

# **Mechanismen der Transzytose von Makromolekülen bei Morbus Crohn: Untersuchungen am Zellmodell T84 und an humanen Kolon-Biopsien**

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

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

vorgelegt von  
**Lena John**  
aus Heilbronn

April 2014

Diese Arbeit wurde von Februar 2010 bis April 2014 unter der Leitung von Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke in der Medizinischen Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin angefertigt.

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

2. Gutachter: Prof. Dr. Udo Heinemann, Freie Universität Berlin

Disputation am 12. September 2014

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Der Darm als Barriere .....	1
1.1.1 Tight Junctions .....	2
1.2 Morbus Crohn .....	5
1.2.1 Die Darmbarriere bei Morbus Crohn.....	6
1.2.2 Zytokine und Histamin bei Morbus Crohn.....	7
1.3 Endozytose .....	11
1.3.1 Clathrin-vermittelte Endozytose.....	15
1.3.2 Caveolin-vermittelte Endozytose .....	17
1.3.3 Makropinozytose .....	17
1.3.4 Endozytose der Meerrettich-Peroxidase.....	19
1.4 Zielsetzung der Arbeit .....	20
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1 Geräte und Materialien.....	21
2.1.1 Geräte .....	21
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	22
2.1.3 Substanzen und Chemikalien .....	22
2.1.4 Puffer und Lösungen .....	24
2.1.5 Gebrauchsfertige Kits und Lösungen: .....	27
2.1.6 Antikörper .....	27
2.1.7 Inhibitoren.....	29
2.1.8 Zytokine .....	29
2.1.9 Zelllinie .....	30
2.1.10 Software .....	30
2.2 Zellbiologische Methoden .....	30
2.2.1 Zellkultivierung .....	30
2.3 Elektrophysiologische Methoden .....	32
2.3.1 Manuelle Messung des transepithelialen Widerstands.....	32
2.3.2 Ussing-Kammer.....	32
2.3.3 Zwei-Wege-Impedanzmessungen an T84-Monolayern .....	34
2.4 Biochemische Methoden .....	39
2.4.1 HRP-Permeabilitätsmessung .....	39

---

2.4.2 Proteinextraktion .....	44
2.4.3 Proteinbestimmung.....	44
2.4.4 Western Blot.....	45
2.5 Immunfluoreszenzoptische und mikroskopische Methoden .....	47
2.5.1 Immunfluoreszenzfärbung .....	47
2.5.2 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie .....	51
2.6 Statistische Auswertung.....	52
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>54</b>
3.1 Einfluss Morbus Crohn-spezifischer Mediatoren auf T84-Zellen.....	54
3.1.1 HRP-Permeabilität und transepithelialer Widerstand .....	54
3.2 Weitere durch IL-4 vermittelte Veränderungen der epithelialen Barriere von T84-Monolayern .....	57
3.2.1 Expression von TJ-Proteinen .....	57
3.2.2 Para- und transzellulärer Widerstand .....	58
3.3 Charakterisierung des Transportweges von Meerrettich-Peroxidase (HRP) durch T84-Zellmonolayer hindurch .....	60
3.3.1 HRP wird aktiv und Dynamin-abhängig transportiert.....	60
3.3.2 Charakterisierung der beim HRP-Transport beteiligten Endozytose- mechanismen.....	62
3.3.3 Charakterisierung des für die Steigerung der HRP-Permeabilität durch IL-4 verantwortlichen Signalwegs.....	73
3.3.4 Zeitverlauf des HRP-Transports .....	76
3.4 HRP-Permeabilität bei Morbus Crohn .....	80
<b>4 Diskussion</b>	<b>85</b>
4.1 Morbus Crohn-relevante Mediatoren und ihre Wirkung auf T84-Monolayer....	85
4.1.1 IL-4 erhöht die HRP-Permeabilität im T84-Zellmodell .....	85
4.1.2 Einfluss von IL-4 auf die parazelluläre Barriere .....	86
4.2 HRP-Transport durch T84-Monolayer .....	88
4.2.1 Transzellulärer Transportweg der Meerrettich-Peroxidase (HRP).....	88
4.2.2 Endozytosemechanismen des HRP-Transports.....	89
4.2.3 Zeitverlauf des HRP-Transports .....	92
4.3 HRP-Transport im Darmepithel von Morbus Crohn-Patienten .....	95

---

<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>98</b>
<b>6 Summary</b>	<b>100</b>
<b>7 Literatur</b>	<b>102</b>
<b>8 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>120</b>
<b>9 Anhang</b>	<b>122</b>
9.1 Publikationen .....	122
9.2 Lebenslauf .....	123
9.3 Danksagung .....	124

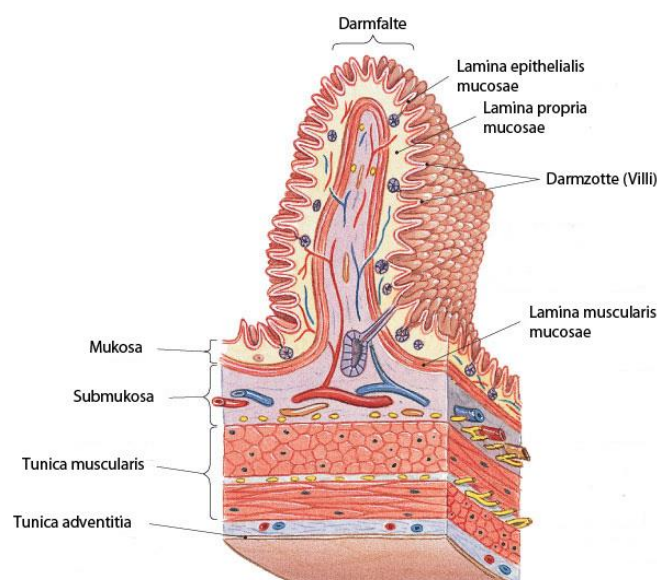
---

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Der Darm als Barriere

Der Darm bildet im menschlichen Körper die größte Oberfläche, die mit der Außenwelt in Kontakt kommt und hat damit zentrale, wichtige Aufgaben. Dazu zählt der gezielte Stoffaustausch als auch die Bildung einer Barriere gegenüber unerwünschten Stoffen aus dem Lumen. Damit einhergehend spielt der Darm eine entscheidende Rolle bei der Immunabwehr, da es in der Darmwand zum Erstkontakt von Immunzellen mit potentiell gefährlichen Stoffen kommt.

Die Darmwand ist von außen nach innen aus folgenden Schichten aufgebaut (Abb. 1.1): die äußerste Schicht bildet die Tunica adventitia aus Bindegewebe, dann folgt die Tunica muscularis, in der die Muskelfasern verlaufen. Darüber liegt die Tela submucosa (kurz: Submukosa), eine Bindegewebsschicht mit Blut- und Lymphgefäßen, sowie Nervenzellen. Die innerste Schicht der Darmwand bildet die Tunica mucosa (kurz: Mukosa), die wiederum von außen nach innen in die Lamina muscularis mucosae, die Lamina propria mucosae und die Lamina epithelialis mucosae (kurz: Epithel) unterteilt ist. In der Lamina propria mucosae ist eine Vielzahl an Immunzellen angesiedelt, die der Bildung von Antikörpern, als auch der Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie den Zytokinen dienen.



**Abb. 1.1: Aufbau der Darmwand (Dünndarm)**

Die Darmwand setzt sich aus Tunica adventitia, Tunica muscularis, Submukosa und Mukosa zusammen. Die Mukosa wiederum besteht aus Lamina muscularis mucosae, Lamina propria mucosae und Lamina epithelialis mucosae. Modifiziert nach [1].

Das einschichtige Epithel des Dickdarms (Kolon) ermöglicht durch die Ausbildung einer selektiven Barriere einerseits den Stoffaustausch zwischen dem Darmlumen und dem Körperinneren, das heißt die Aufnahme von Nährstoffen, Elektrolyten und Wasser als auch die Sekretion von Stoffwechselprodukten [2-4]. Andererseits verhindert es einen Rückfluss bereits absorbiertes bzw. sezernierter Substanzen und das Eindringen schädlicher Antigene [5, 6]. Bei einer Beeinträchtigung der epithelialen Barriere des Darms, beispielsweise im Rahmen von Entzündungsprozessen, kann es durch einen passiven Austritt von Ionen und Wasser ins Darmlumen zu einer Leckflux-Diarrhö kommen. Dabei diffundieren große Mengen an gelösten Stoffen und Wasser ins Lumen zurück und werden nicht mehr ausreichend resorbiert [7]. Darüber hinaus können bei intestinaler Entzündung unter anderem Antigene aus dem Darmlumen über die gestörte Barriere aufgenommen werden und die Entstehung oder Aufrechterhaltung chronischer Entzündungen, wie beispielsweise Morbus Crohn (näher beschrieben in Kapitel 1.2), begünstigen.

Der Transport von Substanzen durch das Epithel kann auf zwei Wegen erfolgen. Zum einen können Stoffe aktiv durch die Zellen hindurch, also transzellulär, transportiert werden. Auf diesen Weg wird später in dem Kapitel Endozytose (1.3) näher eingegangen. Zum anderen können Solute und Wasser parazellulär zwischen den Zellen hindurch transportiert werden [8]. Aber auch dieser passive Transport über die lateralen interzellulären Spalträume unterliegt einer Regulation. Hierbei spielt der junctionale Komplex, bestehend aus den Tight Junctions, den Adherens Junctions und den Desmosomen, eine wichtige Rolle [9, 10].

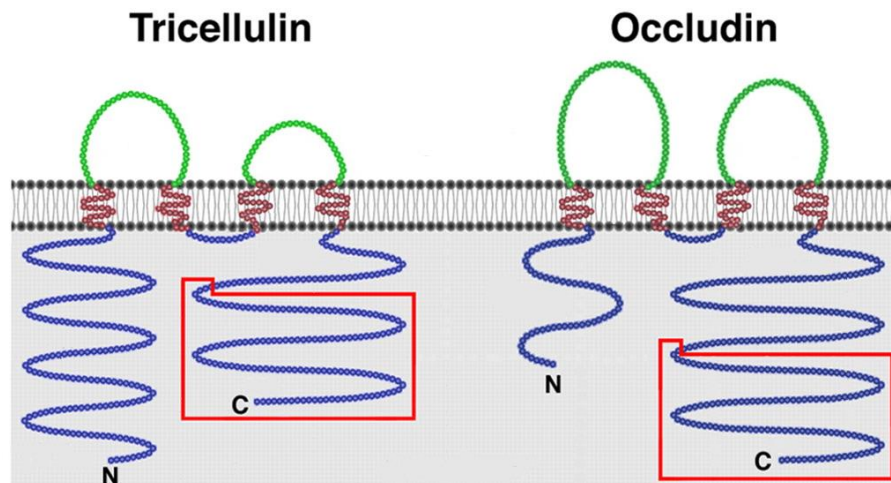
### **1.1.1 Tight Junctions**

Tight Junction (TJ)-Proteine sind netzartig um die Zelle herum angeordnet und wechselwirken mit TJ-Proteinen angrenzender Zellen [9, 11]. Auf diese Weise schränken sie als regulierende Barriere zwischen den Epithelzellen des Darmes den Transport von Ionen und Soluten ein, was auch als „*gate function*“ bezeichnet wird. Eine andere wichtige Funktion der TJs ist die so genannte „*fence function*“, die die laterale Membrandiffusion von Proteinen verhindert und somit die apikal-basolaterale Polarität aufrechterhält [12].

TJs sind Multiproteinkomplexe aus transmembranen Proteinen, die man in zwei Familien unterteilen kann, die Claudine und die TJ-assoziierten MARVEL-Proteine (TAMPs), zu denen Occludin, Tricellulin und MarvelD3 zählen [13].

**Occludin:** Das erste TJ-Protein, das strukturell beschrieben wurde, ist das ca. 65 kDa große Occludin, das vier Transmembrandomänen, zwei extrazelluläre und eine intrazelluläre Schleife sowie einen intrazellulären N- und C-Terminus besitzt (Abb. 1.2) [14]. Die genaue Funktion von Occludin ist noch immer nicht geklärt, jedoch weisen viele Untersuchungen darauf hin, dass Occludin eine wichtige Rolle für die Stabilität der TJs und damit für die Barrierefunktion spielt [15].

**Tricellulin:** Tricellulin ist vor allem an trizellulären Kontaktstellen im Epithel lokalisiert, aber auch in geringerer Dichte in bizellulären Kontakten nachweisbar. Die 64 kDa große Isoform Tricellulin-a zeigt Sequenzhomologien zu Occludin und besitzt auch vier Transmembrandomänen, zwei extrazelluläre und eine intrazelluläre Schleife und einen intrazellulären N- und C-Terminus (Abb. 1.2) [16]. Tricellulin besitzt als barriereförderndes Protein eine abdichtende Funktion gegenüber Makromolekülen [16, 17].

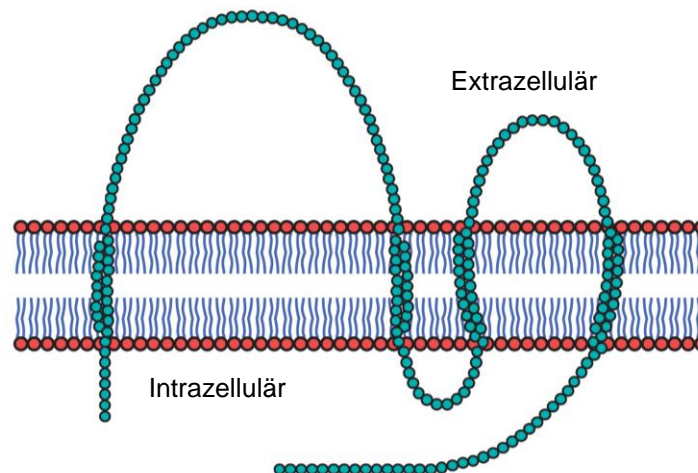


**Abb. 1.2: Tricellulin und Occludin**

Schematischer Aufbau von Tricellulin und Occludin in der Maus. In dem Bereich, der durch die rote Box markiert ist, sind die Aminosäuren der beiden Proteine zu 32 % identisch. Modifiziert nach [16].



**Claudine:** Inzwischen wurden bei den Säugetieren 27 Claudine identifiziert, die, wie Occludin und Tricellulin, vier Transmembrandomänen, zwei extrazelluläre und eine intrazelluläre Schleife und einen intrazellulären N- und C-Terminus besitzen (Abb. 1.3) [18, 19].



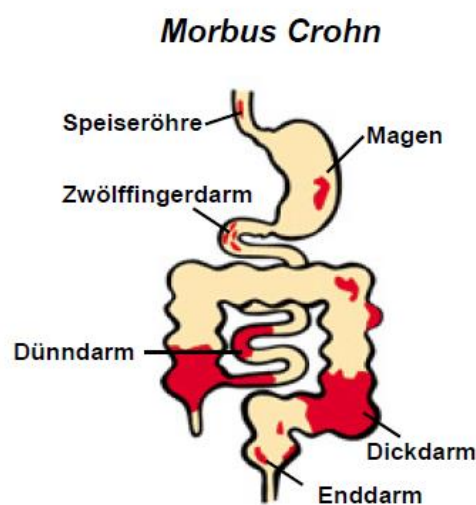
**Abb. 1.3: Claudin**

Schematischer Aufbau von Claudinen. Modifiziert nach [20].

Obwohl bisher nicht alle Funktionen der 20 – 27 kDa großen Claudine entschlüsselt werden konnten, wurde für einige Claudine eine abdichtende oder eine kanalbildende Funktion im Epithel gezeigt. Zu den abdichtenden Claudinen zählen Claudin-1, -3, -4, -5 und -8 [21-25]. Diese sind wesentlich für die Barriere-eigenschaften in dichten oder mitteldichten Geweben, beispielsweise im distalen Nephron, dem Dickdarm, der Harnblase oder in der Epidermis [22, 26-28]. Daneben gibt es Claudine, die parazelluläre Kanäle bilden, wie Claudin-2, -6, -10 und -15. Diese bilden Kanäle, die selektiv für Kationen oder Anionen sind; Claudin-2 bildet sogar Kanäle für Wasser [29-34]. Diese Claudine sind eher in lecken Geweben wie dem proximalen Nephron und dem Dünndarm lokalisiert [27, 28]. Die Lokalisation der Claudine ist also, je nach Funktion, gewebespezifisch.

## 1.2 Morbus Crohn

Morbus Crohn zählt neben Colitis ulcerosa zu den bedeutsamsten chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Diese sind gekennzeichnet durch in Schüben auftretende oder kontinuierliche Entzündungen des Darmes, die mit Bauchschmerzen und im Fall der Colitis ulcerosa mit blutiger Diarrhö einhergehen. Bei Morbus Crohn sind die Entzündungen diskontinuierlich im gesamten Gastrointestinaltrakt verteilt, wobei überwiegend der distale Dünndarm und der Dickdarm betroffen sind (Abb. 1.1) [35].



**Abb. 1.4: Verteilung der Entzündungen bei Morbus Crohn**

Bei Morbus Crohn können segmentale Entzündungen (rot) im gesamten Gastrointestinaltrakt, von der Speiseröhre bis zum Enddarm, auftreten. Hauptsächlich sind jedoch der distale Dün- und der Dickdarm betroffen. Modifiziert nach [36].

Die Ursachen für die Entstehung von Morbus Crohn sind noch nicht vollständig geklärt. Es gibt jedoch Indizien dafür, dass eine erhöhte intestinale Permeabilität die Entstehung begünstigt. Es wurde gezeigt, dass die Permeabilität bei Verwandten ersten Grades von Morbus Crohn-Patienten erhöht ist [37, 38]. Außerdem konnte bei einer Patientin 8 Jahre vor Ausbruch der Krankheit eine erhöhte Permeabilität des Markers  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  festgestellt werden [39]. Wie bereits in Kapitel 1.1 erwähnt, können durch eine geschädigte Darmbarriere, die eine erhöhte Durchlässigkeit aufweist, Antigene aus dem Darmlumen aufgenommen werden. Die Immunzellen der Darmmukosa, deren Zahl bei Morbus Crohn stark erhöht ist, werden dann diesen Antigenen ausgesetzt. Zusammen führt dies zu einer überschießenden

Immunantwort [40, 41]. Zusätzlich ist die Toleranz gegenüber der eigenen Darmflora gestört, was zu einer Hyperreaktivität und einer chronischen Immunantwort gegenüber dieser führt [41, 42]. Neben der erhöhten intestinalen Permeabilität und der erhöhten Zahl an Immunzellen spielen zusätzlich auch Umwelteinflüsse und genetische Faktoren eine wichtige Rolle, wie beispielsweise Mutationen des NOD2-Gens, das für einen Mustererkennungsrezeptor für Fremdstoffe im angeborenen Immunsystem kodiert [35, 43, 44].

### **1.2.1 Die Darmbarriere bei Morbus Crohn**

Die intestinale Barriere bei Patienten mit Morbus Crohn ist, abhängig vom Grad der Entzündung, beeinträchtigt. Dies äußert sich durch einen verminderten epithelialen Widerstand, eine erhöhte Apoptoserate und eine erhöhte intestinale Permeabilität [45-50]. Permeabilitätsmessungen an verschiedenen Segmenten des entzündeten Darmes zeigten eine erhöhte Transportrate diverser Markermoleküle. Die ersten dieser Untersuchungen wurden in den 1980ern mit Laktulose-Mannitol- bzw. Laktulose-Rhamnose-Tests durchgeführt, bei denen das Verhältnis von Laktulose zu Mannitol bzw. Rhamnose erhöht war [51-54]. Diese Untersuchungen weisen eher auf eine gesteigerte parazelluläre Permeabilität hin, da Laktulose parazellulär aufgenommen wird [55]. Ähnliche Ergebnisse wurden durch im Urin gemessene, oral verabreichte Marker wie <sup>51</sup>Cr-EDTA und Polyethylenglykol 400 (PEG 400) erzielt, die ebenfalls parazellulär transportiert werden [37, 56]. Spätere Studien mit der Meerrettichperoxidase (HRP) und Ovalbumin zeigten jedoch, dass bei Morbus Crohn auch die transzelluläre Permeabilität erhöht ist [45, 46, 48]. HRP und Ovalbumin konnten mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen in intrazellulären Vesikeln nachgewiesen werden [46, 48]. Bei Morbus Crohn ist also sowohl die para- als auch die transzelluläre Barriere gestört.

#### **1.2.1.1 Veränderungen der Tight Junctions**

Wie bereits erwähnt ist die parazelluläre Barriere des Darms bei Morbus Crohn beeinträchtigt, was sich größtenteils auf Veränderungen der TJ-Strukturen zurückführen lässt [57]. Die Anzahl der TJ-Stränge zwischen benachbarten Zellen ist stark vermindert und die Höhe des TJ-Netzwerks reduziert. Außerdem kommt es zu einer

Zunahme an Strangbrüchen und zu einem Auftreten diskontinuierlicher TJ-Stränge [50, 57, 58]. Einzelne Claudine sind in ihrem Expressions- und Verteilungsmuster verändert. Claudin-2, das Kanäle für Kationen und Wasser bildet, wird verstärkt exprimiert, wohingegen Claudin-3, -5 und -8, drei abdichtende Claudine, eine verminderte Expression zeigen. Auch Occludin, das wahrscheinlich eine Rolle bei der Stabilisierung der TJs und der Barrierefunktion spielt [15], wird vermindert exprimiert. Claudin-5 und -8 sind zusätzlich aus den TJ-Strängen heraus in der Epithelzelle umverteilt [50].

### **1.2.2 Zytokine und Histamin bei Morbus Crohn**

Bei Morbus Crohn liegt eine Anomalie der mukosalen T-Lymphozyten vor. Diese zeigt sich einerseits dadurch, dass sie gegenüber mikrobiellen Antigenen Immunantworten auslösen, gegenüber denen sie im gesunden Zustand unempfindlich sind [59, 60]. Außerdem sind die T-Lymphozyten resistent gegenüber Apoptose, so dass es zu einem Überschuss dieser Immunzellen in der erkrankten Mukosa kommt [61, 62]. Damit einhergehend ist die erhöhte Produktion zahlreicher Zytokine im Darm [41]. Die ursprüngliche Annahme, dass bei Morbus Crohn hauptsächlich Th1-Zytokine erhöht sind, wurde bereits von einigen Studien widerlegt, die auch eine Erhöhung von Th2- und Th17-Zytokinen zeigten [63-69]. Ein oder mehrere „Schlüssel-Zytokine“ sind jedoch nicht identifizierbar, da viele Faktoren das Zytokinprofil im entzündeten Darm beeinflussen. Dazu zählen unter anderem die verschiedenen Phasen der Krankheit und der Entzündungsgrad [41, 66]. Hinzu kommt die Problematik bei den Zytokinmessungen, da eine Unterscheidung von entzündet und nicht entzündet häufig auf subjektiver Bewertung beruht und die Vergleichbarkeit verschiedener Studien aufgrund einer unterschiedlichen Methodik verwirrend oder nicht möglich ist [41]. Dennoch liefern solche Untersuchungen wichtige Ergebnisse, die Aufschlüsse über die Immunantwort bei Morbus Crohn geben.

Neben den Zytokinen sind viele andere Entzündungsmediatoren bei Morbus Crohn erhöht, unter anderem auch Histamin. Dieses ist nicht nur insgesamt erhöht, die Histaminkonzentration im Darm korreliert auch mit dem Grad der Entzündung [70-72].

Im Folgenden werden außer Histamin nur die Zytokine näher erläutert, die auch in dieser Doktorarbeit verwendet wurden.

### **1.2.2.1 Interleukin-1 $\beta$**

Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ist ein proinflammatorisches Zytokin, das bei Morbus Crohn vermehrt in Makrophagen der Mukosa produziert wird [63, 67, 68, 73]. Der natürlich vorkommende Antagonist von IL-1 $\beta$ , IL-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra), besetzt normalerweise den IL-1 Rezeptor. Bei Morbus Crohn kommt es jedoch durch die übermäßige Synthese von IL-1 $\beta$  zu einem Ungleichgewicht, so dass IL-1 $\beta$  an seinen Rezeptor binden und Entzündungsreaktionen ausgelöst bzw. aufrechterhalten kann [74]. IL-1 $\beta$  verstärkt die antigen-induzierte Proliferation von Th1-, Th2- und Th17-Zellen und die Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine [75, 76]. In Experimenten mit intestinalen Epithelzellen wurde gezeigt, dass IL-1 $\beta$  die Permeabilität der TJ steigert [77].

### **1.2.2.2 Interleukin-4**

In frühen Läsionen des Ileums bei Erwachsenen sowie bei Kindern mit Morbus Crohn wurden erhöhte Interleukin-4 (IL-4)-Spiegel gemessen [66, 78]. Dieses anti-inflammatorische Zytokin wird hauptsächlich in Th2-Lymphozyten gebildet, aber auch in Mastzellen [79, 80].

Zahlreiche Studien zeigten bereits, dass die Zugabe von IL-4 zu der intestinalen Zelllinie T84 eine Verminderung des transepithelialen Widerstandes verursacht [81-88]. Korrelierend zu dieser Widerstandsverminderung erhöht IL-4 die Expression des TJ-Proteins Claudin-2, welches als kanalbildendes Claudin die parazelluläre Barriere schwächt [87]. Permeabilitätsstudien mit verschiedenen Markermolekülen zeigten, dass IL-4 sowohl den para-, als auch den transzellulären Transport erhöht [83, 85, 87, 88]. Diese Tatsache deutet daraufhin, dass IL-4 in einem frühen Stadium des Morbus Crohn die Barrierefunktion des Darmepithels schädigen und so die Translokation von Antigenen erleichtern kann [66], was wiederum die Entzündungsreaktion verstärkt. Außerdem stimuliert IL-4 T- und B-Zellen, Mastzellen, Monozyten und Makrophagen [89-91]. Diese Zellen können Entzündungsmediatoren wie z.B. Histamin freisetzen, auf dessen Wirkungen im Darm im Kapitel 1.2.2.6 noch

eingegangen wird. Auf der anderen Seite inhibiert IL-4 die Produktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine, wie zum Beispiel die von IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ , und induziert die Expression des IL-1ra durch periphere Monozyten und intestinale Lamina propria mononukleäre Zellen (LPMCs) [92, 93]. Allerdings ist diese regulatorische Funktion bei Morbus Crohn beeinträchtigt, da die Empfänglichkeit der peripheren Monozyten und intestinalen LPMCs gegenüber IL-4 vermindert ist [93]. In einer Studie, in der der Einsatz von IL-4 in der Therapie von Krebs untersucht wurde, traten bei einigen Patienten starke Nebenwirkungen auf, unter anderem Diarrhö und gastrointestinale Blutungen [94].

### **1.2.2.3 Interleukin-6**

Interleukin-6 (IL-6) wird von einer Vielzahl von Zelltypen produziert, unter anderem Makrophagen und T-Zellen, aber auch Endothel- und Epithelzellen [95, 96]. Es existieren zwei Rezeptoren für IL-6, der membrangebundene (IL-6R) und der lösliche IL-6 Rezeptor (sIL-6R). Die meisten Effekte werden nach Bindung von IL-6 an den sIL-6R und die darauffolgende Bindung dieses Komplexes an das membran-gebundene gp130 Protein ausgelöst [97]. IL-6 spielt eine Rolle bei der bereits beschriebenen Resistenz von T-Lymphozyten gegenüber apoptotischen Ereignissen, die bei Morbus Crohn auftritt [98]. Das pro- und antiinflammatorisch wirkende Zytokin ist außerdem einer der wichtigsten Mediatoren der Akute-Phase-Reaktion, einer Entzündungsreaktion bei der unspezifischen Immunantwort [99, 100]. Außerdem bewirkt es die Differenzierung von B-Zellen und die Aktivierung von T-Zellen [101]. Sowohl IL-6, als auch der sIL-6R sind bei Morbus Crohn erhöht [102]. Tocilizumab (Handelsname: RoActemra<sup>®</sup>), ein Antikörper, der gegen den sIL-6R gerichtet ist, wurde bereits in einer klinischen Studie an Morbus Crohn Patienten getestet. Dabei wurde zwar eine erhöhte Remissionrate und eine Induktion der T-Zell Apoptose erzielt, jedoch konnten bei endoskopischen und histologischen Untersuchungen keine Verbesserungen festgestellt werden [103].

#### 1.2.2.4 Tumornekrosefaktor- $\alpha$

Im Darm von Morbus Crohn Patienten konnte ein erhöhter Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )-Spiegel gemessen werden [48, 67-69]. Dieses proinflammatorische Zytokin wird in Makrophagen, LPMCs und Mastzellen der Mukosa gebildet [104-106].

Bei der bereits erwähnten Steigerung der Permeabilität bei Patienten mit Morbus Crohn spielt TNF $\alpha$  einigen Studien zufolge eine wichtige Rolle [48, 106]. So wurde in mukosalen Biopsien eine Korrelation zwischen dem Anstieg der endosomalen HRP-Aufnahme und der mRNA-Expression von TNF $\alpha$  gefunden [48]. In Zellkultur-experimenten zeigte TNF $\alpha$  ebenfalls eine barriestörende Wirkung. Apoptosen wurden induziert, die TJs wurden beeinträchtigt, die parazelluläre Ionenpermeabilität und die endosomale Aufnahme von HRP erhöht [48, 107-109]. Die Abnahme des transepithelialen Widerstandes durch die Kokultivierung einer intestinalen Zelllinie mit mononukleären Zellen von Patienten mit Morbus Crohn wurde ebenfalls auf die Wirkung von TNF $\alpha$  zurückgeführt [106]. Diese Annahme wird unterstützt durch andere Studien mit intestinalen Zelllinien, bei denen die alleinige Gabe von TNF $\alpha$  den transepithelialen Widerstand senken konnte [107, 108].

Eine effektive Behandlungsmethode von Morbus Crohn Patienten stellt die Therapie mit den anti-TNF $\alpha$ -Antikörpern Infliximab (Handelsname: Remicade<sup>®</sup>) und Adalimumab (Handelsname: Humira<sup>®</sup>) dar. In zwei Studien senkte die Behandlung mit Infliximab bei den Patienten die intestinale Permeabilität für <sup>51</sup>Cr-EDTA, sowie die Apoptoserate und erhöhte den transepithelialen Widerstand [49, 110].

#### 1.2.2.5 Interferon- $\gamma$

Das proinflammatorische Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) wird von Th1-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen produziert. Es aktiviert unter anderem mononukleäre Phagozyten, Neutrophile, natürliche Killerzellen und stimuliert die Differenzierung von B- und T-Zellen [111].

Experimente mit intestinalen Zelllinien zeigten, dass IFN $\gamma$  den transepithelialen Widerstand senkt und die Permeabilität für die para- beziehungsweise transzellulären Marker Mannitol, HRP und <sup>51</sup>Cr-EDTA erhöht [86, 112, 113]. Auch eine Umverteilung der abdichtenden TJ-Proteine Claudin-1, -4 und Occludin aus der TJ-Domäne der Epithelzelle heraus konnte beobachtet werden [114]. Aus in vivo Studien an Mäusen mit entzündetem Darm wurde ein Zusammenhang zwischen der

erhöhten intestinalen Permeabilität für  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  und der Produktion von IFN $\gamma$  postuliert [115].

### 1.2.2.6 Histamin

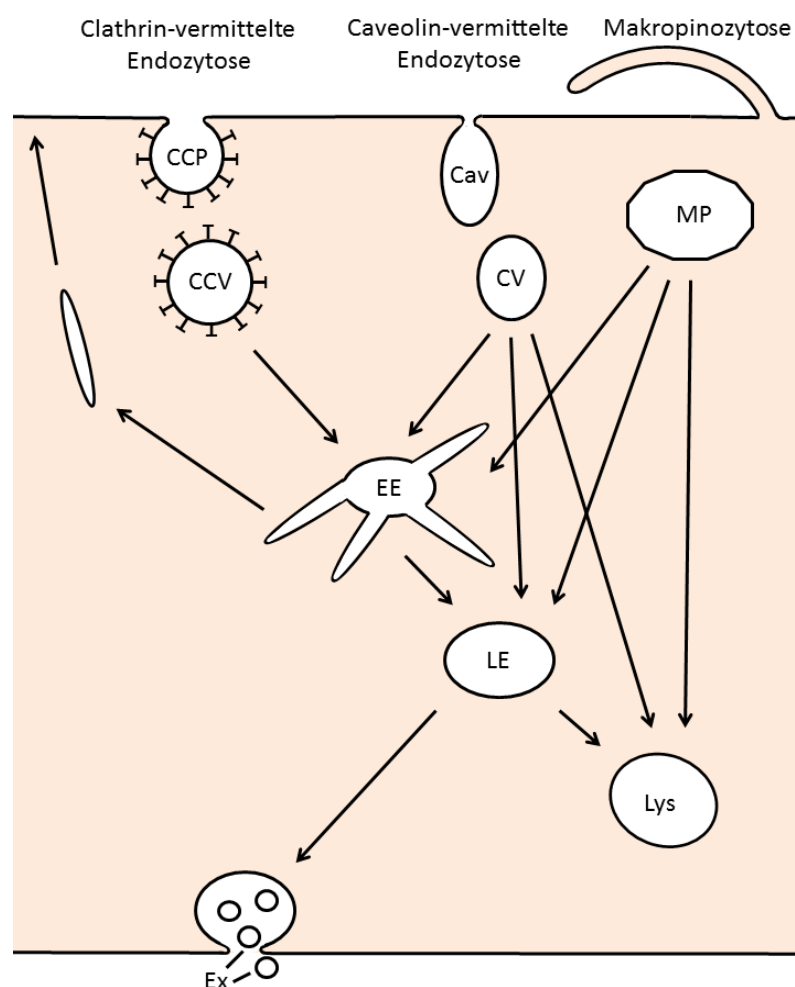
Das Gewebshormon Histamin ist ein wichtiger proinflammatorischer Mediator, der vor allem in den Granula von Mastzellen und basophilen Granulozyten gespeichert wird. Werden diese Zellen, beispielsweise durch Immunglobuline, aktiviert, kommt es zur Degranulation und das gespeicherte Histamin wird freigesetzt [116]. Einige Untersuchungen zeigten eine erhöhte Anzahl von intestinalen Mastzellen bei Morbus Crohn [117-119], wohingegen andere keine Erhöhung finden konnten [120, 121]. Hinweise auf eine erhöhte Aktivität der Mastzellen während der Krankheit existieren, aber auch hier gibt es gegensätzliche Beobachtungen [121, 122]. Einigkeit herrscht hingegen gegenüber der Tatsache, dass das Histaminlevel bei Morbus Crohn erhöht ist [70-72]. Viele der für Morbus Crohn typischen Symptome, unter anderem Bauchschmerzen und Diarrhö, können durch die biologische Wirkung von Histamin, wie beispielsweise die Schmerzübermittlung, die Induktion von Muskelkontraktionen und Wasser- und Ionensekretion, erklärt werden [71, 123-125]. In einer in vivo Histamin-Provokationsstudie sowie in einem in vitro Nahrungsmittelallergie-Modell konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass Histamin die TJ-Integrität stört [126, 127]. Eine weitere in vivo Histamin-Provokationsstudie konnte diesen Verlust der TJ-Integrität jedoch nicht bestätigen [128]. Es gibt Spekulationen über einen Zusammenhang zwischen der erhöhten transepithelialen Permeabilität des Darms bei Nahrungsmittelallergie und dem bei diesem Krankheitsbild ausgeschütteten Histamin [129].

## 1.3 Endozytose

Unter Endozytose wird die Internalisierung von Flüssigkeit und den darin gelösten Stoffen, Makromolekülen, Zellmembranbestandteilen und anderen Partikeln verstanden. Die Endozytose spielt eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Nährstoffen, der Herunterregulierung von Rezeptoren, der Antigenpräsentation, der Aufnahme von Pathogenen, der intrazellulären Signaltransduktion, der Zellpolarität, in der interzellulären Kommunikation und weiteren Prozessen in der Zelle [130, 131].



Der transzelluläre Transport, welcher als Transzytose bezeichnet wird, beginnt mit der Endozytose, welche durch verschiedene Mechanismen bewerkstelligt werden kann. Dazu gehören die Makropinozytose, die Clathrin- oder Caveolin-vermittelte Endozytose und die Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose [130-133]. Es gibt einige Gemeinsamkeiten zwischen den verschiedenen Wegen, aber auch viele Unterschiede. Diese werden für die Makropinozytose, die Clathrin- und Caveolin-vermittelte Endozytose in den Kapiteln 1.3.1 - 1.3.3 beschrieben. Trotz dieser erwähnten Unterschiede zwischen den verschiedenen Endozytosemechanismen, gibt es ein allgemeines Schema des Endozytoseablaufs (Abb. 1.5).



**Abb. 1.5: Allgemeines Schema der Endo- und Transzytose:**

Endozytotische Vesikel (CCV: Clathrin-umhülltes Vesikel, CV: caveoläres Vesikel, MP: Makropinosom) entstehen nach der Internalisierung von Stoffen an der apikalen Plasmamembran. Diese fusionieren mit beziehungsweise reifen zu frühen Endosomen (EEs), späten Endosomen (LEs) oder Lysosomen (Lys). Von den frühen und späten Endosomen können Vesikel an die Plasmamembran transportiert werden. CCP: Clathrin-umhüllte Grube, Cav: Caveolae; Ex: Exosom.

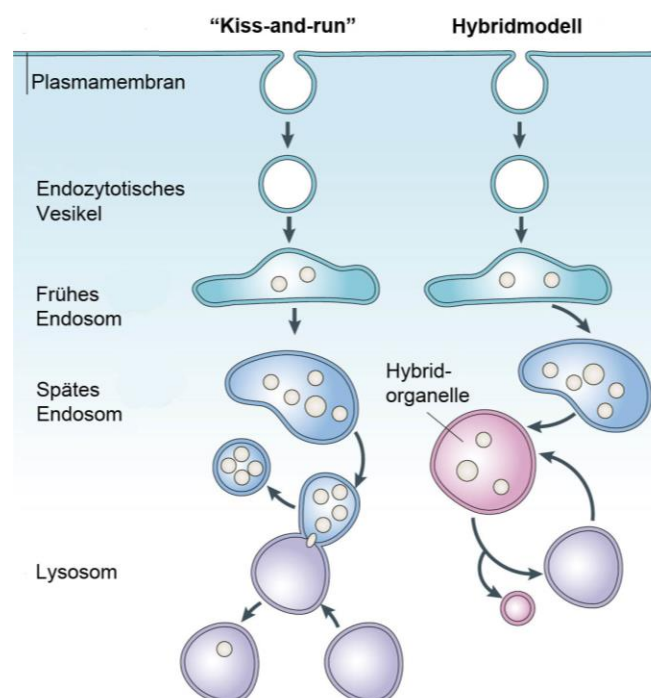
Ein Molekül bindet entweder an einen Rezeptor und wird gemeinsam mit diesem internalisiert oder es wird in Einstülpungen oder durch Extensionen der Plasmamembran aufgenommen [134-136]. Die Membran muss für diesen Vorgang ein- bzw. ausstülpbar sein. Dies wird bewerkstelligt durch verschiedene Proteine, die die Membran deformieren und Wölbungen induzieren können, wie beispielsweise Aktin oder die Hüllproteine Clathrin und Caveolin [137, 138]. Auch durch Veränderungen im Zytoskelett kann die Membranspannung herabgesetzt werden [137]. Die eingestülpte Membran wird dann abgeschnürt, wodurch ein endozytotisches Vesikel entsteht. Für diese Abschnürung werden zusätzliche Proteine wie beispielsweise die große GTPase Dynamin benötigt [139]. Durch Reife- und Fusionsprozesse werden aus den endozytotischen Vesikeln frühe Endosomen (EEs von engl. *early endosomes*) oder späte Endosomen (LEs von engl. *late endosomes*) oder Lysosomen [140-144].

EEs sind in der Nähe der Plasmamembran lokalisiert, wo sie entlang von Mikrotubuli transportiert werden [145]. Sie haben eine vesikuläre Struktur mit einem Durchmesser von bis zu 1 µm, die mit tubulären Anhängen mit einem Durchmesser von ca. 60 nm verbunden sind [146]. Die Membran der EEs enthält zahlreiche funktionelle Proteine, die an der Regulation des Vesikeltransports und der Endosomenfusion beteiligt sind. Dazu zählen unter anderem die kleine GTPase Rab5 und das Rab5-Effektorprotein EEA1 [145, 147]. In den EEs findet die hauptsächliche Sortierung statt, wobei das weitere Schicksal des Cargos festgelegt wird [148]. Entweder wird es mittels der EEs zurück zur Membran recycelt oder es verbleibt in den EEs, die durch weitere Prozesse zu LEs reifen [148, 149]. Während dieser Reifeprozesse werden die tubulären Anhänge, in denen sich viele der Moleküle konzentrieren, die zur Plasmamembran recycelt werden, entfernt [146]. Aus der Membran der EEs entstehen kleinere Vesikel, sogenannte intraluminale Vesikel (ILVs), in denen weitere Moleküle eingeschlossen sein können [150]. Außerdem verändert sich während der Reifung die Zusammensetzung der regulierenden Proteine in der Membran. So wird beispielsweise Rab5 mit Rab7 ausgetauscht, einer weiteren GTPase, die den Vesikeltransport und die Fusion mit Lysosomen reguliert [151, 152]. Während dieses Austauschs sind kurzfristig beide GTPasen gleichzeitig in der Vesikelmembran nachweisbar [153].

Die runden oder ovalen LEs mit einem Durchmesser von 400 bis 800 nm werden aufgrund der ILVs auch als multivesikuläre Körper (MVBs von engl. *multivesicular*

bodies) bezeichnet [153, 154]. Sie werden mit Hilfe der Mikrotubuli weiter in das Zellinnere transportiert, wo sie mit anderen LEs oder Lysosomen fusionieren können [155, 156]. LEs können auch zur Plasmamembran transportiert werden und ihren Inhalt durch Fusion mit der Membran freigeben. Die so freigesetzten 40 bis 100 nm großen ILVs nennt man Exosomen [157]. Findet diese Fusion an der der Aufnahme gegenüberliegenden Zellseite statt, spricht man von Transzytose.

Im Lysosom findet die Degradation und das Recycling intra- und extrazellulärer Moleküle durch lysosomale Enzyme statt [158]. Der Transport der zu degradierenden Moleküle in die Lysosomen geschieht auf verschiedenen Wegen (Abb. 1.6). Zum einen werden durch vorübergehende Fusionen Cargo von den LEs in die Lysosomen transferiert, was als „kiss-and-run“ bezeichnet wird [159]. Zum anderen verschmelzen LEs mit Lysosomen zu Hybridorganellen, in denen die Degradation stattfindet (Abb. 1.6) [155].



**Abb. 1.6: Transportwege zum Lysosom**

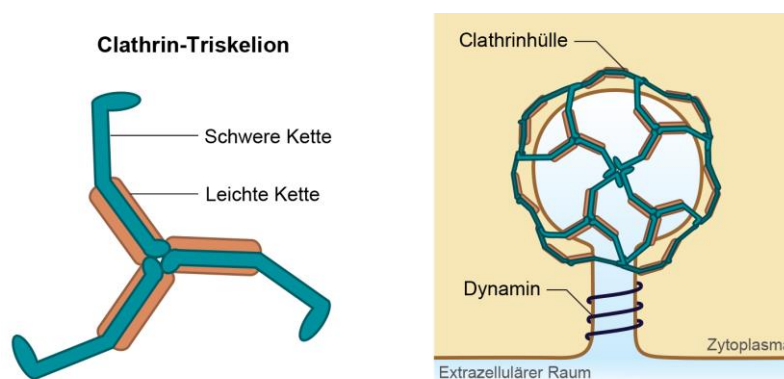
Beim „kiss-and-run“-Modell fusionieren LE und Lysosom kurzzeitig, um Moleküle zum Lysosom zu transferieren. Beim Hybrid-Modell entsteht eine Hybridorganelle aus LE und Lysosom. Modifiziert nach [160].

Viele der durch Degradation von Polymeren entstandenen Monomere, wie beispielsweise Aminosäuren aus dem Polypeptidabbau, werden in das Zytosol freigesetzt [161]. Durch die Verschmelzung von Lysosomen mit der Plasmamembran, die lysosomale Exozytose, kann der lysosomale Inhalt aber auch abgegeben werden [162]. Dabei spielt das in der Membran lokalisierte lysosomal assoziierte Membranprotein 1 (LAMP1), das, zusammen mit anderen Proteinen, den lysosomalen Transport reguliert, eine wichtige Rolle [162].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Endozytose ein komplexer und hochdynamischer Prozess ist, der aufgrund seines essentiellen Charakters einer großen Zahl an Regulationen unterliegt.

### 1.3.1 Clathrin-vermittelte Endozytose

Bei der Clathrin-vermittelten Endozytose (CME von engl. *clathrin mediated endocytosis*) bildet das Protein Clathrin ein Netzwerk aus einzelnen sogenannten Triskelien um prävesikuläre Einstülpungen der Plasmamembran (CCPs von engl. *clathrin coated pits*) (Abb. 1.7) [163].

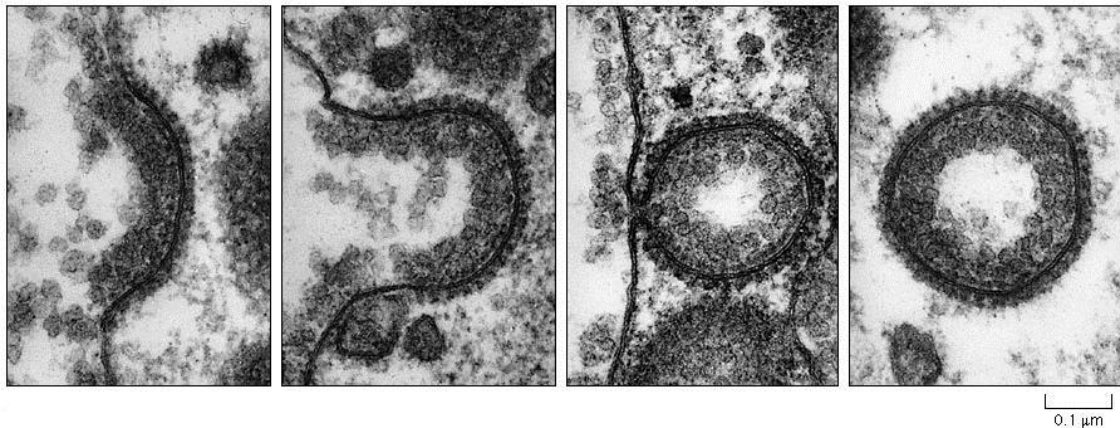


**Abb. 1.7: Clathrinhülle aus Triskelien**

Ein Triskelion (links) besteht aus je drei schweren und leichten Ketten. Durch Polymerisierung bildet sich ein Netzwerk um die CCPs (rechts). Modifiziert nach [164].

Zu Beginn der CME binden Clathrin und das Adapterprotein 2 (AP2) an spezialisierte Motive an der Innenseite der Plasmamembran [165]. Dadurch, und durch die Bindung weiterer regulatorischer Proteine wie Amphiphysin, wird die Einstülpung der Membran und somit die Entstehung der CCPs induziert [137]. Einige Rezeptoren, wie beispielsweise der Transferrin-Rezeptor, können mit dem AP2 interagieren und

werden dann, zusammen mit den daran gebundenen Liganden, in die CCPs aufgenommen [134]. Moleküle, die nicht rezeptorvermittelt transportiert werden, benötigen die Interaktion mit AP2 oder anderen assoziierten Proteinen, um internalisiert zu werden [134]. Die Clathrin-Triskelien polymerisieren und bilden so ein Netzwerk um die CCPs (Abb. 1.7) [131]. Dieses kann man in elektronenmikroskopischen Aufnahmen gut erkennen (Abb. 1.8).



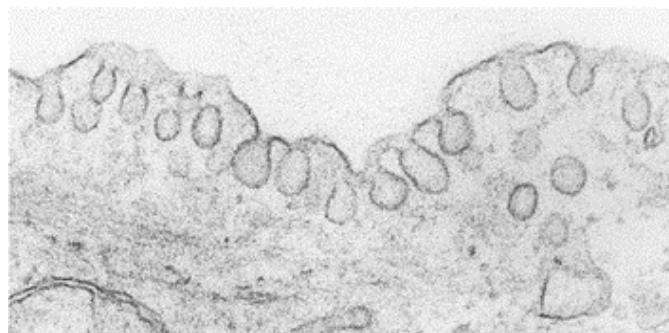
**Abb. 1.8: Clathrin-vermittelte Vesikelbildung**

Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer Hühnereizelle. Von links nach rechts: eine Clathrin-umhüllte Grube bildet sich, an deren Außenseite das Clathrin-Netzwerk gebunden ist. Nach dem Schließen und Abschnüren entsteht ein Clathrin-umhülltes Vesikel. Modifiziert nach [166].

Bei der Abschnürung von CCPs und somit der Entstehung von bis zu 150 nm großen Clathrin-umhüllten Vesikeln (CCVs von engl. *clathrin coated vesicles*) ist die große GTPase Dynamin beteiligt. Der genaue Mechanismus hierbei ist umstritten. Es wird angenommen, dass sich Dynamin am Vesikelhals polymerisiert, und diesen als Mechanoenzym unter Hydrolyse von GTP abschnürt [139]. Nach dem Entfernen der Clathrinhülle und daran gebundener AP2s fusionieren die so entstandenen „nackten“ Vesikel untereinander und mit EEs [140, 167]. Dabei spielen (wie unter 1.3 bereits ausgeführt) Rab5 und EEA1 eine wichtige Rolle [167].

### 1.3.2 Caveolin-vermittelte Endozytose

Die Caveolin-vermittelte Endozytose tritt an Cholesterol- und Sphingolipid-reichen Bereichen der Plasmamembran, sogenannten Floßstrukturen (engl. *lipid rafts*) auf. Das Protein Caveolin-1 wird, gebunden an Cholesterol, zur Plasmamembran transportiert und in diese integriert [168]. Weitere Proteine, wie das Cavin, das Membraneinstülpungen induzieren kann und die Knospung reguliert, lagern sich an [169]. Auch Caveolin-1 selbst induziert Wölbungen der Plasmamembran [138]. Durch das Zusammenspiel der angelagerten Proteine bilden sich Caveolae, sackförmige Einstülpungen in der Plasmamembran, die von Caveolin-1 umhüllt sind (Abb. 1.9) [136]. Diese stabilen Strukturen können durch Signale, wie beispielsweise die Aktivierung eines Src-Kinase-Signalwegs, stimuliert werden und von der Plasmamembran mit Hilfe der großen GTPase Dynamin abgeschnürt werden [170, 171].



**Abb. 1.9: Caveolae an der Plasmamembran**

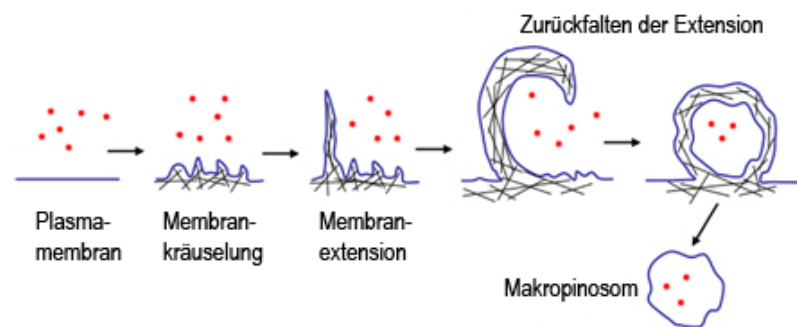
Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Myoepithelzelle. Modifiziert nach [172].

Die so entstandenen 60 bis 80 nm durchmessenden Vesikel fusionieren unter der Regulation von Rab5 hauptsächlich mit EEs, aber auch mit LEs oder Lysosomen und transferieren ihr Cargo dorthin [141, 142]. In den EEs wird Caveolin-1 in ILVs eingeschlossen, wo es bis zur Degradation im Lysosom verbleibt [168].

### 1.3.3 Makropinozytose

Bei der Makropinozytose bilden sich durch die Polymerisierung von Aktin Extensionen der Plasmamembran [135]. Durch Zurückfallen der Extensionen entstehen Vesikel, in denen das extrazelluläre Medium und darin gelöste Stoffe eingeschlossen sind (Abb. 1.10) [135]. Nach der Abschnürung dieser Vesikel entstehen Makropinosomen, die 0,2 bis > 5 µm groß sind [173].

Die Bildung von Makropinosomen wird durch eine Vielzahl von Kinasen, GTPasen und anderen regulatorischen Proteinen gesteuert. Hierzu zählen unter anderem die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), die GTPasen Dynamin, Ras, Rac1, p21-aktivierte Kinase 1 (PAK1) und das Membranprotein *sorting nexin 5* (SNX5) [135, 144, 174-178]. Diese Proteine sind meist an mehreren Stadien der Makropinosomenbildung beteiligt. Die kleine GTPase Ras beispielsweise aktiviert drei Signalwege, die parallel ablaufen. Dabei sind unter anderem die GTPasen Rab5, Rac1 und die PI3K involviert, welche wiederum in verschiedene Prozesse der Makropinosomenbildung, beispielsweise die Membrankräuselung oder die Bildung von Extensionen der Plasmamembran, eingreifen [135]. Die Abschnürung der Makropinosomen erfolgt durch das C-terminale Bindeprotein-1/BrefeldinA-ADP ribosyliertes Substrat (CtBP1/BARS), welches durch PAK1 phosphoryliert wird [178].



**Abb. 1.10: Stadien der Makropinosomenbildung**

Durch die Polymerisierung von Aktin (schwarz) kräuselt sich die Membran (blau) und es bilden sich Extensionen. Durch das Zurückfallen der Extensionen entstehen Makropinosomen mit internalisiertem Cargo (rot). Modifiziert nach [179].

Makropinosomen bilden unter der Regulation von SNX5 tubuläre Extensionen aus, die entlang von Mikrotubuli zu EEs transportiert werden und mit diesen verschmelzen. In diesen tubulären Extensionen ist Cargo enthalten, der über die EEs zurück zur Plasmamembran transportiert werden kann. Daher kann man SNX5 auch eine Rolle bei der Sortierung internalisierten Cargos zuschreiben [144]. Der Rest des Makropinosoms reift, u.a. auch durch Fusionsprozesse, zu LEs und Lysosomen [143, 144].

### 1.3.4 Endozytose der Meerrettich-Peroxidase

Das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP von engl.: *horseradish peroxidase*) ist ein 44 kDa großes Glykoprotein aus den Wurzeln des Meerrettichs (*Armoracia rusticana*) [180]. Wie andere Peroxidasen katalysiert die HRP die Reduktion von Hydroperoxiden, wie zum Beispiel Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). Dabei können verschiedenste Substrate oxidiert werden. Diese Eigenschaft wird in der Molekularbiologie häufig genutzt, beispielsweise beim Western Blot. An den sekundären Antikörper gekoppelt, oxidiert die HRP einen chromogenen Farbstoff (z.B. Diaminobenzidin, Tetramethylbenzidin), der nach der Oxidation farbige Produkte bildet und somit das Protein sichtbar macht.

HRP wurde bereits in vielen Untersuchungen als Markermolekül für Permeabilitätsmessungen genutzt. Angesichts der Peroxidase-Aktivität ist HRP ein optimaler Marker hierfür, da man einerseits den transzellulären Durchtritt intakter HRP-Moleküle aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität messen kann und es andererseits die Option gibt, HRP während des Transports durch enzymatische Färbung nachzuweisen [129]. Es wurde gezeigt, dass HRP auf dem transzellulären Weg durch die Zelle transportiert wird [46, 181]. Allerdings gibt es auch einige Studien am Rattendarm beziehungsweise einer intestinalen Zelllinie, die HRP elektronenmikroskopisch im parazellulären Spalt zeigen konnten. Aufgrund der Größe (44 kDa) ist es jedoch unwahrscheinlich, dass HRP allein durch Permeation durch die TJ dorthin gelangt. Vielmehr wird hier der Transport über die transzelluläre Route in den parazellulären Spalt erwogen [83, 181, 182]. So wurde HRP auch erst nach längerer Inkubationszeit parazellulär nachgewiesen, was eher für laterale Exozytose als für parazellulären Durchtritt spricht [181].

Da HRP Mannosegruppen enthält, wird diskutiert, dass HRP auch an den Mannose-Rezeptor binden kann und so rezeptorvermittelt mittels CCPs in die Zelle internalisiert wird [183, 184]. In einer dieser Studien wurde aber auch gezeigt, dass HRP zusätzlich rezeptorunabhängig transportiert wird [184]. Da der Mannose-Rezeptor nur auf Makrophagen, retinalem Pigmentepithel, glatten Muskelzellen der Luftröhre, dendritischen Zellen und einigen Leber-, Nieren- und lymphatischen Zellen exprimiert wird [183, 185], spielt dieser Rezeptor für den HRP-Transport im Darm keine Rolle.



## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung des zellbiologischen Mechanismus der Transzytose von Makromolekülen über das Darmepithel. Dabei wurde die Meerrettich-Peroxidase (HRP) als repräsentatives Makromolekül verwendet.

Weiterhin sollte geklärt werden, inwieweit unter entzündlichen Bedingungen beziehungsweise bei der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn die makromolekulare Transzytose verändert ist und welche Mechanismen der Regulation zugrunde liegen.

Ein Hauptmerkmal der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn ist die erhöhte Durchlässigkeit der geschädigten Darmbarriere. Daher wurden in dieser Arbeit verschiedene bei Morbus Crohn relevante Mediatoren, namentlich IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  und Histamin, auf ihre Transzytose-steigernde Wirkung im Zellmodell untersucht.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Geräte und Materialien

#### 2.1.1 Geräte

Agarosegel-Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad, Deutschland
Analysenwaage	Sartorius, Deutschland
Begasungsbrutschrank B5060 EC / CO <sub>2</sub>	Heraeus, Deutschland
Begasungsbrutschrank Revco Ultima II	Thermo Electron, Deutschland
Brutschrank	Heraeus, Deutschland
Cryostat CM 1900	Leica, Deutschland
Feinwaage R 200 D	Sartorius, Deutschland
Fluoreszenz- u.	Vilber Lourmat, Deutschland
Chemilumineszenzsystem Fusion Fx7	
Heizblock	Grant, Deutschland
Laser Scanning-Mikroskop: LSM 510	Zeiss, Deutschland
Meta	
Magnetrührer: IKA-Combimag	Janke & Kunkel, IKA-Werk, Deutschland
Mikrotiterplattenlesegerät infinite M200	Tecan, Österreich
Pipettierhilfe Pipetboy accu	Integra Biosciences, Schweiz
Rotator	Snijders, Niederlande
Schüttelinkubator	Biometra, Deutschland
Schüttler IKA-Schüttler MTS 2	Janke & Kunkel, IKA-Werk, Deutschland
Sterilwerkbank	Heraeus, Deutschland
Stromversorgungsgerät: Power pac 300	Bio-Rad, Deutschland
Ussing-Kammer	Institut für Klinische Physiologie, Charité-CBF, Deutschland
Verstärkersystem, phasensensitiv:	
1286 Electrochemical Interface	Fa. Schlumberger, Deutschland
402 Frequency Response Analyzer	Beran Instruments, Deutschland
Vortex-Gerät	Pharmacia Biotech, Deutschland
Wasserbad	Störk-Tronic, Deutschland

Widerstandsmessgerät	Institut für Klinische Physiologie, Charité-CBF, Deutschland
Wippe WT12	Biometra, Deutschland
Zentrifugen:	
Beckman AvantiJ25	Beckman, USA
Biofuge 15R	Heraeus, Deutschland
Tischzentrifuge Sprout	Heathrow Scientific, USA

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	Menzel, Braunschweig
Einmal-Skalpelle	Feather Safety Razor Co., Ltd., Japan
Einmal-Spritzen (1 ml)	BD, Deutschland
Eppendorf-Gefäße	Eppendorf, Deutschland
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	BD, Deutschland
Gel Blotting-Filter	Whatman, Deutschland
Millicell PCF Zellkultureinsätze, 12 mm, Poren 3,0 µm	Millipore, Deutschland
Objektträger	Marienfeld, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Deutschland
Stabpipetten	BD, Deutschland
Transfer Membran: PVDF	Perkin Elmer, USA
6-, 12-, 24-, 96-Well-Platten	Thermo Scientific, Deutschland
Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup>	BD, Deutschland
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	BD, Deutschland
Zellkulturschalen, Ø 6 cm	Nunc, Deutschland

### 2.1.3 Substanzen und Chemikalien

Aceton	J. T. Baker, Niederlande
Acrylamid-Bis (37,5:1 - 30 % (w/v))	Merck, Deutschland
Albumin Standard	Pierce Perbio Science, Deutschland
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Bio-Beads SM-2 Adsorbents	Bio-Rad, Deutschland

---

Bovine Serum Albumin (BSA)	Applichem, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck, Deutschland
Complete Mini EDTA-frei	Roche, Deutschland
DAPI	Roche, Deutschland
3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB)	Roth, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Roth, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Dulbecco's modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM	Sigma-Aldrich, Deutschland
EDTA	Merck, Deutschland
EGTA	Roth, Deutschland
Ethanol	Herbeta, Deutschland
Fluoreszein	Sigma-Aldrich, Deutschland
Flüssigstickstoff	Linde, Deutschland
Fötale Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich, Deutschland
D(+)-Glukose	Roth, Deutschland
L-Glutamin	Fluka, Deutschland
Glutaraldehyd (25 %)	Serva, Deutschland
β-Hydroxybutyrat	Sigma-Aldrich, Deutschland
Histamindihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Deutschland
Imipenem	MSD Sharp & Dohme GmbH, Deutschland
Isopropanol	J.T. Baker, Niederlande
Kaliumchlorid	Roth, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Deutschland
D(+)-Mannose	Fluka, Deutschland
Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Meerrettich-Peroxidase (HRP), biotinyliert	Invitrogen, Deutschland
Methanol	Merck, Deutschland
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Deutschland

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck, Deutschland
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich, Deutschland
Paraformaldehyd (16 %)	Electron Microscopy Sciences, USA
PBS-Tabletten	Gibco / Invitrogen, Deutschland
Penicillin / Streptomycin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Phosphatgepufferte saline Lösung (PBS)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Piperacillin	LKT Laboratories, Inc., USA
Protein Molecular Weight Marker	Fermentas, Deutschland
ProTaq MountFlour	BIOCYC, Deutschland
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Deutschland
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura, Niederlande
Tris-HCl Puffer (0,5 M, pH 6,8)	Biorad, München
Tris HCl Puffer (1 M, pH 7,5)	Biorad, München
Tris HCl Puffer (1M, pH 8,8)	Serva, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deutschland
Trypsin-EDTA (1x)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Tween-20	National Diagnostics, USA
Wasserstoffperoxid (30 %)	Roth, Deutschland

#### 2.1.4 Puffer und Lösungen

BSA-Blockierungslösung (in PBS):

BSA	5 %
NaN <sub>3</sub>	0,02 %

Elektrophorese-Puffer:

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

## Gesamtlysepuffer

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

## HRP-Färbelösung (in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,4):

DAB	0,1 %
CoCl <sub>2</sub>	0,007 %
Imidazol	0,025 %
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,003 %

## 5x Laemmli-Proben-Puffer:

Tris HCl pH 6,8	300 mM
DTT	500 mM
SDS	10 %
Bromphenolblau	0,001 %
Glycerol	50 %

## PBS-T (1 l):

PBS	2 Tbl.
Tween	0,1 %

## Ringerlösung (#111):

NaCl	113,6 mM
KCl	5,4 mM
NaHCO <sub>3</sub>	21 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,2 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,2 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,4 mM

## Sammelgel:

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

## Substrate (Endkonzentration):

D(+)-Glukose	10 mM
D(+)-Mannose	10 mM
L-Glutamin	2,4 mM
$\beta$ -Hydroxybutyrat	0,5 mM
Piperacillin	50 mg/l
Imipenem	4 mg/l

## 1x TBS-T:

Tris	20 mM
NaCl	500 mM
Tween	0,1 %

## Transferpuffer:

Tris HCl	25 mM
Glycin	190 mM
Methanol	10 %

## Trenngel:

Acrylamid-Bis	8,5 % oder 12,5 %
Tris-HCl pH 8,8	0,35 mM
SDS	0,1 %
APS	0,1 %
TEMED	0,05 %

## 2.1.5 Gebrauchsfertige Kits und Lösungen:

BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Deutschland
LumiLight <sup>PLUS</sup> Western Blotting Kit	Roche, Deutschland
Quanta Blu <sup>TM</sup> Fluorogenic Peroxidase Substrate	Thermo Scientific, Deutschland

## 2.1.6 Antikörper

### 2.1.6.1 Western Blot

Tab. 2.1: Verwendete Antikörper für Western Blots

Antikörper	Spezies	Herkunft
Anti- $\beta$ -Aktin	Maus	Invitrogen, Deutschland
Anti-Claudin-1	Kaninchen	Invitrogen, Deutschland
Anti-Claudin-2	Kaninchen	Invitrogen, Deutschland
Anti-Claudin-3	Kaninchen	Invitrogen, Deutschland
Anti-Claudin-4	Maus	Invitrogen, Deutschland
Anti-Claudin-5	Maus	Invitrogen, Deutschland
Anti-Claudin-7	Kaninchen	Invitrogen, Deutschland
Anti-Claudin-8	Kaninchen	Invitrogen, Deutschland
Anti-Claudin-10	Kaninchen	Invitrogen, Deutschland
Anti-Occludin	Kaninchen	Invitrogen, Deutschland
Anti-Tricellulin	Kaninchen	Invitrogen, Deutschland
Anti-Maus IgG-Peroxidase	Ziege	Roche, Deutschland
Anti-Kaninchen IgG-Peroxidase	Ziege	Roche, Deutschland Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., UK



### 2.1.6.2 Immunfluoreszenzfärbung

Tab. 2.2: Verwendete Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen

Antikörper	Spezies	Herkunft
Anti-Caveolin-1	Kaninchen	Abcam, UK
Anti-Clathrin	Maus	Santa Cruz, USA
Anti-EEA1	Kaninchen	Cell signaling, USA
Anti-HRP	Maus	Thermo Scientific, USA
Anti-HRP	Ziege	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., UK
Anti-LAMP1	Maus	R&D, USA
Anti-Rab5	Kaninchen	Cell Signaling, USA
Anti-Rab7	Kaninchen	Cell signaling, USA
Anti-SNX5	Kaninchen	Santa Cruz, USA
Alexa Fluor 488 anti-Kaninchen	Ziege	Invitrogen, Deutschland
Alexa Fluor 488 anti-Maus	Ziege	Invitrogen, Deutschland
Alexa Fluor 594 anti-Ziege	Kaninchen	Invitrogen, Deutschland
Cy3 anti-HRP	Ziege	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., UK
DyLight488 anti-HRP	Ziege	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., UK
DyLight594 Streptavidin	Streptomyces avidinii	Vectorlabs, USA
FITC anti-HRP	Ratte	ARP, USA
FITC anti-HRP	Ziege	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., UK

## 2.1.7 Inhibitoren

Tab. 2.3: Verwendete Inhibitoren

Inhibitor	Wirkung	Herkunft
AS1517499	inhibiert STAT6-Phosphorylierung	Axon Medchem BV, NL
Chlorpromazin	verhindert Bildung von CCPs	Sigma-Aldrich, Deutschland
EHT 1864	blockiert Rac1	Santa Cruz, USA
Farnesylthiosalicylsäure (FTS)	inhibiert Ras-vermittelte Signalübertragung	Santa Cruz, USA
Filipin	bindet Cholesterin in der Plasmamembran	Sigma-Aldrich, Deutschland
LY294002	hemmt die PI3-Kinase	Sigma-Aldrich, Deutschland
Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD)	entfernt Cholesterin aus der Plasmamembran	Sigma-Aldrich, Deutschland
Myristyltrimethylammoniumbromid (MitMAB)	inhibiert Dynamin 2	Calbiochem, Deutschland
Nystatin	bindet Cholesterin in der Plasmamembran	Sigma-Aldrich, Deutschland
Pitstop 2	hemmt Clathrin	Abcam, UK
Suberoylanilid-Hydroxamsäure (SAHA)	inhibiert STAT6-Phosphorylierung	Cayman Chemical, USA
Wortmannin	hemmt die PI3-Kinase	Sigma-Aldrich, Deutschland

## 2.1.8 Zytokine

IFN $\gamma$	Peprtech, USA
IL-1 $\beta$	Peprtech, USA
IL-4	Peprtech, USA
IL-6	ImmunoTools, Deutschland
TNF $\alpha$	Peprtech, USA

### 2.1.9 Zelllinie

Die T84-Zelllinie ist eine funktionell gut differenzierte Kolonkarzinom-Zelllinie. Sie wächst als Monolayer aus polarisierten Zellen, die Transport- und Barriere-eigenschaften aufweisen [186].

### 2.1.10 Software

Auswertung von Mikrotiterplatten:

Tecan i-control Version 1.5.14.                      Tecan, Österreich

Datenauswertung:

Excel 2000, 2010                                      Microsoft Corporation, USA

Densitometrische Auswertung:

AIDA Advanced Image Data Analyzer              Raytest GmbH, Deutschland  
Version 3.21.001

Erstellung von Grafiken:

XACT Version 6.00                                    SciLab GmbH, Deutschland

Detektion von Western Blots:

Fusion Version 15.08                                Vilber Lourmat, Deutschland

Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie:

LSM510 Version 3.2 SP2                            Zeiss, Deutschland

LSM Image Browser Version 4.2.0.121            Zeiss, Deutschland

Powerpoint 2010                                    Microsoft Corporation, USA

Textverarbeitung:

Word 2000, 2010                                    Microsoft Corporation, USA

## 2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Zellkultivierung

Die humane Kolonkarzinom-Zelllinie T84 wurde in Dulbecco's modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM Medium (DMEM F-12 HAM) unter Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (FKS) und Antibiotika (100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin) in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm<sup>2</sup> unter

physiologischen Bedingungen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt in Begasungs-Brutschränken kultiviert.

Das Medium wurde drei Mal wöchentlich erneuert. Alle 14 Tage wurden konfluent bewachsene Flaschen mit PBS-Puffer ohne Kalzium und Magnesium gewaschen, vortrypsiniert mit 3 ml 0,05 % Trypsin-EDTA und anschließend die Zellen mit Hilfe von 0,05 % Trypsin-EDTA bei 37 °C enzymatisch abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 10 ml DMEM F-12 HAM aufgenommen und mit Hilfe der Pipette sorgfältig vereinzelt. Für die Weiterkultivierung wurden 1,5 ml Zellsuspension in eine neue Kulturflasche überführt und 8,5 ml Medium zugegeben.

### 2.2.1.1 Zellkultivierung auf Filtern

Zwei Wochen alte, in kleinen Flaschen gewachsene T84 Zellen wurden trypsiniert (siehe 2.2.1) und je 500 µl der Zellsuspension pro PCF-Filter (3 µm Porengröße und 0,6 cm<sup>2</sup> effektive Fläche) ausgesät. Die Kultivierung erfolgte unter den oben genannten Bedingungen in 6 cm<sup>2</sup> Kulturschalen, wobei jeder Filter mit 500 µl und die Zellkulturschalen mit 10 ml Medium gefüllt wurden. Die Konfluenz wurde nach ca. 10 Tagen erreicht und durch Messung des transepithelialen Widerstandes ermittelt. Für alle weiteren Experimente wurden die konfluenten Zellen 24 h mit verschiedenen Zytokinen und Inhibitoren (Tab. 2.4) behandelt oder blieben als Kontrollen unbehandelt.

**Tab. 2.4: Verwendete Zytokine und Inhibitoren**

Substanz	Konzentration	Zugabeseite	Inkubationszeit
Zytokine:			
IL-1 $\beta$	10 ng/ml	basal	24 h
IL-4	10 ng/ml	basal	24 h
IL-6	100 ng/ml	basal	24 h
TNF $\alpha$ + IFN $\gamma$	10 <sup>3</sup> U/ml + 10 U/ml	basal	24 h
Inhibitoren:			
AS1517499	1 µg/ml	beidseitig	1 h vor Zytokinzugabe
LY294002	10 µM	beidseitig	1 h vor Zytokinzugabe
SAHA	5 µM	beidseitig	2 h vor Zytokinzugabe
Wortmannin	500 nm	beidseitig	1 h vor Zytokinzugabe

## 2.3 Elektrophysiologische Methoden

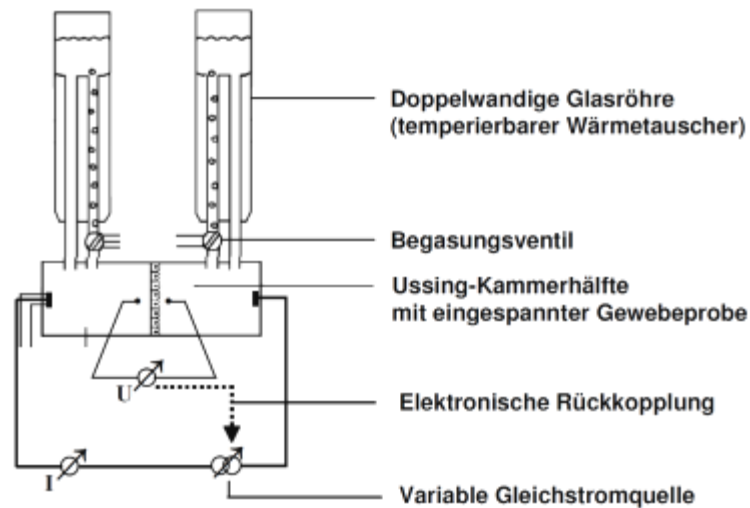
### 2.3.1 Manuelle Messung des transepithelialen Widerstands

Der transepitheliale Widerstand ( $R^t$ ) eines Zellmonolayers gibt Auskunft über die Barriereintegrität von Epithelien. Außerdem gibt er Aufschluss darüber, inwieweit sich die Barriereigenschaften eines Monolayers im Zusammenhang mit der Zugabe von verschiedenen Agenzien verändert. Mit Hilfe von zwei fixierten Elektroden, die mit einem Widerstandsmessgerät verbunden sind (Eigenkonstruktion von D. Sorgenfrei, Institut für Klinische Physiologie), konnte der transepitheliale Widerstand der auf PCF-Filtern kultivierten Zellen erfasst werden [187]. Dabei wurde eine Elektrode apikal direkt über dem Zellmonolayer und die andere im basolateralen Zellkulturmedium platziert, während die Temperatur des Mediums durch eine Heizplatte konstant auf 37 °C gehalten wurde. Der  $R^t$  ergab sich entsprechend dem Ohm'schen Gesetz aus der Spannungsänderung, die durch einen Rechteckstrom ( $\pm 10 \mu\text{A}$ , 21 Hz) hervorgerufen wurde. Die Messwerte wurden um den Eigenwiderstand des leeren Zellfilters korrigiert und von der exponierten Filterfläche ( $0,6 \text{ cm}^2$ ) auf  $1 \text{ cm}^2$  umgerechnet ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ). Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die Messdaten auf den Ausgangswiderstand, der stets zu Beginn einer Stimulation gemessen wurde, normiert und prozentual angegeben.

### 2.3.2 Ussing-Kammer

Die Ussing-Technik ermöglicht die Messung elektrophysiologischer Barriere- und Transportfunktionen am lebenden Epithel.

Die Ussing-Kammer besteht aus zwei gleichartigen Kammerhälften, zwischen die ein Epithel oder Zellkulturfilter abgedichtet eingespannt werden kann, so dass ein Molekültransport ausschließlich durch das eingespannte Epithel stattfindet (Abb. 2.1). Die Kammerhälften werden mit dem gleichen Volumen modifizierter Ringerlösung (#111) gefüllt, die mittels Wärmetauschern auf 37 °C konstant temperiert bleibt und ständig mit einer Gasmischung von 95 %  $\text{O}_2$  / 5 %  $\text{CO}_2$  begast wird. Diese Begasung gewährleistet auch die Zirkulation der Ringerlösung innerhalb der Ussing-Kammer.



**Abb. 2.1: Ussing-Versuchsstand**

Das Epithel wird zwischen die beiden Kammerhälften eingespannt, während die Zirkulation der auf 37 °C temperierten Badlösung in den Wärmetauschern für eine konstante Umgebung sorgt. Die Registrierung der Potentialdifferenz und des Kurzschlussstroms erfolgt mit Hilfe zweier Elektrodenpaare. Modifiziert nach [188].

Die elektrische Messanordnung entspricht der 4-Elektroden-Messanordnung nach Ussing und Zerahn [189]. Als leitende Verbindung zwischen den Elektroden und dem Inneren der Messkammer dienen Agarbrücken, deren Enden in gesättigte KCl-Lösung tauchen. Das andere Ende des einen Agarbrückenpaares, das mit den Spannungselektroden verbunden ist, befindet sich in der Nähe des eingespannten Epithels und dient zur Messung der Potentialdifferenz über dem Epithel mittels eines Voltmeters. Das zweite Agarbrückenpaar („Stromelektroden“) hingegen befindet sich weiter abgehend vom Epithel und die damit verbundenen Elektroden sind an eine variable Gleichstromquelle und ein Amperemeter angeschlossen.

Durch das Anlegen eines Kurzschlussstroms ( $I_{sc}$ ), der die epitheliale Spannung auf 0 mV kurzschließt, herrscht kein treibender elektrischer Gradient mehr. Dieser applizierte Kurzschlussstrom entspricht der Netto-Summe aller aktiven elektrogenen Ionentransporte des eingespannten Epithels. Somit ist es möglich, Aussagen über die Aktivität von Ionenkanälen oder elektrogenen Transportern zu treffen, da der  $I_{sc}$  sowie die transepitheliale Spannung und der  $R^t$  im Verlauf eines Experimentes in kurzen Abständen von einer computergesteuerten Spannungsklemmeinrichtung erfasst werden.

Da die Ringerlösung in der Kammer (Badlösung) selbst über einen Widerstand verfügt und den Spannungsabfall über dem Epithel beeinflusst, muss eine Korrektur der Messwerte vollzogen werden. Hierfür bedarf es einer Messung des Badwiderstandes und des Asymmetriepotentials der Spannungselektroden. Eine Registrierung der Leerwerte erfolgt durch vorherige Messung an der nur mit Ringerlösung gefüllten Messkammer und wird anschließend jeweils von den späteren Messwerten abgezogen.

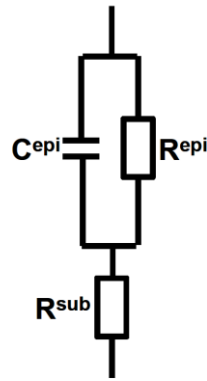
### 2.3.3 Zwei-Wege-Impedanzmessungen an T84-Monolayern

#### 2.3.3.1 Prinzip der Impedanzspektroskopie

Die Ein-Wege-Impedanzspektroskopie dient der separaten Messung des epithelialen ( $R^{\text{epi}}$ ) und des subepithelialen Widerstands ( $R^{\text{sub}}$ ). Im Gewebe steht  $R^{\text{epi}}$  für den Widerstand des eigentlichen Epithels, also der TJ-bildenden Zellschicht und  $R^{\text{sub}}$  für den des subepithelialen Gewebes, also der Kollagenfasern, Bindegewebs- und Muskelschichten. Im Zellmodell entspricht  $R^{\text{epi}}$  dem Widerstand des epithelialen Zellmonolayers und  $R^{\text{sub}}$  dem Widerstand des Zellkulturfilters. Die Summe von  $R^{\text{epi}}$  und  $R^{\text{sub}}$  ergibt somit den transepithelialen Gesamtwiderstand  $R^{\text{t}}$ :

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

In einem stark vereinfachten elektrischen Ersatzschaltkreis wird das Epithel beziehungsweise der Zellmonolayer durch die Parallelschaltung des Ohm'schen Widerstands  $R^{\text{epi}}$  mit der epithelialen Kapazität  $C^{\text{epi}}$  dargestellt.  $C^{\text{epi}}$  entspricht dabei der Gesamtkapazität der apikalen und basolateralen Zellmembran. Der Ohm'sche Widerstand  $R^{\text{sub}}$ , also das subepitheliale Gewebe bzw. der Zellkulturfilter, ist zu dieser Parallelschaltung in Reihe geschaltet (Abb. 2.2) [190].



**Abb. 2.2: Ersatzschaltkreis des epithelialen Modells in der Ein-Wege-Impedanzspektroskopie**

$C^{\text{epi}}$ : epitheliale Kapazität,  $R^{\text{epi}}$ : epithelialer Widerstand,  $R^{\text{sub}}$ : subepithelialer Widerstand.

Modifiziert nach [190].

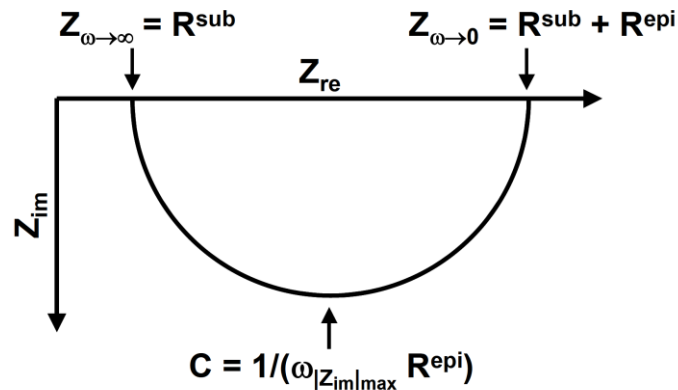
Beim Anlegen von Wechselströmen in ansteigenden Frequenzen ergeben sich zwei Extremwerte, durch die sich  $R^{\text{epi}}$  und  $R^{\text{sub}}$  bestimmen lassen. Bei einer Frequenz von nahe 0 Hz ist der kapazitive Blindwiderstand unendlich groß, so dass kein Strom durch den Kondensator fließt, sondern nur durch  $R^{\text{epi}}$  und  $R^{\text{sub}}$ . Somit entspricht der bei  $\sim 0$  Hz gemessene Widerstand dem Wert von  $R^{\text{t}}$ . Bei steigender Frequenz nimmt der kapazitive Blindwiderstand ab und bei sehr hohen Frequenzen ist er nahezu null, so dass der gesamte Strom in der Parallelschaltung durch den Kondensator fließt und der gemessene Widerstand nur dem in Serie geschalteten  $R^{\text{sub}}$  entspricht.

Die graphische Darstellung der Impedanzmesswerte erfolgt in einem Nyquist-Diagramm mit Hilfe von komplexen Zahlen (Abb. 2.3). Auf der Ordinate werden die Imaginärteile der komplexen Impedanzen ( $Z_{\text{im}}$ ), die den kapazitiven Eigenschaften des Epithels entsprechen, aufgetragen und auf der Abszisse die Realteile der komplexen Impedanzen ( $Z_{\text{re}}$ ), die die Ohm'schen Widerstandsanteile darstellen. Die bei der Messung der Impedanz bei verschiedenen Frequenzen erhaltenen Werte ergeben in dieser Darstellung ein Kreissegment, durch dessen Schnittpunkte mit der Abszisse zum einen  $R^{\text{t}}$  (Schnittpunkt bei niedriger Frequenz) und zum anderen  $R^{\text{sub}}$  (Schnittpunkt bei hoher Frequenz) abgelesen werden können.  $R^{\text{epi}}$  entspricht dann der Differenz von  $R^{\text{t}}$  und  $R^{\text{sub}}$ . Die epitheliale Kapazität  $C^{\text{epi}}$ , die die Eigenschaften der Zellmembranen widerspiegelt, kann über  $R^{\text{epi}}$  und die Kreisfrequenz  $\omega_{|Z_{\text{im}}|_{\text{max}}}$  berechnet werden, also die Kreisfrequenz, bei der der Betrag des Imaginärteils der Impedanz sein Maximum hat:



$$C^{\text{epi}} = \frac{1}{\omega_{|Z_{\text{im}}|_{\text{max}}} \cdot R^{\text{epi}}}$$

(Kreisfrequenz  $\omega = 2 \cdot \pi \cdot \text{Frequenz}$ )



**Abb. 2.3: Nyquist-Diagramm einer Modellmessung**

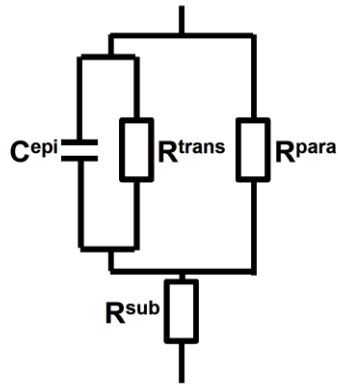
Kreissegment der gemessenen Impedanzwerte bei verschiedenen Wechselstrom-Frequenzen. Der Schnittpunkt mit der Abszissenachse bei hohen Frequenzen ( $\omega \rightarrow \infty$ ) entspricht dem subepithelialen Widerstand  $R^{\text{sub}}$  und bei sehr niedrigen Frequenzen ( $\omega \rightarrow 0$ ) dem transepithelialen Widerstand  $R^{\text{t}} = R^{\text{sub}} + R^{\text{epi}}$ . Die Kapazität  $C$  kann anhand der Frequenz des Kreisbogenminimums berechnet werden. Modifiziert nach [190].

Mit Hilfe der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie lässt sich  $R^{\text{epi}}$  weiter in den transzellulären ( $R^{\text{trans}}$ ) und den parazellulären Widerstand ( $R^{\text{para}}$ ) aufteilen.

In einem elektrischen Ersatzschaltkreis lässt sich der transzelluläre Weg als epitheliale Kapazität mit dem parallel geschalteten Ohm'schen Widerstand  $R^{\text{trans}}$  darstellen.  $R^{\text{para}}$  ist dazu parallel geschaltet.  $R^{\text{sub}}$  ist wiederum in Serie geschaltet (Abb. 2.4) [190].

Da  $R^{\text{trans}}$  und  $R^{\text{para}}$  parallel geschaltet sind, erfolgt die Berechnung von  $R^{\text{epi}}$  durch die Addition der Kehrwerte von  $R^{\text{trans}}$  und  $R^{\text{para}}$ :

$$\frac{1}{R^{\text{epi}}} = \frac{1}{R^{\text{trans}}} + \frac{1}{R^{\text{para}}}$$



**Abb. 2.4: Ersatzschaltkreis des epithelialen Modells in der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie**

$C^{\text{epi}}$ : epitheliale Kapazität,  $R^{\text{trans}}$ : transzellulärer Widerstand,  $R^{\text{para}}$ : parazellulärer Widerstand. Modifiziert nach [190].

Zusätzlich zur herkömmlichen Impedanzmessung werden bei der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie Fluxmessungen des parazellulären Markers Fluoreszein durchgeführt. Mittels Kalziumentzug durch EGTA wird der parazelluläre Weg, der durch die TJs begrenzt wird, geöffnet [191]. Durch die Fluoreszein-Fluxverhältnisse vor und nach der Zugabe von EGTA kann mit Hilfe der Impedanzmessungen  $R^{\text{para}}$  von  $R^{\text{trans}}$  unterschieden werden (siehe 2.3.3.2).

### 2.3.3.2 Durchführung der Impedanzmessungen an T84-Monolayern

Für die Messung wurden die unbehandelten beziehungsweise mit IL-4 vorinkubierten Zellkulturfilter, die mit den T84-Monolayern konfluent bewachsen waren, in Ussing-Kammern eingespannt. Die Kammerhälften wurden mit je 10 ml modifizierter Ringerlösung (#111) + 11,1 mM Glucose befüllt. Nach einer 15-minütigen Äquilibrierungsphase wurde zunächst basolateral eine 300  $\mu\text{l}$ -Probe als Leerwert entnommen und gegen frische Ringerlösung ersetzt. Apikal wurde Fluoreszein (100  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) zugegeben ( $t_{-1}$ ). Zum Zeitpunkt  $t_0$  wurde die erste Impedanzmessung durchgeführt. Dazu wurde sinusförmiger Wechselstrom (35  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) mit 48 verschiedenen Frequenzen von 1,3 Hz bis 65 kHz angelegt. Die durch den Strom verursachten Spannungsänderungen wurden mit einem phasensensitiven Verstärkersystem gemessen und die resultierenden Impedanzwerte aufgezeichnet. Zwischen den Impedanzmessungen wurde das transepitheliale Potential auf 0 mV geklemmt. In 10-minütigem Abstand wurden weitere Impedanz-

messungen durchgeführt. Zum Zeitpunkt  $t_5$  wurde basolateral eine 300  $\mu\text{l}$ -Probe entnommen und gegen frische Ringerlösung ersetzt: Diese Probenentnahme erfolgte in 10-minütigem Abstand zwischen den Impedanzmessungen, um diese nicht zu stören. Zum Zeitpunkt  $t_{25}$  wurde beidseitig EGTA (1 mM Endkonzentration) zugegeben, was einen Widerstandsabfall zur Folge hatte. Die Impedanzmessungen sowie die basolaterale Probenentnahmen erfolgten weiter bis zum Zeitpunkt  $t_{60}$  beziehungsweise  $t_{65}$ .

Die Fluoreszein-Konzentration in den Proben wurde, zusammen mit einer Standardreihe, fluorimetrisch am Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 525 nm ermittelt und zur Berechnung der Fluxe beziehungsweise der Permeabilität verwendet. Mithilfe der Standardreihe wurde eine Eichgerade erstellt.

Die Probe, die zum Zeitpunkt  $t_0$  entnommen wurde, konnte anhand der Emissionswerte mit der Steigung und dem Achsenabschnitt der jeweiligen Eichgerade berechnet werden. Um die Konzentration in nM angeben zu können, wurde dieser Wert mit 1000 multipliziert.

$$\text{Probenkonz } t_0 \text{ (nM)} = (\text{Emissionswert} * \text{Steigung} + \text{Achsenabschnitt}) * 1000$$

Bei den Proben, die zu den Zeitpunkten  $t_5$  bis  $t_{65}$  entnommen wurden, wurde zusätzlich der Lösungsaustausch bei der Probenabnahme des vorhergehenden Zeitpunktes berücksichtigt.

$$\text{Probenkonz } t_5 \text{ (nM)} = \frac{\text{Emissionswert} * \text{Steigung} + \text{Achsenabschnitt}}{1 - \text{Probenvolumen(ml)}/\text{Schalenvolumen(ml)}}$$

Die Konzentration des Leerwerts ( $t_0$ ) wurde von den Konzentrationen der Proben, die zu einem späteren Zeitpunkt genommen wurden, abgezogen. Aus den so berechneten Probenkonzentrationen konnte der Fluoreszein-Flux der jeweiligen Fluxperiode ermittelt werden (hier am Beispiel der Fluxperiode  $t_{15} - t_{25}$ ).

$$\text{Flux (nmol/h} * \text{cm}^2) = \frac{(\text{Probenkonz } t_{25} \text{ (nM)} - \text{Probenkonz } t_{15} \text{ (nM)}) * \text{Schalenvolumen(l)}}{\text{Fluxperiode (h)} * \text{Filterfläche (cm}^2)}$$

Mithilfe des Umrechnungsfaktors 3,6, der sich aus der Umrechnung von Stunde (h) auf Sekunde (s) und Liter (l) auf Kubikzentimeter (cm<sup>3</sup>) ergibt, und der im Experiment eingesetzten Fluoreszein-Konzentration kann der Fluoreszein-Flux in die Fluoreszein-Permeabilität (P) umgerechnet werden.

$$P (10^{-6} \text{ cm/s}) = \frac{\text{Flux (nmol/h/cm}^2\text{)}}{\text{Fluoreszein-Konz (mmol/l)} \cdot 3,6}$$

Um den para- und den transzellulären Widerstand zu berechnen, wurde zunächst das Verhältnis des Fluoreszeinfluxes vor der EGTA-Zugabe zum Fluoreszeinflux nach der EGTA-Zugabe berechnet.

$$\text{Verhältnis Fluoreszeinflux} = \frac{\text{Fluoreszeinflux vor EGTA}}{\text{Fluoreszeinflux nach EGTA}}$$

Mit Hilfe von R<sup>epi</sup> vor und nach der EGTA-Zugabe wurde dann R<sup>para</sup> berechnet.

$$R^{\text{para}} = \frac{R^{\text{epi}} \text{ vor EGTA} \cdot R^{\text{epi}} \text{ nach EGTA} \cdot (1 - \text{Verhältnis Fluoreszeinflux})}{\text{Verhältnis Fluoreszeinflux} \cdot (R^{\text{epi}} \text{ vor EGTA} - R^{\text{epi}} \text{ nach EGTA})}$$

## 2.4 Biochemische Methoden

### 2.4.1 HRP-Permeabilitätsmessung

#### 2.4.1.1 Zellkultur: T84

Nach Messung des transepithelialen Widerstands wurde das Medium aus den Kontrollfiltern und den behandelten Filtern abgesaugt und jeder Filter in ein Well einer 6-Wellplatte platziert. Der Filter wurde mit 400 µl, das Well mit 3 ml modifizierter Ringerlösung (#111) + 11,1 mM Glucose befüllt. Nach einer 30-minütigen Äquilibrierungsphase wurde der transepitheliale Widerstand gemessen, bevor in einige Filter die Inhibitoren apikal beziehungsweise beidseitig (Tab. 2.5) zugegeben wurden. Nach 30 - 60 min Inkubationszeit (Tab. 2.5), wurde zunächst basolateral eine 150 µl-Probe als Leerwert entnommen und gegen frische Ringerlösung ersetzt. Apikal wurde HRP (18,2 µM Endkonzentration) zugegeben (t<sub>0</sub>). Nach 30 min (t<sub>30</sub>)

wurde basolateral erneut eine 150 µl-Probe entnommen und anschließend der transepitheliale Widerstand gemessen. Für die eingesetzten Inhibitoren wurden zusätzlich eigene Standardreihen erstellt, da sie die Emissionswerte von HRP verändern. Dafür wurde der Inhibitor zur Lösung, aus der die Standardreihe pipettiert wurde, zugegeben.

**Tab. 2.5: Konzentrationen, Zugabeseiten und Inkubationszeiten der verwendeten Inhibitoren**

Inhibitor	Konzentration	Zugabeseite	Inkubationszeit
Chlorpromazin	6 µg/ml	apikal	60 min
EHT 1864	5 µM	apikal	30 min
FTS	20 µM	apikal	30 min
Filipin	5 µg/ml	apikal	30 min
LY294002	10 µM	beidseitig	30 min
MβCD	10 mM	apikal	30 min
MiTMAB	20 µM	beidseitig	30 min
Nystatin	25 µg/ml	apikal	60 min
Pitstop 2	15 µM	apikal	30 min
Wortmannin	500 nM	beidseitig	30 min

Die Temperaturversuche wurden in Ussing-Kammern durchgeführt, da die Begasung im Kühlschrank bei 15 °C nicht möglich war. Hierzu wurden die Filter nach der Messung des transepithelialen Widerstands in die auf 37 °C erwärmten beziehungsweise auf 15 °C gekühlten Ussing-Kammern eingebaut und die beiden Kammerhälften mit je 5 ml modifizierter Ringerlösung (#111) + 11,1 mM Glucose befüllt. Nach einer 30-minütigen Äquibrierungsphase wurde zunächst basolateral eine 150 µl-Probe als Leerwert entnommen und gegen frische Ringerlösung ersetzt. Apikal wurde HRP (18,2 µM Endkonzentration) zugegeben. Nach weiteren 30 min wurde basolateral erneut eine 150 µl-Probe entnommen.

Auch die Histaminversuche wurden in Ussing-Kammern durchgeführt, da diese über einen längeren Zeitraum verliefen und eine ausreichende Begasung im Brutschrank nicht gewährleistet war. Wie bereits für die Temperaturversuche beschrieben, wurden die Filter eingebaut und nach einer Äquibrierungsphase HRP zugegeben. Nach 0, 30, 60 und 90 min ( $t_0$ ,  $t_{30}$ ,  $t_{60}$  und  $t_{90}$ ) wurde basolateral eine Probe entnommen und gegen frische Ringerlösung ersetzt. Zum Zeitpunkt  $t_{60}$  wurde

beidseitig Histamin (100  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) zugegeben. Um zu untersuchen, welche Wirkung Histamin auf die HRP-Permeabilität hat, wurden Mittelwerte der HRP-Permeabilitäten aus den Fluxperioden vor Histaminzugabe ( $t_0 - t_{60}$ ) gebildet und mit der Fluxperiode nach Histaminzugabe ( $t_{90}$ ) verglichen.

Die HRP-Konzentration in den Proben wurde, zusammen mit den jeweiligen Standardreihen mit bekannten Konzentrationen, mit Hilfe des Quanta Blu™ Fluorogenic Peroxidase Substrate Kits bestimmt. Dabei wurde die enzymatische Aktivität der HRP genutzt, indem die Oxidation eines in dem Kit enthaltenen Substrats unter Zuhilfenahme der Wellenlängen 325 nm (Exzitation) und 420 nm (Emission) im Mikrotiterplattenlesegerät gemessen wurde. Mithilfe der Standardreihe wurde eine Eichgerade erstellt.

Die Probe, die zum Zeitpunkt  $t_0$  entnommen wurde, konnte anhand der Emissionswerte mit der Steigung und dem Achsenabschnitt der jeweiligen Eichgerade berechnet werden.

$$\text{Probenkonz } t_0 \text{ (pM)} = \text{Emissionswert} * \text{Steigung} + \text{Achsenabschnitt}$$

Bei den Proben, die zu den Zeitpunkten  $t_{30}$  bis  $t_{90}$  entnommen wurden, wurde zusätzlich der Lösungsaustausch bei der Probenabnahme des vorhergehenden Zeitpunktes berücksichtigt.

$$\text{Probenkonz } t_{30} \text{ (pM)} = \frac{\text{Emissionswert} * \text{Steigung} + \text{Achsenabschnitt}}{1 - \text{Probenvolumen (ml)} / \text{Schalenvolumen (ml)}}$$

Die Konzentration des Leerwerts ( $t_0$ ) wurde von den Konzentrationen der Proben, die zu einem späteren Zeitpunkt genommen wurden, abgezogen. Aus den so berechneten Probenkonzentrationen konnte der HRP-Flux der jeweiligen Fluxperiode ermittelt werden (hier am Beispiel der Fluxperiode  $t_0 - t_{30}$ ).

$$\text{Flux (pmol/h} * \text{cm}^2) = \frac{(\text{Probenkonz } t_{30} \text{ (pM)} - \text{Probenkonz } t_0 \text{ (pM)}) * \text{Schalenvolumen (l)}}{\text{Fluxperiode (h)} * \text{Filterfläche (cm}^2)}$$

Mithilfe des Umrechnungsfaktors 3,6, der sich aus der Umrechnung von Stunde (h) auf Sekunde (s) und Liter (l) auf Kubikzentimeter (cm<sup>3</sup>) ergibt, und der im Experiment eingesetzten HRP-Konzentration kann der HRP-Flux in die HRP-Permeabilität (P) umgerechnet werden.

$$P (10^{-9} \text{ cm/s}) = \frac{\text{Flux (pmol/h/cm}^2\text{)}}{\text{HRP-Konz (mmol/l)} * 3,6}$$

#### **2.4.1.2 Biopsien**

Zum Vergleich der HRP-Permeabilität zwischen gesunden Kontrollen und Patienten mit Morbus Crohn wurden Biopsien des Sigma (Colon sigmoideum) verwendet. Das Alter der 4 männlichen und 8 weiblichen Probanden lag zwischen 28 und 63 Jahren (Tab. 2.6). Alle Probanden wurden aufgeklärt und haben eine Einverständniserklärung unterzeichnet. Bei den Morbus Crohn-Patienten variierte der Grad der Entzündung von nicht entzündet zu mittelgradig entzündet (Tab. 2.6). Bei den Kontrollen handelte es sich in der Regel um Patienten, die zum Zwecke eines Tumorausschlusses untersucht worden sind.

**Tab. 2.6: Patientendaten zu den untersuchten Biopsien**

Erklärung der Medikamente: Azathioprin: Immunsuppressiva, Prednisolon und Budenofalk: Glucocorticoide; Humira: Anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, Sulfasalazin: Entzündungshemmer

Datum	Gruppe	Alter	Geschlecht	Entzündung	Medikamente
26.03.2012	Kontrolle	56	w	-	-
19.04.2012	M. Crohn	44	m	-	Azathioprin
29.08.2013	Kontrolle	54	w	-	-
10.10.2013	Kontrolle	42	m	-	-
11.10.2013	Kontrolle	63	m	-	-
13.11.2013	M. Crohn	39	w	-	Prednisolon
13.12.2013	M. Crohn	28	w	-	Humira, Budenofalk
03.03.2014	M. Crohn	42	w	leicht bis mittelgradig	Sulfasalazin
06.03.2014	M. Crohn	62	w	-	-
04.04.2014	Kontrolle	34	w	-	-
10.04.2014	Kontrolle	62	m	-	-
11.04.2014	M. Crohn	34	w	leicht	Azathioprin, Budenosid

Das Gewebe wurde auf Plastikringe geklebt und in entsprechende Container für die Ussing-Kammer eingebaut. Diese Container enthalten mittig ein Loch auf Höhe des Gewebes, um eine definierte Flächenexposition (0,049 cm<sup>2</sup>) des Epithels für die R<sup>t</sup>- und Permeabilitäts-Messungen in der Ussing-Kammer zu garantieren. Anschließend wurde der Biopsie-Container zwischen die Kammerhälften der auf 37 °C erwärmten Ussing-Kammer eingespannt und die beiden Seiten der Ussing-Kammer mit je 5 ml modifizierter Ringerlösung (#111) + Substrate befüllt. Für die Temperaturversuche wurde jeweils ein Biopsie-Container in eine auf 15 °C gekühlte Ussing-Kammer eingebaut. Nach einer 30-minütigen Äquilibrationsphase wurden einige Biopsien für 30 min mit verschiedenen Inhibitoren inkubiert (Tab. 2.7). Anschließend wurde basolateral eine Probe als Leerwert entnommen und mit frischer Ringerlösung ersetzt. Apikal wurde HRP (18,2  $\mu$ M Endkonzentration) zugegeben ( $t_0$ ). Nach 30, 60 und 90 min ( $t_{30}$ ,  $t_{60}$  und  $t_{90}$ ) wurde basolateral erneut eine Probe entnommen und gegen frische Ringerlösung ersetzt. Aus den entnommenen Proben konnte, wie unter



2.4.1.1 beschrieben, die HRP-Permeabilität berechnet werden. Dabei wurde der Mittelwert aus den Permeabilitäten der einzelnen Fluxperioden gebildet, welcher für die Vergleiche zwischen Kontrollen und Morbus Crohn-Patienten benutzt wurde.

Es war leider nicht immer möglich, in jedem Versuch alle Inhibitoren einzusetzen, da bei einigen Patienten nicht ausreichend Biopsie-Material zur Verfügung stand.

**Tab. 2.7: Konzentrationen und Zugabeseiten der verwendeten Inhibitoren**

Inhibitor	Konzentration	Zugabeseite
EHT 1864	5 $\mu$ M	apikal
Nystatin	25 $\mu$ g/ml	apikal
Pitstop 2	15 $\mu$ M	apikal

## 2.4.2 Proteinextraktion

Mit der Gesamtlysat-Extraktion werden sämtliche Proteine eines Zelllayers isoliert. Dafür wurden in 10 ml Gesamtlysepuffer 1 Tablette Complete Mini EDTA-frei (Proteaseinhibitor-Cocktail) gelöst. Die T84-Zellmonolayer, die entweder unbehandelt oder mit Zytokinen behandelt waren, wurden nach der Messung des transepithelialen Widerstands 2 x mit PBS<sup>+</sup> gewaschen. Anschließend wurde pro Filter ein Volumen von 150  $\mu$ l Gesamtlysepuffer auf die Zellen gegeben. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen vorsichtig von den Filtern gelöst und in vorgekühlte Eppendorfgefäße überführt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zelltrümmer in einer 15-minütigen Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 °C pelletiert, der Überstand für weitere Analysen abgenommen und bei -80 °C gelagert.

## 2.4.3 Proteinbestimmung

Für weitere quantitative Analysen wurden die Proteinkonzentrationen der Lysate ermittelt. Dies geschah mithilfe des Pierce BCA Protein Assay Kits der Firma Thermo Scientific [192]. Der Prozess basiert auf einer Reduktion von Cu<sup>2+</sup>-Ionen in Cu<sup>+</sup>-Ionen, wenn diese in Kontakt mit Proteinen treten (Biuret-Reaktion). Die Cu<sup>+</sup>-Ionen bilden einen stabilen violetten Farbkomplex mit der im Kit enthaltenen BCA-Reagenz (Bicinchoninsäure). Die Proteinmenge einer Probe kann somit anhand einer Eichgeraden mit Proteinen des Rinderserumalbumins (Albuminstandards: 0; 0,2; 0,8;

1,2 mg BSA/ml) photometrisch ermittelt werden. Hierzu wurden auf einer 96-Well-Platte pro Well je 10 µl der Eichlösung beziehungsweise der gegebenenfalls verdünnten Probe aufgetragen, mit je 190 µl der BCA-Gebrauchslösung versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Extinktion wurde anschließend bei 562 nm im Mikrotiterplattenlesegerät gemessen. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt.

## **2.4.4 Western Blot**

### **2.4.4.1 Proteinauftrennung durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese**

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) dient zur Auftrennung von Proteingemischen, welche im Gel fast ausschließlich nach der relativen Molekülmasse erfolgt, unabhängig von der Gesamtladung oder der Konformation. Dieses wird durch eine vorherige Denaturierung der Proteine mit dem Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS), das im Ladepuffer enthalten ist, ermöglicht. Bei der SDS-PAGE wandern die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld durch eine Gelmatrix aus Acryl- und Bisacrylamid von der Kathode (-) zur Anode (+). Acrylamid bildet in einer Kettenreaktion lange Polymere, die durch Bisacrylamid miteinander vernetzt werden. Diese Reaktion wird durch die Anwesenheit von freien Radikalen (Radikalbildner: APS) sowie durch einen Katalysator (TEMED) unterstützt.

Zur Auftrennung der Proteine wurde die diskontinuierliche Gelelektrophorese nach Laemmli [193] unter Verwendung des Mini-Protean 3 Elektrophorese-Systems bei einer Spannung von 100 V durchgeführt. Entsprechend des Molekulargewichts der zu untersuchenden Proteine enthielten die Trenngele 12,5 % (Claudine) oder 8,5 % (Occludin, Tricellulin) Acrylamid-Bis.

Vor der Gelbeladung wurden alle Proben mit 5x Laemmli-Proben-Puffer versetzt und 5 min lang bei 95 °C denaturiert. Für die elektrophoretische Auftrennung wurden 10 µg Protein in einem Volumen von 20 µl pro Tasche eingesetzt. Um das relative Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine bestimmen zu können, wurden stets 5 µl des Protein Molecular Weight Markers mitgeführt.

#### 2.4.4.2 Proteintransfer auf PVDF-Membranen

Mithilfe des Tank-Blot-Verfahrens wurden die denaturierten Proteine vom SDS-Polyacrylamidgel auf eine proteinbindende PVDF-Membran transferiert. Die PVDF-Membran wurde vor dem Blotvorgang mit absolutem Ethanol aktiviert und, ebenso wie Gel, Schwämme und Whatman-Filterpapiere, in methanolhaltigem Transferpuffer vorinkubiert. Methanol löst die Bindung zwischen SDS und den Proteinen, so dass diese an die PVDF-Membran binden können.

Der Aufbau in der Transferkammer sah folgendermaßen aus:

##### **Kathode (-)**

Schwarzes Panel

Schwamm

Whatman-Filter

SDS-Polyacrylamidgel

PVDF-Membran

Whatman-Filter

Schwamm

Klares Panel

##### **Anode (+)**

Der Proteintransfer vom SDS-Polyacrylamidgel erfolgte im Transferpuffer unter Stromzufuhr (1 h, 100 V) und ständiger Kühlung von der Kathode zur Anode und damit auf die PVDF-Membran.

#### 2.4.4.3 Immundetektion von Proteinen

Nach dem Proteintransfer wurden die an der Membran fixierten Proteine mithilfe spezifischer Antikörper sichtbar gemacht und quantifiziert. Zur Blockierung der freien Proteinbindungsstellen wurde die Membran mit einer 5 %igen BSA-Lösung für 2 h unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde ein spezifischer, gegen das gewünschte Protein gerichteter Primärantikörper auf die Membran gegeben und über Nacht auf dem Schüttler bei 4 °C inkubiert. Nicht-gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen in PBS-T und / oder TBS-T vollständig entfernt. Zur Detektion des Primärantikörpers wurde ein Maus- oder

Kaninchen-spezifischer Sekundärantikörper eingesetzt, der mit einer Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist. Nach 90-minütiger Inkubation unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur wurde der Sekundärantikörper durch dreimaliges Waschen in PBS-T und / oder TBS-T entfernt. Bei der anschließenden Inkubation mit LumiLight<sup>PLUS</sup> Reagenz erfolgte eine durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase katalysierte Luminol-Reaktion. Die in dieser Reaktion entstandene Chemolumineszenz wurde mithilfe des Fluoreszenz- und Chemilumineszenzsystem Fusion Fx7 detektiert. Die dabei aufgenommenen Lumineszenzbilder wurden mit dem Programm AIDA quantitativ ausgewertet.

## **2.5 Immunfluoreszenzoptische und mikroskopische Methoden**

Mit Hilfe der Fluoreszenzfärbung können (intra-)zelluläre Proteine durch spezifische Markierung mit Antikörpern am Mikroskop visualisiert und untersucht werden. Die verwendeten Antikörper sind entweder direkt mit einem Fluorophor gekoppelt oder werden in einem nachfolgenden Schritt über einen zweiten Antikörper fluoreszenzmarkiert. Bei Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen mit verschiedenen Anregungswellenlängen können gleichzeitig mehrere Proteine lokalisiert und verglichen werden. Zudem können Kollokalisierungen untersucht werden, die durch die Signalüberlagerung verschieden markierter Proteine erkennbar sind.

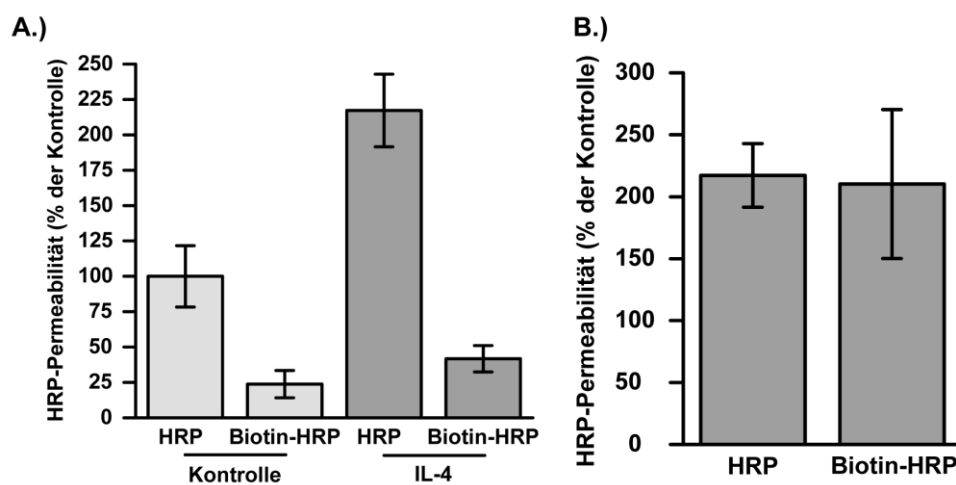
### **2.5.1 Immunfluoreszenzfärbung**

#### **2.5.1.1 Zellkultur: T84**

Für die Untersuchung der Kollokalisation von HRP mit verschiedenen intrazellulären Vesikeln wurden 6 verschiedene anti-HRP-Antikörper mit verschiedenen Fixier- und Färbeprotokollen ausgetestet. Keiner dieser Antikörper zeigte jedoch eine spezifische Färbung, so dass, basierend auf der Dreifachfärbung von Dederen & Joosten, eine Färbung etabliert wurde, bei der HRP histochemisch dargestellt werden konnte [194]. Allerdings konnten die Vesikel in den Bereichen, in denen HRP sichtbar war, bei dieser Methode nicht immunfluoreszent angefärbt werden, da durch die chemische Reaktion vermutlich Bindungsstellen zerstört wurden. Unter Ausnutzung der starken Bindung zwischen Biotin und Streptavidin konnte HRP mit

Hilfe von biotinylierter HRP und fluoreszenzmarkiertem Streptavidin dargestellt werden.

Um zu überprüfen, ob die HRP-Permeabilität der biotinylierten HRP die der nicht-biotinylierten HRP entspricht, wurden unbehandelte und mit IL-4 behandelte T84-Monolayer mit biotinylierter beziehungsweise nicht-biotinylierter HRP inkubiert und nach 30 min wurde die Permeabilität ermittelt. Abb. 2.5 A zeigt, dass die Permeabilität für die biotinylierte HRP geringer war als für die nicht-biotinylierte HRP. Die Steigerung der HRP-Permeabilität durch IL-4 gegenüber der jeweiligen Kontrolle ist jedoch gleich groß (Abb. 2.5 B).



**Abb. 2.5: Vergleich von nicht-biotinylierter HRP mit biotinylierter HRP**

Unbehandelte (Kontrolle) und mit IL-4 behandelte Zellen wurden 30 min mit nicht-biotinylierter HRP (HRP) oder biotinylierter HRP (Biotin-HRP) inkubiert. **A.)** Die HRP-Permeabilität nicht-biotinylierter HRP bei unbehandelten Kontrollen ( $n = 6$ ) wurde auf 100 % normiert und die HRP-Permeabilität nicht-biotinylierter und biotinylierter HRP bei Kontrollen ( $n = 6 / 8$ ) und mit IL-4 behandelten Zellen ( $n = 6 / 7$ ) dazu ins Verhältnis gesetzt. **B.)** Die HRP-Permeabilität nicht-biotinylierter HRP und biotinylierter HRP bei unbehandelten Kontrollen ( $n = 6 / 8$ ) wurde jeweils auf 100 % normiert und die HRP-Permeabilität der nicht-biotinylierten HRP bzw. der biotinylierten HRP der mit IL-4 behandelten Zellen ( $n = 6 / 7$ ) zur jeweiligen Kontrolle ins Verhältnis gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Um Unterschiede zwischen Zytokin-behandelten und unbehandelten Zellen zu untersuchen, wurden Zellen 24 h mit 10 ng/ml IL-4 inkubiert. Analog zu den HRP-Fluxmessungen wurde jeder Filter in ein Well einer 6-Wellplatte platziert. Der Filter wurde mit 100  $\mu$ l, das Well mit 1,5 ml modifizierter Ringerlösung (#111) + 11,1 mM Glucose befüllt. Nach einer 30-minütigen Äquilibrationsphase wurde apikal

biotinylierte HRP (18,2  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) zugegeben, außer zu den Negativkontrollen ohne HRP, die bei jeder Färbung mitgeführt wurden. Für die Färbungen zu den Zeitpunkten  $t_2$ ,  $t_5$ ,  $t_{10}$  und  $t_{20}$  wurde die doppelte Menge an biotinylierter HRP (36,4  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) eingesetzt. Da die biotinylierte HRP in PBS + 0,1 % BSA gelöst war, wurde im Well PBS + 0,1 % BSA zugegeben, so dass auf beiden Seiten die gleiche Konzentration herrschte. Zu den Zeitpunkten  $t_2$ ,  $t_5$ ,  $t_{10}$ ,  $t_{20}$  oder  $t_{30}$  wurden die Filter zweimal mit PBS<sup>+</sup> gewaschen und mit 2 % Paraformaldehyd in PBS<sup>+</sup> bei Raumtemperatur für 10 min fixiert. Anschließend wurden sie für mindestens 6 Tage in 0,3 % Paraformaldehyd in PBS<sup>+</sup> bei 4 °C gelagert. Dann wurden die Membranen der Filter ausgeschnitten und nach dreimaligem Waschen mit PBS<sup>+</sup> wurden die Zellen für 5 min mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert. Danach wurden die Zellen für 60 min bei 37 °C mit DyLight594 Streptavidin (1:100 in PBS<sup>+</sup> mit 1 % BSA) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS<sup>+</sup> wurden die Filter bei Raumtemperatur mit Blockierungslösung inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Bei der Blockierungslösung handelte es sich um 6 % Goat-Serum und 1 % BSA in PBS<sup>+</sup>. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei 4 °C mit je einem der 6 gegen verschiedene intrazelluläre Vesikel gerichteten Primärantikörper inkubiert (Zielvesikel und Verdünnungen: Tab. 2.8). Nach dreimaligem Waschen mit Blockierungslösung erfolgte die 60-minütige Inkubation im Dunkeln bei 37 °C mit den Sekundärantikörpern Alexa Fluor 488 anti-Maus IgG oder Alexa Fluor 488 anti-Kaninchen IgG (1:500 in Blockierungslösung). Durch anschließende Waschgänge mit Blockierungslösung wurden überschüssige Antikörper entfernt. Zur Zellkernfärbung wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen mit Blockierungslösung 10 min bei Raumtemperatur mit dem Nukleinsäurefarbstoff DAPI (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) inkubiert. Abschließend wurden die Membranen mit ddH<sub>2</sub>O und 98 %igem Ethanol gespült, nach kurzem Trocknen mit ProTaq MountFluor apikal überschichtet und durch Auflegen der Deckgläschen auf Objektträger eingedeckt. Die Objektträger wurden bis zur Mikroskopie bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

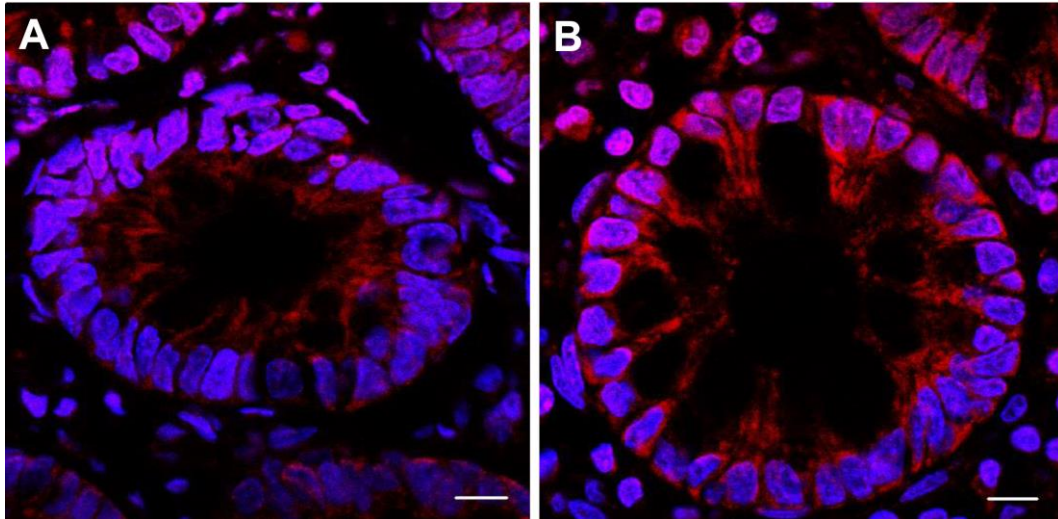
**Tab. 2.8: Zielvesikel und Verdünnungen der verwendeten Primärantikörper**

Primärantikörper	Zielvesikel	Verdünnung
Anti-Caveolin-1	Caveolae	1:150
Anti-Clathrin	Clathrin-umhüllte Vesikel	1:150
Anti-EEA1	Frühe Endosomen	1:500
Anti-LAMP1	Lysosomen	1:75
Anti-Rab7	Späte Endosomen	1:100
Anti-SNX5	Makropinosomen	1:100

### 2.5.1.2 Biopsien

Nach 20-minütiger Inkubation mit biotinylierter HRP in der Ussing-Kammer (siehe 2.4.1.2) wurden Biopsien für Kolokalisationsfärbungen aus den Kammern ausgebaut und für 60 min mit 2 % Paraformaldehyd in PBS<sup>+</sup> bei Raumtemperatur und anschließend für 6 Tage mit 0,3 % Paraformaldehyd in PBS<sup>+</sup> bei 4 °C fixiert. Die Fixierung wurde gestoppt durch die Inkubation mit 125 mM Glycin in PBS<sup>+</sup> und die Biopsien wurden durch eine ansteigende Sucrose-Reihe (10 % und 20 % Sucrose für je 60 min bei Raumtemperatur, anschließend 30 % Sucrose über Nacht bei 4 °C) entwässert. Um Cryoschnitte herzustellen, wurden die fixierten Biopsien zunächst in mit Stickstoff gekühltem 2-Methylbutan eingefroren und im Cryostat bei -25 °C in Tissue-Tek O.C.T. Compound eingebettet. Die eingebetteten Biopsien wurden in einer Stärke von 5 µm geschnitten und auf beschichtete Objektträger aufgebracht. Die Färbung erfolgte wie unter 2.5.1.1 für die Zellen beschrieben.

Allerdings konnten die Färbungen der Biopsien aufgrund des hohen Hintergrundes nicht ausgewertet werden (Abb. 2.6). Dieser Hintergrund ist am ehesten durch natürlicherweise in Darmzellen enthaltenes Biotin erklärbar, da auch die Negativkontrolle, die nicht mit biotinylierter HRP inkubiert wurde, entsprechende Signale zeigte (Abb. 2.6 B).



**Abb. 2.6: Immunfluoreszenzfärbung einer Morbus Crohn-Biopsie**

Abgebildet ist jeweils der Querschnitt durch eine Krypte des Dickdarmepithels, der mit Streptavidin (rot) gefärbt wurde, um Biotin darzustellen. Die Zellkerne sind in blau dargestellt. **A.)** Mit biotinylierter HRP inkubierte Biopsie und **B.)** ohne biotinylierte HRP inkubierte Biopsie. Balken = 10  $\mu$ m

### 2.5.2 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Die Visualisierung der gefärbten Strukturen erfolgte mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (CLSM für *confocal laser scanning microscope*). Dabei wird die Probe punktuell bestrahlt und die hervorgerufene Fluoreszenz ebenso punktuell gemessen. Informationen über die gesamte Probe erhält man, wenn der Laserstrahl über die Probe bewegt wird und das Präparat Punkt für Punkt abgerastert wird. Ein vollständiges Bild wird im Computer rechnerisch aus den Lichtintensitäten der einzelnen gemessenen Punkte konstruiert. Eine in ihrem Durchmesser variable Blende blockiert Licht, welches von außerhalb der Objektebene kommt, wodurch das Streulicht reduziert und die Auflösung in der zu betrachtenden Ebene verbessert wird. Auf diese Weise ermöglicht die konfokale Laserscanning-Mikroskopie die Abbildung sehr dünner Probenschichten. Die Fluoreszenz unterschiedlicher Fluorophore wird durch von verschiedenen Lasern emittierte Wellenlängen angeregt und unter Verwendung passender Filter detektiert. In dieser Arbeit wurden Anregungswellenlängen von 594 nm für HRP und 488 nm für die intrazellulären Vesikel eingesetzt. DAPI wurde mit einer Wellenlänge von 408 nm angeregt. Für die Aufnahmen wurde ein 63 $\times$ /1,4 Oil Plan-Apochromat-Objektiv verwendet.



Konfokale Bilder können in Form von Stapeln (z-stacks) aufgenommen werden, so dass man 3D-Datensätze von den Präparaten erhält. Die Aufnahme und Auswertung der Bilder erfolgte mit den LSM-Programmen LSM510 Version 3.2 SP2 und Zeiss LSM Image Browser Version 4.2.0.121.

Für die Quantifizierung der aufgenommenen HRP und der Kollokalisationsereignisse zwischen HRP und den verschiedenen Vesikelmarkern wurden jeweils 3 - 4 z-stacks pro Filter mit 6 - 14 konfokalen Bildern aufgenommen. Von jedem dieser z-stacks wurden 1 - 3 Ebenen analysiert, welche mindestens 0,9 µm voneinander entfernt waren. Mit Hilfe des Kollokalisationsstools wurde ein Scatterplot erstellt, bei dem die beiden Achsen die Intensitäten der beiden Fluoreszenzkanäle widerspiegeln und in dem alle Pixel des Bildes dargestellt werden. Die vier Quadranten enthalten die Hintergrund-Pixel (Quadrant 4), einfach markierte Pixel (Quadranten 1 und 2) und kollokalisierte Pixel (Quadrant 3). Der Threshold wurde so gewählt, dass die Quadranten 1 - 3 keine Hintergrund-Pixel enthielten. Der Hintergrund, der durch Biotin, das in den Zellen vorhanden ist, zustande kommt, konnte anhand der Negativkontrollen ohne biotinylierte HRP bestimmt werden. Die von dem Programm berechneten Flächen der Pixel in den Quadranten wurden benutzt, um den prozentualen Anteil der Kollokalisierungen im Verhältnis zur HRP-Gesamtfläche, die sich aus der Fläche der kollokalisierten Pixel und der Fläche der HRP-positiven Pixel zusammensetzt, zu errechnen.

HRP - Gesamtfläche (µm<sup>2</sup>) = Kollokalisationsfläche (µm<sup>2</sup>) + HRP – positive Fläche (µm<sup>2</sup>)

$$\text{Kollokalisierung (\%)} = \frac{\text{Kollokalisationsfläche (µm}^2\text{)}}{\text{HRP - Gesamtfläche (µm}^2\text{)} + \text{Kollokalisationsfläche (µm}^2\text{)}} * 100$$

## 2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Excel (Microsoft, USA). Grafiken wurden mit Xact (SciLab, Frankreich) erstellt, Tabellen mit Word (Microsoft, USA). CLSM-Abbildungen wurden mit den Programmen Zeiss LSM Image Browser Version 4.2.0.121 und Powerpoint (Microsoft, USA) angefertigt. Die Daten wurden als unabhängige Mehrfachbestimmungen erhoben und, wenn nicht anders beschrieben, als arithmetischer Mittelwert ± SEM (*standard error of the mean*) angegeben. Zur

Bestimmung von Signifikanzen wurden der Student's t-Test oder der zweiseitige Mann-Whitney-U-Test verwendet. Bei Mehrfach-Testung wurde die Bonferroni-Holm-Korrektur angeschlossen.

Ein P-Wert von  $P < 0,05$  wurde als statistisch signifikant gewertet (\*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ ).

### 3 ERGEBNISSE

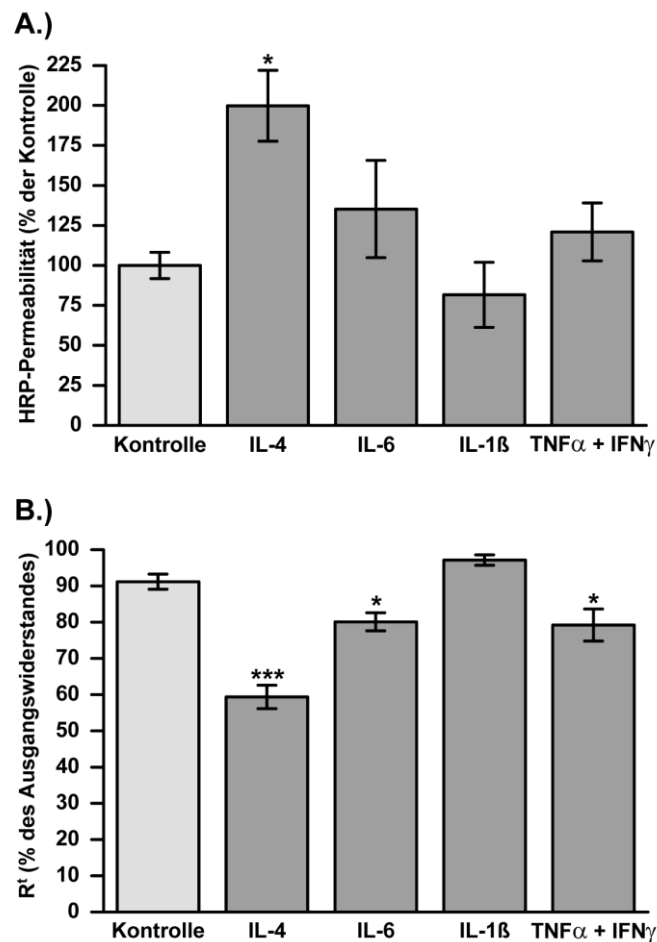
#### 3.1 Einfluss Morbus Crohn-spezifischer Mediatoren auf T84-Zellen

##### 3.1.1 HRP-Permeabilität und transepithelialer Widerstand

Um die transepithelialen Transportwege, die bei Morbus Crohn fehlreguliert sind, zu charakterisieren, wurden verschiedene beim Morbus Crohn relevante Zytokine und der Entzündungsmediator Histamin im Zellmodell untersucht [41, 48, 63-72, 78]. Hierfür wurde die Kolonkarzinomzelllinie T84 benutzt. Im Einzelnen wurden die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  analysiert.

Die Permeabilitätsmessungen für die Meerrettich-Peroxidase (HRP) ergaben, dass nach 24-stündiger Inkubation mit den jeweiligen Mediatoren nur IL-4 die HRP-Permeabilität signifikant beeinflusste ( $200 \pm 22$  % IL-4-behandelt versus  $100 \pm 8$  % unbehandelt;  $P < 0,05$ ;  $n = 8 / 9$ ; Abb. 3.1 A), während IL-6 und TNF $\alpha$  + IFN $\gamma$  ohne Effekt blieben ( $135 \pm 30$  % IL-6-behandelt, bzw.  $121 \pm 18$  % TNF $\alpha$  + IFN $\gamma$ -behandelt versus  $100 \pm 8$  % unbehandelt;  $n = 9 / 8 / 9$ ; Abb. 3.1 A). IL-1 $\beta$  reduzierte den Mittelwert der HRP-Permeabilität sogar auf  $82 \pm 20$  %, was jedoch keine statistische Signifikanz erreichte ( $n = 8$ ; Abb. 3.1 A).

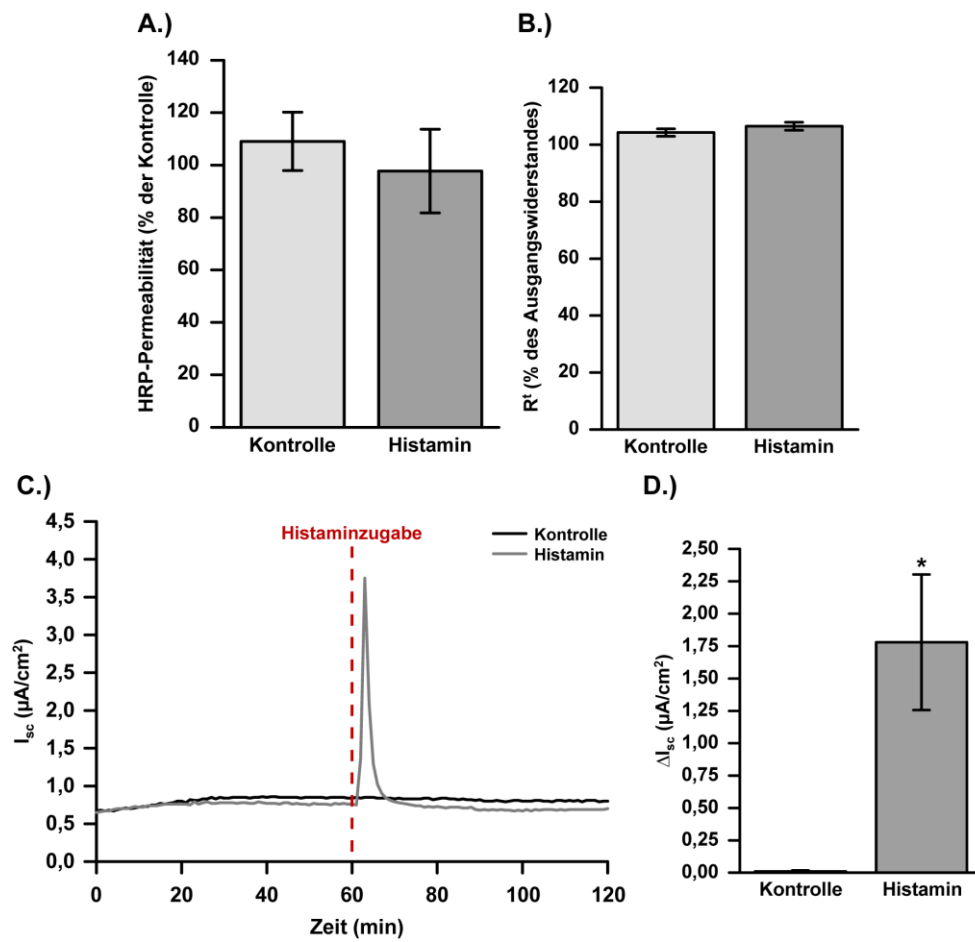
Der transepitheliale Widerstand ( $R^t$ ) der Zellmonolayer wurde durch IL-4 auf  $59 \pm 3$  % ( $P < 0,0001$ ;  $n = 8$ ), durch IL-6 auf  $80 \pm 2$  % ( $P < 0,05$ ;  $n = 9$ ) sowie durch TNF $\alpha$  + IFN $\gamma$  auf  $79 \pm 4$  % ( $P < 0,05$ ;  $n = 8$ ) des Ausgangswiderstandes gesenkt (Kontrolle:  $91 \pm 2$  %;  $n = 9$ ; Abb. 3.1 B). IL-1 $\beta$  beeinflusste den  $R^t$  nicht ( $97 \pm 1$  %;  $n = 8$ ).



**Abb. 3.1: Einfluss verschiedener Zytokine auf die HRP-Permeabilität und den transepithelialen Widerstand ( $R^t$ ) von T84-Monolayern**

**A.)** Die HRP-Permeabilität unbehandelter Kontrollen ( $n = 9$ ) wurde auf 100 % normiert und die HRP-Permeabilität der mit IL-4 ( $n = 8$ ), IL-6 ( $n = 9$ ), IL-1 $\beta$  ( $n = 8$ ) oder TNF $\alpha$  + IFN $\gamma$  ( $n = 8$ ) behandelten Zellen dazu ins Verhältnis gesetzt. **B.)**  $R^t$  vor Zugabe der Zytokine wurde auf 100 % normiert und der  $R^t$ -Wert nach 24 h dazu ins Verhältnis gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*:  $P < 0,05$ , \*\*\*:  $P < 0,0001$  versus Kontrolle).

Abb. 3.2 zeigt den Einfluss von Histamin auf T84-Monolayer. Histamin bewirkte nach 30-minütiger Inkubation gegenüber der Kontrolle keine signifikanten Unterschiede in der HRP-Permeabilität ( $98 \pm 16$  % Histamin-behandelt versus  $109 \pm 11$  % Kontrolle;  $n = 8 / 6$ ; Abb. 3.2 A). Der Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ) zeigte innerhalb von wenigen Minuten nach Histamin-Zugabe einen Anstieg, während der der Kontrollen unverändert blieb ( $\Delta I_{sc}$   $1,78 \pm 0,52$   $\mu A/cm^2$  Histamin-behandelt versus  $0,014 \pm 0,007$   $\mu A/cm^2$  Kontrolle;  $P < 0,05$ ;  $n = 8 / 6$ ; Abb. 3.2 C und D). Der  $R^t$  der Histamin-behandelten Zellen unterschied sich nicht von dem der Kontrollen ( $106 \pm 1$  % Histamin-behandelt versus  $104 \pm 1$  % Kontrolle;  $n = 8 / 6$ ; Abb. 3.2 B).



**Abb. 3.2: Einfluss von Histamin auf die HRP-Permeabilität, den transepithelialen Widerstand ( $R^t$ ) und den Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ) von T84-Monolayern**

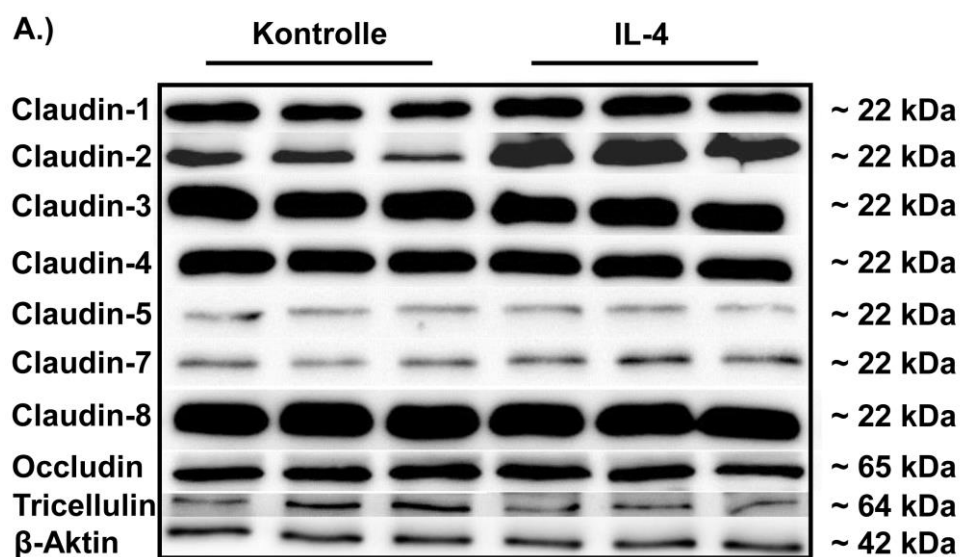
**A.)** Die HRP-Permeabilität vor Histamin-Zugabe wurde auf 100 % normiert und die HRP-Permeabilität 30 min nach Histamin-Zugabe dazu ins Verhältnis gesetzt **B.)** Auch der  $R^t$ -Wert wurde vor Zugabe von Histamin auf 100 % gesetzt und der  $R^t$ -Wert 30 min nach Histamin-Zugabe dazu ins Verhältnis gesetzt **C.)** Repräsentativer Verlauf des  $I_{sc}$  vor und nach Zugabe von Histamin. **D.)** Die Änderung des Kurzschlussstroms ( $\Delta I_{sc}$ ) durch die Zugabe von Histamin wurde ermittelt, indem die Differenz des  $I_{sc}$  zum Zeitpunkt der Zugabe und dem höchsten Wert des anschließenden (negativen) Peaks berechnet wurde. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*:  $P < 0,05$  versus Kontrolle;  $n = 6 - 8$ ).

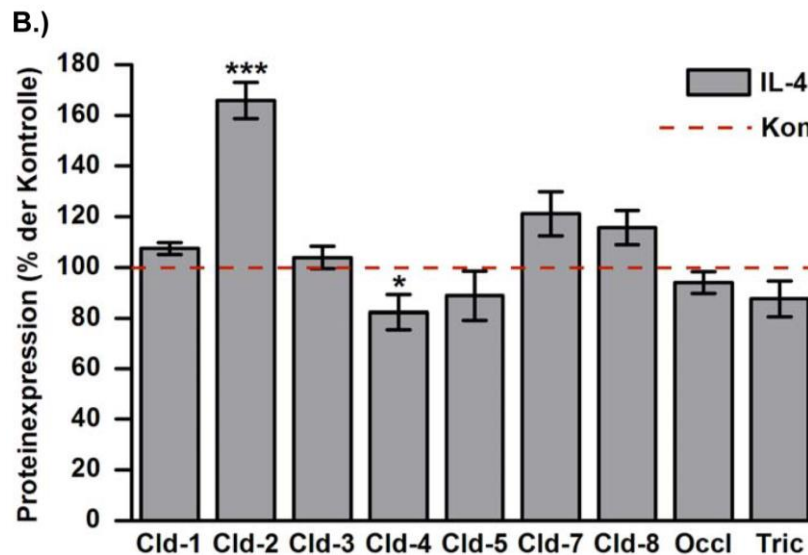
Da von den von uns getesteten Mediatoren nur das Zytokin IL-4 einen Anstieg der HRP-Permeabilität verursachte, wurde in den weiteren Experimenten nur noch mit IL-4 gearbeitet. Die HRP-Permeabilität der mit IL-4 behandelten Zellen war immer signifikant verschieden von der Kontrolle. Daher wird dies in den folgenden Experimenten nicht mehr extra erwähnt.

## 3.2 Weitere durch IL-4 vermittelte Veränderungen der epithelialen Barriere von T84-Monolayern

### 3.2.1 Expression von TJ-Proteinen

Es wurde der Einfluss von IL-4 auf das Expressionsmuster verschiedener TJ-Proteine untersucht und zwar im Einzelnen von Claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7 und -8 sowie Occludin und Tricellulin. Nach 24-stündiger Inkubation mit IL-4 zeigten behandelte T84-Zellmonolayer eine erhöhte Expression von Claudin-2 ( $166 \pm 7 \%$ ;  $P < 0,0001$ ;  $n = 6$ ) und eine verminderte Expression von Claudin-4 ( $82 \pm 7 \%$ ;  $P < 0,05$ ;  $n = 5$ ), während die Proteinlevel der anderen TJ-Proteine nicht signifikant verändert waren (Claudin-1:  $107 \pm 2 \%$ ; Claudin-3:  $104 \pm 4 \%$ ; Claudin-5:  $89 \pm 10 \%$ ; Claudin-7:  $121 \pm 9 \%$ ; Claudin-8:  $116 \pm 7 \%$ ; Occludin:  $94 \pm 4 \%$ ; Tricellulin:  $88 \pm 7 \%$ ;  $n = 5 / 6$ ). Abb. 3.3 A zeigt dazu repräsentative Western Blots. Die Proteinbanden wurden densitometrisch quantifiziert und die Veränderungen gegenüber der Kontrolle prozentual ermittelt (siehe Abb. 3.3 B).





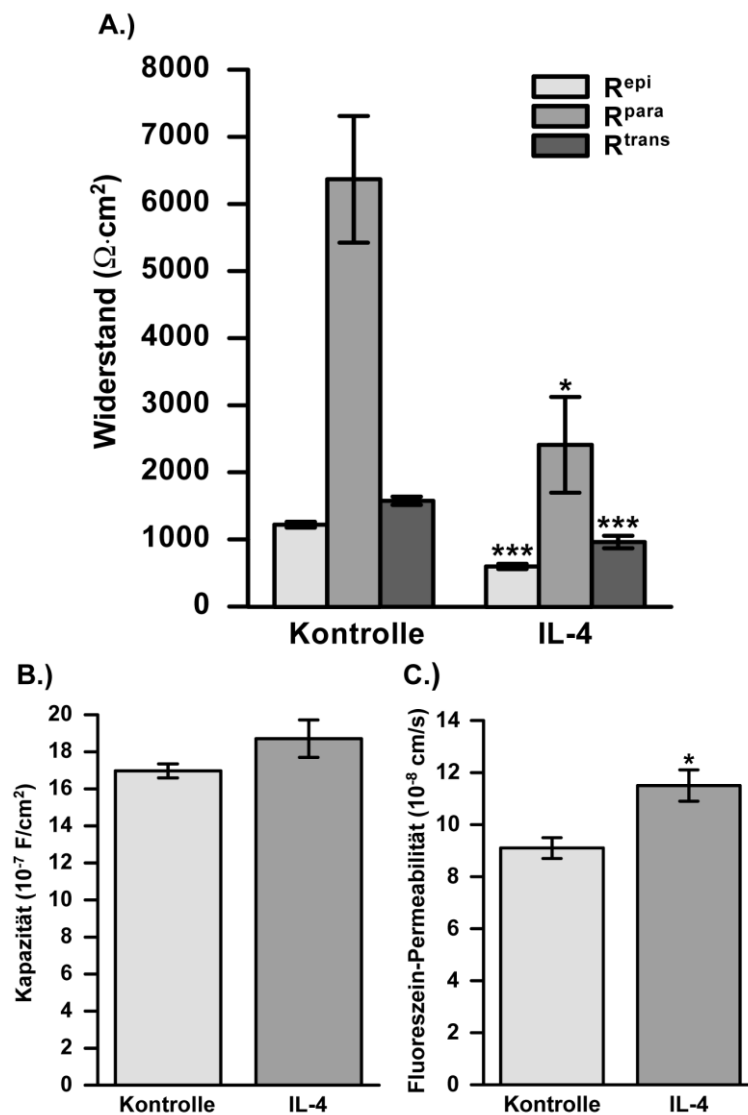
**Abb. 3.3: Einfluss von IL-4 auf die Expression von TJ-Proteinen in T84-Monolayern**

**A.)** Repräsentative Western Blots zeigen die Expression verschiedener TJ-Proteine von unbehandelten Zellen (Kontrolle) und Zellen, die 24 h mit IL-4 inkubiert wurden.

**B.)** Densitometrische Analyse der Western Blots. Unbehandelte Kontrollen (n = 6) wurden auf 100 % normiert und die mit IL-4 behandelten Zellen (n = 5 / 6) dazu ins Verhältnis gesetzt.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*: P < 0,05, \*\*\*: P < 0,0001 versus Kontrolle).

### 3.2.2 Para- und transzellulärer Widerstand

Mit Hilfe der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie wurde der Abfall des epithelialen Widerstands ( $R^{epi}$ ) weiter untersucht, indem die durch IL-4 induzierten Veränderungen des parazellulären ( $R^{para}$ ) und des transzellulären Widerstands ( $R^{trans}$ ) analysiert wurden. Gegenüber dem  $R^{epi}$  der Kontrollzellen ( $1228 \pm 43 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ; n = 7) war der  $R^{epi}$  der IL-4 behandelten Zellen etwa um die Hälfte verringert ( $606 \pm 39 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ; P < 0,0001; n = 7; Abb. 3.4 A).  $R^{para}$  betrug bei den unbehandelten Kontrollen  $6372 \pm 943 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (n = 7) und bei den mit IL-4 inkubierten Zellen lediglich  $2416 \pm 713 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (P < 0,05; n = 7; Abb. 3.4 A). Auch  $R^{trans}$  war nach der Inkubation mit IL-4 gegenüber der Kontrolle verringert ( $967 \pm 93 \Omega \cdot \text{cm}^2$  IL-4-behandelt versus  $1581 \pm 63 \Omega \cdot \text{cm}^2$  Kontrolle; P < 0,0001; n = 7; Abb. 3.4 A). Die epitheliale Kapazität war gegenüber der Kontrolle unverändert ( $18,7 \pm 1,0 \cdot 10^{-7} \text{ F/cm}^2$  IL-4-behandelt versus  $16,9 \pm 0,4 \cdot 10^{-7} \text{ F/cm}^2$  Kontrolle; n = 7; Abb. 3.4 B). Die Fluoreszein-Permeabilität der mit IL-4 behandelten Zellen war gegenüber den Kontrollen erhöht ( $11,5 \pm 0,6 \cdot 10^{-8} \text{ cm/s}$  IL-4-behandelt versus  $9,1 \pm 0,4 \cdot 10^{-8} \text{ cm/s}$  Kontrolle; P < 0,05; n = 5; Abb. 3.4 C).



**Abb. 3.4: Einfluss von IL-4 auf den para- und transzellulären Widerstand, die Fluoreszein-Permeabilität und die epitheliale Kapazität von T84-Monolayern**

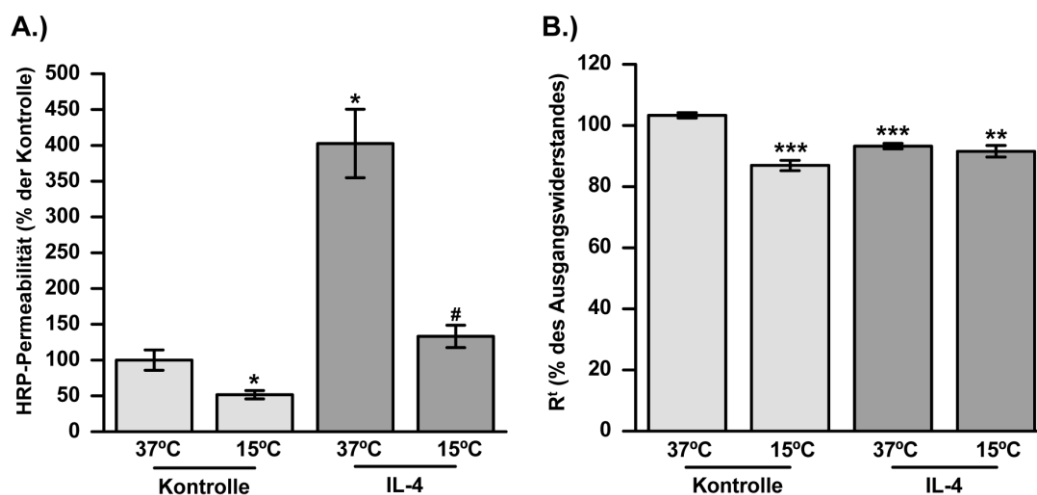
Impedanzmessungen von unbehandelten (Kontrolle;  $n = 5 / 7$ ) und mit IL-4 behandelten Zellen ( $n = 5 / 7$ ). **A.)** Epithelialer, para- und transzellulärer Widerstand. **B.)** Epitheliale Kapazität. **C.)** Fluoreszein-Permeabilität nach 30 min. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*:  $P < 0,05$ , \*\*\*:  $P < 0,0001$  versus Kontrolle).



### 3.3 Charakterisierung des Transportweges von Meerrettich-Peroxidase (HRP) durch T84-Zellmonolayer hindurch

#### 3.3.1 HRP wird aktiv und Dynamin-abhängig transportiert

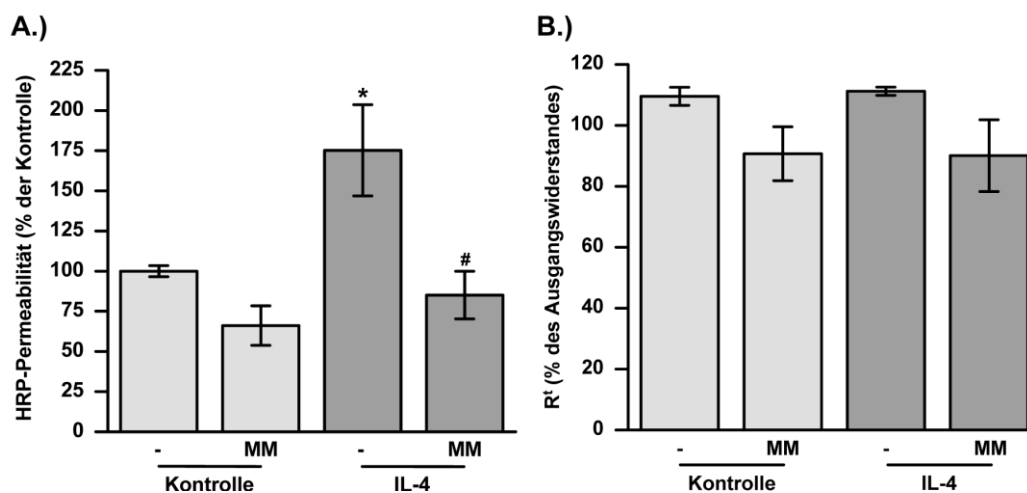
Um zu beweisen, dass HRP über einen aktiven, transzellulären Weg transportiert wird, wurde untersucht, welchen Einfluss das Absenken der Temperatur auf den Transportvorgang hat. Dazu wurden die Epithelien in der Ussing-Kammer auf 15 °C abgekühlt, was passive Transportwege wie den parazellulären Stoffdurchtritt weitgehend unbeeinflusst lässt. Im Gegensatz dazu war die HRP-Permeabilität durch die Temperaturabsenkung stark beeinflusst (Abb. 3.5 A) und zwar sowohl bei den Kontrollen ( $52 \pm 6 \%$  bei 15 °C versus  $100 \pm 14 \%$  bei 37 °C;  $P < 0,05$ ;  $n = 10 / 9$ ) als auch bei den mit IL-4 behandelten Zellen ( $133 \pm 16 \%$  bei 15 °C versus  $403 \pm 48 \%$  bei 37 °C;  $P < 0,05$ ;  $n = 8 / 6$ ). Der transepitheliale Widerstand ( $R^t$ ) der Kontrollen bei 15 °C verringerte sich, während der  $R^t$  der Kontrollen bei 37 °C konstant blieb ( $87 \pm 2 \%$  bei 15 °C versus  $103 \pm 1 \%$  bei 37 °C;  $P < 0,0001$ ;  $n = 10 / 9$ ; Abb. 3.5 B). Bei den mit IL-4 behandelten Zellen gab es keinen Unterschied im  $R^t$  ( $91 \pm 2 \%$  bei 15 °C versus  $93 \pm 1 \%$  bei 37 °C;  $n = 8 / 6$ ; Abb. 3.5 B).



**Abb. 3.5: Einfluss der Temperatur auf die HRP-Permeabilität und den transepithelialen Widerstand ( $R^t$ ) von T84-Monolayern**

**A.)** Die HRP-Permeabilität unbehandelter Kontrollen ( $n = 10$ ) wurde auf 100 % normiert und die HRP-Permeabilität der mit IL-4 behandelten und / oder auf 15 °C gekühlten Zellen ( $n = 6 - 9$ ) dazu ins Verhältnis gesetzt. **B.)** Der Ausgangs- $R^t$  wurde auf 100 % normiert und der  $R^t$ -Wert zum Zeitpunkt  $t_{30}$  dazu ins Verhältnis gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*:  $P < 0,05$ , \*\*:  $P < 0,001$ , \*\*\*:  $P < 0,0001$  versus Kontrolle; #:  $P < 0,05$  versus IL-4).

Bei Behandlung mit dem Dynamin-Inhibitor MiTMAB nahm die HRP-Permeabilität bei den Kontrollfiltern tendenziell ab. Aufgrund der großen Streuung der einzelnen Messwerte war diese Abnahme jedoch knapp nicht signifikant ( $66 \pm 12$  % MiTMAB-behandelt versus  $100 \pm 4$  % in der Kontrolle;  $n = 5 / 6$ ; Abb. 3.6 A). In IL-4-stimulierten Zellen senkte MiTMAB die Permeabilität ungefähr auf die Hälfte ( $85 \pm 15$  % zusätzlich MiTMAB-behandelt versus  $175 \pm 28$  % bei alleiniger IL-4-Exposition;  $P < 0,05$ ;  $n = 5 / 6$ ; Abb. 3.6 A).  $R^t$  wurde durch die Zugabe von MiTMAB nicht signifikant beeinflusst ( $91 \pm 9$  % MiTMAB-behandelt versus  $110 \pm 3$  % in der Kontrolle;  $n = 6 / 5$ ;  $90 \pm 12$  % zusätzlich MiTMAB-behandelt versus  $111 \pm 1$  % bei mit IL-4 behandelten Zellmonolayern;  $n = 5 / 6$ ; Abb. 3.6 B).



**Abb. 3.6: Einfluss von MiTMAB auf die HRP-Permeabilität und den transepithelialen Widerstand ( $R^t$ ) von T84-Monolayern**

**A.)** Die HRP-Permeabilität unbehandelter Kontrollen ( $n = 5$ ) wurde auf 100 % normiert und die HRP-Permeabilität der mit IL-4 und / oder MiTMAB (MM) behandelten Zellen ( $n = 5 / 6$ ) dazu ins Verhältnis gesetzt. **B.)** Der  $R^t$ -Wert vor Zugabe des Inhibitors wurde auf 100 % normiert und der  $R^t$ -Wert zum Zeitpunkt  $t_{30}$  dazu ins Verhältnis gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*:  $P < 0,05$  versus Kontrolle; #:  $P < 0,05$  versus IL-4).

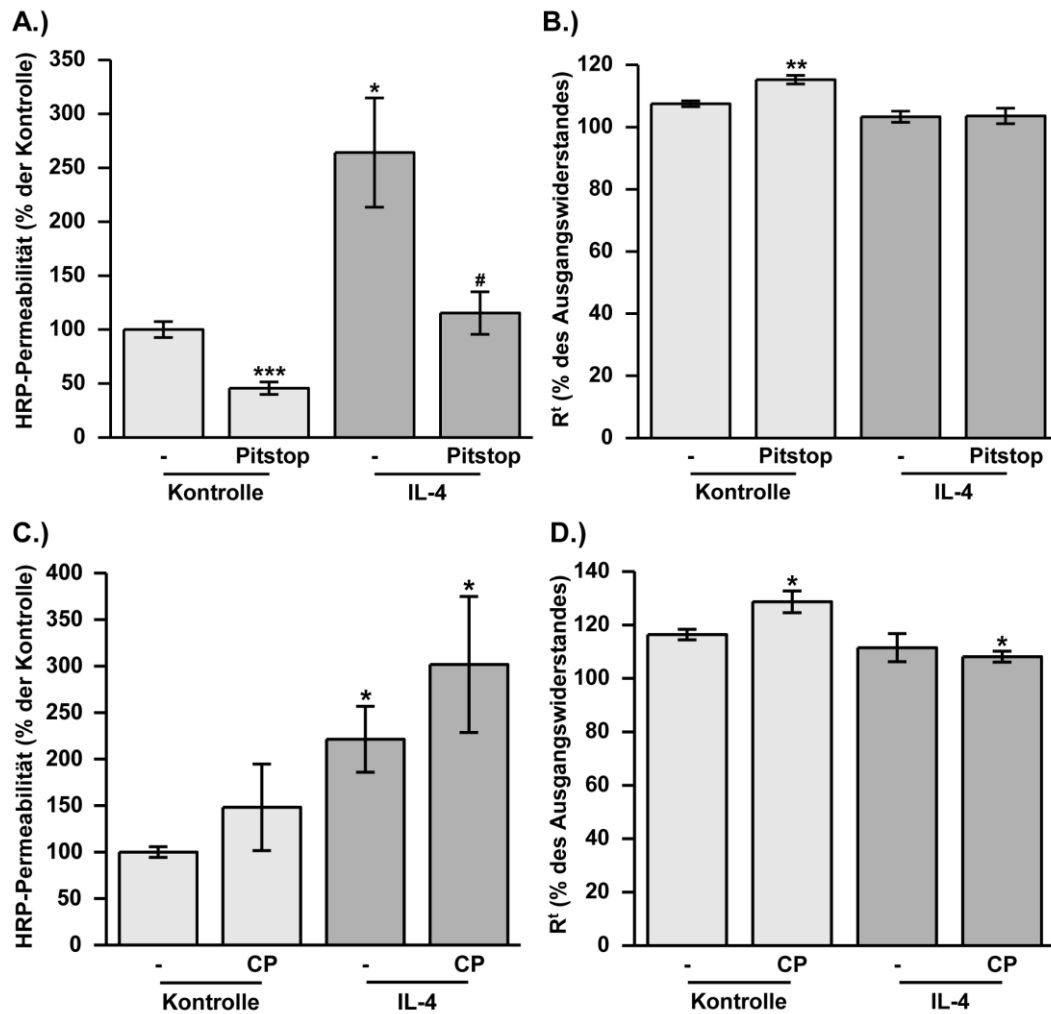
### 3.3.2 Charakterisierung der beim HRP-Transport beteiligten Endozytose-mechanismen

Um die an der durch IL-4 induzierten HRP-Transzytose beteiligte Endozytose-Mechanismen zu beleuchten, wurden Inhibitoren für die Clathrin-vermittelte Endozytose (CME), die Caveolin-vermittelte Endozytose und die Makropinozytose eingesetzt.

#### 3.3.2.1 Clathrin-vermittelte Endozytose

Als Inhibitoren für die CME wurden Pitstop 2 und Chlorpromazin eingesetzt. Pitstop 2 blockiert die Interaktion von Amphiphysin mit Clathrin und Chlorpromazin verhindert die Bildung von Clathrin-umhüllten Gruben an der Plasmamembran [195, 196].

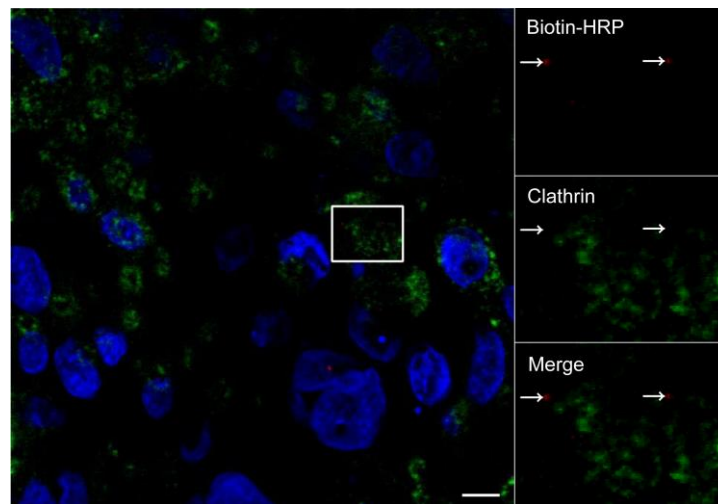
Die beiden Inhibitoren zeigten unterschiedliche Auswirkungen auf die HRP-Permeabilität. Während die Behandlung der unbehandelten Kontrollen mit Pitstop 2 die HRP-Permeabilität von  $100 \pm 7\%$  ( $n = 8$ ) um mehr als die Hälfte auf  $46 \pm 6\%$  senkte ( $P < 0,0001$ ;  $n = 9$ ; Abb. 3.7 A), wurde die Permeabilität durch Chlorpromazin eher erhöht, wobei die Erhöhung aufgrund der großen Streuung nicht signifikant war ( $148 \pm 47\%$  Chlorpromazin-behandelt versus  $100 \pm 6\%$  Kontrolle;  $n = 12 / 10$ ; Abb. 3.7 C). Gleiches gilt für die mit IL-4 behandelten Zellen, bei denen die Zugabe von Pitstop 2 die HRP-Permeabilität von  $264 \pm 51\%$  ( $n = 8$ ) auf  $115 \pm 20\%$  ( $P < 0,05$ ;  $n = 9$ ; Abb. 3.7 A) reduzierte, während Chlorpromazin die Permeabilität von  $221 \pm 35\%$  ( $n = 12$ ) auf  $302 \pm 73\%$  ( $n = 11$ ) erhöhte, was wiederum nicht signifikant war (Abb. 3.7 C).  $R^t$  wurde durch Pitstop 2 lediglich bei der unbehandelten Kontrolle erhöht ( $115 \pm 1\%$  Pitstop 2-behandelt versus  $108 \pm 1\%$  in der Kontrolle;  $P < 0,001$ ;  $n = 9 / 8$ ; Abb. 3.7 B), während der  $R^t$  der IL-4-behandelten Zellen durch die Zugabe von Pitstop 2 unbeeinflusst blieb ( $104 \pm 2\%$  Pitstop 2-behandelt versus  $103 \pm 2\%$  bei IL-4-Exposition;  $n = 9 / 8$ ; Abb. 3.7 B). Gleiches galt für den  $R^t$  unter der Einwirkung von Chlorpromazin ( $129 \pm 4\%$  Chlorpromazin-behandelt versus  $116 \pm 2\%$  Kontrolle;  $n = 12 / 10$ ;  $P < 0,05$ ;  $108 \pm 2\%$  Chlorpromazin-behandelt versus  $111 \pm 5\%$  bei IL-4-Exposition;  $n = 11 / 12$ ; Abb. 3.7 D).



**Abb. 3.7: Einfluss von Pitstop 2 und Chlorpromazin auf die HRP-Permeabilität und den transepithelialen Widerstand ( $R^t$ ) von T84-Monolayern**

**A.) + C.)** Die HRP-Permeabilität unbehandelter Kontrollen ( $n = 8 / 10$ ) wurde auf 100 % normiert und die HRP-Permeabilität der mit IL-4 und / oder Pitstop 2 (**A**) bzw. Chlorpromazin (CP; **B**) behandelten Zellen ( $n = 8 - 12$ ) dazu ins Verhältnis gesetzt. **B.) + D.)** Der  $R^t$ -Wert vor Zugabe des Inhibitors wurde auf 100 % normiert und der  $R^t$ -Wert zum Zeitpunkt  $t_{30}$  dazu ins Verhältnis gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*:  $P < 0,05$  versus Kontrolle, \*\*:  $P < 0,001$ , \*\*\*:  $P < 0,0001$  versus Kontrolle; #:  $P < 0,05$  versus IL-4).

In den Immunfluoreszenzfärbungen wurde keine spezifische Kolo-kalisation von biotinylierter HRP und Clathrin gefunden. Abb. 3.8 zeigt eine repräsentative Aufnahme einer Kontrolle zum Zeitpunkt  $t_5$  und in Tab. 3.1 sind die prozentual errechneten Kolo-kalisationsereignisse zu den verschiedenen Zeitpunkten aufgeführt. Es gab zu keinem Zeitpunkt einen Unterschied zwischen Kontrolle und IL-4. Auch zwischen den Zeitpunkten gab es keinen Unterschied.



**Abb. 3.8: Intrazelluläre Lokalisation von HRP und Clathrin in T84-Monolayern**

Repräsentative Aufnahme einer Immunfluoreszenzfärbung von HRP (rot) und Clathrin (grün) nach 5-minütiger Inkubation unbehandelter T84-Monolayer mit biotinylierter HRP. Pfeile markieren endozytierte HRP. Balken = 5  $\mu$ m.

**Tab. 3.1: Kolokalisation von biotinylierter HRP und Clathrin**

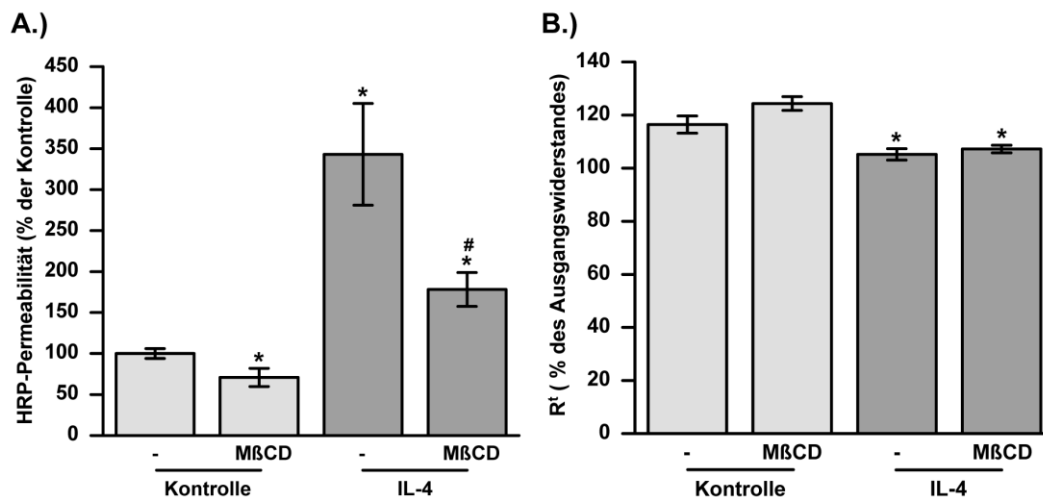
Die prozentualen Anteile der mit Clathrin kolokalisierten HRP im Verhältnis zur Gesamt-HRP zu verschiedenen Zeitpunkten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. In Klammern sind die jeweiligen n-Zahlen angegeben.

Zeit (min)	Kolokalisation (% der Gesamt-HRP)	
	Kontrolle	IL-4
2	0 $\pm$ 0 (8)	0 $\pm$ (8)
5	0 $\pm$ 0 (9)	0 $\pm$ 0 (9)
10	0,0007 $\pm$ 0,0007 (14)	0 $\pm$ 0 (11)
20	0,2 $\pm$ 0,1 (12)	0,07 $\pm$ 0,05 (12)
30	0,2 $\pm$ 0,2 (15)	0,3 $\pm$ 0,3 (11)

### 3.3.2.2 Caveolin-vermittelte Endozytose

Für die Hemmung der Caveolin-vermittelten Endozytose wurden Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD), Filipin und Nystatin benutzt. Alle drei Inhibitoren modifizieren Cholesterol in der Plasmamembran, wobei M $\beta$ CD der Membran Cholesterol entzieht, während Filipin und Nystatin das Cholesterol in der Plasmamembran binden [197].

M $\beta$ CD hemmte die Permeabilität für HRP bei Kontrollen ( $71 \pm 11$  % M $\beta$ CD-behandelt versus  $100 \pm 6$  % in der Kontrolle;  $P < 0,05$ ;  $n = 12$ ; Abb. 3.9 A), als auch bei Zellen, die mit IL-4 behandelt wurden ( $178 \pm 21$  % M $\beta$ CD-behandelt versus  $343 \pm 62$  % bei IL-4;  $P < 0,05$ ;  $n = 11 / 12$ ; Abb. 3.9 A).  $R^t$  wurde durch M $\beta$ CD nicht verändert ( $124 \pm 3$  % M $\beta$ CD-behandelt versus  $116 \pm 3$  % in der Kontrolle;  $n = 12$ ;  $107 \pm 1$  % M $\beta$ CD-behandelt versus  $105 \pm 2$  % bei IL-4-Exposition;  $n = 11 / 12$ ; Abb. 3.9 B).

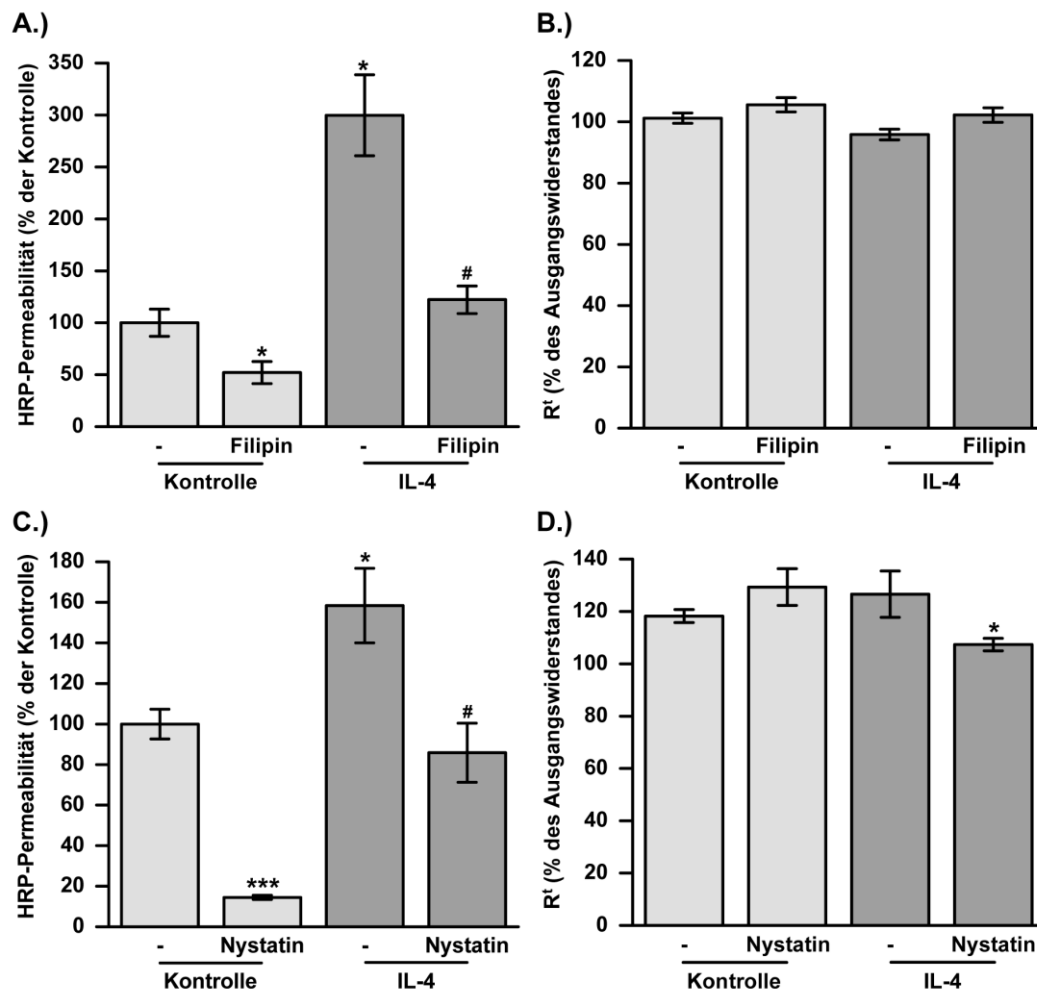


**Abb. 3.9: Einfluss von M $\beta$ CD auf die HRP-Permeabilität und den transepithelialen Widerstand ( $R^t$ ) von T84-Monolayern**

**A.)** Die HRP-Permeabilität unbehandelter Kontrollen ( $n = 12$ ) wurde auf 100 % normiert und die HRP-Permeabilität der mit IL-4 und / oder M $\beta$ CD behandelten Zellen ( $n = 11 / 12$ ) dazu ins Verhältnis gesetzt. **B.)** Der  $R^t$ -Wert vor Zugabe des Inhibitors wurde auf 100 % normiert und der  $R^t$ -Wert zum Zeitpunkt  $t_{30}$  dazu ins Verhältnis gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*:  $P < 0,05$  versus Kontrolle; #:  $P < 0,05$  versus IL-4).

Auch die polyenen Antimykotika Filipin und Nystatin senkten als Inhibitoren der Caveolin-abhängigen Endozytose die HRP-Permeabilität (Abb. 3.10 A und C). Filipin verminderte die HRP-Permeabilität gegenüber der unbehandelten Kontrolle auf ungefähr die Hälfte (von  $100 \pm 13$  % auf  $52 \pm 11$  %;  $P < 0,05$ ;  $n = 6 / 5$ ; Abb. 3.10 A) und gegenüber den Zellen, die mit IL-4 inkubiert waren, sogar um das 2,45-fache (von  $300 \pm 39$  % auf  $122 \pm 13$  %;  $P < 0,05$ ;  $n = 6$ ; Abb. 3.10 A).  $R^t$  wurde durch Filipin nicht verändert ( $106 \pm 2$  % Filipin-behandelt versus  $101 \pm 2$  % in der Kontrolle;  $n = 5 / 6$ ; unter IL-4 Exposition:  $102 \pm 2$  % Filipin-behandelt versus  $96 \pm 2$  % in der Kontrolle;  $n = 6$ ; Abb. 3.10 B). Nystatin senkte die HRP-Permeabilität der mit IL-4 behandelten Zellen ( $158 \pm 18$  %;  $n = 5$ ) auf  $86 \pm 15$  % ( $P < 0,05$ ;  $n = 6$ ; Abb. 3.10 C). In der Kontrolle ( $100 \pm 7$  %;  $n = 7$ ) verminderte Nystatin die Permeabilität für HRP

sogar um das 6,9fache ( $14 \pm 1 \%$ ;  $P < 0,0001$ ;  $n = 6$ ; Abb. 3.10 C).  $R^t$  wurde durch Nystatin nicht verändert ( $129 \pm 7 \%$  Nystatin-behandelt versus  $118 \pm 3 \%$  in der Kontrolle;  $n = 6 / 7$ ;  $107 \pm 2 \%$  Nystatin-behandelt versus  $127 \pm 9 \%$  bei IL-4-Exposition;  $n = 6 / 5$ ; Abb. 3.10 D).

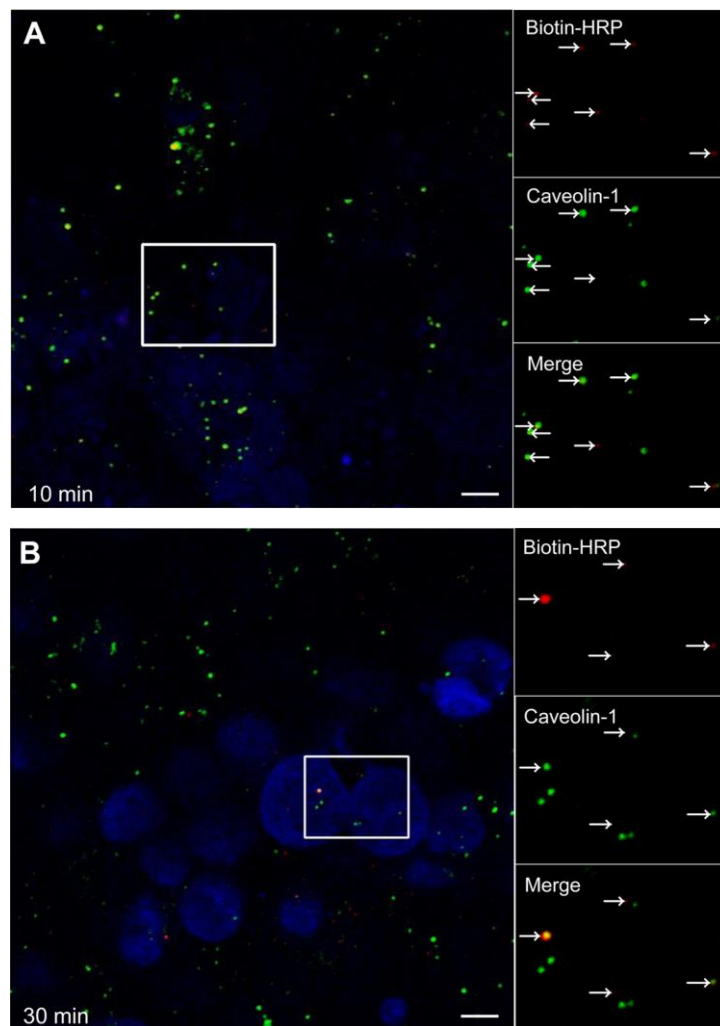


**Abb. 3.10: Einfluss von Filipin und Nystatin auf die HRP-Permeabilität und den transepithelialen Widerstand ( $R^t$ ) von T84-Monolayern**

**A.) + C.)** Die HRP-Permeabilität unbehandelter Kontrollen ( $n = 6 - 7$ ) wurde auf 100 % normiert und die HRP-Permeabilität der mit IL-4 ( $n = 5 - 6$ ) und / oder Filipin (**A**) bzw. Nystatin (**C**) behandelten Zellen ( $n = 5 - 7$ ) dazu ins Verhältnis gesetzt. **B.) + D.)** Der  $R^t$ -Wert vor Zugabe des Inhibitors wurde auf 100 % normiert und der  $R^t$ -Wert zum Zeitpunkt  $t_{30}$  dazu ins Verhältnis gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*:  $P < 0,05$ ; \*\*\*:  $P < 0,0001$  versus Kontrolle; #:  $P < 0,05$  versus IL-4).

In den Immunfluoreszenzfärbungen wurden Kolokalisationen von biotinylierter HRP und Caveolin-1 gefunden. Abb. 3.11 zeigt repräsentative Aufnahmen zu den Zeitpunkten  $t_{10}$  und  $t_{30}$  und in Tab. 3.2 sind die prozentual errechneten

Kolokalisationsereignisse zu den verschiedenen Zeitpunkten aufgeführt. In den Kontrollen als auch in den mit IL-4 behandelten Zellen waren nach 10-minütiger Inkubation mit biotinylierter HRP die meisten Kolokalisationen sichtbar (Abb. 3.11 A, Tab. 3.2). Zum Zeitpunkt  $t_5$  war die Kolokalisationsrate bei den mit IL-4 behandelten Zellen signifikant höher als bei den Kontrollen.



**Abb. 3.11: Intrazelluläre Lokalisation von HRP und Caveolin-1 in T84-Monolayern**

Repräsentative Aufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen von HRP (rot) und Caveolin-1 (grün) nach 10- (**A**) und 30-minütiger (**B**) Inkubation unbehandelter T84-Monolayer mit biotinylierter HRP. Pfeile markieren endozytierte HRP. Balken = 5 µm.



**Tab. 3.2: Prozentuale Kolokalisation von biotinylierter HRP und Caveolin-1**

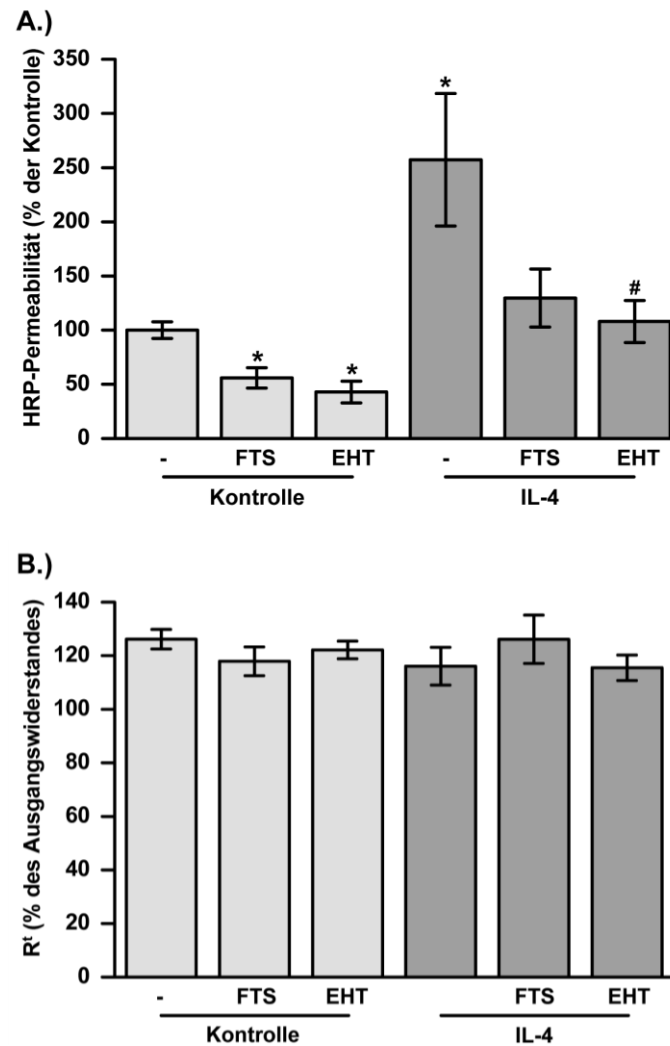
Die prozentualen Anteile der mit Caveolin kolokalisierten HRP im Verhältnis zur Gesamt-HRP zu verschiedenen Zeitpunkten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. In Klammern sind die jeweiligen n-Zahlen angegeben. Werte mit dem gleichen hochgestellten Buchstaben sind signifikant unterschiedlich, \* markieren einen signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (<sup>a,b,c,d,e,f</sup>: P < 0,05; \*: P < 0,05).

Zeit (min)	Kolokalisation (% der Gesamt-HRP)	
	Kontrolle	IL-4
2	10 $\pm$ 5 <sup>a</sup> (7)	12 $\pm$ 8 (8)
5	3 $\pm$ 2 <sup>b,c</sup> (11)	20 $\pm$ 6 <sup>*,d</sup> (8)
10	40 $\pm$ 12 <sup>a,b,e</sup> (12)	33 $\pm$ 11 <sup>f</sup> (11)
20	26 $\pm$ 8 <sup>c,g</sup> (18)	12 $\pm$ 4 (16)
30	6 $\pm$ 2 <sup>e,g</sup> (21)	4 $\pm$ 2 <sup>d,f</sup> (17)

### 3.3.2.3 Makropinozytose

Als Inhibitoren für die Makropinozytose wurden die Inhibitoren für Ras (Farnesylthiosalicylsäure, FTS) und Rac1 (EHT 1864), zwei an der Regulation der Makropinozytose beteiligten GTPasen, sowie die PI3K-Inhibitoren LY294002 und Wortmannin eingesetzt.

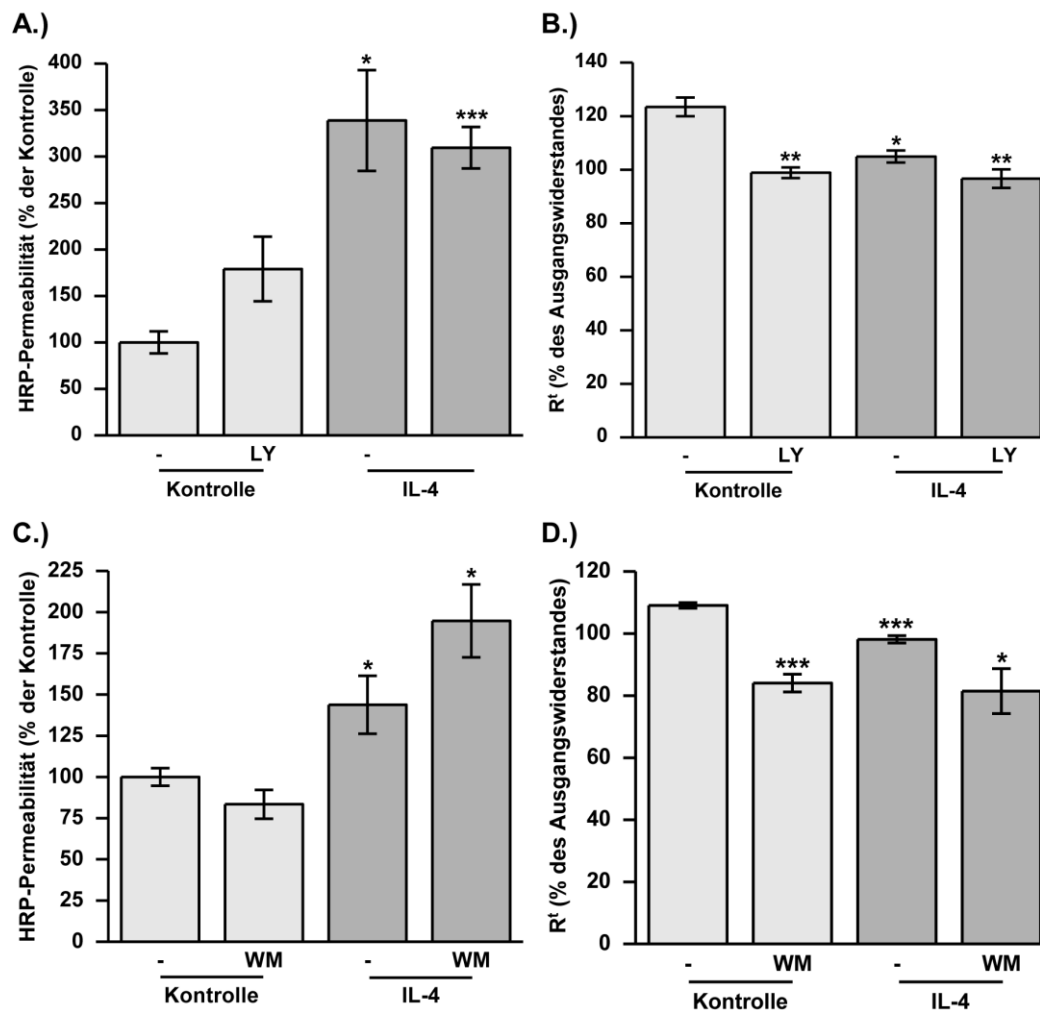
FTS und EHT 1864 senkten die Permeabilität für HRP (Abb. 3.12 A). Bei den mit IL-4 behandelten Zellen war allerdings nur die Hemmung durch EHT 1864 signifikant (108  $\pm$  20 % EHT 1864-behandelt versus 257  $\pm$  61 % bei alleiniger IL-4 Exposition; P < 0,05; n = 9 und 130  $\pm$  27 % FTS-behandelt; n = 9). Dagegen zeigten bei den nicht IL-4 exponierten Kontrollen beide Inhibitoren eine Hemmung (43  $\pm$  10 % EHT 1864-behandelt und 56  $\pm$  9 % FTS-behandelt versus 100  $\pm$  7 % in der unbehandelten Kontrolle; P < 0,05; n = 8 / 7 / 8). R<sup>t</sup> wurde durch FTS und EHT 1864 nicht beeinflusst (122  $\pm$  3 % EHT 1864-behandelt und 118  $\pm$  5 % FTS-behandelt versus 126  $\pm$  4 % in der unbehandelten Kontrolle; n = 8 / 7 / 8; 115  $\pm$  5 % EHT 1864-behandelt; 126  $\pm$  9 % FTS-behandelt versus 116  $\pm$  7 % in den IL-4-exponierten Zellmonolayern; n = 9; Abb. 3.12 B).



**Abb. 3.12: Einfluss von Farnesylthiosalicylsäure und EHT 1864 auf die HRP-Permeabilität und den transepithelialen Widerstand ( $R^t$ ) von T84-Monolayern**

**A.)** Die HRP-Permeabilität unbehandelter Kontrollen ( $n = 8$ ) wurde auf 100 % normiert und die HRP-Permeabilitäten der mit IL-4 und / oder Farnesylthiosalicylsäure (FTS) bzw. EHT 1864 behandelten Zellen ( $n = 11 / 12$ ) dazu ins Verhältnis gesetzt. **B.)** Der  $R^t$ -Wert vor Zugabe der Inhibitoren wurde auf 100 % normiert und der  $R^t$ -Wert zum Zeitpunkt  $t_{30}$  dazu ins Verhältnis gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*:  $P < 0,05$  versus Kontrolle; #:  $P < 0,05$  versus IL-4).

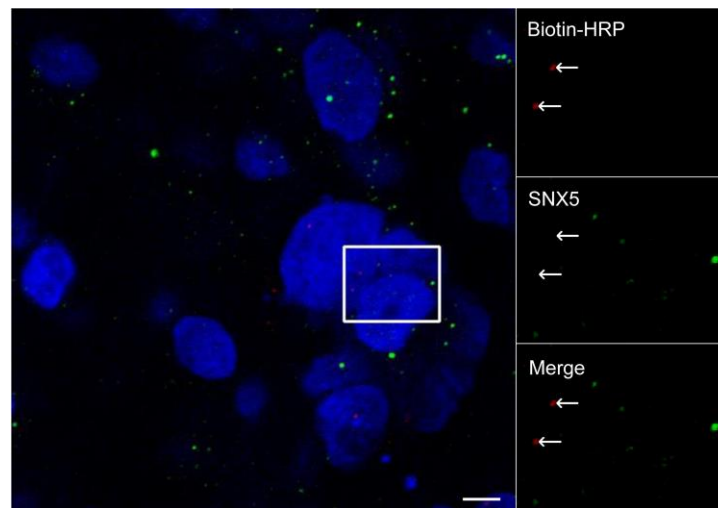
Der PI3K-Inhibitor LY294002 steigerte die HRP-Permeabilität der Kontrollen ( $100 \pm 12 \%$ ;  $n = 6$ ) auf  $179 \pm 35 \%$  ( $n = 6$ ; Abb. 3.13 A). Diese Steigerung war aufgrund der Streuung der einzelnen Werte nicht signifikant. Bei den mit IL-4 behandelten Zellen gab es keine signifikante Veränderung durch die Zugabe von LY294002 ( $310 \pm 22 \%$  LY294002-behandelt versus  $339 \pm 54 \%$  IL-4;  $n = 6$ ; Abb. 3.13 A). Wortmannin, ein weiterer PI3K-Inhibitor, zeigte eine leichte, jedoch nicht signifikante Hemmung der HRP-Permeabilität der Kontrollen ( $83 \pm 9 \%$  Wortmannin-behandelt versus  $100 \pm 5 \%$  Kontrolle;  $n = 8$ ; Abb. 3.13 C). Die Zugabe zu den mit IL-4 inkubierten Zellen erhöhte die Permeabilität von HRP tendenziell, aber wiederum nicht signifikant ( $195 \pm 22 \%$  Wortmannin-behandelt versus  $144 \pm 18 \%$  IL-4;  $n = 5 / 6$ ; Abb. 3.13 C). Der  $R^t$  der mit LY294002 behandelten Zellen ( $99 \pm 2 \%$ ;  $n = 6$ ) war gegenüber dem der unbehandelten Kontrolle ( $123 \pm 4 \%$ ;  $n = 6$ ) vermindert ( $P < 0,001$ ; Abb. 3.13 B). Zwischen dem  $R^t$  der mit IL-4 inkubierten Zellen ( $105 \pm 2 \%$ ;  $n = 6$ ) und den zusätzlich mit LY294002 behandelten Zellen ( $97 \pm 4 \%$ ;  $n = 6$ ) gab es keinen Unterschied (Abb. 3.13 B). Ebenso verhielt es sich mit den mit Wortmannin behandelten Zellen. Gegenüber der Kontrolle ( $109 \pm 1 \%$ ;  $n = 8$ ) war der Widerstand vermindert ( $84 \pm 3 \%$ ;  $n = 8$ ;  $P < 0,0001$ ), während die Zugabe von Wortmannin keinen Einfluss auf die mit IL-4 behandelten Zellen hatte ( $81 \pm 7 \%$  Wortmannin-behandelt versus  $98 \pm 1 \%$  IL-4;  $n = 5 / 6$ ; Abb. 3.13 D).



**Abb. 3.13: Einfluss von LY294002 und Wortmannin auf die HRP-Permeabilität und den transepithelialen Widerstand (R<sup>t</sup>) von T84-Monolayern**

**A.) + C.)** Die HRP-Permeabilität unbehandelter Kontrollen (n = 6 / 8) wurde auf 100 % normiert und die HRP-Permeabilität der mit IL-4 (n = 6) und / oder LY294002 (LY; **A**) bzw. Wortmannin (WM; **C**) behandelten Zellen (n = 5 - 8) dazu ins Verhältnis gesetzt. **B.) + D.)** Der R<sup>t</sup> -Wert vor Zugabe der Inhibitoren wurde auf 100 % normiert und der R<sup>t</sup>-Wert zum Zeitpunkt t<sub>30</sub> dazu ins Verhältnis gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM (\*: P < 0,05 versus Kontrolle).

In den Immunfluoreszenzfärbungen wurden sehr wenige Kolo-kalisationen von biotinylierter HRP und dem Makropinosomen-Marker SNX5 gefunden. Abb. 3.14 zeigt eine repräsentative Aufnahme einer Kontrolle zum Zeitpunkt t<sub>30</sub> und in Tab. 3.3 sind die prozentual errechneten Kolo-kalisationsereignisse zu den verschiedenen Zeitpunkten aufgeführt. Diese unterschieden sich nicht zwischen den verschiedenen Zeitpunkten. Auch zwischen Kontrolle und den mit IL-4 behandelten Zellen gab es zu keinem Zeitpunkt einen Unterschied (Tab. 3.3).



**Abb. 3.14: Intrazelluläre Lokalisation von HRP und SNX5 in T84-Monolayern**

Repräsentative Aufnahme einer Immunfluoreszenzfärbung von HRP (rot) und SNX5 (grün) nach 30-minütiger Inkubation unbehandelter T84-Monolayer mit biotinylierter HRP. Pfeile markieren endozytierte HRP. Balken = 5  $\mu$ m.

**Tab. 3.3: Prozentuale Kolokalisation von biotinylierter HRP und SNX5**

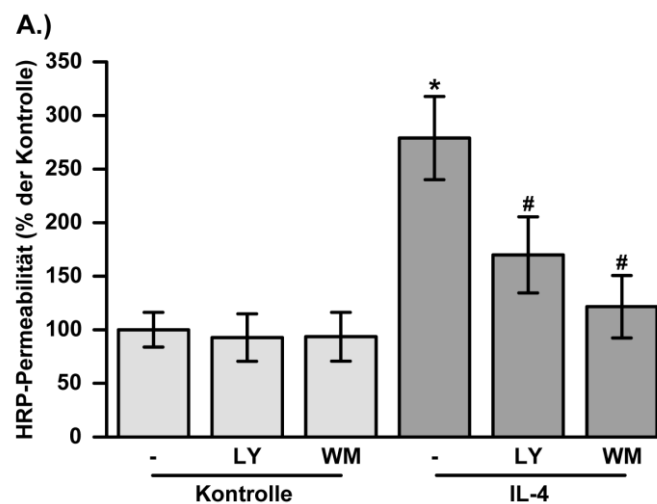
Die prozentualen Anteile der mit SNX5 kolokalisierten HRP im Verhältnis zur Gesamt-HRP zu verschiedenen Zeitpunkten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. In Klammern sind die jeweiligen n-Zahlen angegeben.

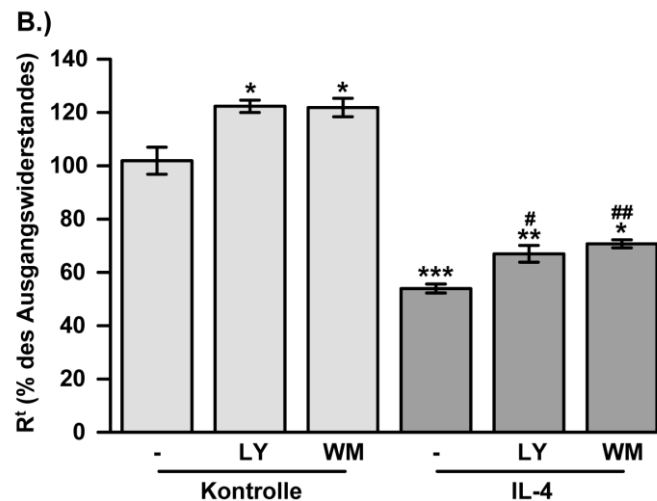
Zeit (min)	Kolokalisation (% der Gesamt-HRP)	
	Kontrolle	IL-4
2	0 $\pm$ 0 (8)	0,1 $\pm$ 0,1 (8)
5	1,8 $\pm$ 1,8 (8)	2,1 $\pm$ 1,2 (8)
10	1,2 $\pm$ 0,8 (13)	0,8 $\pm$ 0,4 (12)
20	0,9 $\pm$ 0,6 (11)	0,6 $\pm$ 0,5 (18)
30	1,4 $\pm$ 1,4 (13)	0,1 $\pm$ 0,1 (14)

### 3.3.3 Charakterisierung des für die Steigerung der HRP-Permeabilität durch IL-4 verantwortlichen Signalwegs

Um zu untersuchen, auf welchem Signalweg IL-4 die Zunahme der HRP-Permeabilität bewirkt, wurden die Zellen vor der IL-4-Zugabe mit zwei Inhibitoren des PI3K-Wegs, LY294002 und Wortmannin, und zwei Inhibitoren des STAT6-Wegs, AS1517499 und Suberoylanilid-Hydroxamsäure (SAHA), inkubiert (Abb. 3.15 A und Abb. 3.16 A und C).

Gegenüber der Kontrolle ( $100 \pm 16 \%$ ;  $n = 8$ ) hatten die eingesetzten Inhibitoren des PI3K-Weges keinen Effekt auf die HRP-Permeabilität ( $93 \pm 22 \%$  LY294002-behandelt;  $94 \pm 23 \%$  Wortmannin-behandelt;  $n = 8$ ; Abb. 3.15 A). Bei den mit IL-4 behandelten Zellen zeigten die PI3K-Inhibitoren allerdings eine hemmende Wirkung ( $170 \pm 36 \%$  LY294002-behandelt,  $122 \pm 29 \%$  Wortmannin-behandelt versus  $279 \pm 39 \%$  IL-4 allein;  $P < 0,05$ ;  $n = 8 / 7 / 7$ ; Abb. 3.15 A). Der  $R^t$ -Wert der Kontrolle ( $102 \pm 5 \%$ ;  $n = 8$ ) wurde durch die Inhibitoren der PI3-Kinase erhöht ( $122 \pm 2 \%$  LY294002-behandelt;  $122 \pm 3 \%$  Wortmannin-behandelt;  $P < 0,05$ ;  $n = 8$ ; Abb. 3.15 B), genauso wie der durch IL-4 gesenkte  $R^t$  (IL-4:  $54 \pm 2 \%$ ;  $n = 7$ ; LY294002:  $67 \pm 3 \%$ ;  $P < 0,05$ ;  $n = 8$ ; Wortmannin:  $71 \pm 1 \%$ ;  $P < 0,0001$ ;  $n = 7$ ; Abb. 3.15 B).

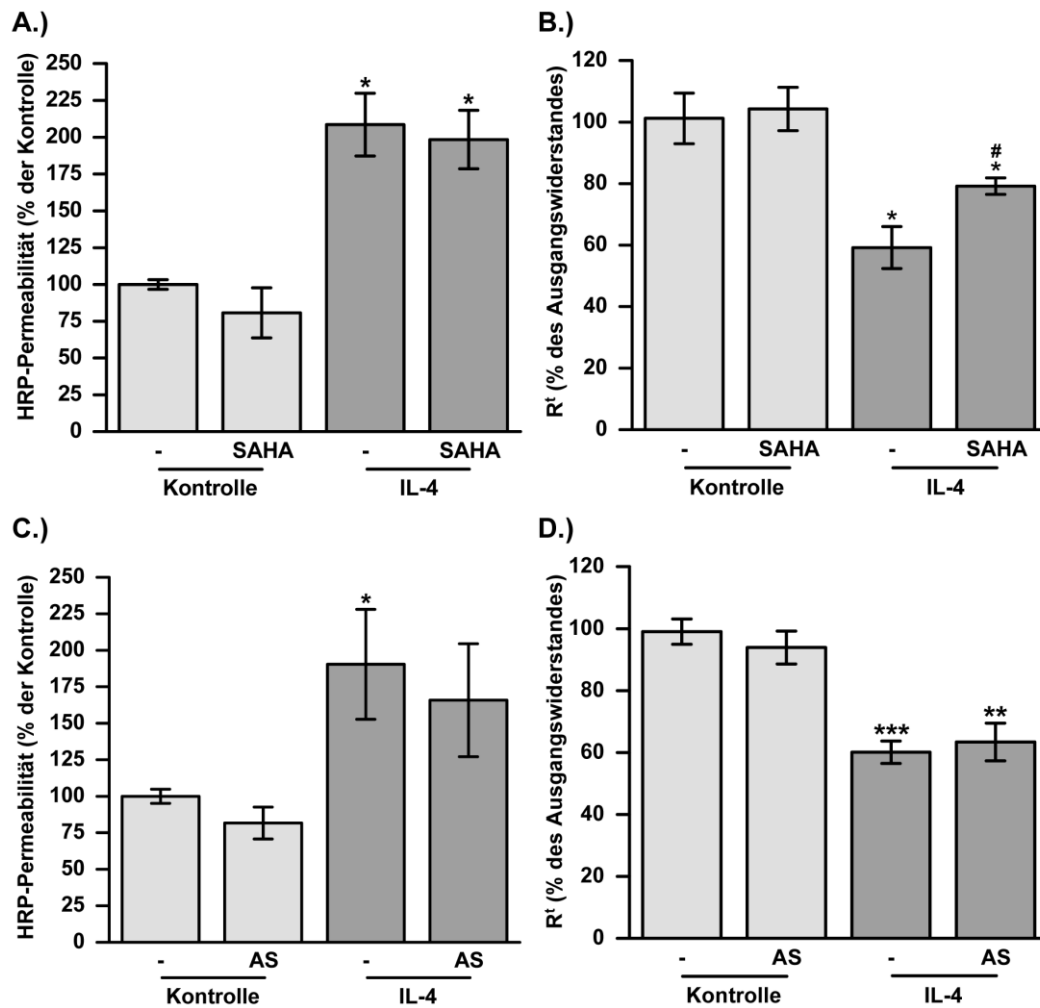




**Abb. 3.15: Einfluss von LY294002 und Wortmannin auf die HRP-Permeabilität und den transepithelialen Widerstand (R<sup>t</sup>) von T84-Monolayern**

**A.)** Die HRP-Permeabilität unbehandelter Kontrollen (n = 8) wurde auf 100 % normiert und die HRP-Permeabilität der mit IL-4 (n = 7) und / oder LY294002 (LY) bzw. Wortmannin (WM) behandelten Zellen (n = 7 / 8) dazu ins Verhältnis gesetzt. **B.)** Der R<sup>t</sup>-Wert vor Zugabe der Inhibitoren wurde auf 100 % normiert und der R<sup>t</sup>-Wert nach 24 h dazu ins Verhältnis gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM (\*: P < 0,05 versus Kontrolle, \*\*: P < 0,001, \*\*\*: P < 0,0001 versus Kontrolle; #: P < 0,05, ##: P < 0,001 versus IL-4).

Die Zugabe der STAT6-Inhibitoren hatte keinen Einfluss auf die HRP-Permeabilität. Weder SAHA (81 ± 17 % SAHA-behandelt versus 100 ± 3 % Kontrolle; n = 7 / 6; Abb. 3.16 A) noch AS1517499 (82 ± 11 % AS1517499-behandelt versus 100 ± 5 % Kontrolle; n = 8; Abb. 3.16 C) konnten die HRP-Permeabilität gegenüber der Kontrolle verändern. Gleiches galt für die mit IL-4 inkubierten Zellen. Auch hier konnte weder SAHA (198 ± 20 % SAHA-behandelt versus 209 ± 21 % IL-4; n = 8 / 6; Abb. 3.16 A) noch AS1517499 (166 ± 39 % AS1517499-behandelt versus 190 ± 38 % IL-4; n = 8 / 9; Abb. 3.16 C) eine Veränderung der Permeabilität von HRP hervorrufen. Der R<sup>t</sup>-Wert der Kontrolle wurde durch die Zugabe von SAHA (104 ± 7 % SAHA-behandelt versus 101 ± 8 % in der Kontrolle; n = 7 / 6; Abb. 3.16 B) beziehungsweise AS1517499 (94 ± 5 % AS1517499-behandelt versus 99 ± 4 % in der Kontrolle; n = 8; Abb. 3.16 D) nicht verändert. Während AS1517499 den R<sup>t</sup> der mit IL-4 behandelten Zellen nicht veränderte (63 ± 6 % AS1517499-behandelt versus 60 ± 4 % IL-4; n = 8 / 9; Abb. 3.16 D), steigerte SAHA den durch IL-4 gesenkten R<sup>t</sup> wieder (79 ± 3 % SAHA-behandelt versus 59 ± 7 % IL-4; P < 0,05; n = 8 / 6; Abb. 3.16 B).



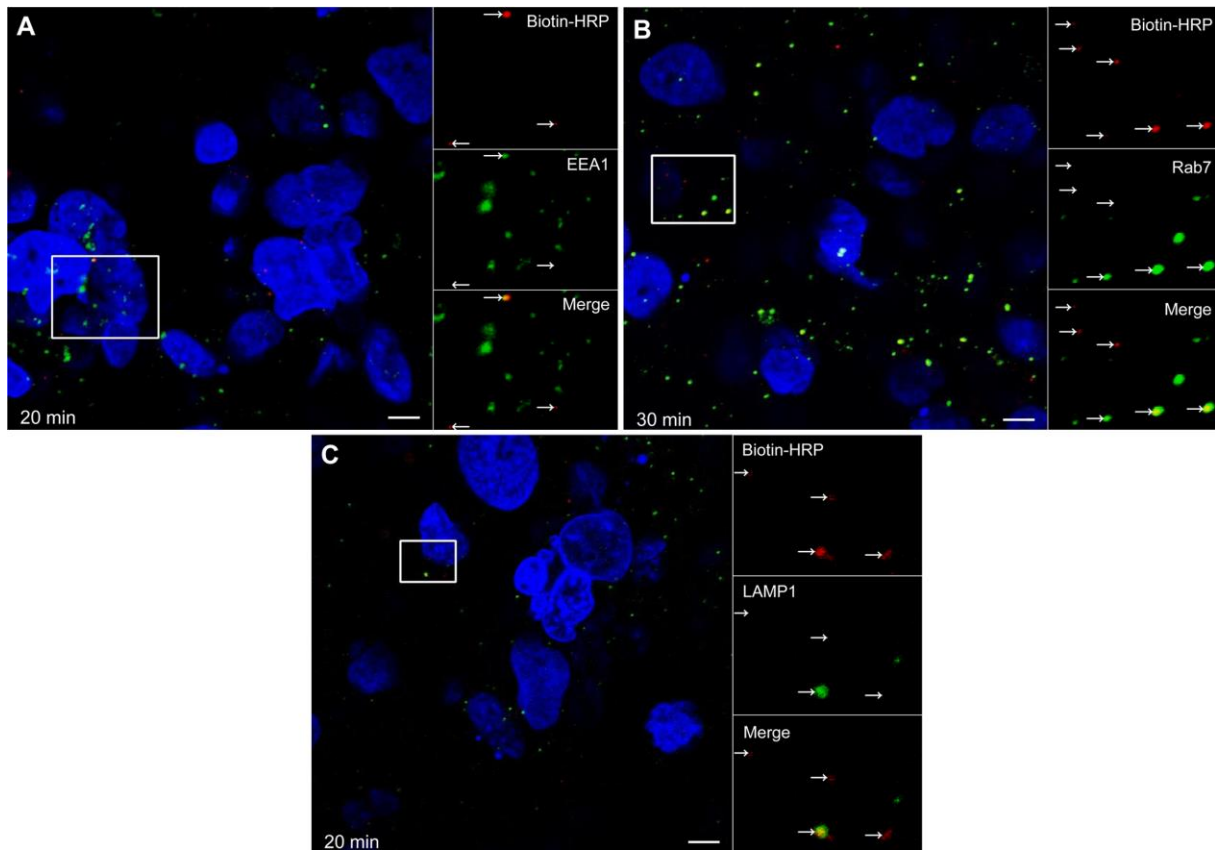
**Abb. 3.16: Einfluss von SAHA und AS1517499 auf die HRP-Permeabilität und den transepithelialen Widerstand (R<sup>t</sup>) von T84-Monolayern**

**A.) + C.)** Die HRP-Permeabilität unbehandelter Kontrollen (n = 6 / 8) wurde auf 100 % normiert und die HRP-Permeabilität der mit IL-4 (n = 6) und / oder SAHA (**A**) bzw. AS1517499 (AS; **C**) behandelten Zellen (n = 7 / 8) dazu ins Verhältnis gesetzt. **B.) + D.)** Der R<sup>t</sup>-Wert vor Zugabe der Inhibitoren wurde auf 100 % normiert und der R<sup>t</sup>-Wert nach 24 h dazu ins Verhältnis gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM (\*: P < 0,05 versus Kontrolle, \*\*: P < 0,001, \*\*\*: P < 0,0001 versus Kontrolle; #: P < 0,05 versus IL-4).



### 3.3.4 Zeitverlauf des HRP-Transports

Zusätzlich zu den bereits gezeigten Kollokalisationsfärbungen wurden zu den Zeitpunkten  $t_2$ ,  $t_5$ ,  $t_{10}$ ,  $t_{20}$  und  $t_{30}$  Färbungen mit biotinyliertem HRP und Markern für weitere am Transzytoseprozess beteiligte intrazelluläre Vesikel durchgeführt. Dabei wurde EEA1 (*Early endosome antigen 1*) als Marker für frühe Endosomen, Rab7 für späte Endosomen und LAMP1 (*Lysosomal-associated membrane protein 1*) für Lysosomen verwendet. Abb. 3.17 zeigt repräsentative Aufnahmen der Färbungen. In Tab. 3.4 sind die prozentual errechneten Kollokalisationsereignisse der jeweiligen Vesikelmarker mit der biotinylierten HRP zu den verschiedenen Zeitpunkten aufgeführt. EEA1 als auch LAMP1 zeigten insgesamt wenige Kollokalisierungen mit HRP und es gab zu keinem Zeitpunkt einen Unterschied zwischen Kontrolle und den mit IL-4 behandelten Zellen. Rab7 zeigte insgesamt eine hohe Kollokalisationsrate, die nach 10 bis 20 min am höchsten war. Die Kollokalisationsraten zwischen Kontrolle und den Zellen, die mit IL-4 behandelt waren, unterschied sich nicht signifikant, allerdings waren zum Teil deutliche Unterschiede erkennbar. Zu den Zeitpunkten  $t_2$  und  $t_5$  war in den mit IL-4 behandelten Zellen mehr HRP mit Rab7 kolokalisiert als in den Kontrollzellen. Zum Zeitpunkt  $t_{10}$  war die Kollokalisationsrate bei beiden Konditionen gleich hoch. Während zum Zeitpunkt  $t_{20}$  in den mit IL-4 behandelten Zellen wieder mehr HRP mit Rab7 kolokalisiert war als in Kontrollzellen, war die Kollokalisationsrate zum Zeitpunkt  $t_{30}$  in den Kontrollzellen höher. Von  $t_{20}$  zu  $t_{30}$  fand nämlich bereits eine signifikante Abnahme der Anzahl von Kollokalisierungen zwischen biotinylierter HRP und Rab7 bei den mit IL-4 inkubierten Zellen statt, während diese bei den Kontrollen nahezu gleich blieb.



**Abb. 3.17: Intrazelluläre Lokalisation von HRP und EEA1, Rab7 bzw. LAMP1 in T84-Monolayern**

Repräsentative Aufnahmen von Kollokalisationsfärbungen mit biotinylierter HRP (rot) und den Markern (grün) für frühe Endosomen (EEA1; **A**), späte Endosomen (Rab7; **B**) und Lysosomen (LAMP1; **C**) zu den Zeitpunkten  $t_{20}$  (**A** + **C**) und  $t_{30}$  (**B**). Pfeile markieren endozytierte HRP. Balken = 5  $\mu\text{m}$ .

**Tab. 3.4: Prozentuale Kolokalisation von biotinylierter HRP und EEA1, Rab7 bzw. LAMP1**

Die prozentualen Anteile der mit EEA1, Rab7 bzw. LAMP1 kolokalisierten HRP im Verhältnis zur Gesamt-HRP zu verschiedenen Zeitpunkten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. In Klammern sind die jeweiligen n-Zahlen angegeben. Werte mit dem gleichen hochgestellten Buchstaben sind signifikant unterschiedlich (<sup>a,b,f,h,l,n,o,p,q</sup>:  $P < 0,05$ ; <sup>c,d,e,i,j,k</sup>:  $P < 0,001$ ; <sup>g,m</sup>:  $P < 0,0001$ ).

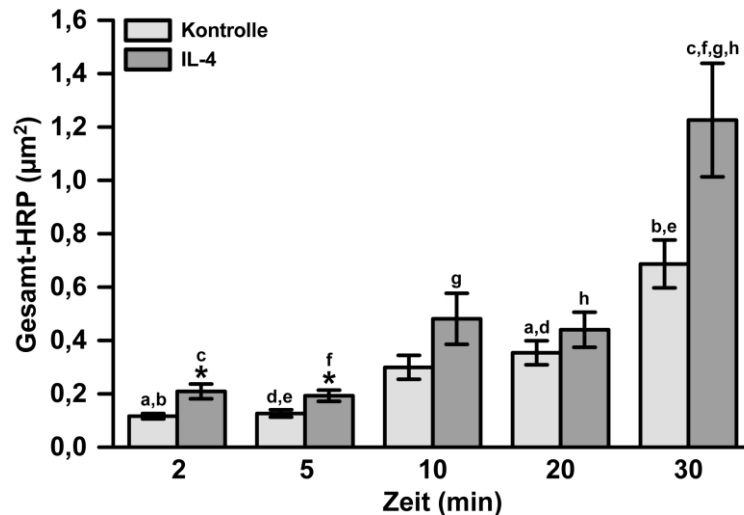
Vesikelmarker	Zeit (min)	Kolokalisation (% der Gesamt-HRP)	
		Kontrolle	IL-4
EEA1	2	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup> (7)	0 $\pm$ 0 (7)
	5	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup> (9)	0,2 $\pm$ 0,2 (9)
	10	2,3 $\pm$ 1,5 (11)	0,5 $\pm$ 0,4 (12)
	20	3,8 $\pm$ 1,6 <sup>a,b</sup> (15)	2,9 $\pm$ 1,6 (17)
	30	1,3 $\pm$ 0,9 (20)	0,2 $\pm$ 0,2 (18)
Rab7	2	0 $\pm$ 0 <sup>c,d,e</sup> (7)	0,7 $\pm$ 0,7 <sup>f,g,h</sup> (8)
	5	0,8 $\pm$ 0,8 <sup>i,j,k</sup> (8)	1,7 $\pm$ 1,1 <sup>l,m,n</sup> (9)
	10	46 $\pm$ 11 <sup>c,i,o</sup> (12)	45 $\pm$ 11 <sup>f,l,p</sup> (9)
	20	27,3 $\pm$ 6,4 <sup>d,j,o</sup> (13)	47,6 $\pm$ 7,6 <sup>g,m,q</sup> (12)
	30	32,5 $\pm$ 7,3 <sup>e,k</sup> (22)	9,1 $\pm$ 2,5 <sup>h,n,p,q</sup> (21)
LAMP1	2	0 $\pm$ 0 (8)	0 $\pm$ 0 (8)
	5	0 $\pm$ 0 (8)	0,6 $\pm$ 0,6 (9)
	10	0,05 $\pm$ 0,05 (11)	1,8 $\pm$ 0,9 (12)
	20	6,3 $\pm$ 3,4 (14)	3,7 $\pm$ 1,9 (13)
	30	0 $\pm$ 0 (15)	0 $\pm$ 0 (14)

Weiterhin wurde die intrazelluläre Gesamt-HRP-Fläche zu jedem Zeitpunkt berechnet (Abb. 3.18 / Tab. 3.5). Obwohl für die Färbungen zum Zeitpunkt  $t_{30}$  weniger biotinylierte HRP zu den T84-Monolayern zugegeben wurde als zu den früheren Zeitpunkten, war dort die intrazelluläre Gesamt-HRP-Fläche sowohl bei den Kontrollen als auch bei den mit IL-4 behandelten Zellen am höchsten.

Zu den Zeitpunkten  $t_2$  und  $t_5$  war im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Erhöhung der HRP-Gesamtfläche in den mit IL-4 behandelten Zellen erkennbar.

Sowohl bei den Kontrollen als auch bei den mit IL-4 behandelten Zellen veränderte sich die HRP-Menge zwischen 2 und 5 min nach HRP-Zugabe nicht. Zum Zeitpunkt  $t_{10}$  hatte sich die intrazelluläre Gesamt-HRP-Fläche gegenüber dem Zeitpunkt  $t_5$  mehr als verdoppelt. Zwischen 10 und 20 min nach HRP-Zugabe gab es keinen

Unterschied in der HRP-Menge in der Zelle, während diese sich vom Zeitpunkt  $t_{20}$  auf  $t_{30}$  vervielfachte. Über den genauen Faktor des Anstiegs ist keine Aussage möglich, da, wie bereits erwähnt, zum Zeitpunkt  $t_{30}$  weniger biotinylierte HRP eingesetzt wurde als zu den anderen Zeitpunkten.



**Abb. 3.18: Intrazelluläre Gesamt-HRP-Fläche zu verschiedenen Zeitpunkten**

Die berechnete Gesamt-HRP-Fläche der Kontrollen (hellgraue Balken; n = 48 - 108) und der mit IL-4 behandelten Zellen (dunkelgraue Balken; n = 49 - 95) zum jeweiligen Zeitpunkt ist als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Werte mit dem gleichen hochgestellten Buchstaben sind signifikant unterschiedlich, \* markieren einen signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (<sup>g,h</sup>: P < 0,05; <sup>a,d</sup>: P < 0,001; <sup>b,c,e,f</sup>: P < 0,0001; \*: P < 0,05).

**Tab. 3.5: Intrazelluläre Gesamt-HRP-Fläche zu verschiedenen Zeitpunkten**

Die berechnete Gesamt-HRP-Fläche zum jeweiligen Zeitpunkt ist als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. In Klammern sind die jeweiligen n-Zahlen angegeben. Werte mit dem gleichen hochgestellten Buchstaben sind signifikant unterschiedlich, \* markieren einen signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (<sup>g,h</sup>: P < 0,05; <sup>a,d</sup>: P < 0,001; <sup>b,c,e,f</sup>: P < 0,0001; \*: P < 0,05).

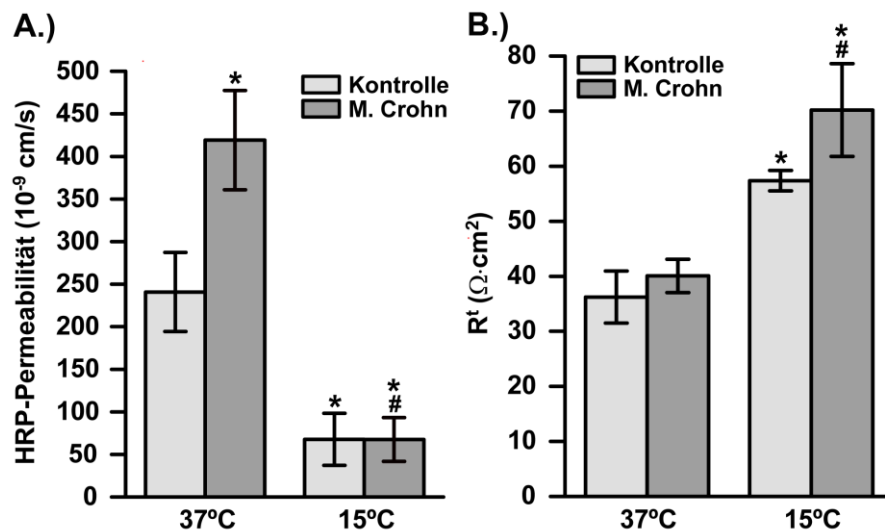
Zeit (min)	Gesamt-HRP-Fläche (µm <sup>2</sup> )	
	Kontrolle	IL-4
2	0,12 $\pm$ 0,01 <sup>a,b</sup> (48)	0,21 $\pm$ 0,03 <sup>*,c</sup> (49)
5	0,13 $\pm$ 0,01 <sup>d,e</sup> (52)	0,19 $\pm$ 0,02 <sup>*,f</sup> (52)
10	0,30 $\pm$ 0,04 (73)	0,48 $\pm$ 0,10 <sup>g</sup> (66)
20	0,35 $\pm$ 0,05 <sup>a,d</sup> (85)	0,44 $\pm$ 0,07 <sup>h</sup> (87)
30	0,69 $\pm$ 0,09 <sup>b,e</sup> (108)	1,23 $\pm$ 0,21 <sup>c,f,g,h</sup> (95)

### 3.4 HRP-Permeabilität bei Morbus Crohn

Um Unterschiede in der HRP-Permeabilität der Barriere zwischen gesunden Kontrollpatienten und Patienten mit Morbus Crohn zu untersuchen, wurden Biopsien aus dem Sigma in Ussing-Kammern eingespannt und die HRP-Permeabilität unter verschiedenen Bedingungen getestet.

Die HRP-Permeabilität war nach 90 min bei Patienten mit Morbus Crohn gegenüber gesunden Kontrollpatienten erhöht ( $419 \pm 58 \cdot 10^{-9}$  cm/s Morbus Crohn versus  $241 \pm 47 \cdot 10^{-9}$  cm/s Kontrolle;  $P < 0,05$ ;  $n = 5 / 6$ ; Abb. 3.19 A). Dabei handelte es sich um einen aktiven Transportprozess, da ein Absenken der Temperatur auf  $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$  die HRP-Permeabilität sowohl bei Kontrollpatienten ( $68 \pm 31 \cdot 10^{-9}$  cm/s;  $P < 0,05$ ;  $n = 6$ ; Abb. 3.19 A) als auch bei Patienten mit Morbus Crohn senkte ( $68 \pm 26 \cdot 10^{-9}$  cm/s;  $P < 0,05$ ;  $n = 4$ ; Abb. 3.19 A). Der  $R^t$ -Wert der Sigma-Biopsien von Morbus Crohn-Patienten war gegenüber dem der Kontrollpatienten unverändert ( $40 \pm 3 \Omega \cdot \text{cm}^2$  Morbus Crohn versus  $36 \pm 5 \Omega \cdot \text{cm}^2$  Kontrolle;  $n = 5 / 6$ ; Abb. 3.19 B). Die Temperaturabsenkung auf  $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$  erhöhte den  $R^t$ -Wert der Biopsien sowohl bei den Kontrollpatienten ( $57 \pm 2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ;  $P < 0,05$ ;  $n = 6$ ; Abb. 3.19 B), als auch bei den Patienten mit Morbus Crohn ( $70 \pm 8 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ;  $P < 0,05$ ;  $n = 4$ ; Abb. 3.19 B).

Zu früheren Zeitpunkten ( $t_{30}$  und  $t_{60}$ ) war die HRP-Permeabilität bei Patienten mit Morbus Crohn gegenüber gesunden Kontrollpatienten zwar erhöht, aber nicht so stark, dass dieser Unterschied statistische Signifikanz erreichte (Tab. 3.6). Die Abkühlung auf  $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$  zeigte stets eine starke Hemmung der HRP-Permeabilität (Tab. 3.6).



**Abb. 3.19: HRP-Permeabilität und transepithelialer Widerstand (R<sup>t</sup>) von Morbus Crohn-Patienten und gesunden Kontrollpatienten bei 37 °C und 15 °C**

**A.)** Die HRP-Permeabilität von unbehandelten Biopsien von Kontrollpatienten und Patienten mit Morbus Crohn bei 37 °C (n = 5 - 6) und 15 °C (n = 4 - 6) wurde zum Zeitpunkt t<sub>90</sub> ermittelt. **B.)** R<sup>t</sup>-Wert der Biopsien zum Zeitpunkt t<sub>90</sub>. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM (\*: P < 0,05 versus Kontrollbiopsie bei 37 °C; #: P < 0,05 versus Morbus Crohn-Biopsie bei 37 °C).

**Tab. 3.6: HRP-Permeabilität der Biopsien von Kontrollpatienten und Patienten mit Morbus Crohn bei 37 °C und 15 °C**

Die HRP-Permeabilität von unbehandelten Biopsien von Kontrollpatienten und Patienten mit Morbus Crohn bei 37 °C und 15 °C wurde zu den Zeitpunkten t<sub>30</sub>, t<sub>60</sub> und t<sub>90</sub> ermittelt. Die Werte sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. In Klammern sind die jeweiligen n-Zahlen angegeben. Werte mit dem gleichen hochgestellten Buchstaben sind signifikant unterschiedlich, \* markieren einen signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (<sup>a-e</sup>: P < 0,05; \*: P < 0,05).

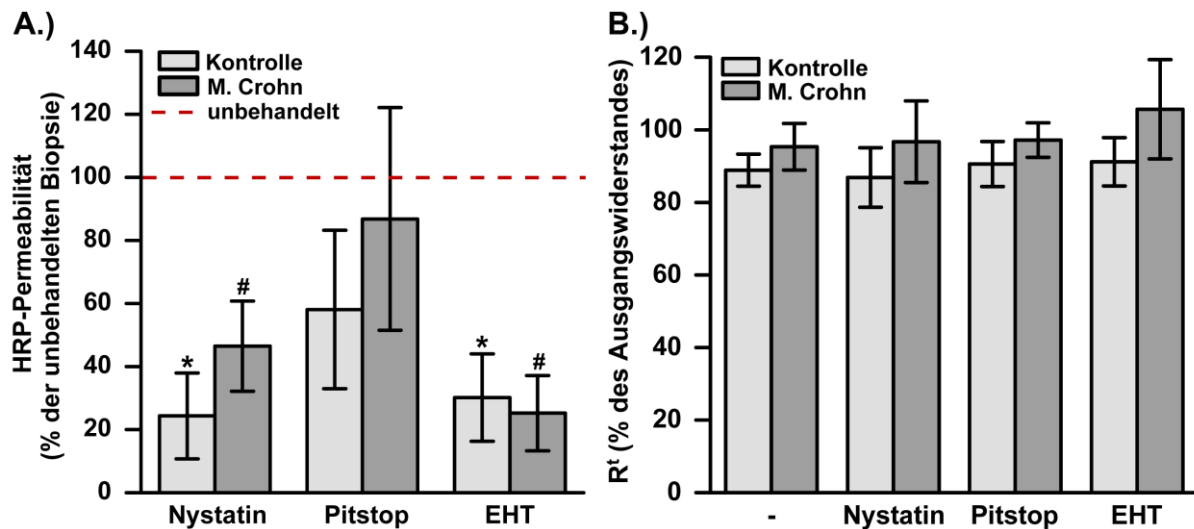
Zeit (min)	Temperatur	HRP-Permeabilität (10 <sup>-9</sup> cm/s)	
		Kontrolle	Morbus Crohn
30	37 °C	52 ± 17 <sup>a</sup> (6)	65 ± 23 (5)
	15 °C	10 ± 4 <sup>a</sup> (6)	6 ± 1 (4)
60	37 °C	176 ± 45 <sup>b</sup> (6)	269 ± 47 <sup>c</sup> (5)
	15 °C	31 ± 17 <sup>b</sup> (6)	29 ± 12 <sup>c</sup> (4)
90	37 °C	241 ± 47 <sup>d</sup> (6)	419 ± 58 <sup>*e</sup> (5)
	15 °C	68 ± 30 <sup>d</sup> (6)	68 ± 26 <sup>e</sup> (4)

Verschiedene in der Zellkultur wirksame Inhibitoren wurden eingesetzt, um zu untersuchen, auf welchem Weg HRP durch das Darmepithel transportiert wird. Die Hemmung durch die Inhibitoren wurde für jeden Patienten prozentual zu einer unbehandelten Biopsie prozentual ermittelt.

Der Clathrin-Inhibitor Pitstop 2 zeigte nach 90 min weder bei der Kontrolle (Hemmung auf  $58 \pm 25$  %;  $n = 2$ ; Abb. 3.20 A) noch bei den Patienten mit Morbus Crohn (Hemmung auf  $87 \pm 35$  %;  $n = 5$ ; Abb. 3.20 A) eine signifikante Hemmung der HRP-Permeabilität. Der  $R^t$  wurde durch Pitstop 2 nicht verändert ( $91 \pm 6$  % Pitstop 2 versus  $89 \pm 4$  % Kontrolle;  $n = 2 / 5$ ;  $97 \pm 5$  % Pitstop 2 versus  $95 \pm 6$  % Morbus Crohn;  $n = 5$ ; Abb. 3.20 B). Zu den Zeitpunkten  $t_{30}$  und  $t_{60}$  hemmte Pitstop 2 bei den Biopsien der Kontrollpatienten die HRP-Permeabilität, bei den Biopsien der Morbus Crohn-Patienten erhöhte der Inhibitor die Permeabilität allerdings (Tab. 3.7).

Die Inhibition der Caveolin-vermittelten Endozytose durch Nystatin verminderte die HRP-Permeabilität zum Zeitpunkt  $t_{90}$  sowohl bei der Kontrolle (Hemmung auf  $24 \pm 14$  %;  $P < 0,05$ ;  $n = 4$ ; Abb. 3.20 A), als auch bei Morbus Crohn-Patienten (Hemmung auf  $46 \pm 14$  %;  $P < 0,05$ ;  $n = 4$ ; Abb. 3.20 A). Nystatin hatte keinen Einfluss auf den  $R^t$  ( $87 \pm 8$  % Nystatin versus  $89 \pm 4$  % Kontrolle;  $n = 4 / 5$ ;  $97 \pm 11$  % Nystatin versus  $95 \pm 6$  % Morbus Crohn;  $n = 4 / 5$ ; Abb. 3.20 B). Auch zu den Zeitpunkten  $t_{30}$  und  $t_{60}$  konnte sowohl bei den Kontrollen als auch bei den Morbus Crohn-Biopsien eine Hemmung der HRP-Permeabilität durch Nystatin gezeigt werden (Tab. 3.7). Zum Zeitpunkt  $t_{30}$  war die Hemmung bei den mit Nystatin behandelten Morbus Crohn-Biopsien aufgrund der hohen Streuung nicht signifikant verschieden zu den unbehandelten Morbus Crohn-Biopsien (Tab. 3.7).

Die HRP-Permeabilität wurde durch den Inhibitor für die Makropinozytose, EHT 1864, bei den Kontrollpatienten (Hemmung auf  $30 \pm 14$  %;  $P < 0,05$ ;  $n = 4$ ; Abb. 3.20 A) als auch bei den Patienten mit Morbus Crohn vermindert (Hemmung auf  $25 \pm 12$  %;  $P < 0,05$ ;  $n = 5$ ; Abb. 3.20 A). Der  $R^t$  wurde durch EHT 1864 nicht verändert ( $91 \pm 7$  % EHT 1864 versus  $89 \pm 4$  % Kontrolle;  $n = 4 / 5$ ;  $106 \pm 14$  % EHT 1864 versus  $95 \pm 6$  % Morbus Crohn;  $n = 5$ ; Abb. 3.20 B). Auch zu den früheren Zeitpunkten ( $t_{30}$  und  $t_{60}$ ) hemmte EHT 1864 sowohl bei den Kontrollen als auch bei den Morbus Crohn-Biopsien die HRP-Permeabilität (Tab. 3.7).



**Abb. 3.20: Einfluss von Pitstop 2, Nystatin und EHT 1864 auf die HRP-Permeabilität und den transepithelialen Widerstand ( $R^t$ ) von Sigma-Biopsien von Kontrollpatienten und Patienten mit Morbus Crohn**

**A.)** Die HRP-Permeabilität der unbehandelten Kontrollbiopsien ( $n = 5$ ) und der unbehandelten Biopsien von Morbus Crohn-Patienten ( $n = 5$ ) wurde jeweils auf 100 % normiert (rote Linie) und die HRP-Permeabilität der mit Nystatin, Pitstop 2 oder EHT 1864 behandelten Biopsien ( $n = 2 - 5$ ) dazu ins Verhältnis gesetzt. **B.)** Der Ausgangs- $R^t$  wurde auf 100 % normiert und der  $R^t$ -Wert zum Zeitpunkt  $t_{90}$  dazu ins Verhältnis gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*:  $P < 0,05$  versus unbehandelte Kontrollbiopsie; #:  $P < 0,05$  versus unbehandelte Morbus Crohn-Biopsie).



**Tab. 3.7: Einfluss von Pitstop 2, Nystatin und EHT 1864 auf die HRP-Permeabilität von Sigma-Biopsien von Kontrollpatienten und Patienten mit Morbus Crohn**

Die HRP-Permeabilität der unbehandelten Kontrollbiopsien und der unbehandelten Biopsien von Morbus Crohn-Patienten wurde zu den Zeitpunkten  $t_{30}$ ,  $t_{60}$  und  $t_{90}$  jeweils auf 100 % normiert und die HRP-Permeabilität der mit Nystatin, Pitstop 2 oder EHT 1864 behandelten Biopsien zum jeweiligen Zeitpunkt dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. In Klammern sind die jeweiligen n-Zahlen angegeben. \* markieren einen signifikanten Unterschied zur jeweiligen Kontrolle ( $P < 0,05$ ).

Zeit (min)	Inhibitor	HRP-Permeabilität (% der unbehandelten Biopsie)	
		Kontrolle	Morbus Crohn
30	Nystatin	23 $\pm$ 13* (4)	74 $\pm$ 61 (4)
	Pitstop 2	67 $\pm$ 1* (2)	334 $\pm$ 188 (5)
	EHT 1864	21 $\pm$ 12* (4)	35 $\pm$ 12* (5)
60	Nystatin	19 $\pm$ 10* (4)	30 $\pm$ 15* (4)
	Pitstop 2	62 $\pm$ 1* (2)	186 $\pm$ 80 (5)
	EHT 1864	17 $\pm$ 7* (4)	27 $\pm$ 12* (5)
90	Nystatin	24 $\pm$ 14* (4)	46 $\pm$ 4* (4)
	Pitstop 2	58 $\pm$ 25 (2)	86 $\pm$ 35 (5)
	EHT 1864	30 $\pm$ 14* (4)	25 $\pm$ 12* (5)

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Morbus Crohn-relevante Mediatoren und ihre Wirkung auf T84-Monolayer

Bei der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn sind zahlreiche Zytokine und Entzündungsmediatoren verändert [41, 48, 63-72, 78]. In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  sowie Histamin auf ihre Wirkung auf die Permeabilität von HRP in T84-Monolayern untersucht.

#### 4.1.1 IL-4 erhöht die HRP-Permeabilität im T84-Zellmodell

Von den getesteten Morbus Crohn-relevanten Mediatoren erhöhte nur das Zytokin IL-4 die HRP-Permeabilität in relevantem Ausmaß. Die Permeabilitätserhöhung durch IL-4 war zu erwarten, da die Erhöhung der Permeabilität von HRP unter dem Einfluss dieses Zytokins bereits von anderen gezeigt worden ist [83, 85, 88].

Überraschend hingegen war, dass keiner der anderen Mediatoren die HRP-Permeabilität beeinflusste. Für TNF $\alpha$  sowie für IFN $\gamma$  wurde eine Erhöhung der HRP-Permeabilität in T84-Monolayern sogar schon publiziert [48, 86, 112]. Die Erhöhung der Permeabilität durch diese beiden Zytokine konnten wir in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigen. Bei den Versuchen dieser Arbeit wurde zwar eine Kombination aus TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  eingesetzt, aber da die beiden Zytokine synergistisch auf die intestinale epitheliale Barriere wirken [107, 114, 198, 199], ist es unwahrscheinlich, dass sie in diesem Fall antagonistisch wirken und den permeabilitätserhöhenden Effekt des anderen Zytokins aufheben sollten. Möglich wäre jedoch, dass die permeabilitätssteigernde Wirkung von TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  erst nach 48-stündiger Inkubation eintritt. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiter untersucht, aber in einer Studie, in der die parazelluläre Permeabilität von FITC-Dextran (3 kDa) an T84-Monolayern untersucht worden war, wobei die Erhöhung der Permeabilität erst nach 48 h, nicht aber schon nach 24 h aufgetreten war [114].

Auch für IL-1 $\beta$  wurde bereits eine Erhöhung der Endozytoserate für Formaldehyd-behandeltes Rinderserumalbumin gezeigt [198]. Hierbei handelt es sich jedoch um ein anderes Markermolekül, das rezeptorvermittelt transportiert wird [200]. Da der Endozytoseprozess molekülspezifisch ist [130], wurden wahrscheinlich ein oder

mehrere andere Transportwege durch die Zellen hierfür genutzt. Weiterhin handelte es sich bei der Studie von Martinez et al. um sinusoidale Leberendothelzellen [198], die vermutlich andere Transporteigenschaften aufweisen als intestinale Epithelzellen. Für IL-1 $\beta$  und IL-6 zeigten diverse Studien an Zellmonolayern eine erhöhte Durchlässigkeit der intestinalen Barriere, jedoch nur für parazelluläre Marker [77, 198, 199, 201]. Allerdings zeigte eine weitere Untersuchung an der intestinalen Zelllinie Caco2-BBE, dass IL-6 eine Verminderung der parazellulären Permeabilität für FITC-Dextran (4 kDa) verursacht [202].

Der Entzündungsmediator Histamin zeigte in dieser Arbeit keinen Einfluss auf die Permeabilität von HRP. Bei Nahrungsmittelallergie wurde über einen Zusammenhang zwischen Histamin und einem erhöhten transepithelialen Transport von HRP spekuliert [129]. Hierzu gibt es jedoch keine publizierten experimentellen Belege, die dies bestätigen, auch wenn in kornealen Endothel- und Epithelzellen eine Steigerung der HRP-Permeabilität durch Histamin gemessen werden konnte [203, 204]. Die Wirksamkeit des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Histamins zeigte sich jedenfalls durch den Anstieg des Kurzschlussstroms ( $I_{sc}$ ) wenige Minuten nach Histamin-Zugabe.

Zusammenfassend lässt sich bis hierher sagen, dass die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  sowie der Entzündungsmediator Histamin die HRP-Permeabilität in T84-Monolayern nicht beeinflussten. Ob es möglicherweise bei Kombination von verschiedenen Zytokine oder unter Verwendung anderer Konzentrationen und späterer Beobachtungszeiträume zu einer Beeinflussung kommt, bleibt offen.

#### **4.1.2 Einfluss von IL-4 auf die parazelluläre Barriere**

Um einen umfassenderen Überblick über die Wirkung des Zytokins IL-4 auf die intestinale Barriere zu bekommen, wurde mit Hilfe der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie untersucht, ob die durch IL-4 verursachte Abnahme des epithelialen Widerstands ( $R^{epi}$ ) auf eine Verminderung des parazellulären Widerstands ( $R^{para}$ ) oder des transzellulären Widerstands ( $R^{trans}$ ) zurückzuführen ist oder ob sie von beiden verursacht wird. Parallel dazu wurde unter diesem Aspekt die Expression der TJ-Proteine Claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7 und -8 sowie Occludin und Tricellulin, als die wesentlichen Determinatoren des parazellulären Widerstands, unter dem Einfluss von IL-4 mittels Western Blot untersucht. Eine so umfassende

Analyse der TJ-verändernden Wirkung von IL-4 in intestinalen Zellen ist bisher in Hinblick auf den Barriere-modulierenden Einfluss proinflammatorischer Zytokine, insbesondere von IL-4, noch nicht durchgeführt worden.

Das kanalbildende Claudin-2 zeigte eine deutlich erhöhte Expression nach der Inkubation mit IL-4, während das abdichtende Claudin-4 vermindert exprimiert wurde. Alle anderen untersuchten TJ-Proteine waren unverändert. Wisner und Mitarbeiter konnten nach der Inkubation mit IL-4 keinen Unterschied in der Claudin-4-Expression bei T84-Monolayern feststellen, die gesteigerte Expression von Claudin-2 wurde jedoch auch von ihnen gemessen [87].

Mit Hilfe der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie konnten wir zeigen, dass der durch Inkubation mit IL-4 verminderte  $R^{\text{epi}}$  auf einer Abnahme sowohl von  $R^{\text{para}}$  als auch von  $R^{\text{trans}}$  beruht. Dies zeigt, dass zum einen die Veränderung der Barriere-eigenschaften durch Modifikation der epithelialen Ausstattung mit TJ-Proteinen für die Abnahme von  $R^{\text{epi}}$  verantwortlich war. Zum anderen lässt sich aus dem verminderten  $R^{\text{trans}}$ , zusammen mit der unveränderten Kapazität (als Indikator der exponierten Membranfläche) schließen, dass vermehrt Transportproteine (oder Ionenkanäle) in den Zellmembranen der Epithelzellen exprimiert wurden. Demgegenüber haben sich die kapazitiven Membraneigenschaften nicht verändert, was auf eine weitgehende Konstanz der Geometrie des Epithels, wie beispielsweise der Zellhöhe, hindeutet. Diesen morphologischen Aspekten wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiter nachgegangen.

Der durch die Inkubation mit IL-4 verminderte  $R^{\text{para}}$  ist, zumindest größtenteils, durch die erhöhte Expression von Claudin-2 zu erklären. Durch die Transfektion von Claudin-2 in MDCK-Zellen konnte gezeigt werden, dass dieses TJ-Protein als Kationen- und Wasserkanal den  $R^{\text{t}}$  senken kann [29, 30, 205]. Claudin-2 wird im Darm unter entzündlichen Bedingungen vermehrt exprimiert, wie zum Beispiel bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa [50, 206, 207]. Einhergehend damit ist der  $R^{\text{t}}$  gegenüber gesundem Darm reduziert [50, 208]. Allerdings trägt auch die verminderte Expression von Claudin-4 sehr wahrscheinlich zur Verminderung des  $R^{\text{t}}$  bei. In mehreren Studien mit renalen und intestinalen Zelllinien wurde gezeigt, dass eine erhöhte Expression von Claudin-4 mit einem erhöhten  $R^{\text{t}}$  einhergeht, so dass diesem TJ-Protein im Kontext der anderen intestinal exprimierten TJ-Proteine eine abdichtende Barrierefunktion zuzusprechen ist [24, 209-212]. Weiterhin wurde bei Patienten mit kollagener Colitis eine Abnahme

des R<sup>t</sup>, begleitet von einer verringerten Expression der TJ-Proteine Claudin-4 und Occludin, gemessen [213].

## **4.2 HRP-Transport durch T84-Monolayer**

### **4.2.1 Transzellulärer Transportweg der Meerrettich-Peroxidase (HRP)**

In mehreren Studien wurde bereits postuliert, dass HRP sowohl trans- als auch parazellulär durch das Epithel hindurch transportiert wird [46, 83, 85, 88, 181, 182]. Der parazelluläre Transport von HRP ist allerdings eher gering, da HRP einen Durchmesser von mindestens 25 Å hat [214, 215] und somit zu groß ist, um die bizellulären TJs der parazellulären Barriere zu durchqueren. Claudin-2 formt beispielsweise kationen- und wasserpermeable Kanäle, deren Poren im engsten Bereich 6,5 bis 8 Å groß sind [216, 217]. Eine größere Durchtrittsstelle bildet die 10 nm große trizelluläre Zentralpore, die nach heutigem Stand des Wissens vor allem vom Hauptprotein der trizellulären TJ, dem Tricellulin, abgedichtet wird [218]. In einer Überexpressionsstudie wurde direkt gezeigt, dass der HRP-Transport durch die Überexpression von Tricellulin in der trizellulären TJ nicht beeinflusst wird [17], was am ehesten damit zu erklären ist, dass HRP aufgrund seiner Größe nicht über die trizellulären TJs transportiert wird.

Möglicherweise wird HRP, nachdem es in die Zellen aufgenommen wird, parazellulär in den sogenannten lateralen interzellulären Spalt (LIS) abgegeben. Dafür spricht die Tatsache, dass HRP in elektronenmikroskopischen Aufnahmen erst nach längerer Inkubationszeit (nach 30 min) im parazellulären Spalt nachweisbar ist, zu früheren Zeitpunkten (bis 20 min) aber nicht [48, 181, 182]. Allerdings ist es nicht auszuschließen, dass ein kleiner Teil der HRP durch den parazellulären Spalt gelangt, da auch bei Kälte ein geringer HRP-Transport nachgewiesen werden konnte [83]. Ein Absenken der Temperatur hemmt den aktiven, endosomalen Transport, während der passive, parazelluläre Transportweg weitgehend unbeeinflusst bleibt. In dieser Arbeit senkten wir die Temperatur allerdings nur auf 15 °C ab, und nicht wie in vorhergehenden Studien auf 4 °C [83], da bei niedrigen Temperaturen auch Veränderungen in den TJs auftreten können. Diese Einschätzung beruht auf der Tatsache, dass in der intestinalen Zelllinie HT29 bei Temperaturen unter 10 °C keine TJs ausgebildet werden konnten [219]. Am wahrscheinlichsten ist es deshalb, dass

durch die geringere Abkühlung auf nur 15 °C in unserem Versuchsdesign nicht alle aktiven Prozesse in den Zellen gehemmt wurden, da bei den gekühlten Zellen immer noch eine Erhöhung der HRP-Permeabilität durch IL-4 erkennbar war. In Herzmuskelzellen wurde bereits gezeigt, dass ein Absenken der Temperatur auf 17 °C den HRP-Transport teilweise, aber nicht vollständig hemmt [220]. Dies wird auch unterstützt durch den Befund, dass durch die Hemmung von Dynamin 2 die durch IL-4 verursachte Permeabilitätserhöhung für HRP auf Kontrollniveau gesenkt werden konnte, so dass man davon ausgehen kann, dass in diesem Kontext transzytotische Prozesse für den HRP-Transport verantwortlich sind. Dynamin 2 ist eine große GTPase, die unter anderem an der Bildung und Abschnürung endozytotischer Vesikel beteiligt ist [139, 221]. Während die Beteiligung von Dynamin zunächst nur an der Clathrin-vermittelten Endozytose nachgewiesen wurde, konnte später auch gezeigt werden, dass diese GTPase an Caveolin-vermittelten Endozytoseprozessen und selbst an der Makropinozytose mitwirkt [221, 222].

#### **4.2.2 Endozytosemechanismen des HRP-Transports**

HRP wird in der Literatur häufig als Marker für die „*fluid phase*“ Endozytose genannt [135, 144, 184, 223, 224]. Dieser Begriff ist nicht ganz eindeutig definiert, aber in den meisten Fällen ist er mit der Makropinozytose gleichzusetzen [135, 224, 225]. Neuere Untersuchungen vermuten HRP allerdings auch in Clathrin-umhüllten Gruben (CCPs) und in Caveolae [184, 226, 227]. Es ist also noch nicht eindeutig geklärt, welche Endozytosewege bei der HRP-Transzytose beteiligt sind. Um weitere Aufschlüsse hierüber zu geben, wurden in dieser Arbeit Inhibitoren für die Clathrin-vermittelte und die Caveolin-vermittelte Endozytose und die Makropinozytose eingesetzt. Unterstützt wurden die daraus gewonnenen Ergebnisse durch Kolokalisationsfärbungen von intrazellulären Vesikeln und biotinylierter HRP.

Betrachtet man ausschließlich die HRP-Permeabilitätsmessungen, so sprechen die Ergebnisse für die Nutzung mehrerer Endozytosewege für die HRP-Transzytose, da Inhibitoren aller drei untersuchten Wege eine Hemmung der HRP-Permeabilität zeigten. Auch die Tatsache, dass die maximale Hemmung der HRP-Permeabilität durch die eingesetzten Inhibitoren (Ausnahme: Nystatin, 15 %) lediglich knapp unter 50 % betrug, zeigt, dass entweder mehrere Wege gleichzeitig an der HRP-Transzytose beteiligt sind, oder dass durch die Hemmung eines Endozytoseweges

ein anderer aktiviert beziehungsweise hochreguliert wird. Diese Nutzung eines alternativen Weges bei der Hemmung der normalerweise genutzten Endozytoseroute wurde bereits in einigen Zelllinien gezeigt [133, 222, 228]. Auch die Nutzung mehrerer Endozytosewege durch das Markermolekül BSA sowie zweier Viren wurde bereits nachgewiesen [228-230]. Eine Hemmung der Makropinozytose durch die Überexpression von Caveolin-1 und umgekehrt die Heraufregulierung der Makropinozytose durch Silencing von Caveolin-1 verdeutlicht diese Vernetzung der unterschiedlichen Endozytosewege [225]. Einige Kinasen und GTPasen sind außerdem an mehreren Endozytosewegen beteiligt, die sie teilweise gegensätzlich beeinflussen [231, 232].

In den Immunfluoreszenzfärbungen konnten wir allerdings bei den frühen endozytotischen Vesikeln lediglich zwischen Caveolin-1, dem Marker für Caveolae, und der biotinylierten HRP eine deutliche Anzahl an Kollokationen finden. Dieses Ergebnis ist sehr überraschend, da HRP, wie bereits erwähnt, in der Literatur häufig als Marker für die Makropinozytose eingesetzt wurde [135, 144, 184, 223, 224]. Das von uns als Makropinosomenmarker benutzte SNX5 (*sorting nexin 5*) ist ein Protein, das in verschiedenen Zelltypen an der Bildung und Reifung von Makropinosomen beteiligt ist und daher in der Literatur bereits als Marker für Makropinosomen verwendet wurde [144, 233, 234]. Es koloalisiert mit EEA1 und Rab5, den Markern für frühe Endosomen, und mit Rab7, einem Marker für späte Endosomen [144], so dass es also nicht ausschließlich auf Makropinosomen lokalisiert ist. Einen spezifischen Antikörper, der gegen Makropinosomen gerichtet ist, gibt es derzeit nicht [232]. Es ist also nicht auszuschließen, dass in Makropinosomen lokalisiertes HRP aufgrund des Fehlens eines spezifischen Antikörpers nicht nachgewiesen werden konnte. Die Tatsache, dass zwei Inhibitoren, die in die Regulierung der Makropinozytose eingreifen [235, 236], die HRP-Permeabilität in meinen Untersuchungen senken konnten, unterstützt diese Annahme.

Die sehr geringe Anzahl der Kollokationen zwischen Clathrin und der biotinylierten HRP spricht dafür, dass die Clathrin-vermittelte Endozytose für den HRP-Transport keine signifikante Rolle spielt. Anders als bei Makropinosomen gibt es einen spezifischen Antikörper, der gegen das Protein Clathrin gerichtet ist, und somit sind klare Aussagen über eine Kollokation zwischen HRP und Clathrin-umhüllten Gruben beziehungsweise Vesikeln möglich. Die Tatsache, dass Pitstop 2, ein als spezifisch eingeschätzter Inhibitor der Clathrin-vermittelten Endozytose [195], die

HRP-Permeabilität senken konnte, steht allerdings im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Kolokalisationsfärbungen. Chlorpromazin, ein weiterer Inhibitor der Clathrin-vermittelten Endozytose [196], hatte wiederum keinen Einfluss auf die HRP-Permeabilität, was die Ergebnisse der Kolokalisationsfärbungen unterstützt. Der Grund für die Permeabilitätshemmung der HRP durch Pitstop 2 bleibt ungeklärt, aber eine Beteiligung der Clathrin-vermittelten Endozytose am HRP-Transport halten wir für eher unwahrscheinlich. Der durch die Hemmung der Rho GTPase Rac1 bewirkte Rückgang in der HRP-Permeabilität unterstützt die Vermutung, dass HRP durch die Caveolin-vermittelte Endozytose und Makropinozytose transportiert wird, nicht aber über die Clathrin-vermittelte Endozytose. Aktivierte Rac1 steigert vor allem die Makropinozytose, aber auch die Caveolin-vermittelte Endozytose [135, 174, 231], während die Clathrin-vermittelte Endozytose sogar gehemmt wird [231, 237, 238].

In dieser Arbeit gab es keinen Hinweis darauf, dass unter der Einwirkung von IL-4 ein anderer Endozytosemechanismus aktiviert wird als unter Kontrollbedingungen. Alle eingesetzten Inhibitoren hatten sowohl in der Kontrolle als auch in den mit IL-4 behandelten Zellen die gleiche Wirkungsweise. Auch bei den Aufnahmen der Kolokalisationsfärbungen gab es keinen Anhaltspunkt für unterschiedliche Endozytosemechanismen bei den beiden Konditionen.

Um Aufschlüsse über den durch IL-4 verursachten Permeabilitätsanstieg der HRP zu erhalten, wurden Signalwege untersucht, die durch die Bindung von IL-4 an seinen Rezeptor aktiviert werden, namentlich den PI3K-Signalweg und den STAT6 (*signal transducer and activator of transcription 6*)-Signalweg [239]. Einhergehend mit den Ergebnissen von Di Leo und Mitarbeitern [85] konnte in meiner Arbeit gezeigt werden, dass die durch IL-4 verursachte Erhöhung der HRP-Permeabilität PI3K-abhängig, aber STAT6-unabhängig reguliert wird. Überraschenderweise konnte die Behandlung mit den PI3K-Inhibitoren LY294002 und Wortmannin nach der 24-stündigen Inkubation mit IL-4 die Permeabilität von HRP nicht senken. Für unbehandelte T84-Zellen wurde aber bereits gezeigt, dass eine kurzzeitige Inkubation mit LY294002 keine Veränderungen der HRP-Permeabilität hervorruft [85]. Daten über Zytokin-vorbehandelte Zellen, die nur kurzzeitig mit einem PI3K-Inhibitor inkubiert wurden, gibt es bisher noch nicht. Möglicherweise wurden bei der durch IL-4 in Gang gesetzten Signalkaskade Proteine neu gebildet, die an der HRP-Transzytose beteiligt sind. Diese Neubildung von Proteinen könnte durch Vorinkubation mit den PI3K-Inhibitoren gehemmt sein, während die an die IL-4-



Inkubation anschließende Behandlung mit den gleichen Inhibitoren ohne Effekt bleibt, da die Proteine bereits synthetisiert sind. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass eine Hemmung der Proteinsynthese die durch IL-4 vermittelte Erhöhung der HRP-Permeabilität verhindert [85].

Zusammenfassend konnten wir in dieser Arbeit zeigen, dass HRP über den Caveolin-vermittelten Endozytoseweg transportiert wird. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse in der Literatur und den von uns erlangten Ergebnissen mit Inhibitoren der Makropinozytose ist davon auszugehen, dass HRP auch auf dem makropinozytotischen Weg zu weiteren intrazellulären Vesikeln gelangt. Eine Involvierung der Clathrin-vermittelten Endozytose ist zwar nicht komplett auszuschließen, aber sehr unwahrscheinlich. Ob noch weitere Wege involviert sind, bleibt offen. Die Regulierung des durch IL-4 verursachten Anstiegs der HRP-Permeabilität erfolgt durch den PI3K-Signalweg.

#### **4.2.3 Zeitverlauf des HRP-Transports**

Um Aussagen über den zeitlichen Verlauf des HRP-Transports innerhalb der T84-Monolayer treffen zu können, wurde die Kolokalisation von biotinylierter HRP mit verschiedenen intrazellulären Vesikeln untersucht. Dafür wurden die T84-Monolayer 2 – 30 Minuten mit biotinylierter HRP inkubiert. Anhand von anschließenden Immunfluoreszenzfärbungen mit Clathrin, Caveolin-1, SNX5 und Markern für frühe Endosomen (EEA1; *early endosome antigen 1*), späte Endosomen (Rab7) und Lysosomen (LAMP1; *lysosomal-associated membrane protein 1*) konnten die Kolokalisationen mit der ebenfalls gefärbten HRP analysiert werden.

Wie bereits im vorigen Kapitel (4.2.2) diskutiert, konnten wir nur wenige bzw. keine Kolokalisationen mit SNX5, dem Marker für Makropinosomen, und Clathrin finden. Die Kolokalisationsfärbungen von HRP und Caveolin-1 zeigen, dass bereits nach 2 Minuten HRP in Caveolae aufgenommen wurde. In den Zellen, die mit IL-4 inkubiert wurden, scheint HRP schneller aufgenommen zu werden, da nach 5 Minuten deutlich mehr HRP mit Caveolin-1 kolokalisiert war als in Kontrollzellen. Zu späteren Zeitpunkten ist in den IL-4-behandelten Zellen etwa gleich viel oder sogar weniger HRP in Caveolae als in den Kontrollen. Weiterhin war zu den Zeitpunkten  $t_{20}$  und  $t_{30}$  weniger HRP mit Caveolin-1 kolokalisiert als zum Zeitpunkt  $t_{10}$ . Dies deutet darauf hin, dass die HRP-Aufnahme an der apikalen Plasmamembran nicht kontinuierlich

stattfindet, sondern nach etwa 20 Minuten stagniert. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die durch Ein- oder Ausstülpungen reduzierte Oberfläche der Plasmamembran, welche dazu führt, dass weitere Endozytoseprozesse erschwert werden [240].

Wir konnten insgesamt nur wenige Kollokalisierungen mit EEA1, dem Marker für frühe Endosomen (EEs), finden. Möglicherweise fusionieren bzw. reifen die Caveolae bzw. Makropinosomen direkt zu späten Endosomen (LEs) und Lysosomen und umgehen so mit ihrem Inhalt die EEs. Für Caveolae wurde dieses Phänomen bereits gezeigt [141, 142]. Makropinosomen bilden Extensionen zu den EEs, über die Moleküle transportiert werden, die zurück zur Plasmamembran recycelt werden. Der Rest des Makropinosoms reift und fusioniert zu LEs und Lysosomen [143, 144]. Vermutlich wird nur wenig HRP zur Plasmamembran recycelt, so dass ein großer Teil der aufgenommenen HRP in die LEs und Lysosomen gelangt, ohne vorher die EEs zu passieren. In einer Untersuchung an MDCK-Zellen wurde gezeigt, dass bei apikaler HRP-Zugabe mit anschließender Inkubation in HRP-freiem Medium nach 10 beziehungsweise 20 Minuten nur etwa 13 % beziehungsweise 2 % der aufgenommenen HRP recycelt wird [241].

Mit Rab7, dem Marker für LEs, fanden wir eine große Anzahl an Kollokalisierungen. Während nach 20 Minuten mehr HRP in Rab7-positiven Vesikeln der mit IL-4 behandelten Zellen lokalisiert war, konnten wir nach 30 Minuten deutlich mehr Kollokalisierungen in den Kontrollzellen finden. Daraus lässt sich wiederum schließen, dass der HRP-Transport in den mit IL-4 behandelten Zellen schneller stattfindet. In diesen Zellen ist das meiste HRP zu einem früheren Zeitpunkt in den LEs lokalisiert als in den Kontrollen. Als Folge davon ist zum Zeitpunkt, an dem in den Kontrollen das meiste HRP in den LEs zu finden ist, in den IL4-behandelten Zellen bereits nicht mehr so viel HRP vorhanden. Die Beobachtung, dass zu einem späteren Zeitpunkt weniger HRP mit Rab7 kollokalisiert, unterstützt die Vermutung, dass die HRP-Aufnahme nicht kontinuierlich stattfindet.

Wir konnten nur wenige Kollokalisierungen mit dem lysosomalen Marker LAMP1 finden. Die Ursache hierfür ist möglicherweise, dass HRP beziehungsweise das Biotinlabel an der HRP im Lysosom degradiert wurde und so die Bindung des Streptavidin nicht mehr zustande kam. Des Weiteren wurde bereits darüber berichtet, dass die Fixierung der Zellen zu einer Schädigung der Lysosomen führen kann, was die Anzahl der erkennbaren Kollokalisationsereignisse gegenüber dem Live cell imaging vermindert [168, 242]. Die meisten Kollokalisierungen zwischen HRP und

LAMP1 konnten wir sowohl für die unbehandelten als auch für die mit IL-4 behandelten Zellen nach 20-minütiger Inkubation detektieren. Möglicherweise ist dies der Zeitpunkt, zu dem der größte Teil der HRP gerade in die Lysosomen gelangt ist, ohne dass bereits eine Degradation stattgefunden hat. Einhergehend mit diesem Ergebnis wurde in anderen Arbeiten gezeigt, dass Makropinosomen 15 bis 25 Minuten nach ihrer Entstehung mit LEs und Lysosomen fusionieren [232, 233]. Nach 30 Minuten konnten wir weder für die unbehandelten noch für die mit IL-4 inkubierten Zellen Kolokalisationen zwischen HRP und LAMP1 finden, was in der Tat wiederum dafür spricht, dass HRP im Lysosom degradiert wird, so dass kein Nachweis der HRP in den Lysosomen mehr möglich war. In einer Studie wurde gezeigt, dass in der intestinalen Zelllinie HT29-19A 90 % der endozytierten HRP degradiert wird. Dieser Anteil wurde durch IFN $\gamma$  nicht verändert, obwohl die Permeabilität für HRP zunahm [243].

Nach 30 Minuten konnten wir insgesamt wenige Kolokalisationen finden, obwohl die Gesamtmenge an intrazellulärem HRP zu diesem Zeitpunkt am höchsten war. Dies spricht dafür, dass es weitere intrazelluläre Vesikel gibt, die an der HRP-Transzytose beteiligt sind. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um Exosomen, die aus späten Endosomen entstehen und ihren Inhalt durch Fusion mit der Plasmamembran freigeben [157]. Nicht auszuschließen ist allerdings auch, dass durch die Fixierung der Vesikelinhalt in das Zytoplasma freigegeben wurde, wie es bereits für Lysosomen gezeigt wurde [168].

Zu jedem Zeitpunkt war die Menge an endozytierter HRP in IL-4 behandelten Zellen größer als in den Kontrollen, auch wenn dieser Unterschied nur zu den Zeitpunkten  $t_2$  und  $t_5$  signifikant war. Dies unterstützt die aus den Permeabilitätsmessungen gewonnenen Ergebnisse, die stets eine Erhöhung der HRP-Permeabilität durch IL-4 zeigten. Die Tatsache, dass es nur kurz nach HRP-Zugabe einen signifikanten Unterschied zwischen Kontrolle und IL-4 gibt, bestätigt die Hypothese, dass bei den mit IL-4 behandelten Zellen anfänglich schneller HRP in die Zellen aufgenommen wird. Nach 10 Minuten befand sich sowohl bei den Kontrollen als auch bei den Zellen, die mit IL-4 inkubiert wurden, etwa die Hälfte der aufgenommenen HRP in den späten Endosomen und auch in den Lysosomen war eine kleine Menge HRP lokalisiert. Dies spricht dafür, dass nach 10 Minuten bereits HRP auf der basalen Seite abgegeben wurde und sich ein Fließgleichgewicht eingestellt hat. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse, dass die Inkubation der Zellen mit IL-4 immer eine

Erhöhung der HRP-Permeabilität verursachte, und den bereits diskutierten Ergebnisse der Kolokalisationsfärbungen mit intrazellulären Vesikelmarkern kann man davon ausgehen, dass HRP bei den mit IL-4 behandelten Zellen insgesamt schneller durch die Zellen transportiert wurde.

Insgesamt weisen die Ergebnisse der Kolokalisationsfärbungen darauf hin, dass die HRP in den mit IL-4 behandelten Zellen schneller transzytiert wird und dass die HRP-Aufnahme an der apikalen Plasmamembran nach ca. 20 Minuten stagniert. Widersprüchlich hierzu ist allerdings, dass die intrazelluläre HRP-Menge nach 30-minütiger Inkubation am höchsten war. Möglicherweise fusionieren die Exosomen (oder weitere intrazelluläre Vesikel) nicht sofort mit der basalen Plasmamembran, um ihren Inhalt freizugeben, sondern werden zunächst im Zytoplasma akkumuliert. Dies würde erklären, warum trotz der sehr geringen Kolokalisationsrate die intrazelluläre HRP-Menge nach 30 Minuten am höchsten war.

### **4.3 HRP-Transport im Darmepithel von Morbus Crohn-Patienten**

Wir konnten in dieser Arbeit bestätigen, dass die HRP-Permeabilität im Darm von Patienten mit Morbus Crohn gegenüber dem von gesunden Kontrollpatienten erhöht ist [45, 46, 48]. Weiterhin konnten wir zeigen, dass der HRP-Transport hauptsächlich transzellulär stattfindet, da ein Absenken der Temperatur die HRP-Permeabilität senken konnte.

Die meisten der von uns untersuchten Morbus Crohn-Biopsien waren von Patienten ohne akute intestinale Entzündung. In einer ähnlichen Untersuchung wurde gezeigt, dass die HRP-Permeabilität im humanen Dünndarm bei leichtem Morbus Crohn gegenüber der Kontrolle kaum verändert ist, während sie bei schwerer Morbus Crohn-Entzündungsaktivität um ein Vielfaches erhöht ist [45]. Wir konnten im Gegensatz dazu zeigen, dass auch in nicht entzündetem bis mittelgradig entzündetem Gewebe eine erhöhte Permeabilität für HRP messbar ist, allerdings war unser Messsegment der distale Dickdarm von Morbus Crohn-Patienten. Dies ist möglicherweise ein Anzeichen dafür, dass die Durchlässigkeit der Darmbarriere im Dickdarm bei Morbus Crohn stärker beeinflusst wird als im Dünndarm. Um dies zu bestätigen, müssten allerdings weitere Untersuchungen durchgeführt werden, bei denen nicht entzündete und stark entzündete Dickdarmbiopsien direkt miteinander verglichen werden.

Interessanterweise war die HRP-Permeabilität der Biopsien von Morbus Crohn-Patienten nach 30 und 60 Minuten zwar gegenüber den Biopsien der Kontrollen erhöht, aber erst nach 90 Minuten war der Unterschied so groß, dass er statistische Signifikanz erreichte. Überträgt man die Ergebnisse der Zellkultur auf die Biopsien, so würde man erwarten, dass auch zu frühen Zeitpunkten ein deutlicher Unterschied in der HRP-Permeabilität erkennbar ist, da IL-4 die HRP-Transzytose in den T84-Monolayern beschleunigte. Möglicherweise wird der Transport der HRP durch die Biopsie im Subepithel verlangsamt. Zeissig und Mitarbeiter zeigten, dass der subepitheliale Widerstand bei Biopsien von Morbus Crohn-Patienten gegenüber Kontrollen erhöht ist [49, 50]. Dies deutet darauf hin, dass das subepitheliale Gewebe verdickt ist und die HRP nur langsamer hindurch transportiert werden kann. Möglicherweise verzögert sich so der HRP-Transport und Unterschiede in der HRP-Permeabilität gegenüber der Kontrolle werden erst später sichtbar. Im Folgenden werden daher nur die Daten des späten Zeitpunktes ( $t_{90}$ ) diskutiert.

Sowohl der Inhibitor für die Makropinozytose, EHT 1864, als auch der Inhibitor für die Caveolin-vermittelte Endozytose, Nystatin, konnten die HRP-Permeabilität in den Kontrollbiopsien und den Biopsien der Morbus Crohn-Patienten senken. Der Inhibitor für die Clathrin-vermittelte Endozytose, Pitstop 2, zeigte bei den Morbus Crohn-Biopsien keinen Einfluss auf die Permeabilität der HRP. Bei den Kontrollbiopsien zeigte sich die Tendenz einer Hemmung, allerdings kann man aufgrund der geringen Stichprobengröße von 2 Biopsien keine genauen Aussagen hierüber treffen. Diese Ergebnisse entsprechen den Ergebnissen aus der Zellkultur. Auch dort konnten wir zeigen, dass HRP über Caveolin-vermittelte Endozytose und Makropinozytose transportiert wird und die Clathrin-vermittelte Endozytose nicht an der HRP-Transzytose beteiligt ist.

Die von uns gewonnenen Widerstandsdaten der Biopsien stimmen mit der Literatur überein [49, 50]. Der transepitheliale Widerstand der Biopsien von Morbus Crohn-Patienten war gegenüber den Biopsien der Kontrollpatienten nicht verändert. Zeissig und Mitarbeiter konnten mit Hilfe der Ein-Wege-Impedanzspektroskopie zeigen, dass der epitheliale Widerstand in Biopsien von Patienten mit Morbus Crohn gegenüber Kontrollpatienten vermindert war, obwohl der transepitheliale Widerstand keine Unterschiede aufwies, was auf einer entzündlichen Erhöhung des subepithelialen Widerstandes beruhte [49, 50]. Da wir den transepithelialen Widerstand nicht weiter

untersucht haben, ist es durchaus möglich, dass auch bei den von uns untersuchten Patienten eine Verminderung des epithelialen Widerstandes vorlag.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die transzelluläre HRP-Permeabilität bei Morbus Crohn erhöht ist und analog zu den Ergebnissen, die wir aus dem Zellmodell gewonnen haben, konnten wir zeigen, dass an der HRP-Transzytose im nativen Darm die Caveolin-vermittelte Endozytose und die Makropinozytose, nicht aber die Clathrin-vermittelte Endozytose beteiligt waren.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Eines der Hauptmerkmale in der Funktionalität der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn ist die erhöhte Durchlässigkeit der im Rahmen der Entzündung geschädigten Darmbarriere. In dieser Arbeit wurden verschiedene bei Morbus Crohn relevante Mediatoren, namentlich IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  und Histamin, auf ihre Transzytose-steigernde Wirkung im Zellmodell untersucht. Dazu wurde die humane Kolonkarzinomzelllinie T84 verwendet, da diese rege Endozytoseeigenschaften aufweist und als Marker für die Transzytose wurde die Meerrettich-Peroxidase (HRP) verwendet. Von allen untersuchten Zytokinen erhöhte lediglich IL-4 die HRP-Permeabilität in einem relevanten Ausmaß. Deshalb wurden die Auswirkungen dieses Zytokins auf weitere barriererelevante Eigenschaften untersucht. Dazu wurde die Expression der TJ-Proteine Claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7 und -8 sowie Occludin und Tricellulin unter dem Einfluss von IL-4 mittels Western Blot analysiert. Dies ist die erste so umfassende Analyse der TJ-verändernden Wirkung von IL-4 auf intestinale Zellen überhaupt. Das kanalbildende Claudin-2 zeigte eine deutlich erhöhte Expression, während das abdichtend wirkende Claudin-4 vermindert exprimiert wurde. Alle anderen untersuchten TJ-Proteine waren unverändert. Weiterhin wurde der transepitheliale Widerstand analysiert, welcher durch Inkubation mit IL-4 vermindert ist. Mittels Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie konnten wir zeigen, dass der durch IL-4 verursachte Abfall des transepithelialen Widerstands etwa gleichermaßen durch Änderungen des transzellulären und des parazellulären Widerstands zustande kommt.

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Identifizierung des Endozytoseweges, auf dem HRP durch den Zellmonolayer transportiert wird und die Beantwortung der Frage, ob unter entzündlichen Bedingungen, die durch IL-4 induziert wurden, zusätzliche beziehungsweise andere Wege beteiligt sind. Dazu wurden spezifische Inhibitoren für die Clathrin-vermittelte Endozytose, die Caveolin-vermittelte Endozytose und die Makropinozytose eingesetzt und die Veränderung der HRP-Permeabilität unter dem Einfluss dieser Inhibitoren gemessen. Um diese Ergebnisse zu unterstützen, wurde eine Methode etabliert, um HRP immunfluoreszent darzustellen. Durch die parallele Färbung verschiedener intrazellulärer Vesikel konnte die Lokalisation von HRP zu frühen und späten Zeitpunkten (2 – 30 Minuten) der Transzytose nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbungen und der Permeabilitätsmessungen konnten wir in dieser Arbeit zeigen, dass HRP hauptsächlich durch die Caveolin-vermittelte Endozytose, aber auch durch die Makropinozytose durch das Epithel transportiert wird.

Die Relevanz dieser Ergebnisse für Morbus Crohn-Patienten wurde dann anhand von Vergleichen der HRP-Permeabilität zwischen Biopsien von gesunden Kontrollpatienten und Patienten mit Morbus Crohn überprüft, indem einige der im Zellmodell wirksamen Inhibitoren eingesetzt wurden und ihre Wirksamkeit im nativen Darm getestet wurde. Hier konnten wir zum einen bestätigen, dass die HRP-Permeabilität von Patienten mit Morbus Crohn gegenüber Kontrollpatienten erhöht ist. Zum anderen konnten wir zeigen, dass die HRP-Transzytose auch im nativen Darm über Caveolin-vermittelte Endozytose und Makropinozytose stattfindet.



## 6 SUMMARY

A main feature of the inflammatory bowel disease Crohn's disease is the increased permeability of the disturbed intestinal barrier. In this study we investigated several mediators pertinent to Crohn's disease in regard to their ability to enhance transcytosis. In particular we investigated the effects of IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  and histamine on the human colon carcinoma cell line T84, which was chosen because of its endocytotic properties. As a marker for transcytosis we used horseradish peroxidase (HRP). Only IL-4 increased the permeability for HRP to a relevant extent. Therefore, the impact of this cytokine on other barrier properties was investigated. The influence of IL-4 on the expression of the tight junction (TJ) proteins claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7 and -8 as well as occludin and tricellulin was investigated by means of western blot analyses. This is the first analysis of the effect of IL-4 on TJ proteins in intestinal cells to such an extent. The channel-building claudin-2 showed an enhanced expression, whereas the expression of the tightening claudin-4 was decreased. The remaining TJ proteins remained unchanged. In addition the transepithelial resistance was analysed, which is reduced in T84 monolayers after the incubation with IL-4. By means of two-path-impedance spectroscopy we could show that the paracellular as well as the transcellular resistance were decreased by IL-4 and both account for the decrease in transepithelial resistance.

The main goal of this study was to elucidate the endocytotic pathway of HRP and furthermore to study if there are additional or other pathways that are involved under inflammatory conditions, which are elicited by IL-4. For that purpose we used inhibitors specific for either clathrin mediated endocytosis, caveolin mediated endocytosis or macropinocytosis and measured the changes in the permeability for HRP in response to these inhibitors. To validate these results we established a method to immunofluorescently stain intracellular HRP. Through co-staining of several intracellular vesicles the localization of HRP in early and late stages (2 – 30 minutes) of transcytosis could be demonstrated.

By means of the immunofluorescent staining and the permeability measurements we showed that HRP is transported mainly via caveolin mediated endocytosis but also via macropinocytosis.

The relevance of these results for patients with Crohn's disease was examined by comparing the permeability for HRP in patients with Crohn's disease and healthy controls. Biopsies from both groups were treated with some of the inhibitors found to

be effective in cell culture. We confirmed that the permeability for HRP of patients with Crohn's disease is elevated compared to healthy controls and further we could show that in the native intestine the transcytosis of HRP also proceeds via caveolin mediated endocytosis and macropinocytosis.

---

## 7 LITERATUR

- 1 - [http://www.ugcumc.ba/\\_gfx/gi\\_histo\\_pearson.jpg](http://www.ugcumc.ba/_gfx/gi_histo_pearson.jpg)
- 2 - **Bröer S.** (2008). Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol Rev* 88 (1): 249-286.
- 3 - **Ferraris R. P., and Diamond J.** (1997). Regulation of intestinal sugar transport. *Physiol Rev* 77 (1): 257-302.
- 4 - **Kunzelmann K., and Mall M.** (2002). Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev* 82 (1): 245-289.
- 5 - **Blikslager A. T., Moeser A. J., Gookin J. L., Jones S. L., et al.** (2007). Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol Rev* 87 (2): 545-564.
- 6 - **Podolsky D. K.** (1999). Mucosal immunity and inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. *Am J Physiol* 277 (3 Pt 1): G495-499.
- 7 - **Fromm M.** (1994). Störungen der Verdauung und des epithelialen Transports. in: Hierholzer, K., Schmidt, R. F. (Eds.), *Pathophysiologie des Menschen*. Chapman & Hall GmbH, Weinheim: 6.28-38.
- 8 - **Madara J. L.** (1990). Warner-Lambert/Parke-Davis Award lecture. Pathobiology of the intestinal epithelial barrier. *Am J Pathol* 137 (6): 1273-1281.
- 9 - **Farquhar M. G., and Palade G. E.** (1963). Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 17: 375-412.
- 10 - **Fanning A. S., Mitic L. L., and Anderson J. M.** (1999). Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J Am Soc Nephrol* 10 (6): 1337-1345.
- 11 - **Furuse M., Sasaki H., and Tsukita S.** (1999). Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol* 147 (4): 891-903.
- 12 - **Mandel L. J., Bacallao R., and Zampighi G.** (1993). Uncoupling of the molecular 'fence' and paracellular 'gate' functions in epithelial tight junctions. *Nature* 361 (6412): 552-555.
- 13 - **Günzel D., and Fromm M.** (2012). Claudins and other tight junction proteins. *Compr Physiol* 2 (3): 1819-1852.
- 14 - **Furuse M., Hirase T., Itoh M., Nagafuchi A., et al.** (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123 (6 Pt 2): 1777-1788.
- 15 - **Cummins P. M.** (2012). Occludin: one protein, many forms. *Mol Cell Biol* 32 (2): 242-250.

- 
- 16 - Ikenouchi J., Furuse M., Furuse K., Sasaki H., et al.** (2005). Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 171 (6): 939-945.
- 17 - Krug S. M., Amasheh S., Richter J. F., Milatz S., et al.** (2009). Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol Biol Cell* 20 (16): 3713-3724.
- 18 - Tsukita S., Furuse M., and Itoh M.** (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (4): 285-293.
- 19 - Mineta K., Yamamoto Y., Yamazaki Y., Tanaka H., et al.** (2011). Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett* 585 (4): 606-612.
- 20 - Turksen K., and Troy T. C.** (2004). Barriers built on claudins. *J Cell Sci* 117 (Pt 12): 2435-2447.
- 21 - Milatz S., Krug S. M., Rosenthal R., Gunzel D., et al.** (2010). Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochim Biophys Acta* 1798 (11): 2048-2057.
- 22 - Furuse M., Hata M., Furuse K., Yoshida Y., et al.** (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 156 (6): 1099-1111.
- 23 - Amasheh S., Schmidt T., Mahn M., Florian P., et al.** (2005). Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell Tissue Res* 321 (1): 89-96.
- 24 - Van Itallie C., Rahner C., and Anderson J. M.** (2001). Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest* 107 (10): 1319-1327.
- 25 - Amasheh S., Milatz S., Krug S. M., Bergs M., et al.** (2009). Na<sup>+</sup> absorption defends from paracellular back-leakage by claudin-8 upregulation. *Biochem Biophys Res Commun* 378 (1): 45-50.
- 26 - Kirschner N., Houdek P., Fromm M., Moll I., et al.** (2010). Tight junctions form a barrier in human epidermis. *Eur J Cell Biol* 89 (11): 839-842.
- 27 - Kiuchi-Saishin Y., Gotoh S., Furuse M., Takasuga A., et al.** (2002). Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol* 13 (4): 875-886.
- 28 - Markov A. G., Veshnyakova A., Fromm M., Amasheh M., et al.** (2010). Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine. *J Comp Physiol B* 180 (4): 591-598.
- 29 - Amasheh S., Meiri N., Gitter A. H., Schöneberg T., et al.** (2002). Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci* 115 (Pt 24): 4969-4976.

- 
- 30 - Rosenthal R., Milatz S., Krug S. M., Oelrich B., et al.** (2010). Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J Cell Sci* 123 (Pt 11): 1913-1921.
- 31 - Turksen K., and Troy T. C.** (2002). Permeability barrier dysfunction in transgenic mice overexpressing claudin 6. *Development* 129 (7): 1775-1784.
- 32 - Günzel D., Stuiver M., Kausalya P. J., Haisch L., et al.** (2009). Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function. *J Cell Sci* 122 (Pt 10): 1507-1517.
- 33 - Van Itallie C. M., Rogan S., Yu A., Vidal L. S., et al.** (2006). Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities. *Am J Physiol Renal Physiol* 291 (6): F1288-1299.
- 34 - Tamura A., Hayashi H., Imasato M., Yamazaki Y., et al.** (2011). Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na<sup>+</sup> deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine. *Gastroenterology* 140 (3): 913-923.
- 35 - Podolsky D. K.** (2002). Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 347 (6): 417-429.
- 36 -** [www.falkfoundation.de](http://www.falkfoundation.de)
- 37 - Hollander D., Vadheim C. M., Brettholz E., Petersen G. M., et al.** (1986). Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann Intern Med* 105 (6): 883-885.
- 38 - May G. R., Sutherland L. R., and Meddings J. B.** (1993). Is small intestinal permeability really increased in relatives of patients with Crohn's disease? *Gastroenterology* 104 (6): 1627-1632.
- 39 - Irvine E. J., and Marshall J. K.** (2000). Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology* 119 (6): 1740-1744.
- 40 - Yacyshyn B. R., and Meddings J. B.** (1995). CD45RO expression on circulating CD19<sup>+</sup> B cells in Crohn's disease correlates with intestinal permeability. *Gastroenterology* 108 (1): 132-137.
- 41 - Fiocchi C.** (1998). Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115 (1): 182-205.
- 42 - Duchmann R., Kaiser I., Hermann E., Mayet W., et al.** (1995). Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 102 (3): 448-455.
- 43 - Parkes M.** (2012). The genetics universe of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dig Dis* 30 Suppl 1: 78-81.

- 44 - Kellermayer R.** (2012). Epigenetics and the developmental origins of inflammatory bowel diseases. *Can J Gastroenterol* 26 (12): 909-915.
- 45 - Malin M., Isolauri E., Pikkarainen P., Karikoski R., et al.** (1996). Enhanced absorption of macromolecules. A secondary factor in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 41 (7): 1423-1428.
- 46 - Schürmann G., Brüwer M., Klotz A., Schmid K. W., et al.** (1999). Transepithelial transport processes at the intestinal mucosa in inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 14 (1): 41-46.
- 47 - Söderholm J. D., Peterson K. H., Olaison G., Franzen L. E., et al.** (1999). Epithelial permeability to proteins in the noninflamed ileum of Crohn's disease? *Gastroenterology* 117 (1): 65-72.
- 48 - Söderholm J. D., Streutker C., Yang P. C., Paterson C., et al.** (2004). Increased epithelial uptake of protein antigens in the ileum of Crohn's disease mediated by tumour necrosis factor alpha. *Gut* 53 (12): 1817-1824.
- 49 - Zeissig S., Bojarski C., Bürgel N., Mankertz J., et al.** (2004). Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by tumour necrosis factor alpha antibody treatment. *Gut* 53 (9): 1295-1302.
- 50 - Zeissig S., Bürgel N., Günzel D., Richter J., et al.** (2007). Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 56 (1): 61-72.
- 51 - Pearson A. D., Eastham E. J., Laker M. F., Craft A. W., et al.** (1982). Intestinal permeability in children with Crohn's disease and coeliac disease. *Br Med J (Clin Res Ed)* 285 (6334): 20-21.
- 52 - Sanderson I. R., Boulton P., Menzies I., and Walker-Smith J. A.** (1987). Improvement of abnormal lactulose/rhamnose permeability in active Crohn's disease of the small bowel by an elemental diet. *Gut* 28 (9): 1073-1076.
- 53 - Ukabam S. O., Clamp J. R., and Cooper B. T.** (1983). Abnormal small intestinal permeability to sugars in patients with Crohn's disease of the terminal ileum and colon. *Digestion* 27 (2): 70-74.
- 54 - Katz K. D., Hollander D., Vadheim C. M., McElree C., et al.** (1989). Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their healthy relatives. *Gastroenterology* 97 (4): 927-931.
- 55 - Weaver L. T., Laker M. F., and Nelson R.** (1984). Intestinal permeability in the newborn. *Arch Dis Child* 59 (3): 236-241.
- 56 - Bjarnason I., O'Morain C., Levi A. J., and Peters T. J.** (1983). Absorption of 51chromium-labeled ethylenediaminetetraacetate in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 85 (2): 318-322.

- 57 - Marin M. L., Greenstein A. J., Geller S. A., Gordon R. E., et al. (1983).** A freeze fracture study of Crohn's disease of the terminal ileum: changes in epithelial tight junction organization. *Am J Gastroenterol* 78 (9): 537-547.
- 58 - Marin M. L., Geller S. A., Greenstein A. J., Marin R. H., et al. (1983).** Ultrastructural pathology of Crohn's disease: correlated transmission electron microscopy, scanning electron microscopy, and freeze fracture studies. *Am J Gastroenterol* 78 (6): 355-364.
- 59 - Pirzer U., Schönhaar A., Fleischer B., Hermann E., et al. (1991).** Reactivity of infiltrating T lymphocytes with microbial antigens in Crohn's disease. *Lancet* 338 (8777): 1238-1239.
- 60 - Pallone F., Fais S., Squarcia O., Biancone L., et al. (1987).** Activation of peripheral blood and intestinal lamina propria lymphocytes in Crohn's disease. In vivo state of activation and in vitro response to stimulation as defined by the expression of early activation antigens. *Gut* 28 (6): 745-753.
- 61 - Ina K., Itoh J., Fukushima K., Kusugami K., et al. (1999).** Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J Immunol* 163 (2): 1081-1090.
- 62 - Bu P., Keshavarzian A., Stone D. D., Liu J., et al. (2001).** Apoptosis: one of the mechanisms that maintains unresponsiveness of the intestinal mucosal immune system. *J Immunol* 166 (10): 6399-6403.
- 63 - Sher M. E., D'Angelo A. J., Stein T. A., Bailey B., et al. (1995).** Cytokines in Crohn's colitis. *Am J Surg* 169 (1): 133-136.
- 64 - Zorzi F., Monteleone I., Sarra M., Calabrese E., et al. (2013).** Distinct profiles of effector cytokines mark the different phases of Crohn's disease. *PLoS One* 8 (1): e54562.
- 65 - Hölttä V., Klemetti P., Sipponen T., Westerholm-Ormio M., et al. (2008).** IL-23/IL-17 immunity as a hallmark of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 14 (9): 1175-1184.
- 66 - Desreumaux P., Brandt E., Gambiez L., Emilie D., et al. (1997).** Distinct cytokine patterns in early and chronic ileal lesions of Crohn's disease. *Gastroenterology* 113 (1): 118-126.
- 67 - Yamamoto T., Nakahigashi M., Umegae S., Kitagawa T., et al. (2005).** Impact of elemental diet on mucosal inflammation in patients with active Crohn's disease: cytokine production and endoscopic and histological findings. *Inflamm Bowel Dis* 11 (6): 580-588.
- 68 - León A. J., Gómez E., Garrote J. A., Bernardo D., et al. (2009).** High levels of proinflammatory cytokines, but not markers of tissue injury, in unaffected intestinal areas from patients with IBD. *Mediators Inflamm* 2009: 580450.

- 69 - Autschbach F., Schürmann G., Qiao L., Merz H., et al.** (1995). Cytokine messenger RNA expression and proliferation status of intestinal mononuclear cells in noninflamed gut and Crohn's disease. *Virchows Arch* 426 (1): 51-60.
- 70 - Knutson L., Ahrenstedt O., Odling B., and Hallgren R.** (1990). The jejunal secretion of histamine is increased in active Crohn's disease. *Gastroenterology* 98 (4): 849-854.
- 71 - Winterkamp S., Weidenhiller M., Otte P., Stolper J., et al.** (2002). Urinary excretion of N-methylhistamine as a marker of disease activity in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 97 (12): 3071-3077.
- 72 - Weidenhiller M., Raithel M., Winterkamp S., Otte P., et al.** (2000). Methylhistamine in Crohn's disease (CD): increased production and elevated urine excretion correlates with disease activity. *Inflamm Res* 49 Suppl 1: 35-36.
- 73 - Mahida Y. R., Wu K., and Jewell D. P.** (1989). Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease. *Gut* 30 (6): 835-838.
- 74 - Casini-Raggi V., Kam L., Chong Y. J., Fiocchi C., et al.** (1995). Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *J Immunol* 154 (5): 2434-2440.
- 75 - Ben-Sasson S. Z., Hu-Li J., Quiel J., Cauchetaux S., et al.** (2009). IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (17): 7119-7124.
- 76 - Dinarello C. A.** (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87 (6): 2095-2147.
- 77 - Al-Sadi R. M., and Ma T. Y.** (2007). IL-1 $\beta$  causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol* 178 (7): 4641-4649.
- 78 - Pak S., Holland N., Garnett E. A., Mileti E., et al.** (2012). Cytokine profiles in peripheral blood of children and adults with Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 54 (6): 769-775.
- 79 - Mosmann T. R., Cherwinski H., Bond M. W., Giedlin M. A., et al.** (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136 (7): 2348-2357.
- 80 - Plaut M., Pierce J. H., Watson C. J., Hanley-Hyde J., et al.** (1989). Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or to calcium ionophores. *Nature* 339 (6219): 64-67.
- 81 - Colgan S. P., Resnick M. B., Parkos C. A., Delp-Archer C., et al.** (1994). IL-4 directly modulates function of a model human intestinal epithelium. *J Immunol* 153 (5): 2122-2129.



- 82 - Zünd G., Madara J. L., Dzus A. L., Awtrey C. S., et al.** (1996). Interleukin-4 and interleukin-13 differentially regulate epithelial chloride secretion. *J Biol Chem* 271 (13): 7460-7464.
- 83 - Berin M. C., Yang P. C., Ciok L., Wasserman S., et al.** (1999). Role for IL-4 in macromolecular transport across human intestinal epithelium. *Am J Physiol* 276 (5 Pt 1): C1046-1052.
- 84 - Ceponis P. J., Botelho F., Richards C. D., and McKay D. M.** (2000). Interleukins 4 and 13 increase intestinal epithelial permeability by a phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Lack of evidence for STAT 6 involvement. *J Biol Chem* 275 (37): 29132-29137.
- 85 - Di Leo V., Yang P. C., Berin M. C., and Perdue M. H.** (2002). Factors regulating the effect of IL-4 on intestinal epithelial barrier function. *Int Arch Allergy Immunol* 129 (3): 219-227.
- 86 - Watson J. L., Ansari S., Cameron H., Wang A., et al.** (2004). Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate blocks epithelial barrier dysfunction provoked by IFN-gamma but not by IL-4. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287 (5): G954-961.
- 87 - Wisner D. M., Harris L. R., 3rd, Green C. L., and Poritz L. S.** (2008). Opposing regulation of the tight junction protein claudin-2 by interferon-gamma and interleukin-4. *J Surg Res* 144 (1): 1-7.
- 88 - Mochizuki T., Satsu H., Totsuka M., and Shimizu M.** (2009). Transepithelial transport of macromolecular substances in IL-4 treated human intestinal T84 cell monolayers. *Biosci Biotechnol Biochem* 73 (11): 2422-2426.
- 89 - Paul W. E.** (1991). Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 77 (9): 1859-1870.
- 90 - Suk K., Somers S. D., and Erickson K. L.** (1993). Regulation of murine macrophage function by IL-4: IL-4 and IFN-gamma differentially regulate macrophage tumoricidal activation. *Immunology* 80 (4): 617-624.
- 91 - Puri R. K., and Siegel J. P.** (1993). Interleukin-4 and cancer therapy. *Cancer Invest* 11 (4): 473-486.
- 92 - de Waal Malefyt R., Figdor C. G., Huijbens R., Mohan-Peterson S., et al.** (1993). Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. *J Immunol* 151 (11): 6370-6381.
- 93 - Schreiber S., Heinig T., Panzer U., Reinking R., et al.** (1995). Impaired response of activated mononuclear phagocytes to interleukin 4 in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 108 (1): 21-33.

- 94 - Margolin K., Aronson F. R., Sznol M., Atkins M. B., et al.** (1994). Phase II studies of recombinant human interleukin-4 in advanced renal cancer and malignant melanoma. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 15 (2): 147-153.
- 95 - Naka T., Nishimoto N., and Kishimoto T.** (2002). The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res* 4 Suppl 3: S233-242.
- 96 - Kusugami K., Fukatsu A., Tanimoto M., Shinoda M., et al.** (1995). Elevation of interleukin-6 in inflammatory bowel disease is macrophage- and epithelial cell-dependent. *Dig Dis Sci* 40 (5): 949-959.
- 97 - Rose-John S., Scheller J., Elson G., and Jones S. A.** (2006). Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol* 80 (2): 227-236.
- 98 - Atreya R., Mudter J., Finotto S., Müllberg J., et al.** (2000). Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 6 (5): 583-588.
- 99 - Heinrich P. C., Castell J. V., and Andus T.** (1990). Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265 (3): 621-636.
- 100 - Rutgeerts P., Vermeire S., and Van Assche G.** (2009). Biological Therapies for Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 136 (4): 1182-1197.
- 101 - Nishimoto N., and Kishimoto T.** (2006). Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2 (11): 619-626.
- 102 - Gustot T., Lemmers A., Louis E., Nicaise C., et al.** (2005). Profile of soluble cytokine receptors in Crohn's disease. *Gut* 54 (4): 488-495.
- 103 - Ito H., Takazoe M., Fukuda Y., Hibi T., et al.** (2004). A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. *Gastroenterology* 126 (4): 989-996; discussion 947.
- 104 - Beutler B., Greenwald D., Hulmes J. D., Chang M., et al.** (1985). Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 316 (6028): 552-554.
- 105 - Bischoff S. C., Lorentz A., Schwengberg S., Weier G., et al.** (1999). Mast cells are an important cellular source of tumour necrosis factor alpha in human intestinal tissue. *Gut* 44 (5): 643-652.
- 106 - Zareie M., Singh P. K., Irvine E. J., Sherman P. M., et al.** (2001). Monocyte/macrophage activation by normal bacteria and bacterial products: implications for altered epithelial function in Crohn's disease. *Am J Pathol* 158 (3): 1101-1109.

- 107 - Schmitz H., Fromm M., Bentzel C. J., Scholz P., et al.** (1999). Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci* 112 ( Pt 1): 137-146.
- 108 - Mankertz J., Tavalali S., Schmitz H., Mankertz A., et al.** (2000). Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. *J Cell Sci* 113 (Pt 11): 2085-2090.
- 109 - Gitter A. H., Bendfeldt K., Schmitz H., Schulzke J. D., et al.** (2000). Epithelial barrier defects in HT-29/B6 colonic cell monolayers induced by tumor necrosis factor-alpha. *Ann N Y Acad Sci* 915: 193-203.
- 110 - Suenart P., Bulteel V., Lemmens L., Noman M., et al.** (2002). Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 97 (8): 2000-2004.
- 111 - Rogler G., and Andus T.** (1998). Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 22 (4): 382-389.
- 112 - McKay D. M., Watson J. L., Wang A., Caldwell J., et al.** (2007). Phosphatidylinositol 3'-kinase is a critical mediator of interferon-gamma-induced increases in enteric epithelial permeability. *J Pharmacol Exp Ther* 320 (3): 1013-1022.
- 113 - Madara J. L., and Stafford J.** (1989). Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 83 (2): 724-727.
- 114 - Bruewer M., Luegering A., Kucharzik T., Parkos C. A., et al.** (2003). Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol* 171 (11): 6164-6172.
- 115 - Cenac N., Chin A. C., Garcia-Villar R., Salvador-Cartier C., et al.** (2004). PAR2 activation alters colonic paracellular permeability in mice via IFN-gamma-dependent and -independent pathways. *J Physiol* 558 (Pt 3): 913-925.
- 116 - Rangachari P. K.** (1992). Histamine: mercurial messenger in the gut. *Am J Physiol* 262 (1 Pt 1): G1-13.
- 117 - Dvorak A. M., Monahan R. A., Osage J. E., and Dickersin G. R.** (1980). Crohn's disease: transmission electron microscopic studies. II. Immunologic inflammatory response. Alterations of mast cells, basophils, eosinophils, and the microvasculature. *Hum Pathol* 11 (6): 606-619.
- 118 - Hiatt R. B., and Katz L.** (1962). Mast cells in inflammatory conditions of the gastrointestinal tract. *Am J Gastroenterol* 37: 541-545.
- 119 - Ranlöv P., Nielsen M. H., and Wanstrup J.** (1972). Ultrastructure of the ileum in Crohn's disease. Immune lesions and mastocytosis. *Scand J Gastroenterol* 7 (5): 471-476.

- 120 - Lloyd G., Green F. H., Fox H., Mani V., et al.** (1975). Mast cells and immunoglobulin E in inflammatory bowel disease. *Gut* 16 (11): 861-865.
- 121 - Sanderson I. R., Leung K. B., Pearce F. L., and Walker-Smith J. A.** (1986). Lamina propria mast cells in biopsies from children with Crohn's disease. *J Clin Pathol* 39 (3): 279-283.
- 122 - Dvorak A. M., Monahan R. A., Osage J. E., and Dickersin G. R.** (1978). Mast-cell degranulation in Crohn's disease. *Lancet* 1 (8062): 498.
- 123 - Bielkiewicz-Vollrath B., Carpenter J. R., Schulz R., and Cook D. A.** (1987). Early production of 1,4,5-inositol trisphosphate and 1,3,4,5-inositol tetrakisphosphate by histamine and carbachol in ileal smooth muscle. *Mol Pharmacol* 31 (5): 513-522.
- 124 - Mobarakeh J. I., Sakurada S., Katsuyama S., Kutsuwa M., et al.** (2000). Role of histamine H(1) receptor in pain perception: a study of the receptor gene knockout mice. *Eur J Pharmacol* 391 (1-2): 81-89.
- 125 - Crowe S. E., and Perdue M. H.** (1993). Anti-immunoglobulin E-stimulated ion transport in human large and small intestine. *Gastroenterology* 105 (3): 764-772.
- 126 - Pizzuti D., Senzolo M., Buda A., Chiarelli S., et al.** (2011). In vitro model for IgE mediated food allergy. *Scand J Gastroenterol* 46 (2): 177-187.
- 127 - Porvaznik M., Baker W., and Walker R. I.** (1983). Disruption of the goblet cell intercellular junction following histamine infusion of the rabbit ileum. *Experientia* 39 (5): 514-518.
- 128 - Kanny G., Grignon G., Dauca M., Guedenet J. C., et al.** (1996). Ultrastructural changes in the duodenal mucosa induced by ingested histamine in patients with chronic urticaria. *Allergy* 51 (12): 935-939.
- 129 - Groot J. A.** (1998). Correlation between electrophysiological phenomena and transport of macromolecules in intestinal epithelium. *Vet Q* 20 (sup3): 45-49.
- 130 - Conner S. D., and Schmid S. L.** (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422 (6927): 37-44.
- 131 - Doherty G. J., and McMahon H. T.** (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* 78: 857-902.
- 132 - Pelkmans L., and Helenius A.** (2003). Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 15 (4): 414-422.
- 133 - Sandvig K., Pust S., Skotland T., and van Deurs B.** (2011). Clathrin-independent endocytosis: mechanisms and function. *Curr Opin Cell Biol* 23 (4): 413-420.
- 134 - Sorkin A.** (2004). Cargo recognition during clathrin-mediated endocytosis: a team effort. *Curr Opin Cell Biol* 16 (4): 392-399.

- 
- 135 - Mercer J., and Helenius A.** (2009). Virus entry by macropinocytosis. *Nat Cell Biol* 11 (5): 510-520.
- 136 - McMahon K. A., Zajicek H., Li W. P., Peyton M. J., et al.** (2009). SRBC/cavin-3 is a caveolin adapter protein that regulates caveolae function. *EMBO J* 28 (8): 1001-1015.
- 137 - McMahon H. T., and Gallop J. L.** (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* 438 (7068): 590-596.
- 138 - Fra A. M., Williamson E., Simons K., and Parton R. G.** (1995). De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (19): 8655-8659.
- 139 - Roux A., Uyhazi K., Frost A., and De Camilli P.** (2006). GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature* 441 (7092): 528-531.
- 140 - Ungewickell E., Ungewickell H., Holstein S. E., Lindner R., et al.** (1995). Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature* 378 (6557): 632-635.
- 141 - Pelkmans L., Kartenbeck J., and Helenius A.** (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* 3 (5): 473-483.
- 142 - Pelkmans L., Bürli T., Zerial M., and Helenius A.** (2004). Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* 118 (6): 767-780.
- 143 - Racoosin E. L., and Swanson J. A.** (1993). Macropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. *J Cell Biol* 121 (5): 1011-1020.
- 144 - Kerr M. C., Lindsay M. R., Luetterforst R., Hamilton N., et al.** (2006). Visualisation of macropinosome maturation by the recruitment of sorting nexins. *J Cell Sci* 119 (Pt 19): 3967-3980.
- 145 - Nielsen E., Severin F., Backer J. M., Hyman A. A., et al.** (1999). Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nat Cell Biol* 1 (6): 376-382.
- 146 - Hopkins C. R., Gibson A., Shipman M., Strickland D. K., et al.** (1994). In migrating fibroblasts, recycling receptors are concentrated in narrow tubules in the pericentriolar area, and then routed to the plasma membrane of the leading lamella. *J Cell Biol* 125 (6): 1265-1274.
- 147 - McBride H. M., Rybin V., Murphy C., Giner A., et al.** (1999). Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell* 98 (3): 377-386.
- 148 - Maxfield F. R., and McGraw T. E.** (2004). Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 (2): 121-132.

- 149 - Steinman R. M., Mellman I. S., Muller W. A., and Cohn Z. A.** (1983). Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J Cell Biol* 96 (1): 1-27.
- 150 - Piper R. C., and Katzmann D. J.** (2007). Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 519-547.
- 151 - Schimmöller F., and Riezman H.** (1993). Involvement of Ypt7p, a small GTPase, in traffic from late endosome to the vacuole in yeast. *J Cell Sci* 106 ( Pt 3): 823-830.
- 152 - Bucci C., Thomsen P., Nicoziani P., McCarthy J., et al.** (2000). Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell* 11 (2): 467-480.
- 153 - Rink J., Ghigo E., Kalaidzidis Y., and Zerial M.** (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* 122 (5): 735-749.
- 154 - Stoorvogel W., Kleijmeer M. J., Geuze H. J., and Raposo G.** (2002). The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic* 3 (5): 321-330.
- 155 - Mullock B. M., Bright N. A., Fearon C. W., Gray S. R., et al.** (1998). Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. *J Cell Biol* 140 (3): 591-601.
- 156 - Huotari J., and Helenius A.** (2011). Endosome maturation. *EMBO J* 30 (17): 3481-3500.
- 157 - Simons M., and Raposo G.** (2009). Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 21 (4): 575-581.
- 158 - Deduve C.** (1964). From cytochromes to lysosomes. *Fed Proc* 23: 1045-1049.
- 159 - Storrie B., and Desjardins M.** (1996). The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process? *Bioessays* 18 (11): 895-903.
- 160 - Luzio J. P., Pryor P. R., and Bright N. A.** (2007). Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (8): 622-632.
- 161 - Eskelinen E. L., Tanaka Y., and Saftig P.** (2003). At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol* 13 (3): 137-145.
- 162 - Settembre C., Fraldi A., Medina D. L., and Ballabio A.** (2013). Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14 (5): 283-296.
- 163 - Ungewickell E., and Branton D.** (1981). Assembly units of clathrin coats. *Nature* 289 (5796): 420-422.
- 164 - MBIInfo:** [www.mechanobio.info](http://www.mechanobio.info); Mechanobiology Institute N. U. o. S.

- 165 - Höning S., Ricotta D., Krauss M., Späte K., et al. (2005).** Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates sorting signal recognition by the clathrin-associated adaptor complex AP2. *Mol Cell* 18 (5): 519-531.
- 166 -** [http://www.zoology.ubc.ca/~berger/b200sample/unit\\_8\\_protein\\_processing/clathrin\\_pits.htm](http://www.zoology.ubc.ca/~berger/b200sample/unit_8_protein_processing/clathrin_pits.htm)
- 167 - Rubino M., Miaczynska M., Lippe R., and Zerial M. (2000).** Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin-coated vesicles to early endosomes. *J Biol Chem* 275 (6): 3745-3748.
- 168 - Hayer A., Stoeber M., Ritz D., Engel S., et al. (2010).** Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation. *J Cell Biol* 191 (3): 615-629.
- 169 - Hill M. M., Bastiani M., Luetterforst R., Kirkham M., et al. (2008).** PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell* 132 (1): 113-124.
- 170 - Minshall R. D., Tiruppathi C., Vogel S. M., Niles W. D., et al. (2000).** Endothelial cell-surface gp60 activates vesicle formation and trafficking via G(i)-coupled Src kinase signaling pathway. *J Cell Biol* 150 (5): 1057-1070.
- 171 - Oh P., McIntosh D. P., and Schnitzer J. E. (1998).** Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol* 141 (1): 101-114.
- 172 - Sandvig K., Torgersen M. L., Raa H. A., and van Deurs B. (2008).** Clathrin-independent endocytosis: from nonexistent to an extreme degree of complexity. *Histochem Cell Biol* 129 (3): 267-276.
- 173 - Swanson J. A. (2008).** Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (8): 639-649.
- 174 - Ridley A. J., Paterson H. F., Johnston C. L., Diekmann D., et al. (1992).** The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70 (3): 401-410.
- 175 - Araki N., Johnson M. T., and Swanson J. A. (1996).** A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol* 135 (5): 1249-1260.
- 176 - Rodriguez-Viciana P., Warne P. H., Khwaja A., Marte B. M., et al. (1997).** Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* 89 (3): 457-467.
- 177 - Lanzetti L., Palamidessi A., Areces L., Scita G., et al. (2004).** Rab5 is a signalling GTPase involved in actin remodelling by receptor tyrosine kinases. *Nature* 429 (6989): 309-314.

- 178 - Liberali P., Kakkonen E., Turacchio G., Valente C., et al.** (2008). The closure of Pak1-dependent macropinosomes requires the phosphorylation of CtBP1/BARS. *EMBO J* 27 (7): 970-981.
- 179 - Lim J. P., and Gleeson P. A.** (2011). Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunol Cell Biol* 89 (8): 836-843.
- 180 - Welinder K. G.** (1979). Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase. Amino and carboxyl termini, cyanogen bromide and tryptic fragments, the complete sequence, and some structural characteristics of horseradish peroxidase C. *Eur J Biochem* 96 (3): 483-502.
- 181 - Berin M. C., Kiliaan A. J., Yang P. C., Groot J. A., et al.** (1997). Rapid transepithelial antigen transport in rat jejunum: impact of sensitization and the hypersensitivity reaction. *Gastroenterology* 113 (3): 856-864.
- 182 - Bijlsma P. B., Kiliaan A. J., Scholten G., Heyman M., et al.** (1996). Carbachol, but not forskolin, increases mucosal-to-serosal transport of intact protein in rat ileum in vitro. *Am J Physiol* 271 (1 Pt 1): G147-155.
- 183 - East L., and Isacke C. M.** (2002). The mannose receptor family. *Biochim Biophys Acta* 1572 (2-3): 364-386.
- 184 - Ellinger I., and Fuchs R.** (2010). Receptor-mediated and fluid-phase transcytosis of horseradish peroxidase across rat hepatocytes. *J Biomed Biotechnol* 2010: 850320.
- 185 - Takahashi K., Donovan M. J., Rogers R. A., and Ezekowitz R. A.** (1998). Distribution of murine mannose receptor expression from early embryogenesis through to adulthood. *Cell Tissue Res* 292 (2): 311-323.
- 186 - Dharmasathaphorn K., McRoberts J. A., Mandel K. G., Tisdale L. D., et al.** (1984). A human colonic tumor cell line that maintains vectorial electrolyte transport. *Am J Physiol* 246 (2 Pt 1): G204-208.
- 187 - Kreusel K. M., Fromm M., Schulzke J. D., and Hegel U.** (1991). Cl<sup>-</sup> secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6). *Am J Physiol* 261 (4 Pt 1): C574-582.
- 188 - Li H., Sheppard D. N., and Hug M. J.** (2004). Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber. *J Cyst Fibros* 3 Suppl 2: 123-126.
- 189 - Ussing H. H., and Zerahn K.** (1951). Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 23 (2-3): 110-127.
- 190 - Krug S. M., Fromm M., and Günzel D.** (2009). Two-path impedance spectroscopy for measuring paracellular and transcellular epithelial resistance. *Biophys J* 97 (8): 2202-2211.



- 191 - Martinez-Palomo A., Meza I., Beaty G., and Cereijido M.** (1980). Experimental modulation of occluding junctions in a cultured transporting epithelium. *J Cell Biol* 87 (3 Pt 1): 736-745.
- 192 - Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., et al.** (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150 (1): 76-85.
- 193 - Laemmli U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259): 680-685.
- 194 - Dederen P. J., and Joosten E. A.** (1989). A triple-labeling method: HRP anterograde tract tracing combined with double immunofluorescent cell staining in developing neural tissue of the rat. *J Neurosci Methods* 30 (1): 71-76.
- 195 - von Kleist L., Stahlschmidt W., Bulut H., Gromova K., et al.** (2011). Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition. *Cell* 146 (3): 471-484.
- 196 - Wang L. H., Rothberg K. G., and Anderson R. G.** (1993). Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol* 123 (5): 1107-1117.
- 197 - Ivanov A. I.** (2008). Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? *Methods Mol Biol* 440: 15-33.
- 198 - Martinez I., Sveinbjörnsson B., Vidal-Vanaclocha F., Asumendi A., et al.** (1995). Differential cytokine-mediated modulation of endocytosis in rat liver endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 212 (1): 235-241.
- 199 - Horton F., Wright J., Smith L., Hinton P. J., et al.** (2013). Increased intestinal permeability to oral chromium (<sup>51</sup>Cr)-EDTA in human Type 2 diabetes. *Diabet Med*.
- 200 - Eskild W., and Berg T.** (1988). High sensitivity towards monensin of receptor-mediated endocytosis of formaldehyde treated albumin by liver endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 968 (2): 143-150.
- 201 - Tazuke Y., Drongowski R. A., Teitelbaum D. H., and Coran A. G.** (2003). Interleukin-6 changes tight junction permeability and intracellular phospholipid content in a human enterocyte cell culture model. *Pediatr Surg Int* 19 (5): 321-325.
- 202 - Wang L., Srinivasan S., Theiss A. L., Merlin D., et al.** (2007). Interleukin-6 induces keratin expression in intestinal epithelial cells: potential role of keratin-8 in interleukin-6-induced barrier function alterations. *J Biol Chem* 282 (11): 8219-8227.
- 203 - Srinivas S. P., Satpathy M., Guo Y., and Anandan V.** (2006). Histamine-induced phosphorylation of the regulatory light chain of myosin II disrupts the barrier integrity of corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 (9): 4011-4018.
- 204 - Guo Y., Ramachandran C., Satpathy M., and Srinivas S. P.** (2007). Histamine-induced myosin light chain phosphorylation breaks down the barrier integrity of cultured corneal epithelial cells. *Pharm Res* 24 (10): 1824-1833.

- 205 - Furuse M., Furuse K., Sasaki H., and Tsukita S.** (2001). Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol* 153 (2): 263-272.
- 206 - Heller F., Florian P., Bojarski C., Richter J., et al.** (2005). Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 129 (2): 550-564.
- 207 - Prasad S., Mingrino R., Kaukinen K., Hayes K. L., et al.** (2005). Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab Invest* 85 (9): 1139-1162.
- 208 - Schmitz H., Barmeyer C., Fromm M., Runkel N., et al.** (1999). Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 116 (2): 301-309.
- 209 - Amasheh M., Schlichter S., Amasheh S., Mankertz J., et al.** (2008). Quercetin enhances epithelial barrier function and increases claudin-4 expression in Caco-2 cells. *J Nutr* 138 (6): 1067-1073.
- 210 - Hering N. A., Andres S., Fromm A., van Tol E. A., et al.** (2011). Transforming growth factor- $\beta$ , a whey protein component, strengthens the intestinal barrier by upregulating claudin-4 in HT-29/B6 cells. *J Nutr* 141 (5): 783-789.
- 211 - Borovac J., Barker R. S., Rievaj J., Rasmussen A., et al.** (2012). Claudin-4 forms a paracellular barrier, revealing the interdependence of claudin expression in the loose epithelial cell culture model opossum kidney cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 303 (12): C1278-1291.
- 212 - Noda S., Tanabe S., and Suzuki T.** (2013). Naringenin enhances intestinal barrier function through the expression and cytoskeletal association of tight junction proteins in Caco-2 cells. *Mol Nutr Food Res* 57 (11): 2019-2028.
- 213 - Bürgel N., Bojarski C., Mankertz J., Zeitz M., et al.** (2002). Mechanisms of diarrhea in collagenous colitis. *Gastroenterology* 123 (2): 433-443.
- 214 - Karnovsky M. J.** (1967). The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. *J Cell Biol* 35 (1): 213-236.
- 215 - Feder N.** (1971). Microperoxidase. An ultrastructural tracer of low molecular weight. *J Cell Biol* 51 (1): 339-343.
- 216 - Van Itallie C. M., Holmes J., Bridges A., Gookin J. L., et al.** (2008). The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2. *J Cell Sci* 121 (Pt 3): 298-305.
- 217 - Yu A. S., Cheng M. H., Angelow S., Günzel D., et al.** (2009). Molecular basis for cation selectivity in claudin-2-based paracellular pores: identification of an electrostatic interaction site. *J Gen Physiol* 133 (1): 111-127.

- 218 - Staehelin L. A.** (1973). Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J Cell Sci* 13 (3): 763-786.
- 219 - Cohen E., Ophir I., Henis Y. I., Bacher A., et al.** (1990). Effect of temperature on the assembly of tight junctions and on the mobility of lipids in membranes of HT29 cells. *J Cell Sci* 97 ( Pt 1): 119-125.
- 220 - Punnonen E. L., Ryhänen K., and Marjomäki V. S.** (1998). At reduced temperature, endocytic membrane traffic is blocked in multivesicular carrier endosomes in rat cardiac myocytes. *Eur J Cell Biol* 75 (4): 344-352.
- 221 - Hinshaw J. E.** (2000). Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 483-519.
- 222 - Damke H., Baba T., van der Blik A. M., and Schmid S. L.** (1995). Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. *J Cell Biol* 131 (1): 69-80.
- 223 - Griffiths G., Back R., and Marsh M.** (1989). A quantitative analysis of the endocytic pathway in baby hamster kidney cells. *J Cell Biol* 109 (6 Pt 1): 2703-2720.
- 224 - Cao H., Chen J., Awoniyi M., Henley J. R., et al.** (2007). Dynamin 2 mediates fluid-phase micropinocytosis in epithelial cells. *J Cell Sci* 120 (Pt 23): 4167-4177.
- 225 - Cheng Z. J., Singh R. D., Holicky E. L., Wheatley C. L., et al.** (2010). Co-regulation of caveolar and Cdc42-dependent fluid phase endocytosis by phosphocaveolin-1. *J Biol Chem* 285 (20): 15119-15125.
- 226 - Hollinshead M., Johns H. L., Sayers C. L., Gonzalez-Lopez C., et al.** (2012). Endocytic tubules regulated by Rab GTPases 5 and 11 are used for envelopment of herpes simplex virus. *EMBO J* 31 (21): 4204-4220.
- 227 - Lo W. K., Zhou C. J., and Reddan J.** (2004). Identification of caveolae and their signature proteins caveolin 1 and 2 in the lens. *Exp Eye Res* 79 (4): 487-498.
- 228 - Li H. H., Li J., Wasserloos K. J., Wallace C., et al.** (2013). Caveolae-dependent and -independent uptake of albumin in cultured rodent pulmonary endothelial cells. *PLoS One* 8 (11): e81903.
- 229 - Sieczkarski S. B., and Whittaker G. R.** (2002). Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 76 (20): 10455-10464.
- 230 - Plummer E. M., and Manchester M.** (2013). Endocytic uptake pathways utilized by CPMV nanoparticles. *Mol Pharm* 10 (1): 26-32.
- 231 - Pelkmans L., Fava E., Grabner H., Hannus M., et al.** (2005). Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature* 436 (7047): 78-86.

- 232 - Kerr M. C., and Teasdale R. D.** (2009). Defining macropinocytosis. *Traffic* 10 (4): 364-371.
- 233 - Lim J. P., Wang J. T., Kerr M. C., Teasdale R. D., et al.** (2008). A role for SNX5 in the regulation of macropinocytosis. *BMC Cell Biol* 9: 58.
- 234 - Lim J. P., Teasdale R. D., and Gleeson P. A.** (2012). SNX5 is essential for efficient macropinocytosis and antigen processing in primary macrophages. *Biol Open* 1 (9): 904-914.
- 235 - Kumari S., Mg S., and Mayor S.** (2010). Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res* 20 (3): 256-275.
- 236 - Nara A., Aki T., Funakoshi T., Unuma K., et al.** (2012). Hyperstimulation of macropinocytosis leads to lysosomal dysfunction during exposure to methamphetamine in SH-SY5Y cells. *Brain Res* 1466: 1-14.
- 237 - Lamaze C., Chuang T. H., Terlecky L. J., Bokoch G. M., et al.** (1996). Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. *Nature* 382 (6587): 177-179.
- 238 - Malecz N., McCabe P. C., Spaargaren C., Qiu R., et al.** (2000). Synaptojanin 2, a novel Rac1 effector that regulates clathrin-mediated endocytosis. *Curr Biol* 10 (21): 1383-1386.
- 239 - Nelms K., Keegan A. D., Zamorano J., Ryan J. J., et al.** (1999). The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* 17: 701-738.
- 240 - Doherty G. J., and McMahon H. T.** (2008). Mediation, modulation, and consequences of membrane-cytoskeleton interactions. *Annu Rev Biophys* 37: 65-95.
- 241 - Bomsel M., Prydz K., Parton R. G., Gruenberg J., et al.** (1989). Endocytosis in filter-grown Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* 109 (6 Pt 2): 3243-3258.
- 242 - Engel S., Heger T., Mancini R., Herzog F., et al.** (2011). Role of endosomes in simian virus 40 entry and infection. *J Virol* 85 (9): 4198-4211.
- 243 - Terpend K., Boisgerault F., Blaton M. A., Desjeux J. F., et al.** (1998). Protein transport and processing by human HT29-19A intestinal cells: effect of interferon gamma. *Gut* 42 (4): 538-545.

## 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Bovines Serum Albumin
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
C <sup>epi</sup>	epitheliale Kapazität
CU	Colitis ulcerosa
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DAPI	4',6-Diamin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid
ddH <sub>2</sub> O	zweifachdestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSS	dextran sulfate sodium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEA1	<i>Early endosome antigen 1</i>
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
EIPA	5-(N-Ethyl-N-isopropyl)-Amilorid
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FTS	Farnesylthiosalicylsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL	Interleukin
I <sub>sc</sub>	Kurzschlussstrom
kbp	Kilobasenpaare
LAMP1	<i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MBCD	Methyl- $\beta$ -cyclodextrin
MC	Morbus Crohn
MiTMAb	Myristyltrimethylammoniumbromid
MW	Mittelwert
P	Permeabilität

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS-T	Phosphatgepufferte saline Lösung mit Tween ( <i>phosphate buffered saline with Tween</i> )
PFA	Paraformaldehyd
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	rounds per minute
$R^{\text{epi}}$	epithelialer Widerstand
$R^{\text{para}}$	parazellulärer Widerstand
$R^{\text{sub}}$	subepithelialer Widerstand
$R^{\text{t}}$	transepithelialer Widerstand
$R^{\text{trans}}$	transzellulärer Widerstand
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Mittlerer Standardfehler ( <i>standard error of the mean</i> )
SNX5	Sorting nexin 5
STAT6	<i>signal transducer and activator of transcription 6</i>
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TEMED	N,N,N,N-Tetramethyldiamin
TJ	Tight Junction
ü. N.	über Nacht
$Z_{\text{im}}$	Imaginärteil der komplexen Zahl
$Z_{\text{re}}$	Realteil der komplexen Zahl

International übliche physikalische und biochemische Abkürzungen sind nicht extra aufgeführt.

## 9 ANHANG

### 9.1 Publikationen

#### Originalarbeiten:

Bücker R, Schulz E, Günzel D, Bojarski C, Lee IM, **John LJ**, Wiegand S, Janßen T, Wieler LH, Dobrindt U, Beutin L, Ewers C, Fromm M, Siegmund B, Troeger H, Schulzke JD (2014)  $\alpha$ -Haemolysin of *Escherichia coli* in IBD: a potentiator of inflammatory activity in the colon. *Gut*. doi: 10.1136/gutjnl-2013-306099.

**John L**, Aguilar L, Ayasse M, Jarau S (2012) Nest-specific composition of the trail pheromone of the stingless bee *Trigona corvina* within populations. *Insect. Soc.* 59(4): 527-532.

Schulzke JD, Günzel D, **John LJ**, Fromm M (2012) Perspectives in tight junction research. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1257: 1-19.

**John LJ**, Fromm A, Fromm M, Schulzke JD, Amasheh M (2011) Anti-inflammatory and barrier-protective effects of berberine. *Z. Gastroent.* 49: S14-S15.

**John LJ**, Fromm M, Fromm M, Schulzke JD (2011) Epithelial barriers in intestinal inflammation. *Antioxid. Redox Signal.* 15(5): 1255-1270.

Dechmann DK, **John L**, Noventa T, Voigt CC (2009) Polymorphic microsatellites for the lesser bulldog bat (*Noctilio albiventris*) cross-amplify with close and distant relatives. *Conserv. Genet. Resour.* 1(1): 167-170

## 9.2 Lebenslauf

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



### 9.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke, der mir die Möglichkeit gab, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, und mich immer unterstützt und ermutigt hat.

Prof. Dr. Udo Heinemann danke ich herzlich für die Betreuung dieser Arbeit an der Freien Universität Berlin.

Vielen Dank an Prof. Dr. Michael Fromm für die Möglichkeit, meine Arbeit im Labor des Instituts für Klinische Physiologie durchzuführen.

Ich danke dem Team der Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie, insbesondere PD Dr. Christian Bojarski, Dr. Michael Schumann, Dr. Hanno Tröger, Dr. Christian Barmeyer und Dr. Jan Preiß, für die großartige Hilfe bei der Beschaffung der Patientenbiopsien. Weiterhin danke ich allen Patienten, die sich dazu bereit erklärt haben, sich Biopsien für meine Versuche entnehmen zu lassen.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter des Instituts für Klinische Physiologie sowie der Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie. Ganz herzlich danke ich Claudia May, In-Fah Lee, Julia Lüttig, Silke Zakrzewski, Svenja Plöger, Britta Jebautzke und Roland Bücken für die gemeinsame Zeit im Labor. Ein besonderes Dankeschön an Dana Kuntzsch und Stephanie Wiegand für die nette „Nachbarschaft“.

Ein großes Dankeschön an Detlef Sorgenfrei für seine tolle Hilfe bei allen technischen Problemen.

Anja Fromm möchte ich für ihre Hilfe bei den Biopsieversuchen und ihre vielen wichtigen Tipps danken.

Mein außerordentlicher Dank gilt Dr. Michael Schumann für seine wichtigen und sehr hilfreichen Ideen, Tipps und Anregungen, seine Hilfe bei den Immunfluoreszenzaufnahmen und das Korrekturlesen.

Vielen Dank an Dr. Susanne Krug für ihre große Hilfe bei den Impedanzversuchen und vor allem den Auswertungen.

Ich danke Dr. Nina Hering für die Vorarbeit zu den Biopsieversuchen.

Vielen Dank an die Forschungsgruppe Cellular Imaging des Leibniz-Instituts für Molekulare Pharmakologie für die Möglichkeit, ihr Fluoreszenzmikroskop zu nutzen. Besonders möchte ich Jenny Eichhorst für ihre große Hilfsbereitschaft danken.

Der Sonnenfeld-Stiftung möchte ich herzlich für die finanzielle Unterstützung danken.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie, Stefan und meinen Freunden ganz herzlich dafür danken, dass sie mich immer unterstützt, aufgebaut und auch mal abgelenkt haben. Ohne euch hätte ich das nicht geschafft!