargestellt ist der Widerstand konfluenter HT-29/B6-GR/MR-Zellen unter Zugabe von 0 (Kontrolle) bzw. 2 mM Butyrat. Die Ausgangsdaten zum Zeitpunkt t_0 wurden dabei auf 100% normiert und die Widerstände zu den Zeitpunkten t_{24}, t_{48} und t_{72} dazu ins Verhältnis gesetzt (n = 4 - 12, *t-test*, *** $p < 0{,}001$)

Der epitheliale Widerstand (R^{epi}) kann mittels 2-Wege-Impedanzspektroskopie in den transzellulären (R^{trans}) und den parazellulären Widerstand (R^{para}) differenziert werden. Während Veränderungen in R^{trans} z.B. auf Veränderungen im Zusammenhang mit zellulären (elektrogenen) Membrantransportern hinweisen, deuten Änderungen in R^{para} zumeist auf einen Effekt im Bereich der Tight Junction Moleküle hin, so dass diese Methode einen Hinweis darauf gibt, ob Widerstandserhöhungen durch Butyrat eher transzellulärer oder parazellullärer

Natur sind. Zu diesem Zweck wurden die Zellen 24 h Stunden mit 2 mM Butyrat vorinkubiert. Die 2-Wege-Impedanzspektroskopie wurde in dieser Versuchsserie bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt, um eine Überlagerung der parazellulären Effekte (R^{para}) durch transzelluläre Phänomene (R^{trans}) zu minimieren. Konkret wird dabei die transzelluläre Konduktivität von Membrantransportern mittels einer Herabsetzung der Temperatur begrenzt. Mit Hilfe der 2-Wege-Impedanzspektroskopie bei Raumtemperatur konnten dann in der Folge Unterschiede im R^{para} nachgewiesen werden (Abb. 4.2).

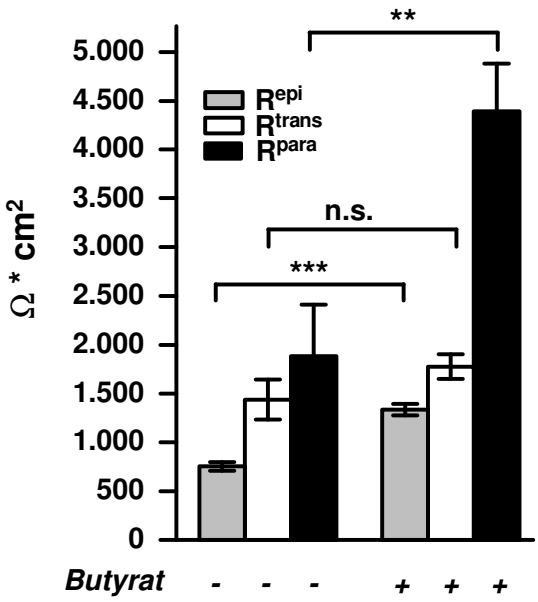


Abb. 4.2 2-Wege-Impedanzspektroskopie an HT-29/B6-GR/MR-Zellen
Darstellung der Differenzierung von R^{epi} in R^{para} und R^{trans} vor und nach der Inkubation mit 2 mM Butyrat für 24 h mittels 2-Wege-Impedanzmessung. Die Versuche wurden bei 22 °C vollzogen ($n \geq 6$, *t-test*; * $p < 0{,}05$)

Bei diesen Messungen (bei Raumtemperatur) zeigte sich, dass sich R^{para} unter dem Einfluss von Butyrat auf das ca. 2,5fache erhöhte. Als Folge davon konnte bei den Kontrollen ein R^{epi} von 752 ± 45 $\Omega \cdot cm^2$ und bei den Butyrat behandelte HT-29/B6-GR/MR-Zellen ein im Vergleich dazu erhöhter R^{epi} von 1333 ± 58 $\Omega \cdot cm^2$ ($p < 0{,}001$) ermittelt werden. Durch die Herabsetzung der Temperatur blieb R^{trans} unter Butyrat im Vergleich zu den Kontrollen nahezu unverändert (Butyrat = 1776 ± 127 $\Omega \cdot cm^2$, Kontrolle = 1438 ± 205 $\Omega \cdot cm^2$, *ns*). Konkret fand sich eine Verdoppelung von R^{para} unter Butyrat Stimulation (Butyrat = 4393 ± 843 $\Omega \cdot cm^2$, Kontrolle = 1880 ± 531 $\Omega \cdot cm^2$, $p < 0{,}01$). Es scheint demnach, dass man zwei verschiedene Effekte

auf R^{epi} unter dem Einfluss von Butyrat differenzieren muss. So war bei 37 °C auch die transzelluläre Konduktivität vermindert (Daten nicht gezeigt), während bei Raumtemperatur ausschließlich eine Erhöhung des parazellulären Widerstandes zu beobachten war, was als ein direkter Hinweis für eine Beeinflussung der Tight Junction zu interpretieren ist.

4.1.2 Einfluss von Butyrat auf die Na^+- und Cl^--Permeabilitäten bei HT-29/B6-GR/MR-Zellen

Die Barrierefunktion wird nicht nur in Form des Gesamtwiderstandes R^t beeinflusst, sondern kann sich auch über eine veränderte Kationen-Selektivität innerhalb der Na^+/Cl^--Permeabilität auszeichnen. In diesem Zusammenhang wurde der Einfluss von Butyrat auf die Barrierefunktion deshalb auch auf der NaCl-Permeabilitätsebene getestet, so dass zusätzlich zu den R^t-Messungen auch noch die Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- und die Dilutionspotentiale ermittelt wurden. Wie zuvor wurden HT-29/B6-GR/MR-Zellen für die Messungen 24 h in 2 mM Butyrat vorinkubiert. Dabei war eine deutliche Differenz für die Na^+-Permeabilität zu beobachten (Abb. 4.3 A).

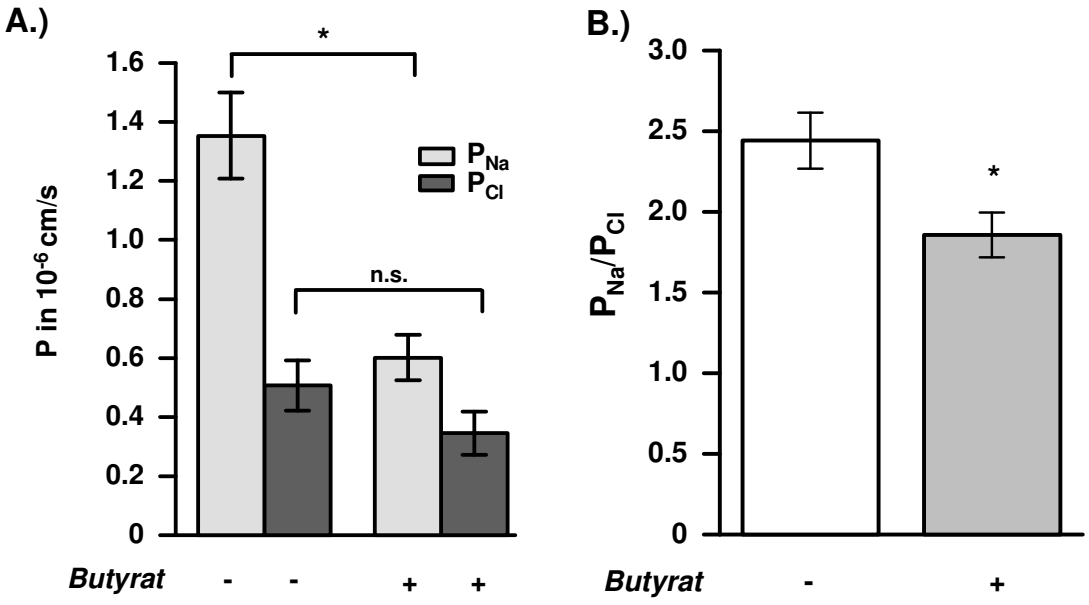


Abb. 4.3 Na^+- und Cl^--Permeabilität bei 4 °C in HT-29/B6-GR/MR-Zellen
A.) Anhand von Fluxmessungen ermittelte Permeabilitäten für Na^+- und Cl^--Ionen in unbehandelten und mit Butyrat behandelten (2 mM, 24 h) HT-29/B6-GR/MR-Zellen und B.) das entsprechende Permeabilitätsverhältnis (n = 6, *t-test*; * $p < 0,05$)

Im Gegensatz zur Kontrolle mit 1,35 ± 0,15·10^{-6} cm/s war für die Butyrat behandelten Proben mit 0,60 ± 0,08·10^{-6} cm/s ($p < 0,05$) eine um die Hälfte verminderte Permeabilität für Na^+-Ionen zu verzeichnen. Auch die Permeabilität für Cl^- zeigte eine leichte Tendenz zur Verminderung, allerdings erreichte diese keine statistische Signifikanz. Aufgrund der Messungen des Dilutionspotentials (Abb. 4.3 B) konnten dann die relativen Na^+- und Cl^--Permeabilitäten ermittelt werden. Auch das Permeabilitätsverhältnis zwischen Na^+ und Cl^- wies eine signifikante Änderung im Sinne einer Verminderung der Kationen-Selektivität für Butyrat behandelte Zellen in einer Größenordnung von 25% auf ($p < 0,05$).

Insgesamt belegen die Ergebnisse eine zeitabhängige Erhöhung für den Gesamtwiderstand R^t nach Butyrat-Exposition. Bei Raumtemperatur fand sich zudem eine 3fache Steigerung von R^{para} und auch die Na^+-Permeabilität war unter dem Einfluss von Butyrat stark vermindert.

4.2 Molekulare Veränderungen durch Butyrat auf parazellulärer Ebene

4.2.1 Proteinexpression barrierererelevanter Claudine unter Butyrat in HT-29/B6-GR/MR-Zellen

Butyrat hat einen positiven Einfluss auf den Widerstand und vermindert parallel dazu die Na^+-Permeabilität von HT-29/B6-GR/MR-Zellen, was einen Rückschluss auf eine positive Wirkung von Butyrat auf die Barrierefunktion zulässt. Veränderungen des parazellulären Widerstandes bei Epithelzellen können in vielen Fällen auf eine Veränderung der Zusammensetzung von Tight Junction-Proteinen, insbesondere von bestimmten Claudinen, zurückgeführt werden. Ob der funktionelle Barriereeffekt von Butyrat bei HT-29/B6-GR/MR-Zellen tatsächlich auf eine differenzierte Expression von Tight Junction-Proteinen zurückzuführen war, wurde im Folgenden auf Proteinebene mittels Western Blot-Analyse ermittelt. Abbildung 4.4 zeigt die Expression verschiedener, barrierererelevanter Claudine auf Proteinebene.

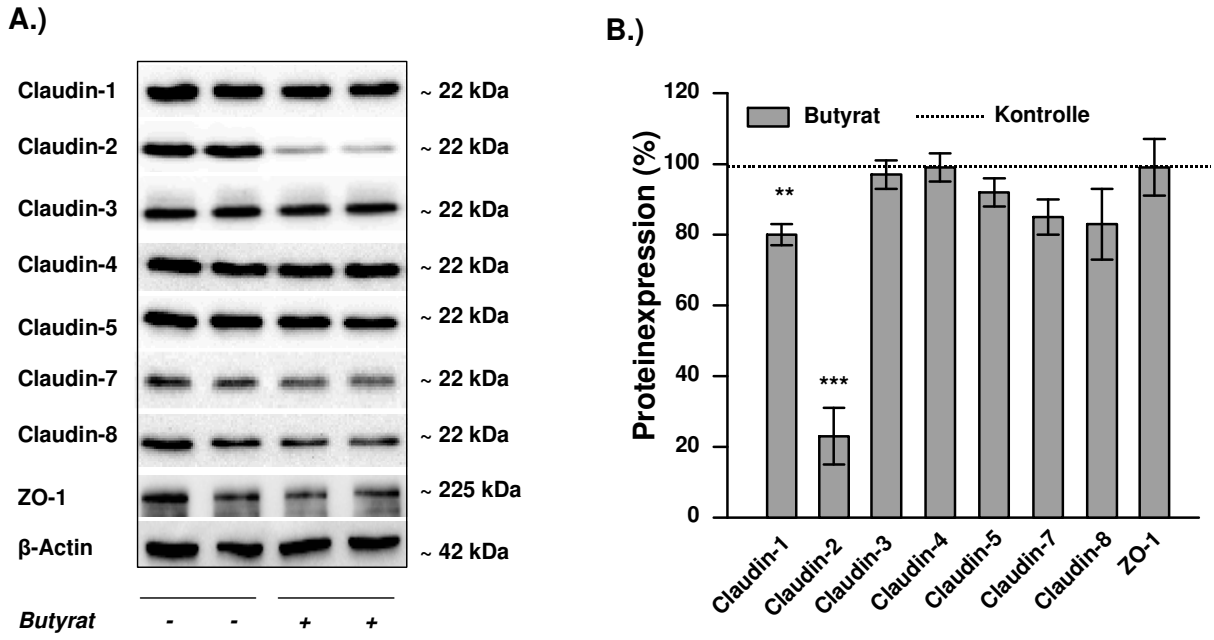


Abb. 4.4 Expression barrierererelevanter Claudine in HT-29/B6-GR/MR-Zellen unter dem Einfluss von Butyrat
A.) Zu sehen sind die Western Blots verschiedener Claudine von HT-29/B6-GR/MR-Zellen, die für 24 h mit 2 mM Butyrat behandelt wurden oder unbehandelt (Kontrolle) blieben und **B.)** die entsprechende quantitative Auswertung der relativen Proteinexpression. Unbehandelte Kontrollen wurden auf 100% gesetzt und in Relation dazu wurden die für 24 h mit 2 mM Butyrat behandelte Proben (grau) dargestellt (n = 5-7; ** p < 00,1 *** p < 0,001)

Weder für die als abdichtend geltenden Tight Junction-Proteine Claudin-4, -5 oder -8 noch für die Claudine 3 und 7 mit weniger sicher zugeordneter Funktionalität konnte eine veränderte Expression unter dem Einfluss von Butyrat dokumentiert werden. Während also die meisten abdichtenden TJ-Proteine unverändert blieben, zeigte das Poren-bildende Claudin-2 eine deutlich verminderte Expression unter dem Einfluss von 2 mM Butyrat. Eine genauere Analyse erfolgte über die densitometrische Auswertung der relativen Proteinexpression mit dem Programm AIDA (Abb. 4.4). Die Proteinexpression der einzelnen Claudine unter dem Einfluss von 2 mM Butyrat wurde dabei in Relation zur Expression unter Kontrollbedingungen gesetzt. Bei diesem Verfahren mit relativ hoher Sensitivität zeigte sich dann aber doch noch für das Protein Claudin-1 eine leicht veränderte Expression unter 2 mM Butyrat. So verringerte sich die Claudin-1-Expression nach 24 h unter dem Einfluss von 2 mM Butyrat auf 80 ± 3% ($p < 0,01$) im Vergleich zur Kontrolle. Wesentlich stärker dagegen war die Abnahme der Claudin-2-Expression, die auf 23 ± 8% ($p < 0,001$) des ursprünglichen Kontrollexpressionsniveaus reduziert war. Des Weiteren konnte in dieser Auswertung für die übrigen getesteten Tight Junction-Proteine Claudin-3 (97 ± 4%, n.s.), Claudin-4 (99 ± 4%, n.s.), Claudin-5 (92 ± 4%, n.s.), Claudin-7 auf 85 ± 5% (n.s.) und Claudin-8 (83 ± 10%, n.s.) kein Unterschied in ihrer Expression im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Auch das Tight Junction-Protein ZO-1, welches zytoplasmatisch mit den Claudinen verankert ist und die Verbindung zum Zytoskelett herstellt, wies keine Unterschiede in der Expression auf (99 ± 8%, n.s.).

Demnach konnte als wesentliches strukturelles Ergebnis dieser Arbeit eine Abnahme der Claudin-1- und -2-Expression unter dem Einfluss von 2 mM Butyrat nachgewiesen werden, wobei Claudin-2 eine wesentlich stärkere Abnahme zeigte als Claudin-1.

4.2.2 Claudin-2-Expression verschiedener Zelllinien unter Butyrat-Einfluss

Um zu testen, ob eine verminderte Proteinexpression von Claudin-2 nur in der mit dem Glucocorticoid- und Mineralcorticoid-Rezeptor transfizierten HT-29/B6-GR/MR Zelllinie unter Butyrat stattfindet, wurden weitere Zelllinien auf die Claudin-2-Expression nach Butyrat getestet (Abb. 4.5). Darunter befanden sich die Zelllinie HT-29/B6, sowie die Klone HT-29/B6-GR und HT-29/B6-MR, die nur jeweils einen der

beiden Steroid-Rezeptoren exprimieren, und die hochohmige Zelllinie T84. Alle Zelllinien, ob mit oder ohne hineintransfizierte Rezeptorausstattung, wiesen eine Abnahme der Claudin-2-Expression auf. Zusätzlich zu den hier aufgeführten Kolonkarzinom-Zellinien wurde die Claudin-2-Expression unter Butyrat-Einfluss auf MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) C11-Zellen getestet.

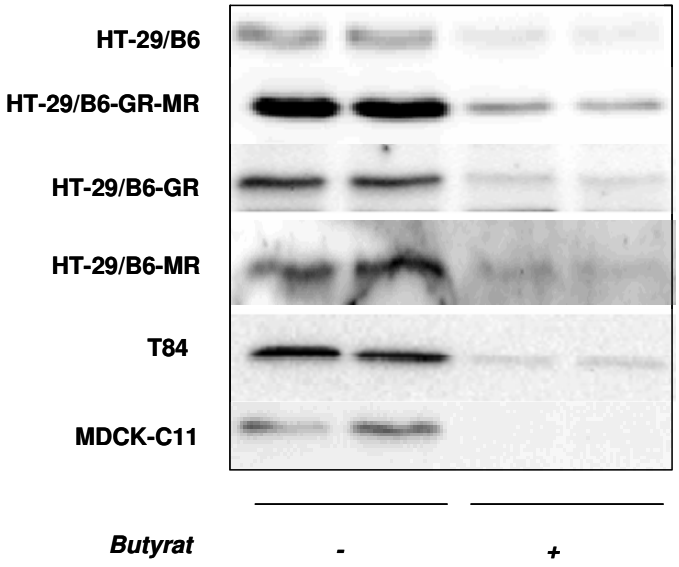


Abb. 4.5 Claudin-2-Expression unter Butyrat
Zu sehen ist die mit Hilfe der Western Blot-Analyse ermittelte Claudin-2-Expression für verschiedene Kolonkarzinom-Zelllinien und der Hundenieren-Zelllinie MDCK-C11 mit 0 (Kontrolle) bzw. 2 mM Butyrat. Die Behandlung mit 2 mM Butyrat erfolgte über 24 h

Dabei handelt es sich um einen Subklon von MDCK-Zellen aus der Hundeniere, in der im Verhältnis zu anderen MDCK-Zelllinien viel Claudin-2 exprimiert ist. Auch die MDCK C11-Zellen konnten eine Abnahme der Claudin-2-Expression unter 24stündiger Inkubation mit 2 mM Butyrat vorweisen. Da dieser Prozess in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden kann, scheint ein universeller Prozess an der Regulation beteiligt zu sein, der in jeder der hier geprüften Zelllinien durch Butyrat angeschaltet werden kann.

4.2.3 Abhängigkeit der Widerstandserhöhung von verschiedenen Konzentrationen des Butyrats

Um die Fragestellung zu klären, ob es in HT-29/B6-GR/MR-Zellen einen Zusammenhang zwischen der Widerstandsänderung und der Butyrat-Konzentration gibt, wurde der Widerstand nach 30 h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen

von Butyrat untersucht. Eingesetzt wurden 0, 0,5, 1, 2 und 5 mM Butyrat. Eine anschließende Western Blot-Analyse gab Aufschluss über die Claudin-2-Expression für verschiedene Butyrat-Konzentrationen.

Die Abbildung 4.6 A zeigt die Widerstandsänderung von HT-29/B6-GR/MR-Zellen 30 h nach der Applikation von verschiedenen Butyrat Dosen. Dabei zeigte sich insgesamt aber keine relevante Dosisabhängkeit im Bereich von 0.5 bis 5 mM. Oberhalb einer Butyrat Dosis von 1-2 mM schien der Widerstand allerdings sogar wieder rückläufig zu sein, ohne dass dies aber statistische Signifikanz erreichte.

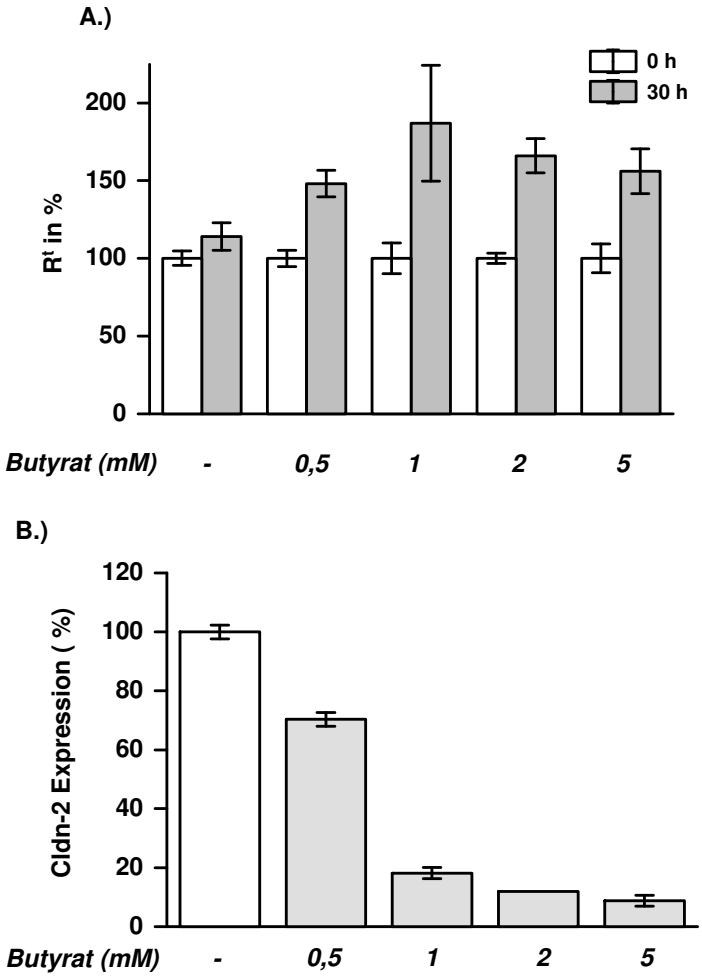


Abb. 4.6 Einfluss von verschiedenen Konzentrationen von Butyrat auf R^t und die Claudin-2-Expression
HT-29/B6-GR/MR-Klone wurden für 30 h mit 0, 0,5, 1, 2 bzw. 5 mM Butyrat behandelt. **A.)** Darstellung der Widerstandsänderung nach 30 h Behandlung der verschiedenen Butyrat-Dosen. Der Widerstand zur Zeit t_0 wurde auf 100% normiert und ins Verhältnis zu den 30 h mit Butyrat inkubierten Proben gesetzt. **B.)** Quantifizierung der Claudin-2-Expression nach Behandlung mit 0, 0,5, 1, 2 bzw. 5 mM Butyrat für 30 h

Anhand der Quantifizierung von Claudin-2 nach der Applikation der verschiedenen Butyrat Dosen, konnte gezeigt werden, dass die Abnahme der Claudin-2-Expression

in Abhängigkeit von der Butyrat-Konzentration steht (Abb. 4.6 B). Eine Abnahme der Claudin-2-Expression konnte ab einer Konzentration von 0,5 mM Butyrat gezeigt werden, wobei sich die Abnahme ungefähr auf ca. 70% der Kontroll-Konzentration von Claudin-2 belief. Schon ab einer Konzentration von 1 mM lag der Expressionspegel nur noch bei 18%. Die Claudin-2-Expression verminderte sich weiter bis zu einer Konzentration von 2 mM, um dann im Sinne einer Sättigung zu stagnieren.

4.2.4 Veränderungen des epithelialen Widerstandes und der Permeabilität im Kolonkarzinom-Zellklon HT-29/B6-GR/MR

Ob die Veränderung der Claudin-2-Expression durch Butyrat auch auf transkriptioneller Ebene erkennbar ist und eine Regulation schon in der Transkription von Claudin-2 durch Butyrat stattfindet, wurde mit Hilfe der Real Time RT-PCR untersucht, d.h. konkret ob sich die verminderte Claudin-2-Expression auch auf mRNA-Ebene bestätigt. Abbildung 4.7 zeigt die relative Genexpression von Claudin-2 nach der Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Butyrat.

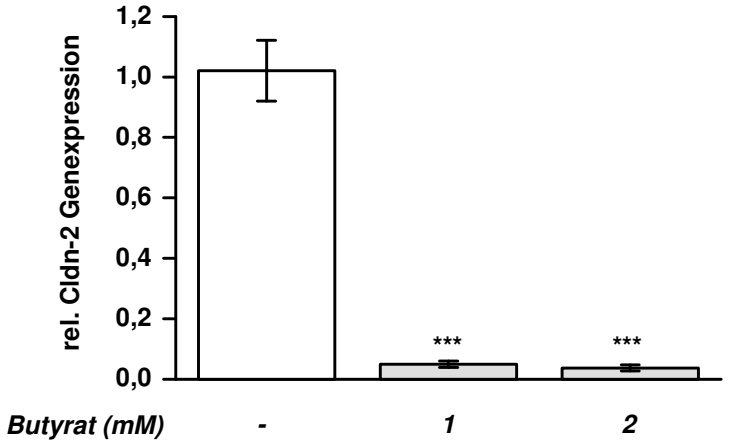


Abb. 4.7 Claudin-2-Expression unter Butyrat
Graphische Darstellung der durch quantitative Real Time PCR ermittelten Genexpression von Claudin-2 im HT-29/B6-GR/MR Zellklon nach Behandlung mit 0, 1 bzw. 2 mM Butyrat für 24 h. Die unbehandelte Kontrolle wurde auf 1 normiert und ins Verhältnis zu den behandelten Proben gesetzt (n = 6; *** $p < 0,001$)

Sowohl nach der Behandlung mit 1 mM als auch mit 2 mM Butyrat über 24 h konnte eine stark verminderte Claudin-2-Expression auf mRNA-Ebene im Vergleich zu unbehandelten Proben erfasst werden. Dabei belief sich die Verminderung nach der Inkubation mit 1 mM Butyrat auf eine relative Genexpression von 0,05 ± 0,01 (p <

0,001) und mit 2 mM Butyrat auf eine relative Genexpression von 0,04 ± 0,01($p < 0,001$).
Somit konnte die vorher festgestellte Verminderung von Claudin-2 durch Butyrat auf Proteinebene auch auf mRNA-Ebene gezeigt werden.

4.2.5 Lokalisation von Claudin-2 in der Tight Junction unter Butyrat

Ein erhöhter elektrischer Widerstand im Sinne einer Barriere-Stabilisierung kann prinzipiell auch auf eine Umverteilung von Tight Junction-Proteinen zurückzuführen sein. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung und anschließender Analyse am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop wurde die Verteilung von Claudin-2 innerhalb der HT-29/B6-GR/MR Klone nach Applikation von 2 mM Butyrat zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Die immunhistochemischen Färbungen sind in Abbildung 4.8 zu sehen. Als Referenz für die Lokalisation innerhalb der Tight Junction wurde das Tight Junction-Protein ZO-1 (grün) angefärbt. Bei den einzelnen Bildern handelt es sich um identisch aufgenommene „z-Stacks“, die auf eine Ebene projektiert wurden. Die Färbungen erfolgten 0, 8, 24 und 48 Stunden nach der Applikation von 2 mM Butyrat. Zum Zeitpunkt t_0 konnte ein deutliches Tight Junction-Strandnetzwerk sowohl für ZO-1 (grün) als auch für Claudin-2 (rot) ausgemacht werden. Außerdem konnten zu den Claudin-2 Signalen, die in der Tight Junction lokalisiert sind, auch noch starke außerhalb der Tight Junction und innerhalb der Zelle lokalisierte Signale beobachtet werden. Nach einer Inkubation von 8 h mit 2 mM Butyrat scheint das Claudin-2-Strandnetzwerk weiterhin zu bestehen und steht im Einklang mit dem durch ZO-1 markierten Tight Junction-Strandnetzwerk. Auffällig sind aber bereits die fehlenden Signale von Claudin-2 außerhalb der Tight Junction. Signale, die zuvor innerhalb der Zellen deutlich vorhanden waren, schienen durch Butyrat-Zugabe komplett eliminiert zu werden. Nach 24-stündiger Applikation von Butyrat war nicht nur das Signal innerhalb der Zelle verschwunden, sondern auch in der Tight Junction zeigte sich eine merkliche Abnahme des Claudin-2-Signals, während ZO-1 ein gleichbleibendes Tight Junction-Strandnetzwerk zeigte. Auffällig ist die Tatsache, dass es Abschnitte gibt, in denen das Claudin-2-Signal um bestimmte Zellen herum immer noch relativ stark ist, während es in anderen Bereichen des Monolayers bereits komplett aus der Tight Junction verschwunden ist.

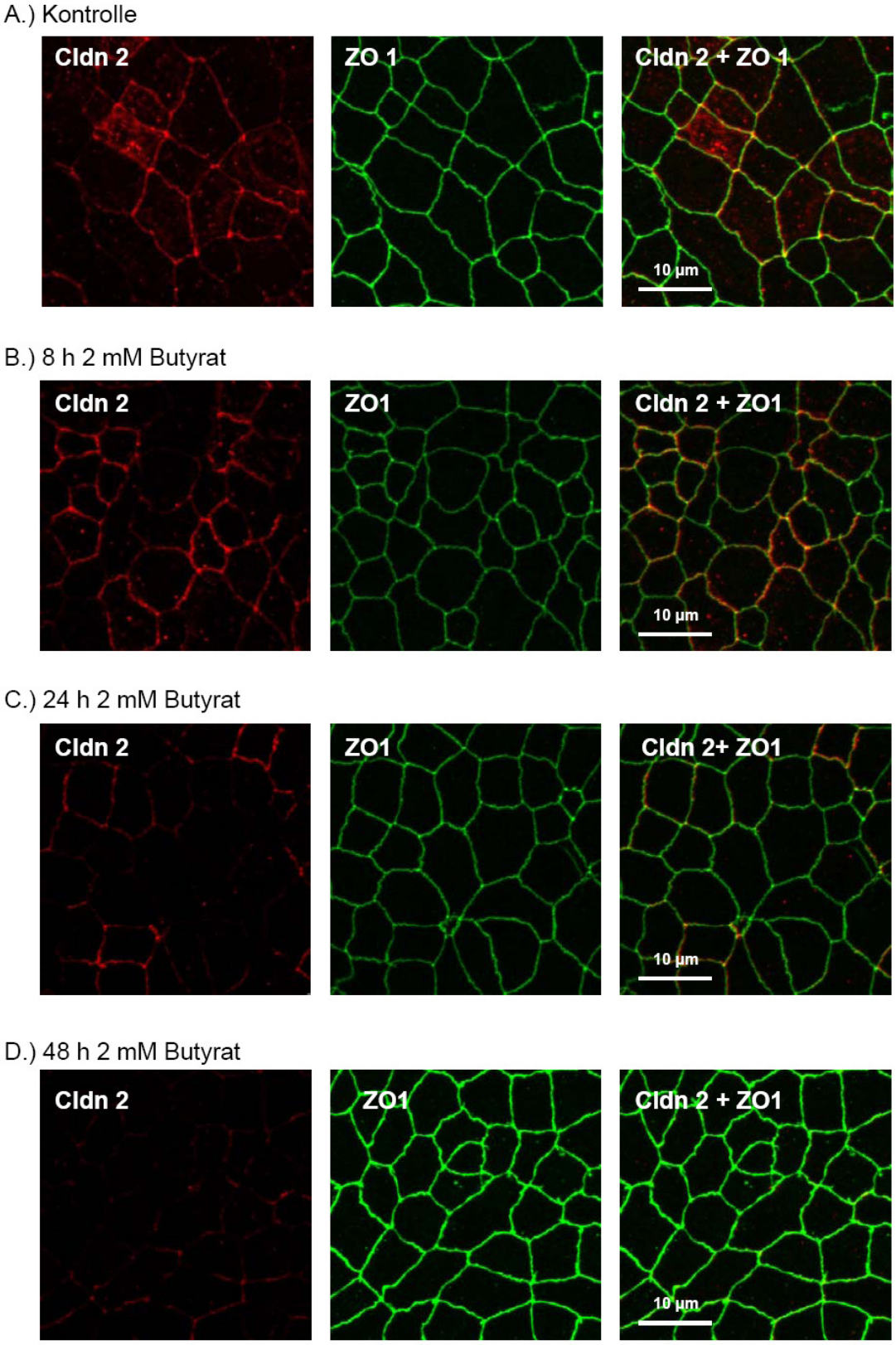


Abb. 4.8 Konfokale Bilder aus der Zeitreihe von Claudin-2 und ZO-1 nach Butyrat-Behandlung
Zu sehen sind Immunfluoreszenzbilder von Claudin-2 (rot) und Z-O1 (grün) nach unterschiedlichen Einwirkzeiten von 2 mM Butyrat (0 h, 8 h, 24 h, 48 h). Dafür sind 3-dimensionale „z-Stacks“ in eine Ebene projektiert worden

Dieser Effekt intensiviert sich nach einer Butyrat Einwirkzeit von 48 h. Das ZO-1-Strand-Netzwerk zeigt nach wie vor keine Änderung und bildet ein geschlossenes Netz, während Claudin-2 kaum noch in der Tight Junction lokalisiert werden kann und das Signal immer schwächer zu werden scheint. Die immunhistochemischen Analysen von fluoreszenzmarkiertem Claudin-2 nach der Applikation von 2 mM Butyrat weisen demnach darauf hin, dass Claudin-2 zunächst eine deutliche Abnahme innerhalb der HT-29/B6-GR/MR-Zellen erfährt, zu späteren Zeitpunkten allerdings auch in höherem Maße aus der Tight Junction verschwindet. Auch eine 3-dimensionale Aufnahme, im „z-Stack“ dargestellt, zeigt eine offensichtliche Verminderung von, in der Tight Junction lokalisiertem, Claudin-2 (Abb. 4.9).

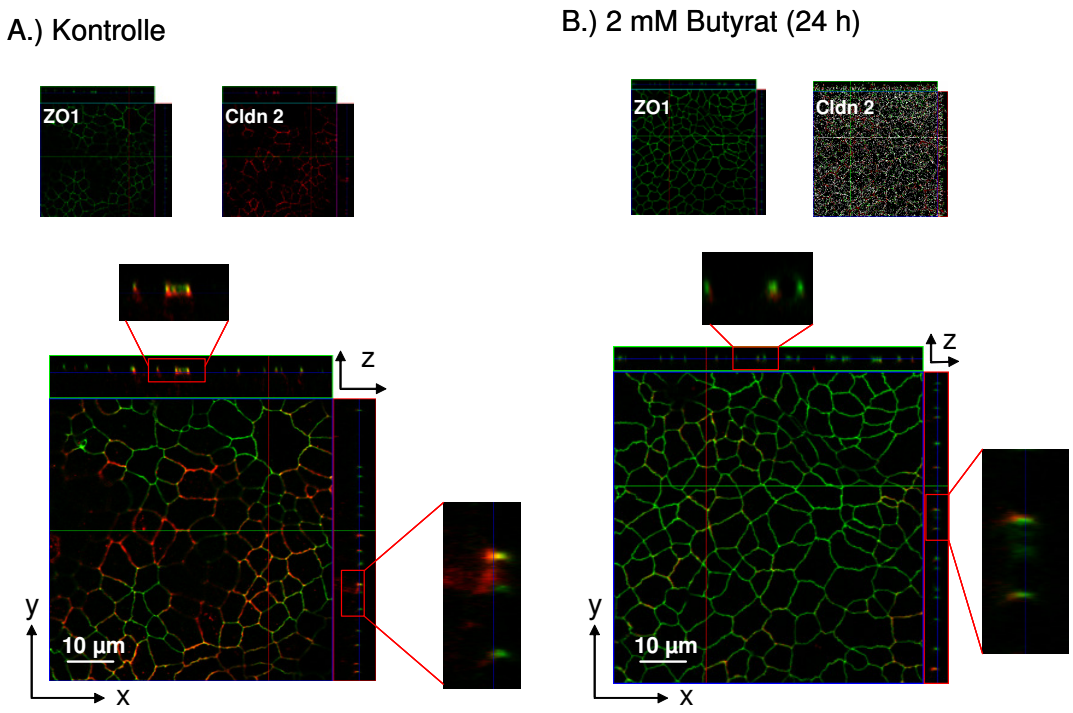


Abb. 4.9 Claudin-2 Lokalisation innerhalb der Tight Junction
3-dimensionale Aufnahme mittels „z-Stack“ **A.)** vor und **B.)** nach Inkubation mit 2 mM Butyrat für 24 h. X- und y-Achse beschreiben die 2-dimensionale Aufsicht auf einen HT-29/B6-GR/MR Monolayer. Die z-Achse beschreibt die Ebene durch die Zellen und zeigt im rot eingerahmten Kasten eine Zoom-Ansicht. ZO-1 (grün) diente als Tight Junction Marker, um die Lokalisation von Claudin-2 (rot) festzustellen. Aufeinanderlagerung der ZO-1 und Claudin-2 Signale erscheinen gelb (merge)

Innerhalb der Kontrollen war besonders in den trizellulären Kontakten der Tight Junction eine Kolokalisation von ZO-1 und Claudin-2 zu vermerken (Abb. 4.9), die sich gelb darstellte. Zudem war auffällig, dass sich das rote Claudin-2-Signal auch noch entlang der Zellmembran in basaler Richtung ausgebreitet hat. Im Gegensatz

dazu unterschieden sich die Claudin-2-Signale nach 24-stündiger Applikation mit 2 mM Butyrat. So zeigt die Abbildung 4.9 B, dass kaum noch eine Kolokalisation von Claudin-2 mit ZO-1 vorhanden war. Außerdem war das Claudin-2-Signal in der basolateralen Zellmembrandomäne und innerhalb der Zelle komplett verschwunden.

Butyrat induziert somit zunächst eine Verminderung von Claudin-2 innerhalb der Zelle und später auch in der Tight Junction.

4.2.6 Butyrat-Einfluss bei subkonfluenten Zellen

Claudin-2 spielt bei der Differenzierung verschiedener Zelllinien eine große Rolle, da das Protein beispielsweise bei nicht ausdifferenzierten Zellen (Caco-2, HT-29) stark exprimiert wird, während eine Expression bei ausdifferenzierten Zellen nur noch vermindert stattfindet. Auch Butyrat ist dafür bekannt, Einfluss auf Differenzierungsprozesse zu nehmen.

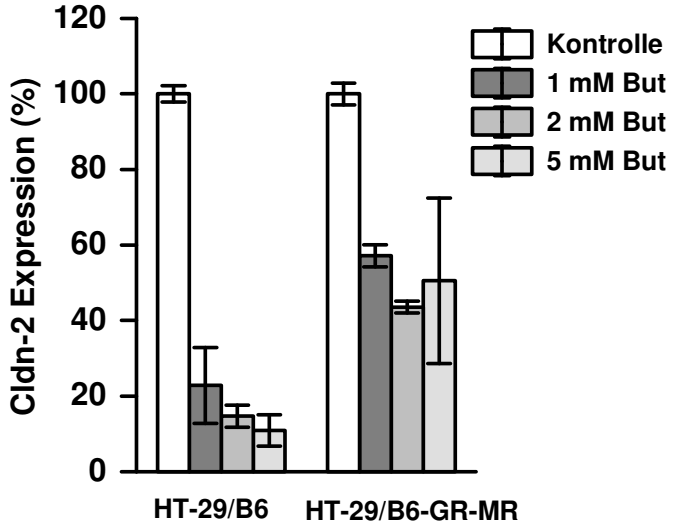


Abb. 4.10 Claudin-2 (Cldn-2) Expression nach Butyrat in subkonfluenten Zellen
Zu sehen ist die relative Proteinsynthese von Claudin-2 in subkonfluenten Zellen der Zelllinie HT-29 (links) und beim Klon HT-29/B6-GR/MR (rechts). Es erfolgte eine Inkubation über 24 h mit 0, 1, 2 und 5 mM Butyrat. Unbehandelte Proben dienten zur Kontrolle und wurden auf 100% normiert, die mit verschiedenen Dosen Butyrat behandelten Proben wurden dazu dann ins Verhältnis gesetzt (n=2)

Um einen Anhaltspunkt dafür zu erhalten, ob die Effekte von Butyrat differenzierungs-spezifisch sein könnten, wurde mittels Western Blot-Analyse auf Proteinebene untersucht, ob Butyrat einen unterschiedlichen Einfluss auf konfluente und damit ausdifferenzierte Zellen und subkonfluente und somit nicht ausdifferenzierte Zellen hat. Dazu wurden Zellen der Zelllinie HT-29/B6 und des

Klons HT-29/B6-GR/MR sowohl in subkonfluentem als auch in konfluentem Zustand für 24 h mit Butyrat inkubiert. Die graphische Darstellung der Proteinquantifizierung von Claudin-2 für verschiedene Butyrat-Konzentrationen zeigt Abb. 4.10 und zwar sowohl für HT-29/B6-Zellen als auch für HT-29/B6-GR/MR-Zellen. Dabei fand sich auch im subkonfluenten Zustand eine dosisabhängige Abnahme von Claudin-2 unter dem Einfluss von Butyrat.

4.2.7 Einfluss von Butyrat und Trichostatin A (TSA) auf die Genexpression von Claudin-2

Butyrat ist ein bekannter Histon-Deacetylase-Inhibitor (HDACi) und sorgt durch Hyperacetylierung von Histonen für eine leichtere Zugänglichkeit von Transkriptionsfaktoren an DNA-Abschnitte, die an Histone binden. Wie bei Butyrat handelt es sich bei Trichostatin A (TSA) ebenfalls um einen HDACi. Sollte TSA die gleiche Wirkung auf die Genexpression von Claudin-2 haben, könnte dies ein indirekter Hinweis darauf sein, dass das Claudin-2 Gen auf transkriptioneller Ebene in Folge einer Histon-Modifikation durch Butyrat reguliert wird.

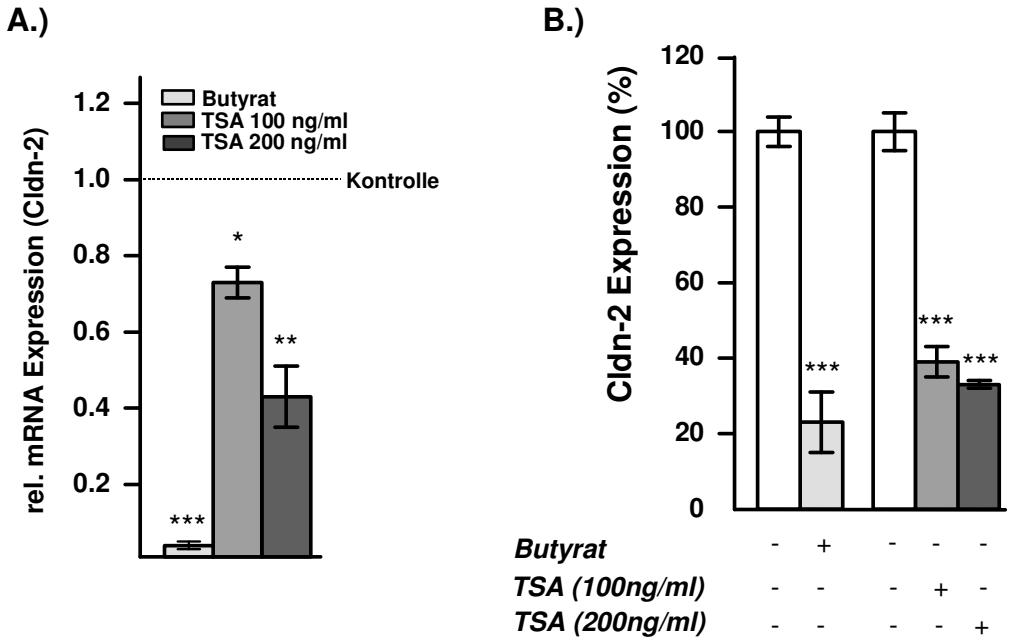


Abb. 4.11 Wirkung von TSA auf die Claudin-2 (Cldn-2)-Expression
Graphische Darstellung **A.)** der relativen mRNA-Konzentration mittels Real Time RT-PCR und **B.)** Proteinkonzentration mittels Western Blot Analyse von Claudin-2 nach Zugabe von 100 bzw. 200 ng/ml TSA für 24 h. Die Kontrolle wurde zum Vergleich auf 1 bzw. 100% normiert (n = 3-6; * $p < 0,05$, *** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

Mittels Western Blot Analyse wurde bestimmt, inwieweit sich die Claudin-2-Expression unter dem Einfluss verschiedener TSA-Dosen (100 ng/ml oder 200 ng/ml) verändert. Abbildung 4.11 A zeigt die Claudin-2-mRNA-Konzentration nach einer Behandlung der Zellen mit 2 mM Butyrat oder 100 bzw. 200 ng/ml TSA. Im Verhältnis zur Kontrolle verminderte sich die Claudin-2-mRNA-Konzentration unter dem Einfluss von Butyrat um das 25fache (0,04 ± 0,01; $p < 0,001$). Konzentrationsabhängig konnte auch eine Claudin-2 Verminderung sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene in Antwort auf TSA nachgewiesen werden (Abb. 4.11 A + B). So konnte eine Verminderung der Claudin-2-mRNA um ca. 30% für 100 ng/ml ($p < 0.05$) und um ca. 50% für 200 ng/ml TSA ($p < 0,05$) bei 24stündiger Inkubation festgestellt werden. Auf Proteinebene belief sich die Reduktion der Claudin-2-Expression bei einer Stimulation mit 100 ng/ml TSA für 24 h auf 39 ± 4% ($p < 0,001$) und bei einer Stimulation mit 200 ng/ml TSA für 24 h auf 33 ± 1% ($p < 0,001$). Eine Verminderung von Claudin-2 auf mRNA- und Proteinebene wird also sowohl durch Butyrat als auch durch TSA induziert. Allerdings war die Reduktion durch TSA nicht ganz so ausgeprägt wie die durch Butyrat.

4.3 Durch Butyrat induzierte Mechanismen zur Reduzierung der Claudin-2-Expression

Eine Reduzierung der Claudin-2-Expression kann verschiedene Ursachen haben, die im folgenden Teil untersucht wurden. Um aufzuschlüsseln, auf welchem Wege Butyrat die Claudin-2-Expression vermindert, wurde sowohl die mRNA und Protein Stabilität unter dem Einfluss von Butyrat ermittelt als auch wurden Bindeaffinitätsstudien am Claudin-2-Promotor in Form von ChIP´s für acetyliertes Histon H3, sowie EMSA´s bzw. „*Supershift*"-Analysen für die Claudin-2 relevanten Transkriptionsfaktoren vorgenommen.

4.3.1 Proteinstabilität von Claudin-2 unter Butyrat Einfluss

Ein möglicher Grund für die verminderte Expression von Claudin-2 unter dem Einfluss von Butyrat kann die Veränderung der Halbwertszeit des Proteins sein. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurde die Proteinbiosynthese konfluenter HT-29/B6-GR/MR durch Cycloheximid (Chx) gehemmt und anschließender 2 mM Butyrat zugegeben. Im Folgenden wurden die Proteine zu verschiedenen Zeitpunkten isoliert und Claudin-2 wurde jeweils mittels Western Blot Analyse quantifiziert. Durch die so zu den verschiedenen Zeitpunkten ermittelten Werte wurde eine Regressionsgerade gelegt und mit einer entsprechenden Funktionsgleichung ausgewertet (Abb. 4.12). Auf diese Weise konnte die Halblebenszeit bestimmt werden, wobei die Claudin-2-Konzentration zum Zeitpunkt t_0 immer auf 100% gesetzt wurde. In Abbildung 4.12 sind die Regressionsgeraden für die Proben, die mit 2 mM Butyrat behandelt wurden, und für die unbehandelten Proben der Kontrolle gezeigt. Für die mit 2 mM Butyrat behandelten Proben ergab sich eine Regressionsgleichung von $f_{(x)} = -5{,}9149x + 100$ und für die unbehandelten Proben von $f_{(x)} = -6{,}7298x + 100$. Für $f_{(x)} = 50$ ergibt sich daraus eine Halblebenszeit für Claudin-2 bei Butyrat behandelten Proben von 8 Stunden und für die Kontrollen von 7 Stunden. Demnach wäre die Halbwertszeit von Claudin-2 unter Butyrat tendenziell sogar eher erhöht als erniedrigt, was das Verschwinden von Claudin-2 nach Butyrat-Zugabe also in keiner Weise erklären kann.

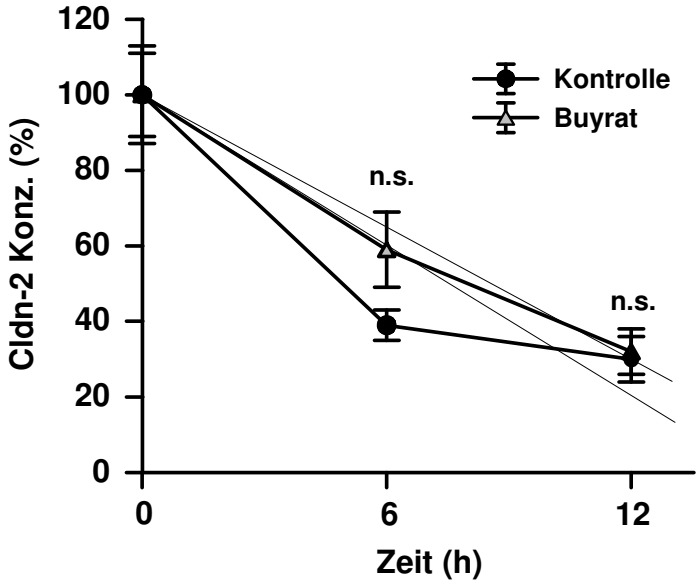


Abb. 4.12 Proteinstabilität von Claudin-2 in HT-29/B6-GR/MR-Zellen
Graphische Darstellung der Protein-Halblebenszeit von Claudin-2 in HT-29/B6-GR/MR-Zellen, quantifiziert mittels Western Blot-Analyse. Nach Hemmung der Protein-Synthese durch Cycloheximid erfolgte eine Zugabe von 2 mM Butyrat. Die Kontrolle blieb nach der Cycloheximid-Zugabe unbehandelt (n = 6; n.s.)

4.3.2 mRNA-Stabilität von Claudin-2 unter Butyrat-Einfluss

Butyrat ist bekannt dafür, die mRNA-Stabilität bestimmter Gene zu beeinflussen und über diesen Weg die Proteinsynthese zu regulieren. Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR sollte Aufschluss über diese Möglichkeit der Regulation der Claudin-2-Synthese durch Butyrat gegeben werden. Actinomycin D (Act D) hemmt den Transkriptionsvorgang von DNA in mRNA, so dass Veränderungen im Abbau der mRNA durch Butyrat verfolgt werden können.

Zu diesem Zweck wurden konfluente HT-29/B6-GR/MR-Zellen für 1 h mit 7 µg/ml Actinomycin D vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit 0 bzw. 2 mM Butyrat für 3, 6 und 12 Stunden. Die Aufklärung der Halblebenszeit der Claudin-2-mRNA erfolgte durch das Setzen einer Regressionsgeraden durch die Werte der relativen mRNA-Konzentration von Claudin-2 zu den verschiedenen Zeitpunkten (Abb. 4.13). Für die Auswertung wurde die Claudin-2-Expression zum Zeitpunkt t_0 immer auf 1 eingesetzt. Die Konzentrationen der mRNA zu den folgenden Zeitpunkten wurden in Relation zu dem Wert zum Zeitpunkt t_0 gesetzt.

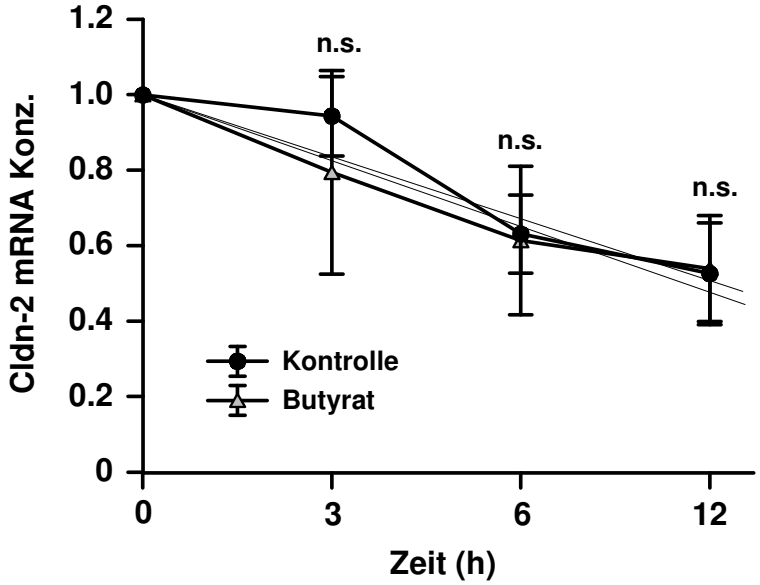


Abb. 4.13 mRNA-Stabilität von Claudin-2 (Cldn-2) in HT-29/B6-GR/MR-Zellen
Graphische Darstellung der Halblebenszeit der mRNA von Claudin-2 in HT-29/B6-GR/MR-Zellen mittels quantitativer RT-PCR nach Hemmung der mRNA-Synthese durch Actinomycin D (7 µg/ml, 1 h vorinkubiert) und anschließender Zugabe von 0 (Kontrolle) bzw. 2 mM Butyrat. Alle Werte für t_3, t_6 und t_{12} wurden auf die entsprechenden t_0-Werte bezogen, die auf 1 normiert wurden (n = 6; n.s)

Dabei ergab sich für die unbehandelten Proben eine Regressionsgerade der Claudin-2-mRNA-Konzentrationen von $f_{(x)} = -0{,}0426x + 1$ und für die mit 2 mM Butyrat behandelten Proben von $f_{(x)} = -0{,}0447x + 1$. Die errechnete Halbwertszeit $f_{(x)} = 50$ lag somit für die Kontroll-mRNA bei 11,7 h und für die mRNA der Butyrat behandelten Proben bei 11,2 h. So zeigte sich nach 3 Stunden ein leichter Abbau der Claudin-2-mRNA (0,94 ± 0,06), während unter 2 mM Butyrat nur eine marginale Tendenz in Richtung einer Erhöhung zu verbuchen war (0,80 ± 0,06, n.s.). Nach 6 Stunden wurde eine Verminderung der mRNA-Konzentration für die Kontrolle von 0,63 ± 0,06 und für die Butyrat behandelten Proben von 0,61 ± 0,11; n.s. sichtbar, was in beiden Gruppen jeweils etwa 2/3 der Ursprungskonzentration entspricht. Somit konnte keine signifikante Veränderung der mRNA-Stabilität für Claudin-2 durch Butyrat nachgewiesen werden.

4.3.3 Bindungsaffinität verschiedener Claudin-2-Promotorabschnitte an Acetyl-Histon-3

Eine Regulierung der Genexpression kann durch die Modifikation von Histonen verursacht werden, da z.B. eine Acetylierung der Histone H3 und H4 maßgeblich an der Zugänglichkeit verschiedener Transkriptionsfaktoren an die Promotorregion

verschiedener Gene beteiligt ist. Im Folgenden wurde zunächst untersucht, ob es eine veränderte Acetylierung von Histon 3 (H3) unter dem Einfluss von Butyrat im Klon HT-29/B6-GR/MR gibt. Mittels ChIP-Analysen (Chromatin-Immunopräzipitation) und anschließender Western Blot-Analyse wurde dafür auf Proteinebene geklärt, ob es eine Veränderung in der Menge von acetyliertem Histon 3 unter Butyrat-Einfluss gibt (Abb. 4.14).

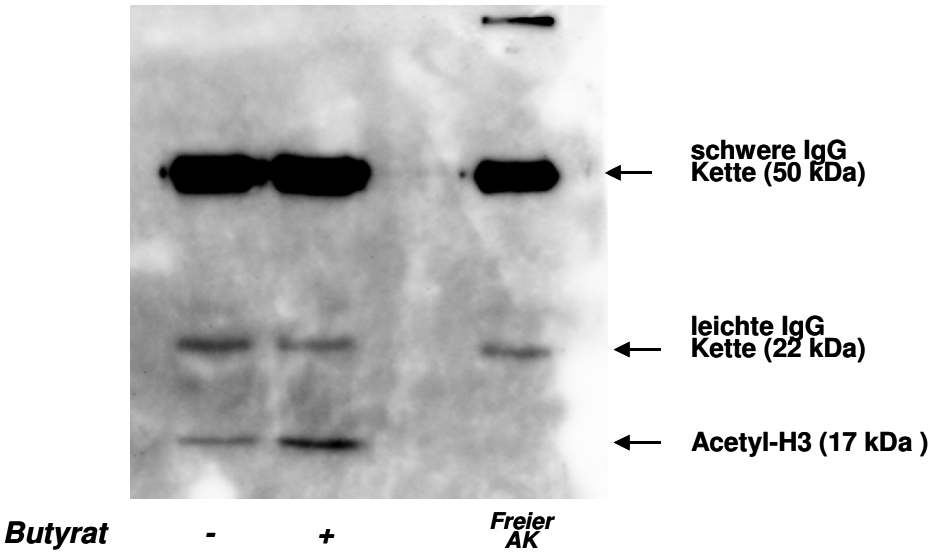


Abb. 4.14 ChIP für Acetyl-H3 unter Butyrat-Einfluss
Darstellung eines Western Blots nach einer IP mit einem Acetyl-H3-Antikörper. Zu sehen sind die verschiedenen Banden der leichten und schweren IgG-Kette und das acetylierte Protein H3 als Kontrolle unbehandelt und nach einer Inkubation für 24 h mit 2 mM Butyrat

Nach einer Behandlung von HT-29/B6-GR/MR-Zellen mit 2 mM Butyrat für 24 Stunden konnte eine Verdoppelung (Kontrolle = 100%, Butyrat = 188%) in der Menge von acetyliertem H3 festgestellt werden. So ist die gesamte Menge an DNA-assoziiertem acetyliertem H3 nach der Behandlung mit Butyrat in HT-29/B6-GR/MR-Zellen ungefähr doppelt so hoch wie im unbehandelten Zustand.

Wie viel acetyliertes Histon H3 letztendlich an bestimmte DNA-Abschnitte des Claudin-2-Promotors gebunden hat, wurde anhand einer ChIP mit anschließender Real Time PCR ermittelt. Dabei konzentrierte ich mich auf die Region direkt im Claudin-2-Promotor, mit den meisten relevanten Transkriptionsbindestellen des Claudin-2 Gens (Abb. 4.15).

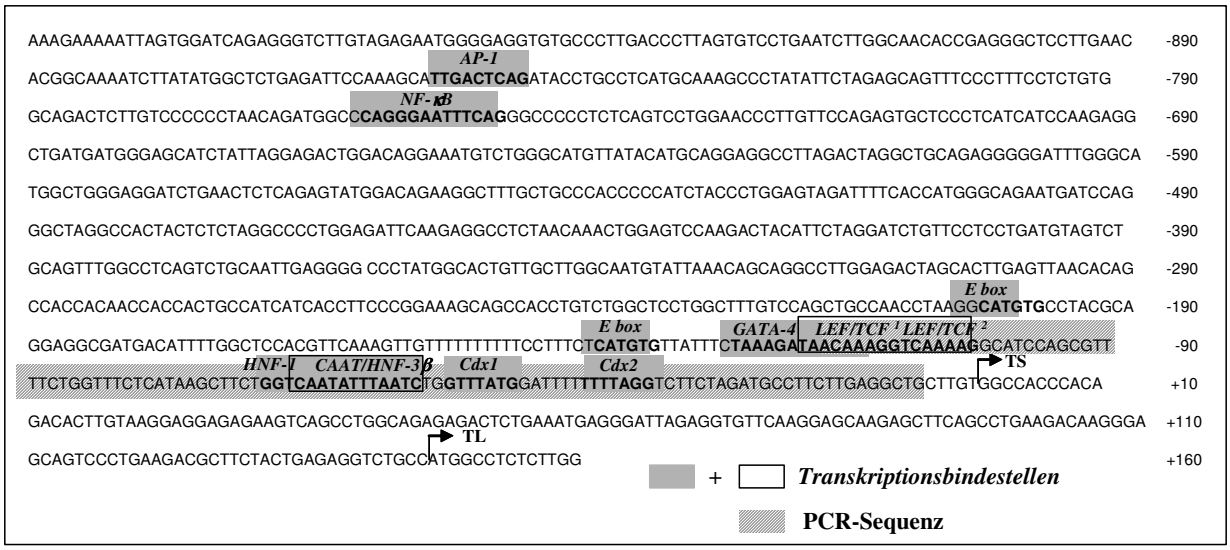


Abb. 4.15 Verwendete Region zur ChIP Analyse
Mittels ChIP-Analyse getesteter Promotorabschnitt von Claudin-2 (grau gestrichelt), mit den entsprechenden Bindesequenzen (grau untermalte Regionen und schwarzer Kasten). Transkriptionsstart (TS) und Translationsstart (TL) sind durch Pfeile gekennzeichnet

Die über Real Time RT-PCR ermittelten relativen DNA-Konzentrationen der getesteten Region, die an acetyliertes H3 gebunden war, wurden graphisch dargestellt. Die Abbildung 4.16 zeigt die logarithmische Darstellung der Konzentration an Acetyl-H3 gebundener DNA für die Claudin-2-Promotorregion, die aufgrund ihrer diversen Transkriptionsbindestellen besonders interessant war. Dabei wurde die Konzentration nach 2, 6 und 24 Stunden ermittelt. Als Positivkontrolle (INPUT) wurde die Gesamt-DNA vor der Immunopräzipitation mit dem Acetyl-H3-AK verwendet. Als Negativkontrolle dienten Proben, die statt mit dem Acetyl-H3-AK mit einem Immunglobulin (IgG) AK behandelt wurden.

Wie anhand der Abbildung 4.16 zu sehen ist, konnte keine Konzentrationsveränderung der an Acetyl-H3 gebundenen DNA der Promotorregion nach 2-stündiger Inkubation mit 2 mM Butyrat ermittelt werden. Nach der Normierung der DNA-Konzentration für die Kontrolle auf 1 (± 0,14) betrug die DNA-Konzentration im Vergleich dazu für die Butyrat behandelten Proben 1,34 (± 0,14, n.s.), was einer Steigerung von ca. 1/3 entspricht. Der Anteil unspezifischer Bindungen, durch IgG dargestellt, betrug im Vergleich sowohl in der Kontrolle als auch bei Butyrat behandelten Proben 0,1 und war somit 10fach geringer, so dass diese nicht berücksichtigt wurden.

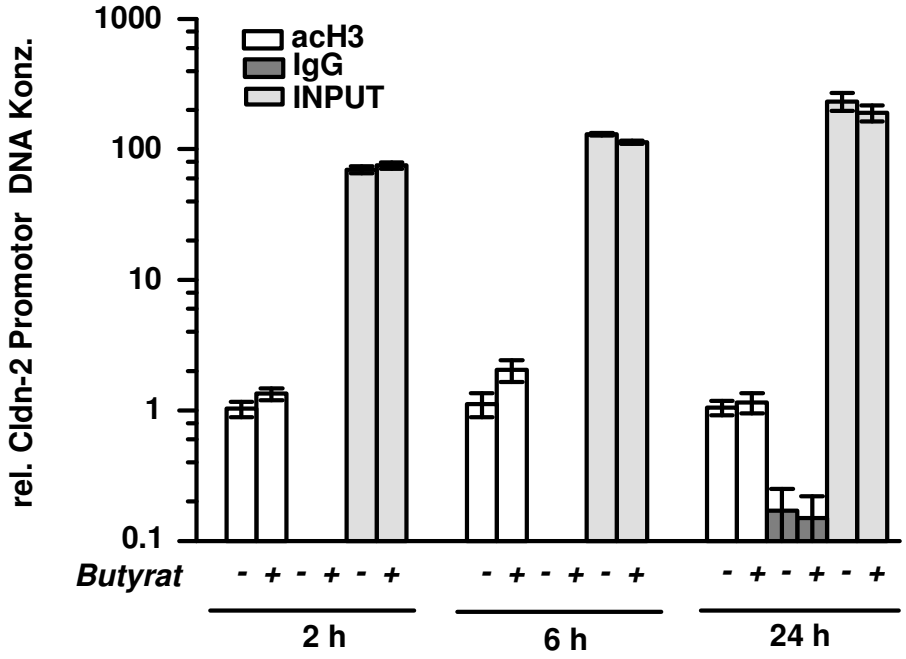


Abb. 4.16 Relative DNA-Menge nach ChIP mit einem Acetyl-H3-AK
Dargestellt ist die durch Real Time RT-PCR ermittelte DNA-Konzentration der Promotorregion nach einer Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) mit einem Acetyl-H3-Antikörper (acH3). Eine Inkubation mit 2 mM Butyrat erfolgte für 2 h, 6 h und 24 h. Mitgeführt wurde eine Negativkontrolle (IgG) und die eingesetzte Gesamt-DNA als Positivkontrolle (INPUT). Unbehandelte Proben wurden zum Vergleich auf 1 normiert (n = 6, n.s.)

Nach 6stündiger Butyrat Behandlung hat sich die an Acetyl-H3 gebundene DNA-Konzentration verdoppelt (2,04 ± 0,39; n.s.). Auch nach 24-stündiger Inkubation mit Butyrat ist keine signifikante Veränderung der Konzentration der an Acetyl-H3 gebundenen DNA zu vermerken. Im Vergleich zur Kontrolle (1,05 ± 0,13) liegt die DNA Konzentration hier bei 1,15 ± 0,20 (n.s.). Somit konnte für keinen der 3 getesteten Zeitpunkte eine veränderte Bindung von acetyliertem H3 an den Promotorbereich von Claudin-2 beobachtet werden.

4.3.4 Bindeverhalten von Transkriptionsfaktoren an verschiedene Transkriptionsfaktor-Bindestellen im Claudin-2-Promotor

Außer einer veränderten Histonacetylierung kann auch die Bindeaffinität von entsprechenden Transkriptionsfaktoren an die Promotorregion bestimmter Gene für deren Regulation verantwortlich sein. Im Falle von Claudin-2 gibt es verschiedene potentielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren im Promotor (Abb. 4.15). Mit Hilfe von EMSAs (*engl. electrophoretic mobility shift assay*) wurde untersucht, ob es Unterschiede in der Bindungsaffinität zu potentiellen Transkriptionsbindestellen im

Claudin-2-Promotor gibt. Untersucht wurden dabei die Bindestellen für AP-1, NF-κB, Cdx1, Cdx2, HNF und GATA-4 (Abb. 4.17, Spur 1-12).

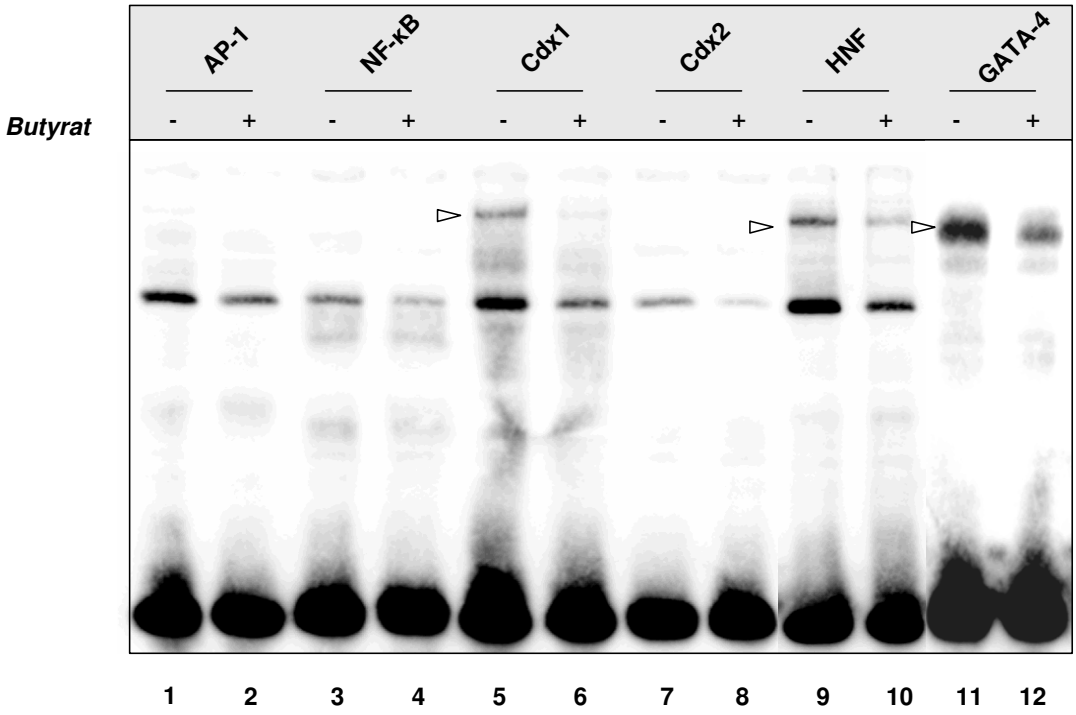


Abb. 4.17 EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)
Dargestellt sind die Bindungsaffinitäten zu verschiedenen Transkriptionsbindestellen im Claudin-2-Promotor in Form von „*Shifts*" für verschiedene Bindungsstellen und zwar für unbehandelte oder mit Butyrat (2 mM, 24 h) behandelte Proben. Die Pfeile kennzeichnen die detektierten „*Shifts*" der jeweiligen Bindungsstellen

Abbildung 4.17 zeigt einen EMSA für diese Bindestellen vor und nach der Behandlung mit 2 mM Butyrat. Die Banden weisen auf Bindeaffinitäten zu der entsprechenden Bindestelle hin. Bei nahezu allen hier aufgeführten Bindestellen ist eine unspezifische Bande auf gleicher Höhe festzustellen gewesen. Banden auf anderer Höhe, die auf eine spezifische Bindung hinweisen, konnten nur für die Bindestellen der Transkriptionsfaktoren Cdx1, HNF und GATA-4 nachgewiesen werden (Abb. 4.17, Spur 5, 9 und 11), während für die Bindestellen AP-1, NF-κB und Cdx2 keine Bindeaffinität zu Proteinen gezeigt werden konnten (Abb. 4.17, Spur 1, 3 und 7). Die Bindeaffinität zu Cdx1, HNF und GATA-4 ist in allen Fällen durch Butyrat in unterschiedlichem Maße verringert (Abb. 4.17, 10 + 12). Als potentielle Kandidaten für die von Butyrat verursachte Herabregulierung von Claudin-2 konnten somit Cdx1, Vertreter der HNF-Familie und GATA-4 ausgemacht werden.

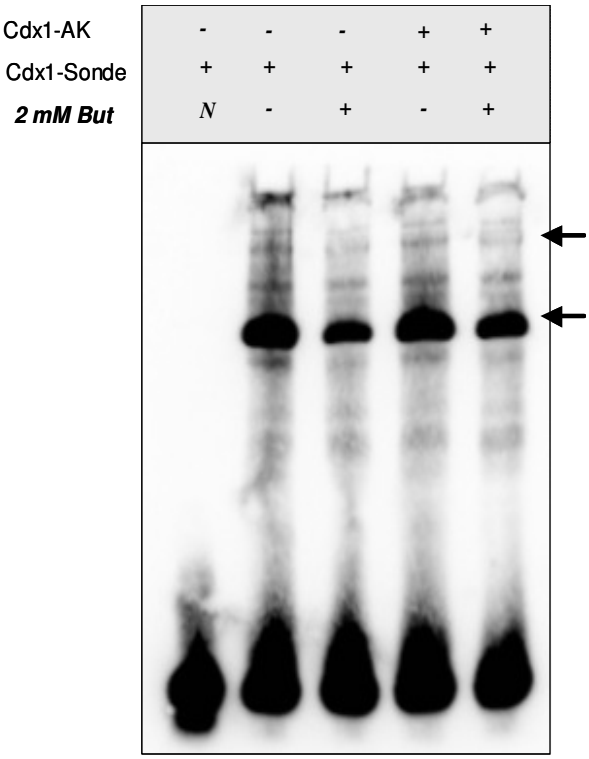
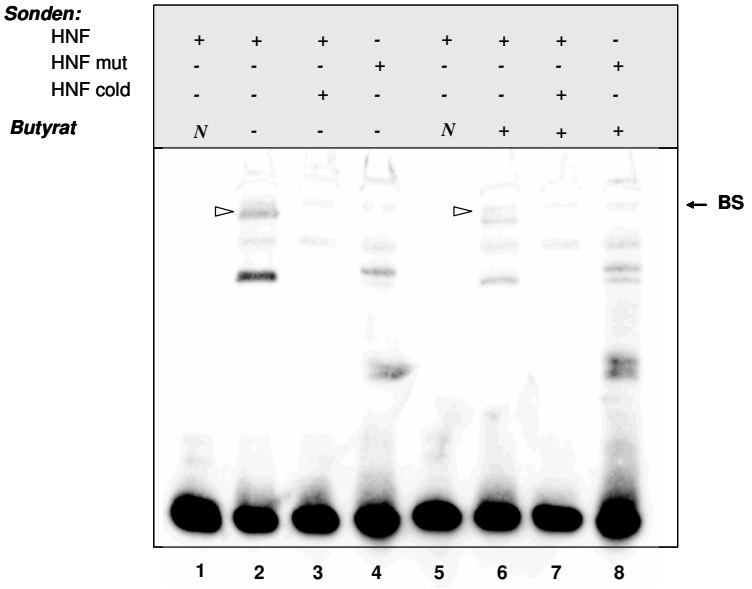


Abb. 4.18 Supershift der Cdx1 Bindestelle von HT-29/B6-GR/MR-Zellen
Band Shift und Supershift nach Behandlung mit 2 mM Butyrat (24 h) und ohne Behandlung. Als Negtivkontrolle (N) diente ein Probenansatz ohne nuklearen Extrakt. Die Pfeile zeigen die entsprechenden *Shifts*

Des Weiteren musste bewiesen werden, dass die im EMSA dargestellten Protein-DNA-Komplexe auch Transkriptionsfaktor-spezifisch waren. Zu dieser Konfirmation bedurfte es der Methode des „*Supershift Assay*“. Im Gegensatz zum EMSA wurde dabei mittels eines für den jeweiligen Transkriptionsfaktor spezifischen Antikörpers der entsprechende AK-Transkriptionsfaktor-DNA-Komplex (SS) sichtbar gemacht. Dieser zeichnete sich durch eine Bande leicht oberhalb der vorher ermittelten EMSA-Bande (BS) ab. Innerhalb dieser Arbeit wurde der „*Supershift Assay*“ für die Transkriptionsfaktoren Cdx1 und verschiedene Vertreter der HNF-Familie durchgeführt. Der „*Supershift*“ für Cdx1 konnte dabei keine Bande oberhalb der „*Band Shift*“-Bande nachweisen (Abb. 4.18, Spur 4 + 5). Anders verhielt es sich für die verschiedenen Antikörper der HNF-Familie. Abbildung 4.19 zeigt zunächst die Bindeaffinität zur HNF-Bindestelle vor und nach Butyrat-Stimulation (Abb. 4.19 A; Spur 2 + 6).

A.)



B.)

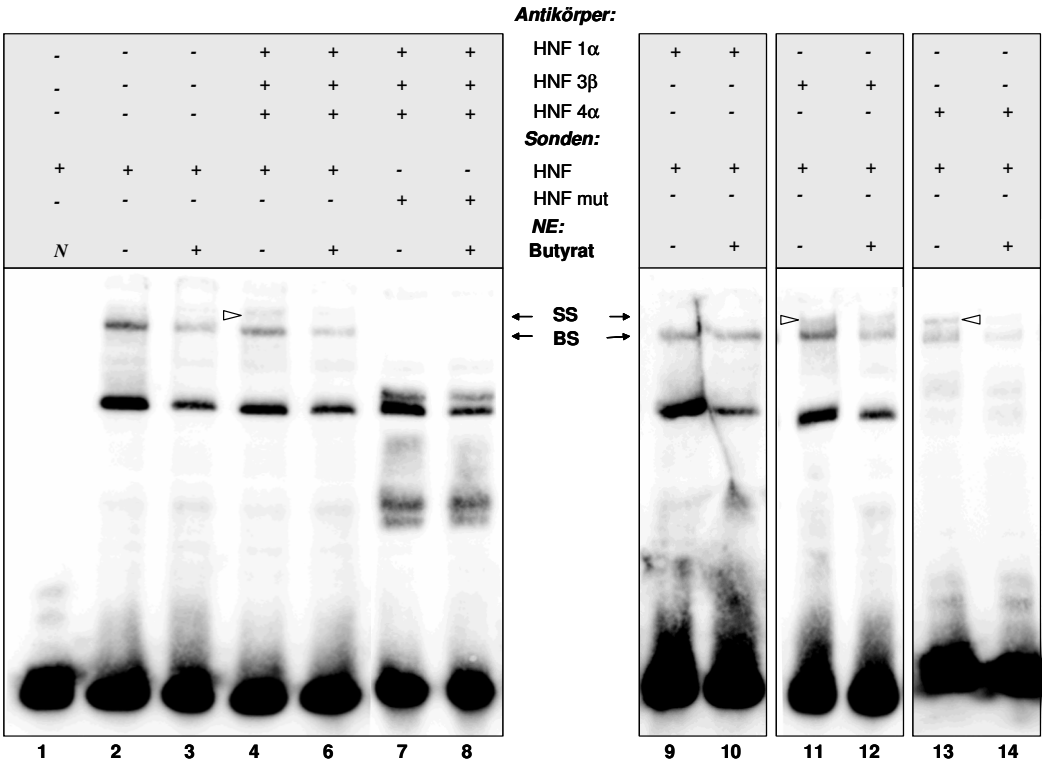


Abb. 4.19 EMSA und Supershift für die HNF-Bindestelle des Claudin-2-Promotors

A.) zeigt die generelle Bindeaffinität zur HNF-Bindestelle (HNF) des Claudin-2-Promotors in MR9 vor bzw. nach einer Behandlung mit 2 mM Butyrat für 24 h mittels EMSA. Die Aufhebung der Bindung erfolgte durch einen Kompetitor (HNF cold) und eine Mutante (HNF mut). Als Negativkontrolle (N) diente ein Ansatz ohne nuklearen Extrakt**, B.**) stellt die *Supershift*-Analyse mit potentiellen HNF-Transkriptionsfaktoren (HNF-1α, HNF-3β, HNF-4α) und deren Bindeverhalten zu der HNF-Bindestelle im Claudin-2-Promotor vor und nach 2 mM Butyrat-Zugabe dar. Mitgeführt wurden wiederum eine Negativkontrolle (N) und das Bindeverhalten zu HNF mut. (BS = band shift; SS = Supershift)

Die Spezifität der Signale wurde gezeigt durch das Einsetzen einer mutierten HNF-Bindestelle (*HNF mut*) und einer hochdosierten „*cold probe*“ oder „kalten Sonde“, welche sich dadurch auszeichnet, dass dieses HNF-Oligonukleotid ungelabelt war (*HNF cold*). Wie schon in der Abbildung 4.17 ist auch hier eine durch Butyrat verursachte verminderte Bindeaffinität an die HNF-Bindestelle zu sehen (Abb. A, Spur 2 + 6). Mittels *HNF cold* ist dieses Signal in beiden Fällen eliminierbar (Abb. 4.19 A, Spur 3 + 7). Eine weitere Kontrolle bot der Einsatz des mutierten Oligonukleotids *HNF mut*, welches im EMSA kein Signal der höher laufenden Bande liefert, während das untere Signal des bisher gezeigten EMSAs auch für *HNF mut* nachweisbar war (Abb. 4.19 A, Spur 4 + 8), was für die Unspezifität dieser Bindung spricht. Für den eigentlichen „*Supershift*“ wurden Antikörper gegen HNF-1α, HNF-3β und HNF-4α verwendet. Das Bandenmuster in Abbildung 4.19 B zeigt neben den Signalen des EMSAs (Abb. 4.19 B, Spur 2 + 3), im *Supershift*, bei Einsatz aller 3 HNF-Antikörper, eine weitere Bande etwas weiter oberhalb (Abb. 4.19 B Spur 4). Unter der Stimulation durch Butyrat war diese Bande fast komplett verschwunden (Abb. 4.19 B Spur 5). Für das mutierte Oligo *HNF mut* war auch im *Supershift* nur die unspezifische Bande zu sehen (Abb. 4.19 B, Spur 6 + 7).

Wurde jeder HNF-Antikörper einzeln für den *Supershift* eingesetzt, so konnte kein Signal oberhalb des EMSA-Signals unter Einsatz des HNF-1α Antikörpers beobachtet werden (Abb. 4.19 B, Spur 8 + 9), während sowohl für HNF-3β als auch für HNF-4α eine *Supershift*-Bande zu vermerken war (Abb. 4.19 B, Spur 10, 12). Im Gegensatz zu dem *Supershift*-Signal von HNF-3β, konnte das Signal für den HNF-4α-*Supershift* durch die Stimulation von Butyrat aufgehoben werden.

Zusammenfassend konnte somit nachgewiesen werden, dass spezifische Bindeaffinitäten zu den, im Claudin-2-Promotor befindlichen, Bindestellen Cdx1, HNF und GATA-4 existieren. Mittels „*Supershift*“-Analyse konnte aber nur für die HNF-Bindestelle ein Signal für einen Antikörper-Protein-DNA-Komplex gezeigt werden, was sowohl auf den HNF-3β- und HNF-4α-, aber nicht für den HNF-1α-Antikörper zutraf. Die Stimulation durch Butyrat konnte nur das Signal für den HNF-4α-DNA-Komplex stark abschwächen, nicht aber für den HNF-3β-DNA-Komplex.

Einfluss von Butyrat auf das distale Kolon bei Patienten mit CED

Um einen direkten Anhaltspunkt zu bekommen, ob die im Zellkulturmodell HT-29/B6-GR/MR gezeigte Verminderung der Claudin-2-Expression durch Butyrat auch für die Linderung der inflammatorischen Effekte bei CED Patienten verantwortlich sein kann, wurden Proben des distalen entzündeten Kolons bei einer CED-Patientin mit Stoma und Diversionscolitis in Ussing-Kammern eingespannt und über 8 Stunden entweder mit 3 nM Aldo oder mit einer Kombination aus 3 nM Aldo und 2 mM Butyrat inkubiert. Die mRNA der Proben wurden isoliert und per Real Time RT-PCR, die relative Expressionsrate von Claudin-2 ermittelt.

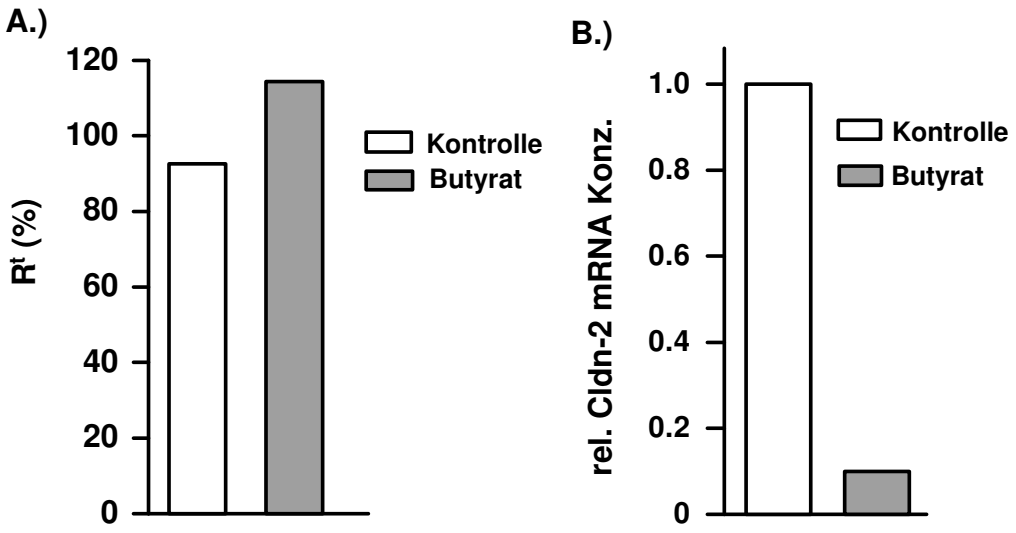


Abb. 4.20 Fallbeispiel einer Patientin mit Diversionscolitis
Einer CED-Patientin wurden Biopsien aus dem distalen Kolon entnommen und in Ussing-Kammern eingespannt, die entweder unbehandelt blieben (Kontrollen) oder für 8 h mit 1 mM Na-Butyrat behandelt wurden. **A.)** zeigt den Widerstandsverlauf R^t nach 8 h, **B.)** zeigt die rel. Claudin-2-mRNA Konzentration nach 8 h (n=1)

Abbildung 4.20 zeigt die Widerstandsveränderung der Kolonbiopsien nach 8 h unter dem Einfluss von 2 mM Butyrat in Korrelation zur Claudin-2-Expression. Wenn der Widerstand zum Zeitpunkt 0 auf 100% gesetzt wurde, lag R^t nach 8stündiger Butyrat Inkubation bei 115%, während die Kontrolle 93% des anfänglichen R^t aufwies (Abb. 4.20 A). Zudem war die Claudin-2-mRNA-Konzentration dieser Kolonbiopsie 10fach vermindert im Vergleich zur unbehandelten Kontrollbiopsie. Während Butyrat also R^t im entzündeten Kolon erhöht hat, wurde die Claudin-2-Expression deutlich reduziert.

5 DISKUSSION

Vielerorts ist beschrieben worden, dass sich kurzkettige Fettsäuren, insbesondere Butyrat, positiv auf den Darm und seine Funktion auswirken. Unter anderem wird Butyrat als eine der wichtigsten Energiequellen für Darmepithelzellen gehandelt (Roediger 1980; Cummings and Englyst 1987). Des Weiteren werden Butyrat aber sowohl pro- als auch anti-apoptotische Einflüsse sowie eine wichtige Rolle in Differenzierungsprozessen zugesagt (Hague and Paraskeva 1995; Csordas 1996; Litvak et al. 1998; Siavoshian et al. 2000; Augenlicht et al. 2002). Die Mechanismen, die hinter diesen regulierenden Eigenschaften stecken, sind aber zu einem großen Teil noch unbekannt. Allerdings konnte bisher schon nachgewiesen werden, dass Butyrat gerade in seiner Rolle als HDAC-Inhibitor eine maßgebliche Rolle in der Regulation vieler Gene spielt, die in diese Prozesse involviert sind (Boffa et al. 1978; Fusunyan et al. 1999; Nishimura et al. 1998; Mariadason et al. 2001; Wu et al. 2001). Zudem konnte beobachtet werden, dass eine Behandlung mit rektalen Butyrat-Einläufen bei CED-Patienten mit Colitis zu einer Linderung der Entzündungssymptome führt (Scheppach et al. 1992). Bis heute ist allerdings unklar, auf welchem Mechanismus dieser Effekt beruht. Im Folgenden werden neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet von uns gezeigt und diskutiert.

5.1 Butyrat und sein Einfluss auf die Elektrophysiologie von Darmepithelzellen

Um die positiven Effekte von Butyrat auf das Darmepithel zu entschlüsseln, habe ich mich eines humanen Kolonkarzinom-Zellklons bedient, der aufgrund seiner Eigenschaft, einen ausdifferenzierten Monolayer zu bilden, besonders geeignet schien. Dieser Zellklon HT-29/B6-GR/MR ist ein mit dem Glucocorticoid- und Mineralcorticoid-Rezeptor stabil transfizierter Subklon der HT-29/B6 Kolonkarzinom Zelllinie (Bergann et al. 2011; Kreusel et al. 1991), die in den letzten Jahren in vielen Studien in unserem Labor als Modellsystem für die elektrophysiologischen Eigenschaften des Darmepithels gedient hat (Zeissig et al. 2004; Heller et al. 2005; Zeissig et al. 2006; Krug et al. 2009; Mankertz et al. 2009). In diesem Fall hier wurde der HT-29/B6-GR/MR Subklon verwendet, da er durch seinen hohen Grad der Differenzierung in seinen physiologischen Eigenschaften dem nativen Darm besonders ähnlich ist. Die stabil transfizierten Steroidrezeptoren wurden dabei nicht direkt hormonell angesprochen bzw. blieben in meinem Versuchsdesign

unberücksichtigt (Zeissig et al. 2006; Bergann et al. 2009). Eine potentielle basale Stimulation durch Bestandteile des Zellkulturmediums ist aber denkbar, ohne von mir hier weiter systematisch untersucht worden zu sein.

Es ist mehrfach beschrieben worden, dass sich Butyrat positiv auf den transepithelialen Widerstand (R^t) verschiedener Kolonkarzinom-Zelllinien auswirkt, wobei der Verlauf der Widerstandsänderung sowohl als zeit- als auch als dosisabhängig beschrieben wurde (Mariadason et al. 2001; Peng et al. 2007; Suzuki et al. 2008, Ohata et al. 2005). Auch in meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass R^t in HT-29/B6-GR/MR Monolayern durch Butyrat erhöht wird. Dieser Effekt war allerdings in dem von uns gewählten Bereich von 0.5 bis 5 mM Butyrat nicht stark dosisabhängig. Deshalb erfolgten alle weiteren Versuche bei einer „mittleren Konzentration“ von 2 mM Butyrat. Dieser Dosisbereich entspricht dabei auch in etwa den Resultaten der anderen Studien. So konnte gezeigt werden, dass der Einfluss von 2 mM Butyrat zwar eine Erhöhung des R^t induziert, allerdings schon eine Konzentration von 8 mM Butyrat gegenteilige Effekte hervorruft (Peng et al. 2007). Peng und Mitarbeiter führten das darauf zurück, dass sich eine Konzentration von 2 mM Butyrat kaum auf die Apoptoserate und Zellproliferation auswirkt, während eine Konzentration von 8 mM Butyrat bereits eine massive Erhöhung der Apoptoserate in Caco-2-Zellen induzierte. Auch Mariadason konnte einen Widerstandsanstieg und eine verminderte Permeabilität für Mannitol in Caco-2-Zellen unter dem Einfluss von Butyrat nachweisen (Mariadason et al. 1997). Eine andere Studie konnte bei T84-Zellen ebenfalls einen erhöhten R^t nach dem Einsatz kurzkettiger Fettsäuren (SCAF) nachweisen. Hier hat sich besonders der Einsatz einer Mischung von Propionat, Acetat und Butyrat als positiv erwiesen, wobei auch Propionat und Acetat, aber nicht Butyrat separat eine Erhöhung des R^t verursachten (Suzuki et al. 2008). Dass im Vergleich dazu in dieser Arbeit an HT-29/B6-GR/MR-Zellen dennoch eine Erhöhung des R^t durch Butyrat nachgewiesen werden konnte, liegt womöglich daran, dass diese Effekte erst nach 24 Stunden auftraten und ihren Höhepunkt mit einer Verdoppelung von R^t erst nach 48 Stunden erreichten. In T84-Zellen waren die Messzeiträume mit 30-60 min wesentlich kürzer, so dass kein Aufschluss über die Langzeitwirkung von Butyrat gewonnen worden ist. Zudem waren die eingesetzten Dosen mit 5-20 mM vergleichsweise hoch und könnten eventuell epitheliale Apoptosen ausgelöst haben, die den Widerstandsverlauf negativ beeinflusst haben könnten. Die R^t-Untersuchungen meiner Arbeit beschränkten sich auf

ausdifferenzierte HT-29/B6-GR/MR-Zellen. Andere Arbeitsgruppen hingegen untersuchten eher den Widerstand unter dem den Einfluss von Butyrat auf undifferenzierte Caco-2-Zellen und führten die Effekte auf die Induktion von Differenzierungsvorgängen zurück (Mariadason et al. 2000; Mariadason et al. 2001).
Außerdem beschränkten sich alle bisherigen Untersuchungen auf den gesamten transepithelialen Widerstand (R^{epi}). In meiner Arbeit wurde mit Hilfe der neuen Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie (Krug et al. 2009) erstmals der Frage nachgegangen, ob die Widerstandseffekte unter dem Einfluss von Butyrat bei HT-29/B6-GR/MR-Zellen eher para- oder transzellulärer Natur sind. Um unerwünschte und störende Konduktivitäten wie die parallele Beeinflussung von Membrantransportern der Epithelzelle zu vermeiden, wurde die Umgebungstemperatur des Versuches dabei auf Raumtemperatur (also 22 °C) herabgesetzt. Unter diesen Versuchsbedingungen konnte kein Unterschied im R^{trans} unter Butyrat-Einfluss festgestellt werden, allerdings wurde, möglicherweise aufgrund der dann höheren Sensitivität der Messung, für den parazellulären Widerstand (R^{para}) ein Anstieg festgestellt. Eine Steigerung von R^{para} weist in erster Näherung auf eine Veränderung innerhalb der Tight Junction-Struktur hin, so dass man annehmen konnte, dass entweder eine Veränderung in der Expression barrierererelevanter Proteine (z.B. bestimmter Claudine) oder eine Umverteilung selbiger durch Butyrat induziert wurde. Schon andere Studien in der Vergangenheit wiesen auf derartige Effekte hin, indem Rückschlüsse auf den Widerstandsanstieg in Zusammenhang mit Umverteilung von TJ-Molekülen gebracht wurden (Peng et al. 2009).
In dieser Arbeit konnten mittels Messung von Dilutionspotentialen zusätzlich Veränderungen in der parazellulären Na^+- und Cl^--Permeabilität bei HT-29/B6-GR/MR-Zellen unter dem Einfluss von Butyrat konstatiert werden, was schon erste sichere Anhaltspunkte für Änderungen in der Tight Junction geben konnte. In diesem Fall konnte eine verminderte Durchlässigkeit für das Kation Na^+ gezeigt werden. Dabei kann die verminderte Na^+-Permeabilität bei gleichbleibender Cl^--Permeabilität sowohl für eine verminderte Expression der Kationenpore Claudin-2 sprechen (Amasheh et al. 2002) als auch z.B. für eine erhöhte Claudin-8-Expression in der Tight Junction, da Claudin-8 als Barriere für Kationen bekannt ist (Yu et al. 2003).

5.2 Erhöhung von R^t und R^{para} mittels Butyrat durch eine Reduktion der Claudin-2-Expression

Wie im vorherigen Kapitel bereits erwähnt kann eine parazelluläre Widerstandssteigerung durch Veränderungen in der Tight Junction-Struktur bedingt sein. Im Zellmodel HT-29/B6-GR/MR konnte eine starke Verminderung des Barriere-relevanten Tight Junction-Proteins Claudin-2 und eine weniger stark ausgeprägte Reduktion von Claudin-1 unter dem Einfluss von Butyrat festgestellt werden. Eine Verminderung der Claudin-1 Expression wurde schon im Verlauf einer anderen Studie gezeigt (Krishnan et al. 2010), was auf eine verminderte Claudin-1-mRNA-Stabilität zurückgeführt werden konnte. Eine verminderte Expression von Claudin-1 hat in der Regel eine Abnahme von R^t zur Folge. So konnte in Claudin-1 transfizierten MDCK (Madin-Darby Canine Kindney)-Zellen eine 4fache Erhöhung des transepithelialen Widerstands beobachtet werden (Inai et al. 1999). Da die Reduktion von Claudin-1 im Vergleich zur Reduktion der Claudin-2-Expression bei meinen HT-29/B6-GR/MR-Zellen hier gering war und eine Reduktion von Claudin-1 eher für eine Widerstandsabnahme sprechen würde, wurde Claudin-1 im Verlauf dieser Arbeit in seinem Regulationsmechanismus nicht weiter berücksichtigt. Anders sieht es im Falle von Claudin-2 aus. Schon innerhalb einer Microarray-Analyse bei HT-29 Zellen, die 24 Stunden mit 5 mM Butyrat behandelt wurden, konnte eine Veränderung von 10,2% aller Gene beobachtet werden. Dabei waren 4,1% hoch- und 6,1% runterreguliert (Daly and Shirazi-Beechey 2006). Wie in meiner eigenen Arbeit gezeigt, konnten auch Daly und Mitarbeiter eine Verminderung der Claudin-2-Expression auf mRNA-Ebene unter dem Einfluss von Butyrat nachweisen. Auch das verminderte Verhältnis der Na/Cl-Permeabilität bei HT-29/B6-GR/MR-Zellen unter Butyrat-Einfluss weist auf eine Veränderung der Kationen-Selektivität hin, was gut zu einer Abnahme der Expression des Kationenkanals Claudin-2 passen würde. Da in meinem Fall keine Veränderung in der Expression von Claudin-8, das in der Tight Junction eine Barriere für Kationen bildet, ermittelt werden konnte, scheint die verminderte Na^+-Permeabilität ausschließlich durch die Herabregulierung von Claudin-2 induziert worden zu sein. Auch der R^t-Anstieg passt dabei zu einer Verminderung von Claudin-2, da sich eine erhöhte Expression von Claudin-2 reduzierend auf den transepithelialen Widerstand auswirken kann, wie durch die Transfektion von Claudin-2 in MDCK-Zellen gezeigt werden konnte (Furuse et al. 2001). So ist es wahrscheinlich, dass Butyrat auch in HT-29/B6-GR/MR

Zellmonolayern eine R^t-Erhöhung durch die Reduktion von Claudin-2 induziert hat. Die durch Butyrat induzierte verminderte Expression von Claudin-2 ist auch auf andere Zelllinien wie z.B. MDCK, T84, aber auch HT-29 übertragbar gewesen, was auf einen universellen, nicht zellspezifischen Mechanismus der Regulation hindeuten könnte. Bei anderen Barriere-relevanten Tight Junction Molekülen wie Claudin-3, -4, -5, -7, -8 oder ZO-1 blieb die Expression unter dem Einfluss von Butyrat in HT-29/B6-GR/MR-Zellen jedenfalls unverändert. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit Studien an Caco-2-Zellen, in denen unter anderem die Expression von ZO-1, Occludin, Claudin-1 und Claudin-4 unter dem Einfluss von Butyrat unverändert blieb (Peng et al. 2009). Andere Studien wiesen allerdings auf Erhöhungen in der Expression von ZO-1 und ZO-2 durch Butyrat in Rattenfibroblasten oder eine erhöhte Claudin-3-Expression in den Hepatom Zelllinien Hep3B und Hep2G hin (Kim and Choi 2010; Bordin et al. 2004). Diese Expressionsunterschiede könnten darauf beruhen, dass es sich hierbei um Zelllinien handelt, die ihren Ursprung nicht im Kolon haben.

Zudem konnte innerhalb meiner Arbeit gezeigt werden, dass der Widerstandsanstieg in HT-29/B6-GR/MR-Zellen bei ca. 1 - 2 mM seinen Höhepunkt erreicht und in diesem Bereich ein breites Plateau aufweist. Dies korreliert bis zu einer Konzentration von 2 mM auch gut mit der Claudin-2-Expression. Bei höheren Dosen von Butyrat nahm der Widerstand wieder ab, obwohl die Claudin-2-Expression nach wie vor stark reduziert war. Dies könnte möglicherweise an einer erhöhten Apoptoserate gelegen haben, die durch höhere Konzentrationen von Butyrat induziert werden kann (Peng et al. 2007).

5.2.1 Butyrat induziert keine Umverteilung von Claudin-2, aber eine Reduzierung innerhalb der Tight Junction

Es ist beschrieben worden, dass sich Butyrat auch durch eine subzelluläre Umverteilung von Tight Junction Molekülen auf den Widerstand auswirken kann. So konnte gezeigt werden, dass nach einem Ca^+-Switch zum Öffnen der Tight Junction ein schnellerer Aufbau der ursprünglichen Tight Junction-Struktur von ZO-1 und Occludin durch Butyrat induziert wurde (Peng et al. 2009). Ohne den Ca^+-Switch konnte allerdings keine Umverteilung von Tight Junction-Molekülen beobachtet werden, so dass uns für die Immunfluoreszenzfärbungen in dieser Studie ZO-1 auch ohne Einschränkung als geeigneter Tight Junction-Marker diente. Nach Applikation

von Butyrat zeigten Immunfluoreszenzfärbungen von HT-29/B6-GR/MR-Zellen eine zeitabhängige Umverteilung von Claudin-2, während ZO-1 als Tight Junction Marker unverändert blieb. Auffällig war dabei, dass Claudin-2 zunächst intrazellulär abnahm und ab 24 bis 48 Stunden Inkubation auch aus der Tight Junction verschwand. Diese Beobachtung korreliert mit dem zeitabhängigen Widerstandanstieg durch Butyrat, der nach 24 h einen merklichen Anstieg aufwies und seinen Höhepunkt nach 48 h erreichte, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass erst nach 48 h Butyrat-Einflusses eine starke Verminderung von Claudin-2 aus der Tight Junction zu vermerken war. Zudem scheint Claudin-2 auch nicht mehr nachproduziert zu werden, da intrazellulär kein Claudin-2 Signal mehr lokalisiert werden konnte. Dies könnte wiederum ein Hinweis auf die transkriptionelle Regulation durch Butyrat sein. Diese Vermutung konnte unter anderem auch dadurch gestützt werden, dass unter Butyrat nicht nur die Proteinmenge an Claudin-2 verringert wurde, sondern auch eine Reduzierung des mRNA-Levels zu beobachten war.

5.3 Beeinflussung transkriptioneller Prozesse durch Butyrat

5.3.1 Butyrat nimmt keinen Einfluss auf die Bindung von ac-H3 im Claudin-2-Promotor

In HT-29/B6-GR/MR-Zellen war zusätzlich zum Protein-Level auch die mRNA-Konzentration von Claudin-2 durch die Applikation von Butyrat stark reduziert.
Schon in HT-29-Wildtyp-Zellen konnte für rund 10,2% der untersuchten Gene eine expressionelle Veränderung auf mRNA-Ebene unter Einfluss von Butyrat gezeigt werden, wobei 4,1% rauf- und 6,1% runterreguliert wurden (Daly and Shirazi-Beechey 2006). Eine expressionelle Änderung durch Butyrat wird häufig auf seine Funktion als Histon-Deacetylase-Inhibitor (HDACi) zurückgeführt (Boffa et al. 1978; Fusunyan et al. 1999; Nishimura et al. 1998; Mariadason et al. 2001; Wu et al. 2001). Durch die Hyperacetylierung der Histone, die an die DNA gebunden sind, lockert sich die Chromatin-Struktur auf und ist leichter zugänglich für Transkriptionsfaktoren, die die Expression entsprechender Gene induzieren oder reprimieren können. Zudem konnte in der Tat auch schon gezeigt werden, dass Butyrat die Expression, speziell bei runterregulierten Genen, durch eine verminderte Histonacetylierung beeinflussen kann (Rada-Iglesias et al. 2007). Dass in der vorliegenden Arbeit nicht nur Butyrat, sondern auch ein weiterer HDACi, Trichostatin A (TSA), eine Verminderung von Claudin-2 sowohl auf mRNA- als auch auf

Proteinebene in HT-29/B6-GR/MR-Zellen induzierte, würde für eine transkriptionelle Regulation sprechen, die auf einer Modifikation des Acetylierungsstatus des Histons beruht. Dass die Reduktion von Claudin-2 unter dem Einfluss von TSA nicht im gleichen Ausmaß zu beobachten war wie bei einer Zugabe von Butyrat, könnte darauf zurückgeführt werden, dass die eingesetzte Dosis im Verhältnis zu Butyrat niedriger war. Es wäre allerdings auch möglich, dass die Reduktion von Claudin-2 unter dem Einfluss von Butyrat zusätzlich anderen nicht-transkriptionellen Mechanismen zuzuschreiben ist. ChIP-Analysen an HT-29/B6-GR/MR-Zellen zeigten keine Veränderungen von an die Claudin-2-Promotorsequenz gebundenem acetyliertem Histon 3, was einerseits daran liegen könnte, das die Bindung von acetyliertem Histon an einer anderen, bisher unbekannten DNA-Sequenz vermindert war oder diese reduzierte Claudin-2-Expression einen sekundären Effekt darstellt, verursacht durch die Beeinflussung der Histonacetylierung an der Promotorsequenz eines involvierten Transkriptionsfaktors. Des Weiteren beeinflusst Butyrat nicht nur die Histonacetylierung, sondern auch die Histonmethylierung und -phosphorylierung, was ebenfalls einen großen Einfluss auf die Genexpression haben kann (Boffa et al. 1981; Whitlock et al. 1983), aber an dieser Stelle (noch) nicht untersucht wurde.

5.3.2 Butyrat induziert eine universelle Verminderung der Bindeaffinität von Transkriptionsfaktoren im Claudin-2-Promotor

Die mittels EMSA getesteten Affinitäten zu potentiellen Bindesequenzen am Claudin-2-Promotor zeigten bei HT-29/B6-GR/MR-Zellen im Gegensatz zu dem acetylierten Histon 3 sehr wohl Veränderungen durch den Einfluss von Butyrat. So konnte eine verminderte Bindeaffinität für die Transkriptionsbindestellen Cdx1 (*engl. caudal homeobox protein 1*), GATA-4 und HNF (*engl. hepatocyte nuclear factor*) beobachtet werden. Auch bei den unspezifischen Bindungen am Claudin-2-Promotor, die vermutlich durch die Bindung von Polymerasen verursacht wurden, konnte eine verminderte Affinität für die Bindestellen festgestellt werden, was darauf hindeuten könnte, dass generell eine Bindung an den Claudin-2-Promotor durch Modifikationen unter dem Einfluss von Butyrat behindert war.

Obwohl der Differenzierungsgrad von HT-29/B6-GR/MR-Zellen keinen Einfluss auf die verminderte Claudin-2-Expression durch Butyrat hatte, handelte es bei den für die Claudin-2-Expression interessanten Transkriptionsfaktoren hauptsächlich um differenzierungsrelevante Proteine. Es ist bekannt, dass Butyrat die Differenzierung

von Zellen induzieren kann (Siavoshian et al. 2000). Auch Claudin-2 wird differenzierungsabhängig exprimiert und ist im Darm und in Caco-2-Zellen besonders in undifferenzierten Zellen gehäuft präsent (Escaffit et al. 2005). Die Transkriptionsfaktoren der Cdx-Familie sind beispielsweise für die caudale Entwicklung des Embryos essentiell und regeln Gene in undifferenzierten Geweben wie im Falle von Cdx2 (Beck et al. 1999), was auch eine große Rolle in der Claudin-2-Expression spielt (Sakaguchi et al. 2002; Escaffit et al. 2005). Cdx1 und Cdx2 können dabei sowohl gleiche als auch individuell unterschiedliche Effekte auf die Proliferation und Differenzierung in intestinalen Zelllinien haben (Suh and Traber 1996; Lorentz et al. 1997; Soubeyran et al. 1999). In dieser Arbeit konnte allerdings keine Bindeaffinität von Cdx1 an die Cdx1-Bindestelle im Claudin-2-Promotor ermittelt werden, obwohl dieser laut früherer Promotorstudien eine wichtige Funktion in der Aktivierung des Claudin-2-Promotors besitzt (Sakaguchi et al. 2002). Schon andere Arbeiten konnten keinen definitiven Beweis für die Bindung von Cdx1 an den Claudin-2-Promotor erbringen (Sakaguchi et al. 2002). Eine Regulation über Cdx1 sollte dennoch nicht absolut ausgeschlossen werden, da ein fehlender „*Supershift*“ für Cdx1 auch an den aktuellen Versuchsbedingungen gescheitert sein könnte.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Erkenntnis, dass Butyrat auch die Bindeaffinität zur HNF-Bindestelle des Claudin-2-Promotors in HT-29/B6-GR/MR-Zellen stark reduziert hat. Bei den Vertretern der HNF-Familie (*engl. Hepatocyte Nuclear Factor*) handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die wie schon die Cdx-Transkriptionsfaktoren essentiell für die Differenzierung und den Metabolismus der Zelle sind (Costa et al. 2003). Mutationen von HNF-1α und HNF-4α sind stark mit der MODY1- und MODY3-Diabetes (*engl. maturity onset diabetes of the young type 1 bzw. 3*) assoziiert (Yamagata et al. 1996; Yamagata et al. 1996). Dabei bindet HNF-4α als Homodimer an der DNA, um beispielsweise die Expression von HNF-1α zu regulieren, und ist essentiell für die Entwicklung von Leber, Niere und Darm (Jiang et al. 1995; Lu et al. 2008). Schon in einer Studie von Sakaguchi und Mitarbeitern konnte die Bindung von HNF-1α an die HNF-Bindestelle im Claudin-2-Promotor nachgewiesen werden (Sakaguchi et al. 2002). Diese konnte innerhalb dieser Arbeit allerdings nicht bestätigt werden. Anders sah es bei HNF-3β und HNF-4α aus. So konnte eine Bindung von HNF-3β an die HNF-Bindestelle im Claudin-2-Promotor nachgewiesen werden, die allerdings nicht durch Butyrat beeinflusst wurde. Von größerem Interesse war deshalb die Bindeaffinität von HNF-4α an diese

Bindestelle im Claudin-2-Promotor, da es sich bei HNF-4α um einen Transkriptionsfaktor auf Chromosom 20q13 handelt, dem 2009 eine Prädisposition zur Entwicklung einer Colitis ulcerosa zugeordnet werden konnte (Barrett et al. 2009). Obwohl in früheren Studien keine Bindung von HNF-4α an die HNF-Bindestelle im Claudin-2-Promotor untersucht wurde, wurde HNF-4α in dieser Arbeit mit berücksichtigt, eben aufgrund seiner jüngst vorgeschlagenen Rolle für die Ätiologie der Colitis ulcerosa. Zudem sind die Bindesequenzen von HNF-4α sehr vielseitig und zeigen hauptsächlich Homologien in der Kernsequenz, die der HNF-Bindestelle im Claudin-2-Promotor aber sehr ähnlich ist (Ellrott et al. 2002).

Ein Zusammenhang in Bezug auf die Regulation von Tight Junction-Molekülen konnte auch schon in einer anderen Studie nachgewiesen werden. Dort wurde gezeigt, dass eine induzierte Expression von HNF-4α in differenzierten Zellen zu einer Translokation von Tight Junction-Proteinen und Förderung der Zellpolarität zu einer gürtelartig geformten Tight Junction führt, in der sich Clauin-6, -7, und Occludin ansammeln (Satohisa et al. 2005). Eine weitere Studie zeigte, dass das Ileum von Mäusen, denen längere Zeit Alkohol appliziert wurde, eine Reduktion des mRNA Levels von Tight Junction-Molekülen, wie Claudin-1, Occludin und ZO-1 aufweist, was in direkten Zusammenhang mit einer verminderten HNF-4α Expression gebracht wurde und die epitheliale Barriere negativ beeinflusst (Zhong et al. 2010). Eine verminderte Anwesenheit von HNF-4α in Caco-2-Zellen zeigte zudem einen negativen Effekt auf den transepithlialen Widerstand sowie eine Reduktion von Claudin-1, Occludin und ZO-1-mRNA (Zhong et al. 2010).

In jedem Falle konnte in meiner Arbeit gezeigt werden, dass Butyrat eine verminderte Bindeaffinität zum Claudin-2-Promotor induziert, was eine verminderte Expression von Claudin-2 verursacht und somit die epitheliale Barriere in HT-29/B6-GR/MR-Zellen negativ beeinflusst. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass der bei Colitis ulcerosa als relevant angesehene Transkriptionsfaktor HNF-4α eine entscheidende Rolle spielt, indem seine Bindung zum Promotor durch Butyrat fast komplett eliminiert wurde.

5.4 Einfluss von Butyrat auf den nativen Darm von CED-Patienten

Schon das Zellmodell HT-29/B6-GR/MR zeigte innerhalb meiner Arbeit, dass ein positiver Widerstandseffekt durch den Einfluss von Butyrat über die Herabregulierung von Claudin-2 induziert werden kann. Es ist bekannt, dass eine

erhöhte Expression von Claudin-2 bei CED-Patienten zu verzeichnen ist, was einen negativen Effekt auf die epitheliale Barriere zur Folge hat (Zeissig et al. 2006), und dass Butyrat-Einläufe, speziell im Falle von Colitis ulcerosa, eine Linderung der Entzündung hervorrufen können (Roediger 1980; Biasco et al. 1990; Scheppach et al. 1992). In dieser Arbeit konnte anhand eines CED-Patienten zum ersten Mal eine Korrelation der Widerstandserhöhung durch Butyrat und der Herabregulierung von Claudin-2 *in vitro* gezeigt werden. Dabei wurde auf eine Patientin mit einem doppelläufigen Stoma und mit einer milden Diversionscolitis zurückgegriffen, wo die Besonderheit darin bestand, dass sich eine Entzündung im Kolon entwickelt hatte, obwohl das Kolon durch die Stomaanlage aus der Nahrungspassage ausgeschaltet war. Als Folge davon finden sich nahezu keine kurzkettigen Fettsäuren wie Butyrat in dem ausgeschalteten Kolon. Schon bei Ratten mit DSS (dextran sulfate sodium)-induzierter Colitis zeigte sich in Ussing-Versuchen ein verminderter R^t und eine erhöhte Permeabilität für Mannitol, sowie eine verminderte Viabilität des Epithels (Venkatraman et al. 2000). Durch die Zugabe von 25 mM Butyrat kam es nach 30 bis 60 min zu einer Erholung des Widerstandes und der Mannitol-Permeabilität, was Venkatraman und Mitarbeiter auf Tight Junction-Effekte zurückführten und auf eine Inhibition des proinflammatorischen Zytokins TNF-α, was wiederum auch eine erhöhte Expression von Claudin-2 induzieren kann, wie bei CED-Patienten gezeigt werden konnte (Mariadason et al. 1997; Venkatraman et al. 2000; Zeissig et al. 2006; Mankertz et al. 2009). In einer späteren Studie wurde dann gezeigt, dass der durch Butyrat induzierte Zellschutz in DSS-Ratten zum Teil auf die Verminderung des Hitzeschockproteins HSP(70) und von NF-κB zurückzuführen sein könnte (Venkatraman et al. 2003). Ein direkter Zusammenhang zu einer Veränderung in der Tight Junction wurde allerdings nicht untersucht. In dieser Arbeit konnte demnach das erste Mal ein direkter Zusammengang zwischen der Linderung der Inflammation in Form eines Widerstandanstieges und einer verminderten Expression eines Barriere-relevanten Tight Junction-Moleküls, nämlich Claudin-2, gezeigt werden. Eine andere Studie von Thibault und Mitarbeitern konnte sowohl in CED-Patienten als auch in Proben des distalen Kolons von Ratten mit DSS induzierter Colitis, eine Verminderung der Butyrat-Aufnahme nachweisen, was generell zu einer verminderten Oxidation von Butyrat führte. Diese Beobachtung konnte in direkten Zusammenhang mit der verminderten Expression des Butyrat-Transporters MCT-1 (*engl. monocarboxylate transporter 1*) in, an Colitis erkrankten, Individuen gesetzt

werden (Thibault et al. 2007). Zudem konnte anhand des Zellmodells HT-29 eine verminderte Expression für MCT-1 unter dem Einfluss der für CED-relevanten proinflammatorischen Zytokine TNF-α und IFN-γ gezeigt werden. Es wäre also denkbar, dass aufgrund der verminderten Butyrat-Aufnahme via MCT-1 bei CED-Patienten viele Genregulationsprozesse, wie z.B. die Inhibition der Claudin-2-Expression durch Butyrat, eingeschränkt sein könnten bzw. höhere Butyrat-Dosen dafür erforderlich sind. Zusätzlich würde die Expression von Claudin-2 in dieser Situation dann auch noch durch TNF-α angeregt, was zu einer weiteren Labilisierung der epithelialen Barriere beiträgt und i.S. eines Leckflux-Mechanismus zu Diarrhoe führen könnte. Auch eine Studie von Kovarik und Mitarbeitern konnte eine, durch die erhöhte IL-12/23p40 und TNF-α Produktion reflektierte, TLR-2 Hyperstimulierung im PBMC (*engl. peripheral blood mononuclear cell*) von CED-Patienten nachweisen, die im Vergleich zu gesunden Patienten nur durch höhere Butyrat-Konzentrationen inhibiert werden konnte (Kovarik et al. 2011). Das Zytokin TNF-α spielt unter anderem deswegen eine so große Rolle bei CED, weil es die Expression des Transkriptionsfaktors NF-κB (*engl. nuclear factor kappa B*) induziert, welcher in entzündetem Gewebe eine verstärkte Aktivität aufweist und die Synthese von Entzündungsmediatoren reguliert (Schutze et al. 1992; Cogswell et al. 2003). NF-κB reguliert dabei hauptsächlich Gene, deren Expression in die Zellproliferation und Apoptose involviert sind, was wiederum im Zusammenhang steht mit der Tatsache, dass auch Butyrat solche Prozesse beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Anzahl NF-κB positiver Makrophagen bei Patienten mit Colitis ulcerosa nach 4 - 8 wöchiger Behandlung mit 100 mM Butyrat reduziert (Luhrs et al. 2002). Ein Fehlen von NF-κB fördert eine erhöhte Proliferationsrate im Kolonepithel, die wiederum mit der vermehrten Expression von TNF-α korreliert (Inan et al. 2000). Dabei scheint Butyrat in der Lage zu sein, diesen TNF-α-induzierten Effekt zu inhibieren (Inan et al. 2000). Ob dieser Effekt auch in direktem Zusammenhang mit der verminderten Claudin-2-Expression steht, ist jedoch fraglich, da Claudin-2 im Promotor zwar eine Bindestelle für NF-κB aufweist, dieser aber keine funktionelle Rolle in der Aktivierung von Claudin-2 zugewiesen werden konnte (Sakaguchi et al. 2002). Auch konnten Nancey und Mitarbeiter anhand einer *in vitro* Studie im Vollblut-Modell mit künstlich induzierter Zytokin-Ausschüttung zeigen, dass die stimulierte Ausschüttung von TNF-α, IFN-γ und IL-12 reduziert werden konnte. Dabei zeigten schon niedrige Konzentrationen von Butyrat eine Verminderung der Zytokine IL-5, IL-10 und IL-13,

während die Induktion von IFN-γ, IL-12, IL-5 und IL-13 sogar komplett inhibiert werden konnte (Nancey et al. 2002). In diesem Zusammenhang ist besonders das Zytokin IL-13 zu beachten, da dieses nicht nur als Schlüssel-Zytokin bei Colitis ulcerosa relevant ist, sondern IL-13 auch eine Überexpression von Claudin-2 verursachen kann.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Es ist bekannt, dass die kurzkettige Fettsäure Butyrat protektive Effekte auf den Darm ausübt, indem es z.B. bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) eine Stabilisierung der epithelialen Barrierefunktion oder Induktion antiinflammatorischer Effekte bewirkt. Zudem besitzt Butyrat wichtige Funktionen bei der Zelldifferenzierung und der Induktion von Apoptosen. Zahlreiche Gene der Zelle werden durch Butyrat reguliert, indem es als Histon-Deacetylase-Inhibitor (HDACi) fungiert.

Ziel dieser Arbeit war es, die Mechanismen des Effekts von Butyrat auf die epitheliale Barriere des Darms aufzuklären. In einem geeigneten Modell-Epithel, der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29/B6-GR/MR, konnte gezeigt werden, dass Butyrat zeitabhängig den transepithelialen Widerstand (R^t, TER) erhöht, was auf eine Erhöhung des parazellulären Widerstandes (R^{para}) zurückgeführt werden konnte. In Expressionsanalysen konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gezeigt werden, dass dieser Effekt durch die Reduktion der Expression des Tight Junction-Moleküls Claudin-2 verursacht wurde. Diese Reduktion korrelierte mit einer verminderten Na^+-Permeabilität unter Butyrat, was wiederum auf die Kationenkanal-Eigenschaften von Claudin-2 zurückzuführen ist. Andere barriererelevante Claudine blieben unter dem Einfluss von Butyrat unverändert. Mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass Claudin-2 unter dem Einfluss von Butyrat zunächst aus dem Zytoplasma und anschließend aus der Tight Junction verschwand. Da die mRNA- und Protein-Stabilität von Claudin-2 unter dem Einfluss von Butyrat unverändert blieb und der Histon-Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A ebenfalls eine Verminderung der Claudin-2-Expression induzierte, deutete dies auf eine Claudin-2-Reduktion als Folge von transkriptionellen Effekten hin. Zwar konnten keine Veränderungen der Bindung von acetyliertem Histon-3 an den Claudin-2-Promotor gezeigt werden, aber es konnte generell eine verminderte Bindung von Proteinen an verschiedenen Transkriptions-Bindestellen des Claudin-2-Promotors nachgewiesen werden. Eine wichtige Rolle konnte dabei dem für Colitis ulcerosa relevanten Transkriptionsfaktor HNF-4α zugeordnet werden, dessen Bindung an die HNF-Bindestelle im Claudin-2-Promotor durch Butyrat fast vollständig eliminiert wurde, was dafür spricht, dass HNF-4α einen wichtigen Faktor bei der Herabregulierung von Claudin-2 darstellt.

Abschließend konnte in dieser Arbeit anhand eines Fallbeispiels einer Patientin mit Diversionscolitis die Relevanz dieses Mechanismus auch am nativen Darm bzw. in einer spezifischen Krankheitssituation nachgewiesen werden, indem auch hier ein Butyrat-induzierter Widerstandsanstieg in entzündeten Biopsien in direktem Zusammenhang mit einer verminderten Claudin-2-Expression stand.

Die Hauptaussage dieser Arbeit ist, dass Butyrat die bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erhöhte Expression des parazellulären Kationenkanal-Bildners Claudin-2 reduziert und es auf diese Weise zu einer Verbesserung der gestörten epithelialen Barrierefunktion des Darms kommen kann. Dieses Ergebnis unterstreicht die Wichtigkeit kurzkettiger Fettsäuren für die angeborene Immunität in Interaktion mit der Bakterienflora des Darms.

7 SUMMARY

Butyrate is known to have beneficial effects on colonocytes including preservation of epithelial barrier function or anti-inflammatory influences and has also an important role in cell differentiation, apoptosis induction and gene regulation by acting as a histone deacetylase (HDAC) inhibitor.

Aim of this study was to characterize the mechnisms induced by butyrate to improve the epithelial barrier function of the intestine. By means of the human colon cancer cell line HT-29/B6-GR/MR as a model, which resemble the native intestine because of its physiological properties, this study has demonstrated that butyrate treatment causes a time-dependent increase in transepthelial resistance (R^t) leading to an increase in paracellular resistance (R^{para}). This was caused by the remarkable decrease of the expression of the tight junction (TJ) molecule claudin-2 which could be demonstrated on mRNA as well as on protein level by expression analysis. In addition, this finding correlated with a decrease in Na^+ permeability, because claudin-2 acts as a channel for cations. Other barrier relevant claudins remained unchanged by butyrate. Confocal laser scanning fluorescence microscopy also showed that claudin-2 at first disappears from the cytoplasm of the cell and afterwards also from the tight junction in a time dependent manner in response to butyrate. The absence of butyrate effects on claudin-2 mRNA or protein stability and that the HDACi trichostatin A (TSA) also induced a decrease in claudin-2 expression indicated a decrease in claudin-2 expression which is based on transcriptional effects. While changes in binding of actylated histone 3 on claudin-2 promoter binding sites could not be found, a decrease in binding affinity of proteins to the claudin-2 promoter binding sites could be demonstrated. In this context, a main role of the ulcerative colitis relevant transcriptionfactor HNF-4α could be assigned. Thus, this study has demonstrated for the first time that HNF-4α bound the HNF binding site of the claudin-2 promoter, a process which could be completely inhibited by butyrate. This indicates that HNF-4α plays an important role in the regulation of claudin-2 in response to butyrate.

The fact that biopsies from a patient with active diversion colitis showed a correlation of an increasing R^t and a decreasing claudin-2 expression after butyrate exposure in vitro underlined the relevance of these findings in our cell culture model.

That butyrate can decrease the transcription of claudin-2 resulting in an improved epithelial barrier function of the intestine points to an important role of short chain fatty acids in innate immunity in interaction with the bacterial flora of the gut.

8 LITERATUR

Amasheh, S., N. Meiri, A. H. Gitter, et al. (2002). Claudin-2-Expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. J Cell Sci 115: 4969-76.

Amasheh, S., T. Schmidt, M. Mahn, et al. (2005). Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. Cell Tissue Res 321(1): 89-96.

Anderson, J. M. (2001). Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. News Physiol Sci 16: 126-30.

Ando-Akatsuka, Y., M. Saitou, T. Hirase, et al. (1996). Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. J Cell Biol 133(1): 43-7.

Argenzio, R. A., N. Miller and W. von Engelhardt (1975). Effect of volatile fatty acids on water and ion absorption from the goat Colon. Am J Physiol 229(4): 997-1002.

Argenzio, R. A. and S. C. Whipp (1979). Inter-relationship of sodium, chloride, bicarbonate and acetate transport by the Colon of the pig. J Physiol 295: 365-81.

Augenlicht, L. H., J. M. Mariadason, A. Wilson, et al. (2002). Short chain fatty acids and Colon cancer. J Nutr 132(12): 3804-3808.

Balda, M. S., J. A. Whitney, C. Flores, et al. (1996). Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. J Cell Biol 134(4): 1031-49.

Barrett, J. C., J. C. Lee, C. W. Lees, et al. (2009). Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. Nat Genet 41(12): 1330-4.

Beck, F., K. Chawengsaksophak, P. Waring, et al. (1999). Reprogramming of intestinal differentiation and intercalary regeneration in Cdx2 mutant mice. Proc Natl Acad Sci U S A 96(13): 7318-23.

Bergann, T., S. Ploger, A. Fromm, et al. (2009). A Colonic mineralocorticoid receptor cell model expressing epithelial Na+ channels. Biochem Biophys Res Commun 382(2): 280-5.

Bergann, T., A. Fromm, S. A. Borden, et al. (2011). Glucocorticoid receptor is indispensable for physiological responses to aldosterone in epithelial Na(+) channel induction via the mineralocorticoid receptor in a human Colonic cell line. Eur J Cell Biol. Epub ahead of print.

Biasco, G., G. M. Paganelli, M. Miglioli, et al. (1990). Rectal cell proliferation and Colon cancer risk in ulcerative colitis. Cancer Res 50(4): 1156-9.

Blikslager, A. T., A. J. Moeser, J. L. Gookin, et al. (2007). Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. Physiol Rev 87(2): 545-64.

Boffa, L. C., R. J. Gruss and V. G. Allfrey (1981). Manifold effects of sodium butyrate on nuclear function. Selective and reversible inhibition of phosphorylation of histones H1 and H2A and impaired methylation of lysine and arginine residues in nuclear protein fractions. J Biol Chem 256(18): 9612-21.

Boffa, L. C., G. Vidali, R. S. Mann, et al. (1978). Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate. J Biol Chem 253(10): 3364-6.

Bordin, M., F. D'Atri, L. Guillemot, et al. (2004). Histone deacetylase inhibitors up-regulate the expression of tight junction proteins. Mol Cancer Res 2(12): 692-701.

Broer, S. (2008). Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. Physiol Rev 88(1): 249-86.

Bugaut, M. (1987). Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals. Comp Biochem Physiol B 86(3): 439-72.

Bugaut, M. and M. Bentejac (1993). Biological effects of short-chain fatty acids in nonruminant mammals. Annu Rev Nutr 13: 217-41.

Charney, A. N., L. Micic and R. W. Egnor (1998). Nonionic diffusion of short-chain fatty acids across rat Colon. Am J Physiol 274: 518-24.

Chishti, M. S., A. Bhatti, S. Tamim, et al. (2008). Splice-site mutations in the TRIC gene underlie autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment in Pakistani families. J Hum Genet 53(2): 101-5.

Chung, N. P., D. Mruk, M. Y. Mo, et al. (2001). A 22-amino acid synthetic peptide corresponding to the second extracellular loop of rat occludin perturbs the blood-testis barrier and disrupts spermatogenesis reversibly in vivo. Biol Reprod 65(5): 1340-51.

Citi, S. and M. Cordenonsi (1998). Tight junction proteins. Biochim Biophys Acta 1448(1): 1-11.

Cogswell, P. C., D. F. Kashatus, J. A. Keifer, et al. (2003). NF-kappaB and I kappa B alpha are found in the mitochondria. Evidence for regulation of mitochondrial gene expression by NF-kappaB. J Biol Chem 278(5): 2963-8.

Colegio, O. R., C. M. Van Itallie, H. J. McCrea, et al. (2002). Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. Am J Physiol Cell Physiol 283(1): 142-7.

Cook, S. I. and J. H. Sellin (1998). Review article: short chain fatty acids in health and disease. Aliment Pharmacol Ther 12(6): 499-507.

Costa, R. H., V. V. Kalinichenko, A. X. Holterman, et al. (2003). Transcription factors in liver development, differentiation, and regeneration. Hepatology 38(6): 1331-47.

Cousens, L. S., D. Gallwitz and B. M. Alberts (1979). Different accessibilities in chromatin to histone acetylase. J Biol Chem 254(5): 1716-23.

Csordas, A. (1996). Butyrate, aspirin and colorectal cancer. Eur J Cancer Prev 5(4): 221-31.

Cummings, J. H. (1983). Fermentation in the human large intestine: evidence and implications for health. Lancet 1: 1206-9.

Cummings, J. H. and H. N. Englyst (1987). Fermentation in the human large intestine and the available substrates. Am J Clin Nutr 45: 1243-55.

Cummings, J. H. and G. T. Macfarlane (1991). The control and consequences of bacterial fermentation in the human Colon. J Appl Bacteriol 70(6): 443-59.

Cummings, J. H., E. W. Pomare, W. J. Branch, et al. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. Gut 28(10): 1221-7.

Daly, K. and S. P. Shirazi-Beechey (2006). Microarray analysis of butyrate regulated genes in Colonic epithelial cells. DNA Cell Biol 25(1): 49-62.

Ellrott, K., C. Yang, F. M. Sladek,et al. (2002). Identifying transcription factor binding sites through Markov chain optimization. Bioinformatics 18: S100-9.

Escaffit, F., F. Boudreau and J. F. Beaulieu (2005). Differential expression of claudin-2 along the human intestine: Implication of GATA-4 in the maintenance of claudin-2 in differentiating cells. J Cell Physiol 203(1): 15-26.

Fanning, A. S., L. L. Mitic and J. M. Anderson (1999). Transmembrane proteins in the tight junction barrier. J Am Soc Nephrol 10(6): 1337-45.

Farquhar, M. G. and G. E. Palade (1963). Junctional complexes in various epithelia. J Cell Biol 17: 375-412.

Ferraris, R. P. and J. Diamond (1997). Regulation of intestinal sugar transport. Physiol Rev 77(1): 257-302.

Furuse, M., K. Furuse, H. Sasaki, et al. (2001). Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. J Cell Biol 153(2): 263-72.

Furuse, M., M. Hata, K. Furuse, et al. (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. J Cell Biol 156(6): 1099-111.

Furuse, M., T. Hirase, M. Itoh, et al. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. J Cell Biol 123: 1777-88.

Furuse, M., M. Itoh, T. Hirase, et al. (1994). Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. J Cell Biol 127: 1617-26.

Furuse, M., H. Sasaki, K. Fujimoto, et al. (1998). A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. J Cell Biol 143(2): 391-401.

Fusunyan, R. D., J. J. Quinn, M. Fujimoto, et al. (1999). Butyrate switches the pattern of chemokine secretion by intestinal epithelial cells through histone acetylation. Mol Med 5(9): 631-40.

Gamet, L., D. Daviaud, C. Denis-Pouxviel, et al. (1992). Effects of short-chain fatty acids on growth and differentiation of the human Colon-cancer cell line HT29. Int J Cancer 52(2): 286-9.

Garcia-Ramirez, M., C. Rocchini and J. Ausio (1995). Modulation of chromatin folding by histone acetylation. J Biol Chem 270(30): 17923-8.

Gitter, A. H., M. Bertog, J. Schulzke, et al. (1997). Measurement of paracellular epithelial conductivity by conductance scanning. Pflugers Arch 434(6): 830-40.

Gonda, T., D. Maouyo, S. E. Rees, et al. (1999). Regulation of intracellular pH gradients by identified Na/H exchanger isoforms and a short-chain fatty acid. Am J Physiol 276: 259-70.

Gunzel, D., M. Stuiver, P. J. Kausalya, et al. (2009). Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function. J Cell Sci 122: 1507-17.

Hague, A., A. J. Butt and C. Paraskeva (1996). The role of butyrate in human Colonic epithelial cells: an energy source or inducer of differentiation and apoptosis? Proc Nutr Soc 55(3): 937-43.

Hague, A. and C. Paraskeva (1995). The short-chain fatty acid butyrate induces apoptosis in colorectal tumour cell lines. Eur J Cancer Prev 4(5): 359-64.

Harhaj, N. S. and D. A. Antonetti (2004). Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. Int J Biochem Cell Biol 36(7): 1206-37.

Harig, J. M., E. K. Ng, P. K. Dudeja, et al. (1996). Transport of n-butyrate into human Colonic luminal membrane vesicles. Am J Physiol 271: 415-22.

Heller, F., P. Florian, C. Bojarski, et al. (2005). Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. Gastroenterology 129(2): 550-64.

Hodin, R. (2000). Maintaining gut homeostasis: the butyrate NF-kappaB connection. Gastroenterology 118(4): 798-801.

Hungate, R. E., G. D. Phillips, G. A. Mc, et al. (1959). Microbial fermentation in certain mammals. Science 130: 1192-4.

Ikenouchi, J., M. Furuse, K. Furuse, et al. (2005). Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. J Cell Biol 171(6): 939-45.

Ikenouchi, J., H. Sasaki, S. Tsukita, et al. (2008). Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. Mol Biol Cell 19(11): 4687-93.

Inai, T., J. Kobayashi and Y. Shibata (1999). Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. Eur J Cell Biol 78(12): 849-55.

Inan, M. S., V. Tolmacheva, Q. S. Wang, et al. (2000). Transcription factor NF-kappaB participates in regulation of epithelial cell turnover in the Colon. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 279(6): 1282-91.

Itoh, M., M. Furuse, K. Morita, et al. (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. J Cell Biol 147(6): 1351-63.

Jackson, M. J. (1974). Transport of short chain fatty acids. Biomembranes 4B: 673-709.

Jiang, G., L. Nepomuceno, K. Hopkins, et al. (1995). Exclusive homodimerization of the orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 defines a new subclass of nuclear receptors. Mol Cell Biol 15(9): 5131-43.

Kim, S. O. and Y. H. Choi (2010) The ethyl alcohol extract of Hizikia fusiforme inhibits matrix metalloproteinase activity and regulates tight junction related protein expression in Hep3B human hepatocarcinoma cells. J Med Food 13(1): 31-8.

Kinugasa, T., T. Sakaguchi, X. Gu, et al. (2000). Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. Gastroenterology 118(6): 1001-11.

Kiuchi-Saishin, Y., S. Gotoh, M. Furuse, et al. (2002). Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. J Am Soc Nephrol 13(4): 875-86.

Kottgen, M., J. Leipziger, K. G. Fischer, et al. (1994). pH regulation in HT29 Colon carcinoma cells. Pflugers Arch 428(2): 179-85.

Kovarik, J. J., W. Tillinger, J. Hofer, et al. (2011) Impaired anti-inflammatory efficacy of n-butyrate in patients with IBD. Eur J Clin Invest 41(3): 291-8.

Kreusel, K. M., M. Fromm, J. D. Schulzke, et al. (1991). Cl- secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human Colon cells (HT-29/B6). Am J Physiol 261: 574-82.

Krishnan, M., A. B. Singh, J. J. Smith, et al. (2010) HDAC inhibitors regulate claudin-1 expression in Colon cancer cells through modulation of mRNA stability. Oncogene 29(2): 305-12.

Krug, S. M., S. Amasheh, J. F. Richter, et al. (2009). Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. Mol Biol Cell 20(16): 3713-24.

Krug, S. M., M. Fromm and D. Gunzel (2009). Two-path impedance spectroscopy for measuring paracellular and transcellular epithelial resistance. Biophys J 97(8): 2202-11.

Kruh, J. (1982). Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. Mol Cell Biochem 42(2): 65-82.

Kunzelmann, K. and M. Mall (2002). Electrolyte transport in the mammalian Colon: mechanisms and implications for disease. Physiol Rev 82(1): 245-89.

Li, H., D. N. Sheppard and M. J. Hug (2004). Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber. J Cyst Fibros 3: 123-6.

Litvak, D. A., B. M. Evers, K. O. Hwang, et al. (1998). Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells is associated with apoptosis and early induction of p21Waf1/Cip1 and p27Kip1. Surgery 124(2): 161-9; discussion 169-70.

Lorentz, O., I. Duluc, A. D. Arcangelis, et al. (1997). Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. J Cell Biol 139(6): 1553-65.

Lu, P., J. Liu, M. Melikishvili, et al. (2008). Crystallization of hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 alpha) in complex with the HNF1 alpha promoter element. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 64: 313-7.

Luger, K., T. J. Rechsteiner, A. J. Flaus, et al. (1997). Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. J Mol Biol 272(3): 301-11.

Luhrs, H., T. Gerke, J. G. Muller, et al. (2002). Butyrate inhibits NF-kappaB activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis. Scand J Gastroenterol 37(4): 458-66.

Ma, T. Y., D. Nguyen, V. Bui, et al. (1999). Ethanol modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. Am J Physiol 276: 965-74.

Macfarlane, S. and G. T. Macfarlane (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. Proc Nutr Soc 62(1): 67-72.

Mankertz, J., M. Amasheh, S. M. Krug, et al. (2009). TNFalpha up-regulates Claudin-2-Expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling. Cell Tissue Res 336(1): 67-77.

Mankertz, J., B. Hillenbrand, S. Tavalali, et al. (2004). Functional crosstalk between Wnt signaling and Cdx-related transcriptional activation in the regulation of the claudin-2 promoter activity. Biochem Biophys Res Commun 314(4): 1001-7.

Mankertz, J., J. S. Waller, B. Hillenbrand, et al. (2002). Gene expression of the tight junction protein occludin includes differential splicing and alternative promoter usage. Biochem Biophys Res Commun 298(5): 657-66.

Mariadason, J. M., D. H. Barkla and P. R. Gibson (1997). Effect of short-chain fatty acids on paracellular permeability in Caco-2 intestinal epithelium model. Am J Physiol 272: G705-12.

Mariadason, J. M., K. L. Rickard, D. H. Barkla, et al. (2000). Divergent phenotypic patterns and commitment to apoptosis of Caco-2 cells during spontaneous and butyrate-induced differentiation. J Cell Physiol 183(3): 347-54.

Mariadason, J. M., A. Velcich, A. J. Wilson, et al. (2001). Resistance to butyrate-induced cell differentiation and apoptosis during spontaneous Caco-2 cell differentiation. Gastroenterology 120(4): 889-99.

Marin, M. L., A. J. Greenstein, S. A. Geller, et al. (1983). A freeze fracture study of Crohn's disease of the terminal ileum: changes in epithelial tight junction organization. Am J Gastroenterol 78(9): 537-47.

Markov, A. G., A. Veshniakova, S. Krug, et al. (2007). [The tight junction proteins expression in the epithelium of the small intestines in a rat]. Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova 93(9): 1043-54.

Martinez-Palomo, A., M. Tanimoto-Weki and E. Tena-Betancourt (1980). [Development of lesions produced in hamsters by inoculation of Entamoeba histolytica]. Arch Invest Med (Mex) 11: 169-72.

Mascolo, N., V. M. Rajendran and H. J. Binder (1991). Mechanism of short-chain fatty acid uptake by apical membrane vesicles of rat distal Colon. Gastroenterology 101(2): 331-8.

McCarthy, K. M., I. B. Skare, M. C. Stankewich, et al. (1996). Occludin is a functional component of the tight junction. J Cell Sci 109: 2287-98.

McIntyre, A., P. R. Gibson and G. P. Young (1993). Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model. Gut 34(3): 386-91.

Medina, R., C. Rahner, L. L. Mitic, et al. (2000). Occludin localization at the tight junction requires the second extracellular loop. J Membr Biol 178(3): 235-47.

Milatz, S., S. M. Krug, R. Rosenthal, et al. (2010) Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. Biochim Biophys Acta 1798(11): 2048-57.

Miller, T. L. and M. J. Wolin (1979). Fermentations by saccharolytic intestinal bacteria. Am J Clin Nutr 32(1): 164-72.

Mineta, K., Y. Yamamoto, Y. Yamazaki,et al. (2011) Predicted expansion of the claudin multigene family. FEBS Lett 585(4): 606-12.

Morita, K., M. Furuse, K. Fujimoto, et al. (1999). Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. Proc Natl Acad Sci U S A 96(2): 511-6.

Nancey, S., J. Bienvenu, B. Coffin, et al. (2002). Butyrate strongly inhibits in vitro stimulated release of cytokines in blood. Dig Dis Sci 47(4): 921-8.

Nishimura, A., M. Fujimoto, S. Oguchi, et al. (1998). Short-chain fatty acids regulate IGF-binding protein secretion by intestinal epithelial cells. Am J Physiol 275: 55-63.

Nitta, T., M. Hata, S. Gotoh,et al. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. J Cell Biol 161(3): 653-60.

Ohata, A., M. Usami and M. Miyoshi (2005). Short-chain fatty acids alter tight junction permeability in intestinal monolayer cells via lipoxygenase activation. Nutrition 21(7-8): 838-47.

Peng, L., Z. He, W. Chen, et al. (2007). Effects of butyrate on intestinal barrier function in a Caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier. Pediatr Res 61(1): 37-41.

Peng, L., Z. R. Li, R. S. Green, et al. (2009). Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. J Nutr 139(9): 1619-25.

Podolsky, D. K. (1999). Inflammatory bowel disease 1999: present and future promises. Curr Opin Gastroenterol 15(4): 283-4.

Pogo, B. G., V. G. Allfrey and A. E. Mirsky (1966). RNA synthesis and histone acetylation during the course of gene activation in lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 55(4): 805-12.

Rada-Iglesias, A., S. Enroth, A. Ameur, et al. (2007). Butyrate mediates decrease of histone acetylation centered on transcription start sites and down-regulation of associated genes. Genome Res 17(6): 708-19.

Rahner, C., L. L. Mitic and J. M. Anderson (2001). Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. Gastroenterology 120(2): 411-22.

Rechkemmer, G. and W. von Engelhardt (1988). Concentration- and pH-dependence of short-chain fatty acid absorption in the proximal and distal Colon of guinea pig (Cavia porcellus). Comp Biochem Physiol A Comp Physiol 91(4): 659-63.

Reynolds, D. A., V. M. Rajendran and H. J. Binder (1993). Bicarbonate-stimulated [14C]butyrate uptake in basolateral membrane vesicles of rat distal Colon. Gastroenterology 105(3): 725-32.

Riazuddin, S., Z. M. Ahmed, A. S. Fanning, et al. (2006). Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. Am J Hum Genet 79(6): 1040-51.

Ritzhaupt, A., A. Ellis, K. B. Hosie, et al. (1998). The characterization of butyrate transport across pig and human Colonic luminal membrane. J Physiol 507: 819-30.

Roberfroid, M. B. (2005). Introducing inulin-type fructans. Br J Nutr 93 Suppl 1: S13-25.

Roediger, W. E. (1980). Anaerobic bacteria, the Colon and colitis. Aust N Z J Surg 50(1): 73-5.

Roediger, W. E. (1980). Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the Colonic mucosa in man. Gut 21(9): 793-8.

Rosenthal, R., S. Milatz, S. M. Krug, et al. (2010) Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. J Cell Sci 123: 1913-21.

Ruppin, H., S. Bar-Meir, K. H. Soergel, et al. (1980). Absorption of short-chain fatty acids by the Colon. Gastroenterology 78(6): 1500-7.

Saitou, M., M. Furuse, H. Sasaki, et al. (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. Mol Biol Cell 11(12): 4131-42.

Sakaguchi, T., X. Gu, H. M. Golden, et al. (2002). Cloning of the human claudin-2 5'-flanking region revealed a TATA-less promoter with conserved binding sites in mouse and human for caudal-related homeodomain proteins and hepatocyte nuclear factor-1alpha. J Biol Chem 277(24): 21361-70.

Sandle, G. I. (1998). Salt and water absorption in the human Colon: a modern appraisal. Gut 43(2): 294-9.

Satohisa, S., H. Chiba, M. Osanai, et al. (2005). Behavior of tight-junction, adherens-junction and cell polarity proteins during HNF-4alpha-induced epithelial polarization. Exp Cell Res 310(1): 66-78.

Scheppach, W., H. Sommer, T. Kirchner, et al. (1992). Effect of butyrate enemas on the Colonic mucosa in distal ulcerative colitis. Gastroenterology 103(1): 51-6.

Scheppach, W., H. P. Bartram and F. Richter (1995). Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. Eur J Cancer 31A(7-8): 1077-80.

Schmitz, H., M. Fromm, C. J. Bentzel, et al. (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.

Schneeberger, E. E. and R. D. Lynch (1992). Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. Am J Physiol 262: L647-61.

Schneeberger, E. E. and R. D. Lynch (2004). The tight junction: a multifunctional complex. Am J Physiol Cell Physiol 286(6): C1213-28.

Schulzke, J. D., A. H. Gitter, J. Mankertz, et al. (2005). Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. Biochim Biophys Acta 1669(1): 34-42.

Schutze, S., K. Potthoff, T. Machleidt, et al. (1992). TNF activates NF-kappaB by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. Cell 71(5): 765-76.

Sellin, J. H. and R. DeSoignie (1990). Short-chain fatty acid absorption in rabbit Colon in vitro. Gastroenterology 99(3): 676-83.

Siavoshian, S., J. P. Segain, M. Kornprobst, et al. (2000). Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression. Gut 46(4): 507-14.

Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 150(1): 76-85.

Soubeyran, P., F. Andre, J. C. Lissitzky, et al. (1999). Cdx1 promotes differentiation in a rat intestinal epithelial cell line. Gastroenterology 117(6): 1326-38.

Stein, J., O. Schroder, V. Milovic, et al. (1995). Mercaptopropionate inhibits butyrate uptake in isolated apical membrane vesicles of the rat distal Colon. Gastroenterology 108(3): 673-9.

Stockmann, M., A. H. Gitter, D. Sorgenfrei, et al. (1999). Low edge damage container insert that adjusts intestinal forceps biopsies into Ussing chamber systems. Pflugers Arch 438(1): 107-12.

Suh, E. and P. G. Traber (1996). An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. Mol Cell Biol 16(2): 619-25.

Suzuki, T., S. Yoshida and H. Hara (2008). Physiological concentrations of short-chain fatty acids immediately suppress Colonic epithelial permeability. Br J Nutr 100(2): 297-305.

Thibault, R., P. De Coppet, K. Daly, et al. (2007). Down-regulation of the monocarboxylate transporter 1 is involved in butyrate deficiency during intestinal inflammation. Gastroenterology 133(6): 1916-27.

Topping, D. L. and P. M. Clifton (2001). Short-chain fatty acids and human Colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. Physiol Rev 81(3): 1031-64.

Tsukita, S., M. Furuse and M. Itoh (2001). Multifunctional strands in tight junctions. Nat Rev Mol Cell Biol 2(4): 285-93.

Turksen, K. and T. C. Troy (2002). Permeability barrier dysfunction in transgenic mice overexpressing claudin-6. Development 129(7): 1775-84.

Turksen, K. and T. C. Troy (2004). Barriers built on claudins. J Cell Sci 117: 2435-47.

Ussing, H. H. and K. Zerahn (1951). Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. Acta Physiol Scand 23(2-3): 110-27.

Van Itallie, C., C. Rahner and J. M. Anderson (2001). Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. J Clin Invest 107(10): 1319-27.

Van Itallie, C. M. and J. M. Anderson (1997). Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts. J Cell Sci 110: 1113-21.

Van Itallie, C. M. and J. M. Anderson (2006). Claudins and epithelial paracellular transport. Annu Rev Physiol 68: 403-29.

Velazquez, O. C., H. M. Lederer and J. L. Rombeau (1996). Butyrate and the Colonocyte. Implications for neoplasia. Dig Dis Sci 41(4): 727-39.

Velazquez, O. C., H. M. Lederer and J. L. Rombeau (1997). Butyrate and the Colonocyte. Production, absorption, metabolism, and therapeutic implications. Adv Exp Med Biol 427: 123-34.

Venkatraman, A., B. S. Ramakrishna, R. V. Shaji, et al. (2003). Amelioration of dextran sulfate colitis by butyrate: role of heat shock protein 70 and NF-kappaB. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 285(1): G177-84.

Venkatraman, J. T., J. Leddy and D. Pendergast (2000). Dietary fats and immune status in athletes: clinical implications. Med Sci Sports Exerc 32(7 Suppl): S389-95.

von Engelhardt, W., G. Gros, M. Burmester, et al. (1994). Functional role of bicarbonate in propionate transport across guinea-pig isolated caecum and proximal Colon. J Physiol 477: 365-71.

Whitlock, J. P., Jr., D. Galeazzi and H. Schulman (1983). Acetylation and calcium-dependent phosphorylation of histone H3 in nuclei from butyrate-treated HeLa cells. J Biol Chem 258(2): 1299-304.

Wolin, M. J. (1981). Fermentation in the rumen and human large intestine. Science 213(4515): 1463-8.

Wu, J. T., S. Y. Archer, B. Hinnebusch, et al. (2001). Transient vs. prolonged histone hyperacetylation: effects on Colon cancer cell growth, differentiation, and apoptosis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 280(3): G482-90.

Yamagata, K., H. Furuta, N. Oda, et al. (1996). Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). Nature 384(6608): 458-60.

Yamagata, K., N. Oda, P. J. Kaisaki, et al. (1996). Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). Nature 384(6608): 455-8.

Yu, A. S., A. H. Enck, W. I. Lencer, et al. (2003). Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation. J Biol Chem 278(19): 17350-9.

Zeissig, S., C. Bojarski, N. Buergel, et al. (2004). Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by tumour necrosis factor alpha antibody treatment. Gut 53(9): 1295-302.

Zeissig, S., N. Burgel, D. Gunzel, et al. (2006). Changes in expression and distribution of claudin-2, -5 and -8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. Gut 56(1): 61-72.

Zeissig, S., A. Fromm, J. Mankertz, et al. (2006). Restoration of ENaC expression by glucocorticoid receptor transfection in human HT-29/B6 Colon cells. Biochem Biophys Res Commun 344(4): 1065-70.

Zhong, W., Y. Zhao, C. J. McClain, et al. (2010) Inactivation of hepatocyte nuclear factor-4{alpha} mediates alcohol-induced downregulation of intestinal tight junction proteins. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 299(3): G643-51.

9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AJ	Adherens Junction
AK	Antikörper
Ap-1	*activator protein 1*
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CAMP	zyklisches Adenosin-monophosphat
CD	*Crohn´s disease* (Morbus Crohn)
Cdx	*caudal type homeobox*
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CoA	Coenzym A
C-Terminus	Carboxyterminus
CU	Colitis ulcerosa
Da	Dalton
DAPI	4´,6-Diamin-2´-Phenylindol-Dihydrochlorid
ddH_2O	zweifachdestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DS	Desmosomen
DSS	dextran sulfate sodium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
EMSA	*electrophoretic mobility schift assay*
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	fötales Kälberserum
x g	Gravitationskraft
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GJ	Gap Junction
HNF	*hepatocyte nuclear factor*
IFN-γ	Interferon-gamma

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.S.	im Sinne
I_{SC}	Kurzschlussstrom ($\mu A \cdot h^{-1} \cdot cm^{-2}$)
JAM	*junctional adhesion molecule*
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertani
LIS	lateraler interzellulärer Spaltraum
LPS	Lipopolysaccharid
MALT	Mukosa-assoziiertes Lymphgewebe
MAPK	Mitogen-*activated* Proteinkinase
MCT-1	*monocarboxylate transporter 1*
MODY3	*maturity onset diabetes of the young type 3*
MOI	*multiplicity of infection*
MW	Mittelwert
mv	Mikrovilli
NF-κB	Nuclear factor-*κ*B
n.s.	nicht signifikant
N-Terminus	Aminoterminus
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	*peripheral blood mononuclear cell*
PBST	*phosphate buffered saline with Tween*
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDZ	PSD-95/Discs-large/Z-O1
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	*rounds per minute*
RPMI	Roswell Memorial Park Institute (-medium)
R^{para}	parazellulärer Widerstand
R^{t}	transepithelialer Widerstand ($\Omega \cdot cm^2$)
R^{trans}	transzellulärer Widerstand
SCFA	*short chain fatty acid*
RT	Raumtemperatur

SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Mittlerer Standardfehler (*standard error of the mean*)
TBS	*Tris-buffered saline*
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylendiamin
TJ	Tight Junction
TLR-2	*toll-ike receptor 2*
TNF-*α*	Tumor Nekrose Faktor-alpha
TRIC	Tricellulin
UC	*ulcrative colitis*
ÜN	Übernacht
ZO	Zonula occludens

International übliche physikalische und biochemische Abkürzungen sind nicht extra aufgeführt.

10 ANHANG

10.1 Publikationen

Originalarbeiten:

- **Bergann T, Plöger S, Fromm A, Zeissig S, Borden SA, Fromm M, Schulzke JD.**
  A colonic mineralcorticoid receptor cell model expressing epthelial Na+ channels. Bioch. Biophys. Res. Comm. 2009; 382: 280-285

- **Schulzke JD, Ploeger S* (*shared first authorship), Amasheh M, Fromm A, Zeissig S, TroegerH, Richter JF, Bojarski C, Schumann M, Fromm M**
  Epithelial tight junctions in intestinal inflammation. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2009, 1165: 294-300

- **Brinkrolf K, Plöger S, Solle S, Brune I, Nentwich SS, Hüser AT, Kalinowski J, Pühler A, Tauch A**
  The LacI/GalR family transcriptional regulator UriR negatively controls uridine utilization of Corynebacterium glutamicum by binding to catabolite-responsive element (cre)-like sequences. Microbiology SGM, 2008 154: 1068-1081

Kongressbeiträge

Vortrag:

- 23rd Meeting European Intestinal Transport Group (EITG), Salerno, Italien, 7. – 10. April 2010

  Plöger S, Bergann T, Fromm A, Bücker R, Fromm M, Schulzke JD
  Effect of sodium butyrate on barrier function of HT-29/B6/GR-MR cells in conjunction with down-regulation of claudin-2.

Teilnahme:

- International Conference on „Molecular Structure and Function of the Tight Junction“,
  Berlin, 25. - 27. 4. 2008.

10.2 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

10.3 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke (Klinik für Allgemeinmedizin, Charité, Campus Benjamin Franklin), der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit im Rahmen der Förderung im Teilprojekt der DFG-Forschergruppe 721 anzufertigen. Auch möchte ich mich für die Vergabe des interessanten Themas und für die intensive Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Zudem möchte ich Prof. Dr. Rupert Mutzel (Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin) für seine Bereitschaft, die Arbeit zu begutachten, danken. Prof. Dr. Michael Fromm (Institut für Klinische Physiologie, Charité, Campus Benjamin Franklin) danke ich dafür, jederzeit ansprechbar gewesen zu sein, seine Hilfsbereitschaft bei der Anfertigung von Vorträgen und für die Durchsicht der Promotionsarbeit.

Bei PD Dr. Joachim Mankertz (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit BVL) und Dr. Shida Tavalali bedanke ich mich für die anfängliche Laboreinarbeitung und die intensive Betreuung im ersten Jahr meiner Forschung. Für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Vollführung und Auswertung meiner Experimente gilt Anja Fromm ein besonderer Dank, sowie Ing. grad. Detlef Sorgenfrei für den technischen Support. Dr. Jan F. Richter danke ich für die Einarbeitung am konfokalen Mikroskop. Für die guten Ideen und die Hilfe bei der Auswertung der Zwei-Wege-Impedanz-Daten danke ich PD Dr. Dorothee Günzel. Ein besonderer Dank gilt auch Dr. Nina Hering und Dr. Theresa Bergann für die Mithilfe bei der Arbeit mit humanen Biopsien.

Ein außerordentlicher Dank gilt zudem allen Mitarbeitern der Klinik für Allgemeinmedizin, des Instituts für Klinische Physiologie sowie der Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie für ihre Hilfsbereitschaft, die angenehme Zusammenarbeit und freundlichen Worte zwischendurch.

Am Ende möchte ich mich auch bei meinen Eltern, Geschwistern, meinem Freund Carsten und allen Freunden, die mich während dieser Zeit begleitet haben, für die mentale Unterstützung und aufmunternden Worte, herzlich bedanken.