

Aus der Medizinischen Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und
Rheumatologie (einschließlich Arbeitsbereich Ernährungsmedizin)
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Endozytose von „Tight junction“-Strukturproteinen in intestinalen
Epithelzellen und die Auswirkung von Zytokinen auf die epitheliale
Barriere**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marie-Luise Pahlitzsch

aus Berlin

Datum der Promotion: 09.09.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Abstrakt	3
1. Einleitung	7
1.1 Endozytose	7
1.1.1 Clathrin-abhängige Endozytose	7
1.1.2 Caveolae-abhängige Endozytose	8
1.1.3 Die große GTPase Dynamin	9
1.1.4 Makropinozytose und Phagozytose	10
1.1.5 Nicht-Caveolae- und nicht-Clathrin-vermittelte Endozytose	11
1.1.6 Intraepitheliales Trafficking / endosomale Kompartimente	11
1.2 Tight Junction	13
1.2.1 Aufbau der Tight Junctions	14
1.2.1.1 Occludin	14
1.2.1.2 Proteine der Claudin-Familie	15
1.2.1.3 Junctional adhesion molecules (JAMs)	17
1.2.1.4 Tricellulin	18
1.2.1.5 TJ-assoziierte Proteine	18
1.2.2 Endozytose von Tight Junctions	19
1.3 Zytokine	19
1.3.1 Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α)	20
1.3.2 Interferon- γ (IFN- γ)	21
1.3.3 Interleukin-22 (IL-22)	22
1.3.4 Interleukin-13 (IL-13)	24
1.4 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)	25
1.4.1 Epidemiologie und Klinik	25
1.4.2 Pathophysiologie der CED	25
2. Zielsetzung der Arbeit	27
3. Material und Methoden	28
3.1 Material	28
3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	28
3.1.2 Antikörper für die Immunofluoreszenzfärbung	28
3.1.3 Verwendete Zytokine	29
3.1.4 Sonstige	29
3.1.5 Geräte	29
3.2. Methoden	30
3.2.1 Zellkultur	30
3.2.2 Messung des transepithelialen Widerstands (TER)	32
3.2.3 Bestimmung des Fluorescein-Flux in der Ussing-Kammer	34
3.2.4 Immunfluoreszenzfärbung (IF)	35
3.2.5 Auswertung und Statistik	35

4. Ergebnisse	36
4.1 Einfluss von epithelialer Endozytose am „Steady-State“-Level der epithelialen Barriere	36
4.1.1 Transepithelialer Elektrischer Widerstand (TER)	36
4.1.2 Bestimmung der parazellulären Permeabilität für Makromoleküle	37
4.1.3 Morphologie der epithelialen Tight Junction (TJ) in konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie nach Endozytose-Hemmung in Caco-2-Zellen	38
4.2 Endozytose von TJ-Proteinen nach Exposition proinflammatorischer Zytokine	48
4.2.1 TER-Messung nach Exposition proinflammatorischer Zytokine	48
4.2.2 TJs nach Zytokinexposition	52
5. Diskussion	68
5.1 Einfluss von Endozytose der TJ-Proteine auf die epithelialen Barrierefunktionen	68
5.2 Wirkung von proinflammatorischen Zytokinen auf die transepitheliale Barriere der T84-Zellen	72
5.2.1 TNF- α und TNF- α + IFN- γ	72
5.2.2 Interleukin-22 (IL-22)	74
5.2.3 Interleukin-13 (IL-13)	75
5.3 Limitationen der Arbeit	76
5.4 Potential der Forschung an TJ-Endozytose und Ausblick	77
6. Zusammenfassung	79
7. Literaturverzeichnis	80
8. Eidesstattliche Versicherung	94
9. Lebenslauf	95
10. Danksagung	97

Abkürzungsverzeichnis

AEE	Apical Early Endosome
AP	Adapter Protein
APC	Antigen Presenting Cell
BEE	Basal Early Endosome
BSA	Bovine Serum Albumin
Cav	Caveolae
CCV	Clathrin-Coated-Vesicle
CD	Cyclodextrin
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
Con A	Concanavalin A
CU	Colitis ulcerosa
Da	Dalton
DAPI	4', 6'-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
Drp	Dynamamin-related-protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEA-1	Early Endosomal Antigen-1
EGTA	Ethylenbis (oxyethylennitrilo) Tetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FKS	Fetales Kälberserum
GPCR	G-Protein-Coupled Receptor
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
GTPase	Guanosin-5'-Triphosphatase
HRP	Horse Radish Peroxidase
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IF	Immunfluoreszenzfärbung
IFN	Interferon
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
JAK	Janus-Kinasen
JAM	Junctional Adhesion Molecule
LAMP	Lysosom-Assoziiertes Membranprotein
LDL	Low Density Lipoprotein
lncRNA	long noncoding RNA
LPMC	Lamina Propria Mononuclear Cell
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
M. Crohn	Morbus Crohn
MCP	Monocyte Chemotactic Protein
MDCK	Madin Darby Canine kidney
MHC	Major Histocompatibility Complex
MILCK	Myosin-Leichtketten-Kinase
MVB	Multivesicular Bodies
NK	Natürliche Killerzellen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDZ	Postsynaptic Density Zone

mRNA	messenger Ribonucleic Acid
Rab	Ras-related in brain
STAT	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
TER	Transepithelialer Widerstand
TGF	Tumor Growth Factor
TH	T-Helferzelle
TJ	Tight Junction
TNF	Tumornekrosefaktor
ZO-1	Zonula Occludens-1

Abstrakt

Einleitung: Unter Endozytose versteht man einen Vorgang, in dessen Rahmen eine Zelle Stoffe aufnimmt, die sich im Extrazellulärraum befinden oder solche, die Teil der sich einstülpenden Membran sind. Tight Junctions (TJ, deutsch „Schlussleisten“) sind aus unterschiedlichen Transmembranproteinen aufgebaut und umgeben die laterale Membran von Epithelzellen gürtelförmig. Sie bilden u.a. eine parazelluläre Barriere, die Konzentrationsunterschiede von Substanzen der beiden Seiten des Epithels aufrechterhält. Verschiedene Zytokine sind in der Lage, diese parazelluläre Barriere zu verändern und Endozytose zu induzieren. Bislang etabliert ist dabei die Regulation der Transkription von TJ-Proteinen. Die Endozytose von TJ-Proteinen als eine weitere Regulationsoption der TJ-Funktion ist in der Diskussion.

Zielsetzung: Ziel der Arbeit war es, die Rolle der Endozytose in der TJ-Funktion zu klären bzw. mechanistische Vorgänge, die dieser Funktion zugrunde liegen, zu unterbreiten und in ersten Experimenten zu stützen.

Methodik: Die Barrierefunktion wurde nach Hemmung der Endozytose (Dynasore, Pitstop-2) und nach Inkubation der Epithelzellen mit Zytokinen untersucht. Es wurden drei Darmepithelzelllinien verwendet: T84, Caco-2, Caco-2-Claudin-5. Die Barrierefunktion wurde mittels Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TER) sowie des parazellulären Fluorescein-Flux untersucht. Ferner erfolgten Untersuchungen zur TJ-Integrität mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie nach Immunfluoreszenz-Färbung der TJ-Proteine.

Ergebnisse: Es konnte gezeigt werden, dass Dynasore und Pitstop-2 zu einem statistisch signifikanten TER-Anstieg bzw. -Abfall führen. Eine Dynasore- bzw. Pitstopinkubation führte zu einer Verringerung der parazellulären Fluorescein Permeabilität. Beide Endozytoseinhibitoren führen zu einer Umverteilung oder veränderten Expression von TJ- oder TJ-assoziierten Proteinen. Die Zytokinversuche ergaben ein Ausbleiben einer frühen TER-Veränderung. Für die Inkubation der Epithelzellen mit IL-13 und IL-22 ergab sich eine statistisch signifikante TER-Reduktion nach 48 Stunden. Ein Rescue dieser Zytokin-assoziierten TER-Veränderungen durch parallele Inkubation mit einem Endozytosehemmer blieb aus. Die

Immunfluoreszenzfärbungen zeigten eine Umverteilung und Expressionsänderung von TJ- und TJ-assoziierten Proteinen nach Zytokin-Inkubation.

Schlussfolgerung: Die Wirkung der Endozytoseinhibitoren auf den TER zeigt, dass eine Regulation der parazellulären Barriere nicht nur durch die veränderte Transkription von TJ-Proteinen erreicht wird, sondern dass die Aufnahme dieser durch Endozytose ebenfalls eine Rolle spielt. Der Anstieg des TER hervorgerufen durch Dynasore müsste also am ehesten durch eine verstärkte Expression eines abdichtenden nicht im Rahmen dieser Arbeit untersuchten TJ-Proteins erfolgen oder durch die verringerte Expression des kanalbildenden Claudin-2. Bei Pitstop sinkt der TER ab, ebenso wie es zu einer Abnahme des parazellulären Fluorescein-Transports kommt. Der nach IL-13- und IL-22-Inkubation hervorgerufene TER-Abfall ließ sich nicht abschließend klären, die epitheliale Integrität zeigte sich erhalten, Apoptosen zeigten sich nicht und frühe Endozytose-Effekte nach Minuten ließen sich nicht nachweisen.

(397 Wörter)

Abstract

Introduction: Endocytosis is known as a process in which a cell takes in substances, that are situated in the extracellular space or that are part of the invaginated membrane. Tight Junctions (TJ) are composed out of various transmembrane proteins and encompass the lateral membrane in a belt-shaped manner. Amongst others, they form a paracellular barrier that preserves the gradient of different substances. Several cytokines have the ability to alter the TJ associated paracellular barrier and induce endocytosis. Furthermore, the endocytosis of TJ proteins as a regulation option of the TJ function is in discussion.

Methods: The barrier function was examined after both inhibition of endocytosis (dynasore, pitstop-2) and incubation of the epithelium cells together with cytokine. Three cell lines were used: T84, Caco-2, Caco-2-Claudin-5. Measurement barrier function via the measurement of electrical resistance (TER) and the paracellular fluorescein-flux were used. Regarding TJ integrity it was further investigated through confocal laser-scanning-microscopy after immunofluorescence staining of the TJ proteins.

Results: Dynasore and pitstop-2 lead to a statistical significant TER increase and decrease respectively. They both lead to a decline of paracellular fluorescein permeability. Both inhibitors lead to reallocation or altered expression of TJ or TJ associated proteins. The experiments with cytokine resulted in an absence of an early TER alteration. The incubation with IL-13 and IL-22 resulted in a statistically significant TER reduction after 48 hours. A rescue of the cytokine associated TER alteration through parallel incubation with dynasore failed. The immunofluorescence staining showed a reallocation and express alteration of TJ associated proteins after the incubation of cytokine.

Conclusion: The effect of endocytosis inhibitors on TER shows that a regulation of paracellular barriers cannot only be accomplished through the altered transcription of TJ proteins, but also by the altered uptake of the TJ-proteins through endocytosis. The TER increase following the dynasore incubation should rather be investigated through an increased expression of a sealing TJ-protein (not investigated within the context of

this dissertation) or through a reduced expression of the channel-forming Claudin-2. Pitstop-2 caused a TER descent and an alteration of the paracellular transport. The descent of TER induced by incubation of IL-13 and IL-22 could not finally be clarified; the epithelial integrity was preserved and early endocytosis effects after minutes could not be verified. (372 words)

1. Einleitung

1.1 Endozytose

Die Endozytose ist ein Vorgang, in dessen Rahmen eine Zelle durch eine Einstülpung ihrer Membran ein sog. „Cargo“, d.h. einen oder mehrere Stoffe, die sich im Extrazellulärraum befinden oder die Teil der sich einstülpenden Membran sind, aufnimmt. Die Endozytose kann in unterschiedliche Kategorien unterteilt werden: (i) Clathrin-abhängige Endozytose, (ii) Caveolae-abhängige Endozytose, (iii) Makropinozytose und (iv) Phagozytose, wobei die beiden zuletzt genannten Prozesse Clathrin- und Dynamin-unabhängig sind (Utech et al., 2010).

Nach der vollständigen Abschnürung der Vesikel reifen diese zu einem „Ras related in brain5“ (Rab5) und „Early Endosomal Antigen-1“ (EEA-1) - positiven frühen Endosomen aus. Hier erfolgt die weitere Sortierung des Vesikelinhalts, wobei diese im weiteren Verlauf zur Zellmembran rezirkuliert werden können oder sich durch weitere Reife- und Fusionsprozesse in späten Endosomen entwickeln können und dann mit anderen Vesikeln zu Lysosomen verschmelzen können (Abb. 1.1).

1.1.1 Clathrin-abhängige Endozytose

Es ist bekannt, dass der Clathrin-assoziierte Endozytoseweg eine Vielzahl von Rezeptoren transportiert und dabei, z.B. den Transferrin- und „Epidermal Growth Faktor“ (EGF)-Rezeptor und das „Low Density Lipoprotein“ (LDL) internalisiert. Damit ist die Rezeptor-vermittelte Endozytose typisch für diesen Mechanismus (Goldstein et al., 1979, 1985).

Der Ablauf einer Clathrin-abhängigen Endozytose läuft im Einzelnen in mehreren Schritten ab: Der konzeptionell erste Schritt der Bildung eines Clathrin-beschichteten Vesikels (engl. *Clathrin-coated vesicle*, CCV) läuft auch an einer nicht stimulierten Zellmembran spontan ab. So bilden sich Clathrintriskelion, die Trimere von Clathrinheterodimeren darstellen. Das bedeutet, dass die schwere Kette und die leichte Kette des Clathrins an der Membran polymerisieren und dort nach Stimulation stabilisiert werden. Dazu ist – neben dem Stimulus durch das zukünftige Cargo – die Anwesenheit einer Reihe von Adapterproteinen (AP) notwendig, die wiederum verschiedene sortierende Proteinmotive von Transmembranproteinen erkennen, u.a. YXXF, DEXXX-LLI, FXNPXY wie auch Polyubiquitinierungsmotive (Ungewickell &

Hinrichsen, 2007). AP dirigieren die Bildung eines Clathringitters (engl. *Clathrin lattice*) über die Interaktion mit einem speziellen Inositolphosphat (PI4, 5P2) und Clathrin hin zu speziellen Membranorten (Keen & Beck, 1989). Diese Assoziation wird weiter stabilisiert durch die Interaktion mit Proteinen wie Epsin und AP180/CALM, welche AP2, PIP2 und Clathrin binden (Young, 2007; Abb. 1.1). Weitere regulatorische Proteine sind Amphiphysin, Endophilin und β -Arrestin. Ersteres ist bei der Einstülpung der Membran zur Ausbildung des Clathrin-ummantelten Vesikels beteiligt (Blood & Voth, 2006; McMahon, 2005). Der Endozytosehemmer Pitstop-2 setzt an diesem Schritt an und blockiert die Bindung zwischen Amphiphysin und Clathrin (von Kleist et al., 2011). β -Arrestin, das an AP-2 und Clathrin bindet, hilft u.a. G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) bei der Aufnahme in die Zelle (Laporte, 1999).

Im nächsten Schritt folgt die Abschnürung des Clathrin-beschichteten Vesikels am Vesikelhals durch die große GTPase Dynamin (siehe 1.1.3). Nach erfolgreicher Bildung eines ca. 150-200 nm durchmessenden intrazellulären Vesikels wird die Clathrinhülle entfernt und das Vesikel reift unter Vermittlung des EEA-1 und des Rab5 zum frühen Endosom aus (Zerial & Mc Bride, 2001).

1.1.2 Caveolae-abhängige Endozytose

Caveolae sind Einstülpungen (engl. *invaginations*) der Zellmembran, die initial elektronenmikroskopisch charakterisiert wurden und ca. 60-80 nm Durchmesser (Palade, 1953). Ihre Lipidzusammensetzung zeichnet sich durch einen hohen Cholesterol- und Shingolipidgehalt aus. Sie spielen bei einer Reihe zellulärer Prozesse, u.a. bei der Endozytose und der Transzytose, sowie bei der Calcium-abhängigen Signaltransduktion eine Rolle. Ein wichtiger Proteinbestandteil ist das Caveolin-1. Caveolin-1-Expression in Zellen, die über kaum oder keine Caveolae verfügen, induziert die Ausbildung von Caveolae (Klein et al., 1995). Die Endozytose via Caveolae wird - wie die CCV-Endozytose - durch Dynamin vermittelt und ist ein Clathrin-unabhängiger Prozess.

Caveolae scheinen eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der Lipidhomöostase zu spielen, da sich im Mausmodell und auch bei Menschen beim Fehlen von Caveolae eine Lipodystrophie zeigte (Pilch & Liu, 2011). Zudem kann eine Mutation im Caveolin-Gen zum Auftreten von Muskeldystrophien, Kardiomyopathien und Myopathien sowohl in Menschen als auch in Mäusen führen (Galbiati et al., 2001; Garg & Agarwal, 2008).

Bei der Caveolae-abhängigen Endozytose erfolgt die Abschnürung der Caveolae durch die GTPase Dynamin-2. Es bildet sich in der Folge ein Caveosom, das auch Rab5-positiv ist. Spezifische Caveolin-Inhibitoren existieren leider nicht. Die Aufnahme kann durch Modifikation des Cholesterolgehalts der Zellmembran perturbiert werden, wie z.B. durch Filipin, Nystatin, methyl- β -cyclo-Dextrin ($m\beta$ -CD). Zudem kann durch Dynamin-Hemmung (z.B. mit Dynasore) auch die Caveolae-Endozytose inhibiert werden (Oh et al., 2012).

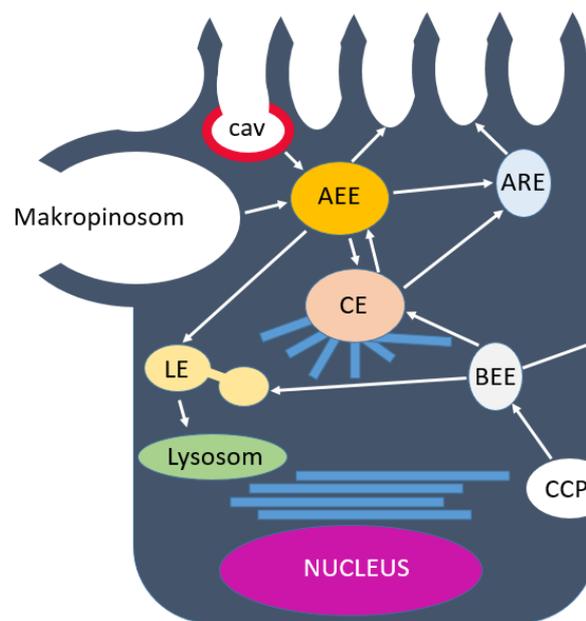


Abb. 1.1: Vesikulärer Transport in intestinalen Epithelzellen

Zellmembranständige Proteine werden auf unterschiedlichen Wegen internalisiert, z.B. durch Clathrin ummantelte Vesikel, sog. „clathrin coated pits“ (CCP), Caveolae (Cav) und Makropinozytose. Nun werden sie – je nach Ort der Aufnahme – in apikalen frühen Endosomen (engl. *apical early endosome*, AEE) oder in basolaterale frühe Endosomen (engl. *basolateral early endosome*, BEE) transportiert. Zusammengeführt werden sie im gemeinsamen Endosom (engl. *common endosome*, CE). Von dort gelangen sie entweder über das rezirkulierende Endosom (RE) zurück zur Zellmembran oder werden in das späte Endosom (engl. *late endosome*, LE) und dann in Lysosome überführt (modifiziert nach Ivanov et al., 2005).

1.1.3 Die große GTPase Dynamin

Dynamin ist eine große GTPase, die über eine Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne) an Lipidbestandteile der Zellmembran binden kann und assoziiert über seine Prolin-reiche Domäne (PRD) mit der SH3-Domäne einer Reihe von Adapterproteinen (Shpetner et al., 1996).

Nach Polymerisation vieler sich spiralförmig anlegender Dynaminmoleküle am Hals eines sich formenden endozytotischen Vesikels, wird durch mechanoenzymatische Aktivität die Abschnürung eines Vesikels von der Plasmamembran verursacht (Sweitzer & Hinshaw, 1998). Die Verengung dieser Dynaminspirale geht zum Teil auf eine Drehbewegung des Dynamins zurück, die GTP-abhängig erfolgt (Chua et al., 2009). Es existieren drei Dynamin-Isoformen: Dynamin-1 wird in Neuronen exprimiert und ist nicht außerhalb neuronalen Gewebes zu finden. Dynamin-2 wird ubiquitär exprimiert und Dynamin-3 kann im Gehirn exprimiert werden, allerdings in einer geringeren Konzentration als Dynamin-1. Dynamin-3 ist zudem im Hoden und in geringen Konzentrationen auch in anderen Geweben wie z.B. der Lunge exprimiert (Cao et al., 1998). Der Inhibitor Dynasore hemmt Dynamin-1, Dynamin-2 und „Dynamin-related-protein“ (Drp) und zwar durch die nicht-kompetitive Hemmung der GTPase-Funktion (Macia et al., 2006).

1.1.4 Makropinozytose und Phagozytose

Die Prozesse Makropinozytose und Phagozytose laufen im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Prozessen in einem größeren Maßstab ab, d.h. es bilden sich nach der Internalisierung größerer Partikel bzw. eines signifikanten Flüssigkeitsvolumens große Vesikel bzw. Vakuolen. Die Makropinozytose wird hauptsächlich für die nicht-selektive Aufnahme von Flüssigkeiten und den darin gelösten Makromolekülen genutzt. Makropinosome können eine Größe von 0,2 bis 10 µm haben. Interessanterweise ist zur Bildung eines Makropinosoms der direkte Kontakt mit dem zu internalisierendem Material nicht erforderlich. Die Makropinosombildung wird durch Agentien wie Phorbolster, Pathogene und Wachstumsfaktoren (z.B. EGF) stimuliert (Mukherjee et al., 1997; Bonifacino & Glick, 2004).

Bei der Phagozytose werden große Partikel wie Bakterien, aber auch apoptotische Zellen und Zelldebris aufgenommen. Die Phagozytose wird durch die Interaktion eines Oberflächenrezeptors (engl. *pattern recognition receptor*) mit einem Erkennungsmerkmal (engl. *pathogen-associated pattern*) initiiert. Dabei kann zwischen körpereigenem und -fremden Material unterschieden werden (Janeway, 1992). In diesem Rahmen formt sich über die Aktivität des zellulären Actomyosin-Komplex eine Membrankurvatur um den zu endozytierenden Partikel. Es folgt die Kontraktion des Actomyosinrings und die Aufnahme des sog. Phagosoms, welches dann in der Zelle weiter heranreift.

1.1.5 Nicht-Caveolae- und nicht-Clathrin-vermittelte Endozytose

Neben den beschriebenen Endozytosemechanismen existiert eine unspezifische Art der Endozytose, die in der Literatur bisher sehr schlecht charakterisiert ist (Bishop, 1997; Nicols & Lippincott-Schwartz, 2001). Es werden unter diesem Begriff aktive Aufnahmeprozesse zusammengefasst die Dynamin abhängig sind, jedoch nicht von Caveolae und nicht von Clathrin vermittelt werden. Diese Form passt in keine der oben beschriebenen Kategorien.

1.1.6 Intraepitheliales Trafficking / endosomale Kompartimente

Die Trafficking-Prozesse, die intrazellulär d.h. nach erfolgter Abschnürung des Endosoms von der Plasmamembran ablaufen, sind in Epithelzellen noch nicht hinreichend beforscht. Dies erklärt sich sicherlich damit, dass Epithelzellen auf Grund ihres polaren Zellaufbaus, auch hinsichtlich endozytotischer Vorgänge, deutlich komplexer sind. So sind die apikale und die basolaterale Membran in Bezug auf ihre biochemische Komposition (bspw. Membran-assoziierte Proteine, Transmembranproteine, Lipide) und ihrer Funktion grundverschieden. Daher sind gerade vor dem Hintergrund, dass die Endozytosevorgänge eine zusätzliche Variabilität mit sich bringen (Clathrin-abhängige Endozytose, caveoläre Endozytose, Makropinozytose, Phagozytose), Erkenntnisse zu Endozytosevorgängen im Epithel rarer gesät. Bekannt ist jedoch, dass nach erfolgter endosomaler Abschnürung eines Cargo-besetzten Vesikels, dieses in das frühe endosomale Kompartiment transportiert wird. Dies übernimmt eine Sortierungsfunktion, von dem aus das Cargo (i) in einen Rezyklierungsweg, (ii) einen degradierenden, d.h. Protein-abbauenden Weg oder (iii) auf dem apiko-basalen oder baso-apikalen Transportweg durch die Zelle geschleust wird (Abb. 1.1).

Für die vermutlich Rezeptor-unabhängige, am ehesten pinosomale Aufnahme, des makromolekularen Proteins „Horse Radish Peroxidase“ (HRP) wurde in Nierenepithelzellen die Aufnahme von apikal in ein Rab5-positives apikales frühes Endosom (engl. *apical early endosome*, AEE) und von basal in ein analoges, ebenfalls Rab5-positives, basolaterales frühes Endosom (engl. *basal early endosome*, BEE) dargestellt. Auch wurde eine Funktion der kleinen GTPase Rab5 bei diesem Prozess nahegelegt, da eine Rab5-Überexpression diesen Prozess quantitativ förderte (Bucci et al., 1994).

Ferner ist das Protein Rabankyrin ein diesbezüglich wichtiger - sog. Rab5-Effektor - da es das aktivierte Rab5-GTP bindet und die apikale (und nicht die basolaterale) pinosomale Aufnahme von Makromolekülen positiv reguliert (Schnatwinkel et al., 2004). Wie läuft der Transport bzw. die Prozessierung des Cargo im Epithel weiter ab? Aufwändige *in vivo*-Versuche an Rattendünndarm-Mukosa haben gezeigt, dass getrennt voneinander luminal sowie von serosal/basolateral aufgenommene Proteine in den Epithelzellen in ein gemeinsames Kompartiment, nämlich den apikal gelegenen späten Endosomen und den „Multivesicular Bodies“ (MVB), transportiert werden. Von den MVB werden sie in den perinukleär gelegenen Lysosomen zur Degradation (Fujita et al., 1990) transportiert. Weitere Studien identifizierten dieses gemeinsame Endosom (engl. *common endosome*, CE) als Rab4- und Rab17-positiv (Zacchi et al., 1998). Von da aus kann das Cargo - so es sich in den vakuolären Anteilen des CE befindet - zur lysosomalen Verdauung weitergereicht werden oder - wie für den Komplex Transferrin-Transferrin-Rezeptor gezeigt - von den tubulären Anteilen des CE hin zu einem Rab11/Rab25-positiven Kompartiment (sog. „apical recycling endosome“, ARE) zurück an die apikale Zellmembran oder alternativ transzytiert werden (siehe unten, Norouziyan et al., 2008; Apodaca, 2001).

Eine Rab11b-Abhängigkeit der Cargo-Rezyklierung ist in intestinalen Epithelzellen zudem für die Rezyklierung des apikalen Chloridkanal „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“ (CFTR) gezeigt (Silvis et al., 2009).

Dahingegen ist die Sortierung in den degradierenden Weg zum Lysosom hin abhängig von Rab7 und wird angezeigt durch das Protein LAMP, dies wurde u.a. für die endozytotische Aufnahme des Echovirus-7 gezeigt (Kim et al., 2012).

Beim dritten Transportweg, der Transzytose, erfolgt nach apikaler (bzw. basolateraler) endozytotischer Aufnahme und einem transzellulären Transport eine basolaterale (bzw. apikale) Sekretion. Für intestinale Epithelzellen ist dies für die Rezeptor-abhängige Endozytose (Transferrinrezeptor) unter Einbezug eines Rab11-positiven Kompartiments gezeigt (Norouziyan et al., 2008). Die mutmaßlich pinosomale Aufnahme eines 33 Aminosäuren langen Gliadinpeptids erfolgt wiederum unter Beteiligung von Rab5 (Schumann et al., 2008).

Der von basolateral aufgenommene Komplex aus dem polymeren Immunglobulin-Rezeptor und dimeren IgA passiert die o.g. CE und ARE und erreicht dann die apikale Zellmembran und stellt damit das am besten studierte Modellsystem einer baso-apikalen Transzytose dar (Gibson et al., 1998).

1.2 Tight Junction

Die Tight Junction (TJ) bildet in Epithelzellen eine interzelluläre Barriere zwischen Lumen und Interstitium. Sie ist der am weitesten apikal gelegene Bestandteil des Schlussleistenkomplexes der aus TJ, Zonula adherens und Desmosomen (Farquhar & Palade, 1963) besteht. Im Gegensatz zur Zonula adherens und den Desmosomen, bei denen die gegenüberliegenden Membrane einen Abstand von ca. 15-20 nm besitzen, ist der Interzellulärraum im Bereich der TJ vollständig abgedichtet (Tsukita et al., 2001; Abb. 1.2). Im Transmissionselektronenmikroskop werden diese Stellen daher als sog. „kissing points“ sichtbar.

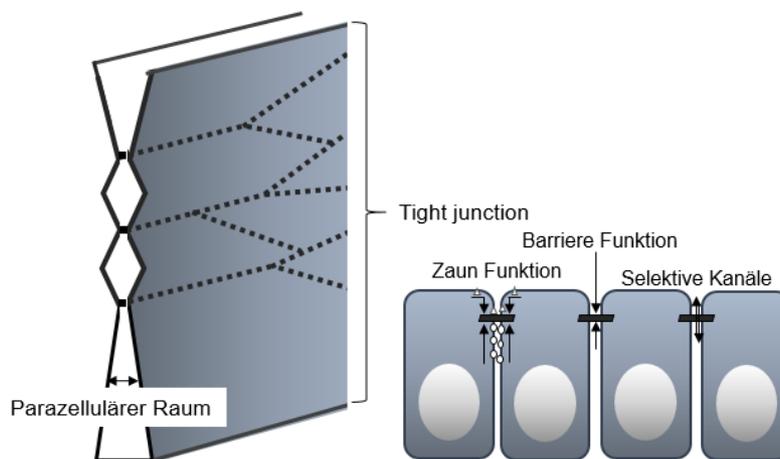


Abb. 1.2: Morphologie und Funktion der Tight Junctions (TJ)

Schematische Darstellung der Abdichtung des parazellulären Raumes durch ein Netzwerk von TJ-Strängen und eine schematische Darstellung ihrer Zaun-Funktion (engl. *fence function*) und der Barrierefunktion (engl. *barrier function*). Die Barrierefunktion ist jedoch nicht absolut, sondern beinhaltet oft auch eine selektive Permeabilität durch parazelluläre Kanäle (modifiziert nach Sawada et al., 2003).

Die Zellverbindungen haben zwei charakteristische Funktionen, die Barrierefunktion zum einen - sowie die Zaun-Funktion zum anderen (Abb.1.2). Die Barrierefunktion determiniert die Permeabilität der TJ für verschieden große bzw. unterschiedlich geladene Solute, durch den parazellulären Passageweg. Die Proteinzusammensetzung der TJ ist Epithel spezifisch. Daher ist auch die Abdichtungsfunktion dieser Barriere für Ionen in unterschiedlichen Epithelien verschieden. Ein Maß für die Dichtigkeit dieser Barriere ist der transepitheliale Widerstand (engl. *transepithelial resistance*, TER; Powell, 1981). Eine andere Möglichkeit der Bestimmung der Permeabilität für

makromolekulare Solute stellen Flux-Messungen dar. TJs sind dynamische Strukturen, mit der Fähigkeit, die eigene Durchlässigkeit als Antwort auf extrazelluläre Stimuli zu verändern (Furuse, 1993; Schneeberger & Lynch, 2004). Im intestinalen Epithel bedingen defekte TJs auf Grund der verminderten Barrierefunktion einen dysregulierten Ionen- und Wasserübertritt aus dem serosalen Kompartiment bzw. auch aus dem subepithelialen Kapillarnetz in das Darmlumen und führen somit zu einer sog. Leckflux-Diarrhoe (Stockmann et al., 1998).

1.2.1 Aufbau der Tight Junctions

TJs bestehen aus einer großen Zahl verschiedener Membran- und Membran-assoziiierter Proteine, die starke Bindungen mit entsprechenden Proteinen der benachbarten Epithelzelle eingehen. Sie sind deshalb eine wichtige Determinante für epitheliale Barrieren (Tsukita et al., 2001) wie z.B. die Barriere zwischen dem Darmlumen und dem subepithelialen Darmkompartiment. TJs sind aus unterschiedlichen Transmembranproteinen aufgebaut. Nämlich zwei Proteinfamilien mit vier transmembranären Domänen, den Tight Junction-assoziierten Marvel-Proteine (TAMPs), zu denen Occludin, Tricellulin, Marvel D3 zählen (Raleigh et al., 2010), und den Claudin-Proteinen, sowie JAM, dass aus nur einer transmembranären Domäne, aufgebaut ist (Furuse et al., 1998; Martin-Padura et al., 1998; Ikenouchi et al., 2005; Furuse & Tsukita, 2006). Claudine werden dabei als das Rückgrat von TJ-Strängen angesehen (Furuse et al., 1999).

1.2.1.1 Occludin

Als erstes Protein des TJ-Komplexes konnte Occludin isoliert werden (Furuse et al., 1993). Occludin besitzt zwei extrazelluläre Schleifen, die wiederum in Verbindung mit TJ-Molekülen benachbarter Zellen stehen. Auf der zytoplasmatischen Seite bindet Occludin die drei Isoformen des Zonula occludens Proteins (ZO-1, ZO-2, ZO-3) sowie das F-Aktin des Zytoskeletts (Tsukita & Furuse, 1998).

Die Funktion von Occludin im TJ-Netzwerk ist derzeit immer noch umstritten, insbesondere hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen Occludin und der Permeabilität des Epithels bzw. inwieweit die Epithelabdichtung vom Vorhandensein dieses TJ-Proteins abhängt. Bei Überexpression des Occludin in MDCK-Zellen stieg der TER um 30-40% an und die Anzahl der TJ-Stränge wurde dabei um 15% gesteigert (Mc Carthy et al., 1996).

Bei Occludin-knockout-Mäusen zeigte sich allerdings morphologisch keine Änderung

der TJ. Bei der elektrophysiologischen Vermessung der Mukosa dieser Mäuse fiel ebenfalls keine Änderung im TER auf. Umso interessanter ist es, dass ein Occludin-knockout bei Mäusen zu chronischen Entzündungen, zu einer Hyperplasie des Magenepithels, zu einer testikulären Atrophie, zu einer Substanzverringerung der ossären Kompakta und zu einer intrazerebralen Kalzifizierung führen kann (Saitou et al., 2000; Schulzke et al., 2005). Eine weitere Vermutung ist, dass fehlerhaftes oder auch das gänzliche Fehlen von Occludin durch andere TJ-Proteine kompensiert werden kann, so dass die Barrierefunktion in der Bilanz nicht beeinträchtigt wird (Van Itallie et al., 2010). Bei Patienten mit Colitis ulcerosa (CU) konnte eine deutliche Verminderung des Occludin-Proteinlevel sowohl in Mukosabereichen mit Entzündung als auch ohne Entzündung nachgewiesen werden (Kucharzik et al., 2001), so dass spekuliert wurde, dass dies zu Veränderungen der Barriere und der Wundheilung bei CU beiträgt.

1.2.1.2 Proteine der Claudin-Familie

Die Expressionsvariabilität der 27 bislang beim Säuger bekannten Mitglieder der Claudin-Familie ist ein determinierender Faktor für die parazelluläre Barriere der verschiedenen Epithelien und auch des Endothels. Dabei ist hervorzuheben, dass durch die Expressionsverschiebung verschiedener Claudine eine spezifische Permeabilitätsveränderung nicht nur für Ionen sondern auch für Wasser- und Makromoleküle erfolgen kann. Das zellspezifische „Set“ an Claudin-Proteinen und die dynamische Regulation ist entscheidend für die resultierende Molekülpermeabilität (Tsukita, et al. 2001). Proteine der Claudin-Familie haben weitreichende Funktionen mit deutlichen Unterscheidungsmerkmalen: Beispielsweise zeigen Claudin-1 und Claudin-5 eine abdichtende Funktion, während Claudin-2 eine Kationen- und Wasserkanal darstellt (Amasheh et al., 2002; Rosenthal et al., 2010).

Claudin-1 ist entscheidend für die Integrität der parazellulären Barriere in der menschlichen Epidermis. Dies zeigt sich bei Claudin-1-knockout-Mäusen, bei denen es innerhalb des ersten postnatalen Tages zu einem letalen transdermalen Wasserverlust kam (Inai et al., 1999; Furuse et al., 2002). Beim Menschen führt eine Claudin-1-Mutation zu einer Ichthyosis-assoziierten neonatalen sklerosierenden Cholangitis (Inai et al., 1999). Auch in der TJ-Protein-Expression des Adenokarzinoms des menschlichen Colon, zeigte sich eine erhöhte Expression von Claudin-1 (Dhawan et al., 2005) und auch von Claudin-2 (Kingugasa et al., 2007).

Claudin-2 bildet einen parazellulären Kanal für Kationen (Amasheh et al., 2002). Claudin-2 ist außerdem auch für Wasser permeabel und bildet so das parazelluläre Gegenstück zu dem transmembranösen Wasserkanal Aquaporin (Rosenthal et al., 2010). Eine vermehrte Claudin-2-Expression führt daher zu einer herabgesetzten Barriere der TJ. Somit verursacht die Überexpression von Claudin-2 eine Reduktion des TER (Furuse et al., 1993).

Claudin-2 konnte bisher in Epithelien unterschiedlicher Organe wie z.B. in der Leber, in der Niere (Furuse et al., 1998), im Pankreas und im Magen-Darm-Trakt (Rahner et al., 2001) nachgewiesen werden. Wie es zu erwarten ist, kommt Claudin-2 in durchlässigen Epithelien wie beispielsweise dem proximalen Tubulus der Niere vor, nicht dagegen in dichten Epithelien wie dem Sammelrohr (Reyes et al., 2002).

Bei Patienten mit Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn wird Claudin-2, bedingt durch den Stimulus proinflammatorischer Zytokine, vermehrt exprimiert. *In vitro* wurde die vermehrte Expression von Claudin-2 an T84-Zellen nach Inkubation mit IL-13 erreicht (Prasad et al., 2005).

Claudin-3 besitzt ebenso wie Claudin-1 eine abdichtende Funktion, so zeigt die Überexpression in MDCK-Zellen eine TER-Erhöhung um das Dreifache. Es bildet dabei gleichermaßen eine Barriere für geladene wie ungeladene Solute (Milatz et al., 2010).

Claudin-4 kommt hauptsächlich in der Niere und dem Darm vor und erfüllt eine abdichtende Funktion. Bei Überexpression zeigte sich eine Erhöhung des transepithelialen Widerstands durch eine selektive Abdichtung gegenüber Kationen (Van Itallie et al., 2001; Michikawa et al., 2008).

Claudin-5 ist für die Integrität der Blut-Hirn-Schranke und für die Barrierefunktion im Gastrointestinaltrakt von Bedeutung (Nitta et al., 2003; Amasheh et al., 2005). Claudin-5 zeigt in Endothelien zwar eine abdichtende Funktion, nicht aber in allen epithelialen Zelllinien. Daher wird vermutet, dass Claudin-12 - welches in Endothelzellen vorhanden ist - als Bindungspartner von Claudin-5 von Nöten ist, um die Abdichtung zu gewährleisten (Coyne et al., 2003). Des Weiteren wurde Claudin-5 in pankreatischen Azinuszellen (Rahner et al., 2001), Schwannzellen (Poliak et al., 2002) und im Alveolarepithel (Wang et al., 2003) nachgewiesen.

1.2.1.3 Junctional adhesion molecules (JAMs)

JAMs gehören zu den integralen Membranproteinen, von denen aktuell drei Isoformen bekannt sind: JAM-A, JAM-B und JAM-C. Diese Isoformen werden in epithelialen und endothelialen Zellen unterschiedlich exprimiert und sind auch auf der Oberfläche von Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten zu finden (Mandell & Parkos, 2005).

JAM-A hat das breiteste Expressionsmuster und ist in Lunge, Leber, Niere, Pankreas, Herz, Gehirn, im Gastrointestinaltrakt und in Lymphknoten zu finden. Genauso wie in Lymphozyten, Neutrophilen, Monozyten, Thrombozyten und Erythrozyten.

JAM-B dagegen ist nur in Endothelien zu finden, vor allem in Herz, Lymphknoten, Gehirn und Niere. JAM-C ist in Endothelien wie dem Gastrointestinaltrakt, Lymphknoten, Hoden, Leber, Plazenta und Gehirn aber auch in Lymphozyten zu finden.

JAMs gehören der Immunglobulin-Superfamilie an, da der extrazelluläre Teil zwei Immunglobulin-artige Domänen bildet. Anders als die meisten anderen TJ-Proteine besitzt es nur eine Transmembrandomäne. JAMs sind einerseits bei der Zell-Zell-Adhäsion von epithelialen und endothelialen Zellen untereinander beteiligt (Martin-Padura et al., 1998; Bazzoni et al., 2000; Liu et al., 2000).

Außerdem spielen sie eine Rolle bei der Migration von Monozyten durch die Interzellularverbindungen des Endothels, ferner bei der Angiogenese, Thrombozytenaktivierung und Reovirus-Bindung (Mandell & Parkos, 2005). JAM wird ebenso zu den TJ-Proteinen gezählt und ist dort unter anderem an der Entstehung von TJs beteiligt, indem es sich bereits an den frühen „spot-like junctions“ anlagert (Ebnet et al., 2004). Bazzoni et al. fanden heraus, dass ZO-1 direkt mit JAM-A interagiert (Bazzoni et al., 2000).

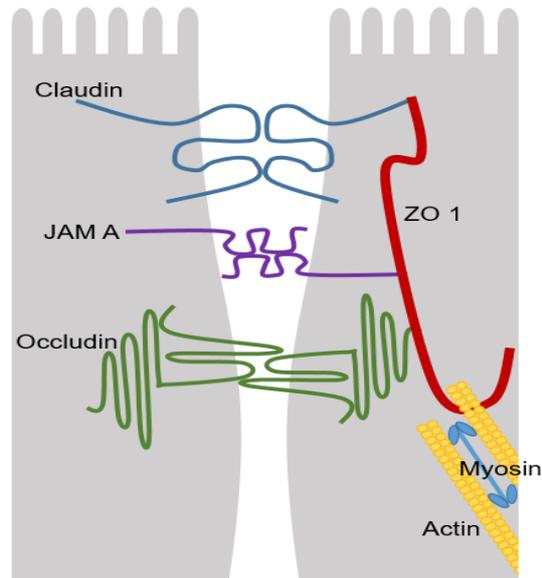


Abb. 1.3: **Molekularer Aufbau der Tight Junctions (TJ)**

TJ bestehen aus drei unterschiedlichen Proteingruppen: Transmembranproteine (Claudin, Occludin), zytosomatischen Plaue-Proteinen (ZO-1,-2,-3; Cingulin) und zytoskeletale Signalproteine (Actinomyosin) (modifiziert nach Yu & Turner, 2008).

1.2.1.4 Tricellulin

Tricellulin ist ein 2005 entdecktes Mitglied der TJ-Proteinfamilie (Ikenouchi et al., 2005) und wird spezifisch an Kontaktpunkten dreier benachbarter Zellen gefunden, wo es zentraler Bestandteil der trizellulären TJ ist. In geringerer Expression kommt es auch am Kontaktpunkt zweier benachbarter Zellen vor (Ikenouchi et al., 2005). Es ist wie Occludin auch ein Interaktionspartner von ZO-1 (Riazuddin et al., 2006). Bei verminderter Expression von Tricellulin kommt es zu einer Zunahme der Permeabilität für Makromoleküle (Krug et al., 2009).

1.2.1.5 TJ-assoziierte Proteine

Weitere Proteine sind am Aufbau des TJ-Komplexes beteiligt, indem sie intrazellulär mit den transmembranären TJ-Proteinen wie z.B. Zonula occludens-1 (ZO-1), ZO-2 und ZO-3 assoziiert sind. ZO-1, ZO-2 und ZO-3 sind über PDZ-Domänen direkt mit der Carboxy-terminalen Domäne der Claudine assoziiert (Itoh et al., 1999; Umeda et al., 2006; Abb. 1.3). Mehrere der genannten Proteine, wie Occludin, JAM und ZO-1, interagieren mit dem perijunktionalen Aktinomyosinring (Madara & Stafford, 1988). Aktinomyosin erlaubt den TJ in der relaxierten Phase sich zur Diffusionsbarriere zu verbinden, während für ein kontrahiertes Zytoskelett diskutiert wurde, dass es die TJ-

Durchlässigkeit erhöhen kann. Vermittelt wird das durch TJ-assoziierte Proteine wie ZO-1, ZO-2, ZO-3 und Occludin, die an Aktin oder Myosin (Cingulin) binden (Abb.1.3). Ferner führt die Phosphorylierung der Myosin-leichten Kette zu einer Kontraktion des perijunktionalen Aktinomyosinrings und so ebenfalls zu einer Erhöhung der TJ-Permeabilität (Turner et al., 1997).

1.2.2 Endozytose von Tight Junctions

Auch TJ-Moleküle werden über Endozytose nach intrazellulär transportiert, um die Permeabilität der Zelle als Antwort auf physiologische und pathologische Stimuli zu verändern oder um die TJ-Proteine zu erneuern. Stimuli sind z.B. proinflammatorische Zytokine oder eine Verminderung der extrazellulären Calciumkonzentration, die über die Lösung der Cadherin-Interaktionen zur Aufnahme von Adherens Junction- und TJ-Proteinen führt.

Ivanov et al. wiesen nach, dass ϵ -Cadherin, Occludin und JAM-A miteinander kolokalisieren; auch wurde eine Interaktion mit α -Adaptin beobachtet, einem Marker für Clathrin-vermittelte Endozytose (Ivanov et al., 2004). Demnach würden diese Proteine über CCV in die Zelle aufgenommen. Die TJ-Proteine kolokalisieren mit Markern der frühen Endosomen, wie Rab5 und EEA-1. Die Kolokalisationsfärbungen suggerieren ferner, dass der intakte Komplex im Ganzen aufgenommen wird (Ivanov et al., 2004).

Für die Zytokin-stimulierte Endozytose von TJ-Proteinen sind andere Mechanismen beschrieben: Interferon- γ (IFN- γ) induziert eine Makropinozytose-vermittelte Aufnahme von TJ-Proteinen (Bruewer et al., 2003). Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) induziert die Aufnahme von Occludin und Claudin-1 (Wang et al., 2005). Inhibitionsexperimente zeigten weiterhin, dass die Internalisierung von Occludin durch eine Caveolae-vermittelte Endozytose geschieht (Schwarz et al., 2007).

1.3 Zytokine

Zytokine spielen aus unterschiedlichen Gründen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, u.a. da sie die T-Zell-Differenzierung von TH1-, TH2- und den erst kürzlich entdeckten TH17-Zellen bestimmen. Lokalisation der Zytokinausschüttung und ihre Konzentration ist sicherlich eine Determinante für den Verlauf der Entzündung bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (z.B. das Auftreten eines Rezidivs). Zytokine sind kleine Proteine, die von Zellen des Immunsystems produziert werden und die Kommunikation zwischen unterschiedlichen

Zellpopulationen ermöglichen (Abb.1.4). Sie stimulieren außerdem die Proliferation antigenspezifischer Effektorzellen und vermitteln lokale und systemische Entzündungen über einen autokrinen, parakrinen oder endokrinen Weg (Neuman, 2007; Sanchez-Munoz et al., 2008).

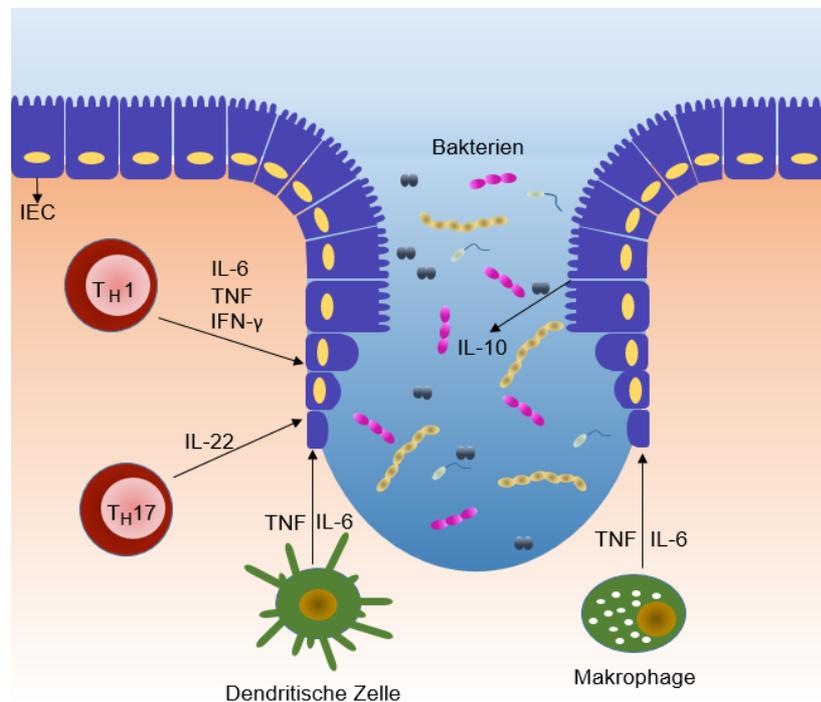


Abb. 1.4: Die Rolle einer defekten TJ-Barriere in der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Durch eine defekte TJ-Barriere können bakterielle Antigene in die intestinalen Epithelzellen (IEC) eindringen und führen zur Makrophagenaktivierung und TH1-Zellen-Aktivierung. Durch Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wird die Entzündung aufrechterhalten (modifiziert nach Al-Sadi et al., 2009).

1.3.1 Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α)

TNF- α ist ein proinflammatorisches Zytokin und kann sowohl Wachstum als auch Apoptose in Säugerzellen induzieren. Diese gegensätzlichen Effekte sind auf die Fähigkeit von TNF- α zurückzuführen, verschiedene Signalwege in der Zelle zu aktivieren. Es gehört zu den wichtigsten Mediatoren einer Sepsis, führt indirekt zum Anstieg der Körpertemperatur und beeinflusst die Permeabilität des Endothels der Blutgefäße (und damit die Ödembildung durch Übertritt von Wasser und Ionen) sowie das Gerinnungssystem. Hierbei wirkt es zusammen mit Interleukin-1 (IL-1) synergistisch

gerinnungsaktivierend und fibrinolysehemmend. Wie bereits oben ausgeführt, induziert TNF- α die Aufnahme von Occludin und Claudin-1. Es wird von Makrophagen ausgeschüttet und ist bei Patienten mit einem aktivem Morbus Crohn in seiner mukosalen Konzentration erhöht (Zeissig et al., 2007).

Dies hat therapeutische Konsequenz, seit vielen Jahren ist eine Therapie der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen mit TNF- α -Antikörpern (wie z.B. Infliximab, Adalimumab und Certolizumab) in der Klinik etabliert (Baert & Rutgeerts, 1999; Yamamoto-Furusho, 2007).

TNF- α ist ferner ein Cofaktor bei der Bildung von TH1-Zytokinen wie IL-2 und IFN- γ (Hernandez-Pando & Rook, 1994; Flesch et al., 1995). Lamina propria-T-Lymphozyten von Patienten mit Morbus Crohn, die mit TNF- α inkubiert wurden, produzierten vermehrt die TH1-Zytokine IL-2, IFN- γ und TNF- α (Holtmann et al., 2002). Die Stimulation der TNF- α -Sekretion durch TNF- α selbst deutet auf einen positiven Rückkopplungsmechanismus hin, der vermutlich zur Chronifizierung der Entzündung beiträgt. Einen Faktor in der komplexen Immunpathologie des Morbus Crohns stellen, die durch TNF- α aktivierten endogenen Matrixmetalloproteinasen dar, welche nach Aktivierung die Architektur der Darmmukosa umbauen (Wang & Mao, 2007).

In Zellkultur-Versuchen zeigte sich nach Inkubation mit TNF- α eine deutliche Reduktion des TER, der in 2-Wege-Impedanzversuchen als Abfall des parazellulären und nicht des transzellulären Widerstands demaskiert wurde und mit einem Expressionsanstieg des Kationenkanal-bildenden Claudin-2 assoziiert war (Schmitz et al., 1999; Mankertz et al., 2009).

1.3.2 Interferon- γ (IFN- γ)

Eingeteilt werden die bislang bekannten Interferone in zwei Typen, die sich sowohl in ihrer Struktur, Signaltransduktion und Genexpression unterscheiden. IFN- γ bildet den IFN-Typ 2 und wird von CD4-TH1, CD8-Lymphozyten, NK-Zellen, B-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) sezerniert.

Die IFN- γ -Produktion ist wiederum durch die von APCs ausgeschütteten Zytokine (IL-12 und IL-18) kontrolliert. In Makrophagen, NK- und T-Zellen stimuliert die Kombination aus IL-12 und IL-18 eine stärkere IFN- γ -Produktion. Dagegen regulieren IL-4, IL-10, TGF- β und Glucocorticoide die IFN- γ -Produktion herunter (Fukao et al., 2000; Schindler et al., 2001; Sen, 2001).

Durch die Aktivierung von zellvermittelten Immunantworten bewirkt IFN- γ eine Steigerung der Abwehr gegen intrazelluläre Pathogene und verstärkt antivirale und antitumorale Immunantworten (Schroder et al., 2004).

Zu den Wirkungen von IFN- γ zählt hier vor allem die Aktivierung von monozytären Zellen. IFN- γ steigert die Phagozytosekapazität der monozytären Zellen (Schroder et al., 2004). Durch die Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies verstärkt IFN- γ auch die Abtötung phagozytierter Pathogene. Im Weiteren bewirkt IFN- γ eine Erhöhung der Expression von MHC-Klasse-I-, MHC-Klasse-II- und kostimulatorischen Molekülen auf seinen Zielzellen und trägt daher zu einer Steigerung der Antigenpräsentationskapazität und zu einer Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und TH bei (Langer et al., 2004). Im Morbus Crohn kommt es zu einer TH1/TH17-vermittelten Immunreaktion bei der vermehrt IFN- γ ausgeschüttet wird.

Bei den Experimenten dieser Arbeit wurden TNF- α und IFN- γ zusammen verwendet, da die beiden Zytokine synergistisch auf die intestinale epitheliale Barriere wirken (Schmitz et al., 1999; Bruewer et al., 2003).

1.3.3 Interleukin-22 (IL-22)

IL-22 zählt wie IL-10, IL-19, IL-20, IL-24 und IL-26 auf Grund von strukturellen Ähnlichkeiten zur IL-10-Interferon-Familie. Die Expression der IL-22-mRNA wurde ursprünglich in IL-9-stimulierten murinen T-Lymphomzellen beschrieben (Dumoutier et al., 2000). Kurze Zeit später wurde der Nachweis der Expression von IL-22 in humanen T-Zellen des peripheren Blutes erbracht (Dumoutier et al., 2000; Xie et al., 2000). IL-22 wird unter anderem von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen ausgeschüttet und bindet an den IL-22-Rezeptor. Insbesondere nach Differenzierung der T-Zellen zu TH1-Zellen steigt die IL-22-Expression an. Gegenteilig ist der Effekt nach einer Differenzierung zu TH2-Zellen (Brand et al., 2006). 2005 wurde erstmals eine weitere TH-Zelle, TH17, beschrieben (Harrington et al., 2005). Auch TH17-Zellen sezernieren IL-22 und zwar in stärkerem Maße als TH1- oder undifferenzierte T-Zellen (Liang et al., 2006; Chung et al., 2006; Zheng et al., 2007).

Die IL-22-Produktion der TH17-Zellen wird von IL-23 oder IL-6 induziert (Mizoguchi, 2012).

Der IL-22-Rezeptor stellt einen heterodimeren transmembranösen Rezeptorkomplex dar; dieser Komplex ist ein Klasse-II-Zytokin-Rezeptor, der aus der IL-22RA1- und der IL-10R2-Untereinheit besteht (Dumoutier et al., 2000; Xie et al. 2000).

Natives IL-22 kann nicht an die IL-10R2-Kette binden, die Bindungsstellen werden erst nach einer Konformationsänderung durch die initiale Bindung von IL-22 an die IL-22RA1-Kette zugänglich. Die Expression der IL-22RA1-Rezeptorkette bestimmt also die Responsivität einer Zelle für IL-22, da IL-10R2 als Komponente verschiedener Zytokinrezeptoren vermehrt exprimiert wird. Immunzellen können keine IL-22RA1-Rezeptorkette exprimieren, wodurch IL-22 keinen Einfluss auf dies hat. Die IL-22RA1-Rezeptorkette wird vorwiegend von epithelialen Zellen exprimiert und somit bieten sie ein potentiell Ziel für die IL-22 Wirkung (Wolk et al., 2004). Eine IL-22RA1-Expression ist in Haut, Niere, Dünndarm, Dickdarm, Lunge, Trachea, Leber und Pankreas nachgewiesen. Die IL-10-Interferon-Familienmitglieder üben ihre Effekte hauptsächlich durch Aktivierung von Janus-Kinasen (Jak), Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (STATs) über den sog. Jak-STAT-Signalweg aus (Renauld, 2003).

Zu den ersten beschriebenen Effekten von IL-22 zählt die Induktion von Akute-Phase-Proteinen und antimikrobiellen Proteinen. Durch eine Induktion der Expression von antimikrobiellen Proteinen bewirkt IL-22 eine Steigerung der angeborenen Immunabwehr in Organen. IL-22 ist sowohl in aktivem Morbus Crohn als auch in aktiver Colitis ulcerosa erhöht. Jedoch ist der IL-22-Level bei Patienten bei Aktivität des Morbus Crohn stärker erhöht.

Bei Morbus Crohn korreliert die IL-22-Konzentration im Serum mit dem Schweregrad der Erkrankung. IL-22 ist in hoher Menge im Blut nachweisbar, im Gegensatz zu IL-17 und IFN- γ . IL-22 führt in aktivem Morbus Crohn zu proinflammatorischen Gen-Expressionen und zur Zellmigration von intestinalen epithelialen Zellen (Wolk et al., 2004; Brand et al., 2006; Schmechel et al., 2008). Es wurden unterschiedliche Effekte von IL-22 beschrieben, einerseits kann es in Entzündungsprozessen eine protektive Rolle spielen, andererseits aber eine proinflammatorische. Die protektive Rolle von IL-22 wurde in Con A-induzierter Hepatitis, Fettleber, Leberschäden, Uveitis, autoimmuner Myokarditis und allergischen Reaktionen der Luftwege gesichert. In Kollagen-induzierter Arthritis und Psoriasis wurde der proinflammatorische Effekt von IL-22 nachgewiesen. Eine Überexpression von IL-22 in Mäusen führt neonatal zum Tod auf Grund von Hautveränderungen, die der Psoriasis beim Menschen ähneln. Daher verwundert es nicht, dass in der Haut von Patienten mit Psoriasis vulgaris, IL-22 stark exprimiert ist. Auch bei der Atopischen Dermatitis, einer weiteren chronisch-entzündlichen Hauterkrankung ist die kutane Expression von IL-22 sehr stark erhöht (Wolk et al., 2004).

1.3.4 Interleukin-13 (IL-13)

IL-13 wurde im Jahre 1989 als P600 entdeckt und als Protein, das vorzugsweise von aktivierten, murinen TH2-Zellen produziert wird, beschrieben (Brown et al., 1989).

IL-13 wird vor allem durch TH2-polarisierte CD4-T-Zellen produziert. Im Menschen können auch NK-Zellen (Akbari et al., 2003), Mastzellen sowie basophile und eosinophile Granulozyten an der IL-13 Produktion beteiligt sein. Letztere produzieren IL-13 vor allem nach Stimulation mit IL-5, so dass es konsekutiv bei IL-5-knockout-Mäusen zu einer verringerten Produktion von IL-13 durch die TH2-Zellen kommt. IL-13 ist ein Zytokin, das imstande ist, die Produktion inflammatorischer Zytokine zu unterdrücken (Minty et al., 1993).

Neben IL-13-produzierenden Zellen gibt es zahlreiche Zytokine und Mediatoren, die die IL-13-Produktion beeinflussen und sich somit positiv auf eine TH2-vermittelte Immunantwort auswirken. Hierzu zählen IL-9, IL-25, sowie Histamin, Adenosin und Endothelin-1 (Elliot et al., 2001; Hurst et al., 2002; Temann et al., 2002; Blackburn et al., 2003).

Patienten mit aktiver Colitits ulcerosa, einer TH2-vermittelten Erkrankung, haben signifikant erhöhte IL-13-Werte, verglichen mit gesunden Patienten oder Patienten mit aktivem Morbus Crohn. Bei der Colitis ulcerosa scheinen die NK-Zellen die Hauptproduzenten von IL-13 darzustellen. IL-13 führt dann zu toxischen Effekten an den Epithelzellen des Colons und der epithelialen Barriere. Weniger klar ist jedoch, wie es zu der vermehrten IL-13-Ausschüttung kommt und somit zu einer Inflamationsreaktion.

IL-13 scheint außerdem einen Einfluss bei anderen Erkrankungen, wie allergischem Asthma, eosinophiler Ösophagitis und Gewebsfibrosen wie z.B. progressive systemische Sklerose, hepatische Fibrose und idiopathischer Lungenfibrose zu spielen. Eine Erhöhung von IL-13 in Caco-2- und in T84-Zellen führt zu einer Erhöhung der Claudin-2-mRNA und der Protein-Expression. Das neu synthetisierte Claudin-2 ist in den TJ zu finden und ebenfalls in intrazellulär vesikulären Strukturen (Prasad, 2005; Weber et al., 2008).

1.4 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

1.4.1 Epidemiologie und Klinik

Unter CED werden vorwiegend zwei Erkrankungen zusammengefasst, nämlich die Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, wenn auch bei einigen Autoren noch die Kollagene Kolitis und die Lymphozytäre Kolitis hinzugezählt werden. Die folgende Darlegung konzentriert sich auf die Colitis ulcerosa und den Morbus Crohn.

In Deutschland leiden mehr als 300.000 Patienten an chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, was einer Prävalenz von 120-200 pro 100.000 Einwohner für Morbus Crohn (Hoffmann et al., 2008) und einer Prävalenz von 160-250 pro 100.000 Einwohner für Colitis ulcerosa (Ott et al., 2008) entspricht.

Der Morbus Crohn ist eine transmurale, diskontinuierlich segmental auftretende entzündliche Erkrankung, deren Aktivität oftmals schubförmig verläuft und die jeden Bereich des Gastrointestinaltrakts betreffen kann. Typische Manifestationsorte sind das terminale Ileum, das Colon und der obere Gastrointestinaltrakt. Komplikationen sind Stenosen bzw. Strikturen, sowie Abszesse und Fisteln.

Colitis ulcerosa ist eine nicht-transmurale, entzündliche Erkrankung, die ebenfalls schubförmig verläuft. Sie beschränkt sich auf das Colon und breitet sich kontinuierlich aus. Es kommt dabei zur Ausbildung von Ulzerationen. Die Erkrankung beginnt meist im Rektum, breitet sich nach oral aus und kann dabei das ganze Colon befallen. Die CU kann daher Ausprägungsformen einer Proktitis, Linksseitencolitis bis hin zur Pancolitis annehmen.

Klinische Zeichen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sind (oftmals blutige oder blutig-schleimige) Diarrhoen, Schmerzen, Fieber und Zeichen eines Ileus oder Subileus. Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa können extra-intestinale Manifestationen entwickeln, wie z.B. Arthritis, Pyoderma gangraenosum, Erythema nodosum, Uveitis, Skleritis, primär sklerosierende Cholangitis und autoimmune Hepatitis. Extraintestinale Symptome sind bei Colitis ulcerosa seltener als bei Morbus Crohn (Baumgart, 2009).

1.4.2 Pathophysiologie der CED

Pirzer et al. zeigte bereits 1991, dass bei Patienten mit Morbus Crohn die mukosalen T-Lymphozyten auf mikrobielle Antigene eine Immunantwort auslösen, auf welche Gesunde nicht reagieren (Pirzer et al., 1991). Beim Morbus Crohn - im Gegensatz zur

Colitis ulcerosa und gesunden Kontrollen - sind die mukosalen T-Lymphozyten gegenüber einer Induktion der Apoptose resistent, so dass es zu einer erhöhten Zahl dieser Immunzellen in der erkrankten Mukosa kommt und konsekutiv zu einer erhöhten Produktion von den durch T-Zellen produzierten und sezernierten Zytokinen (Fiocchi, 1998; Ina et al., 1999; Bu et al., 2001).

Beim Morbus Crohn findet sich eine TH1- bzw. eine TH17-vermittelte Immunantwort, das heißt, dass insbesondere Zytokine von TH1- und TH17-Zellen ausgeschüttet werden (Hölttä et al., 2008). IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-22 und IL-12 spielen demnach eine besondere Rolle in der Crohn-assoziierten Entzündung (MacDonald et al., 1990). Bei Aktivität der Erkrankung zeigt sich ein Claudin-1- und Claudin-2- Expressionsanstieg. Die Claudin-1-Expression steigt mit dem Schweregrad der Entzündung an (Weber et al., 2008). Während Claudin-2 bei aktivem Morbus Crohn vermehrt vorzufinden ist, wird Occludin und das abdichtende Claudin-5 und Claudin-8 vermindert und nicht in der TJ beschrieben (Zeissig et al., 2007).

Colitis ulcerosa hingegen ist eine TH2-vermittelte Erkrankung. Hierbei wird insbesondere IL-13 von NK-Zellen ausgeschüttet und wirkt u.a. auf Epithelzellen, wo es die Apoptose wie auch die parazelluläre Barriere und die Restitutionsgeschwindigkeit reguliert (Heller et al., 2005; Kucharzik et al., 2001). Zudem findet sich eine vermehrte Konzentration des Zytokins IL-5. Das Zytokin IL-4 ist - obgleich es ein TH2-Zytokin ist - nicht erhöht (Strober & Fuss, 2011).

Die epitheliale Barriere wird dadurch beeinträchtigt, dass die Claudin-2-Expression ähnlich stark erhöht ist wie bei Morbus Crohn.

2. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, die Rolle der Endozytose in der TJ-Funktion aufzuklären bzw. mechanistische Vorgänge, die dieser Funktion zugrunde liegen, zu untersuchen und in ersten Experimenten darzustellen. Des Weiteren sollte die Wirkung der Endozytose von TJ-Molekülen auf die transepitheliale und die parazelluläre Barriere untersucht werden. Die TJ-Endozytose sollte dabei sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine analysiert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Antibiotika wie Penicillin und Streptomycin wurden bei PAA Laboratories GmbH (Österreich) erstanden. Organische Lösungsmittel wie Ethanol wurden von J.T. Backer, Deventer (Niederlande), DMSO und Zitronensäure von Sigma-Aldrich und Fluka (Deutschland) gekauft. Bovine Serum Albumin (BSA) wurde von Biolabs (Deutschland), 6%iges Ziegen-Serum von Zymed (Deutschland), Triton-X-100 wurde von Sigma-Aldrich (Deutschland) gekauft. Verbrauchsmaterialien wie z.B. Filterpapier wurde von Schleicher & Schüll (Deutschland), Petrischalen und Multi-well-Platten, Zellkulturflaschen wurden von Nalge Nunc international (Dänemark), Deckgläser von Marienfeld GmbH & Co. KG (Deutschland), Mini-Trans-Blot-Zelle von Biorad (Deutschland), ProTags Mount Fluor von Biocyc GmbH & Co. KG (Deutschland), Millicell PCF-Filter und Sterilfilter (Sterivex 0,22 µm) von Millipore (Schwalbach, Deutschland), Objektträger von Menzel-Gläser (Deutschland), Reaktionsgefäße von Plastibrand (Deutschland), Skalpelle von Feather Safety Razor Co (Japan), Spitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl von Eppendorf (Deutschland) gekauft.

3.1.2 Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung

Antigen	Wirt	Verdünnung	Hersteller
ZO-1	Maus	1:50	Zytomed, Deutschland
Occludin	Maus	1:200	Zytomed, Deutschland
JAMA	Kaninchen	1:100	Zytomed, Deutschland
Claudin-1	Kaninchen	1:100	Zytomed, Deutschland
Claudin-2	Maus	1:100	Zytomed, Deutschland
Claudin-3	Kaninchen	1:100	Zytomed, Deutschland
DAPI		1:1000	Roche-Mannheim, Deutschland
LAMP	Maus	1:50	R&D, USA
α-mouse-Alexa-594	Maus/ Kaninchen	1:500	Molecular Probes, USA
α-rabbit-Alexa-488	Maus/ Kaninchen	1:500	Molecular Probes, USA

3.1.3 Verwendete Zytokine

Zytokin	Konzentration	Hersteller
IL-13	10 ng/ml	Peprotech, USA
IL-22	10 ng/ml	Peprotech, USA
TNF- α	1000 U/ml	TEBU, Deutschland
IFN- γ	200 U/ml	Peprotech, USA

3.1.4 Sonstige

Substanz	Hersteller
FKS (Trypsin-Inhibitor)	Biochrom, Deutschland
PBS-Tabletten	Life Technologies, Deutschland
PBS+Ca/Mg-Lösung	PAA Laboratories GmbH, Österreich
SabSimplex	PARKE-DAVIS GMBH, Deutschland
Trypsin	Biochrom, Berlin
Dynasore	Abcam, UK
Pitstop-2	Abcam, UK
DMSO	Sigma, USA
Fluorescein	Sigma, USA
EDTA	Merck, Deutschland
EGTA	Roth, Deutschland

3.1.5 Geräte

Gerät	Hersteller
Zentrifuge 5414C	Eppendorf, Deutschland
Zentrifuge Z233MK	Hermle, Deutschland
Zentrifuge AvantiJ25	Beckmann, Deutschland
Lambda 2 Spectrophotometer	Perkin Elmer, USA
Lumineszenzbild Analysator	Fuji, Tokyo, Japan
Zeiss LSM 510 META	Carl Zeiss AG, Deutschland
Mikrotiterplattenlesegerät (Tecan Spectra Classic)	TECAN, Deutschland
Wasserbad	Haake, Deutschland
Wippe	Fröbel Labor Technik, Deutschland
Heizblock	Grant, Deutschland
Magnetrührer	Ika-Combimag, Deutschland
Magnetrührstäbchen	Merck, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Deutschland
Brutschrank Kelvitron T	Heraeus, Deutschland
Sterilwerkbank BSB4A	Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim
Ussing-Kammer	Institut f. Klin. Physiologie, Charité, CBF, Berlin
Chop-Stick-Elektroden	Institut f. Klin. Physiologie, Charité, CBF, Berlin
Vortexgerät	Pharmacia, Deutschland
Thermostat 5320	Eppendorf, Deutschland

3.2. Methoden

Zu Beginn dieser Arbeit wurde ich über die „Grundsätze der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ aufgeklärt. Es wurden alle Experimente im Sinne dieser Grundsätze durchgeführt.

3.2.1 Zellkultur

Nach dem In-Kultur-nehmen der Zelllinien wurde von 75 cm²-Flaschen nach gängigem Protokoll unter Verwendung einer Trypsin/EDTA-Lösung trypsinisiert und auf Zellfiltern (PCF 0,4 µm) ausgesät und in dem Zellkulturmedium MEM AQ Media (Sigma M0446) gehalten. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in Inkubatorschränken gehalten. Zur Kultivierung wurden sterile Kunststoffgefäße verwendet. Das Nährmedium der Zellen wurde mit 15% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin (100x von PAA, Cat. No P11-010) supplementiert. Der Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten bis dritten Tag.

Passagieren der Zellen: Um Zellen aus den Kulturflaschen auf Zellfilter umzusetzen, erfolgte zuerst ein Waschschrift mit Calcium- und Magnesium-freiem phosphatgepufferter Salzlösung (engl. *phosphate buffered saline*, PBS). Danach erfolgte eine Vortrypsinierung mit 3 ml Trypsin-EDTA (Sigma T3924) bei 37°C, 5% CO₂. Diese Lösung wurde bereits nach 5 min verworfen. Daraufhin wurde 1 ml Trypsin-EDTA hinzugegeben. Trypsin-EDTA löste die Zellen nach ca. 40 min vom Flaschenboden ab. Die nun abgerundeten und vom Boden gelösten Zellen waren somit in Suspension. Mit 9 ml Medium wurden sie aufgenommen. Dabei hebt das im Medium enthaltene FKS im Weiteren die Wirkung des Trypsins auf.

Nach Bedarf wurden die Zellen dann in vorgegebenen Zellkonzentrationen, die durch Auszählen eines Aliquots in einer Neubauer-Zählkammer auf das benötigte Volumen bestimmt wurden, in neue Gefäße ausgesät. Pro Zellfilter wurden dabei 45 000 Zellen ausgesät. Die Zellen wurden danach im Brutschrank bei 37°C / 5% CO₂ weiter kultiviert.

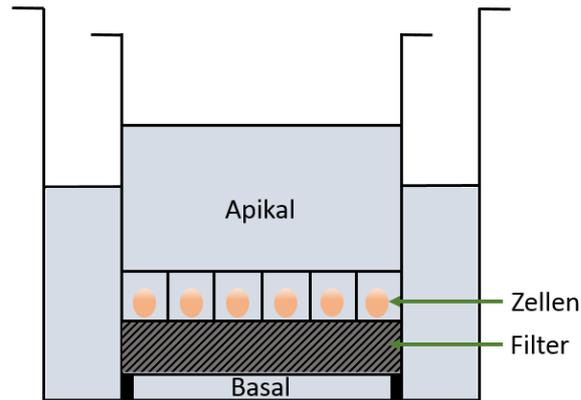


Abb. 3.1: Transwell mit Zellen

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung, der in einem Transwell auf dem Filter angewachsenen intestinalen Epithelzellen.

Für die geschilderten Experimente wurden folgende Zelllinien verwendet:

- I. **Caco-2-Zellen:** Die Caco-2-Zelllinie wurde 1974 von dem dänischen Arzt namens Fogh aus einem humanen Adenokarzinom des Colons isoliert. Caco-2-Zellen sind immortale und adhärente Zellen, die unter normalen Zellkulturbedingungen spontan ausdifferenzieren. Obwohl diese Zellen aus einem Adenokarzinom des Colons stammen, weisen sie morphologische und physiologische Ähnlichkeit zum gesunden Dünndarmepithel auf. Caco-2-Zellen weisen TJs und Mikrovilli auf und exprimieren Enterozyten-typische Enzyme und Transporter. Bei der Anzucht der Caco-2-Zellen, beispielsweise auf Polycarbonatfiltern, bilden sie Monolayer aus säulenartigen Zellen (sog. Zylinder- bzw. Palisaden-Epithel), die Mikrovilli und TJs auf der apikalen Seite zeigen. Die Zellkerne befinden sich basal (Artursson & Karlsson, 1991; Meunier et al., 1995). Caco-2-Zellen haben nach dreiwöchiger Differenzierung transepitheliale Widerstände zwischen 300 und 500 Ωcm^2 . Es wurden Zellen der 22. - 28. Passage verwendet.

- II. **Caco-2-Claudin-5-Zellen:** Da in Caco-2-Zellen kein Claudin-5 exprimiert wird (Amasheh et al., 2005), wurden zusätzlich Caco-2-Claudin-5-Zellen verwendet. Bei diesen ist durch eine stabile Transfektion dauerhaft Claudin-5 eingebracht worden. Da Claudin-5 ein barrierebildendes Claudin ist, haben Caco-2-Claudin-

5-Zellen einen höheren transepithelialen Widerstand als Caco-2-Zellen. Es wurden Zellen der 20. - 22. Passage verwendet.

- III. **T84-Zellen:** T84-Zellen entstammen einer Lungenmetastase eines humanen Colonkarzinoms. Die Zelllinie wächst als Monolayer aus differenzierten Zellen (Dharmasathaphorn et al., 1984) und erhält dabei die Zellpolarität. Es wurden Zellen der 24. - 26. Passage verwendet.

3.2.2 Messung des transepithelialen Widerstands (TER)

Messung unter Verwendung von Chop-Stick Elektroden: Mit Hilfe von zwei fixierten Elektrodenpaaren, dem sog. Chop-Stick-Elektrodensystem, wurde der TER der Zellen direkt in den Kulturschalen gemessen. Zwei Elektrodenhalter, eine Elektrode zur Messung der Spannung und eine Elektrode zur Messung der Stromstärke, bildeten das Chop-Stick-Elektrodensystem. Ein Elektrodenhalter war um 2,5 mm kürzer, um bei der Messung in den Zellkulturschalen einer Schädigung des Zellmonolayers vorzubeugen. Das Elektrodensystem war mit einem Widerstandsmessgerät (Dipl. Ing. grad. D. Sorgenfrei, Inst. für Klinische Physiologie) verbunden. Der TER ergab sich aus den durch einen Rechteckstrom ($\pm 10 \mu\text{A}$, 21 Hz) hervorgerufenen Spannungsänderung. Aus den gemessenen Strom- und Spannungswerten ermittelte das Messgerät den Widerstand in Ohm. Anschließend wurden die Messwerte um den Widerstand des leeren Filters und der Badlösung korrigiert. Der resultierende Wert wurde mit der Filterfläche multipliziert (in der Regel $0,6 \text{ cm}^2$), so dass sich der TER in der Einheit $\text{Ohm} \times \text{cm}^2$ ergab.

Um vergleichbare Messungen zu erhalten, wurde sowohl auf eine Standardisierung von Filterposition und Eintauchtiefe der Elektroden geachtet als auch auf die Konstanzhaltung der Temperatur (37°C). Zwischen den Einzelmessungen wurden die Zellen im Zellkulturschrank kultiviert.

Messung in der Ussing-Kammer: Die Ussing-Kammer ermöglicht *in vitro* den aktiven Ionen-transport sowie die Leitfähigkeit bzw. den Widerstand an Geweben oder Zellkultur Layern zu bestimmen (Ussing et al., 1951).

Dies geschieht indem der treibende elektrische Gradient durch Applikation eines Kurzschlussstroms, der die spontane transepitheliale Potentialdifferenz auf 0 mV reduziert, ausgeschaltet wird. Der dazu verwendete Strom entspricht daher der Netto-Summe aller aktiven elektrogenen Ionen-transporte des Epithels.

Die aus zwei Halbzellen bestehende Ussing-Kammer erlaubt es ein Epithel oder ein mit Zellen besiedelten Filter (z.B. Filter aus PCF-Material, Porengröße 0,4 μm) zwischen die beiden Kammern einzuspannen. Dort werden die Zellen beidseitig von Pufferlösung umspült (Abb. 3.2), um eine physiologische Umgebung für das Gewebe zu schaffen. Die Pufferlösung wurde durch Begasung mit 95% O_2 und 5% CO_2 kontinuierlich durchmischt und der pH-Wert der Bicarbonat-haltigen Pufferlösung bei 7,4 eingestellt. Auf jeder Kammerseite befanden sich 5 ml Pufferlösung. Die U-förmige Anordnung der Röhren sicherte den gleichen hydrostatischen Druck in beiden Seiten der Kammer (Abb. 3.2) und verhinderte so einen durch unterschiedlichen Druck entstehenden mechanischen Schaden der Zellen (Li et al., 2004).

Ein Elektrodenpaar wurde beidseits direkt über dem Epithel platziert und maß mittels eines Voltmeters die Potentialdifferenz zwischen apikaler und basaler Seite.

Der Klemmstrom wurde über ein in möglichst weiter Entfernung zum Epithel befindliches Elektrodenpaar verabreicht. Diese Elektroden waren an eine variable Gleichstromquelle angeschlossen; außerdem war ein Ampèremeter in Reihe geschaltet.

Zwischen den Wänden der Glassäulen zirkulierte beheiztes Wasser, so dass die Temperatur der Inkubationslösung konstant 37°C betrug.

Die Substanzzugabe erfolgte erst nach Einstellung eines Equilibriums (konstanter TER, üblicherweise 15 bis 30 min nach Einbau der Filter in die Ussing-Kammer). Während des Experiments wurden Endozytosehemmer, zur apikalen oder basalen Kammerseite hinzu pipettiert. Die Wirkung der Endozytosehemmer Dynasore und Pitstop-2 wurde über eine Dauer von 30 min, in jeweils 10 sek. Intervallen, aufgezeichnet. Ein Effekt auf den TER zeichnete sich bereits nach wenigen Minuten ab. Nach Entnahme der Filter wurden diese einmal mit PBS-Lösung gewaschen, bevor sie mit 2%igem Paraformaldehyd bei Raumtemperatur für 15 min fixiert wurden. Die Lagerung erfolgte in PBS/Na-Azid bei 4°C bis zur Färbung.

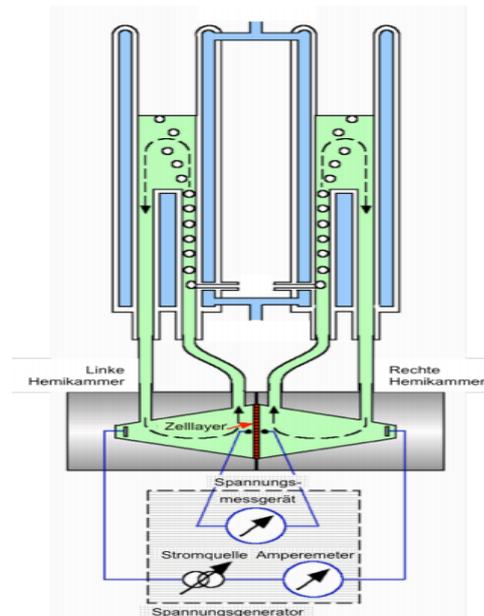


Abb. 3.2 Schematischer Aufbau der Ussing-Kammer

Der Zellfilter wird zwischen beiden Kammerhälften der Ussing-Kammer eingespannt und mit einer 37°C Badlösung umspült und begast. Zwei Elektrodenpaare registrieren die Potentialdifferenz bzw. den Strom über dem Epithel.

Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Fromm, Klinische Physiologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin.

3.2.3 Bestimmung des Fluorescein-Flux in der Ussing-Kammer

Flux-Messungen dienen dem Feststellen der relativen Änderungen der parazellulären Permeabilität durch Messung der uni-direktionalen Fluxe (hier: apikal-nach-basal). Hierfür wurde Fluorescein (332 Da) verwendet, das nur eine parazelluläre Permeabilität aufweist). 10 µl Fluorescein (100 mM) wurden apikal zugegeben. Zur Bestimmung des Fluxes wurden basolaterale Proben (300 µl) 0, 10, 20, 30 und 40 min nach Fluorescein-Zugabe entnommen; das entsprechende Volumen wurde ersetzt.

Die EGTA-Zugabe erfolgte beidseits ca. 40 min nach Zugabe des Endozytoseinhibitors Pitstop-2. EGTA dient dazu, das freie Calcium in der Ussing-Lösung zu binden. Dabei wurde bei jeder basalen Probeentnahme EGTA hinzugefügt. Schlussendlich erfolgte eine letzte basale Probenentnahme, die mit einer apikalen Kontrollentnahme nach ca. 235-249 min einherging. Die Filter wurden nach dem Ausbau verworfen. Zur Bestimmung der Fluoresceinkonzentration der Proben wurden die Proben fluoreszenzoptisch mit einem Fluoreszenzplatten-Lesegeräts bei einer Wellenlänge von 520 nm gemessen (Tecan Infinite 200 M, Germany; Exzitationswellenlänge 480 nm, Emissionswellenlänge 520 nm).

3.2.4 Immunfluoreszenzfärbung (IF)

Bei der Immunfluoreszenzfärbung (IF) handelt es sich um ein Verfahren zur Sichtbarmachung und Lokalisation Proteinen. Dies kann entweder durch die direkte oder die indirekte IF erzielt werden. In der vorliegenden Arbeit kam die indirekte IF zur Anwendung. Die Filter wurden dafür zweimal mit PBS gewaschen und mit 0,5%iger Triton X-Lösung für 5 min permeabilisiert. Wodurch die Zellen der Antikörperbindung erst zugänglich gemacht wurden. Zudem wurde eine Blockierungslösung (5% fetales Kälberserum + 1% BSA in PBS für 30 min) hinzugegeben, die unspezifische Bindungsstellen inaktivieren soll. Die Blockierungslösung wurde außerdem für alle folgenden Waschschrte verwendet. Nun wurde ein spezifischer Antikörper (Primärantikörper) aufgebracht (60 min bei 37°C). Als Primärantikörper wurde u.a. Kaninchen-anti-Claudin-1, Maus-anti-ZO-1, Maus-anti-Occludin und Maus-anti-Claudin-2, Kaninchen-anti-Claudin-3 verwendet.

In einem weiteren Schritt wurde ein Sekundärantikörper aufgetragen, der den Primärantikörper spezifisch bindet. Dieser ist mit einem fluoreszierenden Farbstoff (z.B. Alexa488 oder Alexa594) gekoppelt und wurde nach Auswaschen des Primärantikörpers für 90 min bei 37°C inkubiert (Verdünnung: 1:500 in PBS). DAPI wurde zur Anfärbung der Zellkerne genutzt (Verdünnung: 1:1000 in PBS, 10 min Inkubation bei Raumtemperatur). Nach der Färbung wurden die Filter mit Hilfe von ProTaq MountFluor und einem dünnen Deckglas eingedeckelt. Zur Laser-Scanning-Mikroskopie wurde ein Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany) genutzt. Das konofokale Laser-Scanning-Mikroskop ermöglicht, anders als ein konventionelles Lichtmikroskop, eine topographische Schichtung des Präparats. Die Immunfluoreszenz-Bilder wurden bei Exzitationswellenlängen von 488 nm und 549 nm aufgenommen. Zur Detektion der Zellkerne durch die DAPI-Färbung wurde die Wellenlänge 405 nm (UV-Laserdiode) angeregt. Es wurde ein 40x Ölimmersionsobjektiv verwendet.

3.2.5 Auswertung und Statistik

Die in dieser Arbeit verwendeten Dateitabellen, Abbildungen und statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung von MS Excel, MS Word und MS Powerpoint erstellt. Es wurde eine deskriptive Statistik (arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung) erhoben. Die Berechnung von Signifikanzen erfolgte mittels *Student's t-Test* und bei multipler Testung (Abb. 4.2.1a) mit anschließender Bonferoni-

Holm-Korrektur, wobei ein p-Wert $<0,05$ als signifikant gewertet wurde (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

Für die Ussing-Experimente wurde die Software Analogon (Dipl. Ing. grad. D. Sorgenfrei) verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss von epithelialer Endozytose am „Steady-State“-Level der epithelialen Barriere

In einem ersten Teil der Arbeit wurde der Frage nachgegangen, inwiefern endozytotische Prozesse in Epithelzellen die Barrierefunktion beeinflussen und zwar ohne dass zuvor ein spezifischer Reiz zur Modifikation der Barrierefunktion gegeben wurde (z.B. eine Inkubation mit einem proinflammatorischen Zytokin). Diese Experimente sollten daher die Funktion der Endozytose von TJ-Proteinen im Steady-State der Epithelbarriere analysieren.

4.1.1 Transepithelialer Elektrischer Widerstand (TER)

Es wurden auf PCF-Filter-Transwells ausgesäte Caco-2-Zellen an Tag 14 nach Aussaat in die Ussing-Kammern eingebaut und der TER analysiert (TER-Messung alle 10 sek.). Nach Erreichen eines stabilen TER-Levels wurde Dynasore (80 μM , 30 min, 37°C) zu beiden Kammerseiten hinzugegeben. Schon eine Minute nach Zugabe von Dynasore zeichnete sich ein stetiger Anstieg des TER ab (Abb. 4.1.2). Der Widerstand stieg verglichen zum Ausgangswert (vor Dynasore Zugabe) nach 30 min um $36\% \pm 4,2\%$ an und war somit statistisch signifikant verschieden zum TER-Level ohne Dynasore ($p<0,002$).

Dahingegen zeigte der Expositionsversuch mit dem Clathrin-Inhibitor Pitstop-2 (30 μM , Zugabe bds., 30 min, 37°C) einen Abfall des TER. Dreißig Minuten nach Zugabe betrug der Abfall des TER $14,7\% \pm 3,1\%$ des Widerstands vor Pitstop-2 Zugabe und war damit signifikant verschieden vom unbehandelten TER-Level ($n=5$, $p<0,0012$).

Vergleichbare Resultate ergaben sich mit Caco-2-Claudin-5-Zellen. Interessanterweise ergaben sich in parallel im Labor durchgeführten Impedanzmessungen keine Veränderungen der Membrankapazität unter Dynasorebehandlung (vor Dynasore $7,2 \pm 0,6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$; nach Dynasore $7,3 \pm 0,3 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $p=0,59$), so dass von einer durch

Dynasore unveränderten Oberfläche der epithelialen Zellmembran ausgegangen werden muss.

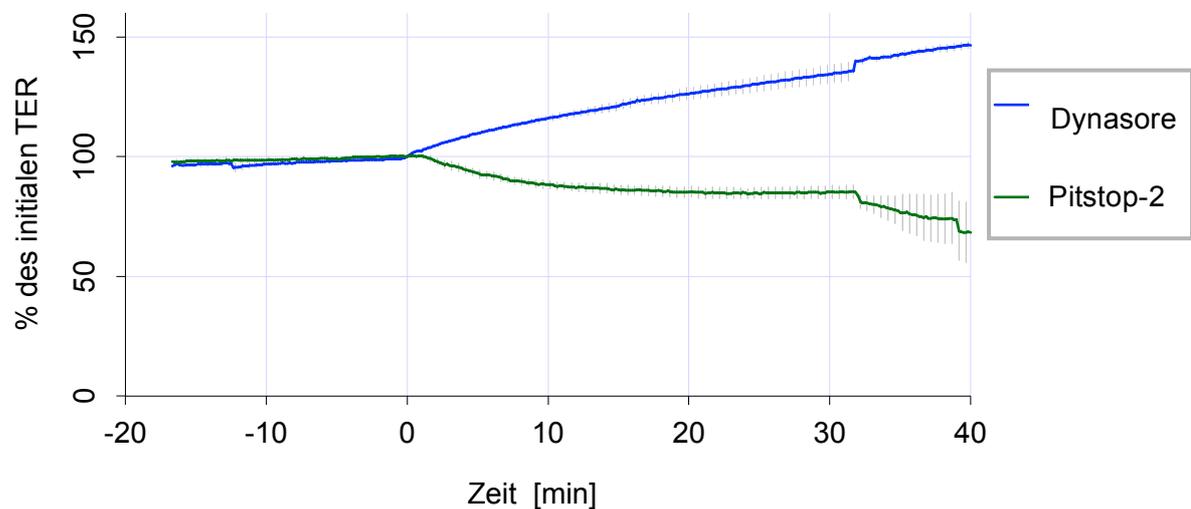


Abb. 4.1.2: TER-Verlauf unter Dynasore- und Pitstop-2-Einwirkung

Auf PCF-Filter ausgesäte Caco-2-Zellen wurden in der Ussing-Kammer hinsichtlich des TER vermessen und dieser für jeden Filter normiert und als % von TER bei 0 min. aufgetragen (der durchschnittliche absolute TER bei 0 min. betrug $460 \pm 39 \text{ Ohm} \times \text{cm}^2$). Der moderate „Sprung“ im Verlauf beider Kurven bei ca. 32 Minuten ergab sich durch vorzeitige Herausnahme von Filtern aus dem Experiment zur Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung. N=5 pro Gruppe.

4.1.2 Bestimmung der parazellulären Permeabilität für Makromoleküle

Zur Messung einer parazellulären Permeabilität für Makromoleküle wurde ein Fluxexperiment mit dem fluoreszierenden Makromolekül Fluorescein (MW: 332 g/mol; Ex: 485 nm; Em: 514 nm) als Tracer durchgeführt. Hierfür wurden die Caco-2-Zellen verwendet, da hierfür vorbeschrieben wurde, dass das Fluorescein bei diesen Zellen ausschließlich parazellulär transloziert. Die Caco-2-besäten PCF-Filter wurden an dem 20.Kulturtag in die Ussing-Kammern eingebaut. Wie o.g. wurde nach Erreichen des TER-Plateaus Pitstop-2 bzw. Dynasore hinzugegeben (Abb. 4.1.3).

Erstaunlicherweise ergab sich nicht nur für Dynasore, sondern auch für Pitstop-2 ein signifikant verminderter Fluorescein-Flux: So fand sich eine Verminderung des Flux durch Dynasore von $0,491 \pm 0,097 \text{ nmol/h/cm}^2$ auf $0,202 \pm 0,052 \text{ nmol/h/cm}^2$ (entsprechend einer Verminderung um 58,9%) und für Pitstop-2 von $0,282 \pm 0,029$

nmol/h/cm² auf $0,126 \pm 0,027$ nmol/h/cm² (entsprechend einer Verminderung um 55,3%). Diese Veränderungen des Fluorescein-Fluxes waren statistisch signifikant ($p < 0,05$).

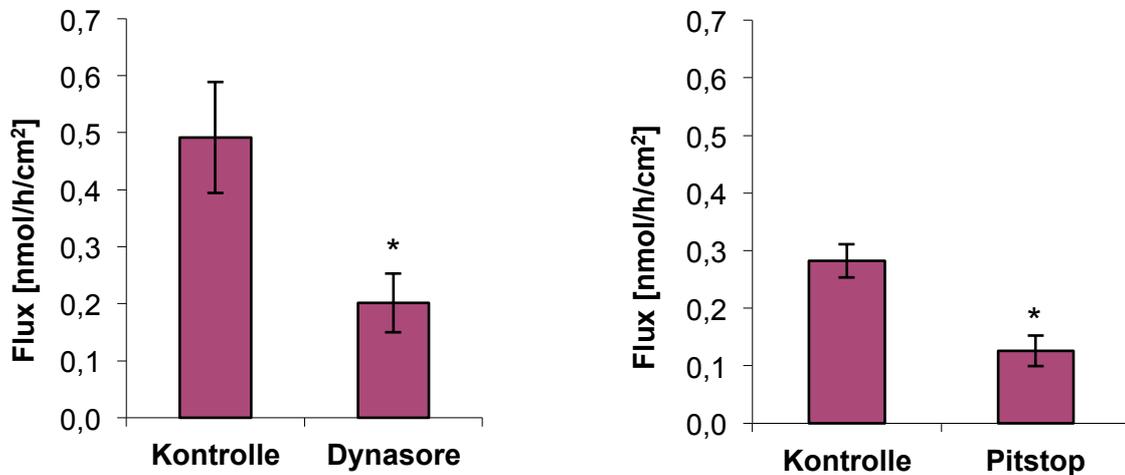


Abb. 4.1.3: **Fluorescein-Flux**

Messung des Fluorescein-Fuxes an Caco-2-Zellen, die gegen Dynasore (80 μ M) oder Pitstop-2 (30 μ M) exponiert wurden. Die Experimente wurden voneinander unabhängig durchgeführt. Daher erfolgt die Darstellung in eigenen Diagrammen mit eigenen Kontrollfiltern (Dynasore: $n=7$, $p < 0,05$; Pitstop-2: $n=5$, $p < 0,05$).

4.1.3 Morphologie der epithelialen Tight Junction (TJ) in konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie nach Endozytose-Hemmung in Caco-2-Zellen

Hierzu wurden Caco-2-besetzte PCF-Filter nach 14 Tagen in Zellkultur mit Paraformaldehyd fixiert und nach dem oben aufgeführten Protokoll immungefärbt. Danach wurden sie am Zeiss LSM 510 konfokalmikroskopisch untersucht. Hierfür wurden gleiche Gesichtsfelder unter dem 40x-Objektiv unter gleichen konfokalmikroskopischen Bedingungen (Lochblende und Sensoreinstellungen) analysiert. Die Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Tab. 4.1. Bei Expositionen sowohl gegen Dynasore als auch gegen Pitstop-2 waren weiterhin TJ-Strukturen erkennbar, allerdings mit einigen Veränderungen in der Ultrastruktur.

Hemmung mit Dynasore

Nach Hemmung der Dynamin-abhängigen Endozytose mit Dynasore war insbesondere eine verstärkte Membranfärbung von JAM-A auffällig und ebenso war JAM-A weiterhin flächig im Zytosol als Vesikel verteilt vorzufinden. Durch die starke Membranfärbung des JAM-A und das weitgehend in der Plasmamembran vorzufindende ZO-1, stellten

sich diese beiden TJ-Proteine an der Zellmembran fast kontinuierlich miteinander kolokalisiert dar. Auf Grund der hohen Dichte an JAM-A Vesikeln in den Zellen zeigten sich auch innerhalb des Zytosols an den Vesikeln vereinzelt Kolokalisationen. Das ZO-1 Signal der Zellfilter, die gegen Dynasore inkubiert wurden, zeigten teilweise im Zytosol liegende vesikulär erscheinende Signale und sich von der Membran lösende Vesikel.

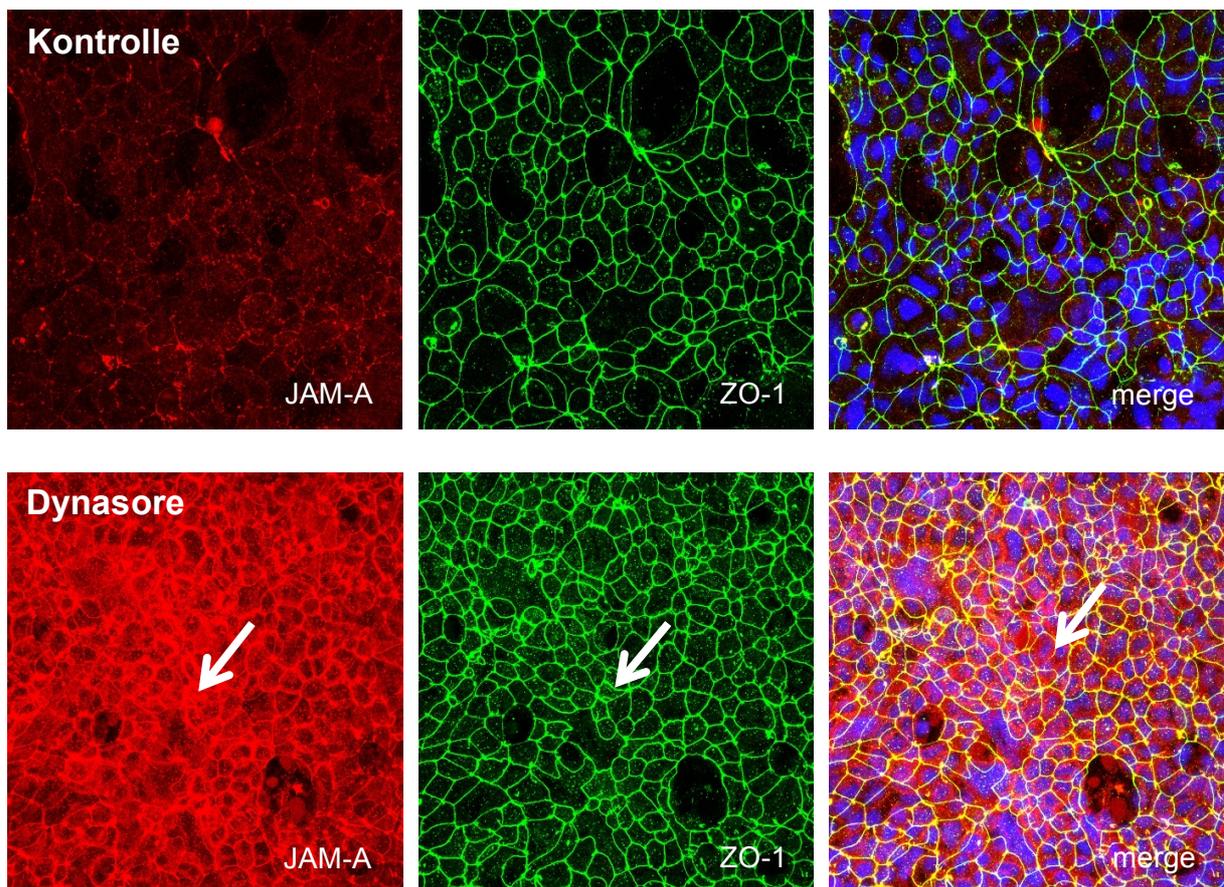


Abb. 4.1.4a: IF-Färbung der Proteine JAM-A und ZO-1 in der Übersicht

Das gefärbte Protein wird in der unteren rechten Bildecke und die stattgehabte Exposition (d.h. Puffer= Kontrolle, Dynasore oder Pitstop-2) wird in der oberen linken Bildecke genannt. Die Überlagerung beider Signale (merge) zeigt die Veränderung der TJ-Proteine zueinander. Im Falle einer Kolokalisation des roten und grünen Fluoreszenzsignals entsteht im Merge-Bild ein gelbes Signal.

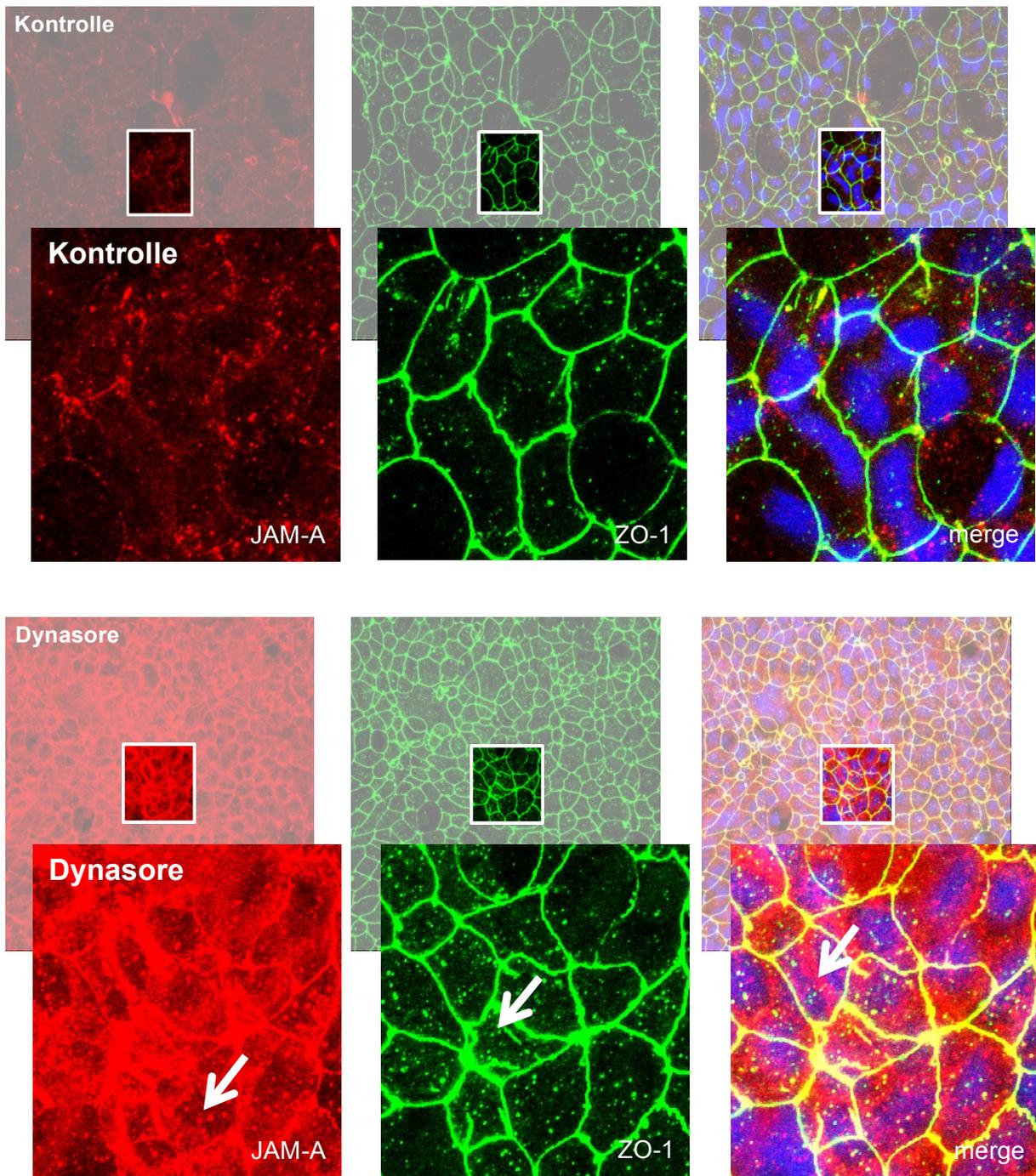


Abb. 4.1.4b: IF-Färbung der Proteine JAM-A und ZO-1 in der Vergrößerung
 Die abgebildeten Pfeile weisen auf die Zunahme der JAM-A Vesikel hin, sowie auf zytoplasmatisch liegende ZO-1 Vesikel.

Auch Occludin war verstärkt an der Membran gefärbt und stellte sich von dieser ablösend dar, so dass sich besonders submembranal lokalisierte Vesikel vorfanden. Außerdem war Occludin insbesondere an den trizellulären Kontaktpunkten verstärkt anfärbbar und kolokalisierte hier mit Claudin-1. Die abdichtenden Claudine, d.h. Claudin-1, Claudin-3 und Claudin-4 waren in Lokalisation und Färbungsintensität unverändert. Dynasore zeigte ebenso eine Wirkung auf das lysosomale Membranprotein (LAMP), dass sich als in der Zellmitte liegendes vesikulär erscheinendes Signal darstellte (Daten nicht gezeigt). Die Resultate der Analysen aus den Abb. 4.1.4a - 4.1.4d sind in Tab. 4.1 zusammenfassend wiedergegeben.

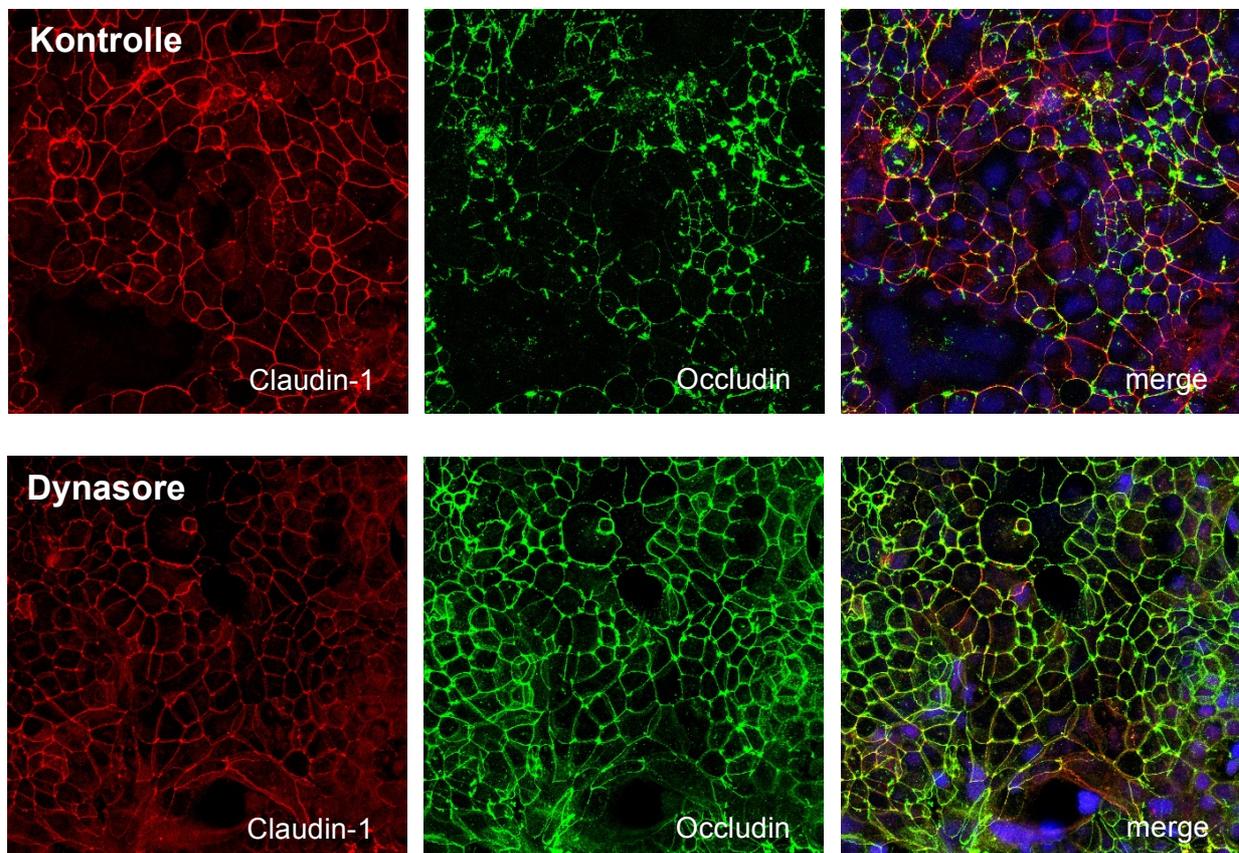


Abb. 4.1.4c: IF-Färbung der Proteine Claudin-1 und Occludin in der Übersicht

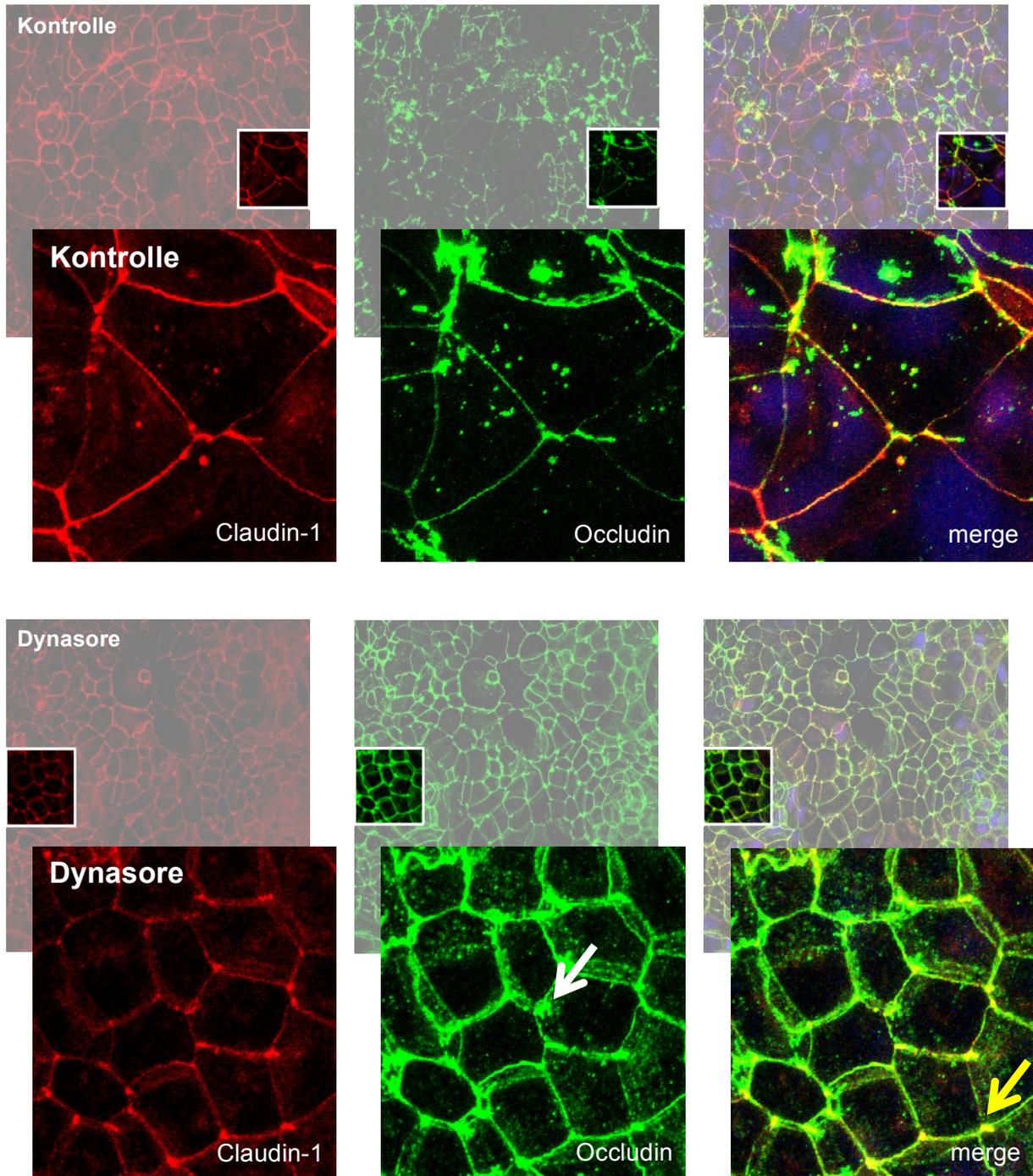


Abb. 4.1.4d: IF-Färbung der Proteine Claudin-1 und Occludin in der Vergrößerung

Der weiße Pfeil markiert vermehrte Occludin-Vesikel und weist auf die Präsenz besonders an trizellulären Kontaktpunkten hin. Der gelbe Pfeil markiert die an zellulären Kontaktpunkten vorkommende Kolokalisation.

Hemmung mit Pitstop-2

Wenn Clathrin-abhängige Prozesse mit Pitstop-2 gehemmt wurden, fand sich ebenfalls eine verstärkte Expression von Occludin. Allerdings war das Occludin-Signal anders als nach Hemmung mit Dynasore vor allem vermehrt in intrazellulären Vesikeln nachweisbar, jedoch ergab sich auch eine verstärkte Präsenz an der Plasmamembran. Die Occludin-haltigen Vesikel lagen dabei - soweit beurteilbar - im Bereich des Nucleolus. Claudin-1 war nach Pitstop-Hemmung vermehrt darstellbar, wobei das Protein sowohl an der Plasmamembran durchgehend linear angeordnet als auch flächig verteilt im Zytosol nachgewiesen werden konnte. In den Kontrollen war Claudin-1 linear an den Zellgrenzen darstellbar und an den zellulären Kontaktpunkten vermehrt präsent, diese Verteilung zu den zellulären Kontaktpunkten schien nach Pitstop-2 Behandlung nicht mehr vorhanden zu sein.

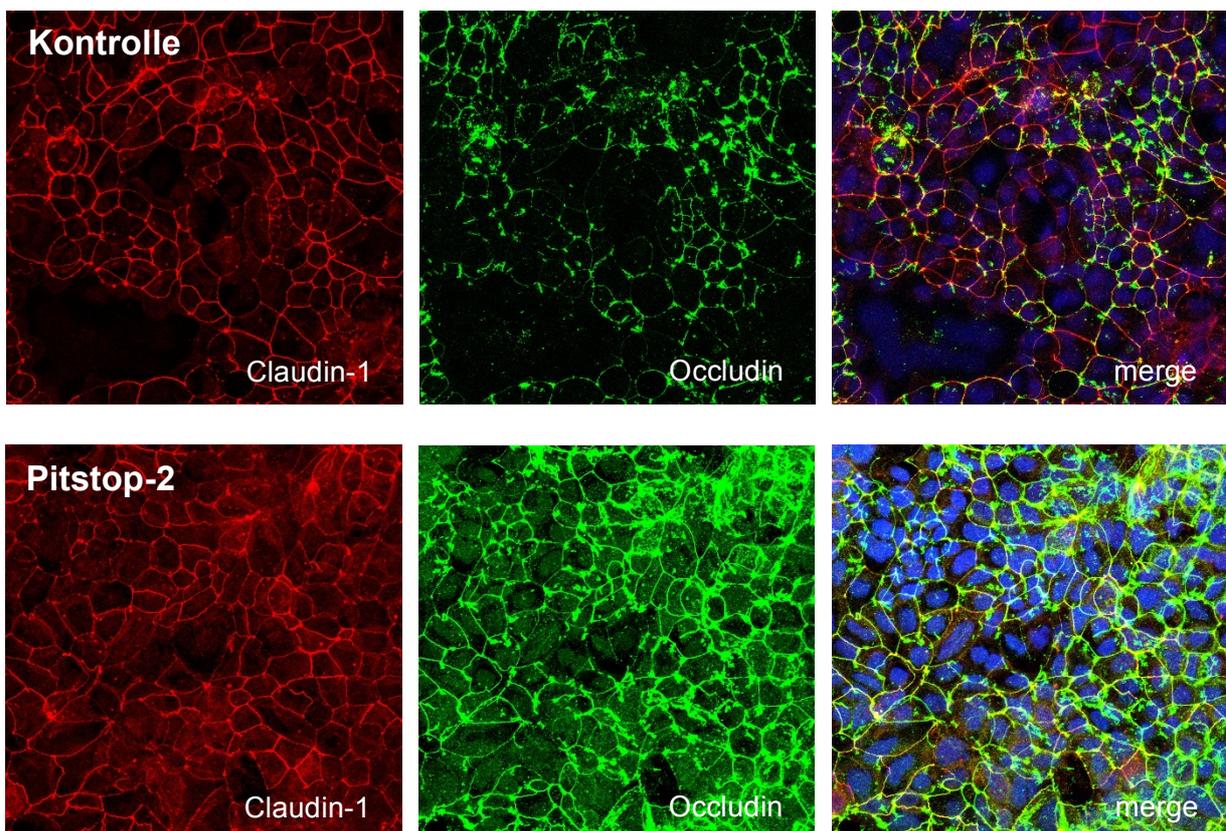


Abb. 4.1.4e: IF-Färbung der Proteine Claudin-1 und Occludin in der Übersicht

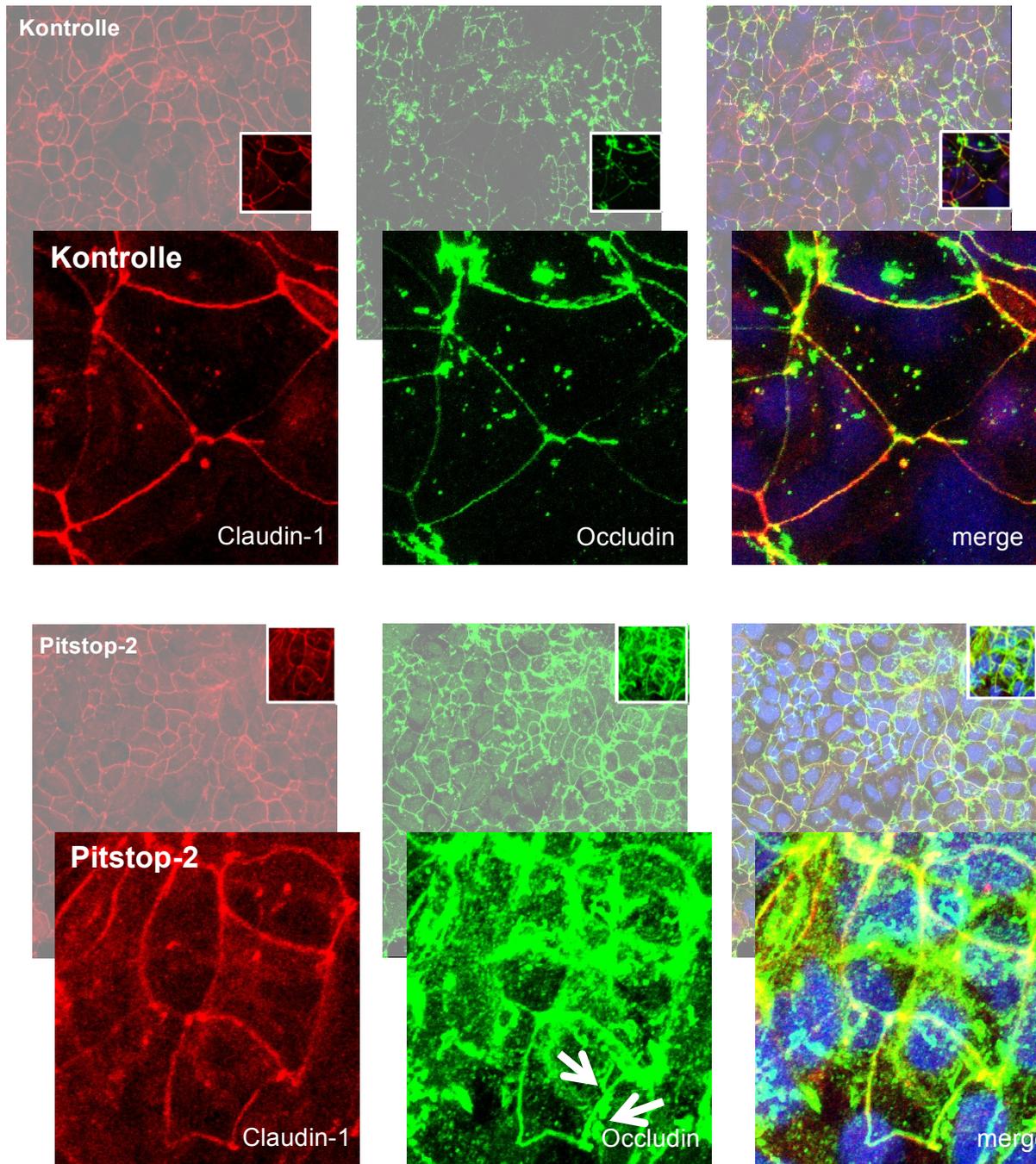


Abb. 4.1.4f: IF-Färbung der Proteine Claudin-1 und Occludin in der Vergrößerung
 Die Pfeile markieren die an der Plasmamembran lokalisierten Occludin-Vesikel.

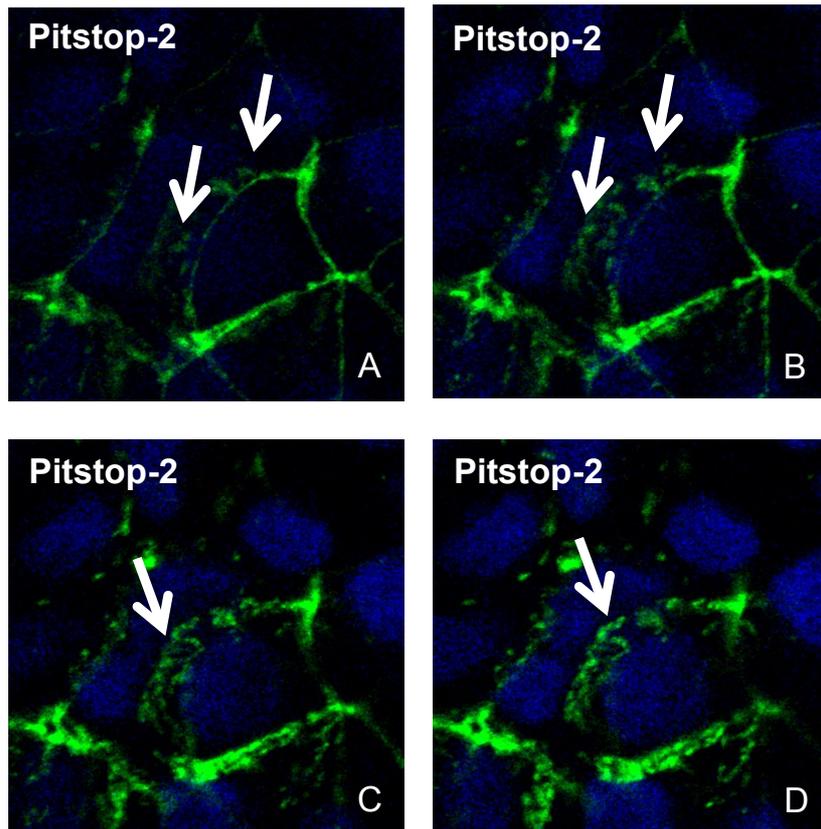


Abb. 4.1.4g: IF-Färbung des Proteins Occludin in der Vergrößerung

Die stattgehabte Exposition gegen Pitstop-2 wird in der oberen linken Bildecke gezeigt. In der rechten unteren Bildecke sind Buchstaben (A-D) aufgetragen, die die Schichten von apikal nach basal darstellen. Mit „A“ ist dabei der am weitesten apikal liegende Stack gekennzeichnet. Die Pfeile markieren Occludin Vesikel, die sich von der Plasmamembran ablösen und in den basalen Schichten sind sie Nucleolus nah lokalisiert.

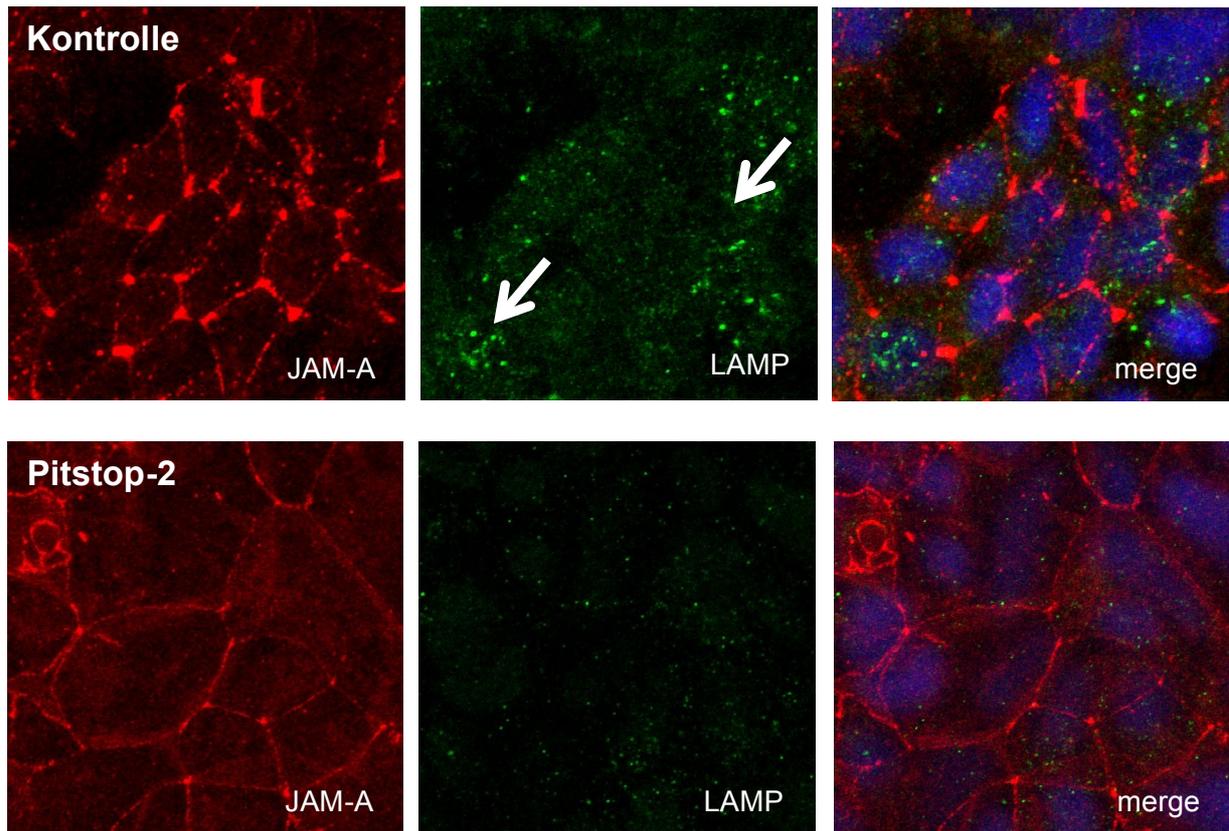


Abb. 4.1.4h: IF-Färbung der Proteine JAM-A und LAMP in der Übersicht

Die Pfeile markieren die unter Kontrollbedingungen angefarbten LAMP-Signale, die nach Pitstop-Inhibition nicht zu erkennen sind.

JAM-A zeigte sich im Gegensatz zur Dynasore-Hemmung dezent verringert bis unverändert in seiner Präsenz an der TJ. Die intrazellulären LAMP-Vesikel, die in den Kontrollen nachweisbar waren und nach Dynasore Behandlung zunahmen, waren bei Exposition gegen Pitstop-2 kaum erkennbar. Die Resultate der Analysen aus den Abb. 4.1.4e - 4.1.4h sind in Tab. 4.1 zusammengefasst wiedergegeben.

TJ-Protein	Dynasore	Pitstop-2
ZO-1	M =/↑	M =
JAMA	M ↑	M =/↓
Occludin	M ↑	M ↑, V ↑
Claudin-1	M =	M ↑
Claudin-3	M =	n.d.
Claudin-4	M =	n.d.
LAMP	V ↑	V ↓

Tab. 4.1: **Expressionslevel und Lokalisation von TJ-Proteinen nach Endozytose-Hemmung**

V: vesikulär, M: Membran-ständig; ↑: Expressionslevel hochreguliert; ↓: herabreguliert; =: unverändert; n.d.: nicht determiniert.

4.2 Endozytose von TJ-Proteinen nach Exposition proinflammatorischer Zytokine

Im Folgenden wurden intestinale Epithelzellen mit proinflammatorischen Zytokinen inkubiert. Dabei wurde der Versuch unternommen, den durch die Zytokine verursachten Funktionsdefekt der epithelialen Barriere mit den morphologischen Veränderungen an der TJ zu korrelieren. Bei diesen Experimenten kamen ausschließlich T84-Zellen zur Anwendung, da diese besonders Zytokin-responsiv sind. Diese werden auf PCF-Filtern ausgesät und nach 7-10 Tagen Kultur vermessen.

4.2.1 TER-Messung nach Exposition proinflammatorischer Zytokine

Interessanterweise zeigte die Behandlung der T84-Zellen mit TNF- α sowie auch die Behandlung mit TNF- α + IFN- γ nur eine tendenzielle (aber nicht statistisch signifikante) Verminderung des TER nach 48 Stunden. Demgegenüber verminderte sich der TER nach Behandlung mit IL-22 sowie auch IL-13 signifikant um 30,3% bzw. um 54,3% (Abb. 4.2.1a).

Da viele endozytotische Prozesse auf deutlich geringeren Zeitskalen ablaufen, wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem der TER 12 Tage alter T84-Zellen engmaschig kurz nach Zugabe der Zytokine gemessen wurde (Abb. 4.2.1b). Hier zeigten sich im Zeitfenster kurz nach Zytokinzugabe keine relevanten TER-Veränderungen. Die im Vorexperiment bereits gezeigten TER-Veränderungen nach 48 Stunden Zytokinexposition bestätigten sich jedoch durchaus.

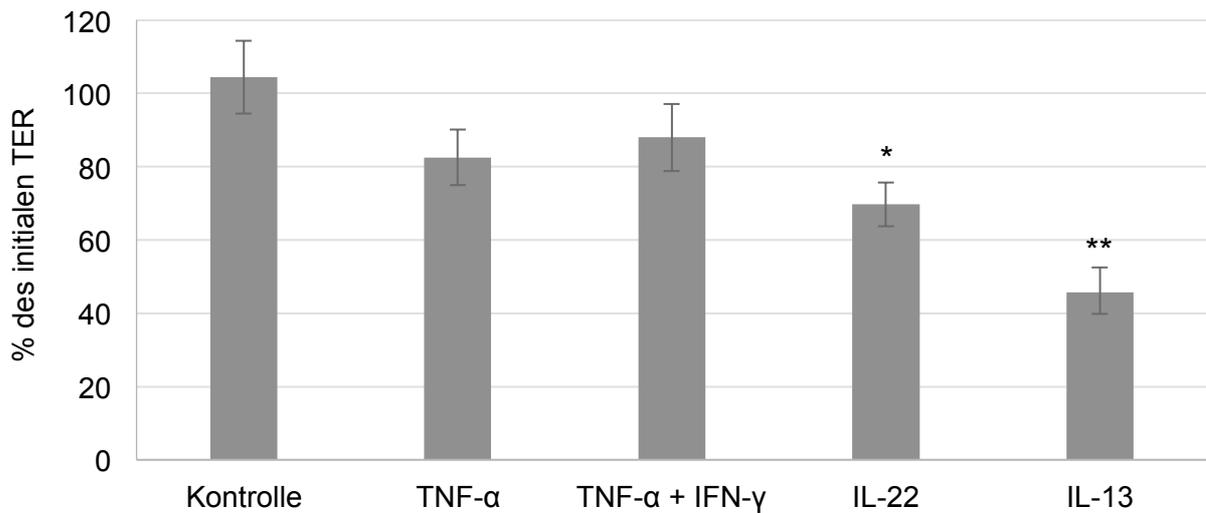


Abb. 4.2.1a: Zytokinexposition von T84 Zellen nach 48h

T84-Zellen wurden sieben Tage nach Aussaat mit den angegebenen Zytokinen exponiert (basolaterale Zugabe bis auf IL-22: hier bds.) und 48 Stunden später mit dem TER-Handmessgerät (sog. Chop-stick-Elektroden) vermessen.

Der Analyse zugrundeliegende n-Zahlen: Kontrolle: n=10, TNF-α: n= 6, TNF-α + IFN-γ: n=12, IL-22: n=12, IL-13: n=10.

*: p<0,05; **: p<0,01

In einem präliminären Experiment wurden in der Folge T84-Zellen, die 48 Stunden mit Zytokinen behandelt worden waren, für weitere 30 min mit dem Endozytosehemmer Dynasore behandelt. Dabei sollte ein Potential von Dynasore aufgedeckt werden, Zytokin-induzierte TER-Defekte aufzuheben. Auf Grund der geringen n-Zahl ist dieses Experiment nicht statistisch auswertbar. Es zeigte an, dass bei IL-22- und IL-13-verursachten Barriere-defekten vermutlich Dynasore-erreichbare Mechanismen keine Rolle spielen. Demgegenüber waren die TNF-α-inkubierten Filter, die anschließend auch noch mit Dynasore behandelt wurden, im TER höher als die entsprechenden Vergleichsfilter, die nur die Zytokinexposition erhalten hatten.

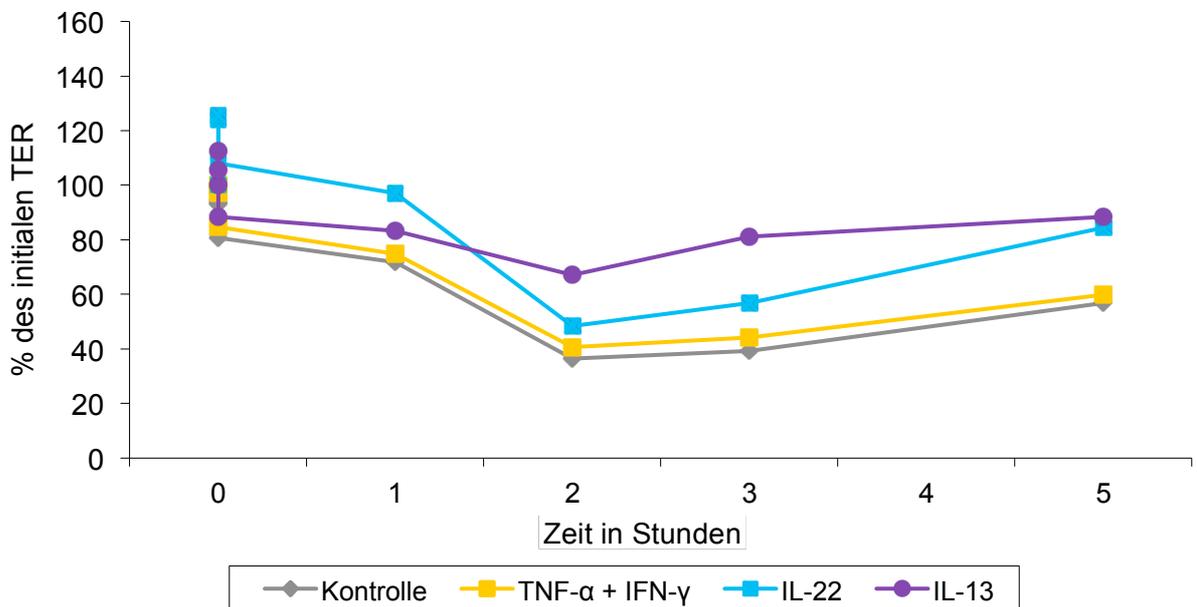
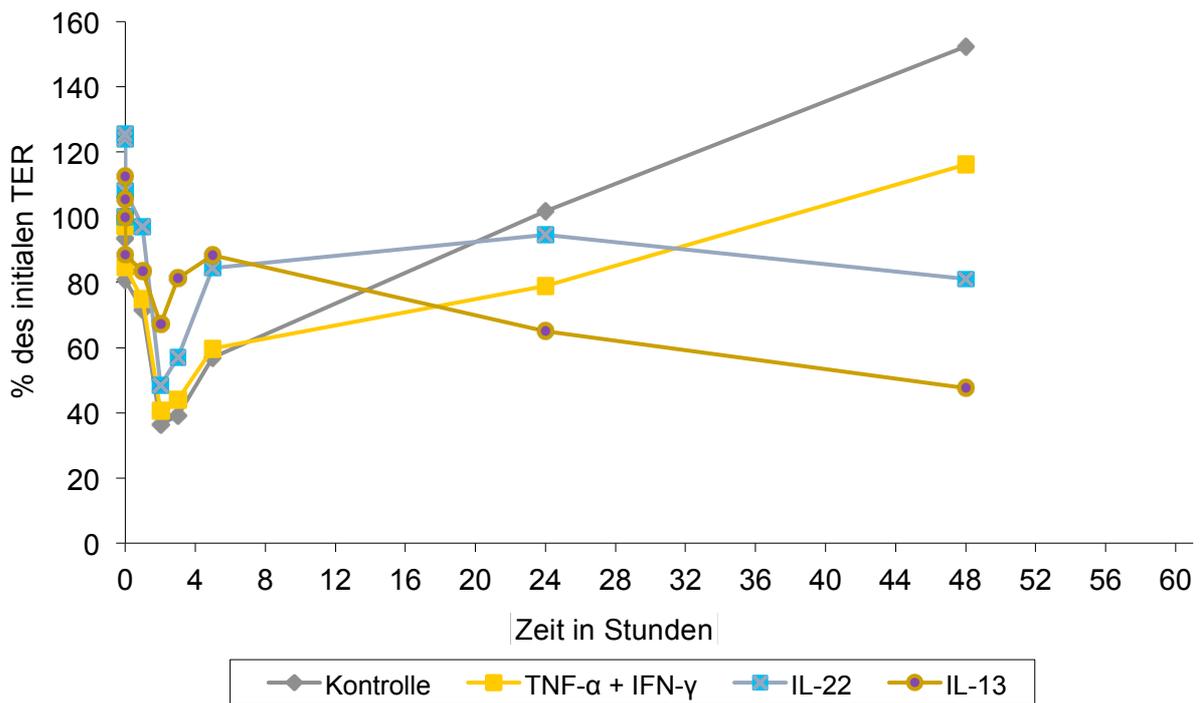


Abb. 4.2.1b: **TER-Verlauf von T84 Zellen unter Exposition proinflammatorischer Zytokine**
 Das obere Diagramm zeigt den TER-Verlauf über 48 Stunden, das untere Diagramm löst den TER-Verlauf während der ersten fünf Stunden der Zytokinexposition auf (n=2).

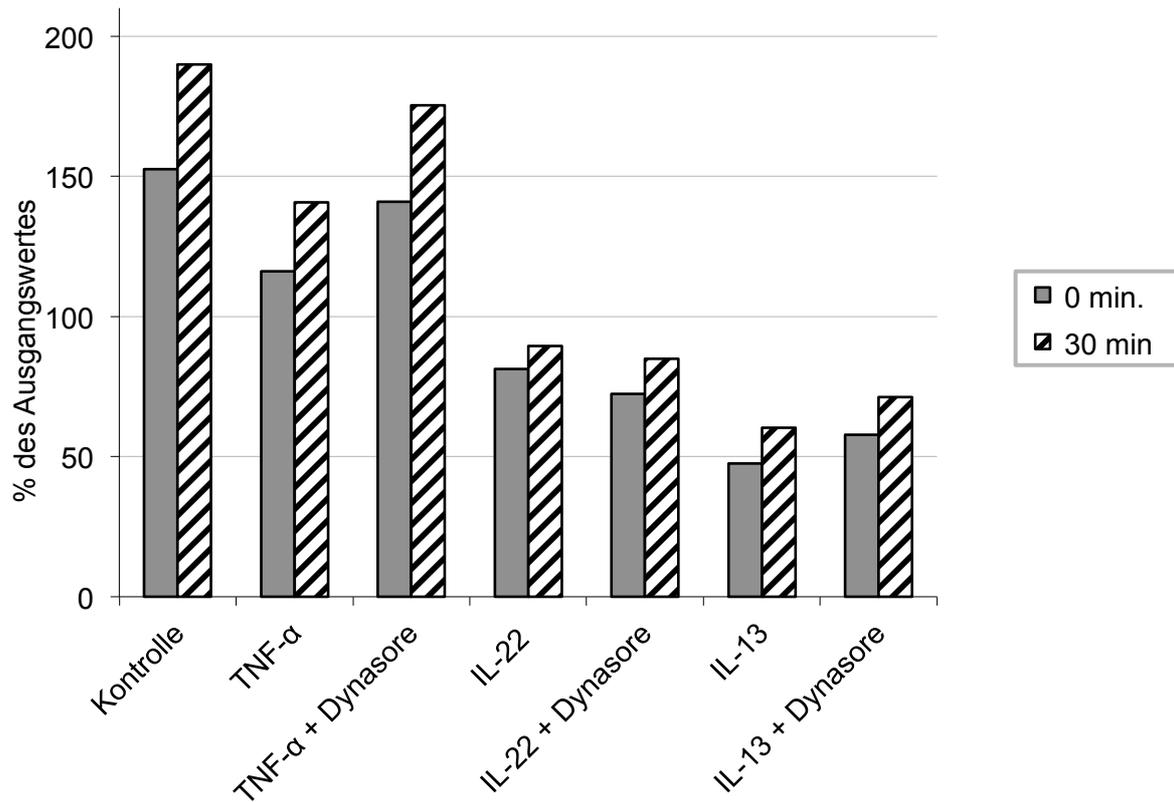


Abb. 4.2.1c: Widerstandsänderung der verschiedenen Zytokine mit und ohne Dynasorebehandlung

Auf Grund der geringen Zahl der Experimente (n=2) wurde nur der Mittelwert angegeben, jedoch keine weitere Statistik berechnet. Nach 48 Stunden und 0 min Zytokininkubation (in der Legende als 0 min gekennzeichnet) erfolgte die dreißigminütige Dynasorezugabe bzw. ein alleiniger Mediumswechsel und eine erneute Widerstandsmessung mittels Chop-Stick-Elektroden nach 48 Stunden und 30 min (in der Legende als 30 min gekennzeichnet).

4.2.2 TJs nach Zytokinexposition

Veränderungen der TJ-Struktur wurden wie im Abschnitt 4.1.3 bereits beschrieben. Des Weiteren wurden die Zytokin-exponierten T84-Zellen konfokal-mikroskopisch analysiert. Auch hier wurden Gesichtsfelder im 40x Objektiv untersucht. Die Resultate der Analysen aus den Abb. 4.2.2a – 4.2.2o sind in Tab. 4.2 zusammenfassend wiedergegeben.

TNF- α : Alleine unter TNF- α -Exposition zeigten sich keine Veränderungen bezüglich Lokalisation und Präsenz der untersuchten TJ-Proteine in der TJ.

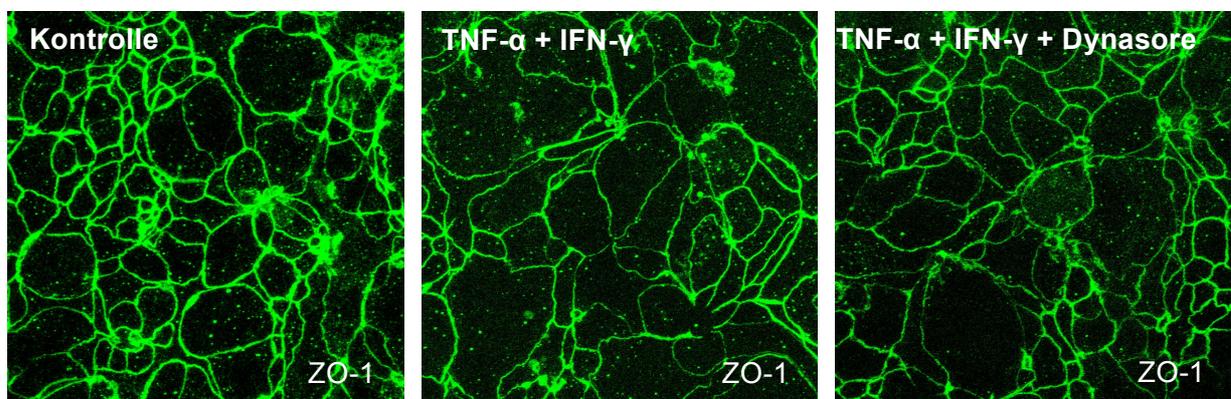


Abb. 4.2.2a: IF-Färbung des Proteins ZO-1 in der Übersicht

Das gefärbte Protein wird in der unteren rechten Bildecke und die stattgehabte Exposition (d.h. Puffer = Kontrolle, Zytokin oder Zytokin gegen Dynasore) wird in der oberen linken Bildecke genannt.

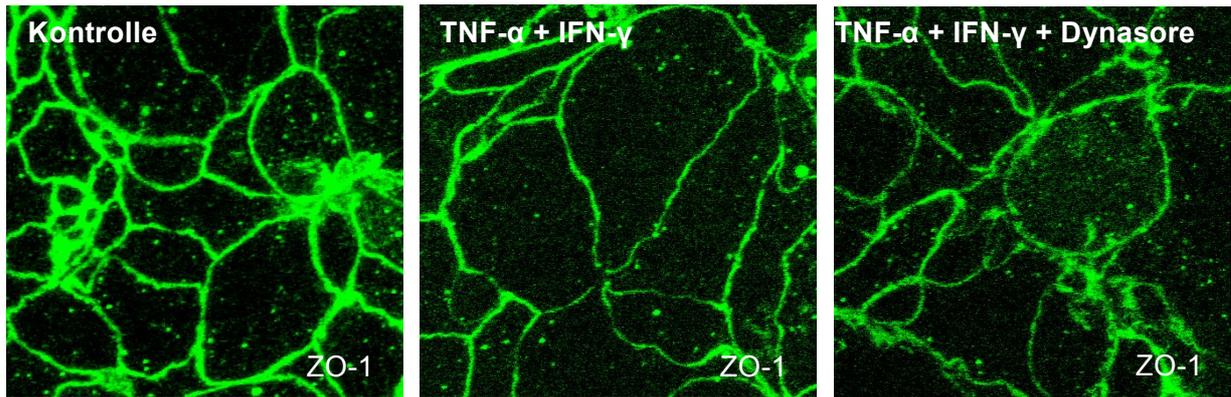


Abb. 4.2.2b: IF-Färbung der Proteins ZO-1 in der Vergrößerung

Das gefärbte Protein wird in der unteren rechten Bildecke und die stattgehabte Exposition (d.h. Puffer = Kontrolle, Zytokin oder Zytokin gegen Dynasore) wird in der oberen linken Bildecke genannt.

Bei den Färbungen gegen ZO-1 waren keine aussagekräftigen Lokalisationsänderungen oder Änderungen bezüglich der Anfärbbarkeit von ZO-1 in den mit einer Kombinationsbehandlung aus TNF- α + IFN- γ oder TNF- α + IFN- γ + Dynasore exponierten Zellen zu sehen.

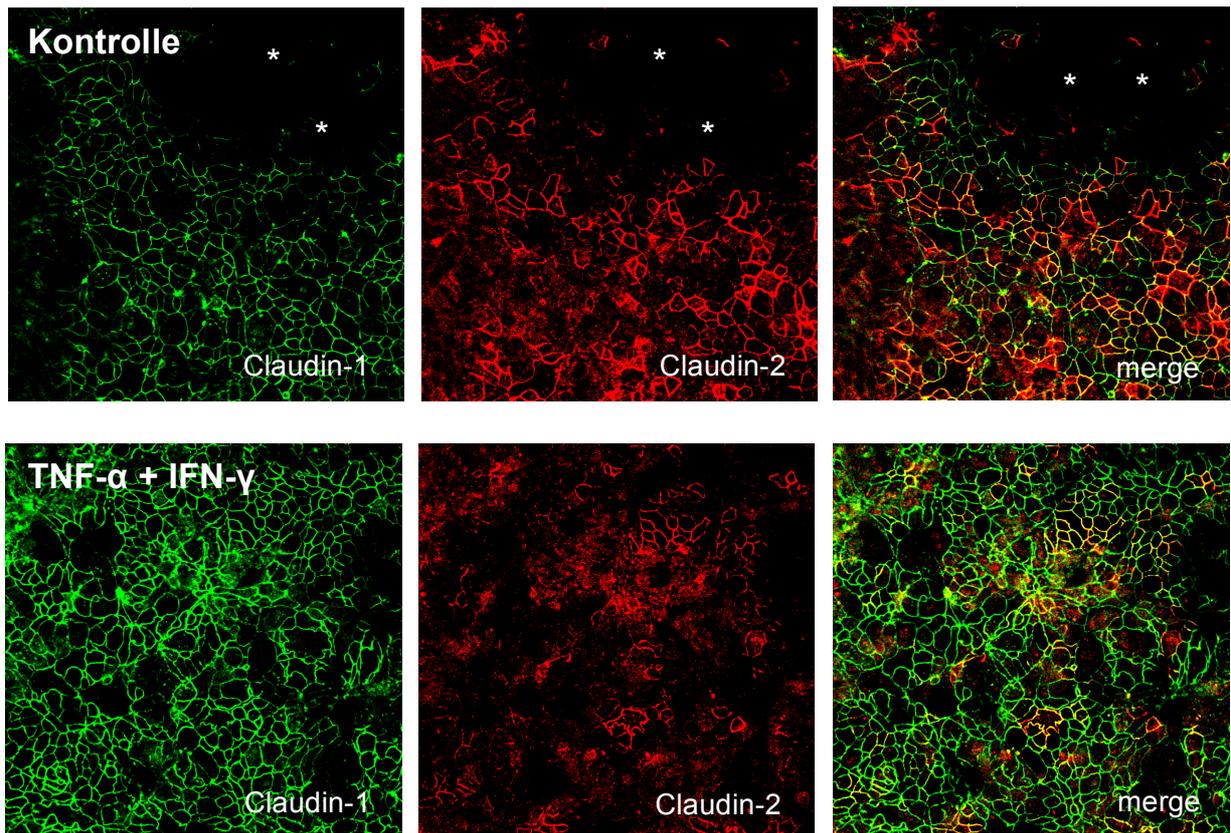


Abb. 4.2.2c: IF-Färbung der Proteine Claudin-1 und Claudin-2 in der Übersicht
 Das gefärbte Protein wird in der unteren rechten Bildecke und die stattgehabte Exposition (d.h. Puffer = Kontrolle, Zytokin oder Zytokin gegen Dynasore) wird in der oberen linken Bildecke genannt. Die Überlagerung beider Signale (merge) zeigt die Veränderung der TJ-Proteine zueinander. Im Falle einer Kolokalisation des roten und grünen Fluoreszenzsignals entsteht im Merge-Bild ein gelbes Signal. Da auf einem Filter gewachsener Epithelzelllayer nicht ganz plan sein kann, kommen in einer konfokalen Aufnahme, die nur eine dünne Schicht der Zellen abbildet, manche Bereiche nicht zur Darstellung – es entsteht der nicht richtige Eindruck eines zellfreien Bereichs auf dem Filter. So verhält sich der mit einem Stern markierte Bereich der Claudin-1/-2 Doppelfärbung.

TNF-α + IFN-γ: In Kombination mit IFN-γ zeigte sich eine vermehrte Präsenz von Claudin-1 linear an der Plasmamembran und ebenso sich von der Membran ablösende Claudin-1-Vesikel. Claudin-2 erschien an der TJ weniger präsent und nicht mehr linear an der Plasmamembran angeordnet zu sein. Im Zytosol hingegen fand man Claudin-2-Vesikel flächig verteilt.

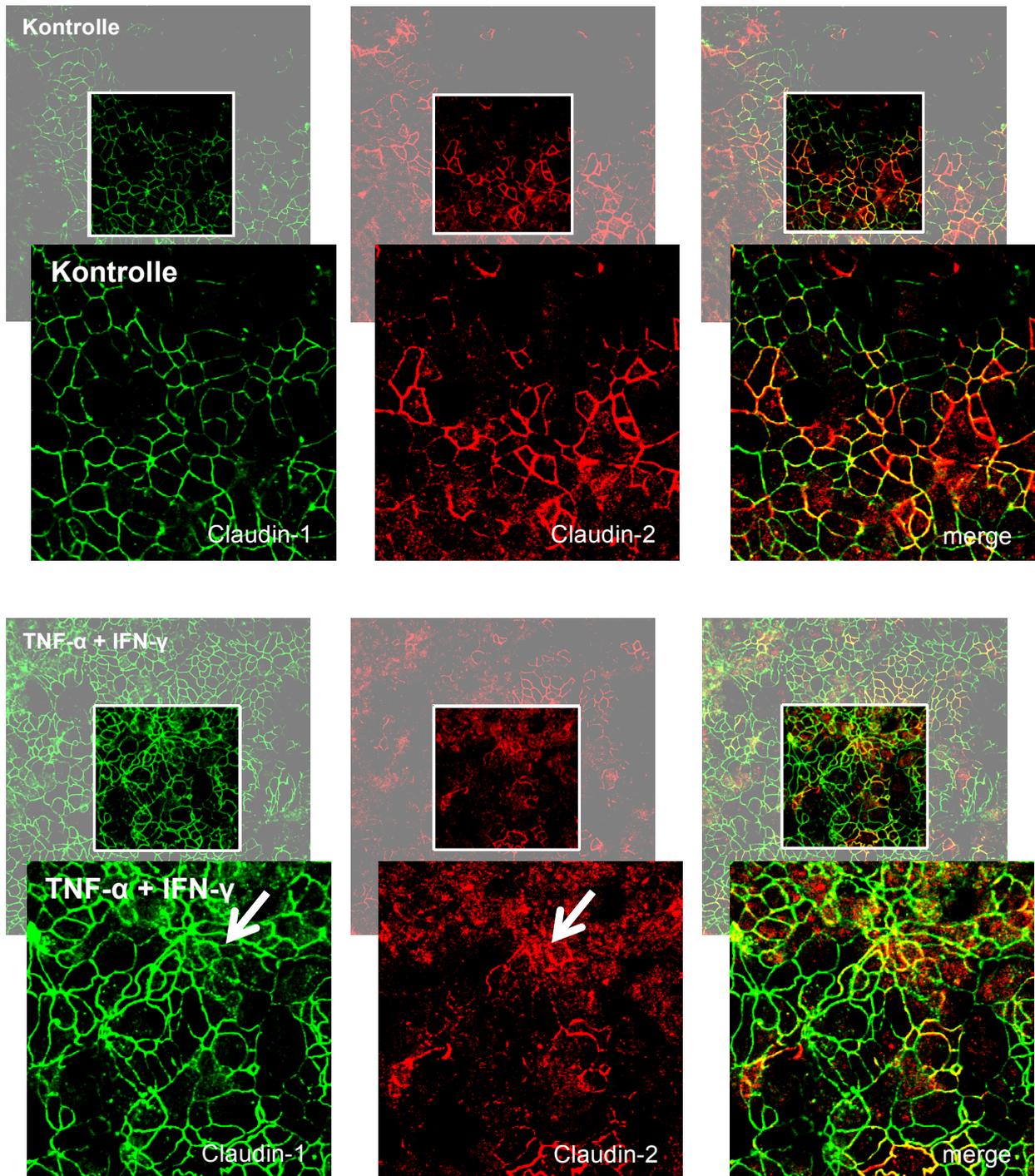


Abb. 4.2.2d: IF-Färbung der Proteins Claudin-1 und Claudin-2 in der Vergrößerung
 Der Pfeil markiert zum einen die verstärkte Präsenz von Claudin-1 an der TJ, der andere Pfeil markiert die flächig im Zytosol verteilten Claudin-2-Vesikel.

TNF- α + IFN- γ + Dynasore: Im Vergleich zu den Kontrollen schien es nach Zugabe von Dynasore zu einer Verringerung von Claudin-1 an der Zellmembran gekommen zu sein und ebenso waren keine Claudin-1 Vesikel intrazellulär auffindbar. Die Zahl der Kollokalisierungen nahm im Vergleich zu den Kontrollen ab.

An der Plasmamembran ebenfalls vermindert anfärbbar war Claudin-2, auch zeigten sich weniger Claudin-2-Vesikel im Zytosol als unter Kontrollbedingungen.

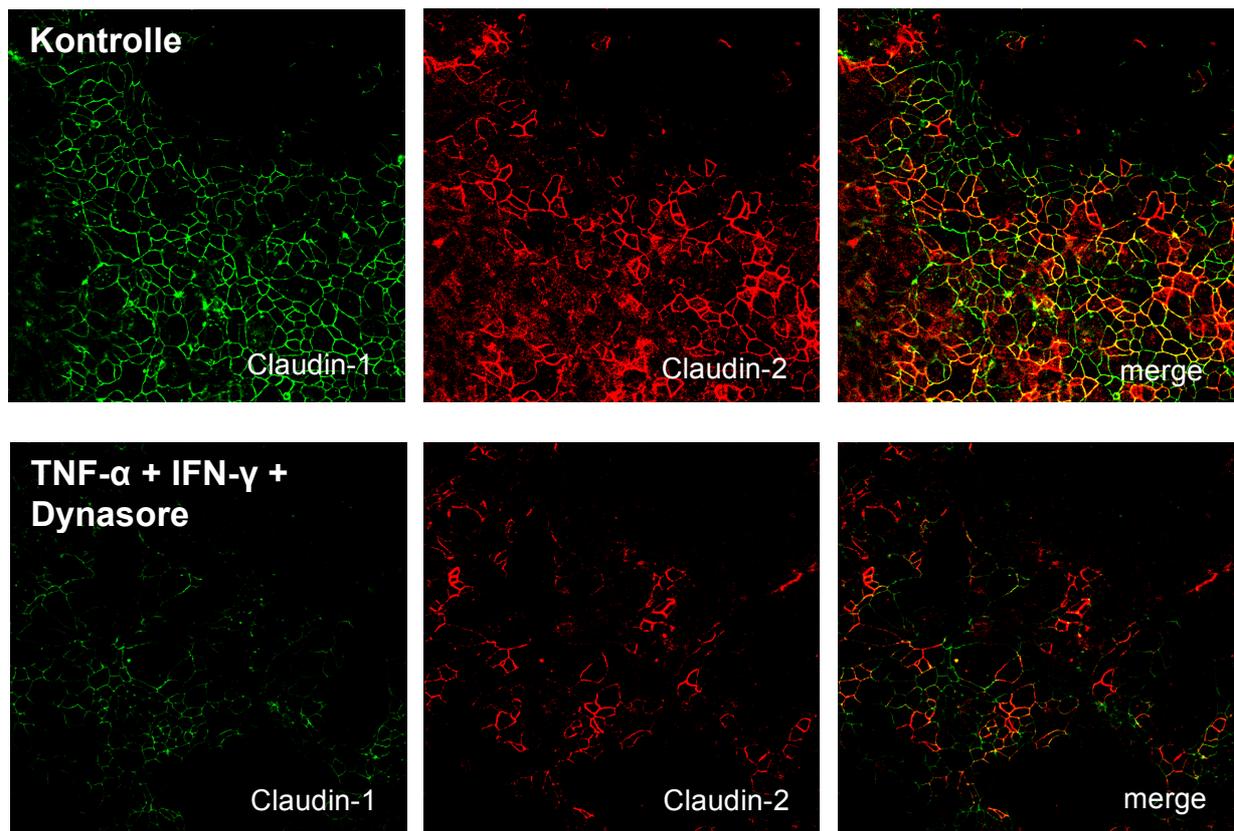


Abb. 4.2.2e: IF-Färbung der Proteine Claudin-1 und Claudin-2 in der Übersicht

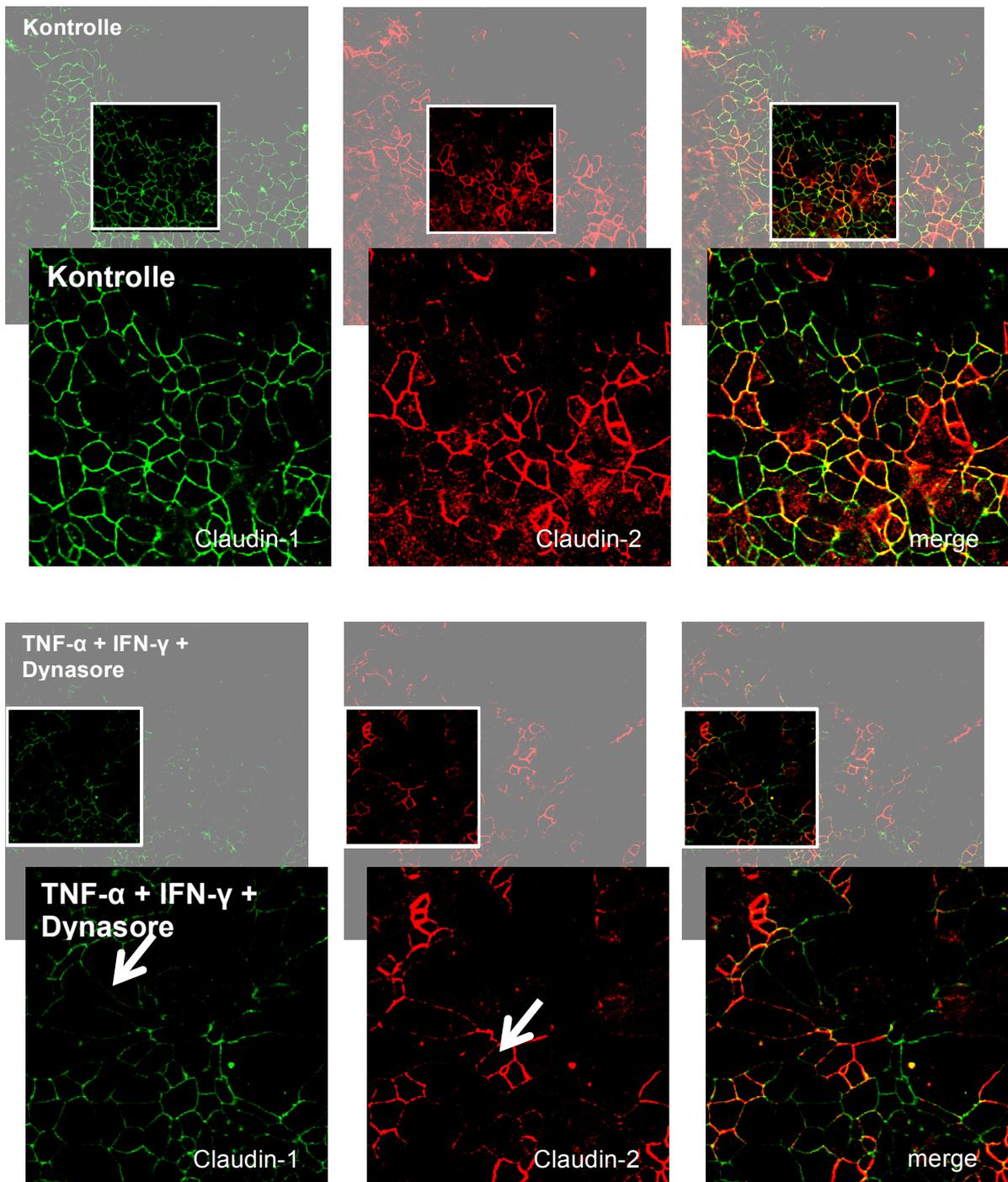


Abb. 4.2.2f: IF-Färbung der Proteins Claudin-1 und Claudin-2 in der Vergrößerung
 Die Pfeile markieren die verminderte Präsenz von Claudin-1 an der Zellmembran und die verminderten Claudin-2-Vesikel intrazellulär.

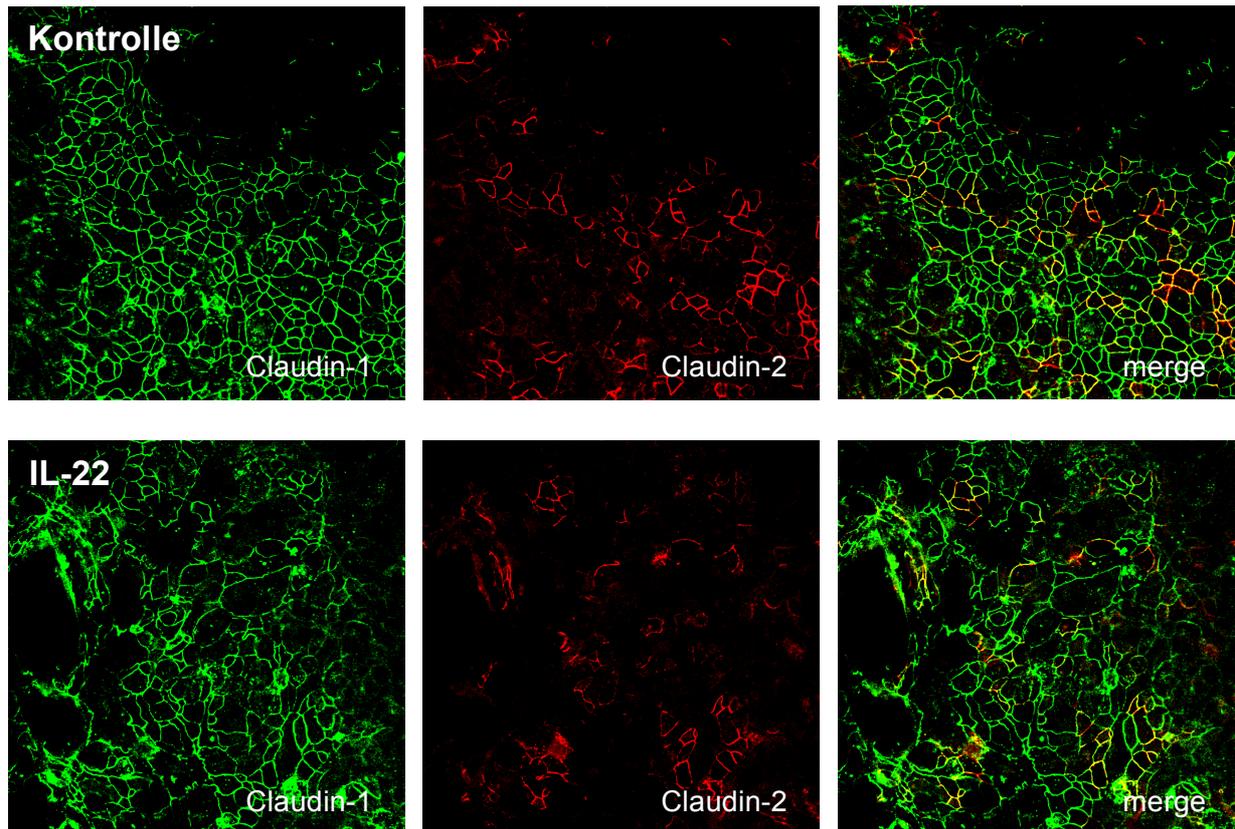


Abb. 4.2.2g: IF-Färbung der Proteine Claudin-1 und Claudin-2 in der Übersicht

IL-22: Sowohl an der Membran als auch intrazellulär war Claudin-1 verstärkt anfärbbar. Claudin-2 war in Lokalisation und Intensität der Anfärbbarkeit unverändert. Das TJ-Protein ZO-1, das am intrazellulären Bereich der apikal-lateralen Membran lokalisiert ist, stellte sich dezent verstärkt an der TJ dar.

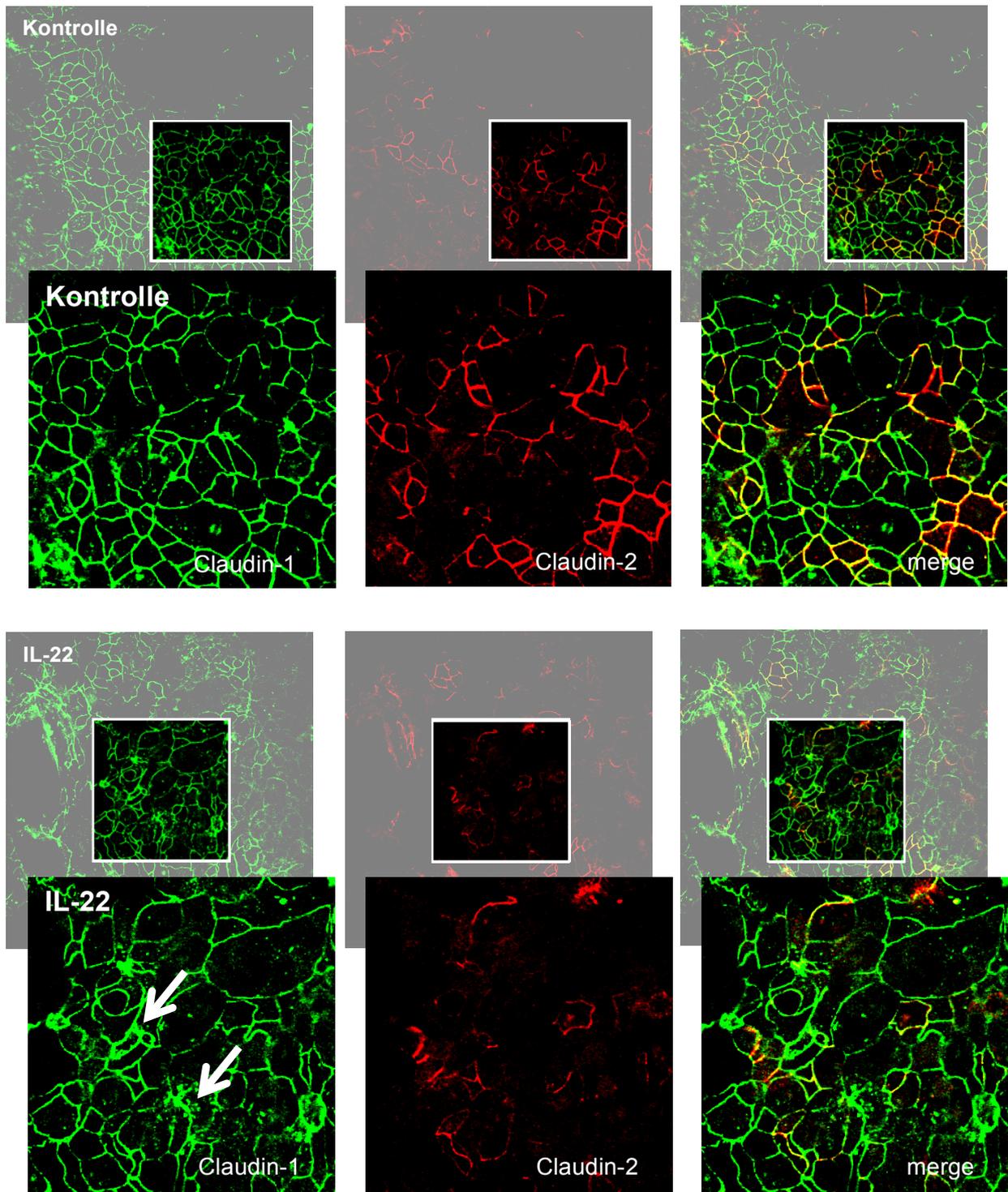


Abb. 4.2.2h: IF-Färbung der Proteins Claudin-1 und Claudin-2 in der Vergrößerung
 Die Pfeile markieren die verstärkte Anfärbbarkeit von Claudin-1 an der Plasmamembran und intrazellulär.

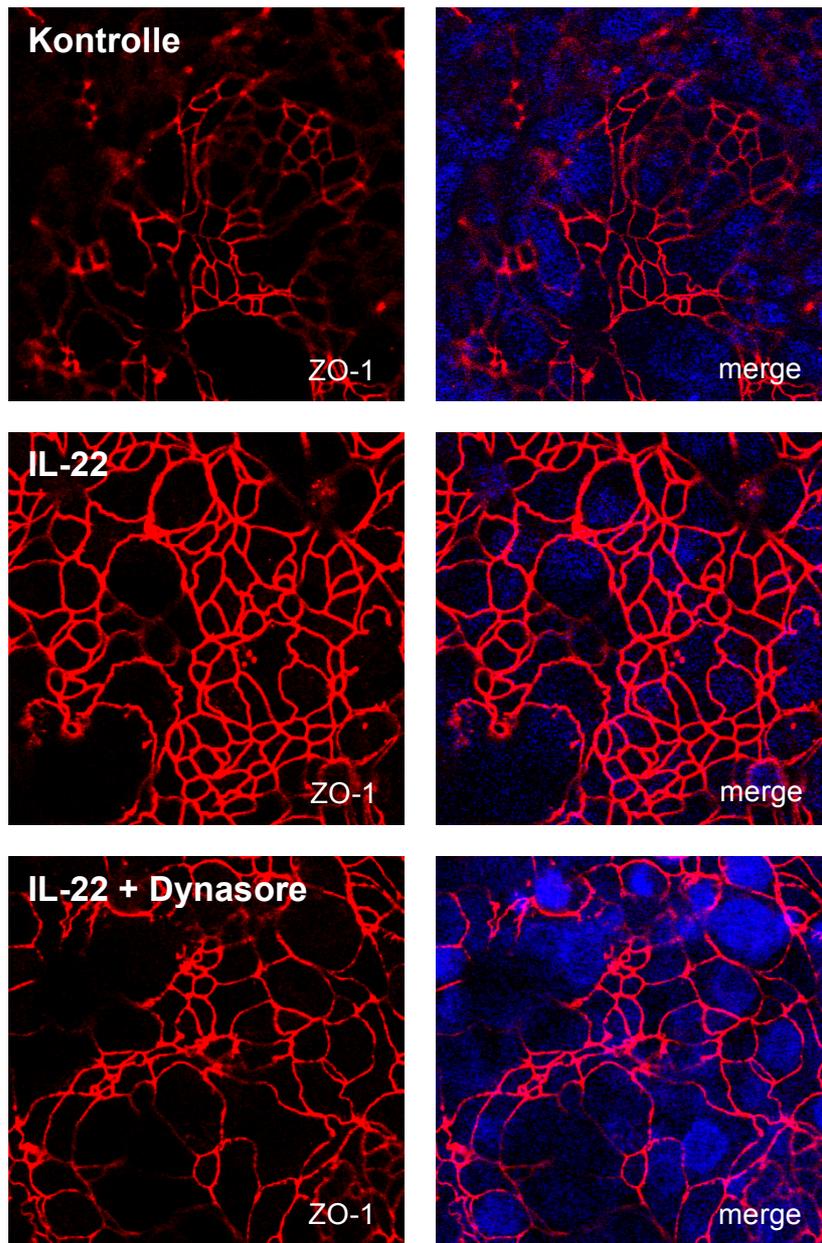


Abb. 4.2.2i: IF-Färbung der Proteins ZO-1

Das gefärbte Protein wird in der unteren rechten Bildecke und die stattgehabte Exposition (d.h. Puffer = Kontrolle, Dynasore oder Pitstop-2) wird in der oberen linken Bildecke genannt.

IL-22 + Dynasore: ZO-1 war unverändert bzw. fraglich verringert in den LSM-Bildern zu sehen, anders als die Zellen nach IL-22 Behandlung, bei denen das ZO-1-Signal verstärkt und von der Zellmembran ablösend darstellte. Die weiteren Färbungen konnten nicht determiniert werden.

IL-13: Die LSM-Bilder, der mit IL-13 behandelten Zellfilter, deuteten auf eine Verminderung von Claudin-1 hin. Claudin-2 war unverändert zu den Kontrollen. In konfokalen Schichtuntersuchungen fiel auf, dass die Signalausdehnung des Claudin-1-Signals in der Z-Achse vergrößert war. Das heißt, dass sich der apiko-basale Bereich, in dem Claudin-1 nach IL-13-Exposition vorzufinden ist, erweitert darstellt und damit die TJ vermutlich an Kompaktheit verliert (Schichtdaten sind nicht dargestellt).

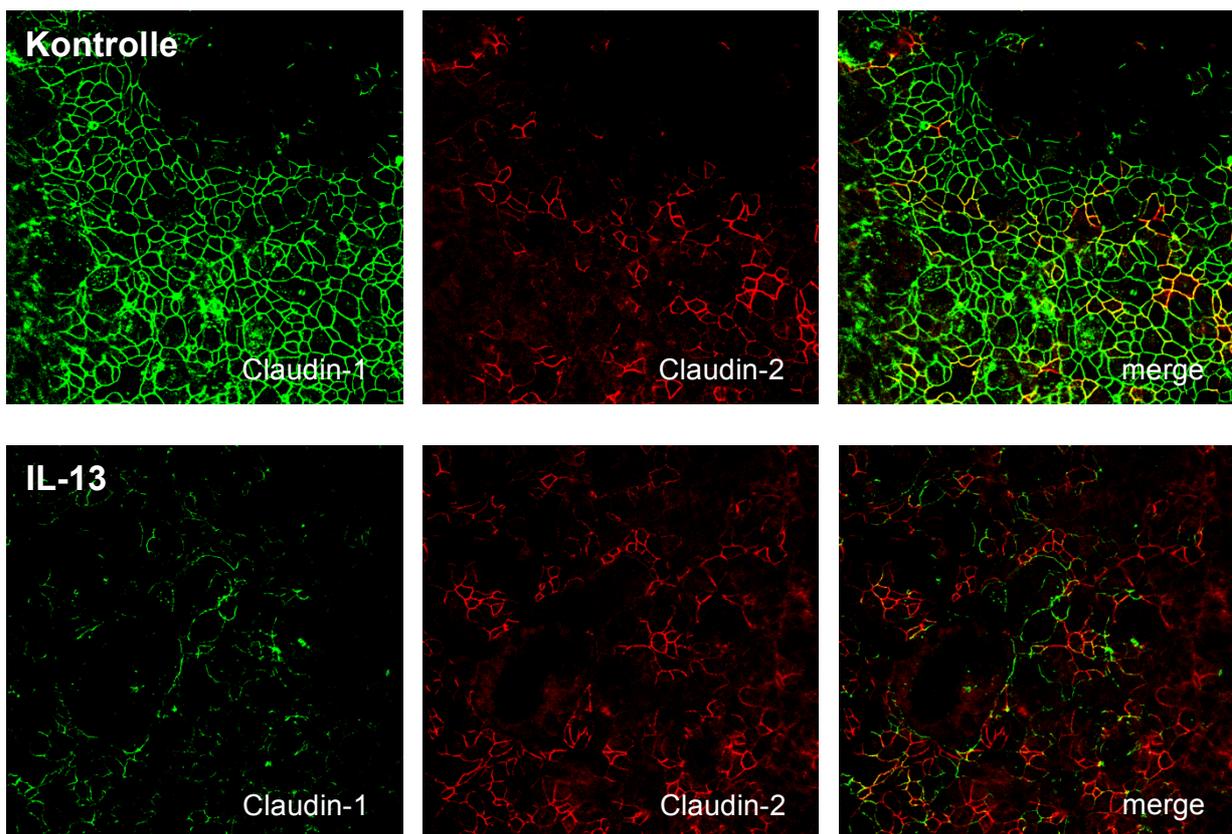


Abb. 4.2.2j: IF-Färbung der Proteine Claudin-1 und Claudin-2 in der Übersicht

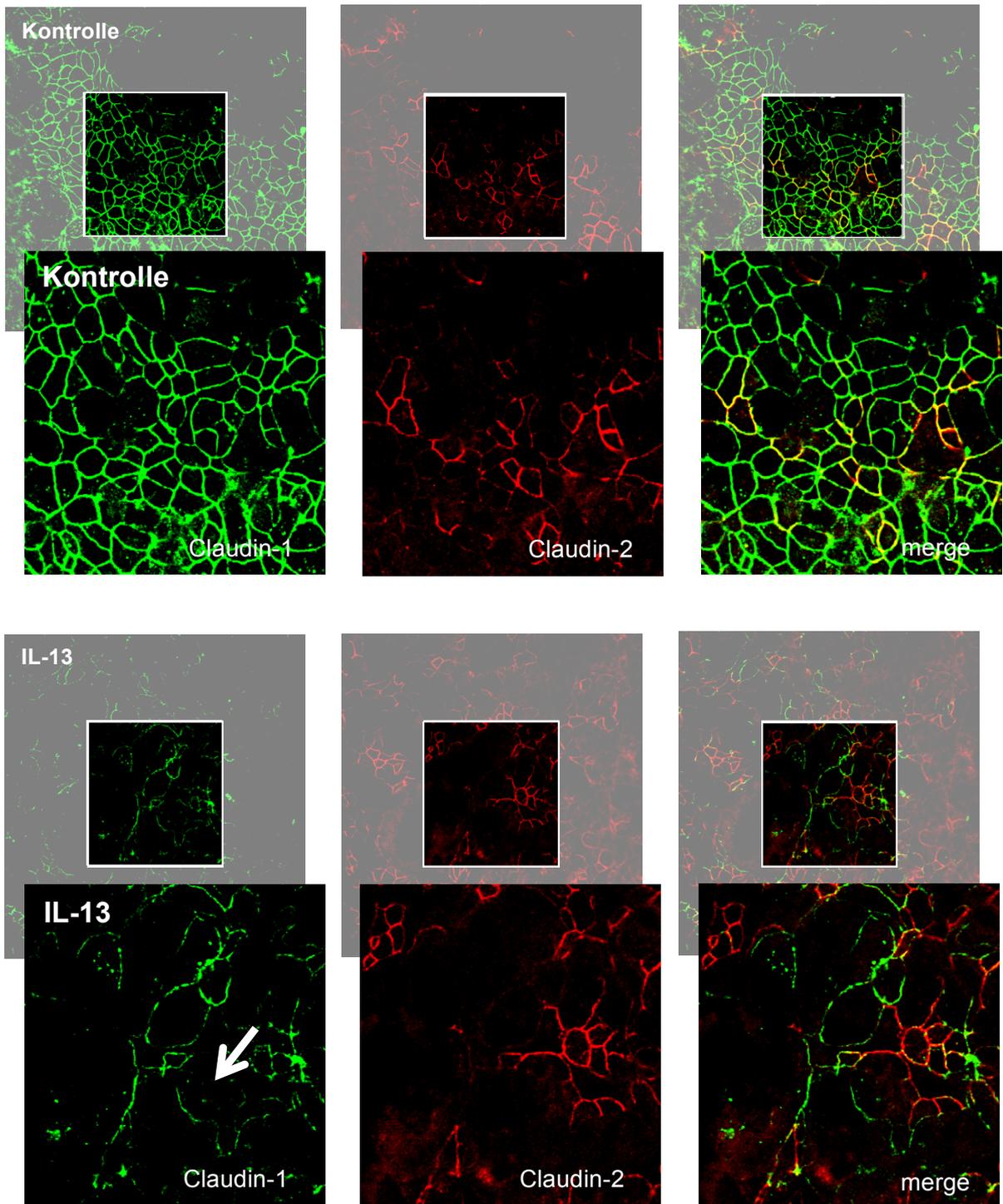


Abb. 4.2.2k: **IF-Färbung der Proteins Claudin-1 und Claudin-2 in der Vergrößerung**
 Der Pfeil deutet auf eine Verminderung von Claudin-1 in der TJ hin.

ZO-1 war nach IL-13-Inkubation an der apikalen Membran dargestellt und dort stärker exprimiert als in den Kontrollen, ebenso in intrazellulären Vesikeln und submembranal von der Zellmembran ablösend.

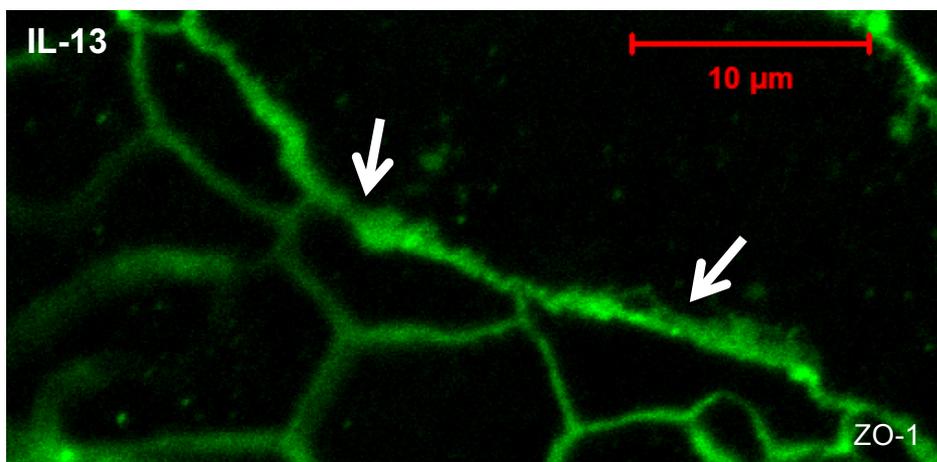
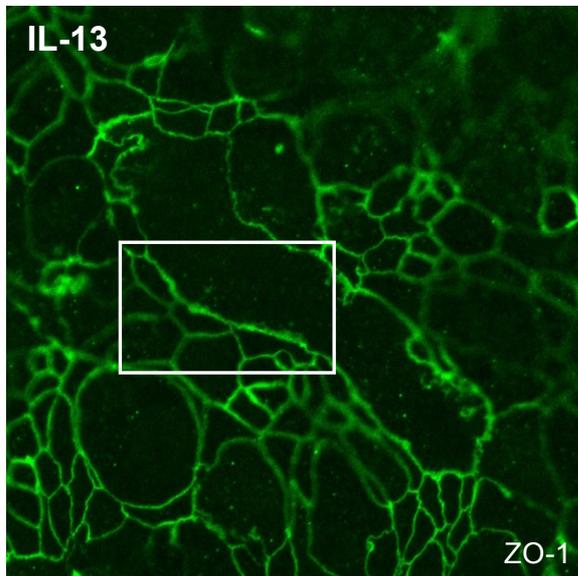


Abb. 4.2.2I: IF-Färbung des Proteins ZO-1 in der Übersicht und der Vergrößerung
Die Pfeile deuten auf die sich von der Plasmamembran lösenden ZO-1-Vesikel hin.

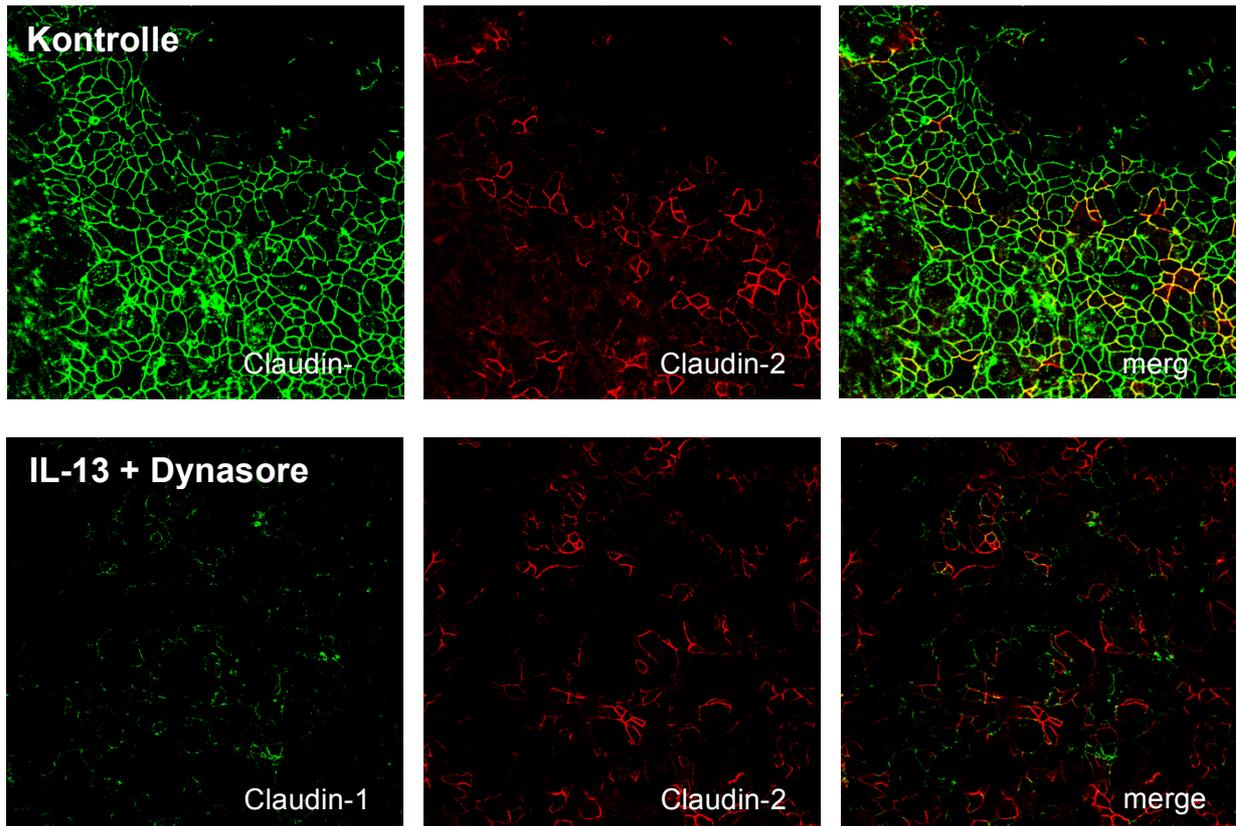


Abb. 4.2.2m: IF-Färbung der Proteine Claudin-1 und Claudin-2 in der Übersicht

IL-13 + Dynasore: In Kombination mit Dynasore zeigte sich die Claudin-1 in der TJ stark vermindert auch im Vergleich zu der alleinigen Behandlung mit IL-13 war Claudin-1 intrazellulär oder submembranal nicht auffindbar. Claudin-2 erschien verringert exprimiert. Die Zellmorphologie zeigte sich verändert nach Dynasorebehandlung, so dass die Zellen zackig geformt aussahen.

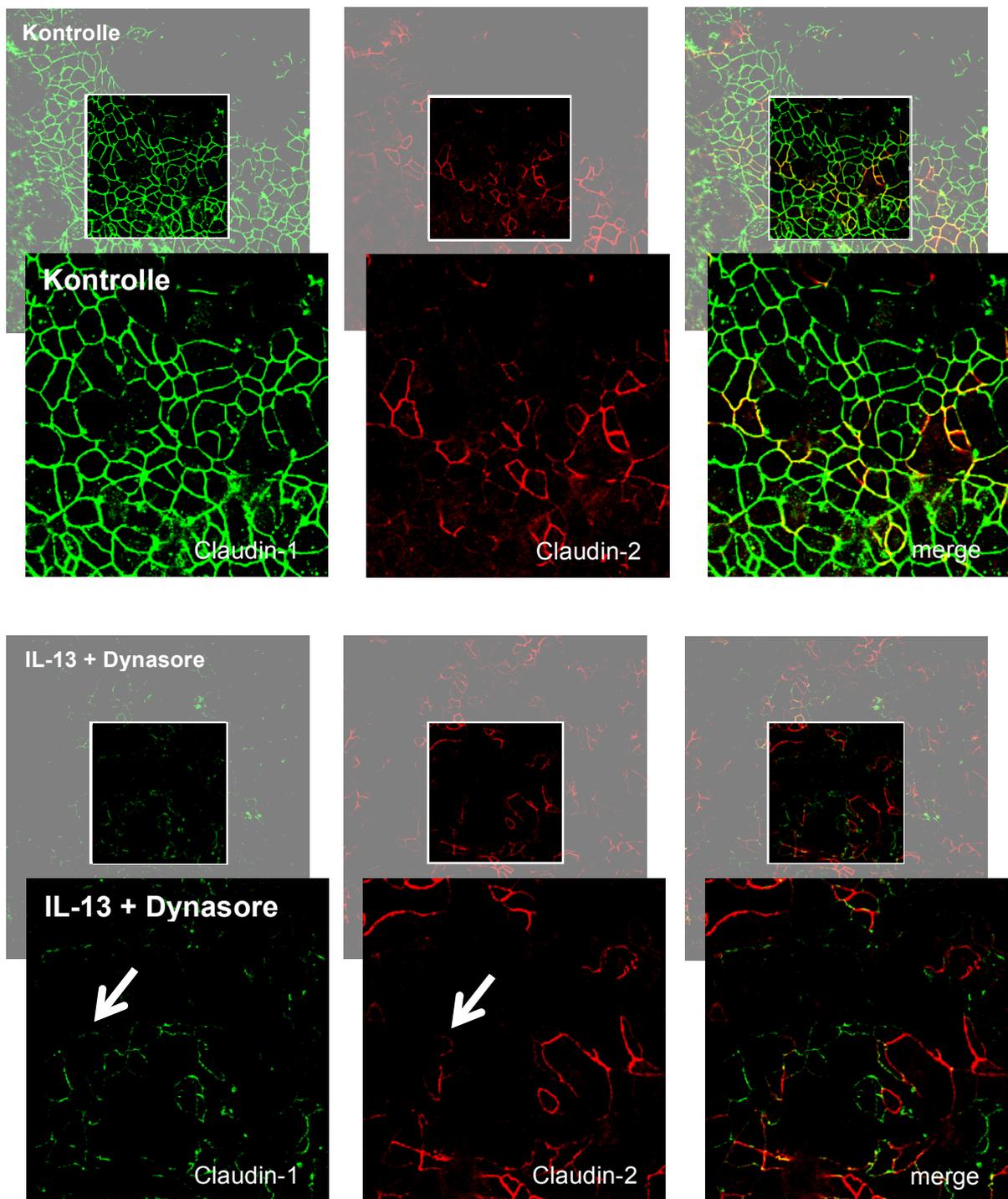


Abb. 4.2.2n: **IF-Färbung der Proteins Claudin-1 und Claudin-2 in der Vergrößerung**
 Die Pfeile markieren die eine Verringerung von Claudin-1 und Claudin-2 in der TJ.

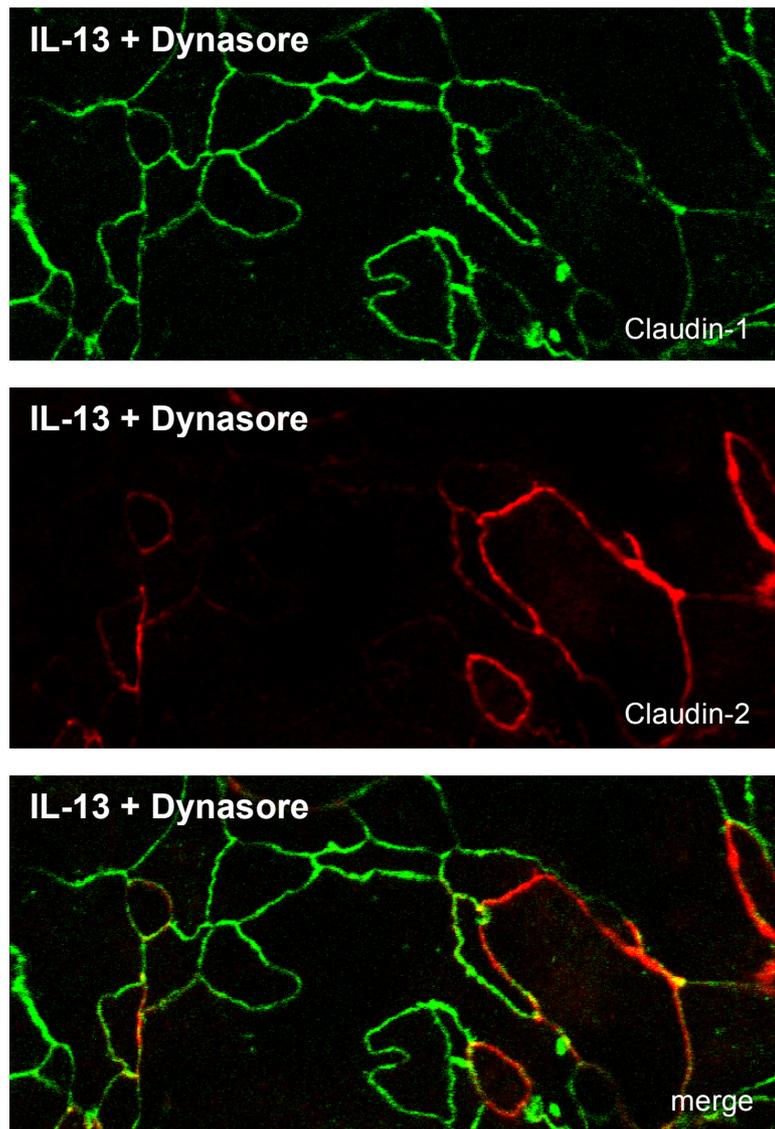


Abb. 4.2.2o: IF-Färbung der Proteins Claudin-1 und Claudin-2

Die Zellmorphologie zeigte sich verändert nach Dynasorebehandlung, so dass die Zellen in der xy-Aufsicht irreguläre Formen annahmen und sich sowohl sehr große als auch sehr kleine Zellen fanden, d.h. dass die Verteilung der apikalen Zellmembranfläche auffallend inhomogen war.

Zytokine	ZO-1	Claudin-1	Claudin-2
TNF- α	M =	M =	M =
TNF- α + IFN- γ	M =	M \uparrow , V +	M \downarrow , V -
TNF- α + IFN- γ + Dynasore	M =	M \downarrow	M \downarrow
IL-22	M \uparrow	M \uparrow , V +	M =
IL-22 + Dynasore	M =/ \downarrow	n.d.	n.d.
IL-13	M \uparrow , V +	M \downarrow	M =
IL-13 + Dynasore	M =	M \downarrow	M \downarrow

Tab. 4.2: **Ergebnisse der IF-Färbungen Zytokin-behandelter T84-Zellen**

V : vesikulär, M : Membran-ständig; \uparrow : Expressionslevel hochreguliert; \downarrow : herabreguliert;
 = : unverändert; n.d.: nicht determiniert.

5. Diskussion

Die intestinale Barriere hat die Gewährleistung sehr verschiedener Funktionen wie die Resorption von Nährstoffen und Schutz vor pathogen agierenden Mikroorganismen bzw. auch das Erlauben funktionell synergistisch wirkender Interaktionen mit Mikroorganismen zum Ziel. Daher ist sie strukturell komplex und umfasst: (i) die Bildung einer komplexen, protektiven Schleimschicht, (ii) der Integrität der Epithelzellschicht, (iii) der parazellulären Abdichtung dieser Epithelzellschicht, d.h. der Integrität des apikalen Junctionskomplexes, der wiederum aus TJ und Adherens Junction aufgebaut ist, und (iv) der Interaktion der Schleim - wie der Epithelschicht mit verschiedenen Lamina propria-Zellen, u.a. Makrophagen, dendritischen Zellen, z.T. auch intraepithelial gelagerten T-Lymphozyten und sIgA-produzierenden B-Lymphozyten. Die in dieser Arbeit untersuchten TJ-Proteine haben damit eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion und damit der intestinalen Integrität. TJs sind Zell-Zell-Verbindungen zwischen benachbarten Epithelzellen, die den parazellulären Stofftransport zwischen Lumen und Interstitium regulieren. Sie dienen auch der Ausbildung und im Weiteren der Aufrechterhaltung der Polarität der Epithelzellen, indem sie die apikale und basolaterale Plasmamembran der Enterozyten kompartimentieren (Zaun-Funktion; engl. *fence function*). Eine fehlerhafte TJ-Proteinexpression kann in einer erhöhten parazellulären Permeabilität resultieren, welche infolge eines Leck-Fluxes zu Diarrhoe, und infolge von gesteigerter Antigenaufnahme zu Inflammation und konsekutiv der Initiation systemischer Entzündungsprozesse führen kann.

Inwieweit TJ-Proteine auch durch Beeinflussung von Endozytoseprozessen im Steady-State der Zelle reguliert werden und inwieweit diese Regulation nach Stimulation durch proinflammatorische Zytokine relevant ist, war die zentrale Fragestellung dieser Arbeit.

5.1 Einfluss von Endozytose der TJ-Proteine auf die epithelialen

Barrierefunktionen

In dieser Arbeit ist eine Analyse der Barriereigenschaften des einschichtigen hochprismatischen Darmepithels nach Inhibition verschiedener Endozytosemechanismen vorgenommen worden. Hierzu wurde als Modellsystem die intestinale Epithelzellkultur Caco-2 verwendet und der transepitheliale elektrische

Widerstand (TER) der Epithelschicht ist als Ausdruck der Barrierefunktion für Ionen gemessen worden. Ferner sind in diesem Zusammenhang Fluorescein-Flux-Messungen (Fluorescein, 332 Da) zur Darstellung eines möglichen parazellulären Transports größerer Moleküle durchgeführt worden.

In unserer Untersuchung wurde ein rascher TER-Anstieg gezeigt.

Was sind mögliche Ursachen für den Dynasore-assoziierten TER-Anstieg?

1. TER-Anstieg infolge einer Hemmung der Endozytose von TJ-Proteinen durch Dynasore mit konsekutiver Abdichtung des Parazellulärraums. Die Dynasore-Hemmung endozytotischer Prozesse durch Hemmung der großen GTPase Dynamin ist gut etabliert (Macia et al., 2006; Oh et al. 2012). Dabei belegt die parallel gezeigte Abdichtung des Zelllayers gegenüber dem parazellulären Tracer Fluorescein die Verminderung der parazellulären (und nicht der transzellulären) Permeabilität für mittelgroße Moleküle. Als Ursache der Änderung der parazellulären Permeabilität ist dabei eine Beeinflussung der Tight Junction anzunehmen. Diese kann auf eine veränderte TJ-Protein-Expression via transkriptioneller oder posttranskriptioneller Einflüsse oder durch subzelluläre Umverteilung der TJ-Proteine zurückzuführen sein, wobei daran auch TJ-assoziierte Proteine oder das Zytoskelett beteiligt sein können (Ye, 2006; Cunningham & Turner, 2012). Eine erhöhte Aktivität der Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) ist zum Beispiel mit einem TJ-Permeabilitätsanstieg verbunden, da eine Phosphorylierung der Myosin-Leichtkette die Kontraktion von Aktin-Myosin-Filamenten auslöst und so über Scaffold-Proteine wie das ZO-1 die TJ-Barriere zu öffnen vermag (Cunningham & Turner, 2012).
2. Eine Änderung der Zelloberfläche könnte ebenfalls eine TER-Änderung zur Folge haben. Dies konnte jedoch in Vorversuchen mittels Kapazitätsmessungen an Caco-2-Zellen ausgeschlossen werden.
3. Eine Verminderung der parazellulären Permeabilität durch Dynasore kann auch auf Grund eines toxischen Dynasore-Effekts verursacht werden, d.h. Dynasore würde unabhängig von seiner Dynamin-Hemmung den Barriereeffekt verursachen. Dies wäre mit einer Schwellung der Zellen einhergegangen, die in der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie und der Kapazitätsmessung in Vorversuchen jedoch nicht auftrat.

Da der TER-Anstieg sich durch eine Hemmung der Endozytose der abdichtenden Claudine Claudin-1, Claudin-3 und Claudin-4 erklärt hätte, wurden diese in mit Dynasore behandelten intestinalen Epithelzellen mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Dabei wiesen die Epithelzellen nach Dynasore-Behandlung jedoch kein verstärktes Signal der genannten Claudine in der TJ auf. Demgegenüber wies das JAM-A- und Occludin-Signal eine verstärkte membranale Präsenz auf. Allerdings gibt es hinsichtlich Occludin keine Daten zu einer abdichtenden Funktion und hinsichtlich JAM-A widersprüchliche Daten (Wilcz-Villega et al., 2013).

Daher kann der Dynasore-assoziierte TER-Anstieg auch durch eine Vermehrung von abdichtenden TJ-Proteinen verursacht worden sein, die nicht im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.

Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass eine Quantifizierung mittels Western Blot nicht zwischen der Lokalisation von Claudinen in der TJ und endozytotischen Vesikeln diskriminiert, weshalb diese Technik hier nicht zur Anwendung kam. Generell gilt die konfokale Mikroskopie von TJ-Proteinen, die mittels Immunfluoreszenz angefärbt wurden, als das Verfahren der Wahl zur Festlegung der Lokalisation dieser zellulären Proteine. Es kann des Weiteren die örtliche Proteinmenge analysieren (z.B. den relativen Claudin-1-Level an einer TJ), ist jedoch andererseits eher ungeeignet für die globale Bestimmung eines bestimmten Proteinlevels (z.B. Bestimmung der Claudin-1-Gesamtmenge in allen Epithelzellen eines Filters).

Laut Preta et al. hat Dynasore noch weitere Dynamin-unabhängige Effekte wie z.B. die Verringerung von zellulärem Cholesterol, die Lösung von Lipid Rafts von der Plasmamembran und die Inhibition der V-ATPase von intrazellulären Vesikeln (Preta et al., 2015). Ob solche Dynamin-unabhängigen Effekte, z.B. durch Veränderungen der Membraninsertion von TJ-Proteinen in Cholesterol-modifizierten Zellmembranen, ebenfalls die parazelluläre Permeabilität betreffen können, bleibt fraglich.

Neben einer Dynamin-Hemmung wurde als zweites Prinzip der Endozytose-Hemmung eine Clathrin-Hemmung mittels Behandlung der Zellen mit Pitstop-2 durchgeführt. Dieser blockiert die Bindung zwischen Amphiphysin und Clathrin und unterbindet so die Clathrin-abhängigen Endozytoseprozesse. In unseren Experimenten führte Pitstop-2 zu einem Absinken des TER. Dies ist überraschend, da (im Gegensatz zu den Dynasore-Experimenten) dies eine erhöhte Permeabilität der TJ für kleine Solute suggeriert. Allerdings wird dies durch den Befund kompliziert, dass in Fluorescein-Flux-Messungen

die Behandlung der Zellen mit Pitstop-2 zu einer Verringerung der parazellulären Fluoresceinpassage führte. Dieser Befund der gegenläufigen Beeinflussung von ionaler Permeabilität und Fluorescein-Flux durch Pitstop-2 ließ sich in der vorliegenden experimentellen Arbeit nicht auflösen. Einerseits könnte das Absinken des TER, bei gleichzeitiger Verminderung des parazellulären Fluorescein-Transports, alternativ auf einen vermehrten transzellulären Ionen-Transport hindeuten. Andererseits könnte es auch ein rein parazellulärer Effekt sein, bei dem simultan gegenläufige Veränderungen zweier TJ-Proteine geschehen, die gegenläufig hinsichtlich der Permeabilität von Molekülen unterschiedlicher Größe/Ladung sind. So war Claudin-1 bei den mit Pitstop-2 behandelten Zellfiltern vermehrt flächig im Zytosol nachweisbar. Diese Internalisierung, eines die Tight Junction gegen Natriumionen abdichtenden TJ-Proteins durch Pitstop-2, könnte den hervorgerufenen Widerstandsabfall erklären.

Parallel dazu könnte die Endozytose eines Tight Junction-Proteins, das gegen größere Moleküle abdichtet, durch Pitstop-2 gehemmt worden sein, was damit die Fluorescein-Flux-Änderung erklären würde.

Ein weiterer Einflussfaktor auf den TER kann auch das verstärkt aus der TJ heraussortierte Occludin sein, dessen Lokalisationsänderung einen TER-Abfall indirekt bedingen kann, da ihm u.a. eine Rolle für die Verteilung des Tricellulin zugeschrieben wird (Ikenouchi et al., 2008). Dieses dichtet die TJ gegen den Durchtritt von Ionen und größeren Molekülen im Bereich von trizellulären Zellkontakten im Epithel ab. Insgesamt ist aber die Rolle des Occludins bei der Abdichtung der epithelialen Barriere nicht vollständig geklärt. So führt eine Überexpression von Occludin in MDCK-Zellen zu einem TER-Anstieg und einer gestiegenen Anzahl von TJ-Strängen (McCarthy et al., 1996), während in Occludin-knockout-Mäusen keine Änderung der TJ und des TER nachgewiesen werden konnte (Saitou et al., 2000; Schulzke et al., 2005). Darüberhinaus zeigten andere Studiengruppen, dass verschiedene Phosphorylierungsstellen am Occludin existieren, die diverse Eigenschaften der Barrierefunktion regulieren können. Beispielsweise begünstigt die Phosphorylierung von Threoninen 403/404 durch die PKC η und von den Threonin-Molekülen 424/438 durch die PKC ζ die Occludin Platzierung innerhalb der TJ (Jain et al., 2011; Suzuki et al., 2009).

Interessanterweise sind von Liashkovich und Mitarbeitern Pitstop-2-Effekte beschrieben worden, die zur Permeabilisierung der Kernporen führen und somit eine Eintrittsmöglichkeit zum Nukleus für große Makromoleküle generieren (Liashkovich et

al., 2015). Dementsprechend ist auch hier ein durch Pitstop-2 ausgelöster Endozytose-unabhängiger Effekt denkbar.

5.2 Wirkung von proinflammatorischen Zytokinen auf die transepitheliale Barriere der T84-Zellen

Zytokine können die TJ über zwei unterschiedliche Mechanismen regulieren, einmal über eine transkriptionelle Expressionsregulation und zum anderen über die Umverteilung von TJ-Proteinen innerhalb der Epithelzelle. Die Frage, die es zu beantworten galt, war, welche Effekte Zytokine auf die transepitheliale Barriere haben und ob proinflammatorische Zytokine die TJ auch durch Endozytose von TJ-Proteinen regulieren. Gleichzeitig untersuchte diese Arbeit, ob Dynasore das Potential besitzt, die Zytokin-induzierten Effekte aufzuheben.

Die Literatur zum Einfluss von Endozytoseprozessen und dem Aufbau der epithelialen TJ in intestinalen Geweben, ist bisher äußerst spärlich. Brüwer und Mitarbeiter fanden an T84-Zellen, dass Clathrin- und Caveolae-abhängige Endozytose in der von IFN- γ ausgelösten Internalisierung von TJ-Proteinen eher keine Rolle spielen, sondern dass vielmehr Makropinozytose-Inhibitoren die Aufnahme von Tight Junction-Proteinen hemmen können (Bruewer et al., 2005). Eine andere Studie, die sich ebenfalls mit dem Effekt von IFN- γ an intestinalen Epithelzellen (Caco-2 und HT-29) beschäftigt hat, zeigte allerdings keinen Unterschied in der Makropinozytoseaktivität von Tight Junction-Proteinen zwischen behandelten Zellen und Kontrollfiltern (So et al., 2000). Makropinozytose-Effekte sind in unserer aktuellen Arbeit allerdings nicht untersucht worden.

5.2.1 TNF- α und TNF- α + IFN- γ

IFN- γ bewirkt eine Steigerung der Abwehr gegen intrazelluläre Pathogene und verstärkt antivirale und antitumorale Immunantworten durch die Aktivierung von zellvermittelten Immunantworten (Schroder et al., 2004). TNF- α und IFN- γ sind miteinander kombiniert worden, da sie synergistisch auf die intestinale epitheliale Barriere wirken und besonders beim M.Crohn in der Mukosa erhöhte Werte zu finden sind (Schmitz et al., 1999; Bruewer et al., 2003).

T84-Zellen, die mit TNF- α oder einer Kombinationsbehandlung aus TNF- α und IFN- γ inkubiert worden sind, zeigten - entgegen zuvor publizierten Daten - nur die Tendenz

eines TER-Abfalls. Es wurde dennoch der Frage nachgegangen, ob morphologische Veränderungen der TJ-Proteinbesetzung vorlagen. Bei den mit TNF- α behandelten Zellfiltern zeigte sich jedoch bezüglich der untersuchten TJ-Proteine (ZO-1, Claudin-1, Claudin-2) kein Unterschied zu den Kontrollen.

Dies ist im Widerspruch zu einer Reihe von Publikationen. In der Literatur ist ein Abfall des transepithelialen Widerstandes nach TNF- α -Exposition von Darmepithelien wie HT-29/B6 beschrieben (Schmitz et al., 1999; Mankertz et al., 2009; 2000). Morphologisch geht dieser mit einer Verringerung der TJ-Stränge und einer verminderten Höhenausdehnung der TJ einher (Schmitz et al., 1999). Dies war hier in unserer aktuellen Arbeit an T84-Zellen nicht der Fall, möglicherweise da diese Zellen für dieses Zytokin weniger empfindlich sind. In der Arbeit von Peralter Soler et al. ist hingegen ebenfalls nach Behandlung mit TNF- α die morphologisch sichtbare epitheliale Integrität erhalten geblieben (Peralter Soler et al., 1996).

Poritz und Mitarbeiter beschreiben in IEC-18-Zellen, die über 48 h mit verschiedenen TNF- α -Konzentrationen behandelt wurden, einen Anstieg der Claudin-1-Expression. Statt an der Zellmembran fanden Poritz et al. das Claudin-1 vermehrt intrazellulär (Poritz et al., 2011). Dies erklärte aus Sicht der Autoren den scheinbaren Widerspruch, dass das in Western Blots verstärkt nachgewiesene Claudin-1, funktionell nicht zu einer Erhöhung des TER führte. Es ist ferner bekannt, dass TNF- α die Aufnahme von Occludin und Claudin-1 in die Epithelzelle induziert (Marchiando et al., 2011).

In Zellkultur-Experimenten an HT-29/B6-Zellen zeigte sich nach Inkubation mit TNF- α eine Reduktion des TER, der in Zwei-Wegeimpedanz-Versuchen einem Abfall des parazellulären und nicht des transzellulären Widerstands zugeordnet werden konnte und mit einem Expressionsanstieg des Kationenkanal-bildenden Claudin-2 einhergeht (Schmitz et al., 1999; Mankertz et al., 2009). Eine Veränderung der Claudin-2-Expression in der TJ oder eine verstärkte Anfärbbarkeit ist in unseren aktuellen Experimenten nach TNF- α -Inkubation jedoch ausgeblieben.

Ferner ist bekannt, dass TNF- α wie IL-1 β starke Induktoren der Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) sind. Diese phosphoryliert Myosin und aktiviert damit das Zytoskelett, was über indirekte Effekte auf die TJ zu einer erhöhten ionalen Permeabilität der intestinalen Barriere führt (Ye et al., 2006; Al-Sadi et al., 2008). Die Rolle des Zytoskeletts ist in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht worden.

Hinsichtlich der Expression von ZO-1 an der TJ-tragenden Membran fand sich unter TNF- α -Exposition keine Veränderung. Hier gibt es zwei gegensätzliche Studien. Zum

einen senkt IFN- γ in T84-Zellen den mRNA- und Proteinlevel von ZO-1 (Youakim & Ahdieh, 1999). Zum anderen zeigten Brüwer et al., dass IFN- γ kaum einen Einfluss auf die Verteilung und den Protein-Level von ZO-1, ϵ -Cadherin und β -Catenin hat (Bruewer et al., 2003). ZO-1 ist ein zytoplasmatisches Plaque-Protein und dient als Gerüst, an das sich andere TJ-Proteine wie Occludin, Claudine und JAM anlagern und interagiert ebenso mit dem Aktin-Zytoskelett (Bruewer et al., 2003).

5.2.2 Interleukin-22 (IL-22)

IL-22 ist als wichtiger Regulator der intestinalen Homöostase anzusehen und dient der Abwehr von Pathogenen durch Ausbildung und Aufrechterhaltung einer ausgewogenen Microbiota, eines intakten Epithels und eines funktionierenden Immunsystems. Bekannt ist, dass das intakte Epithel durch die Regulation der Genexpression über STAT3 Aktivierung gewahrt wird. So führt IL-22 zur Transkription von z.B. Anti-Apoptotischen und pro-proliferativen Genen wie birc5, pla2g5, smo, myc und myc 11 und antibakteriellen Genen (Schreiber et al., 2015; Mizoguchi, 2012).

Bei intestinalen Entzündungen schützt IL-22 das Epithel durch Stimulation der Mucin-1 Produktion und unterstützt die epitheliale Zell- und Becherzellregeneration (Mizoguchi, 2012). Des Weiteren ist IL-22 beim aktiven Morbus Crohn als auch bei aktiver Colitis ulcerosa erhöht. Interessanterweise ist der IL-22-Level bei Patienten mit aktivem Morbus Crohn stärker erhöht. Ferner korreliert der Serumspiegel mit der Aktivität der Erkrankung (Wolk et al., 2007).

In unseren Experimenten fand sich ein Widerstandsabfall 48 h nach Beginn der IL-22-Exposition der intestinalen Epithelzellen.

In der Immunfluoreszenzfärbung zeigte Claudin-1 eine verstärkte Präsenz an der Membran der Epithelzellen und intrazellulär. Die Expression von Claudin-1 und Claudin-2 ist bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erhöht (Weber et al., 2008), was mit der vorgefundenen verstärkten Präsenz von Claudin-1 in Einklang zu bringen ist, Claudin-2 zeigte sich in den untersuchten Zellfiltern allerdings unverändert.

Das TJ-Protein ZO-1, das am intrazellulären Bereich des apiko-lateralen Membranübergangs lokalisiert ist, war moderat verstärkt exprimiert und nicht mehr an der Zellmembran lokalisiert. Diese Lokalisationsänderung weist auf eine verminderte Integrität der TJ hin, was ein mutmaßliches Korrelat des IL-22-verursachten, funktionellen Barrieredefekts ist.

5.2.3 Interleukin-13 (IL-13)

IL-13 wird bei Colitis ulcerosa vermehrt produziert und hat aktuell an Beachtung gewonnen, da die IL-13-Expressions- und Funktionsinhibition bei der Behandlung der experimentellen Kolitis höchst erfolgreich ist. Phase-II-Studien sollen aktuell klären, inwieweit Therapiemöglichkeiten, die auf die T-Zellabhängigen-Zytokine abzielen, in der Therapie der Colitis ulcerosa von Vorteil sein können (Fuss et al., 2004, 2008; Neurath, 2014). Ein TER-Abfall 48h nach IL-13-Inkubation der intestinalen Epithelzellen in den Experimenten dieser Arbeit ließ sich nachweisen.

In der Literatur wird IL-13 als ein Zytokin beschrieben, dass einen TER-Abfall auslöst. Heller et al., führen dies auf eine vermehrte Claudin-2-Expression zurück, Claudin-2 wurde sowohl in der TJ exprimiert als auch intrazellulär in Vesikeln gefunden (Heller et al., 2005).

Außerdem löst IL-13 im intestinalen Epithel vermehrt Apoptosen aus, die Arbeitsgruppe um Heller et al. führen den beschriebenen TER-Abfall jedoch nicht ausschließlich auf Apoptosen zurück, da auch nach Behandlung mit dem Caspase-Inhibitor Z-VAD weiterhin ein TER-Abfall nachgewiesen werden konnte.

Dies bedeutet, dass der durch IL-13 induzierte TER-Abfall zum einen durch Apoptosen ausgelöst ist, zum anderen durch Änderung der TJ-Proteine. Auch wird die epitheliale Restitutionsgeschwindigkeit durch IL-13 gesenkt (Heller et al., 2005).

In HT-29/B6-Zellen zeigte sich ein Claudin-2-Expressionsanstieg, Claudin-1 und Claudin-4 blieben hingegen in Expression und Lokalisation unverändert (Heller et al., 2008). In dieser Arbeit ließ sich Claudin-2 nach IL-13-Inkubation unverändert zu den Kontrollen darstellen.

Anders als in der Literatur beschrieben, war die Claudin-1-Präsenz in der Tight Junction nicht unverändert, sondern vermindert, dies könnte den hoch signifikanten Widerstandsabfall erklären. Die TJ erstreckten sich nach der IL-13-Behandlung über eine größere Höhenausdehnung an der Plasmamembran, was für eine Regulation der TJ spricht.

ZO-1 ist an der apikalen Membran gefunden und dort stärker exprimiert als in den Kontrollen, ebenso ist es in intrazellulären Vesikeln und submembranal von der Zellmembran abgelöst darstellbar.

In den von Park et al. untersuchten humanen Podozyten zeigte sich eine ZO-1 Internalisierung mit Akkumulation im Zytoplasma und nach 24-stündiger Inkubation mit einer hohen IL-13-Dosis (50 und 100 ng/ml) ein herabgesetztes ZO-1-Level in den Western Blots (Park et al., 2015).

Bei den intestinalen Epithelzellen erfolgte nach IL-13-Behandlung eine Dynasore-Zugabe und dies ging mit einem Anstieg des transepithelialen Widerstands, der sich ebenfalls bei den Kontrollfiltern abzeichnete. Es zeigte sich in den Experimenten mit und ohne Dynasore-Zugabe, dass bei IL-22- und IL-13-verursachten Barrieredefekten Dynasore-erreichbare Mechanismen eher keine Rolle spielen, da sich die Zytokin- ausgelösten Effekte nicht durch Dynasore-Zugabe rückgängig machen ließen.

5.3 Limitationen der Arbeit

- (i) Zytokinexposition: Der im Experiment gefundene, zeitlich verzögerte Beginn der Zytokin-assoziierten Barrieredefekte erschwert die Differenzierung zwischen Endozytose-verursachten Effekten und der Änderung des Transkriptionslevels eines TJ-Proteins als Ursache.
- (ii) Endozytose-Inhibitoren: Diese können toxische Effekte in Langzeitexperimenten haben. Daher können sie nicht schon vor der Zytokinzugabe oder parallel mit den Zytokinen appliziert werden. Möglicherweise ist ein Zeitraum von 48 Stunden nach Beginn der Zytokininkubation zu spät, um einen Rescue des Zytokin-bedingt absinkenden TER durch Endozytoseinhibition erreichen zu können. Zudem inhibiert der Endozytosehemmer Pitstop-2 nicht nur die Clathrin-abhängige Endozytose, sondern Dutta et al. berichteten, dass Pitstop-2 nicht nur an die Aminogruppe von Clathrin bindet, sondern auch an andere zelluläre Ziele (Dutta et al., 2012). Daher kann Pitstop-2 nicht dafür verwendet werden, um spezifisch Clathrin-abhängige und Clathrin-unabhängige Endozytose zu unterscheiden. Ebenso inhibiert auch Dynasore nicht selektiv einen Endozytoseweg, sondern sowohl die Clathrin-abhängige Endozytose wie auch die Caveolae-abhängige Endozytose. Weitere Limitationen sind geringe Endzahlen. Bei Folgeexperimenten könnte zusätzlich zur Immunfluoreszenz die Analyse der TJ-Protein Expression mittels Western Blots erfolgen, was einen kompletteren Blick auf die Regulationseinflüsse ermöglichen würde.

- (iii) Zelllinien als Modellsystem: Als weitere Limitation kann die ausschließliche Verwendung von Zelllinien für unsere Untersuchungen genannt werden. Diese müssen nicht in jedem Fall wie humane Epithelzellen im Darm reagieren. So fehlt den Caco-2-Zellen z.B. Claudin-5. Ebenso wird von unseren eingesetzten Zelllinien keine Mucusschicht gebildet, die ebenfalls einen Einfluss auf die Permeabilität und die Barrierefunktion besitzt (Chen et al., 2010;

Amasheh et al., 2009) und von Zytokinen (z.B. IL-22) moduliert wird. Auf der anderen Seite gibt es keine Primärzellkulturen aus Darmepithelien, die auf Filtern hinsichtlich ihrer Barriereeeigenschaften untersucht werden kann. Und *in vivo*-Experimente an Tiermodellen können differenzierte Barriereuntersuchungen auch nicht leisten.

5.4 Potential der Forschung an TJ-Endozytose und Ausblick

Nach aktuellen Studienergebnissen scheinen TJ-Proteine eine weitreichende strukturelle und funktionelle Dynamik aufzuweisen, die dadurch zu Recht in den Forschungsmittelpunkt gelangt sind.

Die TJ-Proteine bieten einen potenziellen Ansatzpunkt für die kausale Therapie von Erkrankungen, denen eine Dysfunktion der epithelialen Barriere zugrunde liegt, beispielsweise Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Als Voraussetzung zur Entwicklung dieser therapeutischen Strategien gilt es, das Funktionsprinzip der selektiven und spezifischen Regulierung der TJ-Proteine weiter zu erforschen. Eine Schlüsselfunktion nimmt die Stabilisierung der TJ-Proteine in der Aufrechterhaltung der intestinalen Barriere ein, so dass Mechanismen der Endozytose-Hemmung Gegenstand zukünftiger Studien sein sollten. In einem Mausmodell mit induzierter Sepsis konnte gezeigt werden, dass der Zusatz der ‚long noncoding‘ RNA (lncRNA) SPRY4-IT1 auf die intestinale Mukosa zu einer Stärkung der epitheliale Barriere durch vermehrte Expression der TJ-Proteine Claudin-1, Claudin-3, Occludin und JAM-1 auf Grund Alterationen der Tight Junction- mRNA Translation führte. Interessanterweise konnte bereits bei Patienten mit erhöhter Darmpermeabilität eine Reduktion der lncRNA SPRY4-IT1 nachgewiesen werden, so dass auch die Gen-modifizierende Therapie einen Stellenwert in der Behandlung von Erkrankungen auf Grund einer gestörten epithelialen Barriere bekommen könnte (Xiao, et al. 2015). Einen weiteren Ansatzpunkt

bietet die Hormontherapie zur Erhöhung der TJ-Stabilität. In einer aktuellen Studie wurde demonstriert, dass in einem Hasen-Tiermodell ex vivo die ösophageale Barriere durch Erhöhung der Occludin-Expression durch 17β -Estradiol gestärkt werden kann (Honda, et al. 2015).

6. Zusammenfassung

Barriere- und Permeabilitätseigenschaften von Epithelien werden durch die epitheliale Tight Junction (TJ) bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurden an Caco-2-Zellen und Caco-2-Claudin-5-Zellen die Endozytose der TJ untersucht. Hierbei sollten zwei Endozytoseinhibitoren die Signifikanz von Endozytosevorgängen und verschiedene Endozytosewege für TJ-Proteine im Steady-State Level einer Zelle aufdecken. Des Weiteren wurde das Verhalten der epithelialen Barriere nach Zugabe proinflammatorischer Zytokine an T84-Zellen untersucht. Besonderes Augenmerk lag dabei darauf, ob die induzierten Effekte nur auf Transkriptionsänderung oder auch durch eine Aufnahme von TJ-Proteinen durch Endozytose basierten. Daher wurden sowohl frühe Effekte minutenweise untersucht sowie die Auslösung eines Rescues mittels Dynasorezugabe 48 h nach Behandlungsbeginn mit proinflammatorischen Zytokinen bestimmt. Die Integrität der epithelialen Barriere wurde anhand der Messung des transepithelialen Widerstands erfasst. Dieser wurde mit Hilfe der Ussing-Kammer und Chop-Stick-Elektroden gemessen und zur Erfassung des parazellulären Transports wurden Fluorescein-Flux-Versuche unter Steady-State-Bedingungen unternommen. Es konnte gezeigt werden, dass Endozytoseinhibitoren die epitheliale Barriere regulieren können. Im Speziellen fand sich, dass die Hemmung der großen GTPase Dynamin eine Verstärkung der epithelialen Barriere zur Folge hat, die aber ohne zusätzlichen Einfluss auf Zytokin-bedingte Barriereeffekte an der Tight Junction blieb. Dagegen verursachte eine Hemmung von Endozytoseprozessen mit Pitstop-2 keine Verbesserung, sondern eine Herabsetzung der Barrierefunktion für Ionen.

Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte parallel dazu eine Umverteilung bzw. veränderte Expression von TJ- und TJ-assoziierten Proteinen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Zellfilter unter dem Einfluss, der bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erhöhten, proinflammatorischen Zytokine untersucht. IL-13 und IL-22 führten zu einem Widerstandsabfall nach 48 h, TNF- α und die Kombinationsbehandlung aus TNF- α + IFN- γ blieben ohne TER-Effekt. Ein Effekt von Endozytoseinhibitoren ließ sich in der Ussing-Kammer nicht nachweisen.

7. Literaturverzeichnis

Agrawal V, Jaiswal MK, Mallers T, Katara GK, Gilman-Sachs A, Beaman KD, Hirsch E. Altered autophagic flux enhances inflammatory responses during inflammation-induced preterm labor. *Sci Rep* 2015;5:9410. doi:10.1038/srep09410.

Akbari O, Stock P, Meyer E, Kronenberg M, Sidobre S, Nakayama T, Taniguchi M, Grusby MJ, DeKruyff RH, Umetsu DT. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nature med* 2003;9:582-8.

Al-Sadi R, Boivin M, Ma T. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. *Front Biosci* 2009;14:2765-2778.

Al-Sadi R, Ye D, Dokladny K, Ma T. Mechanism of IL-1beta-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol* 2008;180:5653-5661.

Amasheh M, Grotjohann I, Amasheh S, Fromm A, Söderholm JD, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Regulation of mucosal structure and barrier function in rat colon exposed to tumor necrosis factor alpha and interferon gamma *in vitro*: a novel model for studying the pathomechanisms of inflammatory bowel disease cytokines. *Scand J Gastroenterol* 2009;44:1226-35.

Amasheh S, Meiri N, Gitter A, Schöneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci* 2002;115:4969-4976.

Amasheh S, Schmidt T, Mahn M, Florian P, Mankertz J, Tavalali S. Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell Tissue Res* 2005;321:89-96.

Amasheh S, Milatz S, Krug SM, Markov AG, Günzel D, Amasheh M, Fromm M. Tight junction proteins as channel formers and barrier builders: claudin-2, -5 and -8. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1165:211-9.

Apodaca G. Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic* 2001;2:149-159.

Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;175:880-5.

Baert FJ, Rutgeerts PR. Anti-TNF strategies in Crohn's disease: mechanisms, clinical effects, indications. *Int J Colorectal Dis* 1999;14:47-51.

Baumgart DC. The diagnosis and treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dtsch Arztebl Int* 2009;106:123-133.

Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Orsenigo F, Cordenonsi M, Citi S, Dejana E. Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem* 2000;275:20520-6.

Bishop NE. An update on non-clathrin-coated Endocytosis. *Rev Med Virol* 1997;7:199-209.

Blackburn MR, Lee CG, Young HW, Zhu Z, Chunn JL, Kang MJ, Banerjee SK, Elias JA. Adenosine mediates IL-13 induced inflammation and remodeling in the lung and interacts in an IL-13- adenosine amplification pathway. *J Clin Invest* 2003;112:332-44.

Blood PD, Voth GA. Direct observation of Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-induced membrane curvature by means of molecular dynamics simulations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:15068-72.

Bonifacino JS, Glick BS. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 2004;116.2:153-66.

Brand S, Beigel F, Olszak T, Zitzmann K, Eichhorst ST, Otte JM, Diepolder H, Marquardt A, Jagla W, Popp A, Leclair S, Herrmann K, Seiderer J, Ochsenkühn T, Göke B, Auernhammer CJ, Dambacher J. IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:827-38.

Brown KD, Zurawski SM, Mosmann TR, Zurawski G. A family of small inducible proteins secreted by leukocytes are members of a new superfamily that includes leukocyte and fibroblast-derived inflammatory agents, growth factors, and indicators of various activation processes. *J Immunol* 1989;142:679-687.

Brewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, Nusrat A. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis independent mechanisms. *J Immunol* 2003;171:6164-72.

Brewer M, Utech M, Ivanov AI, Hopkins AM, Parkos CA, Nusrat A. Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process. *FASEB J* 2005;19:923-33.

Bu P, Keshavarzian A, Stone DD, Liu J, Le PT, Fisher S, Qiao L. Apoptosis: one of the mechanisms that maintains unresponsiveness of the intestinal mucosal immune system. *J Immunol* 2001;166:6399-403.

Bucci C, Wandinger-Ness A, Lütcke A, Chiariello M, Bruni CB, Zerial M. Rab5a is a common component of the apical and basolateral endocytic machinery in polarized epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:5061-5.

Cao H, Garcia F, McNiven MA. Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 1998;9:2595-609.

Chen XM, Elisia I, Kitts DD. Defining conditions for the co-culture of Caco-2 and HT29-MTX cells using Taguchi design. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2010;61:334-42.

Chua J, Rikhy R, Lippincott-Schwartz J. Dynamin 2 orchestrates the global actomyosin cytoskeleton for epithelial maintenance and apical constriction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:20770-5.

Chung Y, Yang X, Chang SH, Ma L, Tian Q, Dong C. Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4⁺ T lymphocytes. *Cell Res* 2006;16:902-7.

Cunningham KE, Turner JR. Myosin light chain kinase: pulling the strings of epithelial tight junction function. *Ann NY Acad Sci* 2012;1258:34-42.

Coyne CB, Gambling TM, Boucher RC, Carson JL, Johnson LG. Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:1166-78.

Dharmasathaphorn K, McRoberts JA, Mandel KG, Tisdale LD, Masui H. A human colonic tumor cell line that maintains vectorial electrolyte transport. *Am J Physiol* 1984;246:204-8.

Dhawan P, Singh AB, Deane NG, No Y, Shiou SR, Schmidt C, Neff J, Washington MK, Beauchamp RD. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest* 2005;115:1765-76.

Dumoutier L, Louahed J, Renauld JC. Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. *J Immunol* 2000;164:1814-9.

Dutta D, Williamson CD, Cole NB, Donaldson JG. Pitstop 2 is a potent inhibitor of clathrin-independent endocytosis. *PLoS One* 2012;7(9):e45799.

Ebnet K, Suzuki A, Ohno S, Vestweber D. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci* 2004;117:19-29.

Elliott KA, Osna NA, Scofield MA, Khan MM. Regulation of IL-13 production by histamine in cloned murine T helper type 2 cells. *Int Immunopharmacol* 2001;1:1923-37.

Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 1963;17:375-412.

Flesch IE, Hess JH, Huang S, Aguet M, Rothe J, Bluethmann H, Kaufmann SH. Early interleukin 12 production by macrophages in response to mycobacterial infection depends on interferon gamma and tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1995;181:1615-1621.

Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;115:182-205.

Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG. De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8655-9.

Fujita M, Reinhart F, Neutra M. Convergence of apical and basolateral endocytic pathways at apical late endosomes in absorptive cells of suckling rat ileum in vivo. *J Cell Sci* 1990;97:385-94.

Fukao, T, Matsuda S, Koyasu S. Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells. *J Immunol* 2000;164:64-71.

Furuse M, Fujita K, Hiiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 1998;141:1539-50.

Furuse M, Furuse H, Sasaki S, Tsukita S. Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby-canine-kidney I cells. *J Cell Biol* 2001;153:236-272.

Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 2002;156:1099-111.

Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 1993;123:1777-88.

Furuse M, Sasaki H, Tsukita S. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol* 1999;147:891-903.

Furuse M, Tsukita S. Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol* 2006;16:181-8.

Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004;113:1490-7.

Fuss IJ, Strober W. The role of IL-13 and NK T cells in experimental and human ulcerative colitis. *Mucosal Immunol* 2008;1:31-33.

Galbiati F, Razani B, Lisanti MP. Caveolae and caveolin-3 in muscular dystrophy. *Trends Mol Med* 2001;7:435-441.

Garg A, Agarwal AK. Caveolin-1: a new locus for human lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1183-5.

Gibson A, Futter CE, Maxwell S, Allchin EH, Shipman M, Kraehenbuhl JP, Domingo D, Odorizzi G, Trowbridge IS, Hopkins CR. Sorting mechanisms regulating membrane protein traffic in the apical transcytotic pathway of polarized MDCK cells. *J Cell Biol* 1998;143:81-94.

Gitter AH, Bendfeld K, Schulzke JD, Fromm M. Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis. *FASEB J* 2000;14:1749-53.

Goldstein JL, Anderson RG, Brown MS. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature* 1979;279:679-85.

Goldstein JL, Brown MS, Anderson RG, Russell DW, Schneider WJ. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol* 1985;1:1-39.

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6:1123-32.

Heller F, Fromm A, Gitter AH, Mankertz J, Schulzke JD. Epithelial apoptosis is a prominent feature of the epithelial barrier disturbance in intestinal inflammation: effect of pro-inflammatory interleukin-13 on epithelial cell function. *Mucosal Immunol* 2008;1:58-61.

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

Hernandez-Pando R, Rook GA. The role of TNF-alpha in T-cell mediated inflammation depends on the Th 1/Th2 cytokine balance. *Immunology* 1994;82:591-5.

Hoffmann JC, Preiß JC, Autschbach F, Buhr HJ, Häuser W, Herrlinger K, Höhne W, Koletzko S, Kriegelstein CF, Kruis W, Matthes H, Moser G, Reinshagen M, Rogler G, Schreiber S, Schreyer AG, Sido B, Siegmund B, Stallmach A, Bokemeyer B, Stange EF, Zeitz M. S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn“ Ergebnisse einer Evidenz-basierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten zusammen mit dem Kompetenznetz Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. *Z Gastroenterol* 2008;46:1094-146.

Holtmann MH, Douni E, Schütz M, Zeller G, Mudter J, Lehr HA, Gerspach J, Scheurich P, Galle PR, Kollias G, Neurath MF. Tumor necrosis factor-receptor 2 is up-regulated on lamina propria T cells in Crohn's disease and promotes experimental colitis in vivo. *Eur J Immunol* 2002;32:3142-51.

Honda J, Iijima K, Asanuma K, Ara N, Shiroki T, Kondo Y, Hatta W, Uno K, Asano N, Koike T, Shimosegawa T. Estrogen Enhances Esophageal Barrier Function by Potentiating Occludin Expression. *Dig Dis Sci* 2015; 10.1007/s10620-015-3980-6

Hurst SD, Muchamuel T, Gorman DM, Gilbert JM, Clifford T, Kwan S, Menon S, Seymour B, Jackson C, Kung TT, Brieland JK, Zurawski SM, Chapman RW, Zurawski G, Coffman RL. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *J Immunol* 2002;169:443-53.

Hölttä V, Klemetti P, Sipponen T, Westerholm-Ormio M, Kociubinski G, Salo H, Räsänen L, Kolho KL, Färkkilä M, Savilahti E, Vaarala O. IL-23/IL-17 immunity as a hallmark of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:1175-84.

Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 2005;171:939-45.

Ikenouchi J, Sasaki H, Tsukita S, Furuse M. Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. *Mol Biol Cell* 2008;19:4687-93.

Ina K, Itoh J, Fukushima K, Kusugami K, Yamaguchi T, Kyokane K, Imada A, Binion DG, Musso A, West GA, Dobrea GM, McCormick TS, Lapetina EG, Levine AD, Ottaway CA, Fiocchi C. Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/ Bax mucosal imbalance. *J Immunol* 1999;163:1081-90.

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

Itoh M, Furuse M, Morita K, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 1999;147:1351-63.

Ivanov AI, Nusrat A, Parkos CA. Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment. *Mol Biol Cell* 2004;15:176-88.

Ivanov I, Nusrat A, Parkos CA. Endocytosis of the apical junctional complex: mechanisms and possible roles in regulation of epithelial barriers. *Bioessays* 2005;27:356-65.

Janeway CA Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 1992;13:11-6.

Jain S, Suzuki T, Seth A, Samak G, Rao R. PKCzeta phosphorylates occludin and promotes assembly of epithelial tight junctions. *Biochem J* 2011;437:289-99.

Keen JH, Beck KA. Identification of the clathrin-binding domain of the assembly protein AP-2. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;158:17-23.

Kim C, Bergelson JM. Echovirus 7 entry into polarized intestinal epithelial cells requires clathrin and Rab7. *MBio* 2012;3:00304-11.

Kinugasa T, Huo Q, Higashi D, Shibaguchi H, Kuroki M, Tanaka T, Futami K, Yamashita Y, Hachimine K, Maekawa S, Nabeshima K, Iwasaki H, Kuroki M. Selective up-regulation of claudin-1 and claudin-2 in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2007;27:3729-34.

Krug SM, Amasheh S, Richter JF, Milatz S, Güntzel D, Westphal JK, Huber O, Schulzke JD, Fromm M. Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol Biol Cell* 2009;37:3713-3724.

Kucharzik T, Walsh SV, Chen J, Parkos CA, Nusrat A. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *Am J Pathol* 2001;159:2001-9.

Langer JA, Cutrone EC, Kotenko S. The Class II cytokine receptor (CRF2) family: overview and patterns of receptor-ligand interactions. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:33-48.

Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, Ferguson SS, Caron MG, Barak LS. The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3712-7.

Leung JM, Davenport M, Wolff MJ, Wiens KE, Abidi WM, Poles MA, Cho I, Ullman T, Mayer L, Loke P. IL-22-producing CD4+ cells are depleted in actively inflamed colitis tissue. *Mucosal Immunol* 2014;7:124-133.

Li H, Sheppard DN, Hug MJ. Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber. *J Cyst Fibro* 2004;3:123-6.

Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th 17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006;203:2271-9.

Liashkovich I, Pasrednik D, Prystopiuk V, Rosso G, Oberleithner H, Shahin V. Clathrin inhibitor Pitstop-2 disrupts the nuclear pore complex permeability barrier. *Sci Rep* 2015;5:9994.

Liu Y, Nusrat A, Schnell FJ, Reaves TA, Walsh S, Pochet M, Parkos CA. Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci* 2000;113:2363-74.

MacDonald TT, Hutchings P, Choy MY, Murch S, Cooke A. Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine. *Clin Exp Immunol* 1990;81:301-5.

Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell* 2006;10:839-50.

Madara JL, Stafford J, Barenberg D, Carlson S. Functional coupling of tight junctions and microfilaments in T84 monolayers. *Am J Physiol* 1988;254:416-23.

Mandell KJ, Parkos CA. The JAM family of proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:857-67.

Mankertz J, Amasheh M, Krug SM, Fromm A, Amasheh S, Hillenbrand B, Tavalali S, Fromm M, Schulzke JD. TNFalpha up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Cell Tissue Res* 2009;336:67-77.

Mankertz J, Tavalali S, Schmitz H, Mankertz A, Riecken EO, Fromm M, Schulzke JD. Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. *J Cell Sci* 2000;113:2085-90.

Marchiando AM, Shen L, Graham WV, Edelblum KL, Duckworth CA, Guan Y, Montrose MH, Turner JR, Watson AJ. The epithelial barrier is maintained by in vivo tight junction expansion during pathologic intestinal epithelial shedding. *Gastroenterology* 2011;140:1208-1218.

Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 1998;142:117-27.

McCarthy KM, Skare IB, Stankewich MC, Furuse M, Tsukita S, Rogers RA, Lynch RD, Schneeberger EE. Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci* 1996;109:2287-98.

McMahon HT, Gallop JL. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* 2005;438:590-6.

Meunier V, Bourrie M, Berger Y, Fabre G. The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol Toxicol* 1995;11:187-94.

Michikawa H, Fujita-Yoshigaki J, Sugiya H. Enhancement of barrier function by overexpression of claudin-4 in tight junctions of submandibular gland cells. *Cell Tissue Res* 2008;334:255-64.

Milatz S, Krug SM, Rosenthal R, Günzel D, Müller D, Schulzke JD, Amasheh S, Fromm M. Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochim Biophys Acta* 2010;1798:2048-57.

Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, Labit C, Leplatois P, Liauzun P, Miloux B, et al. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature* 1993;362:248-50.

Mizoguchi A. Healing of intestinal inflammation by IL-22. *Inflamm Bowel Dis* 2012;18:1777-84.

Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR. *Endocytosis Physiol Rev* 1997;77:759-803.

Neuman MG. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Transl Res* 2007;149:173-86.

Neurath MF. New targets for mucosal healing and therapy in inflammatory bowel diseases. *Mucosal Immunol* 2014;7:6-19.

Nichols BJ, Lippincott-Schwartz J. Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol* 2001;11:406-12.

Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* 2003;161:653-60.

Norouziyan F, Shen WC, Hamm-Alvarez SF. Tyrphostin A8 stimulates a novel trafficking pathway of apically endocytosed transferrin through Rab11- enriched compartments in Caco-2 cells. *AM J Physiol Cell Physiol* 2008;294:7-21.

Oh P, Horner T, Witkiewicz H, Schnitzer JE. Endothelin induces rapid, dynamin-mediated budding of endothelial caveolae rich in ET-B. *J Biol Chem* 2012;287:17353-62.

Ott C, Obermeier F, Thielers S, Kemptner D, Bauer A, Schölmerich J, Rogler G, Timmer A. The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008;20:917-23.

Palade GE. Fine structure of blood capillaries. *J Appl Phys* 1953;24:1424.

Park SJ, Saleem MA, Nam JA, Ha TS, Shin JI. Effects of interleukin-13 and montelukast on the expression of zonula occludens-1 in human podocytes. *Yonsei Med J* 2015;56:426-32.

Peralta Soler A, Mullin JM, Knudsen KA, Marano CW. Tissue remodeling during tumor necrosis factor-induced apoptosis in LLC-PK1 renal epithelial cells. *Am J Physiol* 1996;270:869-79.

Pilch PF, Liu L. Fat caves: caveolae, lipid trafficking and lipid metabolism in adipocytes. *Trends Endocrinol Metab* 2011;22:318-24.

Pirzer U, Schönhaar A, Fleischer B, Hermann E, Meyer zum Büschenfelde KH. Reactivity of infiltrating T lymphocytes with microbial antigens in Crohn's disease. *Lancet* 1991;338:1238-9.

Poliak S, Matlis S, Ulmer C, Scherer SS, Peles E. Distinct claudins and associated PDZ proteins form different autotypic tight junctions in myelinating Schwann cells. *J Cell Biol* 2002;159:361-72.

Poritz LS, Harris LR 3rd, Kelly AA, Koltun WA. Increase in the tight junction protein claudin-1 in intestinal inflammation. *Dig Dis Sci* 2011;56:2802-9.

Powell DW. Barrier function of epithelia. *Am J Physiol* 1981;241:275-88.

Prasad S, Mingrino R, Kaukinen K, Hayes KL, Powell RM, MacDonald TT, Collins JE. Inflammatory processes have differential effects on claudin 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab Invest* 2005;85:1139-62.

Preta G, Cronin JG, Sheldon IM. Dynasore-not just a dynamin inhibitor. *Cell Commun Signal* 2015;13:24.

Rahner C, Mitic LL, Anderson JM. Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver pancreas and gut. *Gastroenterology* 2001;120:411-22.

Raleigh DR, Marchiando AM, Zhang Y, Shen L, Sasaki H, Wang Y, Long M, Turner JR. Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. *Mol Biol Cell* 2010;21:1200-13.

Renauld JC. Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators. *Nat Rev Immunol* 2003;3:667-76.

Reyes JL, Lamas M, Martin D, del Carmen Namorado M, Islas S, Luna J, Tauc M, González-Mariscal L. The renal segmental distribution of claudins changes with development. *Kidney Int* 2002;62:476-487.

Riazuddin S, Ahmed ZM, Fanning AS, Lagziel A, Kitajiri S, Ramzan K, Khan SN, Chattaraj P, Friedman PL, Anderson JM, Belyantseva IA, Forge A, Riazuddin S, Friedman TB. Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. *Am J Hum Genet* 2006;79:1040-51.

Rosenthal R, Milatz S, Krug SM, Oelrich B, Schulzke JD, Amasheh S, Günzel D, Fromm M. Claudin-2, a component of tight junction, forms a paracellular water channel. *J Cell Sci* 2010;123:1913-21.

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

Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto- Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14:4280-8.

Sawada N, Murata M, Kikuchi K, Osanai M, Tobioka H, Kojima T, Chiba H. Tight junctions and human diseases. *Med Electron Microsc* 2003;36:147-56.

Schmechel S, Konrad A, Diegelmann J, Glas J, Wetzke M, Paschos E, Lohse P, Göke B, Brand S. Linking genetic susceptibility to Crohn's disease with Th17 cell function: IL-22 serum levels are increased in Crohn's disease and correlate with disease activity and IL23R genotype status. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:204-12.

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

Schnatwinkel C, Christoforidis S, Lindsay MR, Uttenweiler-Joseph S, Wilm M, Parton RG, Zerial M. The Rab5 effector Rabankyrin-5 regulates and coordinates different endocytic mechanisms. *PLoS Biol* 2004;9:261.

Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;286:1213-28.

Schindler H, Lutz MB, Röllinghoff M, Bogdan C. The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. *J Immunol* 2001;166:3075-82.

- Schreiber F, Arasteh JM, Lawley TD. Pathogen resistance mediated by IL-22 signaling at the epithelial-microbiota interface. *J Mol Biol* 2015;427:3676-3682.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004;75:163-89.
- Schulzke JD, Gitter AH, Mankertz J, Spiegel S, Seidler U, Amasheh S, Saitou M, Tsukita S, Fromm M. Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim Biophys Acta Biomembranes* 2005;1669:34-42.
- Schumann M, Richter JF, Wedell I, Moos V, Zimmermann-Kordmann M, Schneider T, Daum S, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)-gliadin-33mer in coeliac sprue. *Gut* 2008;57:747-54.
- Schwarz BT, Wang F, Shen L, Clayburgh DR, Su L, Wang Y, Fu YX, Turner JR. LIGHT signals directly to intestinal epithelia to cause barrier dysfunction via cytoskeletal and endocytic mechanisms. *Gastroenterology* 2007;137:2383-94.
- Sen GC. Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol* 2001;55:255-81.
- Shpetner HS, Herskovits JS, Vallee RB. A binding site for SH3 domains targets dynamin to coated pits. *J Biol Chem* 1996;271:13-6.
- Silvis MR, Bertrand CA, Ameen N, Golin-Bisello F, Butterworth MB, Frizzell RA, Bradbury NA. Rab11b regulates the apical recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in polarized intestinal epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2009;20:2237-50.
- So AL, Small G, Sperber K, Becker K, Oei E, Tyorkin M, Mayer L. Factors affecting antigen uptake by human intestinal epithelial cell lines. *Dig Dis Sci* 2000;45:1130-7.
- Stockmann M, Fromm M, Riecken EO, Schulzke JD. Non-malabsorptive mechanisms of diarrhea in HIV infection. *Pathobiol* 1998;66:165-9.
- Strober W, Fuss IJ. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011;140:1756-67.
- Suzuki T, Elias BC, Seth A, Shen L, Turner JR, Giorgianni F, Desiderio D, Guntaka R, Rao R. PKC eta regulates occludin phosphorylation and epithelial tight junction integrity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:61-6.
- Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell Mol Life Sci* 2013;70:631-59.
- Sweitzer SM, Hinshaw JE. Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* 1998;93:1021-9.
- Temann UA, Ray P, Flavell RA. Pulmonary overexpression of IL-9 induces Th2 cytokine expression, leading to immune pathology. *J Clin Invest* 2002;109:29-39.

Tsukita S, Furuse M. Overcoming barriers in the study of tight junction: from occludin to claudin. *Genes Cells* 1998;3:569-73.

Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:285-93.

Turner JR, Rill BK, Carson SL, Carnes D, Kerner R, Mrsny RJ, Madara JL. Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation. *Am J Physiol* 1997;273:1378-85.

Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, Matsui T, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* 2006;126:741-54.

Ungewickell EJ, Hinrichsen L. Endocytosis: clathrin-mediated membrane budding. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:417-25.

Ussing HH, Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 1951;23:110-127.

Utech M, Mennigen R, Bruewer M. Endocytosis and Recycling of Tight Junction Proteins in Inflammation. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:484987. doi: 10.1155/2010/484987

Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest* 2001;107:1319-27.

Van Itallie CM, Fanning AS, Holmes J, Anderson JM. Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers. *J Cell Sci* 2010;123:2844-52.

von Kleist L, Stahlschmidt W, Bulut H, Gromova K, Puchkov D, Robertson MJ, MacGregor KA, Tomilin N, Pechstein A, Chau N, Chircop M, Sakoff J, von Kries JP, Saenger W, Kräusslich HG, Shupliakov O, Robinson PJ, McCluskey A, Haucke V. Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition. *Cell* 2011;146:471-484.

Wang F, Daugherty B, Keise LL, Wei Z, Foley JP, Savani RC, Koval M. Heterogeneity of claudin expression by alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29:62-70.

Wang F, Graham WV, Wang Y, Witkowski ED, Schwarz BT, Turner JR. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *Am J Pathol* 2005;166:409-419.

Wang YD, Mao JW. Expression of matrix metalloproteinase-1 and tumor necrosis factor-alpha in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2007;13:5926-32.

Weber CR, Nalle SC, Tretiakova M, Rubin DT, Turner JR. Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. *Lab Invest* 2008;88:1110-20.

Wilcz-Villega EM, McClean S, O'Sullivan MA. Mast cell tryptase reduces junctional adhesion molecule-A (JAM-A) expression in intestinal epithelial cells: implications for the mechanisms of barrier dysfunction in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol.* 2013;108:1140-51.

Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 2004;21:241-54.

Wolk K, Witte E, Hoffmann U, Doecke WD, Endesfelder S, Asadullah K, Sterry W, Volk HD, Wittig BM, Sabat R. IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease. *J Immunol* 2007;178:5973-81.

Xiao L, Rao JN, Cao S, Liu L, Chung HK, Zhang Y, Zhang J, Liu Y, Gorospe M, Wang JY. Long Noncoding RNA SPRY4-IT1 regulates intestinal epithelial barrier function by modulating the expression levels of tight junction proteins. *Mol Biol Cell* 2015;E15-10-0703.

Xie MH, Aggarwal S, Ho WH, Foster J, Zhang Z, Stinson J, Wood WI, Goddard AD, Gurney AL. Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *J Biol Chem* 2000;275:31335-9.

Yamamoto-Furusho JK. Innovative therapeutics for inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007;13:1893-6.

Ye D, Ma I, Ma TY. Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:496-504.

Youakim A, Ahdieh M. Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin. *Am J Physiol* 1999;276:1279-88.

Young A. Structural insights into the clathrin coat. *Semin Cell Dev Biol* 2007;18:448-58.

Yu D, Turner JR. Stimulus-induced reorganization of tight junction structure: the role of membrane traffic. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778:709-16.

Zacchi P, Stenmark H, Parton RG, Orioli D, Lim F, Giner A, Mellman I, Zerial M, Murphy C. Rab17 regulates membrane trafficking through apical recycling endosomes in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 1998;140:1039-53.

Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. 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* 2007;56:61-72.

Zerial M, Mc Bride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:107-17.

Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, Ouyang W. Interleukin-22, a T(H) 17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 2007;445:648-51.

8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Marie-Luise Pahlitzsch, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Endozytose von „Tight junction“-Strukturproteinen in intestinalen Epithelzellen und die Auswirkung von Zytokinen auf die epitheliale Barriere selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum, Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Marie-Luise Pahlitzsch hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Defective tight junctions in refractory celiac disease

Schumann M, Kamel S, Pahlitzsch ML, Lebenheim L, May C, Krauss M, Hummel M, Daum S, Fromm M, Schulzke JD.

Ann N Y Acad Sci. 2012 Jul;1258:43-51

Beitrag im Einzelnen: Durchführung von Widerstandsmessungen unter Zugabe von Endozytoseinhibitor Dynasore in der Ussing-Kammer an Caco-2-Zellen.

Datum, Unterschrift und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Datum, Unterschrift der Doktorandin

9. Lebenslauf

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

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

10. Danksagung

Prof. Dr. Jörg Schulzke möchte ich für die Vergabe dieses Themas danken, dafür dass seine Tür über all die Jahre offen stand und die stets schnelle Beantwortung all meiner Fragen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Michael Schumann für die hervorragende Betreuung, seine Geduld, seine Hilfsbereitschaft und die viele Zeit, die er für die Entstehung dieser Arbeit geopfert hat. Mit seinem Wissen und Einfallsreichtum hat er mich bis zum Schluss am Ball gehalten.

Bei Lydia Lebenheim möchte ich mich ebenso bedanken für ihre große Hilfe an unterschiedlichen Stellen dieser Arbeit, dass sie immer mit Rat und Tat und ihrem Organisationstalent zur Seite stand.

Dipl. Ing. grad. Detlef Sorgenfrei, der leider 2014 verstorben ist, danke ich dafür, dass er immer wieder für einen einwandfreien Versuchsablauf gesorgt hat.

Weiter, danke ich allen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für Klinische Physiologie - insbesondere Britta Jebautzke - die mir die Arbeit in diesem Labor durch die Weitergabe ihres Fachwissens und Hilfe in jeder erdenklichen Form erleichtert haben.

Unendlich dankbar bin ich meinem Freund, der über all die Zeit fest an meiner Seite stand und mich stets unterstützt hat.

Meiner Schwester möchte ich ebenfalls danken.

Meinen Eltern danke ich für die Zeit, die sie mir für diese Arbeit eingeräumt haben und für die gesamte Unterstützung während des Studiums.

Der Familie Choe/Kim bin ich außerdem für die Motivation in schwierigen Phasen dankbar.