

Aus dem Institut für Klinische Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Wirkung von Chitosan auf die parazelluläre und transzelluläre
Barrierefunktion von HT-29/B6-Kolonepithelzellen**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Caroline Finger
aus Riesa

Datum der Promotion: 05.12.2014

Meinem Opa Heinz.

Inhaltsverzeichnis

1. Abstrakt	6
2. Einleitung	10
2.1 Epithel	10
2.1.1 Zellkontakte zwischen Epithelien	12
2.1.2 Tight Junction	13
2.1.2.1 Occludin	15
2.1.2.2 Claudine	17
2.1.2.3 Tight Junction-assoziierte Proteine	20
2.2 Absorptionenhancer	21
2.3 Chitosan	22
2.3.1 Vorkommen	22
2.3.2 Eigenschaften	24
2.3.3 Chitosan-Derivate	25
2.3.4 Anwendung	25
2.4 Zielstellung	26
3. Material und Methoden	28
3.1 HT-29/B6-Zellen	28
3.2 Chitosan-Lösungen	28
3.3 Material und Geräte	29
3.3.1 Geräte	29
3.3.2 Verbrauchsmaterialien	30
3.3.3 Substanzen und Chemikalien	31
3.3.4 Inhibitoren	32
3.3.5 Puffer und Lösungen	33
3.3.6 Antikörper	34
3.4 Elektrophysiologische Methoden	34
3.4.1 Transepithelialer elektrischer Widerstand: Manuelle Messung	34
3.4.2 Widerstandsmessungen: Ussing-Kammern	35
3.4.2.1 Ussing-Technik	35
3.4.2.2 Versuchsablauf	37
3.4.3 Fluxmessungen in Ussing-Kammern	38
3.4.3.1 Mannitol-Fluxmessungen	38

3.4.3.2 Fluxmessungen FITC-markierter Dextrane	39
3.4.4 Transepithelialer Stromfluss in Ussing-Kammern.....	39
3.4.5 Zwei-Wege-Impedanz-Spektroskopie.....	40
3.5 Biochemische Methoden	42
3.5.1 Western Blot.....	42
3.5.1.1 Membranprotein-Extraktion	42
3.5.1.2 Proteinquantifizierung	43
3.5.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	43
3.5.1.4 Elektrophoretischer Transfer auf Membranen.....	44
3.5.1.5 Immundetektion.....	45
3.5.1.6 Densitometrie	46
3.5.2 Immunfluoreszenzfärbung	46
3.5.3 Zytotoxizitäts-Messung durch Bestimmung der Laktatdehydrogenase.....	48
3.6 Statistische Auswertung	48
4. Ergebnisse	49
4.1 Viabilität von HT-29/B6-Zellen nach Inkubation mit Chitosan.....	49
4.2 Effekt von Chitosan auf den transepithelialen Widerstand	50
4.2.1 Manuelle Widerstandsmessung in HEPES.....	50
4.2.2 Widerstands-Messungen in der Ussing-Kammer	52
4.2.3 Impedanzmessungen	54
4.3 Wirkung von Chitosan auf die parazelluläre Permeabilität von Fluxmarkern.....	55
4.4 Effekt von Chitosan auf den epithelialen Ionentransport	57
4.5 Effekt von Chitosan auf das Aktinskelett von HT-29/B6-Zellen	58
4.6 Effekt von Chitosan auf Tight Junction-Proteine.....	60
5. Diskussion	64
5.1 Wirkung von Chitosan auf HT-29/B6-Zellen und ihre Viabilität.....	64
5.2 Wirkung von Chitosan auf die transepitheliale Barriere.....	68
5.3 Wirkung von Chitosan auf die parazelluläre Barriere	70
5.3.1 Fluxe mit parazellulären Markern	70
5.4 Interaktion von trans- und parazellulärem Chitosaneffekt	73
5.5 Ausblick	75
6. Literaturverzeichnis	77

7. Eidesstattliche Versicherung	99
8. Lebenslauf.....	101
9. Publikationsliste	102
10. Danksagung	103

1. Abstrakt

Einleitung:

Die häufigste Art Medikamente zu verabreichen ist die orale Einnahme. Die heutige Entwicklung von großmolekularen Medikamenten auf Protein- oder Peptidbasis birgt jedoch das Problem einer eingeschränkten intestinalen Bioverfügbarkeit. Aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften und des hohen Molekulargewichts können diese Substanzen nicht transzellulär über die Lipidphase oder Transportproteine transportiert werden. Die Alternative, die parazelluläre Resorption, wird durch den interzellulären Multiproteinkomplex der Tight Junction limitiert. Diese dichten den interzellulären Spalt zwischen zwei Epithelzellen ab, nur einige Tight Junction-Proteine bilden selektive parazelluläre Kanäle für Elektrolyte und Wasser. Die Entwicklung von reversibel wirksamen Absorptionsbeschleunigern, welche die Passage großmolekularer Stoffe durch die Tight Junction ermöglichen, ist daher von hohem Interesse. Chitosan und seine Derivate induzieren an verschiedenen Epithelien einen absorptionsbeschleunigenden Effekt, basierend vermutlich auf einer Öffnung der Tight Junction. Die molekulare Wirkungsweise ist jedoch bisher nicht bekannt.

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Chitosan auf die Barrierefunktion von HT-29/B6-Zellen, einem etablierten intestinalen Epithelzellmodell untersucht.

Methodik:

Für sämtliche Versuche wurde niedrig-molekulares Chitosan mit einem Molekulargewicht von 50-190 kDa sowie einem Deacetylierungsgrad von 75-85 % verwendet. Es wurden Chitosan-Konzentration zwischen 0.1-0.002 % getestet, die Zugabe erfolgte stets auf apikaler Zellseite. Messungen der Zytotoxizität erfolgten über die Laktatdehydrogenase-Bestimmung. Der Chitosan-Effekt auf die Barriereigenschaften des Epithels wurde mittels Messungen des transepithelialen elektrischen Widerstands und des transepithelialen Stromflusses sowie der parazellulären Mannitol- und FITC-Dextran-Fluxe überprüft. Mit Hilfe der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie erfolgte die quantitative Differenzierung des epithelialen Widerstands in parazellulären und transzellulären Widerstand. Untersuchungen zur Tight Junction-Integrität umfassten Western-Blot-Analysen und Immunfluoreszenz-Färbungen von Tight Junction-Proteinen und des Zytoskeletts mit anschließender konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie.

Ergebnisse:

Es konnte gezeigt werden, dass Chitosan

- 1) an HT-29/B6-Zellen in Konzentrationen bis zu 0.005 % keine toxischen Eigenschaften besitzt.
- 2) in einer Konzentration von 0.005 % zu einer schnellen konzentrationsabhängigen und nach Entfernen des Polymers vollständig reversiblen Abnahme des transepithelialen elektrischen Widerstands führt.
- 3) zu einer Zunahme der parazellulären Permeabilität für Mannitol- und FITC-Dextran bis zu einer Molekülgröße von 10 kDa führt.
- 4) seine Wirkung weder durch eine Umverteilung oder veränderte Expression von Tight Junction- oder Tight Junction-assoziierten Proteinen, noch durch einen Einfluss auf das Aktinskelett entfaltet.
- 5) einen Einfluss sowohl auf den parazellulären, als auch den transzellulären Widerstand hat. Am transzellulären Effekt scheint die Aktivierung eines Anionenstroms beteiligt zu sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Chitosan in nicht-toxischen Konzentrationen einen schnellen, reversiblen und gröÙenselektiven Anstieg der parazellulären Permeabilität induziert und damit die notwendigen Anforderungen an einen Absorptionenhancer erfüllt.

Introduction:

Oral administration is the easiest way to apply pharmaceuticals. However, today's drugs often have a limited oral bioavailability because of their high molecular weight, their hydrophilic nature or their protein basis, which inhibits the transcellular transport through the lipophilic cell membrane or via transport proteins. Another possibility is the paracellular resorption, which is limited due to tight junctions, which are intercellular multiprotein-complexes sealing the intercellular space. Consequently, the development of absorption enhancers which act in a reversible manner and allow the paracellular transport of high molecular molecules throughout the tight junction is of high interest. Chitosan, a derivative of chitin of crustacean cells, has an absorption enhancing effect on different epithelia, presumably based on an opening of tight junctions. However, its detailed molecular mode of action is widely unknown.

In this thesis, the effect of chitosan on barrier properties was investigated on HT-29/B6-cells, an established epithelial cell model.

Methods:

Low-molecular-Chitosan (50-190 kDa) with a grade of deacetylation of 75-85 % was used for all experiments. It was applied on the apical side of the cells at concentrations from 0.1-0.002 %. Cytotoxicity-measurements were performed via lactate-dehydrogenase-determination. The effects of chitosan on barrier properties were examined by measurements of the transepithelial electrical resistance and by detection of transepithelial currents as well as by paracellular mannitol- and FITC-dextrane fluxes. The quantitative differentiation of the epithelial resistance into paracellular and transcellular resistance was investigated by two-path-impedance-spectroscopy. In order to determine the integrity of tight junctions, Western-blot-analyses and immunofluorescence staining of tight junction-proteins and the cytoskeleton with subsequent confocal laser scanning microscopy were performed

Results:

It was shown that chitosan

- 1) is not toxic at HT-29/B6-cells within concentrations up to 0.005 %.
- 2) induces a fast and fully reversible decrease in transepithelial electrical resistance at concentrations of 0.005 %.

- 3) leads to an increase of paracellular permeability for mannitol and FITC dextrane up to 10 kDa.
- 4) is not associated with redistribution or changed expression of tight junction proteins, nor with effecting the actin cytoskeleton.
- 5) influences both the paracellular and transcellular resistance, whereupon the activation of an anionic current seems to be involved in the transcellular effect.

In conclusion, chitosan induces, if used in non toxic concentrations, a fast, reversible and selective increase in paracellular permeability and fulfils the requirements of an absorption enhancer.

2. Einleitung

2.1 Epithel

Epithelien gehören neben Muskel-, Nerven- und Bindegewebe zu den Grundgewebearten. Generell lassen sich drei Epithelgruppen unterscheiden: die Oberflächen- sowie die Drüsen- und Sinnesepithelien. Oberflächenepithel besteht aus ein- oder mehrschichtigen dicht gelagerten Zellverbänden, die alle inneren und äußeren Körperflächen oder Hohlorgane auskleiden. Dazu gehören neben der Epidermis alle nach außen abgegrenzten Körperhöhlen wie der Magen-Darm-Trakt, die Harnwege und Nierentubuli, aber auch die Grenzflächen zwischen verschiedenen inneren Flüssigkeitsräumen oder der inneren Organe, wie Pleura und Peritoneum, Epi- und Perikard sowie die inneren Wände der Blutgefäße, die jedoch gesondert als Endothel bezeichnet werden. Es gibt unterschiedliche Epithelarten, die nach der Anzahl ihrer Zellschichten (ein- oder mehrschichtig) und der Zellform der obersten Schicht (Plattenepithel, isoprismatisches, hochprismatisches Epithel) eingeteilt werden (Abb. 1). Ihr Vorkommen ist typisch für die jeweiligen Kompartimente, so besitzt das Endothel einschichtiges Plattenepithel, die Darmschleimhaut einschichtiges, hochprismatisches Epithel und Speiseröhre und Mundhöhle mehrschichtiges, unverhorntes Plattenepithel. Eine Ausnahme stellt das in den ableitenden Harnwegen befindliche Urothel (Übergangsepithel) dar. Dieses ist, an die Änderung der Dehnungsverhältnisse der Harnblase angepasst, je nach Blasendehnung mehrschichtig bis mehrreihig und in seiner obersten Zellschicht isoprismatisch [1].

Epithelzellen haben eine dem Lumen bzw. der Oberfläche zugewandte apikale und eine der Blutseite bzw. dem Bindegewebe anliegende basolaterale Membran (Abb. 2). Ihre Aufgaben bestehen, neben einer abdichtenden und mechanischen Barriere- und Schutzfunktion, auch in der von apikal nach basolateral erfolgenden Resorption und der entgegengerichteten Sekretion von Stoffen [1]. Die der Außenseite zugewandte apikale Membran besitzt meist einen Mikrovilli-Saum - fingerartige Ausstülpungen, die zu einer Oberflächenvergrößerung führen und damit Resorption bzw. Sekretion verbessern. Die basolaterale Membran besteht aus der Basal- und den seitlichen Zell-Membranen, wobei die Basalmembran die Funktion einer Wachstumszone einnimmt und den Zusammenhalt mit den sich anschließenden Zellen vermittelt. Auf der lateralen Seite sind die einzelnen Zellen durch einen ca. 20 nm breiten Interzellulärspalt voneinander

getrennt, behalten aber ihren Zusammenhalt durch den darin befindlichen Schlussleistenkomplex [2].

Der Transport von Stoffen durch das Epithel hindurch erfolgt grundsätzlich auf zwei mögliche Arten: Zum einen führt der transzelluläre Weg durch die Zelle hindurch, also durch ihre apikale und basolaterale Membran, zum anderen kann in durchlässigen Epithelien die parazelluläre Passage durch den Interzellulärspalt und einen Abschnitt des Schlussleistenkomplexes, der Zonula occludens, stattfinden [2]. Die Zonula occludens, auch Tight Junction genannt, gehört zu den Zell-Zell-Kontakten, die im Folgenden näher betrachtet werden.

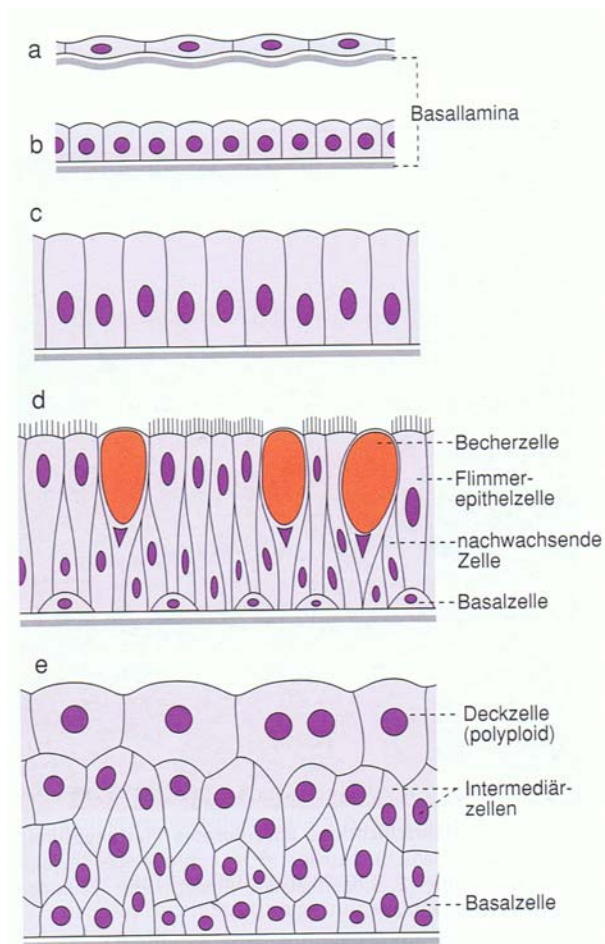


Abb. 1: Schematische Darstellung unterschiedlicher Epitheltypen. a) einschichtiges Plattenepithel, b) einschichtiges isoprismatisches Epithel, c) einschichtiges hochprismatisches Epithel, d) mehrreihiges respiratorisches Epithel, e) Urothel [1].

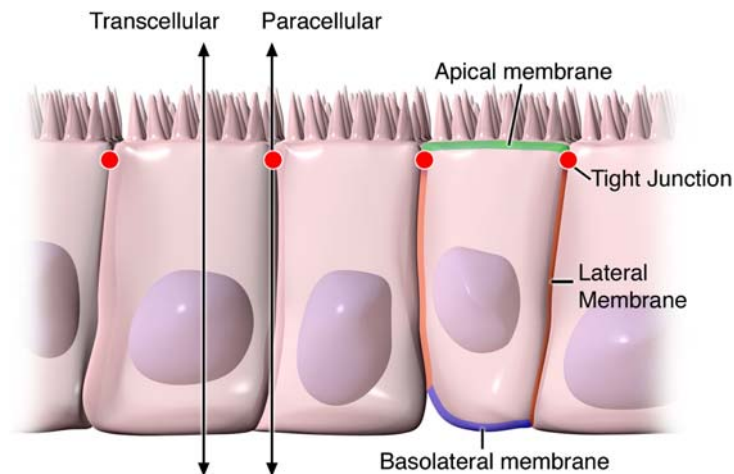


Abb. 2: Beispiel eines hochprismatischen Epithels. Dieses besteht aus einzelnen Zellen mit einer der Blutseite zugewandten basalen Membran, einer dem Lumen anliegenden apikalen Membran und zweier, den benachbarten Zellen angrenzenden, lateralen Membranen. Der interzelluläre Spalt wird durch Tight Junctions verschlossen, welche die parazelluläre Passage von Ionen und Molekülen regulieren. Die transzelluläre Passage erfolgt über die apikale und basolaterale Zellmembran [3].

2.1.1 Zellkontakte zwischen Epithelien

Zellen sind untereinander strukturell und funktionell durch verschiedene Zell-Zell-Kontakte verbunden: durch die Zonula adhaerens, das Desmosom (Macula adhaerens), das Konnexon (Gap Junction) und die bereits genannte Tight Junction (Zonula occludens) [4]. Letztere ist typisch für Epithelien und Endothelien und trägt zur epithelialen Barrierefunktion bei. Zusammen mit der Zonula und Macula adhaerens bildet sie den Schlussleistenkomplex (Abb. 3).

Zonula und Macula adhaerens sind als Haftverbindungen für die mechanische Verankerung zwischen den Epithelzellen verantwortlich. Die Zonula adhaerens befindet sich im Interzellulärspalt topographisch zwischen der am weitesten apikal liegenden Tight Junction und der Macula adhaerens. Sie wird durch die den Interzellulärspalt durchspannenden Cadherin- und Nectin-Adhäsionsproteine gebildet, die über Plaque-Proteine (z. B. Catenin) mit dem Zytoskelett verbunden sind [5]. Die punktförmigen Maculae adhaerentes bilden sich aus zwei zytoplasmatischen Plaques der sich gegenüberliegenden lateralen Zellmembranen, die mit Intermediärfilamenten verbunden

sind. Diese Plaques bestehen ebenfalls aus den Zellsalt durchquerenden Cadherinen sowie Desmoplakin und Plakoglobin [6].

Die Gap Junction (Konnexon), ein aus sechs Membranproteinen (Konnexinen) bestehender ringförmiger Kanal, bildet eine Verbindung zwischen benachbarten Zellen und ermöglicht so einen direkten Austausch kleinerer Moleküle bis ca. 1000 Dalton [7]. Sie können sich bei einem Zellschaden schließen und die geschädigte Zelle dadurch isolieren, wodurch ein Übergreifen der Schädigung auf die noch intakten, benachbarten Zellen verhindert wird [2].

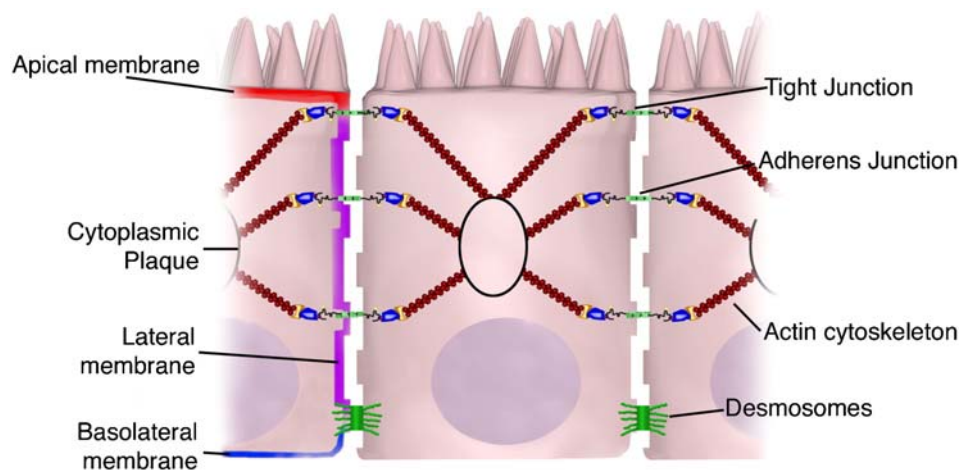


Abb. 3: Anordnung des gastrointestinalen, epithelialen Schlussleistenkomplexes. Dieser besteht aus zwischen benachbarten Zellen interagierenden Desmosomen, der Zonula adhaerens (Adherens Junction) und der Tight Junction. Zonula adhaerens und Tight Junction sind über Adapterproteine mit dem Aktinskelett verbunden [3].

2.1.2 Tight Junction

Die Tight Junction (Zonula occludens) ist ein Multi-Protein-Komplex und liegt topographisch in unmittelbarer Nachbarschaft zur apikalen Zell-Membran, wo sie die Grenze zwischen dieser und der basolateralen Membran darstellt (Abb. 4 A/B). Neben der Bildung der parazellulären Barriere- oder Kanalfunktion (gate function) wird angenommen, dass durch ihre Lage auch eine mögliche Verlagerung von

Membranproteinen der apikalen Membran in die basolaterale Zone und umgekehrt verhindert wird (fence function) [8, 9]. Ob diese Schrankenfunktion jedoch essentiell für die Aufrechterhaltung der Zellpolarität ist, bezweifeln neuere Untersuchungen an Epithelzellen, welche keine Tight Junctions ausbilden, aber dennoch eine erhaltene Polarität aufweisen [10, 11]. Gebildet wird diese gürtelförmige Kontaktzone im Wesentlichen aus der Claudin-Familie und den Transmembran-Proteinen Occludin und Tricellulin, welche zur Gruppe der Tight Junction-assoziierten-MARVEL-Proteine (TAMP) gehören, sowie dem "Junctional Adhesion Molecule" (JAM) (Abb. 4 C) [12-15]. In der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie imponieren sie zusammen als intramembranäre Molekülstränge, die ein netzartiges Maschenwerk um jede Zelle bilden und diese mit ihren benachbarten Zellen verbinden, wodurch sich eine Barriere aufbaut, die eine uneingeschränkte Passage von Lösungen oder Wasser durch den interzellulären Spalt verhindert [16]. Über die zytoplasmatischen Adapter-Proteine ZO-1, ZO-2 und ZO-3 (Zonula occludens-Proteine 1-3) ist die Tight Junction fest mit dem Zytoskelett der Epithelzellen verbunden [17]. Durch eine unterschiedliche Protein-Zusammensetzung der Tight Junction bestimmt sich ihre Dichtigkeit bzw. Kanaleigenschaft, wozu die Claudine den Hauptteil beitragen. Die unterschiedliche Zusammensetzung der 26 verschiedenen humanen Claudine führt entweder zu einem "dichten" oder einem "leckes" Epithel. Als "dicht" gelten Epithelien mit einer im Vergleich zur Zellmembran geringeren elektrischen Leitfähigkeit G der Tight Junction ($G_{TJ}/G_{Membran} < 1$). Diese dichten Epithelien finden sich z. B. in Kolon und Rektum oder im distalen Nierentubulus und dem Sammelrohr. Ist die Leitfähigkeit von Tight Junction und Zellmembran hierzu umgekehrt proportional ($G_{TJ}/G_{Membran} > 1$), ergibt sich ein durchlässiges bzw. "leckes" Epithel, wie es für den Dünndarm und den proximalen Nierentubulus typisch ist. Beispiele für nahezu undurchlässige und somit ausschließlich als Barriere fungierende Epithelien ($G_{TJ}/G_{Membran} < 1/100$) sind die Epidermis und die Harnblase [2].

Die Interaktion der verschiedenen Tight Junction-Proteine miteinander ist kein starrer Prozess, sondern unterliegt dynamischen und kontinuierlichen Umorganisationen. So konnte mittels "live cell imaging" die Mobilität von Occludin und ZO-1 innerhalb des Tight Junction-Komplexes bzw. zwischen Zellmembran und Zytosol (ZO-1) nachgewiesen werden [18]. Eine weitere Rolle wird der Tight Junction in der Genexpression und zellulären Signaltransduktion zugeschrieben, die u. a. zu Differenzierung und Proliferation von Epithelzellen führen [19-21].

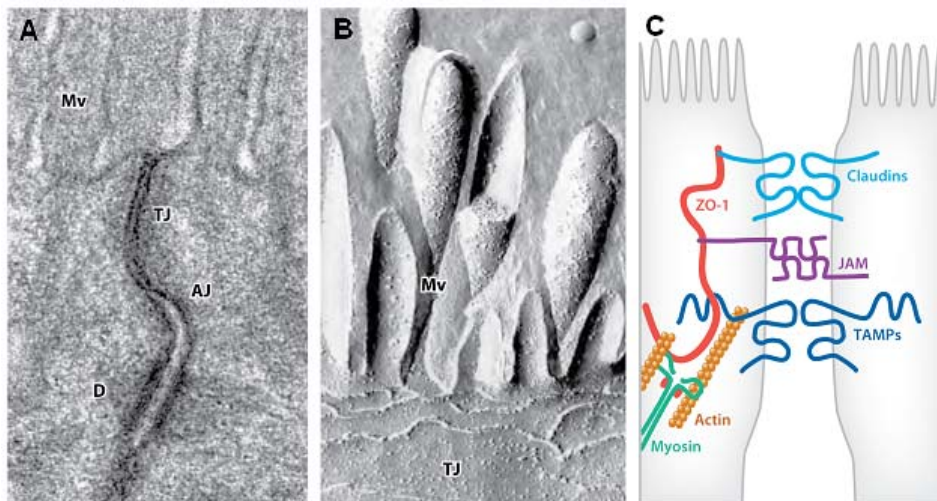


Abb. 4: Transmissionselektronenmikroskopische (A), gefrierbruchelektronenmikroskopische (B) und schematische (C) Darstellung einer Tight Junction (TJ). A/B: Die Tight Junction ist an der apikalen Zone zwischen Mikrovilli (Mv) und Zonula adhaerens (AJ, adherens junction) gelegen. Basolateral finden sich Desmosomen (D). C: Die Tight Junction besteht aus Transmembranproteinen (TAMP-Proteine, Claudine, JAM), die über Adapterproteine (ZO-1 bis ZO-3) mit dem Zytoskelett (F-Aktin, Myosin) verbunden sind. Modifiziert nach [22].

2.1.2.1 Occludin

Occludin ist ein aus vier Transmembrandomänen bestehendes integrales Protein der Tight Junction mit einem Molekulargewicht von ca. 65 kDa [15]. Es gehört gemeinsam mit Tricellulin (MarvelD2) und MarvelD3 zu den Tight Junction-assoziierten-MARVEL-Proteinen (TAMP), deren vier Transmembran-Domänen ein bestimmtes strukturelles Motiv, die MARVEL-Domäne (MAL and related proteins for vesicle traffic and membrane link) bilden. Zu den MARVEL-Proteinen gehören neben Occludin und Tricellulin auch Physine, Gyryne und MAL, wobei MAL (mysin and lymphocyte protein) ebenfalls vier Transmembran-Schleifen besitzt und hauptsächlich als bewegliches Protein in der apikalen Zone von Epithelien lokalisiert ist [13]. Zusätzlich besitzt es zwei extrazelluläre Schleifen aus jeweils 44-46 Aminosäuren, wobei die erste Schleife (ECL 1) typischerweise einen hohen Anteil (60 %) an Glycin- und Tyrosin-Resten

enthält. Intrazellulär befinden sich eine deutlich kleinere Schleife (10 Aminosäuresequenzen) sowie je eine kurze N-terminale und eine lange C-terminale Domäne (Abb. 5) [15].

Die zweite extrazelluläre Schleife (ECL 2) ist u. a. am Einbau von Occludin in die Tight Junction und der Interaktion mit den Occludin-Schleifen der benachbarten Zellen beteiligt [23]. Die zytosolische C-terminale Domäne interagiert über eine PDZ-Domäne mit den Tight Junction-assoziierten Proteinen ZO-1 und ZO-2, wodurch Occludin indirekt mit dem Zytoskelett verbunden wird [24], während für das N-terminale Ende die Regulation des Transports neutrophiler Zellen durch das Epithel beschrieben wurde [25]. Es bestehen Diskrepanzen der Studienergebnisse über die Wirkung von Occludin auf die Epithelbarriere. So sind einerseits bei einer Überexpression von Occludin in MDCK-Zellen ein Anstieg des transepithelialen Widerstands [26] und bei Unterexpression eine erhöhte Permeabilität [27] beschrieben worden. Andererseits zeigten Occludin-Knock-Out-Mäuse keine Einschränkung der epithelialen Barrierefunktion und waren lebensfähig, auch wenn die Tiere u. a. postnatale Wachstumsretardierung, Infertilität oder eine deutlich dünnere Knochenstruktur aufwiesen [28]. Occludin ist auch an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt. Hier zeigte sich bei ischämischen Hirnpathologien durch steigende Metalloproteinase-Level eine Proteolyse von Occludin und daraufhin eine vermehrte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke mit folgendem Hirnödem [29].

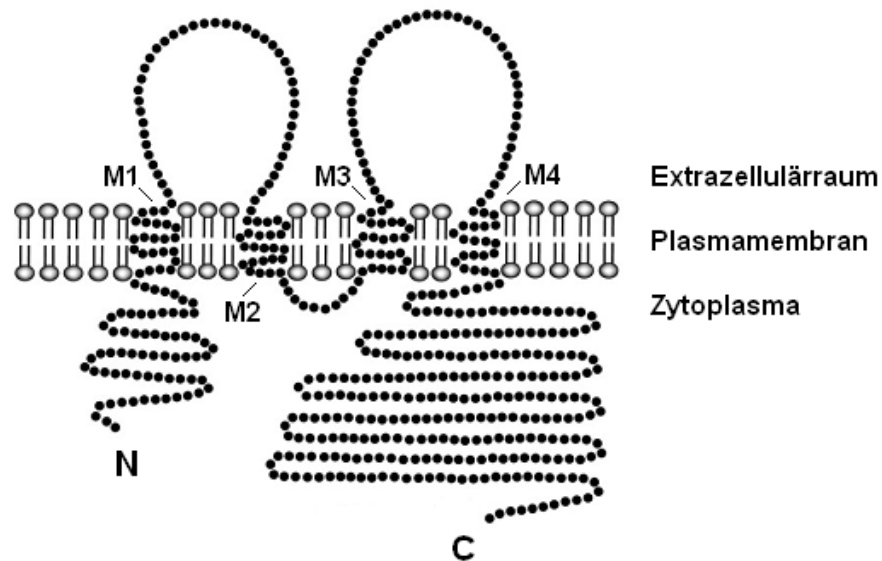


Abb. 5: Allgemeine Proteinstruktur von Occludin. Dieses besitzt vier Transmembran-Domänen (M1-M4) mit einem hohen Anteil an Tyrosin- und Glycin-Resten in M1 und M2, zwei extrazelluläre Schleifen (loops) und eine kleinere intrazellulär gelegene Schleife. Die kurze N- und die lange C-terminale Domäne liegen im Zytoplasma. Modifiziert nach [30].

2.1.2.2 Claudine

Bisher sind 26 humane Claudine (Claudin-1 bis -12 und -14 bis -27) beschrieben worden [31], die aus 207-305 Aminosäuren bestehen und ein Molekulargewicht von 21-34 kDa besitzen [32]. Sie gehören, wie das Occludin, zu den integralen Membran-Proteinen und besitzen je vier Transmembran-Domänen, außerdem ebenfalls zwei extrazelluläre Schleifen und eine kleinere intrazellulär gelegene Schleife (Abb. 6). Ihr kurzes N-terminales Ende und die deutlich längere C-terminale Domäne liegen intrazellulär [32]. Trotz der Strukturähnlichkeit besitzen Claudine mit Occludin keine Sequenzhomologie [12]. Die erste extrazelluläre und größere Schleife besitzt ein um drei Aminosäuren bestehendes G-L-W-Motiv und bildet die für Claudin typische Signatur [32]. An ihrem C-terminalen Ende befindet sich eine PDZ-Bindungsstelle, über welche die Mehrzahl der Claudine mit den PDZ-Bindungsstellen der Adapter-Proteine (ZO-1 bis ZO-3) interagiert [33]. Teilweise besitzen sie eine charakteristische

Ionenselektivität, die hauptsächlich durch die erste extrazelluläre Schleife bestimmt wird [34]. Des Weiteren können Claudine benachbarter Zellen spezifisch miteinander interagieren, wodurch sie zur gewebespezifischen Heterogenität in der Barrierebildung durch Tight Junctions beitragen sollen [35].

Funktionell lassen sich Claudine in zwei Gruppen unterteilen: Sie bilden zum einen eine Barriere gegenüber einer unkontrollierten parazellulären Diffusion (abdichtende Claudine), zum anderen sind einige Claudine in der Lage parazelluläre Kanäle auszubilden, die den Transport von Kationen, Anionen oder Wasser ermöglichen (Tabelle 1). Die kanalbildenden Claudine -2, -10a, -10b, -15 und -17 erhöhen die parazelluläre Ionenpermeabilität bzw. reduzieren den parazellulären Widerstand, wohingegen rein barriereformende Claudine zu einer Zunahme des parazellulären Widerstands führen [32]. Von allen Tight Junction-Proteinen sind Claudine hauptsächlich für die Bildung der Epithelbarriere verantwortlich, wobei im Darmepithel die Zusammensetzung der dort exprimierten Claudine zu den unterschiedlichen Barriereigenschaften führt. Im Verlauf des Intestinaltrakts bildet das Kolon das dichteste Epithel aus. Im Ratten-Modell werden dort die Claudine -1 bis -5, -7, -8 und -12 exprimiert, wobei die abdichtenden Claudine -1, -3, -4, -5 und -8 überwiegen [36]. Im Ileum hingegen werden, beitragend zu seinem relativ "undichten" Charakter, die durchlässigen Claudine -2, -7 und -12 häufiger exprimiert. Im Jejunum fehlen die abdichtenden Claudine -4 und -8 komplett [36].

Mittlerweile konnten viele pathologische Prozesse auf Veränderungen innerhalb der Claudin-Familie zurückgeführt werden. Ein Fehlen von Claudin-1 führte im Mausmodell zu einem frühen postnatalen Tod durch einen Wasserverlust über die Haut [37]. Auch Claudin-7-Knock-Out-Mäuse litten unter massivem renalen Wasser- und Elektrolytverlust, welcher innerhalb von 12 Tagen zum Tod führte [38]. Das kanalbildende Claudin-2 wird im Verlauf entzündlicher Darmerkrankungen wie Colitis Ulcerosa oder Morbus Crohn mehr, das abdichtende Claudin-1 weniger exprimiert, wodurch es zu einer Barrierefunktionsstörung und der folgenden klinischen Ausprägung mit massiven Durchfällen kommt [39]. Die Depletion von Claudin-5, eines für die Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke wichtigen Proteins, führte zu einer gröÙenselektiven Zunahme der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke für kleinere Moleküle bis 800 Da. [40]. Mutationen in den Claudinen -16 und -19 führten durch renalen Magnesiumverlust zu Hypomagnesiämie und Hyperkalziurie mit Nephrokalzinose, während es durch Mutationen von Claudin-14 zu erblicher Taubheit kommt [41-43].

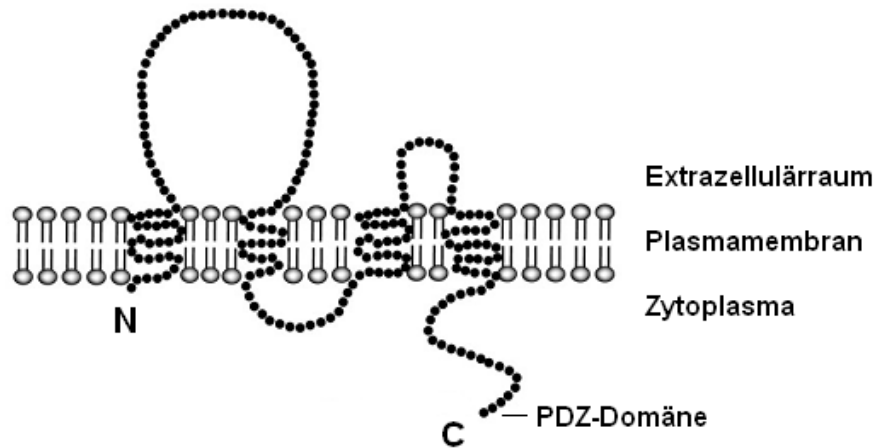


Abb. 6: Allgemeine Proteinstruktur eines Claudins. Diese bestehen aus vier Transmembran-Proteinen, zwei extrazellulären Schleifen (loops) sowie einer kleineren intrazellulär gelegenen Schleife. Sie besitzen eine überwiegend kurze N-terminale und eine lange C-terminale Domäne, an welcher die PDZ-Bindungsstelle sitzt. Modifiziert nach [30].

Tabelle 1: Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten Claudine. Gezeigt werden die unterschiedlichen Eigenschaften der Claudine hinsichtlich der Ausbildung von Poren oder einer Barrierefunktion. Tab. modifiziert n. [32].

Claudin	kanalbildend	barriereformend
Claudin 1		+
Claudin 2	+	
Claudin 3		+
Claudin 4		+
Claudin 5		+
Claudin 7	+ (Kationen)	+ (Anionen)
Claudin 8		+

2.1.2.3 Tight Junction-assoziierte Proteine

ZO-1 ist ein intrazelluläres, Tight Junction-assoziiertes Protein und gehört zur MAGUK-Familie (Membran-assoziierte Guanylat-Kinase) [44]. Es hat ein Molekulargewicht von ca. 220 kDa und dient als Verbindung zwischen den Proteinen der Tight Junction und dem Aktinskelett [33, 45].

Sein N-terminales Ende bindet mittels einer GUK-Domäne an Occludin und mittels einer PDZ-Domäne (PSD95/dlg/ZO-1) an Claudin und JAM, während das C-terminale Ende mit dem Aktin-Skelett interagiert [33, 44, 46]. ZO-1 ist als Signal-Protein beschrieben und soll an der Regulation der Gen-Expression beteiligt sein [47]. Ihre Bedeutung für die Funktion der Tight Junction wird deutlich, sobald man die Proteine aus dieser Einheit eliminiert. MDCK-Epithelzellen mit einer extrem reduzierten ZO-1- und ZO-2-Protein-Expression zeigten einen deutlichen Anstieg des parazellulären Fluxes größerer Moleküle [48]. Eine komplette Depletion von ZO-1 und ZO-2 in einer Maus-Epithelzelllinie (Eph4-Zellen) führte sogar zu einer gänzlich fehlenden Bildung von Tight Junctions [11].

Aktinfilamente, neben den Intermediärfilamenten und Mikrotubuli ein Hauptbestandteil des Zytoskeletts, befinden sich zum größten Teil unmittelbar unterhalb der Zellmembran und definieren die Zellform und Zellbewegungen. F-Aktin besteht aus zweisträngigen helikalen Aktin-Polymeren und hat einen Durchmesser von 4-9 nm [49]. Es ist eng mit den an die Tight Junction grenzenden Kontaktpunkten der lateralen Zellmembran verknüpft und reguliert die gröÙenselektive parazelluläre Diffusion durch dynamische Wechselwirkungen mit den Tight Junctions [50]. So führt eine durch Cytochalasin und Colchicin herbeigeführte Unterbrechung der Aktinfilamente in Caco-2-Zellen zu einer gesteigerten parazellulären Permeabilität [51]. Die genauen molekularen Mechanismen, mit denen das Zytoskelett zur Regulation der epithelialen Permeabilität beiträgt - ob möglicherweise durch Tight Junction-Umverteilung innerhalb der lateralen Membran [50] oder über Kontraktionen des Aktin-Myosin-Netztes [52] - sind bisher nicht genau bekannt [53].

2.2 Absorptionenhancer

Die orale Applikation ist eine einfache und auch die meist genutzte Möglichkeit Medikamente einzunehmen. Viele, besonders lipophile Stoffe können gut im gastrointestinalen Trakt resorbiert werden und Vorteile gegenüber einer parenteralen Verabreichung sind die einfache Praktikabilität, die hohe Kosteneffizienz und ein praktisch fehlendes Infektionsrisiko.

Im Gastrointestinaltrakt gibt es zwei Hauptwege für die Resorption von Soluten, Wasser und Makromolekülen in die Blutbahn:

- Die transzelluläre Passage durch die Zellmembranen hindurch: sie wird reguliert durch spezifische Kanäle, Carrier und Pumpen oder durch Transzytose, bei welcher gelöste und ungelöste Partikel vesikulär durch die Zelle geschleust und abgegeben werden.
- Der parazelluläre Weg: Hierbei diffundieren die Solute durch die Tight Junctions und die Zellzwischenräume.

Die Art der Resorption ist dabei abhängig von den biophysikalischen Eigenschaften der Moleküle. Viele Makromoleküle sind lipophil und bei einem im Intestinum bestehenden alkalischen pH-Wert elektrisch ungeladen, wodurch sie durch die Lipidphase der Zellmembranen, also auf transzellulärem Wege transportiert werden können [54]. Größere hydrophile Moleküle hingegen, wie z. B. Proteine und Peptide, können nur parazellulär über Tight Junctions resorbiert oder endozytiert werden [55]. Die Tight Junction bildet eine funktionelle Barriere zwischen dem Lumen und dem Interstitium, die den parazellulären Transport limitiert und somit zur häufig schlechten oralen Bioverfügbarkeit hydrophiler und geladener Substanzen beiträgt. Medikamente bzw. Proteine besitzen dann eine geringe Bioverfügbarkeit, wenn sie aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften, ihrer Molekülgröße oder der ihnen eigenen physikalischen, chemischen oder proteolytischen Instabilität auf dem Weg durch den Gastrointestinaltrakt nur zu einem Bruchteil resorbiert und teilweise wieder ausgeschieden werden [56]. Acyclovir zum Beispiel, ein antivirales Medikament gegen Herpes-Viren, besitzt eine orale Bioverfügbarkeit von nur ca. 20 %, was u. a. durch seine hydrophilen Eigenschaften verursacht wird, die eine Resorption über den parazellulären Weg notwendig macht [57, 58]. Die orale Zufuhr solcher Stoffe ist daher für die biopharmazeutische Forschung eine große Herausforderung.

Die Entwicklung von absorptionsbeschleunigenden Zusatzstoffen (absorption enhancer), welche, gekoppelt an die schlecht resorbierbaren Moleküle, diese vor zu schnellem Abbau oder ungenutzter Ausscheidung schützen und die Aufnahme durch die Epithelbarriere des Gastrointestinaltrakts verbessern, ist daher Gegenstand der Forschung. Erste bekannte Wirkstoffe, die über eine Tight Junction-Modulation die parazelluläre Barriere beeinflussen, waren Calcium-Chelatoren (EDTA) [59], Gallensalze und Fettsäuren [60]. Ein C-terminales Fragment des Clostridium perfringens-Enterotoxins erhöhte durch Interaktion mit Claudin-4 die Permeabilität für 4-kDa-Dextran im Jejunum von Ratten [61]. Absorptionsverbessernde Materialien pflanzlichen Ursprungs sind u. a. Gele und Polysaccharide von verschiedenen Arten aus der Gattung der Aloen, die im Darmgewebe von Ratten zu einer Reduktion des transepithelialen elektrischen Widerstands (TER) und zu einer verbesserten Permeation von Atenolol führen [62].

Diese Adjuvanzen haben bestimmte Kriterien zu erfüllen: Sie sollten zum einen nicht toxisch und reversibel wirksam, gut verfügbare und herstellbar, biokompatibel bzw. biologisch abbaubar sein, zum anderen für die verbesserte Aufnahme durch die lipophile Zellmembran geladene Partikel oder lipophile Untergruppen besitzen und die Moleküle vor einer Denaturierung wie z. B. durch die Magensäure schützen [63]. In verschiedenen Studien und auch als Thema dieser Arbeit wurde die mögliche Nutzung von Chitosan, eines natürlichen Polysaccharids, als Beispiel eines neuen als Arzneistoffträger genutzten Makromoleküls, welches den parazellulären Transport von hydrophilen Wirkstoffen erhöhen kann, untersucht.

2.3 Chitosan

2.3.1 Vorkommen

Chitosan ((1-4)-2-Amino-2-Deoxy- β -D-Glukan) ist ein hydrophiles und positiv geladenes Polysaccharid, bestehend aus D-Glucosamin-, sowie N-Acetyl-D-Glucosamin-Untereinheiten, das durch Deacetylierung von Chitin gewonnen wird [64].

Chitin, ein N-Acetyl-Glucosamin-Polymer, ist der Hauptbestandteil des Exoskeletts von Krustentieren und Insekten sowie der Zellwand von Pilzen, wo es eine Stützfunktion einnimmt. Es ist das nach Cellulose häufigste Biopolymer der Erde und unterscheidet sich von ihr in seiner Form (Abb. 7) nur durch das Vorhandensein einer Acetamido-Gruppe anstelle einer Hydroxy-Gruppe [65].

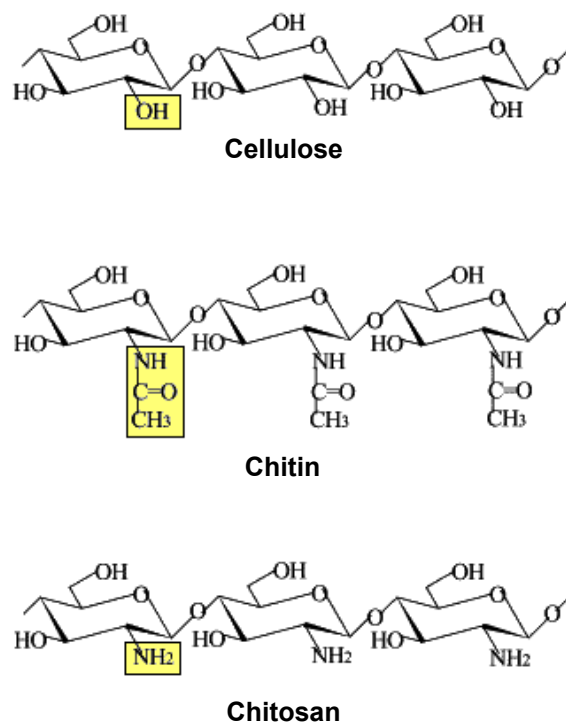


Abb. 7: Strukturformeln der Polysaccharide Cellulose, Chitin und Chitosan. Chitin unterscheidet sich von der Cellulose mit seiner Hydroxygruppe durch eine Acetamidogruppe. Durch Deacetylierung entsteht aus der Acetamidogruppe des Chitins die Glucosamid-Einheit des Chitosans. Modifiziert nach [66].

2.3.2 Eigenschaften

Die Umwandlung von Chitin zu Chitosan erfolgt enzymatisch durch Deacetylierung der Acetamido-Gruppen in freie Amino(-NH₂)-Gruppen (Abb. 7). Eigenschaften dieser Amino-Untereinheiten sind u.a. eine hohe Biokompatibilität und gute biologische Abbaubarkeit sowie eine fehlende Toxizität [67], womit Chitosan die nötigen Anforderungen für einen Protein-Zusatzstoff bzw. -Vehikel erfüllt. Abgebaut wird es in vitro u. a. durch Chitinasen, in vivo durch Lysozyme und bakterielle Enzyme des Kolons, wie Pectin und Cellulase. Der in vivo-Abbau von Chitosan durch die humanen Chitinasen wurde bisher nicht untersucht [67, 68]. Einer der ersten Berichte über Chitosan handelte von der konzentrationsabhängigen Verbesserung der Aufnahme von Insulin durch die nasale Mukosa von Schafen und Ratten [69]. Mittlerweile ist eine beschleunigte Aufnahme von Stoffen durch das gastrointestinale [70], das nasale [71] und buccale [72], das dermale [73] und pulmonale [74, 75] Gewebe beschrieben worden.

Es wird angenommen, dass die Interaktion dieser positiv geladenen Aminogruppen mit den negativ geladenen Oberflächenproteinen der Zellmembran bzw. der Tight Junction zu einer guten Mukoadhäsion und einer konzentrations- und pH-abhängigen reversiblen Umorganisation innerhalb der Tight Junction und dadurch zu ihrer Öffnung und folgenden erhöhten parazellulären Permeabilität führen [76]. Ebenso sind auch eine Umverteilung von F-Aktin, eines Bestandteils des Zytoskeletts und von ZO-1, eines Tight Junction-assoziierten Proteins, beschrieben worden [77].

Chitosan ist in seiner ursprünglichen Form ein Pulver und nur in protonierter Form sowie in Verbindung mit sauren Valenzen löslich. Der Begriff Chitosan steht für eine Vielzahl von Polymeren mit unterschiedlichen Deacetylierungsgraden und Molekulargewichten. Der Grad der Deacetylierung liegt meist zwischen 70 und 95 %, das Molekulargewicht bei 10-1000 kDa [78]. Seine positive Ladung besitzt Chitosan bei pH-Werten < 7.0, sein pKs-Wert liegt je nach Derivat zwischen 5.5 und 6.5 [79]. Bei neutralem und alkalischem pH-Wert verliert es seine Ladung, wird zunehmend schlechter löslich oder fällt aus der Lösung aus [80]. Diese Umstände limitieren einen Gebrauch besonders in der eher alkalischen Umgebung von Dünndarm und Kolon, weshalb verschiedene Chitosan-Derivate mit unterschiedlichen bzw. verbesserten Eigenschaften hinsichtlich Löslichkeit und Mukoadhäsion entwickelt wurden.

2.3.3 Chitosan-Derivate

Die Eigenschaften von Chitosan können durch verschiedene Derivate mit unterschiedlichem Molekulargewicht und Deacetylierungsgrad variiert werden. Chitosane mit einem höheren Molekulargewicht und/oder einem niedrigeren Acetylierungsgrad ($\leq 35\%$) verbessern die epitheliale Permeabilität [81]. Andererseits entstanden verschiedene Derivate, wie u. a. Varianten mit Thiol(-SH)-Gruppen, welche zu einer verbesserten Mukoadhäsion durch die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Thiol-Gruppen des Chitosan und Cystein-reichen Untergruppen von Glykoproteinen der Mukusschicht führen [82]. Auch N-Trimethyl-Chitosan (TMC), das durch Methylierung der Amino-Gruppen von Chitosan gewonnen wird und durch eine permanente positive Ladung über einen großen pH-Bereich löslich ist, besitzt bei neutralem pH-Wert mukoadhäsive und absorptionsverbessernde Eigenschaften [83]. Die Menge der Methylierung wird als Quaternisierungsgrad angegeben (degree of quaternisation, DQ) und bestimmt die mukoadhäsiven Eigenschaften und Löslichkeit von TMC. Hierbei führt ein steigender DQ zu einer höheren Mukoadhäsion [84]. Des Weiteren wurden chitosanbasierte und als Molekülvehikel dienende Mikro- oder Nanopartikel entwickelt, welche die Absorption von Molekülen, neben dem parazellulären Transport über die Tight Junction, zusätzlich auch auf transzellulärem Wege über Endozytose verbessern [85].

2.3.4 Anwendung

Kommerzielle Verbreitung findet Chitosan in Kosmetika [86], in Zahnpasta gegen Zahn-erosion [87] und als diätetischer Zusatzstoff zur Reduktion von Übergewicht [88] und Hyperlipoproteinämie. In Verbindung mit einer hypokalorischen Diät soll es die Fett-Resorption im Gastrointestinaltrakt durch die Bindung von Fettsäuren und Triglyceriden reduzieren und deren Ausscheidung erhöhen [89]. Durch die zusätzliche Bindung von Gallensäuren fördert es die hepatische Synthese neuer Gallenbestandteile und soll somit die Reduktion einer Hyperlipoproteinämie unterstützen [90]. Auch wurde in vivo unter einer supplementären Chitosan-Gabe eine reduzierte Nahrungsaufnahme sowie

eine erhöhte Serum-Konzentration des u.a. appetitzügelnd wirkenden Hormons Leptin gemessen [91].

In Verbandmaterialien zeigt es neben seiner antibakteriellen Aktivität auch blutstillende und die Wundheilung fördernde Eigenschaften [92] und wird angewendet, um die Hämostase bei Blutungen zu fördern [93]. Die antimikrobiellen [94], antifungalen [95] und antiviralen [96] Eigenschaften von Chitosan werden u. a. durch Zerstörung der Zellwände ermöglicht.

Obwohl es viele Ansatzpunkte für einen vielfältigen Gebrauch von Chitosan in der Medizin gibt, ist sein Einsatz bisher auf diese wenigen Bereiche beschränkt. Des Weiteren wird aktuell der Einsatz von Chitosan in der Gewebezüchtung u. a. der Nerven- und Knorpelzüchtung bzw. zur funktionellen Regeneration von Axonen bei Rückenmarksverletzungen erforscht [97-99]. Im Bereich der Chitosan-Nanopartikel-Forschung gibt es Untersuchungen die zeigen, dass oral zugeführte Insulin-Chitosan-Nanopartikel zu einer verbesserten Aufnahme und längeren Blutzuckersenkung als ohne Chitosan oder subkutan verabreichtes Insulin führen [85, 100].

2.4 Zielstellung

Chitosan gilt als biokompatibles Polymer und wird seit den 90er Jahren aufgrund seiner mukoadhäsiven und absorptionsverbessernden Fähigkeiten vielfältig untersucht. Es ist bisher als diätetischer und pharmazeutischer Zusatzstoff verbreitet und wird in seiner Funktion als Absorptionsbeschleuniger intensiv beforscht. Die molekularen Wirkungsmechanismen von Chitosan auf die Epithelbarriere und hier im Besonderen auf die Tight Junction sind dennoch bisher weitgehend unklar und die Untersuchungen und Ergebnisse nicht eindeutig und häufig kontrovers. Forschungen zur Chitosanwirkung auf Zellen des intestinalen Trakts beschränken sich bisher hauptsächlich auf Caco-2-Zellen, einer Zelllinie aus menschlichen epithelialen kolorektalen Adenokarzinomzellen. Ziel dieser Arbeit ist es, die Effekte von niedrigmolekularem Chitosan (50-190 kDa, Deacetylierungsgrad 75-85 % Chitosan) auf HT-29/B6-Zellen, einer etablierten humanen Kolonkarzinom-Zelllinie, darzustellen. Hierbei wurde das Augenmerk der Untersuchungen sowohl auf die Wirkung auf die Tight Junction und damit die

parazelluläre Barriere, als auch auf den transzellulären Transportweg und die ihnen unterliegenden molekularen Mechanismen gelegt.

Ein Ziel ist zunächst, die für Chitosan allgemein anerkannte Aussage eines nicht toxischen Biopolymers zu überprüfen und geeignete Konzentrationen zu etablieren. Anschließend sollen die an der Chitosanwirkung involvierten Strukturen detektiert, die Größenordnung der Tight Junction-Öffnung eruiert und der molekulare Wirkungsmechanismus herausgearbeitet werden.

3. Material und Methoden

3.1 HT-29/B6-Zellen

Sämtliche Versuche wurden mit Zellen der Linie HT-29/B6 durchgeführt, einem Klon der humanen kolorektalen Adenokarzinomzelllinie HT-29 [101]. HT-29/B6-Zellen bilden einen polarisierten Monolayer aus, welcher mit Mukusproduktion, Cl⁻-Sekretion, der Ausbildung von Mikrovilli, interzellulären Tight Junctions und basolateralen Nuklei alle funktionellen Eigenschaften eines Kolonepithels aufweist und somit ein etabliertes Zellkulturmodell darstellt [102, 103].

Die Kultivierung der HT-29/B6 Zellen erfolgte in 25 cm² Zellkulturflaschen mit Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) unter Zugabe von 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Die Umgebungsatmosphäre im Brutschrank betrug 37 °C und 5 % CO₂. Durch Passagierung mit 0.05 % Trypsin/EDTA-Lösung wurden die Zellen bei Konfluenz von den Zellkulturflaschen gelöst und mit einer durchschnittlichen Konzentration von 7x10⁵ Zellen/cm² auf permeablen Zellkultur-Filtern (Millicell-PCF, Durchmesser 12 mm, effektive Membranfläche 0.6 cm², Porengröße 3 µm) ausgesät. Diese Filter wurden in Zellkulturschalen (Durchmesser 6 cm) gesetzt, so dass die Zellen sowohl auf der apikalen als auch auf der basolateralen Seite mit Zellkulturmedium in Kontakt kamen. Die Verwendung erfolgte nach Ausbildung eines konfluenten, einschichtigen Zellrasens (Monolayer) innerhalb von 6-8 Tagen.

3.2 Chitosan-Lösungen

Für alle Versuche wurde niedrig-molekulares Chitosan mit einem Molekulargewicht von 50-190 kDa, je nach Viskosität, sowie einem Deacetylierungsgrad von 75-85 % verwendet.

Zunächst wurde eine 1 %ige Chitosan-Stammlösung hergestellt, bestehend aus dem Chitosan-Pulver, HEPES-Lösung (pH 7.4, s. Kapitel 3.3.5 Puffer und Lösungen) sowie 2.5 %iger Essigsäure. Die Zugabe der Essigsäure erfolgte, um den für die Löslichkeit

von Chitosan essentiellen sauren pH-Wert (6.5) zu erreichen. Äquivalent dazu wurde eine "saure" Kontroll-Lösung aus HEPES-Lösung und ebenfalls 2.5 %iger Essigsäure hergestellt, um eine eventuelle Wirkung vermittelt durch pH-Wert-Änderung auszuschließen.

Aus diesen beiden Stammlösungen wurden durch Zugabe entsprechender Mengen HEPES-Lösung die Chitosan-Versuchslösungen in Konzentrationen von 0.01 %, 0.005 % und 0.002 % sowie entsprechende Kontrolllösungen hergestellt. Alle Medien und Lösungen waren vor Zugabe zu den Zellen auf 37 °C vorgewärmt.

Zu Beginn der Versuche wurde das Zellkulturmedium zuerst auf der basolateralen, dann auf der apikalen Seite entfernt, die Zellen dreimal mit HEPES-Lösung gespült und zunächst 30 Minuten bei 37 °C in HEPES-Lösung belassen, um nach dem mehrmaligen Wechsel des Mediums einen konstanten Widerstand sicherzustellen. Anschließend wurden die verschiedenen Chitosan- und Kontroll-Lösungen zeitgleich und volumenäquivalent stets der apikalen Seite der Zellen hinzugefügt. Bei den Untersuchungen zur Reversibilität des Chitosan-Effekts wurden die Lösungen nach der gewünschten Inkubationszeit wieder entfernt, die Zellen dreimal mit konventionellem Zellkulturmedium gewaschen und im Medium belassen.

3.3 Material und Geräte

3.3.1 Geräte

1286 Electrochemical Interface	Solartron-Schlumberger, Farnborough, UK
402 Frequency Response Analyzer	Beran Instruments, Gilching
Acrylamid-Gelelektrophorese-Kammer	Bio-Rad, Hercules, USA
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	Bio-Rad, Hercules, USA
Brutschrank	Heraeus, Hanau
β-Counter: Tri-Carb 2100TR	Packard, Meridan, CT, USA
Feinwaage R 200 D	Sartorius, Göttingen
Fluorometer: Spectramax Gemini	Molecular Devices, Sunnyvale,

Heizblock	USA
Lumineszenzbild-Analysator LAS 1000	Grant, Berlin
Magnetrührer IKA-Combimag	Fuji, Tokyo, Japan
Magnetrührfische	Janke & Kunkel KG, Staufen
Konfokales Laser Scanning Mikroskop 510 META	Merck, Darmstadt
Mikrotiterplattenlesegerät Spectra Classic	Zeiss, Jena
Netzgerät Power Pac 200	Tecan, Grödig, Österreich
Sterilwerkbank BSB4A	Bio-Rad, Hercules, USA
	Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim
Ussing-Kammer	Institut f. Klin. Physiologie, Charité, CBF, Berlin
	UniEquip, Martinsried
Vakuumzentrifuge Univapo 100 H	Bio-Rad, Hercules, USA
Western Blot Transfer-Kammer	Institut f. Klin. Physiologie, Charité, CBF, Berlin
Widerstandsmessgerät	Biometra, Göttingen
Wippe WT-12	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Biofuge 13	Biosan, Riga, Lettland
Mikrotiterplatten-Zentrifuge LMC-3000	Beckman, Palo Alto, USA
Zentrifuge Beckman AvantiJ25	

3.3.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Menzel Gläser, Braunschweig
Einmalspritzen (1 ml)	Becton Dickinson, Madrid, ESP
Eppendorf-Gefäße	Eppendorf, Hamburg
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Filterpapier (3 mm)	Whatman, Maidstone, GBR
Gel Blotting Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Gelfiltrationssäulen Performa DTR	Edge Bio, Gaithersburg, USA
Glas-Vials	Perkin Elmer, Weiterstadt

Injektionskanülen (Sterican)
Mikrotiterplatte 6-, 24-, 96-well
Objektträger SuperFrost Plus
Pipettenspitzen
PVDF-Transfer-Membran
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 0,5 ml)
Rundboden-Röhrchen (10 ml)
Zellkulturfilter Millicell PCF (3 µm, 0.6 cm²)
Zellkulturflaschen (25 cm²)
Zellkulturlochplatten (6-, 12-, 24-, 96-Loch)
Zellkulturschalen (Ø 6 cm)
Zellschaber

B. Braun, Melsungen
Sarstedt, Nümbrecht
Menzel Gläser, Braunschweig
Eppendorf, Hamburg
Perkin Elmer, Weiterstadt
Eppendorf, Hamburg
Greiner, Frickenhausen
Millipore, Schwalbach
Nunc, Roskilde, Dänemark
Nunc, Roskilde, Dänemark
Nunc, Roskilde, Dänemark
Sarstedt, Nümbrecht

3.3.3 Substanzen und Chemikalien

Acrylamid
Agarose
APS (Ammoniumperoxiddisulfat)
BCA-Protein Assay Reagenz A+B
Bromphenolblau (Laemmli)
BSA
Chitosan
DAPI
Dulbecco's Minimum Essential Medium
EDTA
EGTA
Ethanol
FKS
FITC-Dextrane (4, 10, 20 kDa)
Fluorescein
Glycin

Serva, Heidelberg
Invitrogen, Karlsruhe
Sigma-Aldrich, Steinheim
Pierce, Rockford, Illinois, USA
Amersham, München
Roth, Karlsruhe
Sigma-Aldrich, Steinheim
Roche, Mannheim
Biochrom AG, Berlin
Merck, Darmstadt
Sigma-Aldrich, Steinheim
Merck, Darmstadt
Biochrom AG, Berlin
Sigma-Aldrich, Steinheim
Sigma-Aldrich, Steinheim
Serva, Heidelberg

HEPES	Serva, Heidelberg
H ₂ O (molecular biology reagent)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lumilight Western Blotting Kit	Roche, Mannheim
Mannitol	Merck, Darmstadt
[³ H]-Mannitol	American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, USA
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Serva, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
PBS	PAA, Pasching, Österreich
PBS-Tabletten	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
PFA 16 %	EM Sciences, Hatfield, USA
Phalloidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pro Taqs Mount Fluor	Biocyc, Luckenwalde
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin/EDTA	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.3.4 Inhibitoren

BaCl ₂	Sigma-Aldrich, Steinheim
BAPTA-AM	Merck, Darmstadt
ML-7	Merck, Darmstadt
NFA	Sigma-Aldrich, Steinheim
NPPB	Sigma-Aldrich, Steinheim
U0126	Merck, Darmstadt
Y-27632	Merck, Darmstadt

3.3.5 Puffer und Lösungen

BCA-Protein-Assay-Reagenz:	<i>Lösung A:</i> Na_2CO_3 , NaHCO_3 , Bicinchoninsäure (BCA), Natriumtartrat, 0.1 M NaOH <i>Lösung B:</i> 4 % Kupfer(II)sulfat Mischungsverhältnis 196 : 4 (A : B)
Blockierungslösung:	5 % BSA, 0.02 % NaN_3 in PBS-T bzw. TBS-T
Chitosan-Lösung (1 %, 20 ml):	0.2 g Chitosan, HEPES + 2.5 % Essigsäure
Elektrophorese-Puffer:	190 mM Glycin, 25 mM Tris, 0.1 % Sodiumdodecyl-Sulfat (SDS)
HEPES-Lösung:	137.6 mM NaCl, 2.4 mM Na_2HPO_4 , 0.6 mM NaH_2PO_4 , 5.4 mM KCl, 1.2 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure), 10 mM D(+)-Glucose
Lumi-Light ^{Plus} Reagenz:	5 ml Enhancer Solution + 5 ml Stable Peroxide Solution
Lysepuffer:	20 mM Tris-Cl pH 7.4, 5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 0.6 mM EGTA, 1 Tbl. Complete Mini ohne EDTA / 10 ml Lysepuffer
PBS-T:	2x PBS, 0.1 % Tween-20
Sammelgel:	5 % Acrylamid, 125 mM Tris (pH 6.8), 0.1 % SDS, 0.1 % APS, 0.1 % TEMED
SDS-Probenpuffer (Laemmli):	125 mM Tris pH 6.8, 10 % SDS, 500 mM DTT, 0.001 % Bromphenolblau, 50 % Glycerol

TBS-T:	10 mM Tris pH 7.3, 137 mM NaCl, 0.1 % Tween-20
Transferpuffer:	190 mM Glycin, 25 mM Tris, 10 % Methanol
Trenngel:	8.5 / 12.5 % Acrylamid, 0.35 mM Tris (pH 8.8), 0.1 % SDS, 0.1 % APS, 0.05 % TEMED

3.3.6 Antikörper

β-Actin (mouse)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Alexa Fluor® 488/594 anti-rabbit / anti-mouse	
IgG (goat)	Molecular Probes, Eugene, USA
Anti-Claudin -1/-2/-3/-4/-5/-7/-8 IgG (rabbit / mouse)	Zymed, San Francisco, USA
Anti-Occludin / Anti-ZO-1 IgG (rabbit / mouse)	Zymed, San Francisco, USA

3.4 Elektrophysiologische Methoden

3.4.1 Transepithelialer elektrischer Widerstand: Manuelle Messung

Die Wirkung von Chitosan auf die Barriereigenschaften des Epithels lässt sich durch die manuelle Messung des TER an einem Ohmmeter bestimmen [101]. Hierzu wurden HT-29/B6-Zellen auf permeablen Zell-Filtern ausgesät und in Kulturschalen gesetzt. Die Messung des TER erfolgte durch zwei Ag/AgCl-Chopstick-Elektroden, wobei eine Elektrode direkt über dem Zellrasen der Filter (apikal), die zweite im Medium der Kulturschalen (basolateral) platziert wurde. Vor und zwischen den Messungen wurden die Elektroden mit 80 % Ethanol desinfiziert. Um optimale Umgebungsbedingungen für die Zellen zu gewährleisten und Temperaturschwankungen zu vermeiden, befanden sich die Kulturschalen während der Messung auf einer 37 °C warmen Heizplatte,

dazwischen in einem ebenfalls 37 °C warmen Brutschrank. Vor jedem Experiment wurde der Leerwiderstand an einem Filter ohne Zellrasen in Medium ermittelt. Die gemessenen transepithelialen Widerstände wurden um diesen Leerwiderstand reduziert und auf die Epithelfläche (0.6 cm²) bezogen, so dass die Angabe von TER als Ω*cm² erfolgen kann.

3.4.2 Widerstandsmessungen: Ussing-Kammern

3.4.2.1 Ussing-Technik

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Chitosan auf die Barriereigenschaften von Epithelien eignet sich die Benutzung von Ussing-Kammern, einer in-vitro-Technik, die die Messung von Widerstand, Strom und Spannung erlaubt [104]. Eine Ussing-Kammer besteht aus zwei mit Flüssigkeit gefüllten Halbzellen, welche durch ein Epithel voneinander getrennt sind (Abb. 8). Über ein erstes Elektrodenpaar, welches über eine Agar-Brücke in unmittelbarer Nähe zum Epithel mit der Badlösung verbunden ist, wird die Potentialdifferenz über dem Epithel mittels eines Voltmeters gemessen. Ein zweites Elektrodenpaar ist in größtmöglicher Entfernung zum Epithel mit der Badlösung verbunden und an eine Gleichstromquelle und ein Amperemeter angeschlossen. Der TER wird aus den Potentialänderungen gemessen, die durch kurze Strompulse von 50 µA im Abstand von drei Sekunden induziert werden. Nach dem Ohm'schen Gesetz ($R = U/I$) errechnet sich der TER aus den Potentialdifferenzen U_1 und U_2 , die sich nach Applikation der Ströme I_1 und I_2 durch den Rechteckgenerator über dem Epithel einstellen:

$$R = (U_1 - U_2) / (I_1 - I_2)$$

Nach Abzug des Leerwiderstands ergibt sich der TER. Die transepitheliale Spannung (U^e) wurde direkt gemessen. Aus dem Quotienten der Spannung und des transepithelialen elektrischen Widerstands errechnet sich der äquivalente Kurzschlussstrom (I_{sc}):

$$I_{sc} = U^e / TER$$

Die Messwertkorrektur um den Leerwiderstand ist nötig, da die Flüssigkeit zwischen den die Spannung messenden Elektroden einen konstanten Widerstand aufweist. Zu Beginn wurden daher die Kammern zunächst ohne einen Zellkulturfilter mit der später benutzten Badlösung befüllt und der Widerstand dieser Lösung sowie das Asymmetrie-potential der Spannungselektroden bestimmt. Diese Leerwerte wurden gespeichert und später von den ermittelten Messwerten abgezogen. Die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden in Ussing-Kammern durchgeführt, die den direkten Einsatz von Zellkulturfiltern erlauben [101].

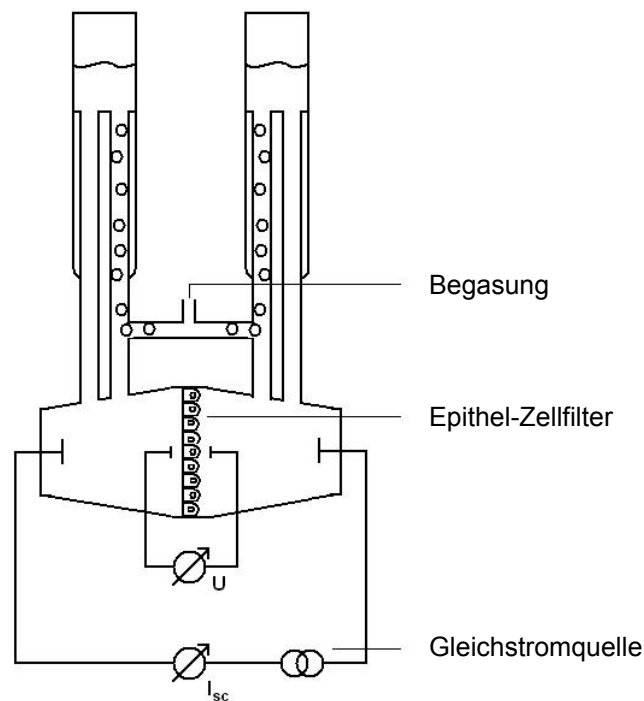


Abb. 8: Schematischer Aufbau der Ussing-Kammer. Der zwischen den beiden Kammerhälften der Ussing-Kammer eingespannte Zellfilter wird mit einer 37 °C warmen Badlösung umspült. Zwei Elektrodenpaare registrieren die Potentialdifferenz (U) sowie den Strom (I) über dem Epithel. Modifiziert nach [105].

3.4.2.2 Versuchsablauf

Nach Einspannen der Zellkulturfilter wurden in jede Kammerseite gleichzeitig je 10 ml der vorgewärmten HEPES-Lösung gegeben. In jeder Kammer erfolgte eine kontinuierliche Begasung mit 95 % O₂ und 5 % CO₂, wodurch eine ständige Umwälzung der Flüssigkeit bzw. eine gleichmäßige Verteilung der später zugegebenen Substanzen gewährleistet wurde sowie die Aufrechterhaltung einer konstanten Flüssigkeitstemperatur von 37 °C. Nach einer Äquilibrationszeit von 30 Minuten erfolgte die Chitosan-Zugabe. Dazu wurde auf der apikalen Seite das entsprechende Volumen aus einer 0.01 % Chitosan- bzw. der sauren Kontroll-Lösung hinzupipettiert, um die gewünschte Chitosan-Konzentration (0.01-0.002 %) zu erhalten. Basolateral wurde die entsprechende Menge Kontroll-Lösung dazugegeben, um Widerstandsschwankungen durch Volumen- und pH-Differenzen zwischen den beiden Kompartimenten zu vermeiden.

Für die Recoveryversuche wurden nach Ablauf des Messzeitraums die Lösungen in einer Verdünnungsreihe mit konventionellem Medium ausgewaschen. Hierbei wurden ca. 6x innerhalb einer Stunde sowohl auf der apikalen als auch der basolateralen Kammerseite gleichzeitig jeweils die Hälfte der Chitosan-Ringer-Lösung abpipettiert und durch konventionelles Medium ersetzt.

Eine mögliche Chitosanwirkung auf das Zytoskelett wurde durch die Zugabe von Inhibitoren der Aktin-Myosin-Interaktion (vor Chitosan-Applikation) untersucht. Eingesetzt wurden der selektive Myosin-Leichtketten-Kinase-Inhibitor ML-7 (10⁻⁵ M), der Rho-assoziierte Protein-Kinase-Inhibitor Y-27632 (10⁻⁵ M) und der membrangängige Ca²⁺-Chelator BAPTA-AM (2x10⁻⁵ M). Des Weiteren wurden als Inhibitoren des Endozytose-Transportwegs Chlorpromazin und Methyl-beta-Cyclodextrin (je 50 µg/ml) sowie Dynasore (80 µM) eingesetzt, um ihren Einfluss auf eine chitosanvermittelte Widerstandsänderung zu untersuchen. Die Applikation aller Inhibitoren erfolgte jeweils auf apikaler und basolateraler Zellseite.

3.4.3 Fluxmessungen in Ussing-Kammern

Zur Beschreibung der parazellulären Permeabilität ist die Messung der Tight Junction-Durchflussrate von radioaktiv oder Fluoreszein-markierte parazellulären Markern in Ussing-Kammern geeignet. Hierzu eignen sich Substanzen wie Mannitol oder Dextrane, die ausschließlich parazellulär das Epithel passieren.

3.4.3.1 Mannitol-Fluxmessungen

Radioaktives [^3H]-Mannitol ist ein hydrophiles und stoffwechselstabiles Molekül, das mit einer Größe von 182 Dalton als Indikator für die parazellulären Eigenschaften eines Epithels dient. Da die Monosaccharid-Transporter der Zellmembran Mannitol nicht akzeptieren, kann es trotz seiner eher geringen Größe nur auf parazellulärem Weg durch die Tight Junctions diffundieren [106]. Aus diesem Grund lässt sich aus der Messung von unidirektionalen [^3H]-Mannitol-Fluxen die parazelluläre Permeabilität für Mannitol errechnen [107].

Der Versuchsablauf gestaltete sich prinzipiell wie bei der einfachen Widerstandsmessung in der Ussing-Kammer (s. Kapitel 3.4.2 Widerstandsmessungen: Ussing-Kammern). Zusätzlich wurde der HEPES-Lösung beider Kammerseiten zur Vermeidung osmotischer Effekte 10 mM Mannitol zugesetzt. Nach Einsetzen der Zell-Filter und einer Äquilibrierungszeit von 30 Minuten wurde zur Erfassung der Nullwerte 1 ml Lösung aus der basolateralen Seite entnommen und das entsprechende Volumen wieder durch Mannitol-haltige HEPES-Lösung ersetzt, um Einflüsse durch hydrostatische Gradienten zu vermeiden. Nun wurde auf apikaler Seite 100 μl [^3H]-Mannitol (Aktivität 25 kBq/ml), basolateral die entsprechende Menge an HEPES-Lösung zugegeben. Unmittelbar nach dieser Zugabe erfolgte aus der apikalen Kammer die Entnahme von 100 μl Flüssigkeit, die mit 900 μl HEPES-Lösung verdünnt wurde, um die Aktivität auf der apikalen "heißen" Seite der Ussing-Kammern zu bestimmen. Die Abnahme von 1 ml Flüssigkeit aus der "kalten" (basolateralen) Seite der Ussing-Kammern erfolgte 10, 20 und 30 Minuten vor und nach Chitosan-Zugabe. Auch hier wurde das entnommene Volumen sofort durch frische Mannitol-haltige HEPES-Lösung

ersetzt. Allen Proben wurde zuletzt jeweils 4 ml Szintillationslösung zugegeben und die Radioaktivität anschließend im β -Counter gemessen, da [^3H]-Mannitol unter Abgabe reiner β -Strahlung zerfällt. Die Mannitol-Fluxe berechneten sich aus der jeweiligen Radioaktivität unter Einbezug der Zeitintervalle und Kammerflächen und werden in $\text{nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ angegeben.

Anschließend wurde das Chitosan wieder durch mehrmaliges Auswaschen mit konventionellem Medium (+ 10 mM Mannitol) aus der Ussing-Kammer entfernt und die Recovery gemessen. Die Abnahme und Bestimmung der Proben nach erneuter Zugabe des radioaktiven Mannitols erfolgte äquivalent zur o.g. Chitosan-Messung.

3.4.3.2 Fluxmessungen FITC-markierter Dextrane

Zur weiteren parazellulären Permeabilitätsbestimmung wurden hochmolekulare, mit Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) markierte Dextrane mit einem Molekulargewicht von 4, 10 und 20 kDa verwendet. Hierzu wurden, äquivalent zu den Mannitolfluxen, zunächst die Ussing-Kammern mit HEPES-Lösung, welche die jeweiligen unmarkierten Dextrane in einer Konzentration von 10 mM enthielt, befüllt. Je 100 μl der FITC-markierten Dextrane wurden, nach vorangehender Dialyse zur Elimination kleinerer FITC-Fragmente, in das apikale Kompartiment gegeben und Fluxreihen von 30 Minuten vor bzw. nach Zugabe von Chitosan durchgeführt. Die Menge des in das basolaterale Kompartiment diffundierten FITC-Dextrans wurde photometrisch mit einem Fluorometer bei einer Wellenlänge von 520 nm analysiert.

3.4.4 Transepithelialer Stromfluss in Ussing-Kammern

Bei einer Zunahme der Amplitude des äquivalenten I_{sc} kann durch Zugabe selektiver Kanalblocker der daran beteiligte Ionenkanal oder Transporter ermittelt werden. In dieser Arbeit wurden die Chloridkanal-Blocker NPPB (0.5 mM) und Nifluminsäure (NFA,

0.5 mM), der Kalium-Kanalblocker BaCl₂ (5 mM) sowie der MAP/ERK-Kinase-Inhibitor U0126 (10 µM), ein Inhibitor der Chlorid-Sekretion an intestinalen Epithelzellen, verwendet.

3.4.5 Zwei-Wege-Impedanz-Spektroskopie

TER setzt sich aus dem epithelialen (R^{epi}) und dem subepithelialen Widerstand (R^{sub}) zusammen. R^{epi} kann weiterhin in einen transzellulären (R^{trans}) und parazellulären (R^{para}) Widerstand unterteilt werden, während R^{sub} in den hier beschriebenen Versuchen an Zellkulturfiltern dem Filter-Widerstand entspricht.

Gemessen wird die Impedanz in der Regel bei Wechselstromfrequenzen zwischen 1.3 Hz und 65 kHz. Graphisch lässt sie sich in einem Nyquist-Diagramm darstellen (Abb. 9 A), wobei die Widerstände auf der x-Achse (Realteil), die kapazitiven Epithel-Eigenschaften auf der y-Achse (Imaginärteil) aufgetragen werden. Hierbei ergibt die Verbindung der Messpunkte einen Halbkreis, wobei der Schnittpunkt des niederfrequenten Endes mit der x-Achse den TER, der Schnittpunkt des hochfrequenten Endes R^{sub} darstellt. R^{epi} ergibt sich daraufhin aus der Differenz $\text{TER} - R^{\text{sub}}$. Die Kapazität C lässt sich in der Impedanzmessung nicht direkt ablesen. Berechnet wird sie über den imaginären Teil der Impedanz [108, 109].

Die Zwei-Wege-Impedanz-Analyse ist eine Erweiterung der Ein-Weg-Impedanzspektroskopie und ermöglicht eine quantitative Differenzierung von R^{epi} in parazellulären (Tight Junction-) und transzellulären Widerstand (R^{para} und R^{trans}) [110]. Die Zellmembraneigenschaften werden durch die Kapazität (C^{epi}) und R^{trans} abgebildet. R^{para} ist parallel dazu geschaltet. R^{sub} verläuft seriell zu diesen beiden Komponenten (Abb. 9 B).

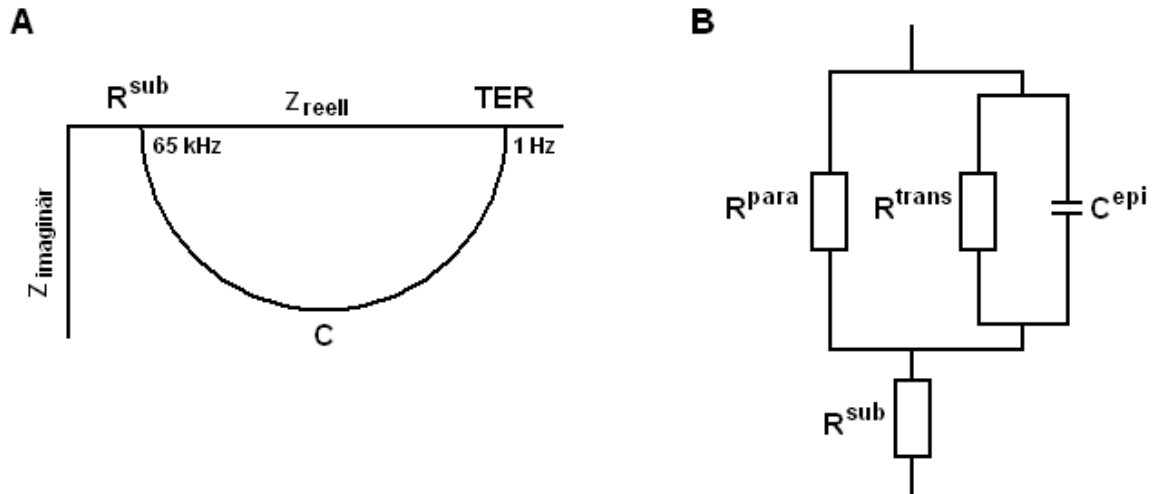


Abb. 9: A: Prinzip der Ein-Weg-Impedanz-Spektroskopie am Nyquist-Diagramm. Bei verschiedenen Wechselstromfrequenzen (1 Hz-65 kHz) erreichte Impedanzwerte bilden graphisch ein Kreissegment. Hohe Frequenzen ergeben auf dem reellen Teil Z_{reell} den subepithelialen Widerstand, niedrige Frequenzen den transepithelialen Widerstand (TER). Die Kapazität C errechnet sich aus der minimalen Kreisbogenfrequenz. B: Ersatzschaltkreis des epithelialen Zellmodells, das in der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie verwendet wird. C^{epi} = Kapazität; R^{sub} = subepithelialer Widerstand; R^{trans} = transzellulärer Widerstand; R^{para} = parazellulärer Widerstand. Modifiziert nach [110].

Der parazelluläre Weg durch die Tight Junction wird durch Calcium-Entzug mittels EGTA-Gabe geöffnet, was einen Widerstands-Abfall zur Folge hat. Gleichzeitig wird der Fluss des parazellulären Markers Fluoreszein gemessen. Unter Einbezug der vor bzw. nach Calcium-Entzug veränderten Fluxverhältnisse lassen sich der transzelluläre und der parazelluläre Widerstand aus den Impedanz-Daten berechnen [110].

Für die Messungen wurden die Zellkulturfilter 30 Minuten mit Chitosan bzw. saurer Kontroll-Lösung in Kulturschalen inkubiert und anschließend direkt in die Ussing-Kammern gesetzt. Beide Kammern wurden jeweils mit 10 ml HEPES-Lösung befüllt und mit einem 95:5 % O_2/CO_2 -Gemisch kontinuierlich begast. Die Applikation des sinusförmigen Wechselstroms ($35 \mu A/cm^2$) mit einer Frequenzänderung zwischen 1.3 Hz und 65 kHz führte zu einer Änderung der epithelialen Spannung, welche durch phasensensitive Verstärker detektiert wurde. Nach einer ersten Impedanz-Messung erfolgten die apikale Zugabe von Fluoreszein (Endkonzentration $10 \mu M$) und drei weitere Impedanz-Messungen in jeweils 10-minütlichem Abstand. Die Durchführung der

Fluxmessungen fand, wie in Kapitel 3.4.2 Widerstandsmessungen: Ussing-Kammern beschrieben, statt. Anschließend wurde apikal und basolateral der Calciumchelator EGTA zugegeben (Endkonzentration 1.3 mM) und erneut zwei Impedanz-Messungen durchgeführt. Der Anteil des parazellulären Widerstands berechnete sich nach der Impedanzmessung durch die vor bzw. nach EGTA-Gabe veränderten Fluxverhältnisse.

3.5 Biochemische Methoden

3.5.1 Western Blot

Die Western Blot-Methode bietet die Möglichkeit Proteingemische ihrer Größe nach aufzutrennen, um sie anschließend auf eine Trägermembran zu übertragen und einzelne Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern zu identifizieren. Dies wurde durchgeführt, um einen eventuellen Zusammenhang zwischen Widerstandsänderungen und Änderungen in der Proteinexpression innerhalb der Tight Junction von Chitosan-behandelten HT-29/B6-Zellen zu detektieren.

3.5.1.1 Membranprotein-Extraktion

Als Grundlage für die Extraktion der membrangebundenen Proteinfraction aus den Gesamtproteinen dienten auf Millicell-Filtern gewachsene HT-29/B6-Monolayer. Die mit Chitosan- bzw. Kontrollösung behandelten Filter wurden nach Entfernung des Mediums einmal in eiskalter PBS gewaschen, jeweils kurz in Lysepuffer inkubiert und anschließend abgeschabt und in Eppendorf-Röhrchen überführt. Zur Homogenisierung wurde das Zellmaterial mehrfach durch eine 26 G-Insulinkanüle gezogen und anschließend 5 Minuten bei 500 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet bestand u. a. aus Zellorganellen, DNA und RNA, während der Überstand die Gesamtproteinfraction enthielt. Dieser Überstand wurde in ein weiteres Eppendorfgefäß überführt und 30

Minuten bei 43.000 g und 4 °C zentrifugiert. Das nun entstandene und die membranständige Proteinfraction enthaltende Pellet wurde nach Zugabe von Lysepuffer mithilfe einer 26 G-Insulinnadel wieder resuspendiert.

3.5.1.2 Proteinquantifizierung

Um gleiche Proteinmengen auf das Gel auftragen zu können wurde eine Proteinmengenbestimmung mit der BCA-Methode durchgeführt. Diese beruht auf der quantitativen Reduktion von Cu^{2+} - zu Cu^{1+} -Ionen und einer Chelatkomplexbildung der Cu^{1+} -Ionen mit Bicinchoninsäure (BCA-Reagenz), welche ein Absorptionsmaximum bei 562 nm hat [111].

Es wurden zunächst eine Eichreihe verschiedener BSA-Konzentrationen (Rinderserumalbumin) und die zu bestimmenden Proben in eine Mikrotiter-Platte pipettiert. Nach Zugabe der BCA-Proteinreagenz-Lösung wurde die Well-Platte 30 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Die anschließende quantitative Proteinbestimmung erfolgte durch Absorptionsbestimmung bei einer Wellenlänge von 562 nm mit einem Spectra Classic Mikrotiterplattenreader (Tecan). Anhand der aus den Standardwerten ermittelten Eichgerade konnten die Proteinkonzentrationen in den Proben errechnet und anschließend gleiche Proteinmengen aufgetragen werden.

3.5.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Mit der SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) ist es durch Anlegen eines elektrischen Feldes möglich, Proteine nach ihrer Molekülgröße aufzutrennen [112]. Die Geschwindigkeit der Wanderung ist dabei abhängig von der Größe der Moleküle, der angelegten Spannung, den Pufferbedingungen und der Prozentigkeit von Polyacrylamid innerhalb des Gelgemisches.

Zu Beginn wurden zunächst die Trenngele (12.5 % bzw. 8.5 %) luftblasenfrei in Mini-Protean-Apparaturen (BioRad) geklemmte Glaskammern pipettiert und sofort mit einer Schicht absolutem Alkohol bedeckt, um eine glatte Grenze zwischen Trenngel und dem später folgenden Sammelgel sicherzustellen. Nach einer 30-minütigen Polymerisationszeit wurde der Alkohol entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegeben und sofort ein Trennkamm in das noch flüssige Sammelgel gesetzt. Nach weiteren 30 Minuten Polymerisationszeit wurden die Kämmen entfernt, die Glasplatten mit dem Gel in Elektroden-Halterungen gespannt und in mit Elektrophoresepuffer gefüllte Elektrophoresekammern gesetzt. Nebenbei erfolgte die Mischung der Zelllysate mit Laemmli-Puffer (Verhältnis Laemmli/Probe 1:4) und die Denaturierung für 5 Minuten bei 95 °C. Anschließend wurden ein Protein-Marker und nacheinander die Proben in die durch den Kamm entstandenen Taschen des Polyacrylamidgels pipettiert. Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgte für 90 Minuten bei 100 V Spannung. Dabei wandern die durch den Elektrophoresepuffer negativ geladenen Proteine zum Pluspol (Anode), die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei umgekehrt proportional zum Molekulargewicht des jeweiligen Proteins.

3.5.1.4 Elektrophoretischer Transfer auf Membranen

Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine auf Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Nylon-Membranen per Tank-Blot-Verfahren transferiert. Der Vorteil der Membranen ist die einfachere Handhabung im Gegensatz zum Gel und die sehr starke Fixierung der Proteine an der Membranoberfläche, wodurch sie leicht zugänglich für die Antikörper sind [113].

Die PVDF-Membranen äquilibrierten zunächst 10 Minuten in absolutem Alkohol und anschließend, ebenso wie die aus den Glaskammern entfernten Gele sowie jeweils zwei Schwämme und Whatman-Filter, für 10 Minuten in Transferpuffer. Hiernach wurden „Sandwiches“, bestehend aus:

Schwamm / Filter / SDS-Polyacrylamid-Gel / PVDF-Membran / Filter / Schwamm

zusammengebaut und mit einem Kühlakku in die mit Transferpuffer befüllten Transferkammern gestellt (Abb. 10). Ein zusätzlich zugefügtes Magnetrührstäbchen gewährleistete eine gleichmäßige Kühlung und Durchmischung. Über 60 Minuten erfolgte bei 100 V die elektrophoretische Übertragung der aufgetrennten Proteine vom Gel auf die PVDF-Membran.

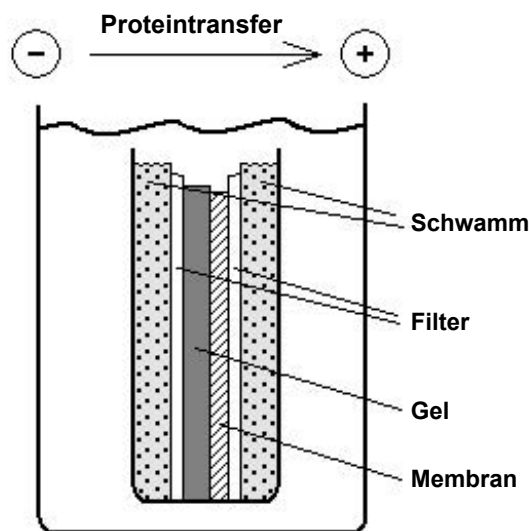


Abb. 10: Proteintransfer-Einheit. Das Polyacrylamidgel mit den nach ihrer Größe aufgetrennten Proteinen liegt in direktem Kontakt mit der PVDF-Membran. Beides ist umgeben von je einem Whatman-Filter und Schwämmen in einer Plastikhalterung. Für den Transfer der negativ geladenen Proteine wird die PVDF-Membran auf der Anodenseite (+) platziert. Die Proteine werden so elektrophoretisch vom Gel auf die Membran transferiert. Modifiziert nach [113].

3.5.1.5 Immundetektion

Im Anschluss an den Proteintransfer erfolgte mittels markierter Antikörper der Nachweis der aufgetrennten Proteine. Dazu wurden die PVDF-Membranen mit Blockierlösung (PBS-T) gespült und in dieser für zwei Stunden (bei Raumtemperatur) oder über Nacht (bei 4 °C) unter ständigem Schwenken belassen. So wurde durch Saturierung überschüssiger Membranbindestellen ein unspezifisches Binden der Antikörper

verringert. Anschließend erfolgte die Zugabe des ersten Antikörpers und die erneute Inkubation für zwei Stunden bzw. über Nacht. Hiernach wurden die PVDF-Membranen jeweils für 10 Minuten zweimal in PBS-T und einmal in TBS-T gewaschen und der jeweilige zweite Antikörper (mit Peroxidase konjugiert) zugegeben. Nach erneutem 10-minütigem Waschen in PBS-T und TBS-T inkubierten die PVDF-Membranen für fünf Minuten im Dunkeln in LumiLight^{Plus}-Lösung. Diese Lumineszenzlösung dient als Substrat der Peroxidase am zweiten Antikörper, wodurch über eine Chemilumineszenzreaktion die Visualisierung der Proteinbanden mittels einer CCD-Kamera (LAS 1000) möglich wird.

3.5.1.6 Densitometrie

Die Auswertung der Signalstärke einzelner Banden der Western Blots erfolgte halbautomatisch mit einem Computer-Programm (AIDA Raytest, Straubenhardt). Hierbei kann die Signalstärke der gespeicherten Blots elektronisch ermittelt und quantifiziert werden. Durch manuelle Markierung der Banden und der unmittelbaren Banden-Umgebung ist es möglich, einen genauen Wert zu ermitteln, der tabellarisch und per Diagramm darstell- und vergleichbar ist. Mit einer zusätzlichen, ebenfalls densitometrisch ausgewerteten β -Aktin-Färbung (humanes β -Aktin, 42 kDa) lässt sich die aufgetragene Proteinmenge bei der Auswertung einbeziehen.

3.5.2 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung bietet eine Möglichkeit, Proteine der Tight Junction oder des Zytoskeletts in ihrer Lokalisation und ihrem Expressionsverhalten sichtbar zu machen. Dazu werden Antikörper benutzt, die jeweils an spezifische Proteinstrukturen binden. Diese Antikörper kann man wiederum mit Fluoreszenzfarbstoffen markieren. Trifft nun Licht einer bestimmten Wellenlänge auf die Fluoreszenzfarbstoffe, werden

diese angeregt und emittieren Licht einer anderen Wellenlänge, wodurch ein Nachweis der gesuchten Strukturen gelingt. Durch die Anwendung verschiedener Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe kann man mehrere Proteine innerhalb eines Zellverbandes detektieren und ihre Lokalisation zueinander vergleichen.

In dieser Arbeit wurden die Tight Junction-Proteine Occludin, ZO-1, Claudin -1 bis -5, -7 und -8 sowie F-Aktin, ein Bestandteil des Zytoskeletts, angefärbt. Nach 30-minütiger Inkubation von HT-29/B6-Monolayern mit Chitosan- und Kontroll-Lösung wurden die Filter jeweils zweimal mit PBS gewaschen, 15 Minuten mit Methanol fixiert und erneut mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit 0.5 % Triton-X-100 (in PBS) sieben Minuten permeabilisiert, erneut mit PBS gewaschen und 30 Minuten mit Blockierungslösung (5 % Goat-Serum in PBS) zur Verhinderung unspezifischer Antikörperbindung blockiert. Nach der Blockierung wurden die jeweils ersten Antikörper (mouse/rabbit; ZO-1/Occludin: 1:100; Claudine 1:50) zugegeben und die Filter im Brutschrank 60 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Nach zweimaligem Spülen der Zellen mit Blockierungslösung erfolgte die Zugabe der zweiten Antikörper (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG bzw. 594 goat anti-rabbit IgG, 1:500) für ebenfalls 60 Minuten bei 37 °C, anschließend wurde wieder mit Blockierungslösung gewaschen. Für die F-Aktin-Immunfluoreszenzfärbungen wurde zur Fixierung der Zellen 4 % Paraformaldehyd benutzt, sowie zusätzlich zum zweiten Antikörper noch Phalloidin (1:50, in Blockierungslösung) gegeben. Zuletzt erfolgte die Kernfärbung mit DAPI (1:1000, in PBS) für fünf Minuten. Für die Eindeckelung wurden die Filter mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Pro TaqsMount Fluor® (auf Eis) auf Objektträgern fixiert.

Die Detektion der Proteine erfolgte an einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (Zeiss, LSM 510 Meta) unter Benutzung des 40× / 1.3 Oil Plan-Neofluar-Objektivs oder des 63× / 1.4 Oil Plan-Apochromat-Objektivs und Anregung der Wellenlängen 488 nm (Argon-Laser, grün) und 543 nm (Helium-Neon-Laser, rot), entsprechend der Alexa Fluor® markierten Proteine 488 oder 543. Zur Detektion der Zellkerne durch die DAPI-Färbung wurde die Wellenlänge 405 nm (UV-Laserdiode) angeregt. Hierbei waren die Intensitätseinstellungen zum Vergleich zwischen Kontrollen und Chitosan-behandelten Zellen jeweils gleich. Das LSM bildet im Vergleich zur einfachen Lichtmikroskopie sehr dünne Probenschichten ab. Die antikörpergekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe emittieren nach Anregung Licht, das durch den Aufbau des LSM mit einer Lochblende (pinhole) und dementsprechendem Filter nur in der Fokusebene detektiert wird.

3.5.3 Zytotoxizitäts-Messung durch Bestimmung der Laktatdehydrogenase

Die Menge der Laktatdehydrogenase (LDH)-Freisetzung aus Zellen ist ein Indikator für Zytotoxizität bzw. Zellsterben. Diese ausschließlich im Zytoplasma vorkommende LDH wird als Konsequenz bei Membranschäden in den extrazellulären Raum freigesetzt [114]. Bei toxischem Einfluss eines Stoffes findet man demzufolge erhöhte Konzentrationen im Medium und verminderte Konzentrationen im Zelllysat.

Die Durchführung des "lactate dehydrogenase release assays" erfolgte nach Madara und Stafford [115]. Hierfür wurden je 500 µl des apikalen konventionellen Mediums Chitosan-behandelter und -unbehandelter HT-29/B6-Monolayer verwendet. Nach der Spülung der Zellen mit Medium wurde zur Lyse der Zellen 2 % Triton-X-100 in 500 µl Medium auf die Zellen gegeben und 30 Minuten inkubiert. Die Lysate wurden anschließend abgeschabt und abpipettiert. Nach gründlicher Resuspension erfolgte die Bestimmung der LDH-Menge im Zentrallabor der klinischen Chemie der Charité am Campus Benjamin Franklin, Berlin.

3.6 Statistische Auswertung

Die Erstellung von Tabellen, Diagrammen und Abbildungen sowie die statistische Auswertung erfolgten mit den Programmen Microsoft Excel und Microsoft Paint. Die Messwerte werden als Mittelwerte (MW) \pm der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben, "n" bezieht sich auf die Anzahl der Messwerte. Die statistische Auswertung zum Vergleich von Kontroll- und Chitosanergebnissen erfolgte mit dem Student's t-Test. Als signifikant gelten Werte von $p < 0.05$ (*), weitere Signifikanzniveaus sind $p < 0.01$ (**) und $p < 0.001$ (***). Die Western-Blot-Analysen und Immunfluoreszenzfärbungen wurden mindestens dreimal durchgeführt, wobei in den Abbildungen jeweils ein repräsentatives Ergebnis dargestellt wird.

4. Ergebnisse

4.1 Viabilität von HT-29/B6-Zellen nach Inkubation mit Chitosan

Zum Ausschluss einer möglicherweise zytotoxischen Wirkung von Chitosan wurde die Konzentration der Laktatdehydrogenase (LDH), eines bei Zellschäden in erhöhtem Maße in das extrazelluläre Medium freigesetzten zytosolischen Enzyms, im apikalen Medium und Zelllysat der mit Chitosan behandelten HT-29/B6- und der Kontrollzellen gemessen. Die LDH-Aktivität ist als prozentualer Anteil der gesamten LDH im Zelllysat angegeben.

Wie in Abb. 11 ersichtlich, zeigte sich nach 120-minütiger Inkubation sowohl bei den mit 0.01 % Chitosan, als auch bei den mit 0.005 % Chitosan behandelten Zellen eine deutliche konzentrationsabhängige Erhöhung der extrazellulären LDH-Aktivität (0.01 % Chitosan: 25.4 ± 1.0 %, $n=3$, $p<0.01$; 0.005 % Chitosan: 7.7 ± 1.2 % $n=3$, $p<0.05$; Kontrolle: 0.6 ± 0.2 %, $n=3$).

Im Gegensatz dazu kam es nach 30-minütiger Inkubation bei den mit 0.01 % Chitosan-Lösung behandelten Zellen zu keinem Anstieg der extrazellulären LDH-Konzentration (5.4 ± 1.9 %, $n=6$, n. s.). Die Aktivität der mit 0.005 % Chitosan behandelten Zellen war im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert (2.0 ± 0.3 %, $n=7$, n. s.; Kontrolle: 1.5 ± 0.1 %, $n=6$). Bei beiden Chitosan-Konzentrationen zeigte sich eine vollständige Recovery innerhalb von 24 Stunden (0.01% Chitosan: 2.5 ± 0.2 %, $n=3$, n. s.; 0.005 % Chitosan: 1.6 ± 0.3 %, $n=3$, n. s.; Kontrolle: 1.5 ± 0.1 %, $n=3$).

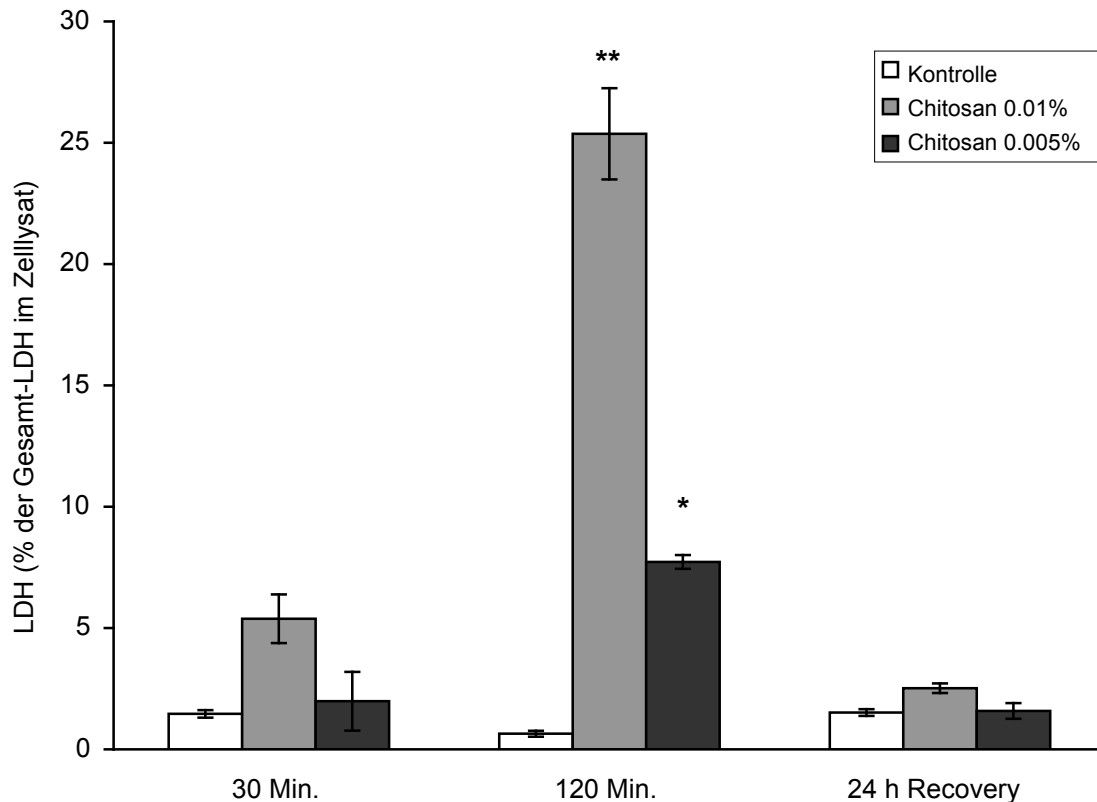


Abb. 11: Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH) an HT-29/B6-Zellen. Inkubation mit Chitosan (0.01 %, 0.005 %) für 120 bzw. 30 Minuten. Die Messung der Recovery erfolgte nach Inkubation mit Chitosan für 30 Minuten über 24 Stunden. Die LDH-Ausschüttung aus dem Zytosol wurde im apikalen Medium und dem Zelllysat gemessen. Anhand der gesamten LDH-Konzentration (100%) erfolgte die Kalkulation der Ausschüttung ins Medium (n = 3-7).

4.2 Effekt von Chitosan auf den transepithelialen Widerstand

4.2.1 Manuelle Widerstandsmessung in HEPES

Bei allen Chitosan-Konzentrationen zeigte sich nach 120 Minuten eine Reduktion ($p < 0.001$) des TER (Abb. 12). Bei der höchsten Chitosan-Konzentration (0.01 %) halbierte sich der Widerstand, verglichen mit dem Ausgangswert, bereits nach 20 Minuten auf 46.98 % (± 5.37 % SEM, n=29). Nach 120 Minuten Inkubationszeit war

der TER bei allen getesteten Konzentrationen abgefallen (0.01 % Chitosan: 23.9 ± 1.5 %, n=29; 0.005 % Chitosan: 75.7 ± 2.8 %, n=16; 0.002 % Chitosan: 84.0 ± 2.2 %, n=19, Kontrolle: 95.2 ± 3.4 %, n=11).

Nach Ablauf der zweistündigen Messungen erfolgte die Bestimmung der Viabilität bzw. der Recovery der Zellen über einen Zeitraum von 48 Stunden. Hierbei erreichten die Zellen, welche vorher mit 0.01 % Chitosan-Lösung behandelt worden waren, nach 48 Stunden nur 56.2 ± 2.6 % (n=9, $p < 0.001$) ihres initialen Ausgangswertes, wohingegen die Zellen, die mit 0.005 % und 0.002 % Chitosan-Lösungen behandelt wurden, mit 86.38 ± 1.04 % (0.005 % Chit., n=8, n. s.) sowie 97.6 ± 2.0 % (0.002 % Chit., n=7, n. s.) annähernd ihre initialen Widerstände erreichten.

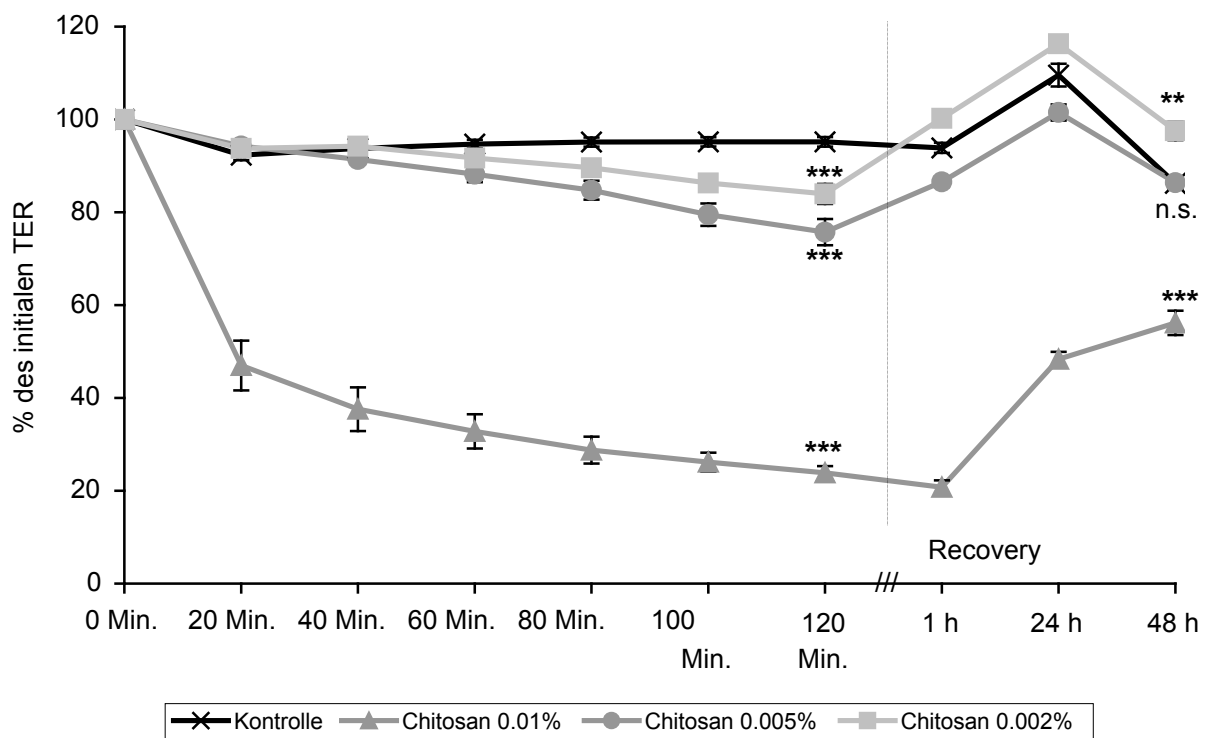


Abb. 12: Messung des TER von HT-29/B6-Zellen nach 120 Minuten Inkubation mit Chitosan (0.01 %, 0.005 %, 0.002 %). Anschließend erfolgte ein mehrmaliges Auswaschen der Zellfilter mit Medium und die Messung der Recovery nach 1, 24 und 48 Stunden (n = 4-29).

4.2.2 Widerstands-Messungen in der Ussing-Kammer

Die 30-minütige Zugabe von Chitosan auf die apikale Seite der in die Ussing-Kammern eingespannten HT-29/B6-Monolayer bewirkte eine im Vergleich zur manuellen Messung deutlichere, dosisabhängige Reduktion des TER auf $4.7 \pm 0.3 \%$ (0.01 % Chitosan, $n=9$, $p<0.01$) bzw. $18.0 \pm 2.2 \%$ (0.005 % Chitosan, $n=18$, $p<0.001$), bezogen auf die initialen Ausgangswerte (Abb. 13). Die Widerstände der Kontrollen blieben mit $99.4 \pm 1.7 \%$ ($n=15$, n. s.) konstant. Nach der darauf folgenden Auswaschphase und sechsstündigen Inkubation mit konventionellem Medium zeigte sich der TER vollständig reversibel. In Abb. 14 ist exemplarisch der zeitliche Verlauf der mit 0.005 % Chitosan behandelten HT-29/B6-Monolayer dargestellt. Es zeigt sich die unmittelbar nach Chitosan-Gabe beginnende Reduktion des TER. Nach dem Auswaschen steigt dieser prompt und hat nach sechs Stunden annähernd gleiche Werte wie zu Beginn der Messung erreicht.

Eine 60 Minuten dauernde Inkubation mit Chitosan führte zu keiner weiteren Reduktion des Widerstands sowohl bei 0.01 % Chitosan ($3.0 \pm 0.1 \%$, $n=5$), als auch bei 0.005 % Chitosan ($14.8 \pm 1.6 \%$, $n=24$). Da die TER-Werte der HT-29/B6-Monolayer bereits nach 20 Minuten Inkubation mit Chitosan annähernd den Endwert erreicht hatten, wurden alle folgenden Versuche mit einer Inkubationszeit von 30 Minuten durchgeführt. Ebenso wurden aufgrund eines bei längerer Inkubation möglichen zytotoxischen Effektes von Chitosan auf die Zell-Viabilität (s. Abb. 11) alle folgenden Experimente mit 0.005 % Chitosan-Lösung durchgeführt.

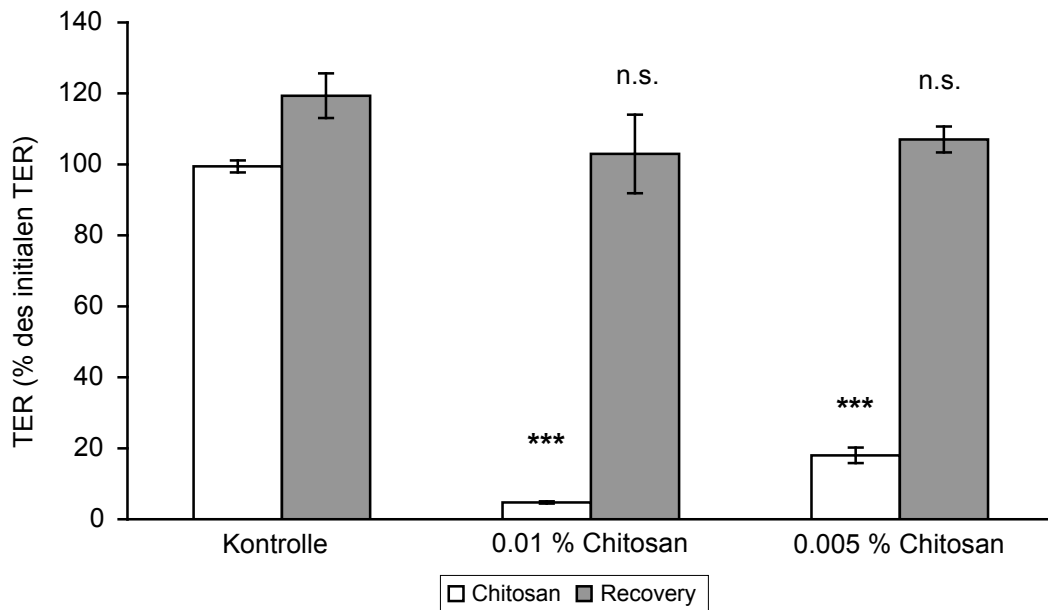


Abb. 13: Wirkung von Chitosan auf den TER. Messung in Ussing-Kammern, Inkubationszeit 30 Minuten, Recoveryzeit 6 Stunden. Es zeigt sich eine dosisabhängige Reduktion des TER in beiden Konzentrationen verglichen mit den jeweiligen Ausgangswerten. Während der Recoveryzeit kam es zu einer kompletten Erholung des TER bis auf das Ausgangsniveau (n=6-18).

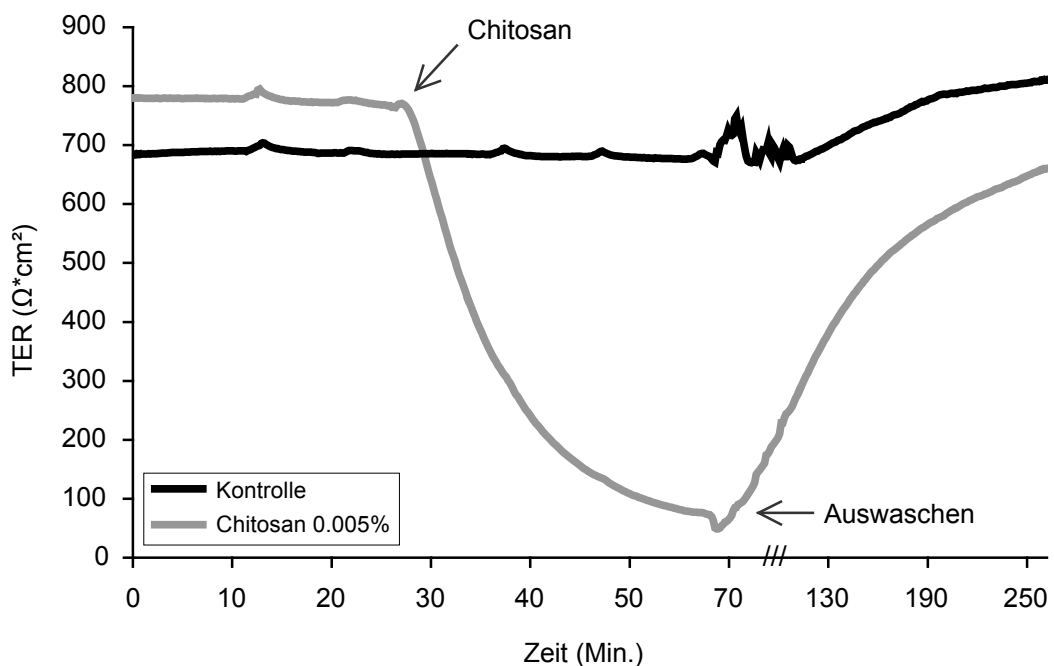


Abb. 14: Originalregistrierung des TER, gemessen in der Ussing-Kammer. Zugabe von 0.005 % Chitosan- bzw. Kontroll-Lösung und 30-minütige Inkubation. Anschließend mehrmaliges Auswaschen durch Ersatz der HEPES-Lösung mit Medium (Absolutwerte). Im direkten zeitlichen Verlauf zeigt sich eine unmittelbar einsetzende und reversible Chitosan-Wirkung auf HT-29/B6-Zellen.

4.2.3 Impedanzmessungen

Zur Unterscheidung, ob die Wirkung von Chitosan vermehrt durch eine Reduktion des parazellulären Widerstands, welcher die Barriereigenschaften der Tight Junctions charakterisiert, oder des transzellulären Widerstands, welcher die apikale und basolaterale Zellmembranen reflektiert, zustande kommt, wurden Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie-Messungen durchgeführt.

Verglichen mit den Kontrollzellen fand während der Inkubation mit 0.005 % Chitosan eine über 50 %ige Reduktion des R^{epi} von $411.1 \pm 13.4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ auf $201.4 \pm 24.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n=4-6$, $p<0.001$) statt. Diese Reduktion wurde sowohl über den para-, als auch über den transzellulären Weg verursacht (Abb. 15). Der parazelluläre Widerstand sank von $1645.8 \pm 313.1 \Omega \cdot \text{cm}^2$ auf $653.7 \pm 69.2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n=4-6$, $p<0.05$). Transzellulär reduzierte sich der Widerstand von $575.18 \pm 22.95 \Omega \cdot \text{cm}^2$ auf $300.21 \pm 47.74 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n=4-6$, $p<0.001$).

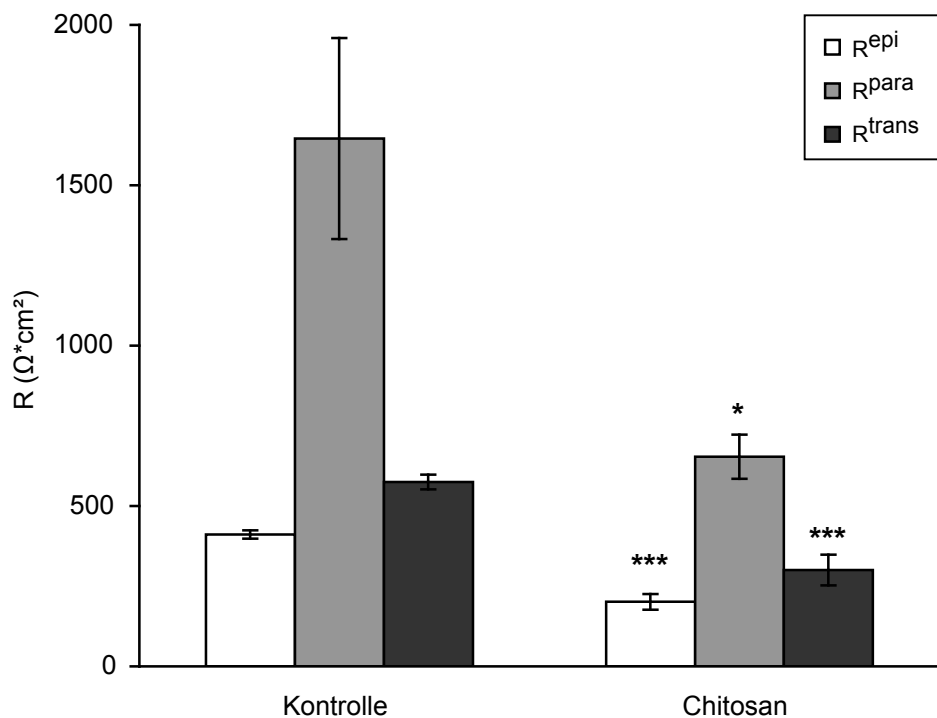


Abb. 15: Zwei-Wege-Impedanzmessung an HT-29/B6-Zellen. Nach 30 Minuten Inkubation mit 0.005 % Chitosan zeigt sich eine Reduktion des R^{epi} , die sowohl durch einen erniedrigten parazellulären (R^{para}), als auch durch einen reduzierten transzellulären Widerstand (R^{trans}) verursacht wird ($n=4-6$).

4.3 Wirkung von Chitosan auf die parazelluläre Permeabilität von Fluxmarkern

Die Durchführung radioaktiver Mannitol- bzw. FITC-markierter Dextran-Fluxe dient zur Überprüfung, ob die Chitosan-abhängige Reduktion des TER mit einer Veränderung der parazellulären Permeabilität auch für größere (Makro-)Moleküle einhergeht.

Abb. 16 zeigt vor Chitosan-Gabe gleiche Mannitol-Permeabilitätswerte (Angabe jeweils in 10^{-6} cm/s) von 1.82 ± 0.25 (Chitosan, n=5) und 1.73 ± 0.13 (Kontrolle, n=6). Nach 30-minütiger Applikation von 0.005 % Chitosan kommt es zu einer Zunahme der Permeabilität für [3 H]-Mannitol (Chitosan: 5.11 ± 0.37 ; Kontrolle: 1.46 ± 0.16 ; n=7-9, $p < 0.001$) sowie zu einer vollständigen Reversibilität nach Auswaschen von Chitosan (Chitosan: 1.34 ± 0.16 ; Kontrolle: 1.10 ± 0.17 , n=7, n. s.). Die Kontroll-Filter blieben in ihrer Permeabilitätsrate jederzeit unverändert.

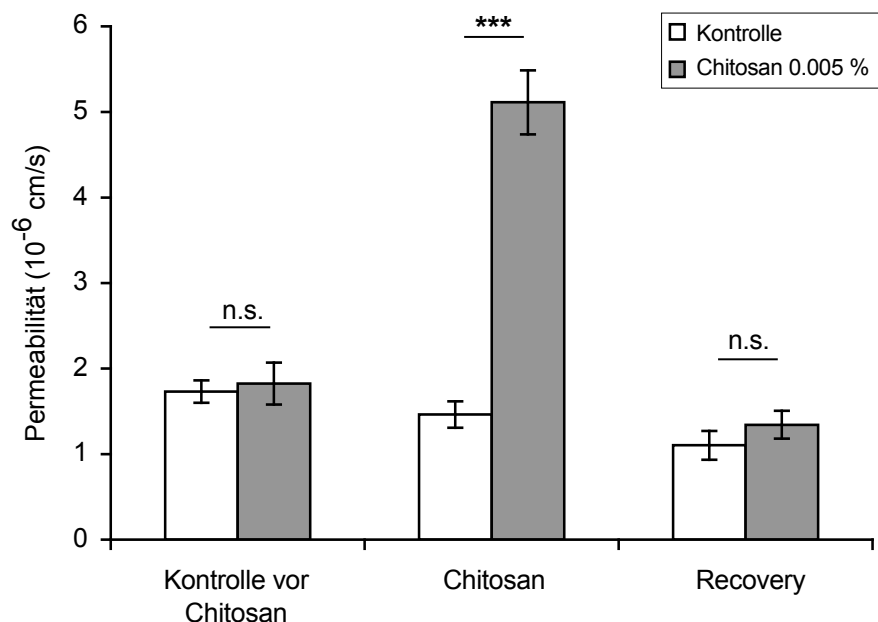


Abb. 16: Darstellung der parazellulären Mannitol-Permeabilität, gemessen mittels [3 H]-Mannitol-Fluxen an HT-29/B6-Zellen. Es wurden Fluxe vor Chitosan-Gabe, 30 Minuten nach Zugabe von 0.005 % Chitosan und nach Auswaschen mit Medium (Recoveryzeit 3.5 h) gemessen. Aus den erhaltenen Fluxwerten wurde die Permeabilität errechnet (n=5-9). Es zeigt sich während der Chitosan-Inkubation eine deutliche Zunahme der Permeabilität, die nach Auswaschen im Vergleich zur Kontrolle vollständig reversibel ist.

Die Analyse der FITC-Dextran-Fluxe ergab eine gröÙenselektive Wirkung von Chitosan auf die Tight Junctions (Abb. 17). Nach Zugabe von 0.005 % Chitosan erhöhte sich die Permeabilität ($P=10^{-6}$ cm/s) für 4 und 10 kDa-Dextrane im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (4 kDa: Chitosan 0.92 ± 0.07 ; Kontrolle 0.12 ± 0.01 und 10 kDa: Chitosan 0.30 ± 0.06 ; Kontrolle 0.04 ± 0.02 , jeweils $n=6-8$, $p<0.001$), während die Permeabilität des 20 kDa-Dextrans unverändert blieb (Chitosan 0.01 ± 0.002 ; Kontrolle 0.01 ± 0.002 , $n=6-8$, n. s.).

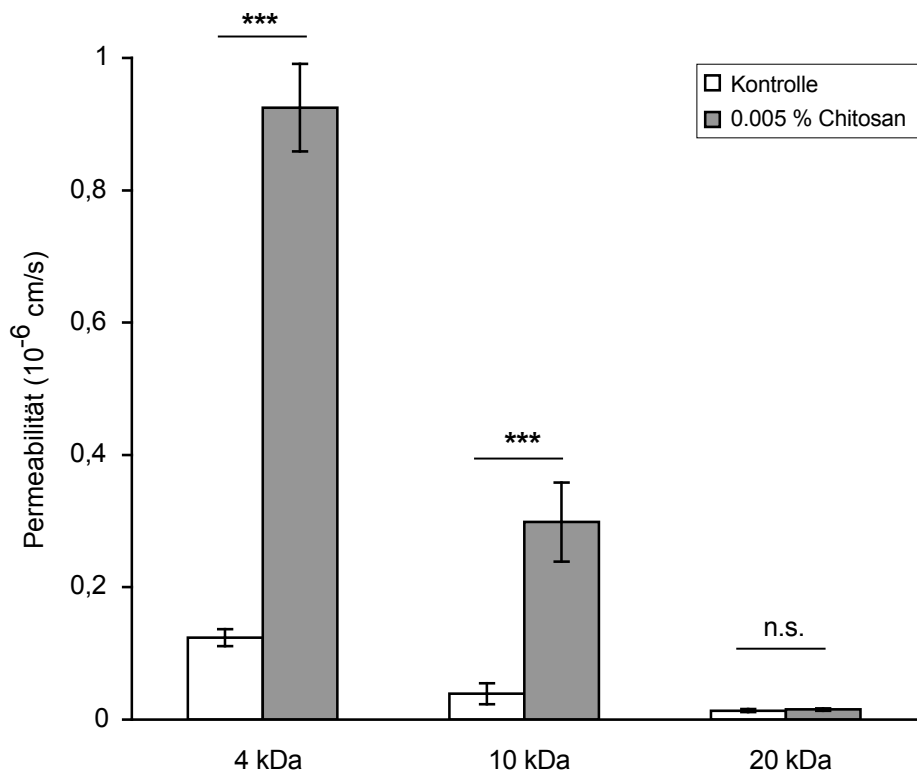
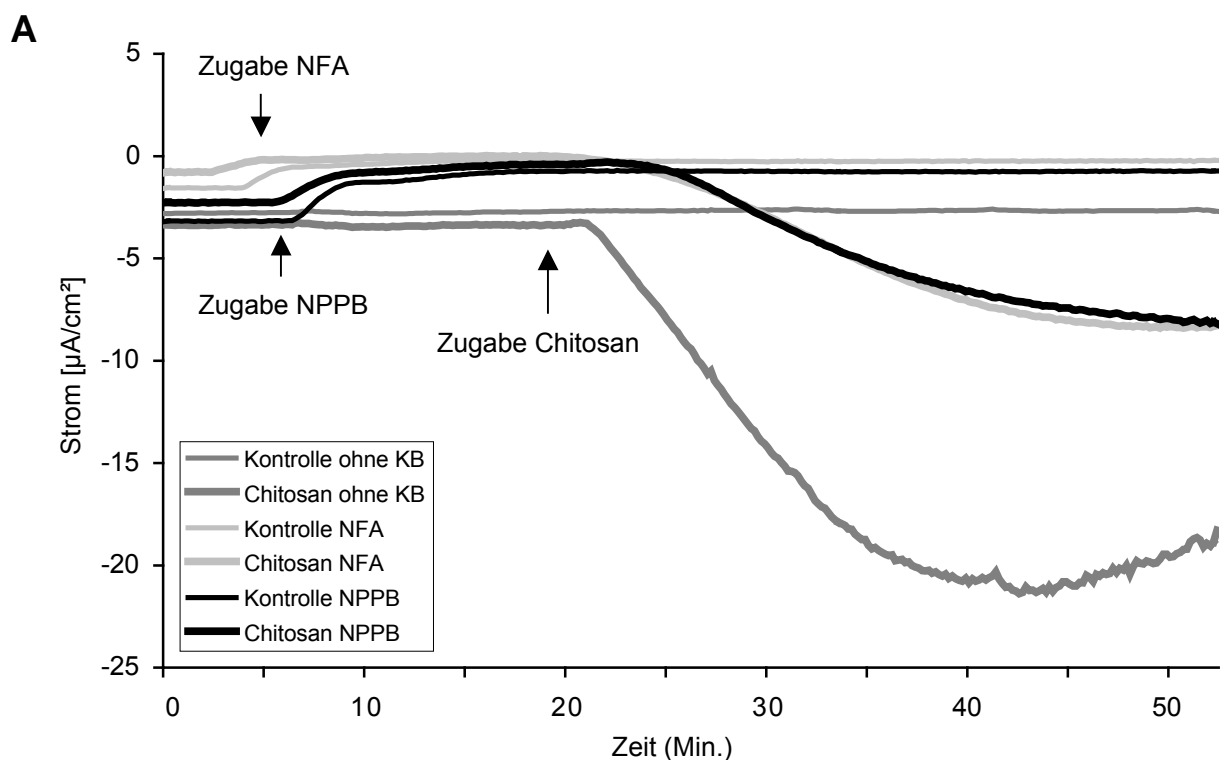


Abb. 17: FITC-Dextran Fluxe vor und nach Inkubation (30 Minuten) mit Chitosan an HT-29/B6-Zellen. Es zeigt sich eine Erhöhung für die Passage des 4 kDa und 10 kDa-Dextrans im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Permeabilität des 20 kDa Dextrans bleibt unverändert ($n=6-8$).

4.4 Effekt von Chitosan auf den epithelialen Ionentransport

Da eine Reduktion des transezellulären Widerstands über die Aktivierung des transepithelialen Ionentransports zustande kommt, wurden Versuche mit verschiedenen Inhibitoren durchgeführt, um die in diesen Prozess involvierten Ionen und Kanäle zu detektieren.

In Abb. 18 A ist das Verhalten des transepithelialen Stromflusses von HT-29/B6-Zellen in Ussing-Kammern mit und ohne die Zugabe des Chlorid-Kanalblockers NFA und des Chlorid-/Kalium-Kanalblockers NPPB dargestellt. Im Vergleich zu den unblockierten Kontrollen, welche einen mittleren Stromfluss von $-19.9 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($n=3$) aufwiesen, zeigt sich bei mit NFA und NPPB blockierten Zellen eine weniger deutliche Reduktion des transepithelialen Stromflusses auf $-8.4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (NFA, $p<0.01$, $n=4$) und $-8.1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (NPPB, $p<0.01$, $n=4$). Der Kaliumkanal-Blocker BaCl_2 zeigte keinen Effekt auf den transezellulären Stromfluss, wohingegen U0126, ein MAP/ERK-Kinase-Hemmer, der die Chloridsekretion in intestinalen Epithelzellen inhibiert, im Vergleich zu den ohne Kanalblocker untersuchten HT-29/B6-Zellen zu einer Reduktion des Chitosaneffekts ($p<0.001$) auf den transepithelialen Stromfluss führte (Abb. 18 B).



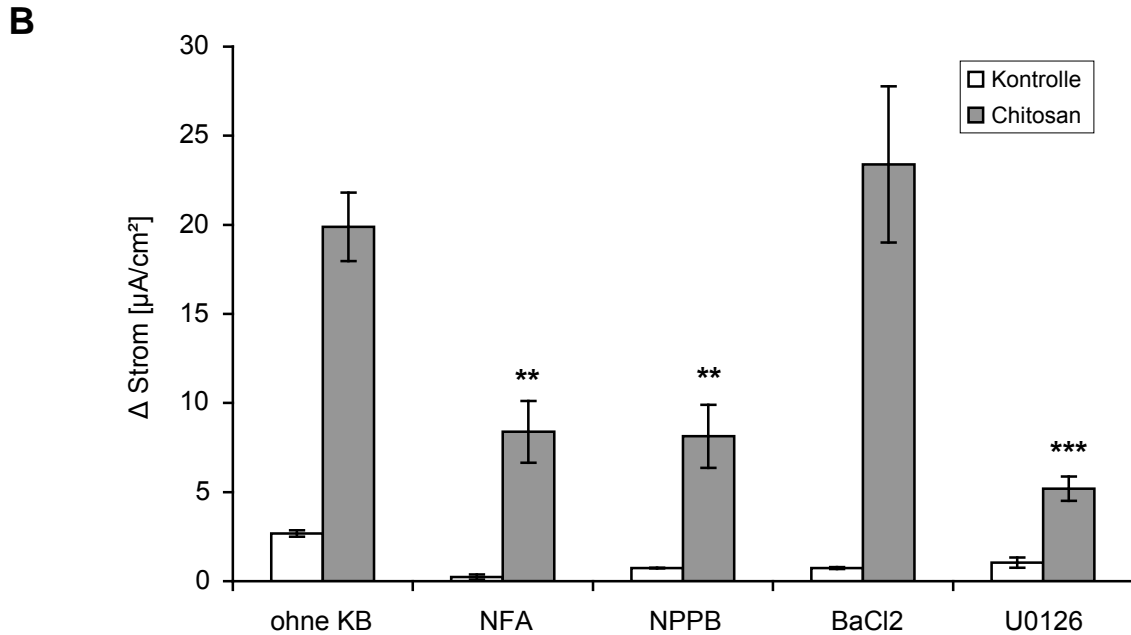


Abb. 18: Effekt von Chitosan auf den äquivalenten Kurzschlussstrom (I_{sc}) unter Zugabe von Inhibitoren. Messungen in der Ussing-Kammer, Inkubationszeit Chitosan 30 Minuten. A: Originalregistrierung des I_{sc} . Die Zugabe des K^+ - und Cl^- -Kanalblockers NPPB bzw. des Cl^- -Kanalblockers NFA erfolgte 15 Minuten vor Zugabe von Chitosan. Die anschließende Inkubation mit 0.005 % Chitosan führt im Vergleich zu den ohne Inhibitoren behandelten Zellen zu einer weniger deutlichen Reduktion des I_{sc} ($n=2-4$). B: Änderung des ΔI_{sc} unter Chitosan in Gegenwart von Inhibitoren. Neben dem Cl^- -Kanalblocker NFA und dem K^+ - und Cl^- -Kanalblocker NPPB führt der MAP/ERK-Kinase-Inhibitor U0126 zu einer ähnlichen Reduktion des ΔI_{sc} . Der K^+ -Kanalblocker $BaCl_2$ zeigt im Vergleich zu den ohne Inhibitoren mit Chitosan behandelten HT-29/B6-Zellen keinen Effekt auf die Chitosan-Wirkung ($n=2-8$).

4.5 Effekt von Chitosan auf das Aktinskelett von HT-29/B6-Zellen

Um die Wirkung von Chitosan auf das Tight Junction-assoziierte Zytoskelett der HT-29/B6-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen zum Zeitpunkt des maximalen Chitosan-Effekts (30 Minuten nach Inkubation) fixiert und anschließend Immunfluoreszenzfärbungen des Aktinskeletts angefertigt. Wie in Abb. 19 ersichtlich, zeigten sich keine Änderungen in der Anordnung der Mikrofilamente.

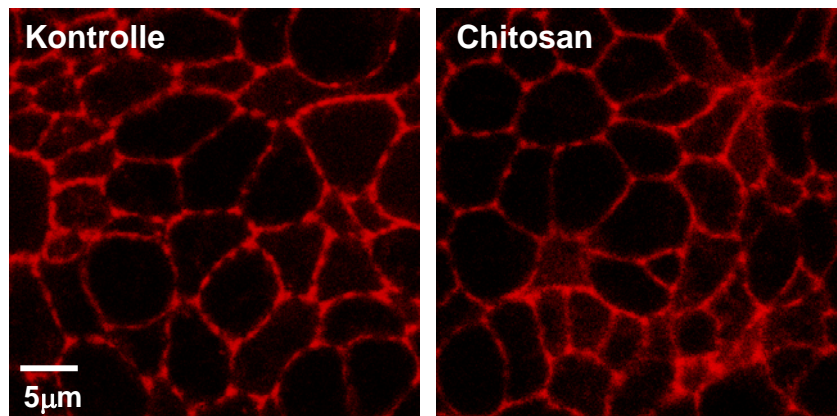


Abb. 19: Immunfluoreszenzfärbung von F-Aktin an HT-29/B6-Zellen nach 30-minütiger Inkubation mit Kontroll-Lösung und 0.005 % Chitosan-Lösung.

Der fehlende Einfluss auf das Aktingerüst lässt sich durch den Einsatz weiterer Inhibitoren bestätigen (Abb. 20). Die Zugabe von ML-7, eines selektiven Myosin-Leichtketten-Kinase-Inhibitors oder Y-27632, eines Inhibitors der Rho-assoziierten Protein-Kinase, führte ebenso wie der membrangängige Ca^{2+} -Chelator BAPTA-AM zu keiner Änderung des Chitosaneffekts auf den TER im Vergleich zu den Zellen ohne Inhibitoren.

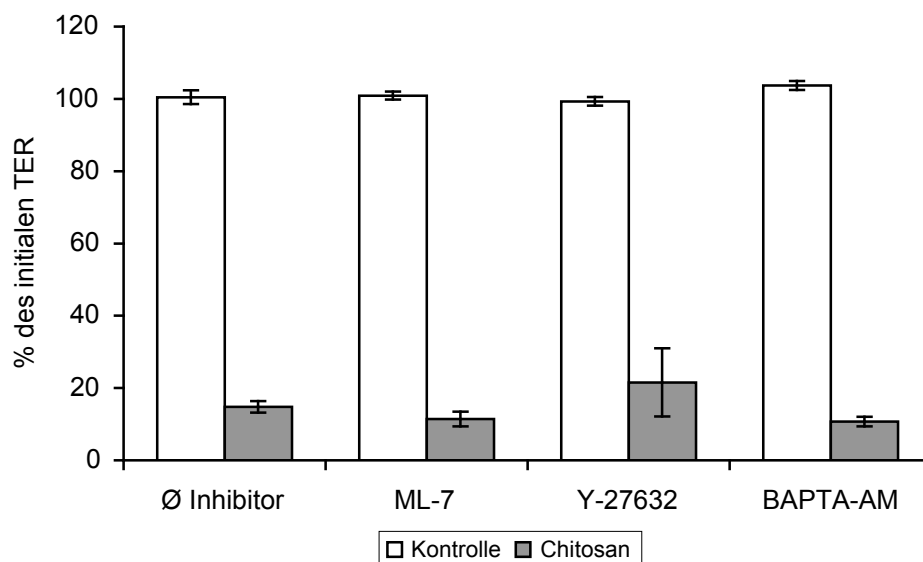


Abb. 20: TER nach Zugabe von Inhibitoren der Aktin-Myosin-Interaktion (ML-7, Y-27632) und des Membran-permeablen Ca^{2+} -Chelators BAPTA-AM. Messung an HT-29/B6-Zellen in Ussing-Kammern, Zugabe von 0.005 % Chitosan (30 Minuten Inkubation), n=3-23. Die Inhibitoren haben keinen Einfluss auf die durch Chitosan bewirkte Reduktion des TER.

4.6 Effekt von Chitosan auf Tight Junction-Proteine

Die Western-Blot-Analyse zur Expression verschiedener Tight Junction-Proteine unter Chitosan-Wirkung ergab sowohl makroskopisch (Abb. 21), als auch nach densitometrischer Auswertung unter Berücksichtigung der mit β -Aktin quantifizierten Proteinmenge in keinem der untersuchten Tight Junction- oder Tight Junction-assoziierten Proteine eine Änderung der Proteinexpression.

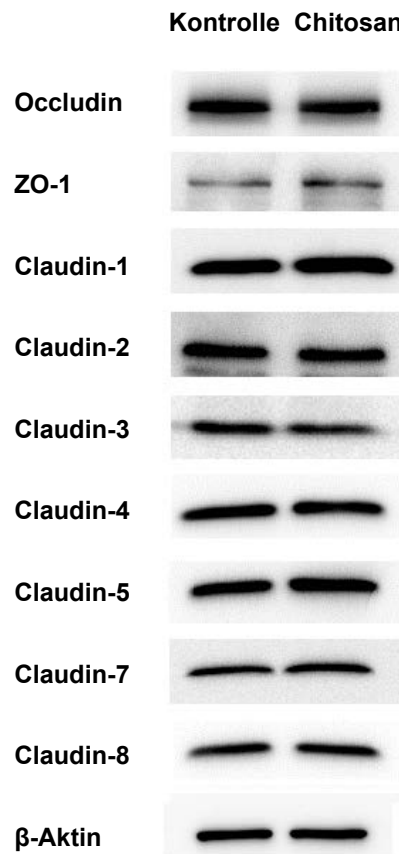


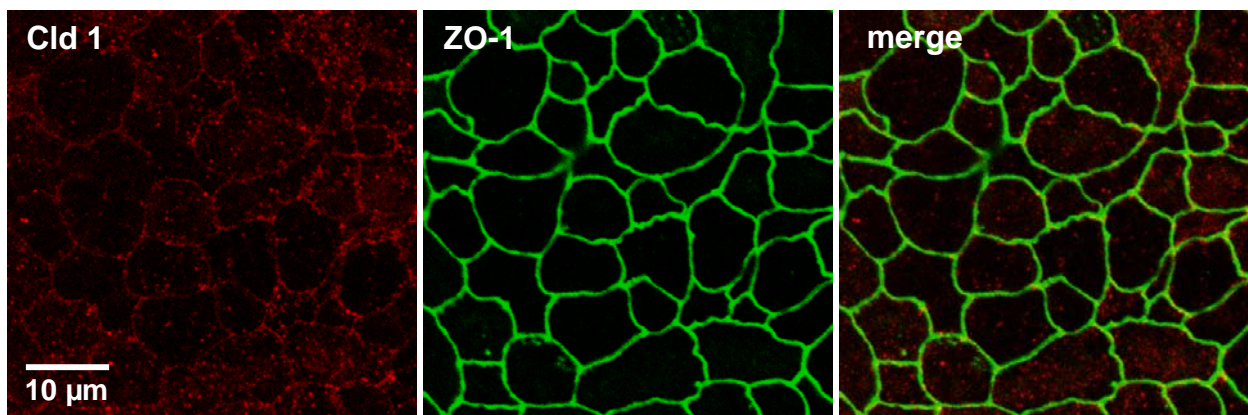
Abb. 21: Western-Blot-Analyse verschiedener TJ-Proteine in Lysaten von HT-29/B6-Zellen nach Inkubation mit 0.005 % Chitosan oder Kontroll-Lösung (30 Minuten). Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Gezeigt sind repräsentative Western-Blot-Ausschnitte. Sowohl makroskopisch, als auch densitometrisch lässt sich kein Einfluss von Chitosan auf die Proteinexpression feststellen (n=3-4).

Neben der Protein-Expression wurde mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen die subzelluläre Lokalisation der Tight Junction-Proteine betrachtet.

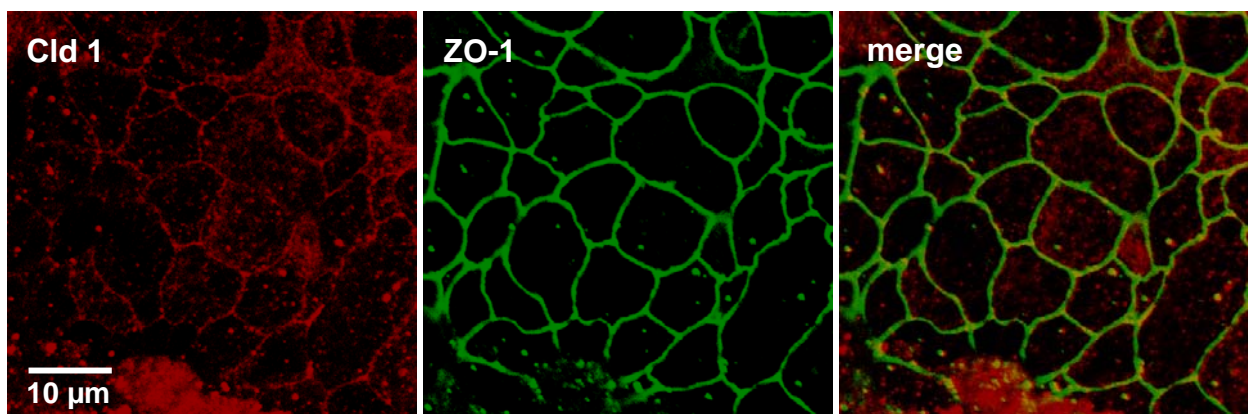
Auch hierbei zeigte sich bei keinem der untersuchten Tight Junction-Proteine (Occludin, ZO-1, Claudin-1 bis Claudin-5, -7 und -8) eine sichtbare Abweichung zwischen den mit Chitosan behandelten HT-29/B6-Zellen und den Kontrollzellen. Die Abb. 22 zeigt repräsentativ immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Claudine -1 und -5 in Kolokalisation mit den Tight Junction-assoziierten Proteinen Occludin und ZO-1.

A

Kontrolle

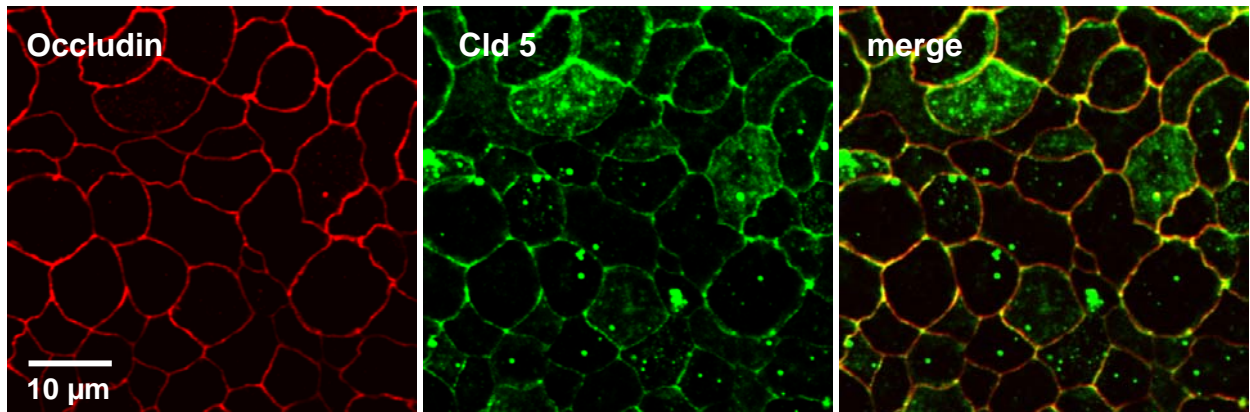


Chitosan



B

Kontrolle



Chitosan

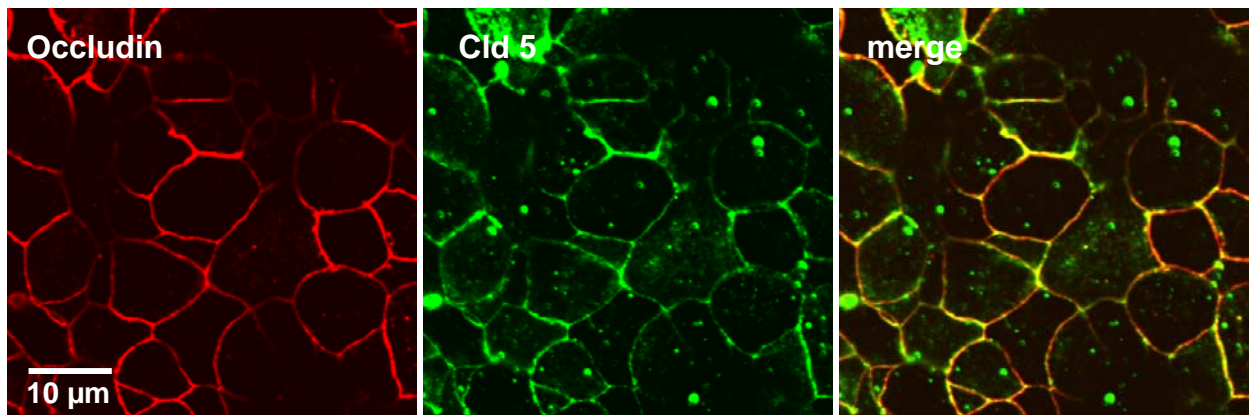


Abb. 22: Immunfluoreszenzfärbung von Tight Junction-Proteinen an HT-29/B6-Zellen. 30-minütige Inkubation mit 0.005 % Chitosan. A: Claudin-1 (rot) und ZO-1 (grün) B: Occludin (rot) und Claudin-5 (grün). Die Überlagerung beider Signale (merge) zeigt keine sichtbare Veränderung in der Anordnung der Proteine zueinander.

Diese Ergebnisse werden unterstützt durch Widerstands-Messungen nach Zugabe verschiedener Inhibitoren des Endozytose-Transportweges (Abb. 23). Weder Methyl- β -Cyclodextrin, das durch eine Depletion von Cholesterol der Zellmembran über eine Internalisierung von Tight Junction-Proteinen zu einem Verlust der Tight Junction-Integrität führt [116], noch Dynasore, ein Inhibitor der Dynamin-abhängigen vesikulären Endozytose [117], oder Chlorpromazin, ein Inhibitor der Clathrin-abhängigen

Endozytose [118], führten im Vergleich zu den ohne Inhibitor behandelten Zellen zu einer Änderung in der chitosaninduzierten TER-Reduktion.

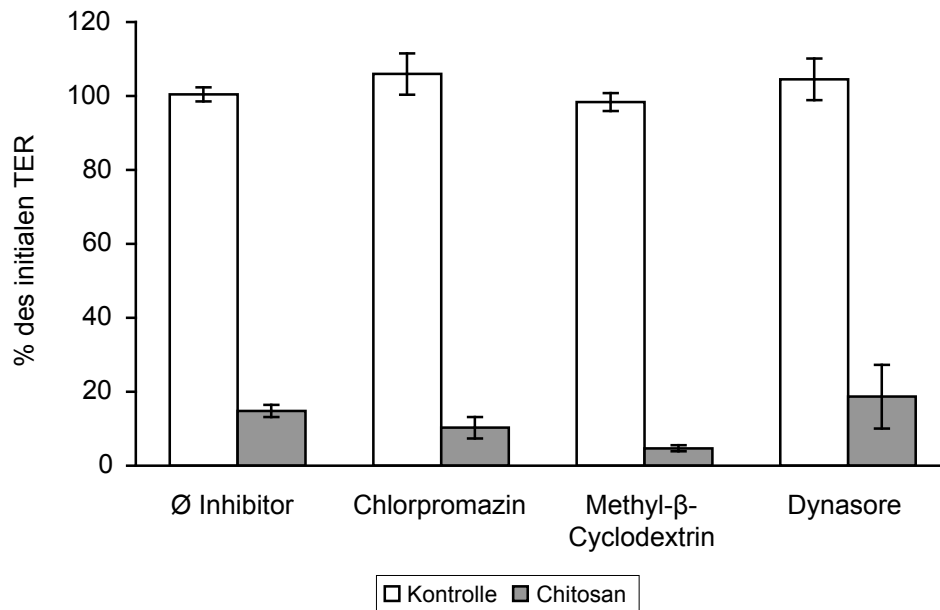


Abb. 23: Messung des TER unter Endozytose-Inhibitoren an HT-29/B6-Zellen. 30-minütige Inkubation mit 0.005 % Chitosan (n=3-6). Im Vergleich zu unbehandelten Kontroll- und Chitosan-Zellen zeigt sich bei keinem Inhibitor ein Einfluss auf die Chitosan-induzierte Reduktion des TER.

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Chitosan auf die Viabilität und Barrierefunktion von HT-29/B6-Kolonepithelzellen untersucht.

Die bisherige in-vitro-Forschung zur intestinalen Chitosan-Wirkung bedient sich hauptsächlich der weit etablierten Caco-2-Zelllinie als Grundlage, welche polarisierte und dichte Monolayer ausbildet und mit Krypten-Zellen des Kolons vergleichbar ist [119]. Ihr fehlen jedoch die für die intestinale Mukosa charakteristische Produktion der Mukusschicht, die einen Einfluss auf die Größe der intestinalen Barrierefunktion und die Permeabilität besitzt [120] sowie die Ausbildung des porenbildenden durchlässigen ("leaky") Claudin-2 und des abdichtenden Claudin-5 [121].

Als Epithelmodell für die in vitro-Versuche dieser Arbeit wurden HT-29/B6-Zellen verwendet, ein Klon der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT-29. Diese bilden ebenfalls polarisierte Monolayer aus und produzieren die für den Gastrointestinaltrakt typische Mukusschicht, die den HT-29/B6-Zellen locker anliegt [101]. Des Weiteren zeichnen sie sich durch eine breite Produktion von Tight Junction-Proteinen wie Occludin sowie den Claudinen -1 bis -5, -7 und -8 aus [122, 123].

5.1 Wirkung von Chitosan auf HT-29/B6-Zellen und ihre Viabilität

Obwohl positiv geladene Polymere für ihr zytotoxisches Potential bekannt sind, gilt Chitosan weithin als ein nicht toxischer Stoff [67]. Die Ergebnisse der TER-Messungen zeigten zunächst, dass Chitosan an HT-29/B6-Zellen zu einem schnellen und konzentrationsabhängigen Widerstandsverlust führte, der nach Entfernen des Polymers von der Zelloberfläche bei geringen Chitosan-Konzentrationen vollständig reversibel war.

Einzig bei der zwei Stunden dauernden Inkubation mit 0.01 % Chitosan zeigte sich eine nur unvollständige Erholung der HT-29/B6-Zellen. Dies ließ einen konzentrationsabhängigen zytotoxischen, die Zellen dauerhaft schädigenden Effekt vermuten, weshalb Zytotoxizitätsbestimmungen anhand von LDH-Messungen durchgeführt wurden. Diese zeigten, dass Chitosan definitiv ein zytotoxisches Potential besitzt, das abhängig von

seiner Konzentration und der Dauer der Inkubationszeit ist. Bei einer kurzen Inkubationszeit von 30 Minuten zeigte Chitosan bis zu einer Konzentration von 0.01 % keine toxischen Nebenwirkungen. Verlängerte man jedoch die Inkubationszeit auf 120 Minuten, stieg die LDH-Ausschüttung aus dem Zytosol sowohl bei der 0.01 %-, als auch bei der 0.005 %-Chitosanlösung signifikant an. Interessanterweise ließ jedoch die 0.005 %-Chitosanlösung nach 120-minütiger Inkubation dennoch eine vollständige Erholung der Zellen bis auf das Ausgangsniveau zu, was für einen nur vorübergehenden toxischen Effekt bei dieser Konzentration sprechen könnte. Dies steht im Gegensatz zur 120-minütigen Inkubation mit der doppelt konzentrierten (0.01 %) Chitosanlösung. Hier verdeutlicht sowohl die erhöhte LDH-Konzentration als auch die unvollständige Recovery der Zellen das toxische Potential von Chitosan.

Untersuchungen an Caco-2-Zellen zeigten ebenfalls die möglichen zytotoxischen Eigenschaften von Chitosan, jedoch variieren die Einschätzungen über die Höhe der potentiell toxischen Konzentration bzw. die Dauer der Inkubationszeit. So stellten Kowapradit et al. einen toxischen Effekt erst nach einer 24-stündigen, nicht jedoch nach zweistündiger Inkubation mit Chitosan fest [64]. Ranaldi et al. beschrieben bei einer zweistündigen Inkubation mit 0.01 % Chitosan, im Konsens mit den Ergebnissen dieser Arbeit, eine deutlich eingeschränkte 24-Stunden-Recovery auf Werte von 35.8 ± 4.5 % im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die fehlende Erhöhung der LDH-Aktivität im Kulturmedium nach dieser Zeit werteten sie jedoch als klares Zeichen, dass die Plasmamembran der Zellen nicht dauerhaft beschädigt worden sei [124].

Andererseits wurde mehrfach auch eine komplette Recovery des TER bei dieser Konzentration (0.01 %) festgestellt und eine fehlende Recovery erst ab Chitosan-Konzentrationen von 0.05 % und 0.5 % beschrieben [125, 126]. Als Ursache wird u. a. vermutet, dass das vollständige Auswaschen der Chitosanlösungen von den Monolayern durch die relativ hohe Viskosität von Chitosan gerade bei steigenden Konzentrationen erschwert wird und es deshalb nicht zu einer kompletten Recovery bis auf die Ausgangswerte kommen kann [55, 125].

Für ein durch die steigende Chitosan-Viskosität begünstigtes Haftenbleiben an den Zellfilter-Wänden spräche, dass der TER in einer statischen Umgebung, wie sie während der manuellen Widerstandsmessung bestand, nicht so stark sank wie in der Ussing-Kammer, in der die Badlösung mit dem gelösten Chitosan durch die Begasung

kontinuierlich durchmischt wurde und die gesamte Chitosan-Konzentration damit vollständig auf das Epithel wirken konnte.

Ein nur unvollständiges Auswaschen erklärt allerdings nicht, dass die Recovery-Werte bei einer Konzentration von 0.01 % Chitosan und einer Inkubationszeit von 120 Minuten nur ca. 60 % der Werte des Ausgangs-TER erreichten, bei einer verkürzten Inkubationszeit von 30 Minuten hingegen innerhalb der gleichen Chitosan-Konzentration eine vollständige Recovery erreicht wurde. Auch die Ergebnisse der LDH-Messungen lassen eher einen toxischen Effekt als ein unvollständiges Auswaschen als Erklärung für eine verringerte Recovery vermuten. Nach der Inkubation über zwei Stunden waren bereits erhöhte LDH-Konzentrationen zu verzeichnen, während bei einer auf 30 Minuten verkürzten Inkubationszeit die Ausschüttung der LDH innerhalb der gleichen Chitosan-Konzentrationen deutlich geringer war.

Die Applikation von Chitosan führt bei HT-29/B6-Zellen demnach schon in geringeren Konzentrationen (0.01 %) zu einer irreversiblen Reduktion der Zell-Viabilität, im Unterschied zu Caco-2-Zellen, welche weitaus höhere Chitosan-Konzentrationen, u.a. bis 1.5 % [127] tolerieren. Ein Grund für diese höhere Sensitivität scheint die von HT-29/B6-Zellen ausgebildete Mukusschicht zu sein. Vllasaliu et al. [128] verglichen die ebenfalls mukusproduzierende pulmonale Calu-3-Zelllinie mit der Caco-2-Zelllinie, welche keine Mukusschicht ausbildet. Hierbei stellten sie Unterschiede in der Tight Junction-Barriere und der Zellviabilität fest. Obwohl beide Zellkulturen nach Chitosan-Gabe einen deutlichen Widerstandsverlust aufwiesen, war sowohl die TER-Reduktion, als auch die parazelluläre Durchlässigkeit für FITC-Dextran (4 kDa) an den mukusproduzierenden Calu-3-Zellen signifikant höher. Dies führten sie auf eine Adhäsion und Interaktion des positiv geladenen Chitosans mit den negativen Ladungen der Mukusschicht zurück, was zu einer starken lokalen Ansammlung von Chitosan in unmittelbarer Nähe des Epithels führen soll. Hierdurch kann es einerseits zu einer verstärkten Wirkung auf die Tight Junction kommen, andererseits kann Chitosan durch die örtlich erreichten hohen Konzentrationen sein toxisches Potential ausüben.

Zu beachten ist die mittlerweile existierende Vielzahl an Chitosan-Derivaten. In Abhängigkeit ihres Deacetylierungsgrades, ihres Molekulargewichts und ihrer jeweiligen Ladungsdichte besitzen sie ein unterschiedliches zytotoxisches Profil [67], was einen Vergleich zwischen verschiedenen Studien erschwert. Es lässt sich zusammenfassend

jedoch sagen, dass mit höherem Deacetylierungsgrad (> 60 %) und in Abhängigkeit von Molekulargewicht und Chitosan-Konzentration die Toxizität zunimmt [81]. Hierbei besitzt Trimethyl-Chitosan im Vergleich zu anderen Derivaten ein relativ geringes zytotoxisches Potential, solange es einen Deacetylierungsgrad von ca. 55 % oder weniger aufweist [67].

Obwohl Chitosan und seine Derivate gemeinhin als nicht-toxische und sichere Polymere gelten [69, 129, 130], sind Informationen über mögliche Folgen bei Langzeitgebrauch bisher sehr rar. Es ist jedoch anzunehmen, dass während der Öffnung der epithelialen Barriere nicht nur die gewünschten zu transportierenden Moleküle, sondern auch das Chitosan selbst durch das Epithel in die Blutbahn tritt und somit auch in andere Organe des Körpers gelangt. Eine in vivo-Studie an Mäusen konnte hepato- und nephrotoxische Nebenwirkungen bei Langzeit-Einnahme zeigen [131]. Diese erhielten für 35 Tage 150-300 mg/kg Chitosan per os. Im Anschluss zeigten sich, neben den erwünschten reduzierten Cholesterin-, HDL-, LDL- und Triglycerid-Werten, konzentrationsabhängig signifikant erhöhte Leberenzym-Werte (ALT, AST, alkalische Phosphatase) sowie ein Anstieg des Serum-Kreatinins. Und auch in Leber- und Nierenbiopsaten stellte man teilweise schwere histopathologische Veränderungen sowie ebenfalls eine konzentrationsabhängige Erhöhung der LDH-Konzentration in Leber-Proben fest.

Die Eigenschaften von Chitosan in Bezug auf seine Wirkung auf die epitheliale Barriere von Mukosazellen des gastrointestinalen Trakts sind somit abhängig sowohl von der Konzentration der Chitosan-Lösung, als auch der Dauer der Inkubation und ab einer Konzentration von 0.01 % und einer Inkubationszeit > 30 Minuten nicht frei von toxischen Nebenwirkungen. Für einen Langzeit-Gebrauch in vivo sollte somit eine Kombination von möglichst geringer Chitosan-Konzentration und möglichst kurzer Einwirkzeit auf das Epithel gewährleistet sein. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Chitosan-Konzentration von 0.005 % bei einer Einwirkzeit von unter zwei Stunden nicht toxisch ist und zu einer starken Reduktion des transepithelialen Widerstands führte. Geringere Konzentrationen (0.002 % Chitosan) hingegen hatten einen nur sehr geringen bis fehlenden Effekt auf die Epithelzellen. Opanasopit et al. zeigten zudem, dass sich die Größenordnung der TER-Reduktion bei einer Erhöhung der Chitosan-Konzentration auf 0.01 % oder höher im Vergleich zu der 0.005 %-Chitosan-

Lösung kaum steigern lässt [126]. Der Einsatz höherer Chitosan-Konzentrationen erscheint folglich nicht sinnvoll, zumal bereits bei einer 0.01 %igen Konzentration ein möglicher toxischer Effekt nicht vollständig auszuschließen ist.

Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf mehr als 30 Minuten scheint, neben dem toxischen Potential von Chitosan bei längerer Einwirkzeit, auch deshalb unnötig, weil der maximale Effekt der Chitosan-Wirkung bereits in den ersten 20 Minuten nach Inkubationsbeginn zu beobachten war. Bei einer längeren Inkubationszeit (bis zu zwei Stunden) kam es im Vergleich zu den ersten 20 Minuten zu keiner weiteren Reduktion des TER.

In niedriger, aber wirkungsvoller Konzentration von 0.005 % erfüllt Chitosan hinsichtlich einer reversiblen Absorptionsverbesserung und fehlenden Zytotoxizität an HT-29/B6-Zellen die geforderten Anforderungen eines Absorptionenhancers, was dieses Polymer zu einem sehr potenten und vielversprechenden Wirkstoff macht, der innerhalb kürzester Zeit seine Wirkung entfalten kann.

Da es, abhängig von der verwendeten Zell-Kultur sowie der unterschiedlichen Derivate, teilweise deutliche Unterschiede hinsichtlich der optimalen, nicht toxischen Konzentrationen gibt, müssen die genauen Dosis-Optima weiter eruiert und den Gegebenheiten der epithelialen Mukosa angepasst werden.

5.2 Wirkung von Chitosan auf die transepitheliale Barriere

Zur genaueren Unterscheidung, über welchen epithelialen Transportweg die Chitosan-vermittelte Reduktion des TER abläuft, wurden Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie-Analysen an HT-29/B6-Zellen durchgeführt. Diese zeigten, dass beide Komponenten des epithelialen Widerstands, sowohl R^{para} als auch R^{trans} , von Chitosan beeinflusst werden. R^{para} gilt als Indikator für den Widerstand der Tight Junction, während R^{trans} den transzellulären Widerstand zeigt, der durch die apikale und basolaterale Membran sowie das Zytosol gebildet wird. Die Ergebnisse der Impedanzspektroskopie-Messungen weisen darauf hin, dass Chitosan nicht nur auf die Tight Junction, sondern zu einem geringeren Teil auch auf die transzelluläre Barriere wirkt. Um die an diesem

Effekt beteiligten Kanäle und/oder Transporter zu bestimmen, wurden Versuche mit Kanalblockern durchgeführt.

In Anwesenheit des Chloridkanalblockers NFA und des Chlorid- und Kaliumkanalblockers NPPB sank der äquivalente Stromfluss I_{sc} , verglichen mit den Werten ohne Kanalblocker, auf etwa 60 % des Ausgangswertes. Der reine Kaliumkanalblocker $BaCl_2$ hingegen führte zu keiner I_{sc} -Änderung. Zusätzlich zu dieser Anionen-Kanal-Beteiligung am Chitosan-Effekt weist die Hemmung des transepithelialen Stromflusses durch den MAP/ERK-Kinase-Inhibitor U0126 auf eine direkte Interaktion von Chitosan mit einem membrangebundenen Rezeptor hin. U0126 hemmt die u. a. durch den ERK1/ERK2-Rezeptor vermittelte epitheliale Chloridsekretion [132], welche wiederum zur Regulation der Tight Junction beitragen soll [133]. Beteiligt an der Aktivierung des transepithelialen Ionentransports scheinen somit Anionen-Kanäle bzw. membrangebundene Rezeptoren zu sein, da bei einer Inhibierung dieser Transporter der Effekt von Chitosan auf den äquivalenten I_{sc} abnimmt.

Bekräftigt wird dieses Ergebnis durch die mittlerweile bestehende Vermutung, dass das Kohlensäure-Bikarbonat-Puffersystem bzw. ein Chlorid-Bikarbonat-Austauscher an der Wirkung von Chitosan beteiligt sein könnte [134]. Der äquivalente I_{sc} kann durch den Anionen-Austausch-Inhibitor DIDS (4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid) und durch Begasung der HT-29/B6-Zellen mit reinem Sauerstoff anstatt des CO_2/O_2 -Gemisches (Carbogen) komplett blockiert werden. Die ebenfalls komplette Blockade der chitosanvermittelten TER-Reduktion durch DIDS sowie die parazelluläre Fluxzunahme erfolgen dabei zeitlich erst nach der Aktivierung des transzellulären Stromflusses. Dies könnte somit bedeuten, dass die Öffnung der Tight Junction als eine Reaktion auf die transzellulären Änderungen stattfindet.

5.3 Wirkung von Chitosan auf die parazelluläre Barriere

Die epitheliale Barriere beeinflussende Stoffe sollten die Tight Junction auf spezifische Weise öffnen, um einen unkontrollierten Durchtritt von Stoffen in die Blutbahn zu verhindern. Diese Wirkung sollte zudem ohne eine dauerhafte Schädigung der Zellintegrität bleiben und komplett reversibel sein.

5.3.1 Fluxes mit parazellulären Markern

Die Ergebnisse der Mannitol- bzw. FITC-Dextran-Flux-Messungen zeigten einen raschen und reversiblen Effekt von Chitosan (0.005 %) auf die Tight Junction und ihre parazelluläre Barrierefunktion. Als Resultat einer Öffnung der Tight Junction sank zum einen der TER, andererseits erhöhte sich die parazelluläre Permeabilität für Mannitol (182 Da) und FITC-markierte Dextrane (4 kDa, 10 kDa) um ein Vielfaches. Beide Größen waren nach Entfernen von Chitosan innerhalb weniger Stunden vollständig reversibel. Bei HT-29/B6-Zellen erhöhte sich die parazelluläre Permeabilität für Moleküle bis zu einer Größe von 10 kDa, im Unterschied zu Caco-2-Zellen, bei welchen eine erhöhte Durchlässigkeit auch für 20 kDa Dextrane besteht [55, 77].

Die gröÙenselektive Öffnung der parazellulären Barriere verdeutlicht eine wichtige Eigenschaft von Chitosan im Hinblick auf seine Anforderungen als potentieller Absorptionenhancer. Eine unselektive und uneingeschränkte Diffusion toxischer Metabolite, Antigene oder Bakterien könnte zu einer systemischen Immunreaktion führen und sollte möglichst vermieden werden.

Ändert sich die parazelluläre Permeabilität von Zellen, ist dies durch eine veränderte Expression oder Umverteilung der Proteine der Tight Junction, Tight Junction-assoziiierter Proteine oder des Zytoskeletts bedingt.

Untersuchungen hinsichtlich der molekularen Mechanismen, die an Caco-2-Zellen zur Öffnung der Tight Junction-Barriere führen, zeigten unterschiedliche Ergebnisse. Es wurden u. a. eine Akkumulation von Occludin an den Zellgrenzen [125], aber auch eine reduzierte Anfärbung von Occludin und ZO-1 in der Zellperipherie bzw. an Zell-Zell-

Kontakten beschrieben [124, 135]. Auch mit Chitosan-Nanopartikeln behandelte Caco-2-Zellen zeigten in der Immunfluoreszenzmikroskopie, dass die vor Inkubation vorhandene kontinuierliche Ringformation von ZO-1 unter Chitosan-Gabe teilweise unterbrochen und diskontinuierlich war [136]. Diese Unterbrechung der Ringformation gilt im Hinblick auf die Funktion von ZO-1 als Verbindungsprotein zwischen Occludin und dem Aktinskelett als Hinweis für eine Tight Junction-Öffnung.

An HT-29/B6-Zellen war jedoch keine Änderung in der Expression oder subzellulären Anordnung dieser Tight Junction-Bestandteile als mögliche Erklärung für die Beteiligung von R^{para} am epithelialen Widerstandsverlust durch Chitosan nachweisbar. Hier hatte Chitosan keinen Einfluss auf die Tight Junction-Proteine Occludin und ZO-1.

Im Gegensatz zu Occludin und ZO-1 ist die Rolle der Claudine bei der Chitosan-Wirkung deutlich weniger erforscht. So wurde an Caco-2-Zellen eine Erhöhung der Expression des abdichtenden Claudin-1 durch Trimethyl-Chitosan [137] oder eine Umverteilung des abdichtenden Claudin-4 von der Membran in das Zytoplasma mit anschließendem Abbau in Lysosomen festgestellt [138].

Die immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen und Western-Blot-Analysen in dieser Arbeit zeigten jedoch keinen Einfluss von Chitosan auf die Claudine -1 bis -5, -7 und -8 von HT-29/B6-Zellen.

Unterstrichen wird dies auch durch den fehlenden Effekt von Endozytose-Inhibitoren auf den TER. Würde die Chitosan-vermittelte TER-Reduktion durch eine Internalisierung der aus dem Tight Junction-Komplex herausgelösten Proteine in das Zytoplasma verursacht, müsste eine Blockierung des Endozytose-Transportweges zu einer Blockierung oder teilweisen Inhibierung der TER-Reduktion führen. Dies konnte hier nicht beobachtet werden.

Auch für die Wirkung auf das Aktinskelett von Caco-2-Zellen gibt es unterschiedliche Ergebnisse. Einerseits sind bei einer 0.1 %igen Chitosan-Konzentration eine Umverteilung von F-Aktin an die Zellgrenzen [125, 137] sowie bei einer Konzentration von 0.005 % Chitosan eine Reduktion des Fluoreszenzsignals [124], andererseits auch keine Änderungen innerhalb des Aktinskeletts [135] beschrieben worden.

Letzteres ist kongruent mit den Ergebnissen dieser Arbeit, in denen sich nach Chitosan-Gabe weder eine immunfluoreszenzmikroskopisch nachweisbare Veränderung

innerhalb des Aktinskeletts zeigte, noch die Quantität der TER-Abnahme durch Inhibitoren der Aktin-Myosin-Interaktion beeinflusst wurde.

Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Untersuchungen mit Trimethyl-Chitosan (TMC) an der humanen Bronchialepithelzelllinie VA10, einer kürzlich etablierten Alternative zur weitverbreiteten Calu-3-Zelllinie [139]. Immunfluoreszenzfärbungen und Western-Blot-Analysen zeigten hier nach zweistündiger Inkubation bzw. 4-24stündiger Recovery mit TMC keine Änderungen in der F-Aktin-Struktur, ebensowenig wie in der Expression von Occludin, ZO-1, Claudin-1 oder Claudin-4 [75]. Interessanterweise waren bei Dimethyl-Chitosan-Derivaten mit unterschiedlicher Länge der N-Alkyl-Kette jedoch eine Auflösung der F-Aktin-Struktur und eine veränderte Claudin-4-Expression an der VA10-Zelllinie zu erkennen [75].

Juliano et al. konnten einen, erst bei höheren Chitosan-Konzentrationen ab 0.5 % auftretenden, immunfluoreszenzmikroskopisch nachweisbaren Effekt von Chitosan-Malat auf das Aktinskelett von Caco-2-Zellen zeigen [140]. Bei Chitosan-Konzentrationen bis zu 0.1 % trat keine sichtbare Veränderung in der Anordnung von F-Aktin auf, wohingegen eine Konzentration von 0.5 % Chitosan eine deutliche irreversible Depolymerisierung mit folgender irregulärer Verteilung der Mikrofilamente zur Folge hatte, die bei weiterer Zunahme der Konzentration bis auf 1 % Chitosan zu einer kompletten Zerstörung der zytoskelettalen Architektur führte.

Dies ist vereinbar mit den Ergebnissen dieser Arbeit, wo innerhalb der nicht-toxischen Chitosan-Konzentrationen bis 0.005 % keine fluoreszenzmikroskopisch sichtbaren Veränderungen in der F-Aktin-Verteilung zu eruieren waren. Diese scheinen erst bei irreversibel schädigenden Chitosan-Konzentrationen aufzutreten und unterhalb dieser Konzentrationen auf nicht-sichtbarer molekularer Ebene abzulaufen.

Es ist allerdings schwierig, die vielen verschiedenen Chitosan-Derivate oder -Präparate wie Gele oder Nanopartikel miteinander zu vergleichen, da sie sehr unterschiedliche Wirkungsprofile zeigen und auch an unterschiedlichen Zelllinien erforscht wurden.

Zusammenfassend führt Chitosan an HT-29/B6-Zellen zu einer schnellen und konzentrationsabhängig reversiblen Erniedrigung des parazellulären Widerstands mit einer erhöhten, gröÙenselektiven Durchlässigkeit für Makromoleküle.

Jedoch ist dieser Effekt, im Gegensatz zu Untersuchungen an Caco-2-Zellen nicht durch eine veränderte Expression oder Lokalisation der die parazellulären

Barriereeigenschaften bestimmenden Tight Junction-Proteine, ihrer assoziierten Plaqueproteine (ZO-1) oder der Proteine des Zytoskeletts (F-Aktin) zu erklären. Möglicherweise führt eine Verbindung des positiv geladenen Chitosans mit negativ geladenen Tight Junction-Strängen zu einer kurzzeitigen geringen Modulation oder Verlagerung der Tight Junction-Proteine, die in einer nur vorübergehenden Öffnung der Tight Junction resultieren ohne dass die Tight Junction-Struktur signifikant und nachweisbar verändert wird [75].

Allerdings gilt dies nur für die in dieser Arbeit untersuchten Tight Junction-Proteine Occludin, ZO-1 sowie die Claudine -1, -2, -4, -5, -7 und -8. Eine mögliche Beteiligung "höherer" Claudine an der Wirkung von Chitosan lässt sich nicht ausschließen.

5.4 Interaktion von trans- und parazellulärem Chitosaneffekt

Obwohl der molekulare Effekt von Chitosan auf die parazellulären Barriereeigenschaften bzw. die Tight Junction bei der HT-29/B6- und der Caco-2-Zelllinie unterschiedlich ist, könnte aufgrund der zeitlichen Verzögerung der parazellulären nach den transzellulären Effekten beiden Zellarten möglicherweise ein gemeinsamer intrazellulärer Startmechanismus, nämlich die Aktivierung eines Transportproteins, zugrunde liegen.

Eine erfolgreiche Blockierung des durch Chitosan induzierten äquivalenten I_{sc} mit dem Anionen-Austausch-Inhibitor DIDS (4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid), sowie ein fehlender Effekt auf HT-29/B6-Zellen, sobald in der Ussing-Kammer die Begasung mit reinem Sauerstoff anstatt des CO_2/O_2 -Gemisches Carbogen erfolgt, lässt die Vermutung einer Beteiligung des Kohlensäure/Bikarbonat-Puffersystems bzw. eines Chlorid-Bikarbonat-Austauschers am Chitosaneffekt zu [134]. Diese Möglichkeit des aktiven, energieabhängigen Ionentransports wird ebenso durch einen ausbleibenden Chitosan-Effekt unterstützt, sobald die Badlösung auf 8 °C gekühlt wird.

Somit erlaubt die positive Ladung von Chitosan seine absorptionsverbessernde Wirkung durch eine direkte Interaktion mit den negativ geladenen Oberflächenproteinen des Epithels [76]. Das die Kompensation von pH-Schwankungen gewährleistende Kohlensäure-Bikarbonat-Puffersystem könnte über eine Aktivierung des Chlorid-

Bikarbonat-Austauschers unter dem Einfluss von Chitosan zu einer intrazellulären Änderung des pH-Werts in Richtung saurer pH-Werte und daraus resultierend zu einer Öffnung der Tight Junction führen [134].

Auch die pH-Abhängigkeit der parazellulären Effekte liefert einen Hinweis auf eine Verbindung der para- und transzellulären Chitosanwirkungen. Eine Erhöhung des extrazellulären pH-Werts auf neutrale oder alkalische Werte führt zur Deprotonierung von Chitosan und zunehmendem Wirkverlust [127]. Da der transzelluläre und parazelluläre Effekt von Chitosan abhängig von dessen positiver Ladung sind, bestätigt auch eine noch vor Chitosangabe auf der apikalen Zellseite erfolgte Präinkubation von HT-29/B6-Zellen mit dem negativ geladenen Polysaccharid Heparin [134]. Heparin führt zu einem kompletten Ausbleiben sowohl der Chitosan-vermittelten TER-Reduktion, als auch der Aktivierung des transepithelialen Stroms.

Chitosan wirkt demnach nicht nur auf den parazellulären, sondern auch auf den transzellulären Transportweg, wobei die transzelluläre Wirkung eventuell die auslösende Komponente sein könnte. Ebenfalls für einen gemeinsamen intrazellulären Startmechanismus spricht, dass neben Caco-2-Zellen, die eine ähnliche Reaktion auf Chitosan, jedoch unterschiedliche Reaktionen auf Tight Junction-Protein-Ebene zeigen und sich außerdem im Tight Junction-Aufbau unterscheiden, auch andere Zelllinien mit unterschiedlicher Tight Junction-Struktur wie MDCK (Madin-Darby Canine Kidney)-Zellen [141] sowohl mit einer Reduktion des TER, als auch mit der zeitlich vorausgehenden Ausbildung eines I_{sc} auf eine Chitosan-Applikation reagieren [134, 142].

Eine Wirkung auf beide Transportwege könnte zur erfolgreichen Entwicklung neuer Chitosan-Derivat-Kombinationen sicherlich erweiterte Möglichkeiten und Ansatzpunkte bieten, andererseits könnte diese transzelluläre Wirkung wiederum zu neuen unerwünschten und unvorhersehbaren Interaktionen führen.

5.5 Ausblick

Chitosan ist ein sehr häufig untersuchtes Polymer und bietet mittlerweile eine Vielzahl an Derivaten mit unterschiedlichen Molekulargewichten, Deacetylierungsgraden oder Salzformen, welche häufig ausgeprägte Unterschiede in ihrer Wirkung auf Epithelien besitzen. Ebenso vielfältig werden die Einsatz- und Anwendungsgebiete untersucht, die möglicherweise für einen kommerziellen Gebrauch infrage kommen. Obwohl die barriereöffnende und permeationsverbessernde Wirkung von Chitosan und seinen Derivaten inzwischen bewiesen ist, sind die hierzu führenden physiologischen und molekularen Mechanismen weiterhin nicht eindeutig geklärt und bieten teilweise kontroverse Ergebnisse. Ebenso lässt sich bisher keine Aussage über mögliche dauerhafte Änderungen oder toxische Langzeiteffekte in der intestinalen Barrierefunktion oder Tight Junction-Integrität treffen. Hierzu sollten in erster Linie weiterführende Untersuchungen zur Zytotoxizität angestrebt werden, denn auch wenn Chitosan als nicht-toxisches Biopolymer beschrieben ist, sind toxische Effekte bei zunehmenden Konzentrationen nachweisbar. Die Durchführung weiterer Untersuchungen im Hinblick auf die maximalen Konzentrationsgrenzen, die Chitosan bzw. seine Derivate in der gastrointestinalen Umgebung erreichen darf ohne einen toxischen Effekt hervorzurufen, sind demnach wünschenswert.

Der im Gegensatz zur parazellulären Barriere bisher deutlich weniger untersuchte Effekt auf den transzellulären Transportweg stellt für die Aufklärung der Wirkungsmechanismen einen neuen und interessanten Aspekt dar. Ein sowohl transzellulärer, als auch parazellulärer Einfluss birgt einerseits neue Ansatzpunkte, die den Einsatz von Chitosan erweitern könnten, andererseits müssen dadurch ebenso neu auftretende, mögliche unerwünschte Nebenwirkungen bedacht werden.

Des Weiteren gibt es Anhaltspunkte für eine immunogene Aktivität von Chitosan, d. h. die Fähigkeit, eine Immunantwort durch Bildung von Antikörpern zu induzieren. In einigen Studien wurde die Fähigkeit sowohl von Chitosan, als auch von seiner Vorstufe Chitin beschrieben, Makrophagen und natürliche Killerzellen zu aktivieren. Beide Zellarten gehören zu den Leukozyten und sind als Bestandteil des Immunsystems fähig Zytokine zu bilden. Diese wiederum besitzen u. a. eine immunstimulierende bzw. wachstumsanregende sowie antivirale oder -tumorale Eigenschaften [143-145]. Die

daraus resultierenden Auswirkungen auf den Körper, ob positiv oder negativ, ebenso wie der sich möglicherweise ergebende Nutzen sind bisher nicht abzusehen.

Zu beachten sind ebenfalls weitere klinische Auswirkungen oder Interaktionen von Chitosan auf den Gastrointestinaltrakt bei oraler Aufnahme. Chitosan besitzt aufgrund seiner kationischen Eigenschaften die Fähigkeit Fett zu binden, somit dessen Aufnahme in die Blutbahn zu verhindern und damit den Cholesterin-Wert zu senken [90]. Gleichsam führt dies aber auch zu einer Bindung fettlöslicher Vitamine oder Mineralstoffe wie der Vitamine A, D, E, K sowie Calcium oder Magnesium an Chitosan, was im Verlauf zu einer Mangelversorgung führen könnte [146].

Ebenso sollte berücksichtigt werden, dass die Chitosanwirkung nur in saurer Umgebung stattfindet. In Dünndarm und Kolon besteht jedoch ein neutraler bis basischer pH-Wert, was seinen Einsatz limitiert. Hier scheint die Weiterentwicklung von TMC sinnvoll, das durch seine partielle Quaternisierung auch in neutraler und basischer Umgebung löslich ist und zu einer verbesserten epithelialen Permeabilität führt [79, 147]. Chitosan erfüllt viele wichtige Anforderungen an einen Absorptionenhancer, wie eine gute quantitative Verfügbarkeit, optimale biologische Abbaubarkeit und eine schnelle, kurzzeitige und reversible Wirkung. Nach einer vollständigen Aufklärung über seine spezifischen epithelialen Effekte und der eindeutigen Klärung seiner zytotoxischen Wirkung besitzt es sicherlich das Potential eines auch abseits des ernährungswissenschaftlichen Marktes im medizinisch-therapeutischen Bereich vielfältig einsetzbaren Zusatzstoffes.

6. Literaturverzeichnis

1. Welsch U. Gewebe. In: Welsch U. Lehrbuch Histologie. 3rd ed. München: Urban & Fischer, 2010:75-85.
2. Fromm M. Transport in Membranen und Epithelien. In: Heckmann M. Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie: mit Repetitorium. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2010:36-48.
3. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:3-20.
4. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 1963;17:375-412.
5. Yonemura S. Cadherin-actin interactions at adherens junctions. *Curr Opin Cell Biol* 2011;23:515-22.
6. Garrod D, Chidgey M. Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778:572-87.
7. Yeager M, Harris AL. Gap junction channel structure in the early 21st century: facts and fantasies. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:521-8.
8. Cerejido M, Contreras RG, Shoshani L, Flores-Benitez D, Larre I. Tight junction and polarity interaction in the transporting epithelial phenotype. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778:770-93.

9. Balda MS, Matter K. Tight junctions. *J Cell Sci* 1998;111:541-7.
10. Ikenouchi J, Suzuki M, Umeda K, Ikeda K, Taguchi R, Kobayashi T, Sato SB, Stolz DB, Umeda M. Lipid polarity is maintained in absence of tight junctions. *J Biol Chem* 2012;287:9525-33.
11. Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, Matsui T, Tsukita S, Furuse M. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* 2006;126:741-54.
12. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 1998;141:1539-50.
13. Sanchez-Pulido L, Martin-Belmonte F, Valencia A, Alonso MA. MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events. *Trends Biochem Sci* 2002;27:599-601.
14. Liu Y, Nusrat A, Schnell FJ, Reaves TA, Walsh S, Pochet M, Parkos CA. Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci* 2000;113:2363-74.
15. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 1993;123:1777-88.

16. Schneeberger EE, Lynch RD. Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am J Physiol* 1992;262:647-61.
17. Fanning AS, Anderson JM. Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1165:113-20.
18. Shen L, Weber CR, Turner JR. The tight junction protein complex undergoes rapid and continuous molecular remodeling at steady state. *J Cell Biol* 2008;181:683-95.
19. Balda MS, Matter K. Tight junctions and the regulation of gene expression. *Biochim Biophys Acta* 2009;1788:761-7.
20. Matter K, Aijaz S, Tsapara A, Balda MS. Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:453-8.
21. Steed E, Balda MS, Matter K. Dynamics and functions of tight junctions. *Trends Cell Biol* 2010;20:142-9.
22. Shen L, Weber CR, Raleigh DR, Yu D, Turner JR. Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annu Rev Physiol* 2011;73:283-309.
23. Medina R, Rahner C, Mitic LL, Anderson JM, Van Itallie CM. Occludin localization at the tight junction requires the second extracellular loop. *J Membr Biol* 2000;178:235-47.

24. Li Y, Fanning AS, Anderson JM, Lavie A. Structure of the conserved cytoplasmic C-terminal domain of occludin: identification of the ZO-1 binding surface. *J Mol Biol* 2005;352:151-64.
25. Huber D, Balda MS, Matter K. Occludin modulates transepithelial migration of neutrophils. *J Biol Chem* 2000;275:5773-8.
26. McCarthy KM, Skare IB, Stankewich MC, Furuse M, Tsukita S, Rogers RA, Lynch RD, Schneeberger EE. Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci* 1996;109:2287-98.
27. Murakami T, Felinski EA, Antonetti DA. Occludin phosphorylation and ubiquitination regulate tight junction trafficking and vascular endothelial growth factor-induced permeability. *J Biol Chem* 2009;284:21036-46.
28. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 2000;11:4131-42.
29. Bauer AT, Burgers HF, Rabie T, Marti HH. Matrix metalloproteinase-9 mediates hypoxia-induced vascular leakage in the brain via tight junction rearrangement. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010;30:837-48.
30. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;286:C1213-28.

31. Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, Tamura A, Igarashi M, Endo T, Takeuchi K, Tsukita S. Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett* 2011;585:606-12.
32. Günzel D, Yu AS. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev* 2013;93:525-69.
33. Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 1999;147:1351-63.
34. Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778:631-45.
35. Furuse M, Sasaki H, Tsukita S. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between junction strands. *J Cell Biol* 1999;147:891-903.
36. Markov AG, Veshnyakova A, Fromm M, Amasheh M, Amasheh S. Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine. *J Comp Physiol B* 2010;180:591-8.
37. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 2002;156:1099-111.

38. Tatum R, Zhang Y, Salleng K, Lu Z, Lin JJ, Lu Q, Jeansonne BG, Ding L, Chen YH. Renal salt wasting and chronic dehydration in claudin-7-deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010;298:F24-34.
39. Amasheh S, Dullat S, Fromm M, Schulzke JD, Buhr HJ, Kroesen AJ. Inflamed pouch mucosa possesses altered tight junctions indicating recurrence of inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 2009;24:1149-56.
40. Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* 2003;161:653-60.
41. Konrad M, Schaller A, Seelow D, Pandey AV, Waldegger S, Lesslauer A, Vitzthum H, Suzuki Y, Luk JM, Becker C, Schlingmann KP, Schmid M, Rodriguez-Soriano J, Ariceta G, Cano F, Enriquez R, Juppner H, Bakkaloglu SA, Hediger MA, Gallati S, Neuhauss SC, Nurnberg P, Weber S. Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *Am J Hum Genet* 2006;79:949-57.
42. Wilcox ER, Burton QL, Naz S, Riazuddin S, Smith TN, Ploplis B, Belyantseva I, Ben-Yosef T, Liburd NA, Morell RJ, Kachar B, Wu DK, Griffith AJ, Friedman TB. Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell* 2001;104:165-72.
43. Konrad M, Hou J, Weber S, Dotsch J, Kari JA, Seeman T, Kuwertz-Broking E, Peco-Antic A, Tasic V, Dittrich K, Alshaya HO, von Vigier RO, Gallati S,

- Goodenough DA, Schaller A. CLDN16 genotype predicts renal decline in familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:171-81.
44. Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 1998;273:29745-53.
45. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 1986;103:755-66.
46. Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Orsenigo F, Cordenonsi M, Citi S, Dejana E. Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem* 2000;275:20520-6.
47. Polette M, Gilles C, Nawrocki-Raby B, Lohi J, Hunziker W, Foidart JM, Birembaut P. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase expression is regulated by zonula occludens-1 in human breast cancer cells. *Cancer Res* 2005;65:7691-8.
48. Fanning AS, Van Itallie CM, Anderson JM. Zonula occludens-1 and -2 regulate apical cell structure and the zonula adherens cytoskeleton in polarized epithelia. *Mol Biol Cell* 2012;23:577-90.

49. Oberleithner H. Grundlagen der Zellphysiologie. In: Heckmann M. Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie: mit Repetitorium. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2010:3-23.
50. Madara JL. Intestinal absorptive cell tight junctions are linked to cytoskeleton. *Am J Physiol* 1987;253:C171-5.
51. Ma TY, Hollander D, Tran LT, Nguyen D, Hoa N, Bhalla D. Cytoskeletal regulation of Caco-2 intestinal monolayer paracellular permeability. *J Cell Physiol* 1995;164:533-45.
52. Madara JL, Barenberg D, Carlson S. Effects of cytochalasin D on occluding junctions of intestinal absorptive cells: further evidence that the cytoskeleton may influence paracellular permeability and junctional charge selectivity. *J Cell Biol* 1986;102:2125-36.
53. Rodgers LS, Fanning AS. Regulation of epithelial permeability by the actin cytoskeleton. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2011;68:653-60.
54. Avdeef A. Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). *Curr Top Med Chem* 2001;1:277-351.
55. Kotze AF, Luessen HL, de Leeuw BJ, de Boer AG, Verhoef JC, Junginger HE. Comparison of the effect of different chitosan salts and N-trimethyl chitosan chloride on the permeability of intestinal epithelial cells (Caco-2). *J Control Release* 1998;51:35-46.

56. Amidi M, Mastrobattista E, Jiskoot W, Hennink WE. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62:59-82.
57. de Miranda P, Blum MR. Pharmacokinetics of acyclovir after intravenous and oral administration. *J Antimicrob Chemother* 1983;12:29-37.
58. Kristl A, Tukker JJ. Negative correlation of n-octanol/water partition coefficient and transport of some guanine derivatives through rat jejunum in vitro. *Pharm Res* 1998;15:499-501.
59. Sedar AW, Forte JG. Effects of Calcium Depletion on the Junctional Complex between Oxyntic Cells of Gastric Glands. *J Cell Biol* 1964;22:173-88.
60. Lemmer HJ, Hamman JH. Paracellular drug absorption enhancement through tight junction modulation. *Expert Opin Drug Deliv* 2013;10:103-14.
61. Kondoh M, Masuyama A, Takahashi A, Asano N, Mizuguchi H, Koizumi N, Fujii M, Hayakawa T, Horiguchi Y, Watanabe Y. A novel strategy for the enhancement of drug absorption using a claudin modulator. *Mol Pharmacol* 2005;67:749-56.
62. Beneke C, Viljoen A, Hamman J. In Vitro Drug Absorption Enhancement Effects of Aloe vera and Aloe ferox. *Sci Pharm* 2012;80:475-86.
63. Svirshchevskaya EV, Alekseeva LG, Reshetov PD, Phomicheva NN, Parphenyuk SA, Ilyina AV, Zueva VS, Lopatin SA, Levov AN, Varlamov VP. Mucoadjuvant

- properties of lipo- and glycoconjugated derivatives of oligochitosans. *Eur J Med Chem* 2009;44:2030-7.
64. Kowapradit J, Opanasopit P, Ngawhirunpat T, Apirakaramwong A, Rojanarata T, Ruktanonchai U, Sajomsang W. In vitro permeability enhancement in intestinal epithelial cells (Caco-2) monolayer of water soluble quaternary ammonium chitosan derivatives. *AAPS PharmSciTech* 2010;11:497-508.
 65. Merzendorfer H. Insect chitin synthases: a review. *J Comp Physiol B* 2006;176:1-15.
 66. Krajewska B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb Technol* 2004;35:126-39.
 67. Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62:3-11.
 68. Laffleur F, Hintzen F, Rahmat D, Shahnaz G, Millotti G, Bernkop-Schnurch A. Enzymatic degradation of thiolated chitosan. *Drug Dev Ind Pharm* 2013;39:1531-9.
 69. Illum L, Farraj NF, Davis SS. Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. *Pharm Res* 1994;11:1186-9.
 70. Thanou M, Verhoef JC, Junginger HE. Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;50:S91-101.

71. Na L, Wang J, Wang L, Mao S. A novel permeation enhancer: N-succinyl chitosan on the intranasal absorption of isosorbide dinitrate in rats. *Eur J Pharm Sci* 2013;48:301-6.
72. Portero A, Remunan-Lopez C, Nielsen HM. The potential of chitosan in enhancing peptide and protein absorption across the TR146 cell culture model-an in vitro model of the buccal epithelium. *Pharm Res* 2002;19:169-74.
73. Choi WI, Lee JH, Kim JY, Kim JC, Kim YH, Tae G. Efficient skin permeation of soluble proteins via flexible and functional nano-carrier. *J Control Release* 2012;157:272-8.
74. Kaur G, Narang RK, Rath G, Goyal AK. Advances in pulmonary delivery of nanoparticles. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2012;40:75-96.
75. Benediktsdottir BE, Gudjonsson T, Baldursson O, Masson M. N-alkylation of highly quaternized chitosan derivatives affects the paracellular permeation enhancement in bronchial epithelia in vitro. *Eur J Pharm Biopharm* 2014;86:55-63.
76. Aungst BJ. Intestinal permeation enhancers. *J Pharm Sci* 2000;89:429-42.
77. Schipper NG, Olsson S, Hoogstraate JA, deBoer AG, Varum KM, Artursson P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement. *Pharm Res* 1997;14:923-9.

78. George M, Abraham TE. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. *J Control Release* 2006;114:1-14.
79. van der Merwe SM, Verhoef JC, Verheijden JH, Kotze AF, Junginger HE. Trimethylated chitosan as polymeric absorption enhancer for improved peroral delivery of peptide drugs. *Eur J Pharm Biopharm* 2004;58:225-35.
80. Kotze AF, Luessen HL, de Leeuw BJ, de Boer BG, Verhoef JC, Junginger HE. N-trimethyl chitosan chloride as a potential absorption enhancer across mucosal surfaces: in vitro evaluation in intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm Res* 1997;14:1197-202.
81. Schipper NG, Varum KM, Artursson P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Pharm Res* 1996;13:1686-92.
82. Leitner VM, Walker GF, Bernkop-Schnurch A. Thiolated polymers: evidence for the formation of disulphide bonds with mucus glycoproteins. *Eur J Pharm Biopharm* 2003;56:207-14.
83. Verheul RJ, Amidi M, van der Wal S, van Riet E, Jiskoot W, Hennink WE. Synthesis, characterization and in vitro biological properties of O-methyl free N,N,N-trimethylated chitosan. *Biomaterials* 2008;29:3642-9.

84. Sandri G, Rossi S, Bonferoni MC, Ferrari F, Zambito Y, Di Colo G, Caramella C. Buccal penetration enhancement properties of N-trimethyl chitosan: Influence of quaternization degree on absorption of a high molecular weight molecule. *Int J Pharm* 2005;297:146-55.
85. Sandri G, Bonferoni MC, Rossi S, Ferrari F, Boselli C, Caramella C. Insulin-loaded nanoparticles based on N-trimethyl chitosan: in vitro (Caco-2 model) and ex vivo (excised rat jejunum, duodenum, and ileum) evaluation of penetration enhancement properties. *AAPS PharmSciTech* 2010;11:362-71.
86. Jimtaisong A, Saewan N. Utilization of carboxymethyl chitosan in cosmetics. *Int J Cosmet Sci* 2014;36:12-21.
87. Neuer Ansatz gegen Zahnerosion. Lörrach: GABA Deutschland, 2013. (At http://www.gaba-dent.de/html/458/de_DE/Pressemitteilungen-Detail.pdf?News=404470.)
88. Liu X, Zhi X, Liu Y, Wu B, Sun Z, Shen J. Effect of chitosan, O-carboxymethyl chitosan, and N-[(2-hydroxy-3-N,N-dimethylhexadecyl ammonium)propyl] chitosan chloride on overweight and insulin resistance in a murine diet-induced obesity. *J Agric Food Chem* 2012;60:3471-6.
89. Zhang J, Liu J, Li L, Xia W. Dietary chitosan improves hypercholesterolemia in rats fed high-fat diets. *Nutr Res* 2008;28:383-90.

90. Muzzarelli RA. Clinical and biochemical evaluation of chitosan for hypercholesterolemia and overweight control. *Exs* 1999;87:293-304.
91. Walsh AM, Sweeney T, Bahar B, O'Doherty JV. Multi-functional roles of chitosan as a potential protective agent against obesity. *PLoS One* 2013;8:e53828.
92. Kumar PT, Lakshmanan VK, Anilkumar TV, Ramya C, Reshmi P, Unnikrishnan AG, Nair SV, Jayakumar R. Flexible and microporous chitosan hydrogel/nano ZnO composite bandages for wound dressing: in vitro and in vivo evaluation. *ACS Appl Mater Interfaces* 2012;4:2618-29.
93. Wedmore I, McManus JG, Pusateri AE, Holcomb JB. A special report on the chitosan-based hemostatic dressing: experience in current combat operations. *J Trauma* 2006;60:655-8.
94. Liu H, Du Y, Wang X, Sun L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *Int J Food Microbiol* 2004;95:147-55.
95. Seyfarth F, Schliemann S, Elsner P, Hipler UC. Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. *Int J Pharm* 2008;353:139-48.
96. Chirkov SN. [The antiviral activity of chitosan (review)]. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 2002;38:5-13.

97. Li X, Yang Z, Zhang A, Wang T, Chen W. Repair of thoracic spinal cord injury by chitosan tube implantation in adult rats. *Biomaterials* 2009;30:1121-32.
98. Hao T, Wen N, Cao JK, Wang HB, Lu SH, Liu T, Lin QX, Duan CM, Wang CY. The support of matrix accumulation and the promotion of sheep articular cartilage defects repair in vivo by chitosan hydrogels. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18:257-65.
99. Wang G, Ao Q, Gong K, Wang A, Zheng L, Gong Y, Zhang X. The effect of topology of chitosan biomaterials on the differentiation and proliferation of neural stem cells. *Acta Biomater* 2010;6:3630-9.
100. Li X, Qi J, Xie Y, Zhang X, Hu S, Xu Y, Lu Y, Wu W. Nanoemulsions coated with alginate/chitosan as oral insulin delivery systems: preparation, characterization, and hypoglycemic effect in rats. *Int J Nanomedicine* 2013;8:23-32.
101. Kreusel KM, Fromm M, Schulzke JD, Hegel U. Cl⁻ secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6). *Am J Physiol* 1991;261:C574-82.
102. Epple HJ, Kreusel KM, Hanski C, Schulzke JD, Riecken EO, Fromm M. Differential stimulation of intestinal mucin secretion by cholera toxin and carbachol. *Pflugers Arch* 1997;433:638-47.
103. Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ, Scholz P, Detjen K, Mankertz J, Bode H, Epple HJ, Riecken EO, Schulzke JD. Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates

- the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci* 1999;112:137-46.
104. Ussing HH, Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 1951;23:110-27.
105. Li H, Sheppard DN, Hug MJ. Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber. *J Cyst Fibros* 2004;3:123-6.
106. Anderberg EK, Nystrom C, Artursson P. Epithelial transport of drugs in cell culture. VII: Effects of pharmaceutical surfactant excipients and bile acids on transepithelial permeability in monolayers of human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J Pharm Sci* 1992;81:879-87.
107. Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schoneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci* 2002;115:4969-76.
108. Fromm M, Palant CE, Bentzel CJ, Hegel U. Protamine reversibly decreases paracellular cation permeability in *Necturus* gallbladder. *J Membr Biol* 1985;87:141-50.
109. Gitter AH, Schulzke JD, Sorgenfrei D, Fromm M. Ussing chamber for high-frequency transmural impedance analysis of epithelial tissues. *J Biochem Biophys Methods* 1997;35:81-8.

110. Krug SM, Fromm M, Gunzel D. Two-path impedance spectroscopy for measuring paracellular and transcellular epithelial resistance. *Biophys J* 2009;97:2202-11.
111. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150:76-85.
112. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
113. Mozdzanowski J, Speicher DW. Microsequence analysis of electroblotted proteins. I. Comparison of electroblotting recoveries using different types of PVDF membranes. *Anal Biochem* 1992;207:11-8.
114. Ooi CC, Good NM, Williams DB, Lewanowitsch T, Cosgrove LJ, Lockett TJ, Head RJ. Efficacy of butyrate analogues in HT-29 cancer cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010;37:482-9.
115. Madara JL, Stafford J. Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 1989;83:724-7.
116. Lambert D, O'Neill CA, Padfield PJ. Methyl-beta-cyclodextrin increases permeability of Caco-2 cell monolayers by displacing specific claudins from cholesterol rich domains associated with tight junctions. *Cell Physiol Biochem* 2007;20:495-506.

117. Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell* 2006;10:839-50.
118. Wang LH, Rothberg KG, Anderson RG. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol* 1993;123:1107-17.
119. Grasset E, Bernabeu J, Pinto M. Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: effect of secretagogues. *Am J Physiol* 1985;248:C410-8.
120. Chen XM, Elisia I, Kitts DD. Defining conditions for the co-culture of Caco-2 and HT29-MTX cells using Taguchi design. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2010;61:334-42.
121. Amasheh S, Milatz S, Krug SM, Markov AG, Gunzel D, Amasheh M, Fromm M. Tight junction proteins as channel formers and barrier builders. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1165:211-9.
122. Amasheh S, Schmidt T, Mahn M, Florian P, Mankertz J, Tavalali S, Gitter AH, Schulzke JD, Fromm M. Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell Tissue Res* 2005;321:89-96.
123. Xia XM, Wang FY, Zhou J, Hu KF, Li SW, Zou BB. CXCR4 antagonist AMD3100 modulates claudin expression and intestinal barrier function in experimental colitis. *PLoS One* 2011;6:e27282.

124. Ranaldi G, Marigliano I, Vespignani I, Perozzi G, Sambuy Y. The effect of chitosan and other polycations on tight junction permeability in the human intestinal Caco-2 cell line(1). *J Nutr Biochem* 2002;13:157-67.
125. Dodane V, Amin Khan M, Merwin JR. Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *Int J Pharm* 1999;182:21-32.
126. Opanasopit P, Aumklad P, Kowapradit J, Ngawhiranpat T, Apirakaramwong A, Rojanarata T, Puttipipatkachorn S. Effect of salt forms and molecular weight of chitosans on in vitro permeability enhancement in intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm Dev Technol* 2007;12:447-55.
127. Kotze AF, Luessen HL, de Boer AG, Verhoef JC, Junginger HE. Chitosan for enhanced intestinal permeability: prospects for derivatives soluble in neutral and basic environments. *Eur J Pharm Sci* 1999;7:145-51.
128. Vilasaliu D, Casettari L, Fowler R, Exposito-Harris R, Garnett M, Illum L, Stolnik S. Absorption-promoting effects of chitosan in airway and intestinal cell lines: a comparative study. *Int J Pharm* 2012;430:151-60.
129. Zheng F, Shi XW, Yang GF, Gong LL, Yuan HY, Cui YJ, Wang Y, Du YM, Li Y. Chitosan nanoparticle as gene therapy vector via gastrointestinal mucosa administration: results of an in vitro and in vivo study. *Life Sci* 2007;80:388-96.

130. Sonaje K, Lin YH, Juang JH, Wey SP, Chen CT, Sung HW. In vivo evaluation of safety and efficacy of self-assembled nanoparticles for oral insulin delivery. *Biomaterials* 2009;30:2329-39.
131. Omara EA, Aly HF, Nada SA. Chitosan induced hepato-nephrotoxicity in mice with special reference to gender effect in glycolytic enzymes activities. *Regul Toxicol Pharmacol* 2012;62:29-40.
132. van der Merwe JQ, Hollenberg MD, MacNaughton WK. EGF receptor transactivation and MAP kinase mediate proteinase-activated receptor-2-induced chloride secretion in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G441-51.
133. Aggarwal S, Suzuki T, Taylor WL, Bhargava A, Rao RK. Contrasting effects of ERK on tight junction integrity in differentiated and under-differentiated Caco-2 cell monolayers. *Biochem J* 2010;433:51-63.
134. Rosenthal R, Günzel D, Finger C, Krug SM, Richter JF, Schulzke JD, Fromm M, Amasheh S. The effect of chitosan on transcellular and paracellular mechanisms in the intestinal epithelial barrier. *Biomaterials* 2012;33:2791-800.
135. Smith J, Wood E, Dornish M. Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions. *Pharm Res* 2004;21:43-9.
136. Yu SH, Tang DW, Hsieh HY, Wu WS, Lin BX, Chuang EY, Sung HW, Mi FL. Nanoparticle-induced tight-junction opening for the transport of an anti-angiogenic

- sulfated polysaccharide across Caco-2 cell monolayers. *Acta Biomater* 2013;9:7449-59.
137. Dorkoosh FA, Broekhuizen CA, Borchard G, Rafiee-Tehrani M, Verhoef JC, Junginger HE. Transport of octreotide and evaluation of mechanism of opening the paracellular tight junctions using superporous hydrogel polymers in Caco-2 cell monolayers. *J Pharm Sci* 2004;93:743-52.
138. Yeh TH, Hsu LW, Tseng MT, Lee PL, Sonjae K, Ho YC, Sung HW. Mechanism and consequence of chitosan-mediated reversible epithelial tight junction opening. *Biomaterials* 2011;32:6164-73.
139. Benediktsdottir BE, Arason AJ, Halldorsson S, Gudjonsson T, Masson M, Baldursson O. Drug delivery characteristics of the progenitor bronchial epithelial cell line VA10. *Pharm Res* 2013;30:781-91.
140. Juliano C, Galleri G, Klemetsrud T, Karlsen J, Giunchedi P. Effect of chitosan malate on viability and cytoskeletal structures morphology of Caco-2 cells. *Int J Pharm* 2011;420:223-30.
141. Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S. Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol* 2001;153:263-72.

142. Shah P, Jogani V, Mishra P, Mishra AK, Bagchi T, Misra A. Modulation of ganciclovir intestinal absorption in presence of absorption enhancers. *J Pharm Sci* 2007;96:2710-22.
143. Nishimura K, Nishimura S, Nishi N, Saiki I, Tokura S, Azuma I. Immunological activity of chitin and its derivatives. *Vaccine* 1984;2:93-9.
144. Nishimura K, Nishimura S, Nishi N, Tokura S, Azuma I. Effect of chitin heparinoids on the activation of peritoneal macrophages and on the production of monokines in mice. *Mol Biother* 1990;2:115-20.
145. Shibata Y, Metzger WJ, Myrvik QN. Chitin particle-induced cell-mediated immunity is inhibited by soluble mannan: mannose receptor-mediated phagocytosis initiates IL-12 production. *J Immunol* 1997;159:2462-7.
146. Koide SS. Chitin-Chitosan: properties, benefits and risks. *Nutr Res* 1998;18:1091-101.
147. Thanou MM, Kotze AF, Scharringhausen T, Luessen HL, de Boer AG, Verhoef JC, Junginger HE. Effect of degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride for enhanced transport of hydrophilic compounds across intestinal caco-2 cell monolayers. *J Control Release* 2000;64:15-25.

7. Eidesstattliche Versicherung

"Ich, Caroline Finger, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Wirkung von Chitosan auf die parazelluläre und transzelluläre Barrierefunktion von HT-29/B6-Kolonepithelzellen" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe "Uniform Requirements for Manuscripts (URM)" des ICMJE - www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§ 156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst."

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Caroline Finger hatte folgenden Anteil an folgender Publikation:

Rosenthal R*, Günzel D* (*shared first authorship), Finger C, Krug SM, Richter JF, Schulzke JD, Fromm M, Amasheh S. The effect of chitosan on transcellular and paracellular mechanisms in the intestinal epithelial barrier. *Biomaterials* 2012;33:2791-2800.

Beitrag im Einzelnen:

- 1) Ermittlung der Zytotoxizität von Chitosan
- 2) Ermittlung geeigneter Konzentrationen für den Einsatz von Chitosan
- 3) Zeitverlauf des Chitosaneffekts und der Recovery
- 4) Detaillierte Analyse des Widerstandseffekts
- 5) Untersuchungen des Einflusses auf Tight Junction-Proteine und des Zytoskeletts

8. Lebenslauf

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

9. Publikationsliste

Rosenthal R*, Günzel D* (*shared first authorship), Finger C, Krug SM, Richter JF, Schulzke JD, Fromm M, Amasheh S. The effect of chitosan on transcellular and paracellular mechanisms in the intestinal epithelial barrier. *Biomaterials* 2012;33:2791-2800.

10. Danksagung

Es ist endlich geschafft - meine Doktorarbeit liegt fertig vor mir und nun ist es an der Zeit, denjenigen zu danken, die mich während dieser spannenden und teils nervenaufreibenden Zeit begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Priv.-Doz. Dr. Rita Rosenthal für die Vergabe des Themas, ihre hervorragende und geduldige Betreuung sowie ihre intensive Unterstützung und unermüdliche Hilfsbereitschaft. Als meine Ansprechpartnerin fand sie immer eine Lösung, stets liebe, aufbauende Worte und stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite. Sie hat mit ihrem Wissen, ihren Erfahrungen und ihren wertvollen Ratschlägen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Professor Dr. Michael Fromm danke ich für die wertvollen Ideen und Anregungen, die konstruktiven, hilfreichen Kritiken und Ratschläge sowie die Unterstützung bei der Beantragung der studentischen Forschungsförderung.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Klinische Physiologie, die mir mit ihren Erfahrungen und ihrem Fachwissen bei der Durchführung der Versuche jederzeit beratend und tatkräftig zur Seite standen. Besonders hervorheben möchte ich: Dr. Susanne Krug für ihr großes Engagement und ihre geduldige Mitarbeit während der Impedanzanalysen und deren Auswertung. Prof. Dr. Salah Amasheh für seine Hilfe bei den Immunfluoreszenzauswertungen und seine wertvollen Anregungen und Überlegungen. Dr. Jan Richter für seine Geduld und die professionelle Einarbeitung am LSM. Dr. Susanne Andres für ihre große Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Mannitolfluxen. In-Fah M. Lee für die kontinuierliche Aussaat, Vorbereitung und Bereitstellung einer Vielzahl von Zellfiltern. Insbesondere Ing.-grad. Detlef Sorgenfrei für die Hilfe bei der Nutzung der Laborgeräte und Computer sowie für die Bereitstellung sämtlicher Programme. Allen ein herzliches Dankeschön!

Zum Schluss möchte ich meiner Familie, meinen Freunden und ganz besonders meinen Eltern Evelyn und Manfred für ihre Neugier und uneingeschränkten Rückhalt während meines Studiums sowie in allen erdenklichen Phasen der Entstehung dieser Arbeit danken. Ohne sie stünde ich jetzt nicht an dieser Stelle!