

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

DISSERTATION

Regulation und Funktion des Tight Junction-Proteins
MarvelD3

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Carolina Czichos

aus Berlin

- Datum der Promotion: 3. Dezember 2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	4
Abstract (Deutsch)	6
Abstract (English)	8
1 Einleitung	10
1.1 Epithelien	10
1.2 Tight Junctions	12
1.3 Tight Junction-Proteine	14
1.3.1 Claudine	15
1.3.2 Tight Junction-assoziierte MARVEL-Proteine (TAMP).....	17
1.3.2.1 Occludin	18
1.3.2.2 Tricellulin	19
1.3.2.3 MarvelD3	20
1.4 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	22
1.4.1 Morbus Crohn.....	23
1.4.2 Colitis ulcerosa	24
1.4.3 Überblick über die Diagnostik und Therapie der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen	24
1.4.4 Rolle der Zytokine in der Pathophysiologie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen	25
2 Zielsetzung	31
3 Material und Methoden	32
3.1 Materialien	32
3.1.1 Zelllinien	32
3.1.1.1 HT-29/B6-Zellen.....	32
3.1.1.2 MDCK-Zellen.....	32
3.1.2 Chemikalien.....	33
3.1.3 Puffer und Lösungen	35
3.1.4 Geräte	38
3.1.5 Verbrauchsmaterialien	38
3.1.6 Programme zur Datenerhebung und -auswertung	39
3.2 Molekularbiologische Methoden	40
3.2.1 Proteinextraktion aus Zellmonolayern	40
3.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung	40
3.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	41
3.2.4 Western Blot.....	42
3.2.5 Immunfluoreszenzfärbung.....	44

3.2.6 Umklonierung in einen Expressionsvektor	45
3.2.6.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	45
3.2.6.2 Agarosegelelektrophorese	47
3.2.6.3 PCR-Gelextraktion	47
3.2.6.4 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung	48
3.2.6.5 Ligation in einen Expressionsvektor.....	49
3.2.7 Transformation	50
3.2.8 Plasmidisolierung	51
3.2.9 Sequenzierung	52
3.2.10 Glycerolstocks	53
3.3 Zellkultur	54
3.3.1 Zellkultur allgemein	54
3.3.2 Transfektion.....	54
3.3.3 Inkubation der HT-29/B6-Zellen mit Zytokinen.....	56
3.4 Elektrophysiologische Methoden	57
3.4.1 Widerstandsmessung in der Ussing-Kammer	57
3.4.2 Dilutionspotentialmessung in der Ussing-Kammer.....	59
3.4.3 Widerstandsmessung mit Chopstickelektroden	60
3.5 Auswertung und Statistik	61
4 Ergebnisse.....	62
4.1 Einfluss CED-relevanter Zytokine auf den TER und die MarvelD3-Expression	
von HT-29/B6-Zellen	62
4.1.1 Tumornekrosefaktor α (TNF α).....	64
4.1.2 Interferon γ (IFN γ)	65
4.1.3 Interleukin 1 α (IL-1 α).....	66
4.1.4 Transforming Growth Factor β 1 und 2 (TGF β 1 und TGF β 2)	67
4.1.5 Interleukin-4 (IL-4)	68
4.1.6 Interleukin-13 (IL-13).....	69
4.1.7 IL-4 + IL-13	70
4.1.8 Claudin 2-Expression von HT-29/B6-Zellen nach der Inkubation mit IL-4,	
IL-13 und deren Kombination.....	71
4.2 Überexpression von MarvelD3 in MDCK-Zellen	72
4.2.1 Überprüfung der Transfektion der MDCK-Zellen.....	72
4.2.2 Überexpression von MarvelD3 in MDCK II-Zellen.....	72
4.2.2.1 Tight Junction-Proteinexpressionsprofil der MarvelD3-Überexpressionsklone	
und der dazugehörigen Vektorkontrollen	72
4.2.2.2 Ausschluss der Vektorkontrolle Vec14 aus der Auswertung.....	74
4.2.2.3 Lokalisationsanalyse von MarvelD3 in MDCK II-Zellen.....	76

4.2.2.4 Einfluss von MarvelD3 auf den transepithelialen Widerstand und die Permeabilität: Widerstands- und Dilutionspotentialmessung in MDCK II-Zellen	77
4.2.3 Überexpression von MarvelD3 in MDCK I-Zellen.....	80
4.2.3.1 Tight Junction-Proteinexpressionsprofil der MarvelD3-Überexpressionsklone MD3#4 und MD3#8 und deren Vektorkontrollen Vec2 und Vec3	80
4.2.3.2 Lokalisationsanalyse von MarvelD3 in MDCKI-Zellen.....	82
4.2.3.3 Einfluss von MarvelD3 auf den transepithelialen Widerstand und die Permeabilität: Widerstands- und Dilutionspotentialmessung in MDCK I-Zellen	83
5 Diskussion	85
5.1 Bedeutung von Zytokinen, veränderter Tight Junction-Proteinexpression und MarvelD3 für die Pathophysiologie der CED	85
5.2 Zytokine und Tight Junctions	89
5.3 Auswirkung von Zytokinen auf den TER von HT-29/B6-Zellen und anderen epithelialen Zelllinien	90
5.4 Auswirkung von Zytokinen auf die Expression von MarvelD3 und anderen Tight Junction-Proteinen.....	95
5.5 Auswirkung der MarvelD3-Überexpression auf die Widerstands- und Dilutionspotentialmessungen in MDCK II-Zellen	97
5.6 Erhöhte Claudin 2-Expression in MarvelD3-Überexpressionsklonen der Zelllinie MDCK II	99
5.7 Eignung der MarvelD3-Überexpression in den Zelllinien MDCK I und II zur Untersuchung der Funktion von MarvelD3	101
5.8 Auswirkung der MarvelD3-Überexpression auf die Widerstands- und Dilutionspotentialmessungen in MDCK I-Zellen	103
5.9 Limitationen	104
5.10 Schlussfolgerung	105
Literaturverzeichnis	107
Eidesstattliche Versicherung.....	120
Curriculum Vitae	121
Publikationsliste	123
Danksagung	124

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Zellkontakte in Epithelien	11
Abb. 2: Tight Junctions	14
Abb. 3: Schematische Darstellung der Tetraspan-Proteine der Tight Junction.....	15
Abb. 4: Schematische Darstellung der Pathophysiologie der CED	28
Abb. 5: Vektorkarte des Expressionsvektors p3XFLAG-CMV-10	50
Abb. 6: Schematische Abbildung einer Ussing-Kammer.....	58
Abb. 7: Western Blot nach Inkubation von HT-29/B6-Zellen mit TNF α	64
Abb. 8: TER und MarvelD3-Expression von HT-29/B6-Zellen nach Inkubation mit TNF α	64
Abb. 9: Western Blot nach Inkubation von HT-29/B6-Zellen mit IFN γ und IL-1 α	65
Abb. 10: TER und MarvelD3-Expression von HT-29/B6-Zellen nach Inkubation mit IFN γ ...	65
Abb. 11: TER und MarvelD3-Expression von HT-29/B6-Zellen nach Inkubation mit IL-1 α ...	66
Abb. 12: Western Blot nach Inkubation von HT-29/B6-Zellen mit TGF β 1, TGF β 2 und IFN γ	67
Abb. 13: TER und MarvelD3-Expression von HT-29/B6-Zellen nach Inkubation mit TGF β 1 und 2	67
Abb. 14: Western Blot nach Inkubation von HT-29/B6-Zellen mit IL-4, IL-13 und IL-4+IL-13	68
Abb. 15: TER und MarvelD3-Expression von HT-29/B6-Zellen nach Inkubation mit IL-4.	68
Abb. 16: TER und MarvelD3-Expression von HT-29/B6-Zellen nach Inkubation mit IL-13 ...	69
Abb. 17: TER und MarvelD3-Expression von HT-29/B6-Zellen nach gleichzeitiger Inkubation mit IL-4 und IL-13.....	70
Abb. 18: Claudin 2-Expression von HT-29/B6-Zellen nach Inkubation mit IL-4, IL-13 und IL-4+IL-13	71
Abb. 19: Western Blot der transfizierten MDCK-Zellen mit dem Antikörper mFLAG	72
Abb. 20: Densitometrische Auswertung der Western Blots zur Charakterisierung der Vektorkontrolle und der MarvelD3-Überexpressionsklone der Zelllinie MDCK II ...	73
Abb. 21: Exemplarische Western Blots zur Charakterisierung der Vektorkontrollen und der MarvelD3-Überexpressionsklone der Zelllinie MDCK II	74
Abb. 22: Claudin 2-Expression der Vektorkontrollen und der MarvelD3- Überexpressionsklone der Zelllinie MDCK II	75
Abb. 23: Immunfluoreszenzbilder der Vektorkontrolle und der MarvelD3-Überexpressions- klone der Zelllinie MDCK II	76
Abb. 24: TER-Messung der Vektorkontrolle und MD3-Überexpressionsklone der Zelllinie MDCK II in der Ussing-Kammer.....	77
Abb. 25: Dilutionspotentialmessungen der Vektorkontrolle und MarvelD3-Überexpressions- klone der Zelllinie MDCK II	78

Abb. 26: Verhältnis der Permeabilitäten für Na ⁺ und Cl ⁻ der Vektorkontrolle Vec 12 und MarvelD3-Überexpressionsklone der Zelllinie MDCK II	79
Abb. 27: Verhältnis der Permeabilitäten für Na ⁺ und Cl ⁻ der Vektorkontrollen Vec 12 und Vec 14 und MarvelD3-Überexpressionsklone der Zelllinie MDCK II ...	79
Abb. 28: Western Blot-Charakterisierung der Vektorkontrollen und MarvelD3- Überexpressionsklone der Zelllinie MDCK I	81
Abb. 29: Exemplarische Western Blots zur Charakterisierung der Vektorkontrollen und MarvelD3-Überexpressionsklone der Zelllinie MDCK I	82
Abb. 30: Immunfluoreszenzbilder des MarvelD3-Überexpressionsklons MD3#8 der Zelllinie MDCK I.....	82
Abb. 31: TER-Messung der Vektorkontrollen und MarvelD3-Überexpressionsklone der Zelllinie MDCK I in der Ussing-Kammer	83
Abb. 32: Dilutionspotentialmessungen der Vektorkontrollen und MarvelD3- Überexpressionsklone der Zelllinie MDCK I	84
Abb. 33: Modell der intestinalen Immunantwort auf luminale Antigene.....	86
Abb. 34: MarvelD3-Expression in Darmbiopsien von Patient*innen mit CED	89
Abb. 35: Überexpression von Claudin 2 in Tricellulin-Überexpressionsklonen der Zelllinie MDCK II.....	100

Abstract (Deutsch)

Epithelien stellen eine Barriere zwischen dem Organismus und der Außenwelt sowie zwischen verschiedenen Kompartimenten innerhalb eines Organismus dar. Je nach Lokalisation lassen sich unterschiedliche Barriereigenschaften beobachten. Diese werden maßgeblich von der Beschaffenheit eines Proteinkomplexes zwischen den Epithelzellen, der Tight Junction (TJ) beeinflusst.

Die Familie der TJ-assoziierten Marvel-Proteine, bestehend aus Occludin, Tricellulin und MarvelD3, bildet einen wichtigen Bestandteil der TJ. In der Darmschleimhaut von Patient*innen mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) wurde eine veränderte Expression von Occludin und Tricellulin beobachtet. Während Tricellulin direkte Effekte auf der Makromolekülebene hat, wurde bei Occludin eine Mischung aus Barriereeffekten und zellregulatorischen Eigenschaften beobachtet. In Vorversuchen zu dieser Arbeit zeigte sich, dass auch die MarvelD3-Expression durch CED beeinflusst wird.

Um herauszuarbeiten, welche Zytokine für die veränderte MarvelD3-Expression verantwortlich sind, wurde die intestinale Zelllinie HT-29/B6 nach der Inkubation mit CED-relevanten Zytokinen auf ihren transepithelialen Widerstand (TER) und ihre MarvelD3-Expression hin untersucht.

Um den Einfluss von MarvelD3 auf die epitheliale Barriere weiter zu analysieren, wurden MarvelD3-Überexpressionsklone in Zelllinien mit unterschiedlichen Barriereigenschaften untersucht. MDCK II-Zellen bilden lecke Epithelien, an denen sich abdichtende Effekte deutlicher zeigen, während MDCK I-Zellen dichte Monolayer ausbilden, welche es ermöglichen, permeabilitätsfördernde Effekte besser zu detektieren.

Die manuelle Widerstandsmessung ergab, dass die Inkubation der HT-29/B6-Zellen mit $\text{TNF}\alpha$, $\text{TGF}\beta 1$, IL-4, IL-13 und IL4+IL-13 eine Senkung des TER zur Folge hatte. In der Western Blot-Analyse zeigte sich die Expression der Isoform 2 von MarvelD3 nach der Inkubation mit IL-4 signifikant und nach der Inkubation mit IL-13 tendenziell erhöht. Die Inkubation mit den übrigen Zytokinen hatte nur andeutungsweise eine Veränderung der MarvelD3-Expression zur Folge.

Die Ergebnisse der Messung des TER und der Dilutionspotentiale in der Ussing-Kammer lassen vermuten, dass die Überexpression von MarvelD3 eher unspezifische Effekte auf die Barriere hat. Als limitierender Faktor sind hierbei die geringen Versuchszahlen an den Überexpressionsklonen der Zelllinie MDCK I zu

nennen. In der Western Blot-Analyse einer Auswahl weiterer TJ-Proteine in den Überexpressionsklonen zeigte sich in beiden Zelllinien ein verändertes TJ-Protein-expressionsprofil.

Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass MarvelD3 keinen direkten Einfluss auf die epitheliale Barriere nimmt, sondern eher zellregulatorische Eigenschaften besitzt. Die veränderte MarvelD3-Expression nach der Inkubation mit IL-4 und IL-13 ließe sich gut mit der Beobachtung vereinbaren, dass das Protein vor allem in der Darmschleimhaut von Patient*innen mit Colitis ulcerosa verändert exprimiert wird, muss in zukünftigen Analysen jedoch weiter untersucht werden.

Abstract (English)

Epithelia represent a barrier between the organism and the outside world, as well as between different compartments within an organism. Depending on the localization, different barrier properties can be observed. These are significantly influenced by the properties of the tight junction (TJ).

The family of TJ-associated Marvel proteins, consisting of occludin, tricellulin and MarvelD3, forms an important component of the TJ. Altered expression of occludin and tricellulin has been observed in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease (IBD). While tricellulin has direct effects at the macromolecule level, a mixture of barrier effects and cell regulatory properties was observed for occludin. Initial analysis showed that MarvelD3 expression is also affected by IBD.

To elaborate which cytokines are responsible for the altered MarvelD3 expression, the intestinal cell line HT-29/B6 was analyzed for its transepithelial resistance (TER) and MarvelD3 expression after incubation with IBD-relevant cytokines.

To further investigate the impact of MarvelD3 on the epithelial barrier, overexpression clones in cell lines with different barrier properties were examined. MDCK II cells form a leaky epithelium in which sealing effects can be more clearly demonstrated, whereas MDCK I cells form tight monolayers that allow permeability-promoting effects to be detected better.

Transepithelial resistance measurements revealed that incubation of HT-29/B6 cells with TNF α , TGF β 1, IL-4, IL-13 and IL4+IL-13 resulted in a decrease in TER. Western blot analysis showed that the expression of isoform 2 of MarvelD3 was significantly increased after incubation with IL-4, and tended to be increased after incubation with IL-13. The remaining cytokines induced slight or no changes in MarvelD3 expression. The results of measurement of TER and dilution potentials in the Ussing chamber suggest that overexpression of MarvelD3 has rather nonspecific effects on the epithelial barrier. A limiting factor is the low number of experiments conducted with the MDCK I cell line overexpression clones. Western blot analysis of a selection of other tight junction proteins revealed an altered tight junction protein expression profile in the overexpression clones of both cell lines.

In conclusion, it can be assumed that MarvelD3 does not directly influence the epithelial barrier but rather has cell regulatory properties. The altered MarvelD3 expression after incubation with IL-4 and IL-13, could be well reconciled with the observation that the protein is expressed in an altered manner in the intestinal

mucosa of patients with ulcerative colitis, but needs to be further investigated in future analyses.

1 Einleitung

1.1 Epithelien

Das Epithelgewebe ist neben dem Binde- und Stütz-, Nerven- und Muskelgewebe eine der vier Grundgewebearten des menschlichen Körpers. (Lüllmann-Rauch, 2009)

Überall dort, wo der Körper an die Umwelt grenzt, stellt es in erster Linie eine Barriere dar, ermöglicht jedoch je nach Organfunktion auch einen transepithelialen Stoffaustausch. Epithelien bilden nicht nur die Epidermis als oberste Grenzschicht der Haut, sondern kleiden auch die Lumina von Körperhöhlen aus, welche mit der Umwelt in Verbindung stehen. Beispiele hierfür sind der Magen-Darm-Trakt, die Nierentubuli und die ableitenden Harnwege. (Fromm, 2010; Lüllmann-Rauch, 2009)

Doch auch verschiedene Flüssigkeitsräume im Inneren des menschlichen Organismus werden durch Epithelgewebe voneinander abgegrenzt. Dies ist beispielsweise an der Pleura, dem Peritoneum, an Gefäßwänden und der Auskleidung innerer Organe der Fall. (Fromm, 2010)

Alle Epithelzellen sind über eine Basalmembran am subepithelialen Bindegewebe verankert und weisen einen polaren Aufbau auf. (Lüllmann-Rauch, 2009) Die der Außenseite bzw. dem Lumen zugewandte Seite wird als apikale Zellmembran, die dem Interstitium zugekehrte und an die benachbarte Zelle angrenzende Seite als basolaterale Zellmembran bezeichnet. Die Polarität der Epithelzellen zeichnet sich vor allem durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Rezeptoren und Transporter an der apikalen und basolateralen Zellmembran aus. (Fromm, 2010)

Den Zusammenschluss von Epithelzellen ermöglichen drei Arten von Zellkontakten: Adhäsionskontakte, Kommunikationskontakte und Verschlusskontakte (Abb. 1).

Adhäsionskontakte ermöglichen eine Anhaftung der Epithelzellen an ihren Nachbarzellen (Desmosomen und Adhärens-Kontakte) oder der Extrazellulärmatrix (Hemidesmosomen, Fokalkontakte). Durch Kommunikationskontakte, auch Gap Junctions genannt, kann zwischen benachbarten Zellen ein Austausch kleiner Solute stattfinden, welcher den funktionellen Zusammenschluss von Zellverbänden ermöglicht. Verschlusskontakte, auch Tight Junctions (TJs) oder *Zonula occludens* (ZO) genannt, dichten den Interzellularspalt ab und stellen so eine größtenteils selektive Diffusionsbarriere dar. (Lüllmann-Rauch, 2009)

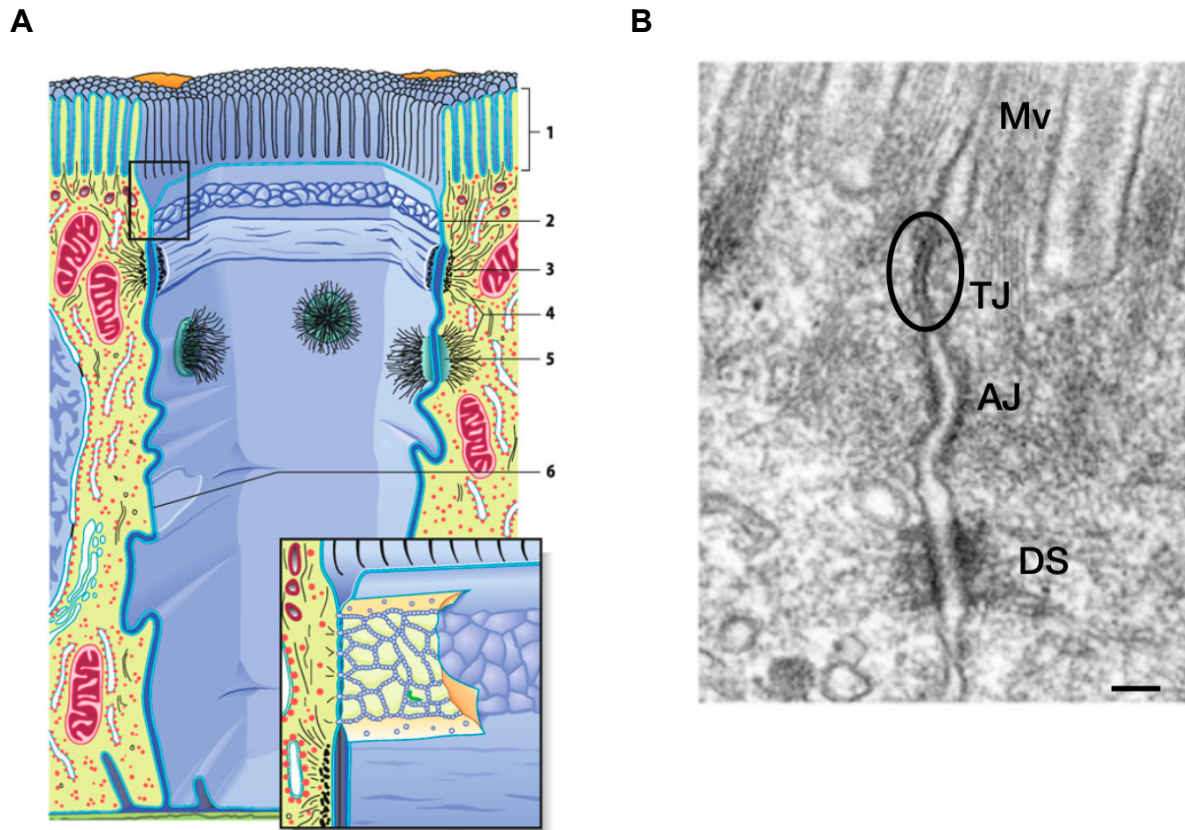


Abb. 1: Zellkontakte in Epithelien.

A: Schematische Darstellung epithelialer Zellverbindungen (Fromm, 2010, S.39).

1 Mikrovilli, 2 Tight Junction, 3 Adherens Junction, 4 Tonofilamente, 5 punktförmige Desmosomen, 6 Gap Junctions. Rechts unten: vergrößerte Darstellung der Tight Junction.

B: Elektronenmikroskopisches Bild der Zellkontakte zweier Darmepithelzellen der Maus. Mv = Mikrovilli, TJ = Tight Junction, AJ = Adherens Junction, DS = Desmosom) (Tsukita, Furuse und Itoh, 2001, Figure 1).

Der Transport an Epithelien kann sowohl parazellulär, d.h. zwischen den Zellen durch die Tight Junctions hindurch, als auch transzellulär, d.h. durch die apikale und basolaterale Zellmembran hindurch, stattfinden. Der Transport in das Interstitium hinein, wird dabei als Resorption, der Transport nach außen hin als Sekretion bezeichnet. (Fromm, 2010)

In Bezug auf den Ionentransport bestimmt das Verhältnis der parazellulären zur transzellulären Durchlässigkeit die Leckheit eines Epithels. Dichte Epithelien weisen geringe Transportraten auf und nutzen vor allem transzelluläre Transportwege. Leckepithelien zeichnen sich umgekehrt durch hohe Transportraten und einen höheren parazellulären im Vergleich zum transzellulären Transport aus. Auch die Durchlässigkeit für Wasser ist damit in aller Regel größer als in dichten Epithelien. Dementsprechend können Leckepithelien im Gegensatz zu dichten Epithelien Konzentrationsgradienten für kleine Solute schlecht aufrechterhalten. (Fromm, 2010)

Die Durchlässigkeit eines Epithels für Ionen und somit dessen Fähigkeit zur Aufrechterhaltung eines elektrochemischen Gradienten spiegelt sich im transepithelialen Widerstand (TER) wider, welcher sich prinzipiell aus dem trans- und dem parazellulären Widerstand zusammensetzt. Da der transzelluläre elektrische Widerstand jedoch typischerweise konstant sehr hoch ist, verändert sich der TER vor allem in Abhängigkeit vom parazellulären Widerstand. (Anderson und Van Itallie, 2009; Vaupel, 2010) Bei lecken Epithelien mit niedrigem parazellulären Widerstand ist der TER demnach in aller Regel niedrig und der zelluläre Anteil am TER größer als der parazelluläre Anteil. An dichten Epithelien mit vergleichsweise hohem TER ist dieses Verhältnis umgekehrt. Dies äußert sich im Extremfall, beispielsweise beim undurchlässigen Epithel der Harnblase in einem sehr hohen parazellulären Widerstand von bis zu $300.000 \Omega \cdot \text{cm}^2$. (Powell, 1981; Anderson und Van Itallie, 2009)

Je nach Lokalisation kommen dem Epithelgewebe unterschiedliche Funktionen zu. Im Darm ist das einschichtige Zylinderepithel vor allem für die Aufrechterhaltung einer Barriere gegenüber dem intestinalen Lumen, die Resorption von Nährstoffen, sowie die Resorption und Sekretion von Elektrolyten und Wasser zuständig. Um für diese Funktionen eine möglichst große Fläche zur Verfügung zu stellen, bildet die Darmschleimhaut (Mukosa) im Dünndarm Ausstülpungen, sogenannte Zotten und im gesamten Darm Einstülpungen, sogenannte Krypten aus. Zusätzlich dazu vergrößern die intestinalen Epithelzellen ihre apikale Membran durch die Ausbildung von Zellfortsätzen, sogenannten Mikrovilli (Abb. 1). (Lüllmann-Rauch, 2009; Gekle, 2010) Die Leckheit des Epithels nimmt im Darm wie in anderen röhrenförmigen Epithelien von proximal nach distal ab und der TER reziprok von proximal nach distal zu. So kommt es im Dünndarm zum Transport großer Mengen von Soluten und Wasser, während im Dickdarm hohe Konzentrationsgradienten herrschen und nur noch in geringem Ausmaß gezielt resorbiert und sezerniert wird. (Vaupel, 2010; Powell, 1981)

1.2 Tight Junctions

Tight Junctions sind für Epithelzellen charakteristische, aus Proteinsträngen bestehende Zellkontakte, welche die lateralen Zellmembranen zweier benachbarter Zellen apikal bandförmig miteinander verbinden. Die TJ-Stränge einer Zelle verbinden sich dabei mit denen der angrenzenden Zelle und verschließen so den interzellulären Raum. (Van Itallie und Anderson, 2006; Fromm, 2010) Seit 1963 können

diese Verschlusskontakte elektronenmikroskopisch immer genauer visualisiert werden (Abb. 1.B, 2.A). (Furuse, 2010, Farquhar und Palade, 1963)

TJs kommen sowohl an den Kontaktstellen zweier (bizelluläre TJ) als auch dreier Zellen (trizelluläre TJ) vor (Abb. 2.B) (Furuse, 2010) und stellen in zweierlei Hinsicht eine Barriere dar. Einerseits verhindern sie die Diffusion apikaler und basolateraler Membranproteine innerhalb der Membran und leisten somit einen Beitrag zur Aufrechterhaltung der Polarität von Epithelzellen („Fence“-Funktion). Andererseits regulieren die TJs den parazellulären Stofftransport, indem sie eine Diffusionsbarriere darstellen und einen selektiven, gerichteten Transport von Soluten und Wasser ermöglichen („Gate“-Funktion). Dies ermöglicht unter anderem die Aufrechterhaltung eines Konzentrationsgradienten zwischen dem Lumen und dem Interstitium von Organen. (Cereijido *et al.*, 2008; Schneeberger und Lynch, 2004; Fromm, 2010; Van Itallie und Anderson, 2006)

Aber die TJ fungiert nicht ausschließlich als Barriere, sondern auch als Brücke zu benachbarten Zellen. Gewisse Lipidmoleküle vermögen es die „Fence“-Funktion der TJ zu umgehen, indem sie sich zwischen der äußeren und zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran bewegen. Es wird davon ausgegangen, dass die TJ die Diffusion bestimmter Lipide und dazugehöriger Proteine an Zell-Zell-Kontakten zulässt, um damit auch einen Teil zur Kommunikation zwischen Zellen beizutragen („Bridge“-Funktion). (Cereijido *et al.*, 2008; Laffafian und Hallett, 2007)

Insgesamt stellt die TJ ein komplexes und dynamisches Gebilde dar, welches mit einer veränderten Struktur und Proteinzusammensetzung auf verschiedene Stimuli reagieren kann. (Shen *et al.*, 2011)

So nehmen beispielsweise zahlreiche Kinasen und Phosphatasen über verschiedene intrazelluläre Signalwege Einfluss auf die Stabilität der TJ. (González-Mariscal, Tapia und Chamorro, 2008) Mehrere TJ-Proteine wurden auch mit Signalwegen in Zusammenhang gebracht, welche Einfluss auf die Genexpression und den Zellzyklus haben. (Anderson und Van Itallie, 2009; Balda und Matter, 2009; González-Mariscal *et al.*, 2014) So scheinen beispielsweise verschiedene TJ-Proteine die Zellproliferation zu unterdrücken, um eine Zell- und Gewebsdifferenzierung zu ermöglichen. (Balda und Matter, 2009)

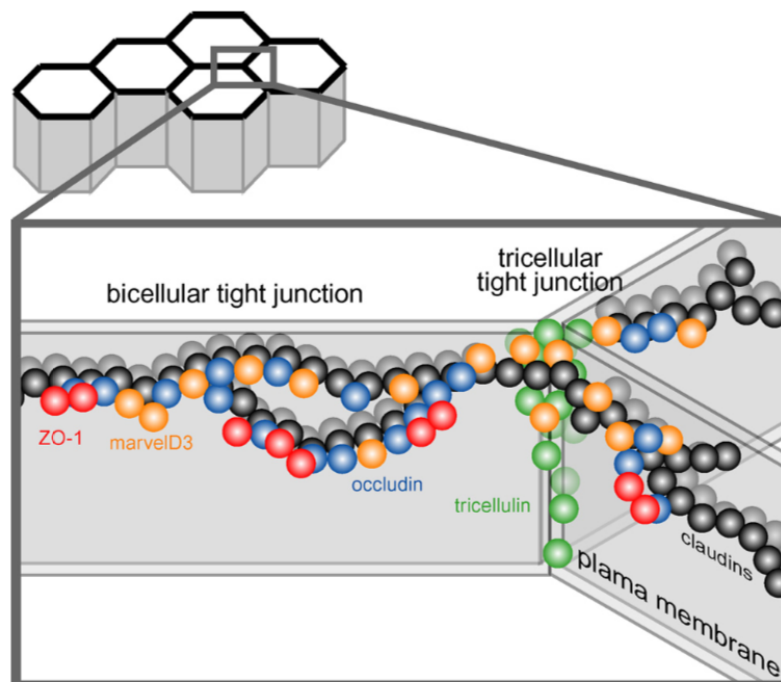
A**B**

Abb. 2: Tight Junctions.

A: Gefrierbruchelektronenmikroskopische Aufnahme muriner intestinaler TJ-Stränge (González-Mariscal, Lechuga und Garay, 2007, Figure 5.A). **M** = Mikrovilli

B: Schematische Darstellung der TJ-Stränge an bizellulären und trizellulären TJs (Raleigh et al., 2010, Figure 10) mit den Tight Junction-Proteinen ZO-1 (rot), MarvelD3 (orange), Occludin (blau), Tricellulin (grün) und den Claudinen (schwarz)

1.3 Tight Junction-Proteine

Die Tight Junction setzt sich aus zahlreichen Proteinen zusammen (Abb. 2.B). Die Bestandteile des TJ-Komplexes lassen sich dabei grob in zwei Gruppen einteilen: integrale Membranproteine und TJ-assoziierte intrazelluläre Proteine. (Günzel und Fromm, 2012; Schneeberger und Lynch, 2004) Die integralen TJ-Proteine sind direkt an der Ausbildung von Zellkontakten und der Barrierebildung beteiligt. Hierzu gehören die Tetraspan-TJ-Proteine, welche wiederum in zwei Proteinfamilien aufgeteilt

werden: die Familie der Claudine und die Tight Junction-assoziierten Marvel-Proteine (TAMP) Occludin, Tricellulin und MarvelD3 (Abb. 3). Neben den Tetraspan-Proteinen gehören auch Singlespan-Proteine, wie die *Junction Adhesion Molecules* (JAM) und die Anguline zu den integralen TJ-Proteinen. (Günzel und Fromm, 2012; Schneeberger und Lynch, 2004; Higashi *et al.*, 2013)

Abgesehen von den Proteinen, welche direkt an der Bildung der TJ beteiligt sind, gibt es Plaque-Proteine, welche die Verankerung der TJ am Zytoskelett der Epithelzelle gewährleisten und eine Rolle in zahlreichen Signalwegen übernehmen. Zu diesen zählen u.a. die Gerüstproteine ZO-1, ZO-2 und ZO-3. Zudem gibt es zahlreiche weitere zytosolische und nukleäre Proteine, die die Funktion und Regulation der TJ beeinflussen. (Schneeberger und Lynch, 2004; Günzel und Fromm, 2012) Die Proteinzusammensetzung der TJ nimmt einen erheblichen Einfluss auf die Transport- und Barriereigenschaften von Epithelien und kann je nach deren Funktion sogar innerhalb eines Organs variieren. (Günzel und Fromm, 2012; John, Fromm und Schulzke, 2011) TJ-Proteine spielen auch als Angriffspunkte für Pathogene, in der Pathogenese verschiedener inflammatorischer Erkrankungen und in der Kanzerogenese eine Rolle. (Günzel und Fromm, 2012)

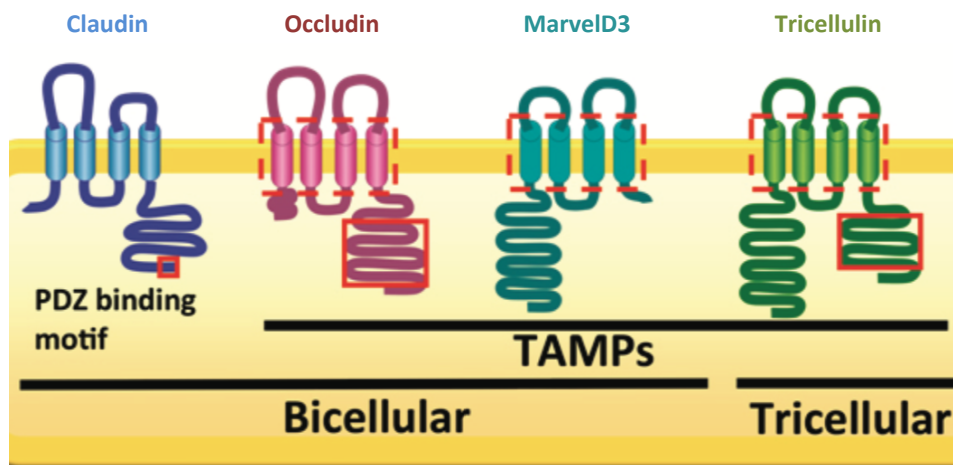


Abb. 3: Schematische Darstellung der Tetraspan-Proteine der Tight Junction (modifiziert nach González-Mariscal *et al.*, 2012, Figure 7.A, S. 9). Claudin, Occludin, MarvelD3 und Tricellulin. Die Proteine der TAMP-Familie enthalten alle die MARVEL-Domäne (rote, gestrichelte Rahmen). Occludin und Tricellulin weisen jeweils eine sehr homologe Domäne am C-Terminus auf (rote, durchgehende Rahmen).

1.3.1 Claudine

Claudine gelten als strukturell und funktionell wichtigste Bestandteile der TJ. (Furuse, 2010) Im Menschen und in der Maus umfasst die Familie der Claudine nach

heutigem Wissensstand mindestens 27 Mitglieder. (Mineta *et al.*, 2011) Diese sind zwischen 21 und 28 kDa groß (Furuse, 2010), weisen vier Transmembrandomänen, zwei extrazelluläre Loops, zytoplasmatische N- und C-Termini sowie eine kurze intrazelluläre Schleife auf. Die meisten Claudine weisen eine PDZ-bindende Domäne an ihrem C-Terminus auf (Abb. 3). Mithilfe letzterer können Claudine an verschiedene Proteine, wie z.B. ZO-1, ZO-2 und ZO-3 binden. (Furuse, 2010; Anderson und Van Itallie, 2009; Günzel und Fromm, 2012; Stiffler *et al.*, 2007; Itoh *et al.*, 1999) Die Hauptfunktion der Claudine besteht darin, TJ-Stränge zu formen. (Furuse, 2010) Je nach Sequenzhomologie werden klassische von nicht-klassischen Claudinen unterschieden. Funktionell können sie hinsichtlich ihres Einflusses auf die epitheliale Barriere in abdichtende und kanalbildende Claudine eingeteilt werden. (Günzel und Fromm, 2012)

Kanalbildende Claudine, wie die Claudine 2, 10a, 10b, 15 und 17 bilden mit den Claudinen benachbarter Zellen parazelluläre, zum Teil ionenselektive Kanäle und führen so zu einer erhöhten Permeabilität von Epithelien. (Fromm 2010; Günzel und Fromm, 2012) Claudin 2 (Amasheh *et al.*, 2002; Rosenthal *et al.*, 2010; Rosenthal *et al.*, 2017) und Claudin 15 (Tamura *et al.*, 2011; Rosenthal *et al.*, 2020) formen dabei parazelluläre Kanäle für kleine Kationen und Wasser. Claudin 10b bildet ebenfalls Kationenkanäle, Claudin 10a (Van Itallie *et al.*, 2006; Günzel *et al.*, 2009) und Claudin 17 (Krug *et al.*, 2012) bilden Anionenkanäle aus. (Günzel und Fromm, 2012) Die kanalbildenden Claudine werden im Darm vor allem in dessen proximalen, lecken Segmenten stark exprimiert. So weisen beispielsweise Claudin 2 und 15 ihre höchste Konzentration im Dünndarm auf, welcher einen entsprechend niedrigeren TER aufweist als der Dickdarm. (Markov *et al.*, 2010; Lameris *et al.*, 2013; John, Fromm und Schulzke, 2011; Amasheh, Fromm und Günzel, 2011; Lüttig, 2016) Hier spielen sie auch in der Natrium-Homöostase und Nährstoffaufnahme eine essenzielle Rolle. (Venugopal, Anwer und Szászi, 2019) Mäuse, in denen die Expression beider Proteine supprimiert wurde, starben an schwerer Unterernährung. (Wada *et al.*, 2013)

Als sicher abdichtend werden die Claudine 1, 3, 5, 11, 14 und 19 beschrieben, während für die Claudine 4, 7, 8 und 16 je nach untersuchter Zelllinie und TJ-Zusammensetzung unterschiedliche Eigenschaften beschrieben wurden. (Günzel und Fromm, 2012)

Claudin 1 wurde u.a. als essenzielle, abdichtende Komponente der TJs in der Epidermis beschrieben. Claudin 1-Knock-Out-Mäuse starben aufgrund eines transepidermalen Wasserverlustes am Tag nach ihrer Geburt. (Furuse *et al.*, 2002) Eine Überexpression von Claudin 3 *in vitro* führte neben einer strukturellen Veränderung der TJs vor allem zu einem wesentlich erhöhten parazellulären Widerstand. (Milatz *et al.*, 2010) Auch Claudin 4 scheint in MDCK II-Zellen eine abdichtende Funktion zu haben, nimmt Einfluss auf die Architektur der TJ und vermindert selektiv die Permeabilität für Kationen. (Van Itallie, Rahner und Anderson, 2001; Hou *et al.*, 2006; Günzel und Fromm, 2012)

Abdichtende Claudine wie Claudin 1, 3 und 4 werden im Darm am stärksten im Kolon exprimiert, welches einen wesentlich höheren TER als die Dünndarmsegmente aufweist. In allen Darmsegmenten kann die Claudin-Expression durch inflammatorische Darmerkrankungen beeinflusst werden. (John, Fromm und Schulzke, 2011; Amasheh, Fromm und Günzel, 2011; Markov *et al.*, 2010; Lameris *et al.*, 2013; Lüttig, 2016) Zudem konnten durch Mutationen in Claudin-kodierenden Genen verursachte Krankheitsbilder, wie beispielsweise das familiäre Hypomagnesiämie-Hypercalciurie-Nephrocalcinose-Syndrom bei einer Mutation in den für Claudin 16 und 19 kodierenden Genen, identifiziert werden. (Günzel und Yu, 2009) Auch in Zellen verschiedener Krebsarten wurde im Vergleich zu gesundem Gewebe eine signifikante Veränderung der Claudin-Expression nachgewiesen. (Kominsky, 2006; González-Mariscal, Lechuga und Garay, 2007; Günzel und Fromm, 2012)

1.3.2 Tight Junction-assoziierte MARVEL-Proteine (TAMP)

Die MARVEL-Domäne wurde 2002 von Sánchez-Pulido *et al.* als eine in mehreren Proteinfamilien konservierte Sequenzdomäne beschrieben, welche speziesübergreifend vorkommt. In einer Untersuchung verschiedener Wirbeltiere zeigte sich ein höheres Maß an evolutionärer Generhaltung in den Gensequenzen, welche für die MARVEL-Domäne kodieren als in anderen Gensequenzen. Dies deutet darauf hin, dass die MARVEL-Domäne selbst die Funktion der Proteine beeinflusst. (Raleigh *et al.*, 2010; Sánchez-Pulido *et al.*, 2002) MARVEL steht hierbei für „*MAL-related proteins for vesicle trafficking and membrane link*“, da eines der ersten Proteine, bei dem die MARVEL-Domäne identifiziert wurde das „*myelin and lymphocyte protein*“ (MAL) war. Alle Proteine, welche die MARVEL-Domäne besitzen, weisen vier Trans-

membran-Helices mit zytoplasmatischen N- und C-Termini auf. (Sánchez-Pulido *et al.*, 2002)

Die Familie der Tight Junction-assoziierten MARVEL-Proteine (TAMP) stellt eine Unterfamilie der MARVEL-Familie dar und besteht aus den Proteinen Occludin, Tricellulin und MarvelD3. Das Vorkommen aller drei Mitglieder der TAMP-Familie konnte in zahlreichen Epithelgeweben nachgewiesen werden, so auch im Jejunum, Kolon, Magen, Dünndarm, Kolon, Leber, Niere und Lunge. Allen drei TAMP ist gemein, dass sie ungleich den Claudinen selbst keine TJ-Stränge ausbilden, in diese jedoch eingebaut werden können. (Raleigh *et al.*, 2010) Zudem konnte eine wechselseitige Interaktion zwischen Claudinen und TAMP aufgezeigt werden. (Cording *et al.*, 2013)

Trotz ihrer Ähnlichkeit zueinander können die TAMP den Verlust eines anderen Proteins aus ihrer Unterfamilie nicht kompensieren. Weiterhin weisen sie eine unterschiedliche Gewebeexpression und subzelluläre Verteilung auf. Es ist daher davon auszugehen, dass jedes der drei Proteine auch einzigartige Eigenschaften besitzt. (Raleigh *et al.*, 2010)

1.3.2.1 Occludin

Occludin war das erste beschriebene integrale Tight Junction-Protein. (Furuse, 2010; Furuse *et al.*, 1993) Es hat eine Größe von ca. 65 kDa und besitzt wie die restlichen Proteine der TAMP-Familie vier Transmembrandomänen, zwei extrazelluläre Loops und zytoplasmatische C- und N-Termini (Abb. 3). Der C-Terminus bindet an ZO-1, ZO-2 und ZO-3. Occludin weist keine Sequenzähnlichkeiten zu den Claudinen auf. Da es scheinbar in allen TJs vorkommt, wird es häufig als TJ-Marker verwendet. Welche Funktionen Occludin in der TJ genau einnimmt, ist noch nicht abschließend geklärt. (Furuse, 2010; Günzel und Fromm, 2012) Knock-Out-Mäuse bildeten trotz des Fehlens von Occludin funktionale TJ-Stränge aus, wiesen jedoch eine Vielzahl an Auffälligkeiten in verschiedenen Geweben auf, z.B. eine Wachstumsretardierung, Kalkablagerungen im Gehirn, eine Knochenausdünnung, eine testikuläre Atrophie sowie eine chronische Gastritis. (Günzel und Fromm, 2012; Saitou *et al.*, 2000) Bei Patient*innen mit einer rezessiven Mutation im Occludin-Gen zeigten sich ebenso Kalkablagerungen im Gehirn sowie kortikale Malformationen. (O'Driscoll *et al.*, 2010) In Occludin-defizienten embryonalen Stammzellen (Saitou *et al.*, 1998) und Occludin-Knockout-Mäusen (Schulzke *et al.*, 2005) konnte kein Effekt des Fehlens von

Occludin auf die Barriereigenschaften der TJ gezeigt werden, während eine Überexpression in MDCK-II-Zellen zu erhöhten transepithelialen Widerständen führte. (Van Itallie *et al.*, 2010; Günzel und Fromm, 2012). Auch in epithelialen Transportvorgängen, der Gewebsdifferenzierung und der Kanzerogenese scheint Occludin eine Rolle zu spielen. (Schulzke *et al.*, 2005; Rachow *et al.*, 2013)

Im Darm wird Occludin analog zu den abdichtenden Claudinen am stärksten im Kolon exprimiert. (Markov *et al.*, 2010; John, Fromm und Schulzke, 2011)

1.3.2.2 Tricellulin

Tricellulin ist das Tight Junction-Protein, welches die höchste Konzentration an trizellulären TJs aufweist (Abb. 2.B). (Furuse, 2010; Ikenouchi *et al.*, 2005) Tricellulin bildet wie die anderen Proteine der TAMP-Familie vier Transmembrandomänen und zwei extrazellulären Loops aus. Die C-Termini von Tricellulin und Occludin weisen eine große Sequenzähnlichkeit auf und binden jeweils an ZO-1 (Abb. 3). (Furuse, 2010; Ikenouchi *et al.*, 2005; Riazuddin *et al.*, 2006) Tricellulin kommt in vier Isoformen vor. In der Regel wird mit „Tricellulin“ die längste Isoform namens TRIC-a gemeint. (Krug *et al.*, 2009) Mittels einer Untersuchung vieler betroffener Familien konnte nachgewiesen werden, dass Mutationen im Tricellulin-Gen autosomal-rezessiv vererbt werden können und am ehesten über Barrierestörungen im Innenohr zu nicht-syndromaler Taubheit führen. (Kitajiri und Katsuno, 2016; Riazuddin *et al.*, 2006; Taghipour-Sheshdeh *et al.*, 2019) Die Suppression der Tricellulin-Expression in Epithelzellen führte zu einer gestörten Organisation der trizellulären, aber auch der bizellulären TJ und beeinflusste somit die Barriereigenschaften des Epithels. (Ikenouchi *et al.*, 2005; Furuse, 2010) Eine Überexpression von Tricellulin in bi- und trizellulären TJs ergab einen erhöhten parazellulären Widerstand, eine verminderte Anzahl von TJ-Strangbrüchen und eine ladungsunabhängige Abnahme der Permeabilität für Ionen. Eine Begrenzung der Überexpression von Tricellulin auf die trizellulären Zellkontakte führte hingegen ausschließlich zu einer Abdichtung gegenüber Makromolekülen. (Krug *et al.*, 2009) Im Umkehrschluss konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der Tricellulin-Expression zu einer erhöhten Passage von Makromolekülen führt und dies auch in der Pathogenese der Colitis ulcerosa eine Rolle spielt. (Krug *et al.*, 2018) Occludin scheint einen Einfluss auf die Lokalisation von Tricellulin in der trizellulären TJ zu haben, da Tricellulin durch einen Knockdown

von Occludin vermehrt in bizellulären TJs vorkommt. (Ikenouchi *et al.*, 2008; Furuse, 2010)

1.3.2.3 MarvelD3

Als drittes Mitglied der TAMP-Familie besitzt MarvelD3 (MD3) ebenfalls vier Transmembranbereiche mit zwei extrazellulären Schleifen. Sein N- und C-Terminus kommen im Zytosol zu liegen. Im Vergleich zu Occludin und Tricellulin besitzt MarvelD3 nur eine kurze zytoplasmatische Domäne des C-Terminus (Abb. 3). Das für MarvelD3 kodierende Gen liegt auf Chromosom 16. Insgesamt ist das Tight Junction-Protein ca. 40 kDa groß und kommt in zwei Splice-Varianten vor: Isoform 1 enthält 410, Isoform 2 401 Aminosäuren. (Steed *et al.*, 2009) Die zwei Isoformen unterscheiden sich hierbei lediglich in der Sequenz ihrer MARVEL-Domäne und ihrer C-Termini. (Raleigh *et al.*, 2010; Steed *et al.*, 2009) In Caco-2-Zellen und Maudarmzellen konnte nachgewiesen werden, dass MarvelD3 sowohl in intrazellulären Vesikeln als auch in der apikalen TJ vorkommt. In der TJ kommt MarvelD3 vorwiegend in bizellulären Zellkontakten vor und kolokalisiert wie Tricellulin und Occludin mit ZO-1. Mittels Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion von MarvelD3 mit Occludin und Tricellulin stattfinden kann. Hierbei ist der Anteil des gesamten MarvelD3-Pools, der an Occludin gebunden ist, größer als der Anteil des gesamten Occludin-Pools, welcher an MarvelD3 gebunden ist. Tricellulin und Occludin interagieren nicht direkt miteinander oder bilden nur instabile oder zeitweilige Verbindungen aus. (Raleigh *et al.*, 2010)

Wie Occludin und Tricellulin wird auch MarvelD3 in Claudin-basierte TJ-Stränge eingebaut, ist jedoch nicht in der Lage ähnliche Strukturen in Abwesenheit der Proteine der Claudin-Familie selbst auszubilden. (Raleigh *et al.*, 2010)

Laut genetischer Datenbanken kommt MarvelD3 nur in Wirbeltieren vor. Alternative Splice-Varianten wurden sogar nur bei Säugetieren vorgefunden. (Steed *et al.*, 2009) So wird MarvelD3 in verschiedenen Epithel- und Endothelzellen exprimiert, wobei gewisse Unterschiede in den Expressionsprofilen beider Isoformen festzustellen sind. (Steed *et al.*, 2009) In Untersuchungen an der Maus zeigte sich eine höhere Expression der Isoform 1 in der Leber, der Isoform 2 in der Niere und eine ähnlich hohe Expression beider Isoformen im Darm. (Raleigh *et al.*, 2010)

Bei der Untersuchung der Auswirkung von MarvelD3 auf den transepithelialen Widerstand kamen Steed et al. und Raleigh et al. jedoch zu gegensätzlichen Ergebnissen. Steed et al. zeigten, dass Caco2-Zellen mit MarvelD3-Depletion höhere transzelluläre Widerstände aufwiesen als Kontrollpopulationen. Die Untersuchung der Permeabilität für Tracer zeigte jedoch, dass es zu keiner signifikanten Änderung der Tracer-Diffusion kam. Die Depletion von MarvelD3 schien keinen Effekt auf die Verteilung anderer großer Komponenten der TJ zu haben. Hieraus könnte also geschlossen werden, dass das Fehlen von MarvelD3 keine Veränderung in der Formation funktioneller TJs bewirkt, es jedoch eine Determinante für die parazelluläre Ionenkonduktivität darstellt. (Steed *et al.*, 2009) Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass der Anstieg des TER möglicherweise auch auf eine Änderung der Occludin-Verteilung oder eine veränderte Claudin-Expression zurückzuführen ist. (Steed *et al.*, 2009)

Raleigh et al. zeigten hingegen, dass die Transkription von MarvelD3 Isoform 1 und Tricellulin in Caco-2-Zellen vor der Entwicklung des transepithelialen Widerstandes signifikant anstieg. Die Proteinexpression stieg daraufhin entsprechend an und fiel zeitlich mit einem Peak-TER 72 h nach dem Ausplattieren der Zellen zusammen. Unmittelbar nach deren Synthese wurden Tricellulin und MarvelD3 in die TJ transportiert. Die Occludin-Expression stieg trotz konstanter mRNA-Gehalte. Dies deuten die Autoren als Hinweis darauf, dass MarvelD3 und Tricellulin eher auf transkriptioneller und Occludin eher auf translationeller Ebene reguliert werden. Die mRNA der Isoform 2 von MarvelD3 wurde während der Barriereentwicklung als nicht erhöht gemessen. (Raleigh *et al.*, 2010)

Die Suppression der einzelnen Proteine der TAMP-Familie führte jeweils zu einer moderat verzögerten Ausbildung des TER, jedoch nicht zu einer kompensatorisch erhöhten Expression der jeweils anderen zwei Proteine. Der gleichzeitige Knockdown aller drei Proteine führte zu einer größeren Verzögerung der Barriereentwicklung als der Knockdown der einzelnen Proteine. (Raleigh *et al.*, 2010)

Zusätzlich zu seiner Funktion bezüglich der epithelialen Barriere wurde auch der Einfluss von MarvelD3 auf verschiedene Signalwege untersucht. Kojima et al. konnten zeigen, dass MarvelD3 in Zusammenhang mit dem Transkriptionsfaktor Snail während der Tumorprogression von Pankreaskarzinomen eine Rolle in der epithelial-mesenchymalen Transition spielt, welche mit einer Störung der TJs und damit einem Verlust der Zell-Zell-Kontakte und der apikobasalen Polarität einhergeht.

So zeigte sich in schlecht differenzierten Pankreaskarzinomzellen und in Pankreaskarzinomzellen, in welchen *in vitro* eine epithelial-mesenchymale Transition induziert wurde, eine erniedrigte Expression von MarvelD3. Es wäre demnach möglich, MarvelD3 als weiteren Marker für eine Tumorprogression in Pankreaskarzinomen zu verwenden. (Kojima *et al.*, 2011) Auch in Magenkarzinomzellen konnte der Einfluss von MarvelD3 auf Signaltransduktionswege gezeigt werden. So führte eine erniedrigte Expression von MarvelD3 zu einer verminderten Wirksamkeit der Serin/Threonin-Kinase PKC II und damit zu einer Zunahme der Zellmigration infolge einer Behandlung der Zellen mit *Epithelial Growth Factor*. Es wird vermutet, dass dieser Mechanismus für den Grad der Invasivität und die Metastasierung verschiedener Tumoren bedeutsam sein könnte. (Qian *et al.*, 2018; Steed *et al.*, 2014) In Caco-2-Zellen wiesen Steed *et al.* nach, dass MarvelD3 ebenso eine Rolle im MEKK1-JNK-Signalweg spielt und somit einen Einfluss auf die Migration, Proliferation und Tumorbildung von Epithelzellen hat. Die Depletion von MarvelD3 stimuliert die Migration und Proliferation von Caco-2-Zellen. Auch für die Reaktion epithelialer Zellen auf osmotischen Stress scheint MarvelD3 bedeutsam zu sein. (Steed *et al.*, 2014) Die Regulation des JNK-Signalwegs durch MarvelD3 wurde von Vacca *et al.* als essenzieller Bestandteil der embryonalen Entwicklung des Auges und der Neuralleiste von Fröschen beschrieben. (Vacca *et al.*, 2016; Vacca *et al.*, 2018)

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass es aktuell noch widersprüchliche Aussagen zur Rolle von MarvelD3 in der Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere gibt, jedoch feststeht, dass es einen wichtigen Bestandteil der Tight Junction mit Einfluss auf verschiedene Signalwege darstellt.

1.4 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED), klassischerweise unterteilt in die Krankheitsentitäten Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, stellen chronisch-rezidivierende Entzündungen des Gastrointestinaltraktes dar. Beide Erkrankungen treten für gewöhnlich zwischen dem 15. und 40. Lebensjahr auf. Ihre Prävalenz in Europa liegt laut einer 2012 veröffentlichten Übersichtsarbeit in etwa bei 1 von 198 Einwohnern für Colitis ulcerosa und 1 von 310 Einwohnern für Morbus Crohn. (Wehkamp *et al.*, 2016, Molodecky *et al.*, 2012) Die Pathogenese der Erkrankungen ist nicht abschließend geklärt. Fest steht jedoch, dass es sich bei der Ätiologie um

ein komplexes Zusammenspiel zwischen genetischer Prädisposition und zahlreichen Umweltfaktoren handelt (Abb. 4). (Vatn und Sandvik, 2015; Neurath, 2014) Die mit den CED assoziierten Genloci weisen unter anderem auf die Bedeutung der intestinalen Barriere und der angeborenen und erworbenen Immunantwort auf das Mikrobiom des Darms in der Pathophysiologie der Erkrankungen hin. Eine wichtige Rolle scheinen zudem die Ernährung und die Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora zu spielen. (Kaplan und Ng, 2017; Ananthakrishnan, 2015; Wehkamp *et al.*, 2016) Bis dato wurden auch zahlreiche weitere Risikofaktoren beschrieben. Zum Beispiel erhöhen in Kaukasiern die Antibiotikaeinnahme im Kindesalter und ein Vitamin D-Mangel das Risiko für das Auftreten beider CED. Stillen scheint bei beiden Entitäten ein protektiver Faktor zu sein. Während eine Appendektomie das Risiko für das Auftreten eines Morbus Crohn erhöht, scheint sie das Risiko für das Auftreten der Colitis ulcerosa zu senken. (Kaplan und Ng, 2017)

Bei den extraintestinalen Manifestationen handelt es sich am ehesten um begleitende Autoimmunprozesse, welche zeitgleich, verfrüht oder nach dem ersten Auftreten abdominaler Beschwerden auftreten können. (Brüning und Homann, 2012) Beide Erkrankungen erhöhen das Risiko für die Entstehung kolorektaler Karzinome. (Neurath, 2014)

1.4.1 Morbus Crohn

Beim Morbus Crohn handelt es sich um eine diskontinuierliche transmurale Entzündung, welche vor allem das distale Ileum und Kolon betrifft, jedoch prinzipiell im gesamten Gastrointestinaltrakt vorkommen kann. (Neurath, 2014; Brüning und Homann, 2012) Als spezifisches Risiko sind eine familiäre Disposition, z.B. die Mutation des NOD2-Gens, sowie der Nikotinabusus bekannt. (Podolsky, 2002) Die führenden Symptome sind krampfartige Bauchschmerzen und Diarrhoe, welche im Gegensatz zur Colitis ulcerosa nur selten blutig ist. Zudem kann es zu unspezifischen Beschwerden wie Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit, Fatigue und Fieber kommen. In den meisten Fällen setzen die Beschwerden schleichend ein. Durch den transmuralen Befall kommt es beim Morbus Crohn zu Komplikationen wie Fistelbildung, Stenosen, Abszessen und Strikturen. Extraintestinale Manifestationen kommen beim Morbus Crohn häufiger vor als bei der Colitis ulcerosa. Zu ihnen gehören u.a. die Fettleber, die Pericholangitis, Aphthen der Mundschleimhaut, Arthritiden, eine Morbus-Bechterew-ähnliche Sakroileitis und ankylosierende Spondylitis, die Iritis, Episkleritis

und Uveitis. Gehäuft treten auch thromboembolische Komplikationen, Osteoporose und Entwicklungsstörungen auf. Nieren- und Gallensteine kommen vor allem beim Morbus Crohn vor. Durch die Diskontinuität und die Möglichkeit des Auftretens im gesamten Gastrointestinaltrakt ist eine operative Heilung beim Morbus Crohn nicht möglich. (Brüning und Homann, 2012)

1.4.2 Colitis ulcerosa

Bei der Colitis ulcerosa handelt es sich um eine kontinuierliche oberflächliche Entzündung des Kolons, welche nur die Mukosa und Submukosa betrifft. Nikotinabusus und eine frühe Appendektomie sind als protektive Faktoren bekannt. (Neurath, 2014) Das Hauptsymptom der Colitis ulcerosa ist die heftige, blutig-schleimige Diarrhoe. Auch hier können wie beim Morbus Crohn abdominale Schmerzen und Allgemeinsymptome (siehe 1.4.1) hinzukommen. Letztere können durch eine blutungsbedingte Anämie vermehrt auftreten. Extraintestinale Manifestationen (siehe 1.4.1) kommen wie beim Morbus Crohn vor, sind jedoch insgesamt weniger häufig. Das toxische Megakolon und die primär-sklerosierende Cholangitis sind extraintestinale Manifestationen, welche ausschließlich im Rahmen der Colitis ulcerosa beobachtet werden. Die wichtigste Komplikation der Colitis ulcerosa ist jedoch das Kolonkarzinom, welches aufgrund der chronischen Schleimhautinflammation nach 20 Jahren Krankheitsaktivität in 50% der Fälle, häufig multifokal, auftritt. Da der Befall auf das Kolon begrenzt ist, ist durch eine Kolektomie als *ultima ratio* eine Heilung der Krankheit möglich. (Brüning und Homann, 2012)

1.4.3 Überblick über die Diagnostik und Therapie der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Bei der initialen Diagnostik der CED spielt neben der Klinik und der Labordiagnostik vor allem die Endoskopie und Histologie als Goldstandard eine zentrale Rolle. Zusätzlich können eine Sonographie und Schnittbildgebung zur Ausbreitungs- und Verlaufsdagnostik durchgeführt werden. Um das Entstehen von Kolonkarzinomen nach längerer Krankheitsaktivität zu verhindern bzw. früh aufzudecken wird in Deutschland die regelmäßige Durchführung einer Koloskopie im Abstand von ein bis zwei Jahren empfohlen. (Wehkamp *et al.*, 2016)

Die therapeutischen Optionen lassen sich grundsätzlich in konservative und chirurgische Interventionen einteilen. Zu den konservativen Therapeutika gehören vor allem

die Glukokortikoide und die Immunsuppressiva v.a. bei akuten Schüben, sowie die Aminosalizylate und Thiopurine v.a. zur Remissionserhaltung. Zudem empfiehlt es sich im akuten Schub auf ballaststoffreiche Kost zu verzichten und ggf. auf vollresorbierbare Elementarkost oder parenterale Ernährung umzusteigen. (Wehkamp *et al.*, 2016; Brüning und Homann, 2012)

Die Glucocorticoidgabe kann im akuten Schub topisch, z.B. mit Budenosid, oder systemisch, z.B. mit Prednisolon, erfolgen. Bei steroidrefraktären oder besonders schweren Verläufen kommen TNF α -Inhibitoren wie Infliximab und Adalimumab, bei der Colitis ulcerosa auch Calcineurininhibitoren wie Ciclosporin zum Einsatz. Die Thiopurine Azathioprin und 6-Mercaptopurin können ergänzend, während des Ausschleichens der Steroide, als Ablösung der Calcineurininhibitoren oder zur Remissionserhaltung eingesetzt werden. Alternativ kommt vor allem beim Morbus Crohn auch der Folsäure-Antagonist Methotrexat zum Einsatz. Teilweise ist auch eine dauerhafte kombinierte Immunsuppression notwendig. Die Aminosalizylate wie Mesalazin werden bei Colitis ulcerosa zur Remissionsinduktion und -erhaltung eingesetzt. Der Anti-Integrin-Antikörper Vedolizumab ist der Vertreter einer neuen Wirkstoffklasse für therapierefraktäre Verläufe beider CED. (Wehkamp *et al.*, 2016) Auch der monoklonale Antikörper gegen die gemeinsame p40-Einheit der Zytokine IL-12 und IL-23 Ustekinumab und der Januskinaseinhibitor Tofacitinib stellen neue Therapeutika in der Behandlung der CED dar. (Stichtenoth und Bachmann, 2020)

Operative Interventionen werden aufgrund von Komplikationen wie z.B. einer Fistelbildung, Abszessen oder einer Darmobstruktion bei einem Großteil der Patient*innen mit Morbus Crohn im Krankheitsverlauf notwendig. Im Falle der Colitis ulcerosa stellt die Kolektomie als *ultima ratio* die einzige kurative Therapieoption dar. (Wehkamp *et al.*, 2016)

1.4.4 Rolle der Zytokine in der Pathophysiologie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen

Eines der frühen Anzeichen für CED ist die erhöhte Permeabilität der Darmschleimhaut. Ob sie die primäre Ursache der Erkrankungen ist oder als Folge der Inflammation oder anderer Umwelteinflüsse auftritt, ist bislang nicht abschließend geklärt. (Ahluwalia *et al.*, 2018; Michielan und D'Incà, 2015) Klinische Studien und Mausmodelle lassen jedoch vermuten, dass die erhöhte Permeabilität des Darms der Entzündungsreaktion vorausgehen könnte. (Ahluwalia *et al.*, 2018; Turpin *et al.*, 2020;

Resta-Lenert, Smitham und Barrett, 2005; Michielan und D'Incà, 2015) Auf molekularer Ebene zeigt sich eine deutlich veränderte Struktur der TJs bei aktiver CED mit brüchigen TJ-Strängen und einer Abnahme der Anzahl der TJ-Stränge. Dies liegt aller Wahrscheinlichkeit nach u.a. an der veränderten Proteinexpression. So zeigten sich bei Patient*innen mit Morbus Crohn eine verminderte Expression der abdichtenden Claudine 3, 5 und 8, sowie eine Zunahme der Expression des porenbildenden Claudin 2. (Zeissig *et al.*, 2007) Auch bei der Pouchitis, welche nach einer Kolektomie bei Colitis ulcerosa auftreten kann, wurde eine erhöhte Expression von Claudin 2 und eine erniedrigte Expression des abdichtenden Claudin 1 festgestellt. (Amasheh *et al.*, 2009b)

Die Barrierestörung führt neben der Diarrhoe dazu, dass bei prädisponierten Individuen das Immunsystem auf den vermehrten Kontakt mit luminalen Antigenen hin eine überschießende Immunreaktion gegen intestinale Mikroorganismen einleitet (Abb. 4). Auch die Zusammensetzung des enteralen Mikrobioms spielt hierbei eine Rolle. (Michielan und D'Incà, 2015; Chichlowski und Hale, 2008; Geremia *et al.*, 2014; Ananthakrishnan, 2015)

Im gesunden Darm treten Zellen des angeborenen Immunsystems (u.a. Dendritische Zellen und Makrophagen), sowie Epithelzellen und Myofibroblasten über sogenannte Pattern-recognition-Rezeptoren (PRR) durchgehend mit luminalen Antigenen und somit auch den intestinalen Mikroorganismen in Kontakt. Erkennen die PRR bestimmte Antigenmotive, sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), leiten sie über intrazelluläre Signalkaskaden eine unspezifische Immunantwort ein. Zudem präsentieren antigenpräsentierende Zellen wie die Dendritischen Zellen den Lymphozyten des erworbenen Immunsystems die entsprechenden Antigene und schütten proinflammatorische Mediatoren aus. Somit wird eine spezifische Immunantwort initiiert (Abb. 4). (Geremia *et al.*, 2014; Siegmund, 2020) Die Dendritischen Zellen können mittels ihrer PRR zwischen der Normalflora und pathogenen Mikroorganismen unterscheiden und tragen so zu der Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber dem intestinalen Mikrobiom bei. Sie können eine spezifische Immunantwort sowohl stimulieren als auch unterbinden. (Baumgart und Carding, 2007; Siegmund, 2020) Die Expression und die Signalwege der PRR werden stark reguliert, um diese Toleranz zu gewährleisten und überschießenden Immunreaktionen vorzubeugen. (Ahluwalia *et al.*, 2018) Bei den CED kommt es durch vermehrten Zelluntergang zusätzlich zur Freisetzung endogener Antigene,

sogenannter *danger-associated molecular patterns* (DAMPs), aus Epithelzellen, welche ebenfalls von PRR erkannt werden und zur Aufrechterhaltung der Inflammation beitragen können. (Siegmund, 2020; Mueller, 2012) Neben der Barrierestörung führen auch unterschiedliche Dysregulationen des angeborenen und erworbenen Immunsystems eine Rolle in der Pathogenese der CED. (Baumgart und Carding, 2007) Ein Beispiel für einen prädisponierenden Faktor für Morbus Crohn ist eine Mutation im NOD2-Gen. Dieses kodiert für NOD2, einen PRR, welcher über intrazelluläre Signalkaskaden und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B eine wichtige Rolle in der Regulation des intestinalen Mikrobioms (Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2009) sowie der Immunantworten des angeborenen und adaptiven Immunsystems auf die luminalen Antigene einnimmt. (Baumgart und Carding, 2007; Geremia *et al.*, 2014)

Ein zentraler Bestandteil dieser Immunantworten sind die Zytokine. Diese sind hormon-ähnliche Proteine, welche als Antwort auf verschiedene Arten von Stimuli von Leukozyten und einer Vielzahl weiterer Zelltypen produziert und ausgeschüttet werden. Über die Aktivierung verschiedenster Rezeptoren und intrazellulärer Signalkaskaden nehmen sie u.a. Einfluss auf die Immunantwort, Entzündungsreaktionen sowie die Proliferation und Differenzierung von Immunzellen. (Tayal und Kalra, 2008) T-Helferzellen (TH-Zellen) und regulatorische T-Lymphozyten reagieren als Teil des adaptiven Immunsystems auf die Zytokinausschüttung und Antigenpräsentation der mukosalen Zellen, produzieren ihrerseits Zytokine und können über eine Aktivierung der B-Lymphozyten auch eine humorale Immunantwort einleiten. (Siegmund, 2020)

Die von den verschiedenen T-Lymphozyten ausgeschütteten Zytokine sind die zentralen Mediatoren der inflammatorisch veränderten Mukosa bei Patient*innen mit CED. Hierbei unterscheidet man je nach Typ der T-Helferzelle mehrere Immunantworten mit jeweils verschiedenen Schlüsselzytokinen. Bei den CED spielen v.a. die Typ1-, Typ2- und Typ17-T-Helferzellen (TH1-, TH2-, TH17-Zellen) eine wichtige Rolle. (Geremia *et al.*, 2014)

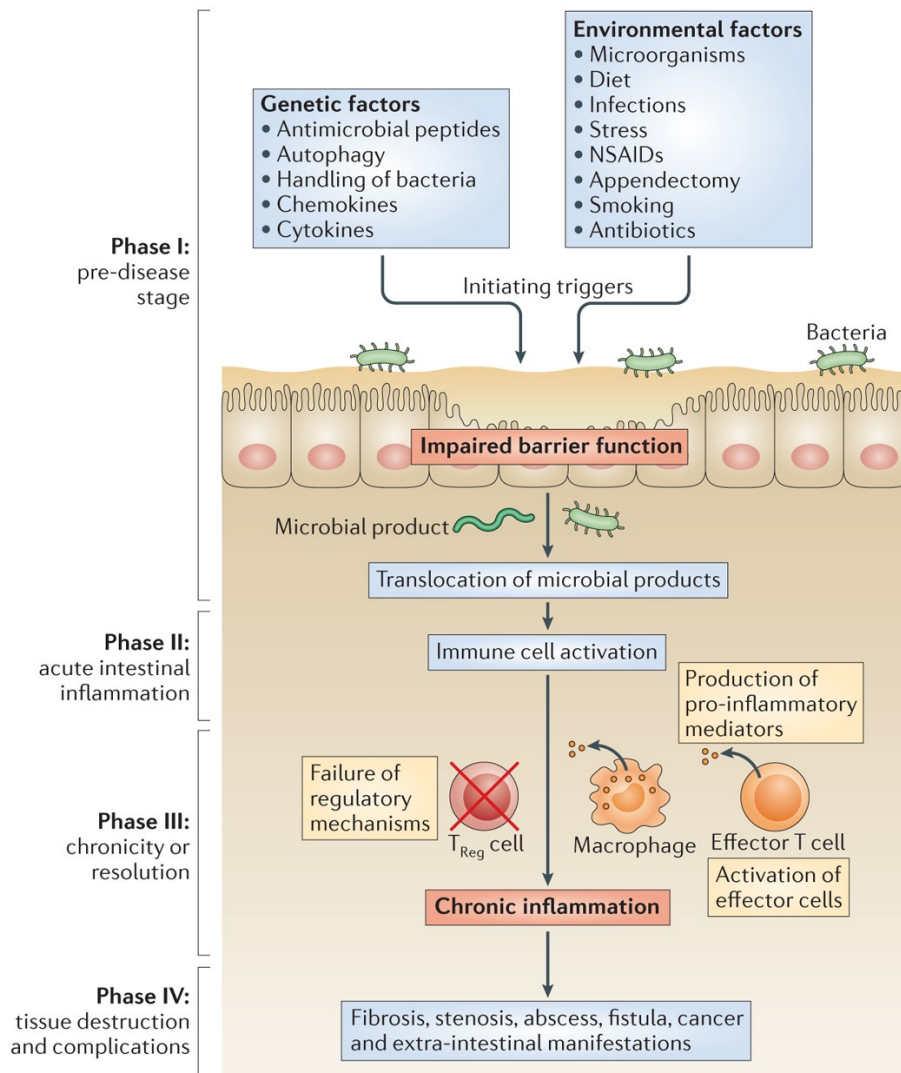


Abb. 4: Schematische Darstellung der Pathogenese der CED (Neurath, 2014, Figure 1). Genetische Prädisposition und zahlreiche Umweltfaktoren führen zu einer mukosalen Barriere-störung, welche wiederum eine Aktivierung verschiedener Immunzellen begünstigt. Die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch T-Zellen und beispielsweise Makrophagen, sowie der Ausfall regulatorischer Mechanismen führen zu einer chronischen Inflammation mit nachfolgenden Schäden wie Fibrose, Stenose, Abszessen, Fisteln und Kanzerogenese. (Neurath, 2014). NSAIDs = nichtsteroidale Antiphlogistika, T_{reg} cell = regulatorische T-Zellen

Beispielsweise produzieren TH1-Zellen vorwiegend die Zytokine Tumornekrosefaktor α (TNF α), sowie Interferon γ (IFN γ), welches u.a. die zusätzliche Ausschüttung von TNF α aus mukosalen Makrophagen stimuliert. (Geremia *et al.*, 2014) TNF α induziert über die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden zahlreiche proinflammatorische Reaktionen. Es stimuliert die Differenzierung stromaler Zellen zu Myofibroblasten und deren Produktion von Metalloproteasen. Letztere induzieren die Apoptose intestinaler Epithelzellen. (Geremia *et al.*, 2014) TNF α führt zudem zu vermehrter Angiogenese, dem Zelltod von Paneth-Zellen, der Aktivierung von

Makrophagen und T-Zellen, sowie zu der direkten Schädigung von intestinalen Epithelzellen über eine Aktivierung der Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK). (Neurath, 2014) Die Inkubation eines Epithelzellmodells mit $TNF\alpha$ führte zu einer vermehrten Expression von Claudin 2. Eine erhöhte Produktion von $TNF\alpha$ durch Lymphozyten in der Lamina propria ist demnach wahrscheinlich an der Zunahme der Expression von Claudin 2 bei Patient*innen mit Morbus Crohn beteiligt. (Zeissig *et al.*, 2007; Mankertz *et al.*, 2009) Im Mausmodell zeigten Raleigh *et al.* eine Zunahme der Expression von Tricellulin und MarvelD3 in jejunalen Epithelzellen nach intraperitonealer TNF-Gabe. Erhöhtes MarvelD3 wurde in der TJ, in apikalen und lateralen Membranen sowie in zytoplasmatischen Vesikeln detektiert. (Raleigh *et al.*, 2010)

Aufgrund seiner zentralen Rolle in der Pathophysiologie der CED sind die monoklonalen Antikörper gegen $TNF\alpha$ (z.B. Infliximab, Adalimumab) oder dessen Fragmente (Certolizumab) eine der wichtigsten Säulen der immunmodulatorischen Therapie. (Eder, Linke und Witowski, 2016) Da es jedoch auch Verläufe der CED gibt, welche kein gutes Ansprechen auf die Therapie mit Antikörpern gegen $TNF\alpha$ zeigen, ist die Entwicklung individualisierter, auf dem Zytokinprofil der CED basierender Therapien erstrebenswert. Auch die Proteine der durch die Zytokine ausgelösten Signalkaskaden stellen potentielle Angriffspunkte für die Therapie der CED dar. (Neurath, 2014) Neben $TNF\alpha$ spielen zahlreiche weitere Zytokine eine Rolle in der Pathophysiologie der CED. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die Zytokine gegeben werden, welche in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

IFN γ gehört zu der Gruppe der Interferone und gilt als inflammatorisches Zytokin. Im Darm wird es vorwiegend von TH1-Zellen und *Innate Lymphoid Cells* produziert, aktiviert Makrophagen, führt zu einer Zunahme der Prozessierung von Antigenen und induziert den Zelltod von Epithelzellen. (Neurath, 2014) Eine erhöhte Sekretion von IFN γ ist vor allem bei Patient*innen mit Morbus Crohn gemessen worden. (Fuss *et al.*, 1996)

Die Zytokine der IL-1-Familie werden vorrangig von Neutrophilen und Makrophagen produziert, stimulieren die Produktion weiterer Zytokine, aktivieren Immunzellen und spielen vor allem in der Initiation der CED eine entscheidende Rolle. (Neurath, 2014) Die Isoform IL-1 α ist vor allem im Zytosol oder auf Zellmembranen lokalisiert. Dort nimmt sie zellregulatorische Funktionen ein und fördert die Transkription proinflammatorischer Gene. Zudem kann IL-1 α sekretiert werden und extrazellulär

wirken. (Lopetuso, Chowdhry und Pizarro, 2013) In Darmbiopsien von an CED erkrankten Patient*innen wurde IL-1 α erhöht gemessen. (Ashwood *et al.*, 2004)

Transforming Growth Factor β (TGF β) kommt in den drei Isoformen TGF β 1, 2 und 3 vor (Lichtman, Otero-Vinas und Falanga, 2016) und gehört zu den antiinflammatorischen Zytokinen. Im Darm nimmt es Einfluss auf die mukosale Integrität, Wundheilung und Fibrose. Die epitheliale Barriere beeinflusst es u.a. über die Regulation der Expression von TJ-Proteinen und Adhäsionsmolekülen. In der intestinalen Immunantwort unterdrückt es nach der Exposition luminaler Antigene die Entzündungsreaktion und trägt so maßgeblich zur oralen Toleranz bei. (Ihara, Hirata und Koike, 2017) Smad3 ist ein intrazelluläres Protein, welches Bestandteil der Signalwege von TGF β ist. Das für Smad3 kodierende Gen ist einer der mit CED assoziierten Genloci. (Ihara, Hirata und Koike, 2017)

Bei der Colitis ulcerosa führt die Ausschüttung von Interleukin-13 (IL-13), welches teilweise synergistisch mit IL-4 zusammenwirkt, zu Fibrose, sowie zu einer erhöhten epithelialen Apoptoserate und damit zu mukosaler Ulzeration. (Neurath 2014) Zudem führt es zu einer veränderten TJ-Funktion mit erhöhter Expression des porenbildenden Claudin 2 und einer verminderten Expression von Tricellulin. (Heller *et al.*, 2005; Krug *et al.*, 2018) IL-4 induziert die Differenzierung naiver TH-Zellen zu TH2-Zellen, welche neben anderen Zytokinen ebenfalls IL-4 produzieren. (Moldoveanu, Diculescu und Braticevici, 2015; Siegmund, 2020)

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Zytokine eine maßgebliche Rolle in der Pathophysiologie der CED einnehmen. Es ist davon auszugehen, dass Veränderungen der Tight Junctions in der Darmschleimhaut von Patient*innen mit CED u.a. auf Veränderungen im Profil der lokalen Ausschüttung von Zytokinen beruhen. (Zeissig *et al.*, 2007) Welche Zytokine die Expression des Tight Junction-Proteins MarvelD3 beeinflussen, ist aktuell noch nicht bekannt.

2 Zielsetzung

MarvelD3 gehört zu den Tight Junction-Proteinen, deren Funktion in der Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere noch kaum erforscht ist.

Vorversuche an Sigmabiopsien gaben den Hinweis darauf, dass MarvelD3 ebenso wie einige andere Tight Junction-Proteine in der Pathogenese von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eine Rolle spielen könnte. Daher wurde seine Regulation in epithelialen Zellen, welche unterschiedlichen proinflammatorischen Reizen ausgesetzt waren, analysiert. Hierzu wurde die intestinale epitheliale Zelllinie HT-29/B6 dem Einfluss verschiedener Zytokine ausgesetzt und auf ihre MarvelD3-Expression sowie ihren transepithelialen Widerstand hin untersucht.

Aufgrund der bisher widersprüchlichen Aussagen über MarvelD3 in der Fachliteratur war das zweite Ziel der vorliegenden Arbeit, die Funktion des Tight Junction-Proteins MarvelD3 hinsichtlich seines Einflusses auf die Barrierefunktion von Epithelien zu untersuchen. Während Raleigh et al. MarvelD3 eine Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere zuschrieben, maßen Steed et al. einen erhöhten transepithelialen Widerstand in Zellen mit MarvelD3-Depletion. (Raleigh et al., 2010; Steed et al., 2009)

In dieser Arbeit wurde versucht, die Effekte von MarvelD3 auf die epitheliale Barriere in nieder- und hochohmigen Subzellen der epithelialen Zelllinie MDCK zu untersuchen. Hierzu wurden Überexpressionsklone generiert und diese auf ihre Tight Junction-Proteinexpression und elektrophysiologische Eigenschaften hin untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Zelllinien

3.1.1.1 HT-29/B6-Zellen

Die Zelllinie HT-29 wurde 1964 durch J. Fogh aus einem humanen Adenokarzinom des Kolons isoliert und beschrieben. (Chen *et al.*, 1987) HT-29/B6-Zellen sind ein Subklon dieser Zelllinie, welcher durch eine Glukose-freie Kultivierung der HT-29-Zellen entstand. HT-29/B6-Zellen wachsen als konfluente Monolayer und weisen einen TER von etwa 400 bis 700 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ auf. (Kreusel *et al.* 1991) Somit stellen sie ein gutes Modell für das Kolonepithel dar. Sie ähneln dem Kolonepithel zudem durch das Ausbilden von Zellkontakten wie den Tight Junctions, ihre Polarität, ihre Mukusproduktion und das Vorhandensein von Mikrovilli. (Mankertz *et al.*, 2000; Kreusel *et al.*, 1991)

3.1.1.2 MDCK-Zellen

Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)-Zellen wurden 1958 von S.H. Madin und N.B. Darby aus der Niere eines weiblichen Cockerspaniels isoliert und seitdem häufig als Epithelzellmodelle verwendet. (Dukes, Whitley und Chalmers, 2011)

Die zwei in dieser Arbeit verwendeten Subtypen der MDCK-Zelllinie sind zum einen die aus niedrigen Zellpassagen gewonnenen MDCK I-Zellen, sowie die aus höheren Zellpassagen gewonnene MDCK II-Zelllinie. (Barker *et al.* 1981; Dukes, Whitley und Chalmers, 2011)

MDCK I-Zellen repräsentieren dichte Epithelien und weisen transepitheliale Widerstände von über 1000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ auf. Damit gehören sie zu den hochohmigen Zellen. MDCK II-Zellen sind niederohmig und weisen transepitheliale Widerstände von unter 300 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ auf. Sie sind größer und höher als die MDCK I-Zellen. (Dukes, Whitley und Chalmers, 2011)

Neben der Morphologie unterscheidet die beiden Subtypen auch die Zusammensetzung ihrer Tight Junctions, die Ausprägung weiterer Zellkontakte sowie die Expression und Aktivität zahlreicher weiterer Membranproteine. Unter anderem wird in der MDCK I-Zelllinie kein Claudin 2 exprimiert, welches in MDCK II-Zellen zum niedrigeren TER beiträgt. (Dukes, Whitley und Chalmers, 2011; Furuse *et al.*, 2001)

3.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm
Antarktische Phosphatase	New England BioLabs, Frankfurt
10x Antarktische Phosphatase-Puffer	New England BioLabs, Frankfurt
Bacto™ Agar	BD, Life Sciences, Heidelberg
BamH I-Restriktionsendonuklease	New England BioLabs, Frankfurt
BCA Protein Assay Reagenz A und B	Pierce, Thermo Fisher, Rockford, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovines Serumalbumin (BSA)	Biomol, Hamburg
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
CutSmart-Puffer	New England BioLabs, Frankfurt
DAPI	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNA-Marker, 1 kb/100 bp DNA Ladder	New England BioLabs, Frankfurt
dNTPs	New England BioLabs, Frankfurt
Dulbecco's phosphate buffered saline mit/ohne Mg ²⁺ /Ca ²⁺ (PBS ^{+/-})	Thermo Fisher, Rockford, USA
Dulbecco's modified eagle medium (MEM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Invitrogen, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
FuGENE® HD-Transfektionsreagenz	Promega, Mannheim
GC-Puffer	New England BioLabs, Frankfurt
Geneticin (G418)	Thermo Fisher, Rockford, USA
D(+)-Glukose	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerol	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
Glycin	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe
LB-Medium-Powder	MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, Frankreich
Lumi-LightPLUS Western Blotting Kit	Roche, Mannheim
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt
Mannitol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Not I-Restriktionsendonuklease	New England BioLabs, Frankfurt
NucleoSpin Gel und PCR Clean up-Kit	Macherey-Nagel, Düren
One Shot Top 10F' kompetente Zellen	Invitrogen, Karlsruhe
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher, Rockford, USA
Penicillin-Streptomycin (100x)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Phusion® High Fidelity-DNA-Polymerase	New England BioLabs, Frankfurt
ProTaq® Mount Fluor	Biocyc, Luckenwalde
Proteaseinhibitor-Tabletten:	Roche, Mannheim
cOmplete Mini EDTA-free	
QIAGEN Plasmid Mini/Midi Kits	Qiagen, Hilden
Roswell Park Memorial Institute (RPMI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
1640 Medium	
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
S.O.C. Medium	Thermo Fisher, Rockford, USA
T4-DNA-Ligase und -Puffer	New England BioLabs, Frankfurt
50x TAE-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS (Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Vektor (p3XFLAG-CMV-10)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasser	Biochrom, Berlin
Ziegenserum	Sigma-Aldrich, Steinheim

Zytokine

Hersteller

Interferon γ (IFN γ)	PeproTech, Hamburg
Interleukin-1 α (IL-1 α)	PeproTech, Hamburg
Interleukin-4 (IL-4)	PeproTech, Hamburg
Interleukin-13 (IL-13)	PeproTech, Hamburg
Tumor Growth Factor β 1 (TGF β 1)	PeproTech, Hamburg
Tumor Growth Factor β 2 (TGF β 2)	PeproTech, Hamburg
Tumor Necrosis Factor α (TNF α)	PeproTech, Hamburg

Antikörper

Hersteller

Alexa Fluor 488 goat-anti-mouse IgG	Invitrogen, CA, USA
Alexa Fluor 594 goat-anti-rabbit IgG	Invitrogen, CA, USA
Anti- β -Aktin-Antikörper (mouse)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-Claudin 1/2/3-Antikörper (rabbit)	Invitrogen, CA, USA
Anti-Claudin 4-Antikörper (mouse)	Invitrogen, CA, USA
Anti-FLAG-Antikörper (mouse)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-MarvelD3-Antikörper (rabbit)	AG Jerrold Turner
Anti-Occludin-Antikörper (rabbit)	Invitrogen, CA, USA
Anti-Tricellulin-Antikörper (rabbit)	ABfinity, Invitrogen, CA, USA
Anti-ZO-1-Antikörper (rabbit)	Invitrogen, CA, USA

Oligonukleotide

Primer 737: N-CMV-30 FORWARD

Basensequenz (5-3'): AATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGC

Primer 738: C-CMV-24 REVERSE

Basensequenz (5-3'): TATTAGGACAAGGCTGGTGGGCAC

Primer 2016: MarvelD3 reverse BamHI
 Basensequenz (5'-3'): AAAAGGATCCTCAAAGAGTTCCAGACCCACAGA

Primer 2017: MarvelD3 forward NotI
 Basensequenz (5'-3'): AAGCGGCCGCAATGGAAGATCCGTCG

3.1.3 Puffer und Lösungen

<u>Agarosegel</u>	1 g 100 ml 5 µl	Agarose 1× TAE Ethidiumbromidlösung
<u>Blockierungslösung (Immunfluoreszenz)</u>	6% 1% ad	Ziegenserum BSA PBS ⁺
<u>BSA-Blockierungslösung (Western Blot)</u>	5 % 0,02 % ad	BSA Natriumazid PBS ⁺ oder TBST
<u>6× DNA-Probenpuffer</u>	40% 0,25% 5 mM	Sucrose Bromphenolblau EDTA pH 8,0
<u>Elektrophoresepuffer (Agarose-Gelelektrophorese)</u>	100 ml 250 µl ad 5 l	50× TAE Ethidiumbromidlösung H ₂ O
<u>Elektrophoresepuffer (SDS-PAGE)</u>	100 ml 10 ml ad 1 l	10× West-Puffer 10% SDS H ₂ O
<u>Ethidiumbromid-Lösung</u>	10 mg/ml	Ethidiumbromid in H ₂ O
<u>10× FSDT</u>	58 g 47.7 g 2,92 g 1,23 g 0,95 g ad 1 l	Tris-Base HEPES EDTA Natriumdisulfit N,N-Dimethylformamid H ₂ O
<u>Gesamtlysepuffer</u>	10 mM 150 mM 0,5% 0,1% pro 10 ml	Tris-Cl pH7,5 NaCl Triton-X-100 SDS 1 Tablette Proteaseinhibitor

<u>5× Laemmli-Probenpuffer</u>	2 g 1,54 g 5 ml 20 mg 10 ml ad 20 ml	SDS DTT 0,5 M Tris, pH 6,8 Bromphenolblau Glycerol H ₂ O
<u>LB-Medium (fest)</u>	4,5 g 300 ml 100 µg/ml	Bacto-Agar LB-Flüssigmedium Ampicillin
<u>LB-Medium (flüssig)</u>	25 g ad 1 l 100 µg/ml	LB-Medium-Powder H ₂ O Ampicillin
<u>1% Magermilchpulver in TBST</u>	1 g ad 100 ml	Magermilchpulver TBST
<u>Mannitol-Ringer-Lösung</u> pH 7,8 Mit Carbogen begasen	238 mM 21 mM 5,4 mM 1 mM 1,2 mM 3 mM 10 mM	Mannitol NaHCO ₃ KCl MgSO ₄ CaCl ₂ HEPES Glukose
<u>Natrium-Ringer-Lösung</u> pH 7,8 Mit Carbogen begasen	119 mM 21 mM 5,4 mM 1 mM 1,2 mM 3 mM 10 mM	NaCl NaHCO ₃ KCl MgSO ₄ CaCl ₂ HEPES Glucose
<u>Sammelgel</u>	9,8 ml 100 µl 100 µl 10 µl	Sammelgel-Lösung (vorgemischt) 10% SDS 10% APS TEMED
<u>Sammelgel-Lösung</u>	85 ml 125 ml 290 ml	30% Acrylamid 0,5 M Tris, pH 6,8 H ₂ O
<u>1× TAE</u>	40 mM 1 mM	Tris-Acetat pH 8,3 EDTA

<u>10× TBS</u>	400 g Tris ad 4,5 l Titration des pH-Wertes auf 7,3 mittels HCl ad 5 l	NaCl 60,5 g H ₂ O H ₂ O
<u>TBST</u>	500 ml 5 ml ad 5 l	10× TBS Tween-20 H ₂ O
<u>Transfer-Puffer (wet blot)</u>	100 ml 100 ml ad 1 l	10× West-Puffer Methanol H ₂ O
<u>Transfer-Puffer (semi-dry blot)</u>	100ml 200 ml ad 1 l	10× FSDT Methanol H ₂ O
<u>Trenngel (8,5%)</u>	5,7 ml 6,9 ml 7 ml 200 µl 200 µl 10 µl	30% Acrylamid-Lösung H ₂ O 1,5 M Tris pH 8,8 10% SDS 10% APS TEMED
<u>Trenngel (10%)</u>	6,7 ml 5,9 ml 7 ml 200 µl 200 µl 10 µl	30% Acrylamid-Lösung H ₂ O 1,5 M Tris pH 8,8 10% SDS 10% APS TEMED
<u>Trenngel (12,5%)</u>	8,2 ml 4,7 ml 7 ml 200 µl 200 µl 10 µl	30% Acrylamid-Lösung H ₂ O 1,5 M Tris pH 8,8 10% SDS 10% APS TEMED
<u>10× West-Puffer</u>	144 g 30,4 g ad 1 l	Glycin Tris H ₂ O

3.1.4 Geräte

Geräte

2720 Thermal Cycler
AccuBlock Heizblock
Agarose-Gelelektrophoresekammer
Begasungsbrutschränke, Inkubatoren
Feinwaage
Fusion Fx7
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop 510 META
Magnetrührer IKAMAG RCT
Magnetrührfische
Mikrotiterplatten-Lesegerät Infinite M200
Mini-PROTEAN® Tetra Cell/Blotting Module
Mr. Frosty™ Freezing Container
Netzgerät Power Pac 200
Pipetboy acu 2
SevenCompact pH-Meter S220
SpeedVac Univapo 100H
Sterilwerkbänke
Thriller Thermoshaker-Inkubator
Trans-Blot Turbo Transfer System
Ussing-Kammer

Vortexer RS-VA 10
Wasserbäder
Widerstandsmessgerät

Wiegeschüttler WT 15
Zentrifugen:
Qualitron DW-41
PerfectSpin 24R
Hermle Z 233 MK-2

Hersteller

Applied Biosystems, Darmstadt
Labnet, Edison, USA
Bio-Rad, Feldkirchen
Hearaeus, Hanau
Sartorius, Göttingen
Vilber Lourmat, Eberhardzell
Zeiss, Jena
IKA, Staufen
Merck, Darmstadt
Tecan, Männedorf, Schweiz
Bio-Rad, Feldkirchen
Thermo Fisher, Rockford, USA
Bio-Rad, Feldkirchen
Integra, Biebertal
Mettler-Toledo, Singapur
UniEquip, Martinsried
Thermo Electron Corporation
Peqlab, Erlangen
Bio-Rad, Feldkirchen
Institut f. Klinische Physiologie,
Charité Berlin
Phoenix, Garbsen
Köttermann, Uetze
Institut f. Klinische Physiologie,
Charité Berlin
Biometra, Göttingen

Artisan, Champaign, USA
Peqlab, Erlangen
HERMLE, Wehingen

3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien

Deckgläser
Einmal-Spritzen (1 ml, 20 ml)
Eppendorf-Gefäße (1,5 ml)
Falcon™-Röhrchen (15, 50 ml)
Filterpapier, Whatman® 3MM papers
Hamilton-Spritze
Kanülen: 20 G, 25 G
Kryo-Röhrchen
Mikrotiterplatten 96-Loch, transparent
Objektträger
Parafilm M® Laborfilm
Pipetten
Pipettenspitzen
PolyScreen PVDF-Transfermembran
Reaktionsgefäße

Hersteller

VWR, Darmstadt
BD, USA; B. Braun, Melsungen
Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Corning, Kaiserslautern
Whatman™, GE Healthcare, UK
HAMILTON, Darmstadt
BD, MD, USA
Sarstedt, Nürnberg
Carl Roth, Karlsruhe
Menzel-Gläser, Braunschweig
Bemis, Neenah, USA
Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Sarstedt, Nürnberg;
PerkinElmer, Rodgau
Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

SafeSeal-Gefäße	Sarsted, Nürnberg
Single-cap PCR-Gefäß	Biozym, Oldendorf
Skalpelle	FEATHER Safety Razor Co., Osaka, Japan
Transparentfolien	Soennecken, Overath
Zellkulturfiltereinsatz Millicell 3,0 /0,4 µm (PCF-Filter)	Merck Millicell, Darmstadt
Zellkulturflaschen	Corning; Thermo Fisher; BD
Zellkulturplatten	Corning, Kaiserslautern
Zellkulturschalen, unbeschichtet	Thermo Fisher, Rockford, USA
Zellschaber	Sarstedt, Nürnberg

3.1.6 Programme zur Datenerhebung und -auswertung

Programm	Hersteller
AIDA Image Analyzer Version 3.2.1	Raytest, Isotopenmessgeräte
Analogon	Institut f. Klinische Physiologie, CBF, Charité
Chromas	Technelysium Pty. Ltd.
Easywin Fitting, Version V6.0a	Tecan Trading AG
Excel – Microsoft Office	Microsoft Corporation
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, Inc
ZEN	Carl Zeiss Microimaging, LLC

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Proteinextraktion aus Zellmonolayern

Um die Zellen auf ihre Proteinexpression hin untersuchen zu können, mussten die Proteine zuerst aus den Zellen extrahiert werden. Durch die Anwendung von Lysepuffer, Zentrifugation und mechanischer Energie (Vortexen) wurde die Auflösung der Zellstruktur erwirkt und damit eine Proteinextraktion ermöglicht.

Zur Proteinextraktion wurden aus konfluent bewachsenen Flaschen und Filtern Zellen gewonnen. Hierzu wurde das Medium abgesaugt. Die Flaschen bzw. Filter wurden mit Magnesium- und Calcium-haltigem PBS (PBS⁺) gewaschen. Auf Eis wurde hiernach eiskalter Gesamtlysepuffer hinzugegeben. Danach wurden die Zellen mithilfe eines Zellscrapers abgeschabt und in ein Eppendorf-Tube überführt. Das Zelllysate wurde mehrmals gevortext, während es 30-60 Minuten lang auf Eis inkubiert wurde. Hierauf folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 15.000 × g und 4 °C. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20 °C gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

3.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Um die Proteinkonzentration der extrahierten Proteinproben zu bestimmen, wurde der erstmals durch Smith et al. beschriebene BCA-Assay (*Bicinchoninic Acid Assay*) angewendet. (Smith *et al.*, 1985) Dieser beruht darauf, dass zweiwertige Kupferionen (Cu²⁺) unter alkalischen Bedingungen mit Proteinen reagieren und reduziert werden (Cu¹⁺). Daraufhin bilden sie mit Bicinchoninsäure einen violetten Komplex mit einem Absorptionsmaximum von 562 nm. Durch Absorptionsmessung kann eine Berechnung der Proteinkonzentration erfolgen. Zum Abgleich dienen Eichreihen mit bereits bekannten Proteinkonzentrationen. (Walker, 1994; Rehm und Letzel, 2010)

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde der BCA-Assay von PierceTM (Thermo Fisher) verwendet. Auf Mikrotiterplatten wurden jeweils in Doppelansätzen die Eichreihe, die Kontrolle und die zu vermessenden Proben aufgetragen. Als Eichreihe dienten je 10 µl-BSA-Lösungen der Konzentrationen 0,2 mg/ml, 0,8 mg/ml und 1,2 mg/ml. Als Kontrolle dienten 10 µl des in der Proteinextraktion verwendeten Lysepuffers. Von den Proben wurden ebenfalls jeweils 10 µl verwendet, wobei diese häufig mit Lysepuffer vorverdünnt worden waren. Zu jedem Ansatz wurden hiernach 190 µl der BCA-Gebrauchslösung (bestehend aus 196 µl Reagenz A und 4 µl Reagenz B) hinzugefügt. Die Mikrotiterplatte wurde dann versiegelt, 30 Minuten lang bei 37 °C

inkubiert und auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Im Tecan Spectra-Photometer wurde dann die Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Basierend auf der Eichreihe wurden Proben gleicher Proteinkonzentrationen angesetzt und konnten weiter analysiert werden.

3.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) ermöglicht eine Analyse von Proteinen hinsichtlich ihres Molekulargewichtes. Hierzu werden die Proteine in geeigneten Konzentrationen angesetzt und mit Probenpuffer nach Laemmli versetzt. Das im Probenpuffer enthaltene SDS bindet an die Proteine, denaturiert sie und überdeckt ihre Eigenladung. Die SDS-Proteinkomplexe weisen hiernach eine negative Ladung auf. Durch eine kurze Hitzeeinwirkung wird die Denaturierung noch verstärkt. Die Proteine werden daraufhin auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung entsteht ein elektrisches Feld. Durch ihre negative Ladung bewegen sich die Proteine im Gel kontinuierlich zur Anode hin. Das Polyacrylamidgel besteht dabei aus zwei unterschiedlichen Teilen. Zuerst durchlaufen die Proteine ein Sammelgel mit einem pH von 6,8, einer niedrigen Acrylamidkonzentration und damit größeren Poren und werden aufkonzentriert. Im Trenngel mit basischem pH, höherer Acrylamidkonzentration und kleineren Poren werden die Proteine dann nach Molekulargewicht aufgetrennt. Proteine mit geringerem Molekulargewicht wandern schneller, Proteine mit hohem Molekulargewicht langsamer durch das Gel.

Anhand des im Probenpuffer vorhandenen Bromphenolblaus ist die Lauffront der Proben gut erkennbar. So kann die Elektrophorese beendet werden, bevor die Proteine das Gel wieder verlassen. Zusätzlich zu den Proteinproben wird ein Größenmarker aufgetragen, der die spätere Größenordnung der Proteine erlaubt. (Garfin, 2009; Rehm und Letzel, 2010)

Zunächst wurde ein etwa 6 cm hohes Trenngel (Acrylamidanteil 8,5%, 10% oder 12,5%) gegossen und mit einem Milliliter absolutem Ethanol bedeckt, um eine glatte Geloberfläche herzustellen. Nach einer Polymerisationszeit von 30 Minuten wurde der Alkohol abgegossen, das Sammelgel gegossen und ein Kamm in das Sammelgel eingelassen. Nach erneuter 30-minütiger Polymerisation wurde das Gel in die Elektrodenhalterung eingespannt und in eine Elektrophoresekammer eingesetzt. Diese

wurde mit Elektrophoresepuffer befüllt. Der Kamm wurde entfernt und die Taschen mit Elektrophoresepuffer gespült.

Die Proteinproben wurden im Verhältnis 4:1 mit 5×-Laemmli-Puffer und Gesamtyse-puffer versetzt, wobei die Lysepuffermenge sich jeweils nach der Proteinkonzentra-tion der Probe richtete. Anschließend wurden die Proben fünf Minuten lang auf 95°C erhitzt. Pro Geltasche wurden dann mithilfe einer Hamilton-Spritze 20 µl Probe auf-getragen. Einmalig erfolgte die Auftragung von 5 µl eines entsprechenden Größen-markers. Die Gelelektrophorese fand bei einer konstanten Spannung von 100 V statt bis die gewünschte Laufweite erreicht war. Anschließend konnte das Gel aus der Halterung und den Glasplatten herausgelöst und weiterverarbeitet werden.

3.2.4 Western Blot

Der 1979 eingeführte Western Blot ermöglicht es, Proteine elektrophoretisch von ei-nem Polyacrylamid-Gel auf eine Membran zu übertragen und durch immunologische Methoden sichtbar zu machen. (Towbin, Staehelin und Gordon, 1979; Rehm und Letzel, 2010)

Um die Proteine vom Gel auf die Membran zu übertragen, werden beide Komponen-ten von Filtern umgeben übereinander gelegt. In einem Semi-Dry- oder Tank-Blotter gewährleistet ein senkrecht zur Geloberfläche angelegtes elektrisches Feld, dass die negativ geladenen Proteine zur Anode hin vom Gel auf die Membran wandern. Nach der Übertragung der Proteine wird die Membran in einer Blockierungslösung inku-biert, sodass freie Bindungsstellen auf der Membran besetzt werden und Antikörper nicht unspezifisch an diese binden. Hiernach wird die Membran im Primärantikörper (anti-Antigen-Antikörper) inkubiert. Dieser bindet an bestimmte in der Membran vor-handene Proteine. Hiernach erfolgt die Inkubation im Sekundärantikörper (anti-IgG-Antikörper). Dieser bindet an den Primärantikörper und ist mit einer Peroxidase mar-kiert. Während der Inkubation der Membran in einer Luminol-haltigen Lösung oxidiert diese Peroxidase das Luminol und löst damit eine Chemilumineszenz aus. Auf diese Weise können die Proteinbanden sichtbar gemacht werden. (Mahmood und Yang, 2012; Rehm und Letzel, 2010) Die Intensität der Lumineszenz kann mithilfe einer eigens dafür ausgelegten Software ausgewertet werden und auf die vorhandene Menge Protein rückschließen lassen.

Für die Durchführung der Western Blots wurden Semi-Dry- oder Tank-Blotter verwendet. Ungeachtet des Verfahrens wurde zunächst eine zugeschnittene

Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran erst in absolutem Ethanol und dann in Transferpuffer vorinkubiert.

Für den Transfer im Semi-Dry-Blotter wurden drei ebenfalls in Transferpuffer (in diesem Fall FSDT) angefeuchtete Filter in eine Kassette des Semi-Dry-Blotters gelegt und mit der PVDF-Membran bedeckt. Hierauf wurde das in Transferpuffer von den Glasscheiben gelöste SDS-Gel gelegt und wiederum mit drei angefeuchteten Filtern bedeckt. Luftblasen wurden ausgestrichen. Hiernach wurde die Kassette in den Blotter gelegt. Als Programm wurde ein eigens auf den FSDT-Puffer abgestimmtes Programm des Semi-Dry Blotters verwendet.

Für den Transfer im Tank-Blotter wurden ebenfalls alle Bestandteile in Transferpuffer inkubiert. Hiernach wurden folgende Komponenten luftblasenfrei zusammengesetzt:

Klares Panel | Schwamm | Whatman-Filter | PVDF- Membran | SDS-Gel | Whatman-Filter | Schwamm | Schwarzes Panel

Dieses Sandwich wurde dann in einem Transfereinsatz mit einem Kühlakku und einem Rührfisch in eine Elektrophoresekammer eingesetzt, welche mit Transferpuffer befüllt wurde. Die Kammer befand sich hierbei auf einem Magnetrührer. Es wurde eine Stunde lang eine Spannung von 100 V angelegt.

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde diese kurz in TBST gespült. Danach wurde sie bei Raumtemperatur für zwei Stunden unter Schwenken in BSA- oder Milchpulver-Blockierungslösung inkubiert (alternativ o/n 4 °C). Hiernach wurde die Membran in einer BSA-basierten Primärantikörperlösung ebenfalls für zwei Stunden bei Raumtemperatur (alternativ o/n 4 °C) geschwenkt.

Primärantikörper	Verdünnung
rabbit anti-MarvelD3	1:1000
rabbit anti-Tricellulin	1:2000
rabbit anti-Occludin	1:1000
rabbit anti-Claudin 1-3	1:1000
mouse anti-β-Aktin	1:10.000
mouse anti-Claudin 4	1:1000
mouse anti-FLAG	1:6000

Nach dreimaligem, zehnminütigem Waschen in TBST, wurden die Membranen dann zwei Stunden bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Sekundärantikörper

(Verdünnung: 1:10.000) inkubiert. Letzterer befand sich in einer Blockierungslösung aus 1% Magermilchpulver oder 1% Blocking Reagent in TBST.

Anschließend wurde die Membran erneut dreimal für zehn Minuten in TBST gewaschen, fünf Minuten lang im Dunkeln in eine Luminol-haltige Lumilight-Lösung (Roche) und dann zwischen zwei Folien gelegt. So konnte die Lumineszenz im Fusion Fx7 gemessen werden. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit der Software AIDA.

3.2.5 Immunfluoreszenzfärbung

Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Zellmonolayern erlaubt eine Visualisierung der Proteine innerhalb und zwischen Zellen. Hierzu werden Zellen mit Methanol bei -20 °C auf einem Deckgläschen fixiert. Nach einer Permeabilisierung der Zellmembran mittels Triton X-100 und einer Blockierung freier Bindungsstellen durch die Inkubation in einer Blockierungslösung bindet ein Primärantikörper an das zu untersuchende Protein. Ein an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelter Sekundärantikörper bindet dann an den Primärantikörper. Der Fluoreszenzfarbstoff kann daraufhin mithilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops sichtbar gemacht werden.

Es wurden Zellen auf Deckgläschen ausgesät. Hierzu wurden jeweils 200 µl Zellsuspension auf ein Deckgläschen gegeben und vier bis fünf Tage lang bei 37 °C inkubiert, um ein dichtes Wachstum der Zellen zu gewährleisten. Die mit Zellen bewachsenen Deckgläschen wurden in Magnesium- und Calcium-haltigem PBS (PBS⁺) gewaschen und dann bei -20 °C für 20 Minuten in Methanol fixiert. Die Zellen wurden erneut mit PBS⁺ gewaschen und dann für sieben Minuten bei Raumtemperatur mit 0,5% Triton X-100 (in PBS⁺) inkubiert, um eine Permeabilisierung der Zellen zu erzielen. Hiernach erfolgte eine 20-minütige Blockierung mit 5% Goat-Serum (in PBS⁺) (alternativ 4 °C o/n). Die Zellen konnten dann für eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper (Verdünnung: mouse anti-FLAG 1:500, rabbit anti-ZO-1 1:200) inkubiert werden. Die Zellen wurden zweimal mit Blockierungslösung oder PBS⁺ gewaschen. Darauf folgte die 45-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Verdünnung: 1:500) und DAPI (Verdünnung: 1:1000). Diese erfolgte im Dunkeln bei 37 °C. DAPI diente zum Anfärben der Zellkerne. Sowohl der Primär- als auch der Sekundärantikörper wurden in Blockierungslösung angesetzt. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die Deckgläschen mit PBS⁺ gewaschen und anschließend mit destilliertem Wasser und Ethanol abgespült.

Hiernach konnten die Deckgläschen auf Objektträger gelegt, mit ProTaq[®] MountFluor fixiert werden und im Dunkeln aushärten.

Unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop konnte dann anhand der Fluoreszenz auf die Lokalisation der gefärbten Proteine rückgeschlossen werden. Die Lokalisation von MarvelD3 wurde mit der Lokalisation des Tight Junction-Markers ZO-1 verglichen. Je nach Sekundärantikörper wurden hierzu Wellenlängen von 594 nm (rot) und 488 nm (grün) sowie 408 nm (blau für DAPI) und verschiedene Objektive verwendet. Zur Aufnahme wurde die Software ZEN verwendet.

3.2.6 Umklonierung in einen Expressionsvektor

Um MarvelD3-Überexpressionsklone herstellen zu können, musste das für MarvelD3 kodierende Gen aus einem Klonierungsvektor in einen Expressionsvektor umkloniert werden. Dieser ermöglicht später eine Überexpression von MarvelD3 in den Zellen, in die er eingebracht wird. Die Klonierung erfolgte gemeinsam mit PD Dr. Susanne Krug und Eva Perusich.

3.2.6.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt und von Saiki et al. (Saiki *et al.*, 1985) erstmals publiziert. Sie dient dazu, einen bestimmten DNA-Abschnitt zu vervielfältigen. (Müller und Prange, 2016)

Die Reaktion läuft in einem Thermocycler in mehreren Wiederholungen dreier Reaktionsschritte ab. Zuerst führt die Denaturierung des DNA-Templates durch Hitze dazu, dass die DNA-Doppelstränge aufgetrennt werden und als Einzelstränge vorliegen. Hiernach findet eine Anlagerung (Annealing) zweier Oligonukleotidprimer an die Einzelstränge, genauer an das 5'- und 3'-Ende der zu vervielfältigenden Gensequenz statt. Dies ist möglich, weil die Primer jeweils eine komplementäre Sequenz zu dem Einzelstrangabschnitt aufweisen, an den sie binden. Die optimale Annealing-Temperatur hängt von der Länge und Sequenz der Oligonukleotidprimer ab und muss vor der Durchführung der PCR bestimmt werden. In der Elongationsphase werden die Primer dann in Anwesenheit von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) von einer hitzestabilen DNA-Polymerase verlängert. Dabei beginnt die Polymerase jeweils am 3'-Ende des Primers mit ihrer DNA-Synthese. Die Temperatur in der Elongationsphase hängt von der Art der DNA-Polymerase, die Elongationszeit von der Länge des zu amplifizierenden Genabschnittes und der Geschwindigkeit der

DNA-Synthese durch die Polymerase ab. Mehrere Zyklen dieser Reaktionsschritte ermöglichen eine exponentielle Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnitts. Nach dem letzten Zyklus wird es der DNA-Polymerase in einem Extensionsschritt ermöglicht, die Elongation unvollständig verlängerter Gensequenzen zu beenden. (Müller und Prange, 2016) In dieser Arbeit wurde die Phusion® High Fidelity DNA-Polymerase von NEB verwendet. Sie wird künstlich hergestellt und weist im Vergleich zu älteren Polymerasen eine deutlich höhere Geschwindigkeit der DNA-Synthese und eine niedrigere Fehlerquote auf. (New England Biolabs, 2021)

Das Template für die PCR huMARVELD3/pEGFP-C1 (Midi #1109) erhielten wir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Jerrold Turner. Hierbei handelte es sich um einen Klonierungsvektor, welcher das für MarvelD3 kodierende Gen beinhaltete. Um die Überführung des Inserts in einen Expressionsvektor zu ermöglichen, wurden die Primer so ausgewählt, dass die zu vervielfältigende Gensequenz auch die Schnittstellen der später eingesetzten Restriktionsenzyme Not I (Primer 2016) und BamH I (Primer 2017) enthielt.

Zur Durchführung der PCR wurde folgender PCR-Ansatz zusammenpipettiert:

PCR-Ansatz (50 µl):

5 µl	DMSO
10 µl	5× GC-Puffer
2,5 µl	10 µM Primer 2016 (forward)
2,5 µl	10 µM Primer 2017 (reverse)
1 µl	Template huMARVELD3/pEGFP-C1
1 µl	10 mM dNTP-Mix
0,3 µl	Phusion® High Fidelity DNA-Polymerase
27,7 µl	H ₂ O

Hiernach wurde der Ansatz in einen Thermocycler gestellt, in dem folgendes PCR-Programm ausgewählt wurde:

PCR-Programm:

	98 °C	5:00
30 Zyklen:	98 °C	0:30
	43 °C	0:30
	72 °C	1:00
	72 °C	5:00
	4 °C	∞

3.2.6.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA hinsichtlich ihrer Größe. Nach Ablauf der PCR kann die amplifizierte Sequenz mittels Agarosegelelektrophorese auf ihre Größe hin überprüft werden.

Dabei werden DNA-Moleküle neben einem Größenmarker auf ein Gel aufgetragen, an welches eine Spannung angelegt wird. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern im entstandenen elektrischen Feld in Richtung der Anode. Das Gel weist abhängig von der Agarosekonzentration eine mehr oder weniger engmaschige Netzstruktur auf, welche große DNA-Moleküle stärker zurückhält als kleine. Um die Nucleinsäuren im Gel sichtbar zu machen, verwendet man Ethidiumbromid, welches zwischen den Basenpaaren in die Doppelhelix eingebaut wird, sodass die DNA bei Anregung mit ultraviolettem Licht längerwelliges Licht emittiert. (Müller und Prange, 2016) Durch Bestrahlung des Gels mit UV-Licht können so die DNA-Fragmente visualisiert, mit dem Größenmarker verglichen und anschließend zur weiteren Verarbeitung dem Gel entnommen werden.

Für die Agarosegelelektrophorese wurde Agarose in 1× TAE / 0,5 µg/ml Ethidiumbromid aufgeköcht. Das Gel wurde nach Abkühlen auf ca. 50°C in einen speziell dafür ausgelegten Gießstand gegossen, Luftblasen wurden entfernt und ein Kamm für die Herstellung von Taschen zur Probenauftragung in das Gel eingelassen. Anschließend wurde das Gel aushärten gelassen. Hiernach wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer eingebaut, welche mit 1× TAE / 0,5µg/ml Ethidiumbromid befüllt wurde.

Die DNA-Suspension wurde im Verhältnis 5:1 mit 6× DNA-Probenpuffer gemischt und nach Entfernung des Kammes neben einem Größenmarker in die Geltaschen geladen. Der Probenpuffer enthielt dabei Bromphenolblau, welches die Beurteilung der Probenlaufweite ermöglichte. Eine Spannung von 80 V wurde angelegt, was zur Folge hatte, dass die DNA-Fragmente sich in Richtung der Anode bewegten und aufgetrennt wurden. Die Visualisierung erfolgte mittels UV-Licht. Das gewünschte Genfragment konnte aus dem Gel ausgeschnitten und weiterverarbeitet werden.

3.2.6.3 PCR-Gelextraktion

Um das PCR-Produkt weiter verwenden zu können, muss es wieder aus dem Agarosegel extrahiert werden. Das PCR-Produkt wird aus dem Gel herausgeschnitten.

Dieses Gelstück wird anschließend thermisch gelöst. Hiernach wird durch mehrere Zentrifugationsschritte zuerst die DNA in einer Membran gebunden, gewaschen und dann getrocknet. Am Ende wird die DNA wieder in Lösung gebracht.

Zur Gelextraktion wurde das NucleoSpin-Kit von Macherey-Nagel verwendet. Zuerst wurde unter einer UV-Lampe das Gelfragment mittels eines Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Hiernach wurden 200 µl des Bindungspuffers NT1 pro 100 mg Gel zusammen mit dem Gelstück in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und 5-10 Minuten lang einer Temperatur von 50 °C ausgesetzt. Hiernach erfolgte eine Zentrifugation bei 11000 × g für 30 Sekunden in einem eigens dafür hergestellten Gefäß mit eingebauter Silika-Membran. Dann wurden 700 µl des Waschpuffers NT3 hinzugegeben und das Röhrchen wiederum für 30 Sekunden bei 11.000 × g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt zwei Mal wiederholt. Während einer erneuten Zentrifugation bei 11.000 × g für eine Minute trocknete die Silika-Membran. Hiernach konnte die DNA erneut in Wasser oder dem Elutionspuffer NE gelöst werden.

3.2.6.4 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung

Um das gewünschte Genfragment in einen Expressionsvektor überführen zu können, muss das Genfragment mithilfe entsprechender Restriktionsenzyme vorbereitet werden. Die Restriktionsenzyme erkennen dabei bestimmte Sequenzen und zerschneiden diese spezifisch. Der Expressionsvektor wird mit denselben Restriktionsendonukleasen inkubiert und so für die Ligation vorbereitet. Nach dem Restriktionsverdau erfolgt eine Inaktivierung der Enzyme durch Hitze.

Als Restriktionsenzyme fungierten Not I und BamH I. Für den Restriktionsverdau wurden folgende Ansätze zwei Stunden lang bei 37°C inkubiert:

Restriktionsverdau-Ansätze:

1. Insert (70 µl):

50 µl	PCR-Ansatz
7 µl	CutSmart-Puffer
3 µl	Restriktionsenzym BamH I
3 µl	Restriktionsenzym Not I
7 µl	H ₂ O

2. Expressionsvektor (70 µl):

10 µl	pCMV10 (Midi 635)
7 µl	CutSmart-Puffer
3 µl	Restriktionsenzym BamH I
3 µl	Restriktionsenzym Not I
47 µl	H ₂ O

Hiernach erfolgte ein Erhitzen der Ansätze auf 65 °C für 20 Minuten. Der Erfolg des Restriktionsverdau wurde mittels einer Agarosegelelektrophorese überprüft. Zudem erfolgte eine Abschätzung der DNA-Konzentration des Vektors und des Inserts durch den Vergleich mit den Konzentrationsangaben des DNA-Größenmarkers.

Um zu verhindern, dass die Enden des aufgeschnittenen Expressionsvektors sich während der Ligation wieder miteinander verbinden, erfolgte eine Dephosphorylierung des Vektors mittels einer Phosphatase. Hierfür wurde folgender Ansatz über eine Stunde bei 37 °C inkubiert:

Dephosphorylierungs-Ansatz (80 µl):

70 µl	Expressionsvektor-Ansatz nach Restriktionsverdau (s.o.)
8 µl	10× Antarktische Phosphatase-Puffer
2 µl	Antarktische Phosphatase

3.2.6.5 Ligation in einen Expressionsvektor

Bei der Ligation wird das Genfragment durch die enzymatische Verknüpfung zweier DNA-Segmente in einen Expressionsvektor eingefügt. Als Enzym dient die T4-Ligase.

Bei dem verwendeten Vektor handelte es sich um den Expressionsvektor p3XFLAG-CMV-10. (pCMV10, Abb. 5)

Der Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Ligationsansatz (10 µl):

7 µl	MarvelD3-Insert nach Restriktionsverdau
1 µl	Expressionsvektor pCMV10 nach Restriktionsverdau und Dephosphorylierung
1 µl	10× Ligasepuffer
1 µl	T4-DNA-Ligase

Die Ligation lief bei 14 °C über Nacht ab. Hiernach wurde der Ansatz auf Eis gestellt und konnte für die Transformation verwendet werden.

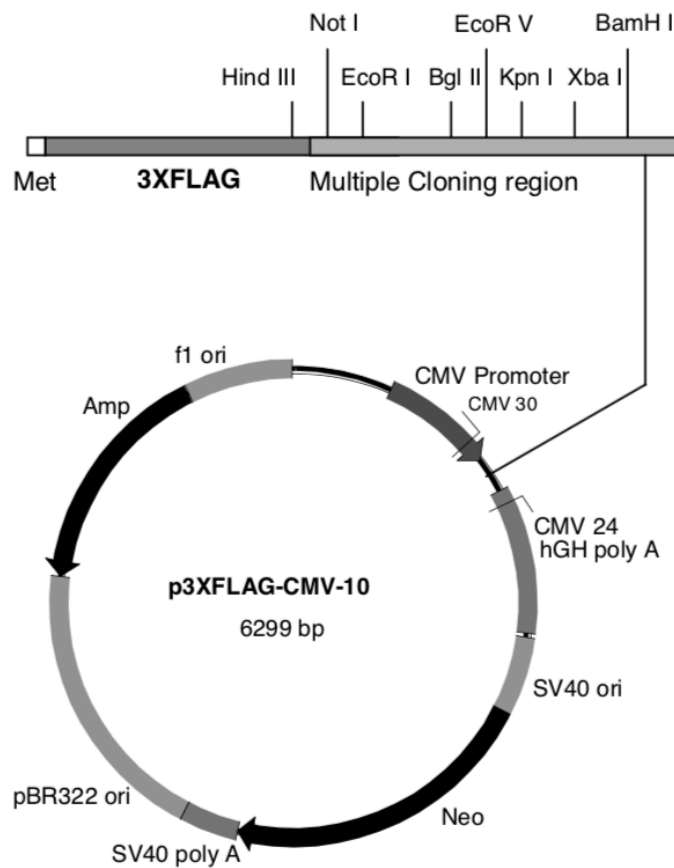


Abb. 5: Vektorkarte des Expressionsvektors **p3XFLAG-CMV-10** mit detaillierter Darstellung der Multiple Cloning Site (ProductInformation, Product No. E 4401, Sigma-Aldrich)

3.2.7 Transformation

Nach der Ligation kann der modifizierte Expressionsvektor (= Plasmid) durch eine Transformation in Bakterien eingebracht werden, um anschließend vervielfältigt oder archiviert werden zu können. Der Begriff Transformation steht hierbei für die Aufnahme exogener DNA durch Bakterien. Diese müssen „kompetent“, d.h. in der Lage sein, exogene DNA aufzunehmen. Bei der Herstellung kompetenter Bakterien kommen verschiedene chemische, physikalische und elektrische Methoden zur Anwendung, welche die Permeabilität der bakteriellen Zellmembran erhöhen. (Ren *et al.*, 2019) Bei hohen Temperaturen gelangt das Plasmid in die kompetenten Bakterienzellen. Hiernach werden diese auf Platten mit Ampicillin-haltigem Medium ausgestrichen und selektiert: Da nur die Bakterien, welche das Plasmid aufgenommen haben, über ein Ampicillin-Resistenzgen verfügen, wachsen auch nur diese auf den Platten. Die transformierten Zellen können dann weiterverarbeitet werden.

Die kompetenten Zellen (50 µl) - in diesem Falle chemisch kompetente *Escherichia coli* - Zellen namens One Shot Top 10F' (Invitrogen) - wurden bei -80 °C gelagert. Vor der Transformation wurden sie auf Eis aufgetaut. 4 µl des Ligationsansatzes wurden vorsichtig unter den Zellen verrührt. Diese wurden dann 30 Minuten lang auf Eis inkubiert. Im Wasserbad erfolgte dann 45 Sekunden lang bei 42°C ein Hitzeschock der Zellen, wonach diese umgehend auf Eis gestellt wurden. Nach einer zweiminütigen Inkubation auf Eis wurden 250 µl S.O.C.-Medium zugegeben. Dann wurde der Ansatz eine Stunde lang bei 37 °C und 200 rpm schütteln gelassen. 150 µl des Ansatzes wurden dann auf LB-Platten, welche 100 µg/ml Ampicillin enthielten, ausplattiert. Über Nacht wurden die Platten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Mit einem Teil der Klone wurden Flüssigkeitskulturen angeimpft, die dann zur Plasmidisolierung herangezogen werden konnten.

3.2.8 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung dient dazu, Plasmide aus Bakterien zu isolieren, um sie dann weiter verwenden zu können. Hierzu wird ein Ampicillin-haltiges Flüssigmedium mit den entsprechenden Bakterienkolonien angeimpft. Nach einer Inkubationszeit wird ein Teil der flüssigen Bakterienkultur zentrifugiert, sodass ein Pellet entsteht, welches nur die Bakterien enthält. Dieses wird in einem Tris-Cl-EDTA-haltigen Puffer resuspendiert. Die Zugabe eines SDS- und NaOH-haltigen Puffers führt zu einer Zelllyse und einer Denaturierung der chromosomalen DNA, der Plasmid-DNA sowie der Proteine. Eine RNase verdaut die in den Zellen befindliche RNA. Hiernach erfolgt eine Zugabe von Kaliumacetat. Die hohe Konzentration an Salzen führt dazu, dass die denaturierten Proteine, die chromosomale DNA sowie Zelldebris ausfallen und sich in unlöslichen Komplexen sammeln. Die Plasmid-DNA mit ihrer zirkulären Struktur renaturiert und bleibt in Lösung. (Qiagen, 2013-21)

Für die Plasmidisolierung wurden Plasmidisolations-Kits von QIAGEN verwendet.

Es wurden 4 ml LB-Flüssigmedium mit 50-100 µg/ml Ampicillin versetzt, mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Am Tag darauf wurden 1,5 ml dieser Bakteriensuspension in ein Eppendorf-Tube überführt, welches für eine Minute bei 5.000 rpm zentrifugiert wurde. Hiernach wurde der Überstand abgegossen und das Pellet, welches die Bakterien enthielt, in 300 µl P1-Puffer (Tris-Cl, EDTA, RNase) durch Vortexen resuspendiert.

Dann wurden 300 µl P2-Puffer (NaOH, SDS) hinzugegeben und der Ansatz vorsichtig invertiert. Es erfolgte die Zugabe von 300µl P3-Puffer (Kaliumacetat), wonach der Ansatz erneut vorsichtig invertiert wurde. Der Ansatz wurde 15 Minuten lang bei 4 °C inkubiert und dann 15 Minuten lang bei >13.000 rpm und 4 °C (alternativ bei Raumtemperatur) zentrifugiert. Das Pellet beinhaltete hiernach die ausgefallene DNA und wurde verworfen. 800µl des Überstandes wurden mit 400 µl Isopropanol gemischt, was dazu führte, dass die Plasmid-DNA ausfiel. Nach erneuter Zentrifugation für 15 Minuten bei 4 °C (alternativ bei Raumtemperatur) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen. Es erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation bei >13.000 rpm und Raumtemperatur. Hiernach wurde der Überstand schnell abgegossen und das Pellet ungefähr 20 Minuten lang in der SpeedVac getrocknet. Das Pellet wurde dann in 50 µl sterilem H₂O resuspendiert, gevortext und 20 Minuten lang inkubiert.

Das gleiche Vorgehen wurde ebenfalls in größerem Maßstab als Midiprep durchgeführt, nachdem die Sequenzierung (3.2.9) die korrekten Plasmide identifiziert hatte. Die Schritte der Plasmidisolierung erfolgten mit größeren Ansätzen, waren jedoch prinzipiell ähnlich.

3.2.9 Sequenzierung

Mithilfe einer DNA-Sequenzierung kann überprüft werden, ob die Basensequenz des in den Expressionsvektor eingebauten Gens der erwarteten Sequenz entspricht. Die Sequenzierung nach Sanger (Sanger, Nicklen und Coulson, 1977) ermöglicht eine Analyse der Abfolge von Nukleotiden in einem DNA-Molekül. Mittlerweile gibt es auch viele weitere Sequenzierungsverfahren, die zum Einsatz kommen. Im Folgenden soll kurz das Prinzip der Sequenzierung nach Sanger ohne radioaktive Marker beschrieben werden.

Neben den für eine PCR notwendigen Bestandteilen (siehe Abschnitt 3.2.6.1) werden für die Sequenzierung chemisch veränderte dNTPs benötigt. Die vier verschiedenen Didesoxynukleotide (ddNTP) ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP werden jeweils an unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt und zum Reaktionsansatz hinzugegeben. In diesem läuft dann eine PCR ab. Neben den dNTPs werden von der DNA-Polymerase per Zufallsprinzip immer wieder auch die fluoreszenzmarkierten ddNTPs zur Elongation der Primer verwendet. Dies führt jedoch zu einem Abbruch der DNA-Synthese, da den ddNTPs die 3'Hydroxylgruppe fehlt, an welche im

Normalfall das nächste Nukleotid angereicht wird. So entstehen DNA-Fragmente verschiedenster Länge, welche auf jeweils unterschiedliche ddNTPs enden. Nach erfolgter PCR durchlaufen die DNA-Fragmente eine Gelelektrophorese und werden ihrer Größe nach aufgetrennt. Währenddessen werden die Fluoreszenzfarbstoffe der ddNTPs mittels Laser angeregt und registriert, sodass die Sequenzabfolge ermittelt werden kann. (Mülhardt, 2013)

Die Sequenzierung des Expressionsvektors erfolgte bei einer auswärtigen Firma. Die PCR-Ansätze wurden mit einem der Primer (737 und 738) versetzt und anschließend zur Sequenzierung eingeschickt. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mithilfe der Software Chromas ausgewertet.

3.2.10 Glycerolstocks

Die Zugabe von Glycerol zu flüssigen Bakterienkulturen ermöglicht deren längerfristige Aufbewahrung bei -80 °C.

500 µl der Bakterienkulturen wurden nach erfolgreicher Transformation mit 500 µl Glycerol versetzt, gevortext und dann in flüssigem Stickstoff schnell tiefgekühlt. Hiernach konnten sie bei -80 °C gelagert werden.

3.3 Zellkultur

Alle Arbeiten an der Zellkultur wurden gemeinsam mit PD Dr. Susanne Krug durchgeführt.

3.3.1 Zellkultur allgemein

Die Zellen wurden in sterilen Zellkulturflaschen und -filtern kultiviert und bei 37 °C und 5% CO₂ in Brutschränken gelagert. In großen Flaschen (75 cm²) befanden sich 20 ml, in kleinen Flaschen (25 cm²) 5 ml und auf Zellkulturfiltern (0,6 cm²) 0,6 ml des jeweiligen Nährmediums, welches jeden zweiten bis dritten Tag gewechselt wurde. Für MDCK-Zellen wurde Minimal essential Medium (MEM), für HT29/B6-Zellen Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium verwendet. Dem jeweiligen Nährmedium wurden zusätzlich 10% FKS und 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin zugegeben.

Nach erfolgter Transfektion (siehe Abschnitt 3.3.2) und Absterben der Kontrollzellen erhielten die MDCK I-Zellen zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks zusätzlich 600 µg/ml Geneticin und die MDCK II-Zellen 400 µg/ml Geneticin.

Zum Passagieren der Zellen wurden die Zellkulturflaschen mit PBS gespült. Um schlecht haftende oder abgestorbene Zellen zu entfernen, wurden die Flaschen fünf Minuten lang mit 3 ml Trypsinlösung inkubiert und die gelösten Anteile abgegossen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Trypsinlösung pro Flasche versetzt, welche dazu führte, dass auch die vitalen Zellen sich vom Flaschenboden ablösten. Nach erfolgtem Ablösen der Zellen wurden diese mit 10 ml Nährmedium vermischt und umgesetzt. Das Trypsin wurde durch das hierbei zugegebene FKS inhibiert. Das Umsetzen der Zellen erfolgte wie folgt:

- 25 cm ² Zellkulturflaschen	1,5 ml auf 5,5 ml Medium
- 75 cm ² Zellkulturflaschen	4,5 ml auf 15 ml Medium
- PCF-Filter (0,6 cm ²)	150 - 350 µl
- 24-Well-Platten (mit Deckgläschen)	200 µl auf 2 ml/Well

3.3.2 Transfektion

Bei einer stabilen Transfektion wird Fremd-DNA dauerhaft in eukaryotische Zellen eingebracht. Hierbei erfolgt eine Integration der eingebrachten DNA in das zelluläre Genom. Je nach Zellart kann sich die Transfektionsmethode unterscheiden.

Für eine stabile reverse Transfektion von MDCK I und II-Zellen mit huMD3/pCMV10 und dem Leervektor pCMV10 wurde als Transfektionsreagenz FuGENE® HD verwendet. Letzteres ist ein Polymer, welches in der Lage ist Komplexe mit der DNA zu

bilden und diese in die Zielzellen einzuschleusen. Revers wird die Transfektion genannt, da die Aussaat der Zellen gleichzeitig mit der Transfektion und nicht bereits am Vortag erfolgt. Die Zellen werden mit dem Transfektionsreagenz und der DNA, welche man in die Zellen einbringen möchte, vermischt, ausgesät und in antibiotikafreiem Medium inkubiert. Nach wenigen Tagen beginnt dann die Selektion der Klone, welche erfolgreich transfiziert wurden. Um eine stabile Transfektion zu gewährleisten, wird mithilfe eines antibiotikumhaltigen Mediums ein Selektionsdruck erzeugt. So überleben nur jene Zellklone, welche das im Expressionsvektor pCMV10 enthaltene Neomycin-Resistenzgen exprimieren und die Neomycinphosphotransferase bilden. Letztere verleiht den Zellen eine Resistenz gegenüber dem Neomycin-ähnlichen Geneticin (G418). Durch Zugabe von G418 zum Medium sterben demnach alle Zellen ab, welche nicht erfolgreich transfiziert wurden. (Promega Corporation, 2021)

In einem ersten Schritt wurden die zu transfizierenden Zellen trypsiniert. Parallel dazu wurden für jede Zelllinie zwei Ansätze aus 2 µg DNA und 6 µl FuGENE® HD in Medium ohne FKS und ohne Antibiotikum vorbereitet. Bei der DNA handelte es sich in einem Ansatz um den Leervektor pCMV10 für die Erstellung von Vektorkontrollen und in dem anderen Ansatz um huMD3/pCMV10 für die Erstellung von MarvelD3-Überexpressionsklonen. Die Ansätze wurden daraufhin mit jeweils 10^6 Zellen vermischt und auf jeweils eine große Schale gegeben. Dem Gemisch wurden jeweils 10 ml antibiotikafreies Medium hinzugefügt. Gleichzeitig wurden 10^6 Zellen als Kontrollpopulation ausgesät, ohne mit einem Transfektionsansatz behandelt zu werden.

Nach drei Tagen wurden die Zellen aus jeweils einer Schale auf drei Schalen verteilt und daraufhin einen weiteren Tag lang inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte der Selektionsstart mit G418. MDCK I-Zellen erhielten G418 in einer Konzentration von 1000 µg/ml, MDCK II-Zellen in einer Konzentration von 600 µg/ml. Es wurde abgewartet, bis die identisch behandelte untransfizierte Kontrollpopulation abgestorben war, um dann Zellinseln aus transfizierten Zellen umzusetzen und weiter zu kultivieren. Nach Absterben der Kontrollpopulation und dem Umsetzen von Zellklonen wurde die G418-Konzentration für die MDCK I-Zellen auf 600 µg/ml und für die MDCK II-Zellen auf 400 µg/ml reduziert.

Zur Kontrolle des Transfektionserfolgs und der exogenen Expression des eingebrachten MarvelD3-Gens diente das Protein-Tag FLAG, welches mittels Western Blot nachgewiesen werden konnte. Das für diese Aminosäuresequenz kodierende

Gen ist im Vektor pCMV10 eingebaut, wird von allen Überexpressionsklonen exprimiert und an das überexprimierte Protein angehängt. Hiernach konnten die Zellklone per Western Blot auf ihre Proteinexpression hin untersucht und weiter charakterisiert werden.

3.3.3 Inkubation der HT-29/B6-Zellen mit Zytokinen

Die Inkubation von HT-29/B6-Zellen mit Zytokinen erfolgte, um den Einfluss verschiedener Zytokine auf den TER und die Expression von MarvelD3 in diesem epithelialen Zellmodell zu vermessen.

Hierzu wurden Zellen auf Zellfilter ausgesät und im Brutschrank bei 37 °C / 5% CO₂ kultiviert. Wenn ein ausreichend hoher TER (> 400 Ω·cm²) gemessen wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass die Zellmonolayer eine für die Durchführung der Experimente ausreichende Dichtigkeit erreicht hatten.

Hiernach wurden die Zellmonolayer basal mit dem jeweiligen Zytokinansatz im Brutschrank inkubiert. Die Zytokinkonzentrationen waren dabei wie folgt:

<u>Zytokin</u>	<u>Konzentration</u>
TNF α	1000 U/ml 1500 U/ml
IFN γ	50 U/ml
IL-1 α	10 ng/ml
TGF β 1	10 ng/ml
TGF β 2	10 ng/ml
IL-4	100 ng/ml
IL-13	100 ng/ml

Die Inkubation erfolgte über 48 Stunden. Die einzige Ausnahme bildete hierbei TNF α , mit dem die Zellen nur 24 Stunden inkubiert wurden.

3.4 Elektrophysiologische Methoden

3.4.1 Widerstandsmessung in der Ussing-Kammer

Die Ussing-Kammer, welche vom dänischen Physiologen Hans Henriksen Ussing entwickelt und nach ihm benannt wurde, ermöglicht u.a. die *in vitro*-Messung des transepithelialen Widerstandes. (Ussing, 1949; Günzel et al. 2010).

Die Ussing-Kammer besteht aus zwei Kammerhälften, an deren Grenze sich eine Halterung für Zellfilter bzw. explantierte Gewebe befindet (Abb. 6). Dies gewährleistet, dass das Epithelgewebe den einzigen Berührungspunkt der beiden Kammerhälften darstellt. Die Kammerhälften repräsentieren dabei zum einen die apikale, zum anderen die basolaterale Umgebung des Epithels. Sie sind mit einer Elektrolytlösung gefüllt und stehen über Silikonschläuche mit jeweils einem doppelwandigen Reservoir in Verbindung. Letzteres dient dazu, die Elektrolytlösung einzufüllen und wird zudem mit warmem Wasser umspült, um die Temperatur der Elektrolytlösung bei 37 °C konstant zu halten. Um eine Oxygenierung der Zellen, ein Zirkulieren der Flüssigkeit und einen konstanten physiologischen pH-Wert von 7,4 zu gewährleisten, werden die Kammerhälften außerdem kontinuierlich mit Carbogen begast (95% O₂, 5% CO₂). Bei allen Experimenten befindet sich zu jeder Zeit in beiden Flüssigkeitsbehältern die gleiche Menge Flüssigkeit, sodass einem hydrostatischen Druckgradienten vorgebeugt wird. Beide Kammerhälften sind über Salzbrücken (3% Agar in 3 M KCl-Lösung) mit jeweils einer Spannungs- und einer Stromelektrode verbunden. Die Stromelektroden sind jeweils weiter vom Epithel entfernt als die Spannungselektroden. (Clarke, 2009) Zwischen den Stromelektroden kann über eine computergesteuerte Stromquelle ein Strom I appliziert und dessen Amplitude über ein Strommessgerät registriert werden. Die hierdurch entstehende Potentialdifferenz U kann mittels der beiden Spannungselektroden und eines Voltmeters gemessen und an den Computer übermittelt werden. (Clarke, 2009; Hou, 2020) Nach dem Ohm'schen Gesetz $R = U / I$ kann der transepitheliale Widerstand R (= TER) berechnet werden, indem die gemessene transepitheliale Potentialdifferenz U durch die Menge des applizierten Stromes I geteilt wird. (Hou, 2020)

Die Anzeige und Registrierung der Messwerte erfolgte mithilfe der Software Analogon (Ing. grad. D. Sorgenfrei).

Da die mit Elektrolytlösung gefüllte Ussing-Kammer auch ohne eingespanntes Epithel einen Widerstand aufweist und zwischen den Spannungselektroden eine Potentialdifferenz vorliegen kann, mussten diese Werte vor der eigentlichen

Messung erhoben werden. Die Leerwerte wurden dann von der Software Analogon automatisch von den später erhobenen Messwerten abgezogen. Zudem wurden die Messwerte auf die Filtergröße von $0,6 \text{ cm}^2$ bezogen und in $\Omega \cdot \text{cm}^2$ angegeben. Nach Erhebung der Leerwerte wurden die Zellfilter eingespannt und die Kammerhälften erneut mit Elektrolytlösung befüllt. Hiernach wurde abgewartet bis sich ein stabiler Widerstand eingestellt hatte, bevor die eigentlichen Experimente begonnen wurden.

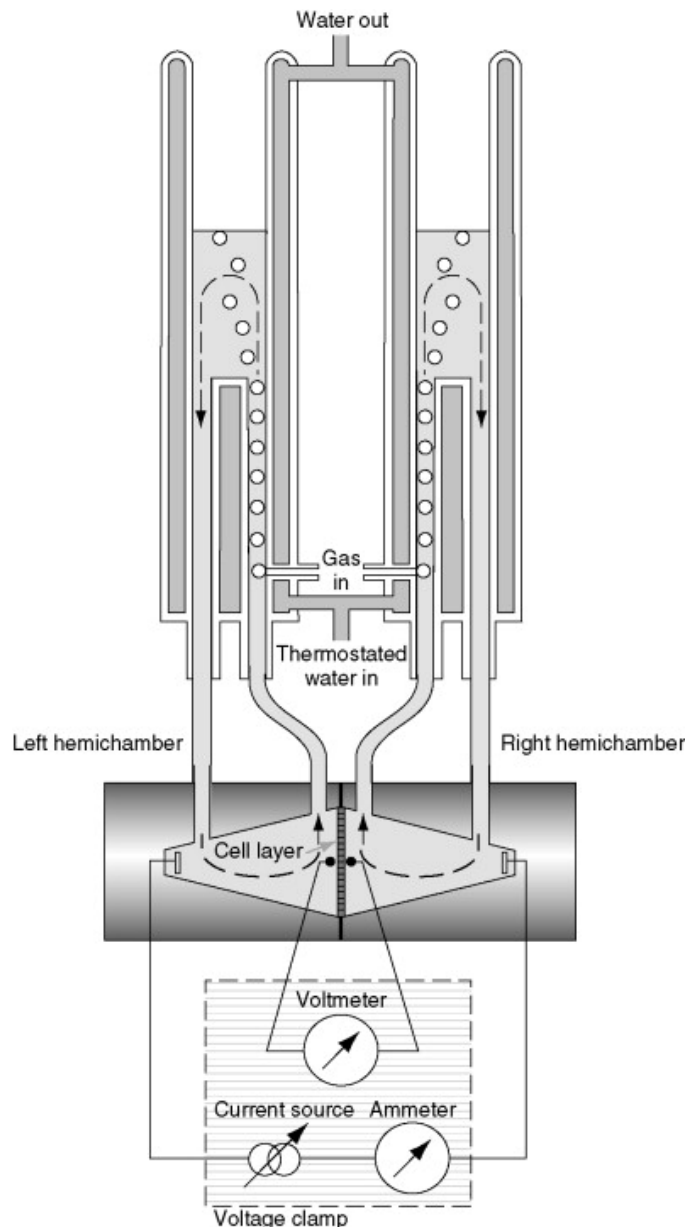


Abb. 6: Schematische Abbildung einer Ussing-Kammer (Günzel et al. 2010). Die Ussing-Kammer besteht aus zwei durch eine Epithelzellschicht getrennte Kammerhälften, welche separat befüllt werden können. Diese können so die apikale und die basolaterale Epithelumgebung darstellen. Das Wasser in der Wand der oberen Reservoirs erlaubt eine Konstanthaltung der Temperatur bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Begasung mit Carbogen ermöglicht die Oxygenierung der Zellen, eine Zirkulation der Flüssigkeit und die Erhaltung eines physiologischen pH-Wertes. Über Elektroden an jeder Kammerhälfte, kann ein Strom appliziert und die transepitheliale Potentialdifferenz gemessen werden.

3.4.2 Dilutionspotentialmessung in der Ussing-Kammer

Die Permeabilität von Epithelien für Natrium (Na^+) und Chlorid (Cl^-) lässt sich durch die Messung von Dilutionspotentialen in der Ussing-Kammer ermitteln. Hierfür wird ein Ionengradient erzeugt, indem auf einer Seite des Epithels ein Teil der Natriumchlorid-haltigen Badlösung iso-osmotisch durch eine ungeladene Mannitol-Lösung ersetzt wird. Die Ionen bewegen sich dann im Bestreben den entstandenen elektrochemischen Gradienten auszugleichen durch das Epithel auf die Seite zu, auf welcher die Natriumchlorid-haltige Badlösung verdünnt wurde. Mit der Bewegung der Ionen entsteht eine messbare Potentialänderung bis sich das sogenannte Dilutionspotential eingestellt hat. Wiederholt man den Vorgang auf der anderen Seite des Epithels, so stellt sich im besten Falle das alte transepitheliale Potential wieder ein. Dass sich die Potentialänderungen beim typischen Verlauf einer Dilutionspotentialmessung schnell einstellen und apikal und basal gleich groß sind, deutet darauf hin, dass es sich nicht um energie- und zeitaufwendige, sowie polaritätsabhängige transzelluläre Transportprozesse, sondern um einen parazellulären Ionentransport handelt. Aus dem Dilutionspotential errechnet werden kann die relative Permeabilität für Na^+ im Vergleich zu Cl^- mithilfe folgender Formel:

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

ΔU Dilutionspotential (basolateral gegen apikal) [V]

R allgemeine Gaskonstante [$\frac{\text{J}}{\text{mol} \cdot \text{K}}$]

T absolute Temperatur [K]

F Faradaykonstante [C/mol]

$P_{\text{Na}}, P_{\text{Cl}}$ Permeabilität für die Ionen Natrium bzw. Chlorid [cm/s]

$[\text{Na}]^{\text{ap}}, [\text{Cl}]^{\text{ap}}$ apikale Konzentration von Natrium bzw. Chlorid [mmol/l]

$[\text{Na}]^{\text{bl}}, [\text{Cl}]^{\text{bl}}$ basale Konzentration von Natrium bzw. Chlorid [mmol/l]

Das gemessene Dilutionspotential wird bei diesen Berechnungen um die Potentialdifferenz, welche allein durch die einseitige Veränderung der Zusammensetzung der Badlösung entsteht, korrigiert.

Aus dem Verhältnis η der Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- zueinander, können die absoluten Permeabilitäten errechnet werden. In die folgenden Formeln fließt der gemessene transepitheliale Widerstand (siehe Abschnitt 3.4.1) bzw. dessen Kehrwert die Gesamtleitfähigkeit G ein (Günzel et al. 2010):

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

G Gesamtleitfähigkeit des Epithels = $\frac{1}{\text{TER}} \left[\frac{1}{\Omega \cdot \text{cm}^2} \right]$

$[\text{NaCl}]$ Konzentration von Natriumchlorid

η Verhältnis der Permeabilitäten für Natrium und Chlorid = $\frac{P_{\text{Na}}}{P_{\text{Cl}}}$

Um an konfluent bewachsenen Zellfiltern eine Dilutionspotentialmessung vorzunehmen, wurden diese nach der Versuchsvorbereitung in die Ussing-Kammern eingespannt. Die Kammerhälften wurden mit je 10 ml Ringerlösung befüllt, temperiert und begast. Nachdem sich ein konstanter Widerstand eingestellt hatte, wurden apikal 5ml der Ringerlösung gegen eine Mannitol-Ringerlösung ausgetauscht. Hierdurch stellte sich eine Potentialdifferenz, das Dilutionspotential ein. Anschließend wurden in der basolateralen Kammerhälfte ebenfalls 5 ml der Ringerlösung durch die Mannitol-Ringerlösung ersetzt, wodurch sich im besten Fall wieder das ursprüngliche Potential einstellte. Die Versuche wurden nur dann ausgewertet, wenn sich dieser typische Verlauf der Dilutionspotentiale darstellte, da sonst davon ausgegangen werden musste, dass technische Probleme vorlagen oder die Potentialänderungen nicht durch Änderungen des parazellulären Transports bedingt waren.

3.4.3 Widerstandsmessung mit Chopstickelektroden

Die manuelle Messung des TER an Zellmonolayern in Zellfiltern unter der Sterilwerkbank erfolgte mittels an ein Ohmmeter angeschlossener Chopstickelektroden (entwickelt von Ing. D. Sorgenfrei). Auch hierbei wird sich des Ohm'schen Gesetzes $R = U / I$ bedient. Die Applikation einer bestimmten Strommenge über die Elektroden resultiert in einer Änderung der gemessenen Spannung zwischen apikaler und basaler Zellseite. Mithilfe des Ohm'schen Gesetzes kann so der transepitheliale Widerstand ermittelt werden. Da dieser maßgeblich von der Fläche des Epithels

abhängt, werden die Messwerte automatisch auf die Größe der Zellfilter bezogen ($0,6 \text{ cm}^2$) und in $\Omega \cdot \text{cm}^2$ angegeben. Vor den Messungen wird ein Leerwert erhoben, indem der Widerstand eines leeren Zellfilters ermittelt wird. Dieser wird automatisch von den darauffolgend erhobenen Messwerten abgezogen.

Die von Medium ausgefüllten, konfluent bewachsenen HT-29/B6-Zellfilter befanden sich in einer ebenfalls mediumgefüllten Schale. Um den Einfluss der Temperatur auf den gemessenen Widerstand zu minimieren, wurde diese Schale während der Messung auf eine 37° C -warme Platte gestellt. Die Chopstickelektroden wurden zeitgleich ins Medium getaucht. Dabei wurde eine Messelektrode im Medium innerhalb des Filters, also apikal und die andere Messelektrode im Medium außerhalb des Filters, also basolateral positioniert. Vor und nach der Benutzung wurden die Elektroden in 80% Ethanol getaucht.

3.5 Auswertung und Statistik

Die Zusammenfassung, statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit den Programmen Microsoft Excel, GraphPad Prism, Microsoft Word und Microsoft PowerPoint.

Die Messwerte werden in dieser Arbeit als arithmetischer Mittelwert und dessen Standardfehler $MW \pm SEM$ (*standard error of the mean*) angegeben. Zur Identifikation statistisch relevanter Ausreißer wurde der Ausreißertest nach Grubbs angewendet. Zur Berechnung der Signifikanzen wurde unter Annahme einer Normalverteilung bei einem Vergleich von zwei Gruppen ein ungepaarter T-Test mit anschließender Bonferroni-Holm-Korrektur bei Mehrfachtestung durchgeführt. Zur Berechnung der Signifikanzen bei einem Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde zunächst eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Bei signifikantem Ergebnis wurde ein ungepaarter T-Test zwischen den einzelnen Gruppen angeschlossen. Auch hier erfolgte eine Bonferroni-Holm-Korrektur der p-Werte. Ein p-Wert von $p < 0,05$ wurde als signifikant gewertet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Die angegebenen p-Werte sind als explorativ zu betrachten und sollten in unabhängigen Studien bestätigt werden.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss CED-relevanter Zytokine auf den TER und die MarvelD3-Expression von HT-29/B6-Zellen

In Vorversuchen wurde gezeigt, dass MarvelD3 in Darmbiopsien von Patient*innen mit CED in seiner Expression verändert ist (Krug, 2010, unveröffentlicht, siehe Abschnitt 5.1, Abb. 34). Um den Einfluss von Zytokinen auf die MarvelD3-Expression im Rahmen einer intestinalen Inflammation im Zellmodell nachzustellen, wurden Monolayer von HT-29/B6-Zellen verschiedenen Zytokinen, die bei CED eine Rolle spielen, ausgesetzt. Nach der Inkubation wurden bei Kontrollzellen und mit Zytokinen inkubierten Zellen die transepithelialen Widerstände manuell vermessen, um einen Effekt der Zytokine auf die Epithelzellen nachzuweisen. Hiernach wurde mittels Western Blot eine Proteinanalyse hinsichtlich der MarvelD3-Expression durchgeführt. MarvelD3 1 mit dem größeren Molekulargewicht zeigte sich im Western Blot als obere, MarvelD3 2 mit dem geringeren Molekulargewicht als untere Bande.

Dabei wurden die Zytokine Tumornekrosefaktor α ($\text{TNF}\alpha$), Interferon γ ($\text{IFN}\gamma$), Interleukin- 1α ($\text{IL-1}\alpha$), *Transforming Growth Factor* β 1 und 2 ($\text{TGF}\beta$ 1 und 2), sowie Interleukin-4 und -13 (IL-4 , IL-13) untersucht. $\text{TNF}\alpha$ kam hierbei in zwei verschiedenen Konzentrationen zum Einsatz (1000 U/ml und 1500 U/ml), da sich die Wirksamkeit zellchargenabhängig sehr unterscheiden kann und diese beiden Konzentrationen sich auch in vorherigen Versuchen mit HT-29/B6-Zellen als wirksam erwiesen hatten. Zudem erwies sich eine kürzere Inkubationszeit von 24 Stunden als sinnvoll, da eine längere Inkubation mit $\text{TNF}\alpha$ zu Apoptose und Zelluntergang führt.

Die 24-stündige Inkubation der HT-29/B6-Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ (Abb. 8.A), sowie die 48-stündige Inkubation mit IL-4 (Abb. 15.A), IL-13 (Abb. 16.A), einer Kombination aus IL-4 und IL-13 (Abb. 17A) und $\text{TGF}\beta$ 1 (Abb. 13.A), hatte eine signifikante Veränderung des TER zur Folge. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass diese Zytokine einen Einfluss auf die Tight Junction und die Dichtigkeit des Zellverbandes hatten und somit ein gutes Teilmodell für eine Inflammationsreaktion darstellen. Die Inkubation der HT-29/B6-Zellen mit den restlichen Zytokinen führte zu keiner signifikanten Veränderung des transepithelialen Widerstandes (Abb. 10.A, 11.A, 13.A). Hier muss in Betracht gezogen werden, dass die Zytokine in diesen Versuchen keine hinreichende Wirkung auf die Tight Junctions ausgeübt haben, um sie als Modell für eine Entzündung zu verwenden.

Die Expression von MarvelD3 Isoform 2 zeigte sich nach 48-stündiger Inkubation von HT-29/B6-Zellen mit dem Zytokin IL-4 in der densitometrischen Auswertung der Western Blots signifikant erhöht (Abb. 15.B). Keines der weiteren untersuchten Zytokine beeinflusste die MarvelD3-Expression signifikant (Abb. 8.B, 10.B, 11.B, 13.B, 15-17.B).

In anderen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass IL-4 und IL-13 in T84- bzw. HT-29/B6-Monolayern zu einer erhöhten Claudin 2-Expression führen. (Wisner *et al.*, 2008; Heller *et al.*, 2005; Prasad *et al.*, 2005) Um zusätzlich zur TER-Messung zu überprüfen, ob die Zytokine IL-4 und IL-13 ihre Wirkung in den Zellfiltern entfalten konnten, wurden die HT-29/B6-Zellen nach der Inkubation mit IL-4, IL-13 und deren Kombination auch auf ihre Claudin 2-Expression hin untersucht (Abb. 18). Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Claudin 2-Expression, sodass von einer ausreichenden Zytokinwirkung ausgegangen werden konnte. Hier sei anzumerken, dass sich nach der Inkubation des Western Blots mit Claudin 2 zwei Banden zeigten. Mithilfe einer Vektorkontrolle der Zelllinie MDCK I, welche kein Claudin 2 exprimiert (Furuse *et al.*, 2001), konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei der oberen Bande um eine unspezifische Bande handelt. Demnach wurde für die Beurteilung der Claudin 2-Expression die untere Bande ausgewertet.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Zytokinversuche dargestellt.

4.1.1 Tumornekrosefaktor α (TNF α)

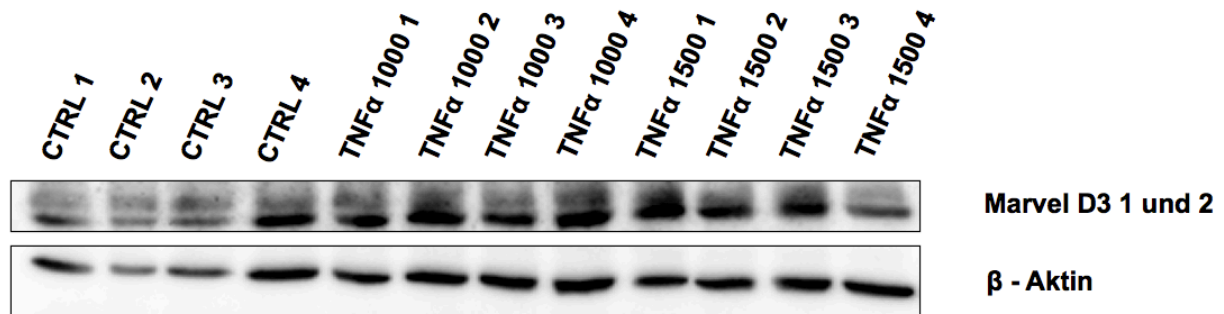


Abb. 7: Western Blot nach Inkubation von HT-29/B6-Zellen mit TNF α : Western Blot mit MarvelD3- und β -Aktin-Antikörpern nach 24-stündiger Inkubation von HT-29/B6-Zellen mit TNF α (1000 und 1500 U/ml).

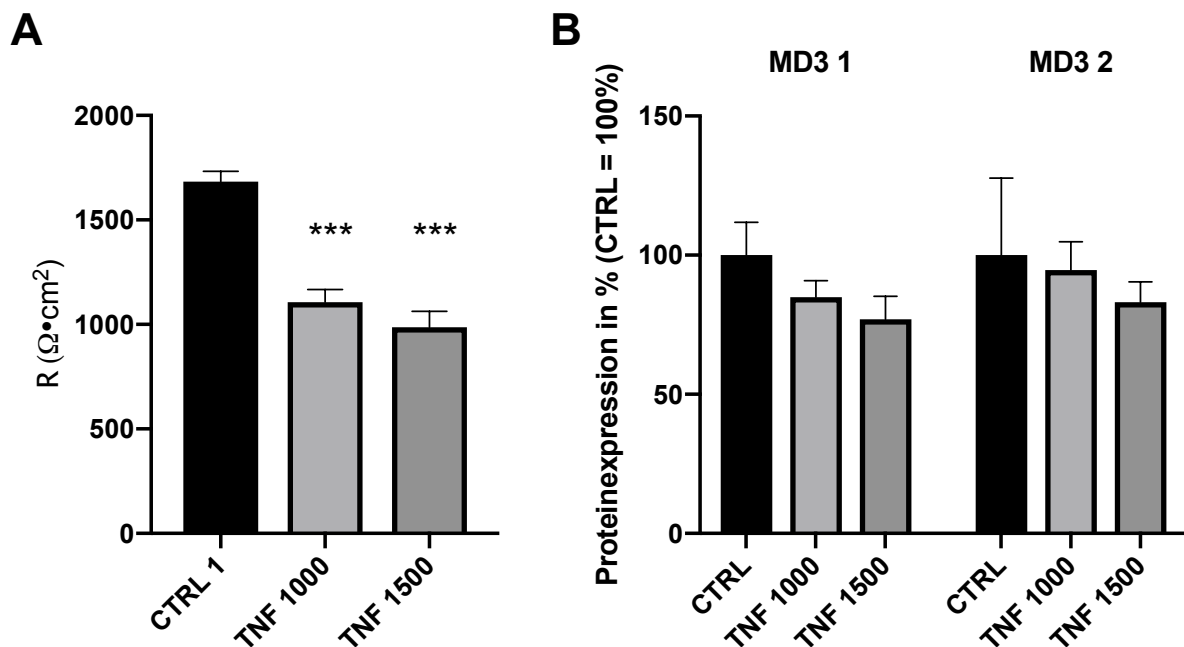


Abb. 8: TER und MarvelD3-Expression von HT-29/B6-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit TNF α (1000 und 1500 U/ml).

A TER nach Inkubation mit TNF α . (CTRL = $1682 \pm 49,59 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n = 4$, TNF α 1000 = $1106,75 \pm 59,78 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n = 4$, TNF α 1500 = $986,75 \pm 76,03 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n = 4$) Es zeigte sich eine signifikante Veränderung des TER (TNF α 1000: $p \dots = 0,0006$, TNF α 1500: $p \dots = 0,0003$).

B MarvelD3-Expression nach Inkubation mit TNF α . Die densitometrische Auswertung der Western Blots wurde entsprechend der β -Aktin-Werte korrigiert und relativ zu den Kontrollen dargestellt (CTRL = 100%).

Die Expression von MarvelD3 veränderte sich nach der Inkubation nicht signifikant (**MD3 1:** CTRL = $100 \pm 11,80\%$, $n = 4$, TNF α 1000 = $84,86 \pm 6,00\%$, $n = 4$, TNF α 1500 = $76,98 \pm 8,28\%$, $n=4$, ANOVA $p = 0,2392$, **MD3 2:** CTRL = $100 \pm 27,73\%$, $n = 4$, TNF α 1000 = $94,66 \pm 10,14\%$, $n = 4$, TNF α 1500 = $83,13 \pm 7,32\%$, $n = 4$, ANOVA $p = 0,7907$).

4.1.2 Interferon γ (IFN γ)

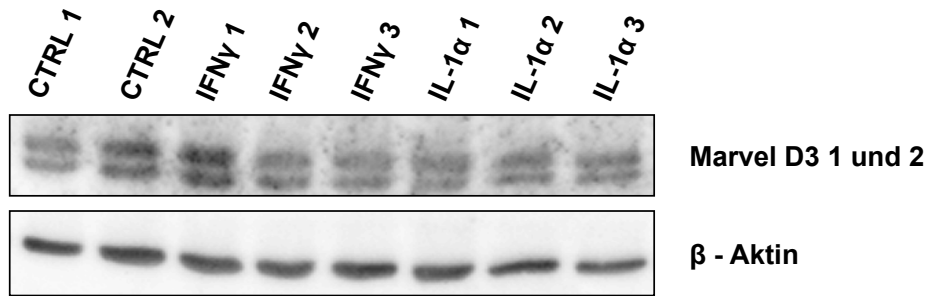


Abb. 9: Western Blot nach Inkubation von HT-29/B6-Zellen mit IFN γ und IL-1 α : Exemplarischer Western Blot mit MarvelD3- und β -Aktin-Antikörpern nach 48-stündiger Inkubation von HT-29/B6-Zellen mit IFN γ und IL-1 α (siehe Abschnitt 4.1.3).

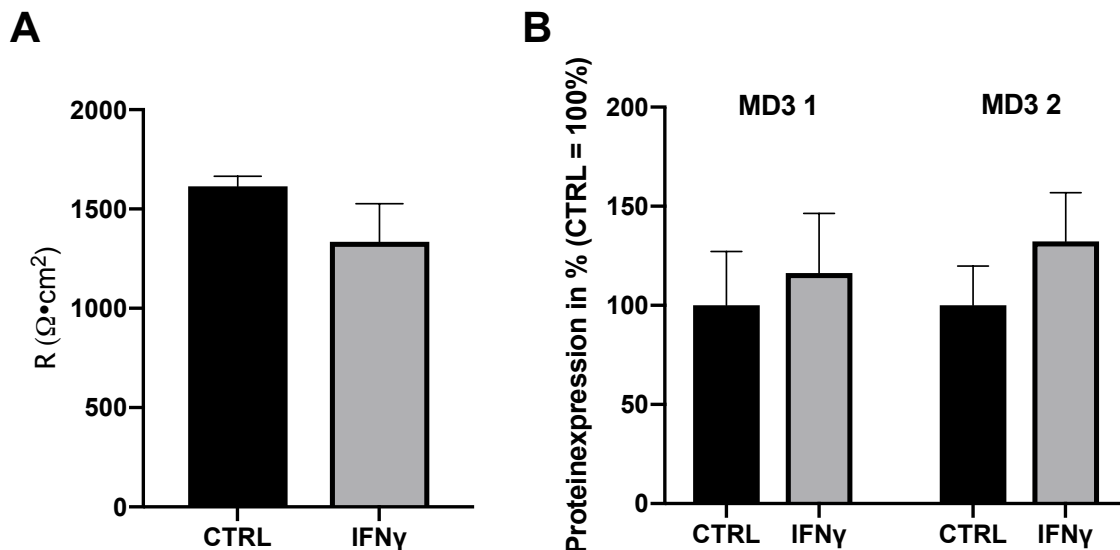


Abb. 10: TER und MarvelD3-Expression von HT-29/B6-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit IFN γ .

A TER nach Inkubation mit IFN γ . (CTRL = $1614,33 \pm 51,20 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n = 6$, IFN γ = $1334,83 \pm 192,25 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n = 6$) Es zeigte sich keine signifikante Veränderung des TER ($p = 0,5709$).

B MarvelD3-Expression nach Inkubation mit IFN γ . Die densitometrische Auswertung der Western Blots wurde entsprechend der β -Aktin-Werte korrigiert und relativ zu den Kontrollen dargestellt (CTRL = 100%).

Auch die Expression von MarvelD3 veränderte sich nach der Inkubation nicht signifikant. (MD3 1: CTRL = $100 \pm 27,19\%$, $n = 5$, IFN γ = $116,38 \pm 30,06\%$, $n = 6$, $p = 2,103$, MD3 2: CTRL = $100 \pm 19,91\%$, $n = 5$, IFN γ = $132,32 \pm 24,47\%$, $n = 6$, $p = 1,3828$)

4.1.3 Interleukin 1 α (IL-1 α)

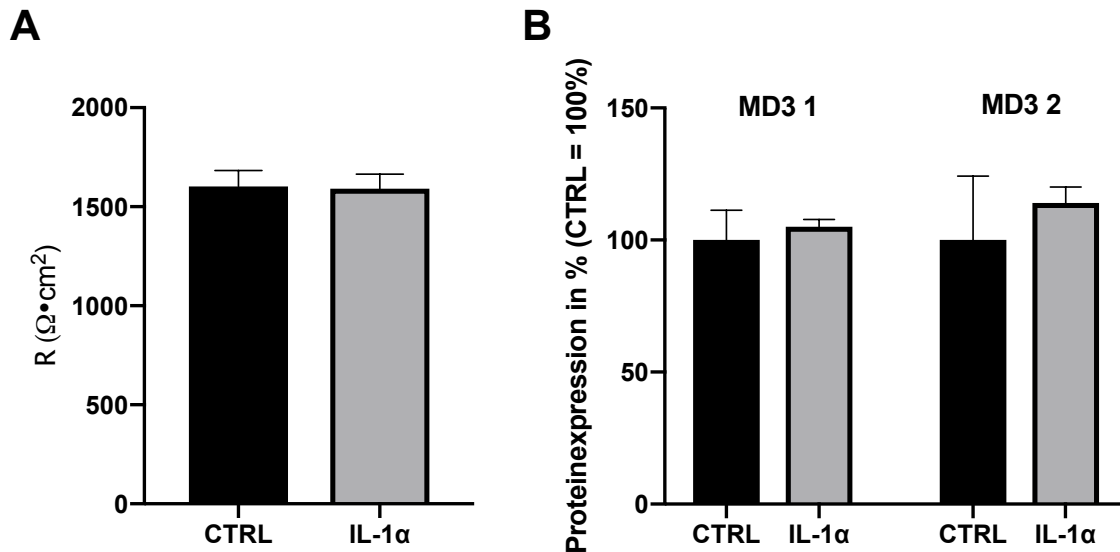


Abb. 11: TER und MarvelD3-Expression von HT-29/B6-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit IL-1 α .

A TER nach Inkubation mit IL-1 α . (CTRL = $1602 \pm 81,10 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n = 3$, IL-1 α = $1590,33 \pm 72,13 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n = 3$) Es zeigte sich keine signifikante Veränderung des TER ($p = 0,9196$).

B MarvelD3-Expression nach Inkubation mit IL-1 α . Die densitometrische Auswertung der Western Blots wurde entsprechend der β -Aktin-Werte korrigiert und relativ zu den Kontrollen dargestellt (CTRL = 100%).

Auch die Expression von MarvelD3 veränderte sich nach der Inkubation mit IL-1 α nicht signifikant (**MD3 1**: CTRL = $100 \pm 11,28\%$, $n = 2$, IL-1 α = $105,06 \pm 2,73\%$, $n = 3$, $p=2,47$, **MD3 2**: CTRL = $100 \pm 24,17\%$, $n = 2$, IL-1 α = $114,02 \pm 6,06\%$, $n = 3$, $p=1,5804$).

4.1.4 Transforming Growth Factor β 1 und 2 (TGF β 1 und TGF β 2)

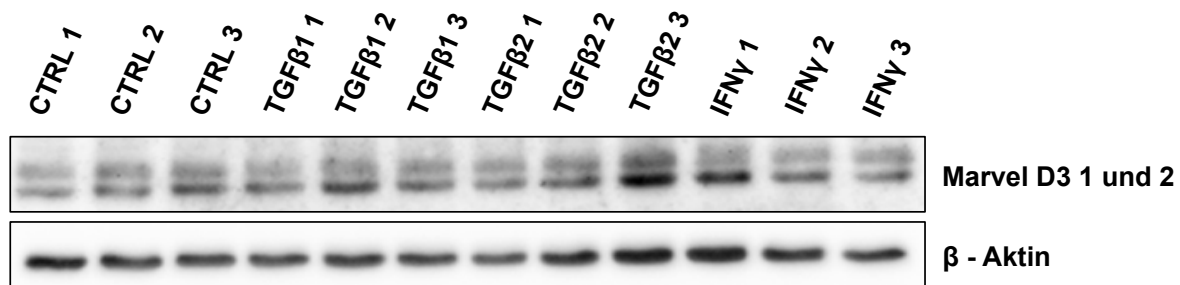


Abb. 12: Western Blot nach Inkubation von HT-29/B6-Zellen mit TGF β 1, TGF β 2 und IFN γ : Exemplarischer Western Blot mit MarvelD3- und β -Aktin-Antikörpern nach 48-stündiger Inkubation von HT-29/B6-Zellen mit TGF β 1, TGF β 2 und IFN γ .

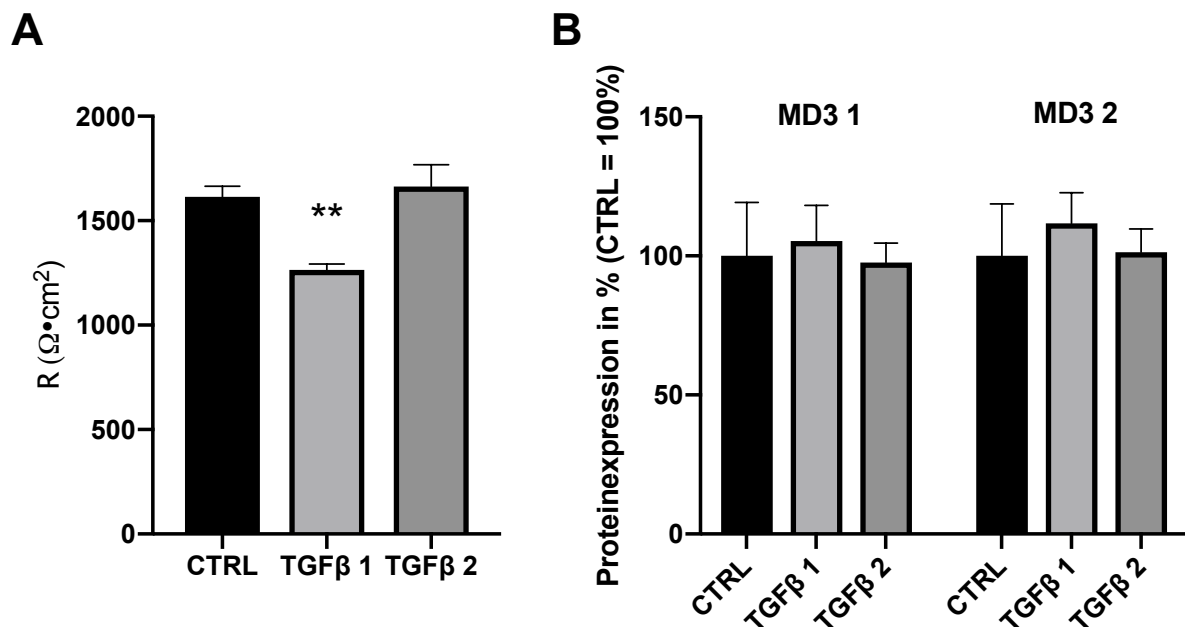


Abb. 13: TER und MarvelD3-Expression von HT-29/B6-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit TGF β 1 und 2.

A TER nach Inkubation mit TGF β 1 und 2. (CTRL = 1614,33 ± 51,20 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, $n = 6$, TGF β 1 = 1264,20 ± 28,54 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, $n = 5$, TGF β 2 = 1663,0 ± 105 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, $n = 5$) Es zeigte sich eine signifikante Senkung des TER nach Inkubation mit TGF β 1 ($p = 0,0012$), jedoch keine signifikante Veränderung des TER nach der Inkubation mit TGF β 2 ($p = 1,3408$).

B MarvelD3-Expression nach Inkubation mit TGF β 1 und 2. Die densitometrische Auswertung der Western Blots wurde entsprechend der β -Aktin-Werte korrigiert und relativ zu den Kontrollen dargestellt (CTRL = 100%).

Es zeigten sich weder in der Expression von **MarvelD3 1** (CTRL = 100 ± 19,24%, $n = 6$, TGF β 1 = 105,31 ± 12,83%, $n = 6$, $p = 1,6458$, TGF β 2 = 97,66 ± 6,96%, $n = 6$, $p = 0,9112$) noch in der Expression von **MarvelD3 2** (CTRL = 100 ± 18,69%, $n = 6$, TGF β 1 = 111,76 ± 10,97%, $n = 6$, $p = 1,1988$, TGF β 2 = 101,33 ± 8,34%, $n = 6$, $p = 0,9495$) von MarvelD3 signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollzellen.

4.1.5 Interleukin-4 (IL-4)

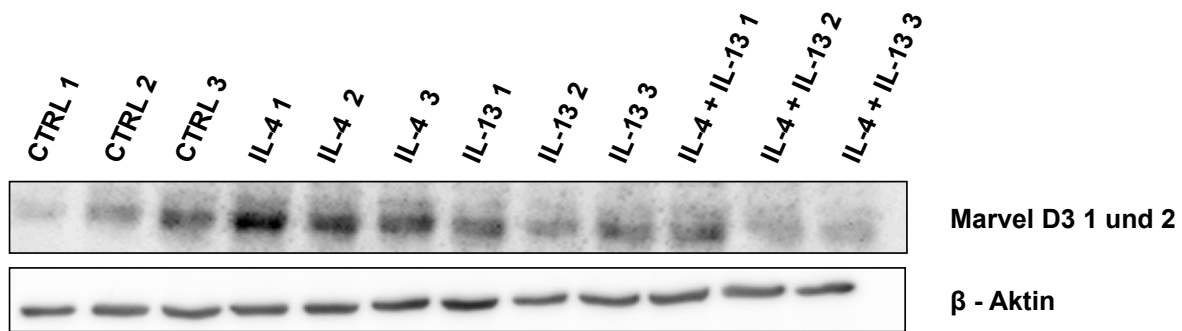


Abb. 14: Western Blot nach Inkubation von HT-29/B6-Zellen mit IL-4, IL-13 und IL-4+IL-13. Exemplarische Western Blots mit identischen Proben und Inkubation mit MarvelD3- bzw. β -Aktin-Antikörpern nach 48-stündiger Inkubation von HT-29/B6-Zellen mit IL-4, IL-13 und IL-4 +IL-13 (siehe Abschnitte 4.1.6; 4.1.7).

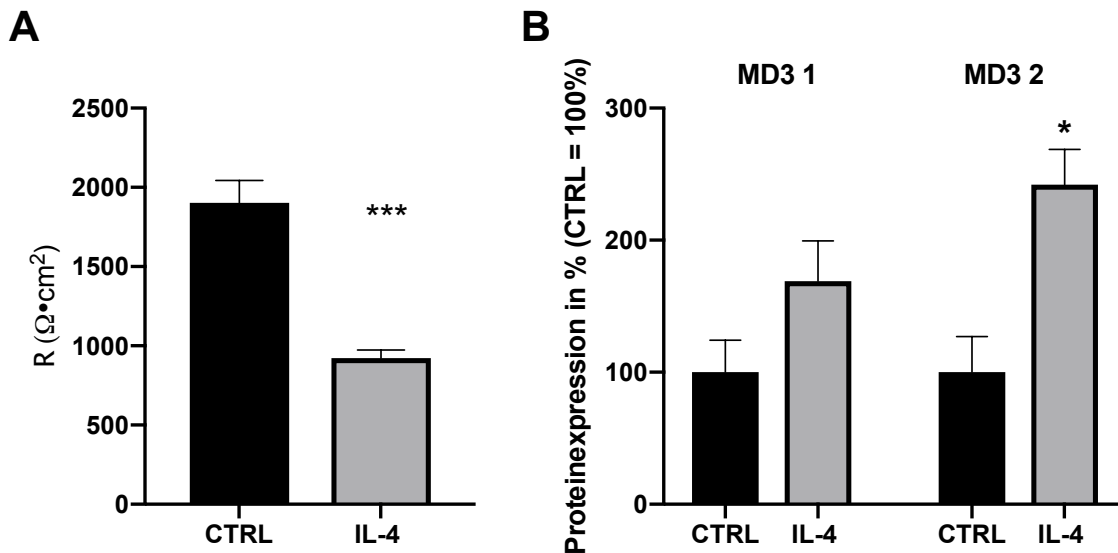


Abb. 15: TER und MarvelD3-Expression von HT-29/B6-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit IL-4.

A TER nach Inkubation mit IL-4. (CTRL = $1903 \pm 140,72 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n = 6$, IL-4 = $921,83 \pm 51,58 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n = 6$) Es zeigte sich eine signifikante Veränderung des TER nach Inkubation mit IL-4 ($p \dots = 0,0003$).

B MarvelD3-Expression nach Inkubation mit IL-4. Ein gleichzeitig erstellter Western Blot mit derselben Probenbeladung wurde mit β -Aktin-Antikörpern inkubiert und für die Normalisierung der Densitometriewerte verwendet. Die densitometrische Auswertung der Western Blots wurde entsprechend der β -Aktin-Werte korrigiert und relativ zu den Kontrollen dargestellt (CTRL = 100%).

Die Expression von MarvelD3 1 veränderte sich nach der Inkubation mit IL-4 nicht signifikant (MD3 1: CTRL = $100 \pm 24,29\%$, $n = 6$, IL-4 = $168,95 \pm 30,44\%$, $n = 6$, $p = 0,3213$). Die Isoform 2 zeigte sich gegenüber den Kontrollzellen hingegen signifikant erhöht (MD3 2: CTRL = $100 \pm 27,08\%$, $n = 5$, IL-4 = $242,16 \pm 26,51\%$, $n = 5$; $p = 0,0168$).

4.1.6 Interleukin-13 (IL-13)

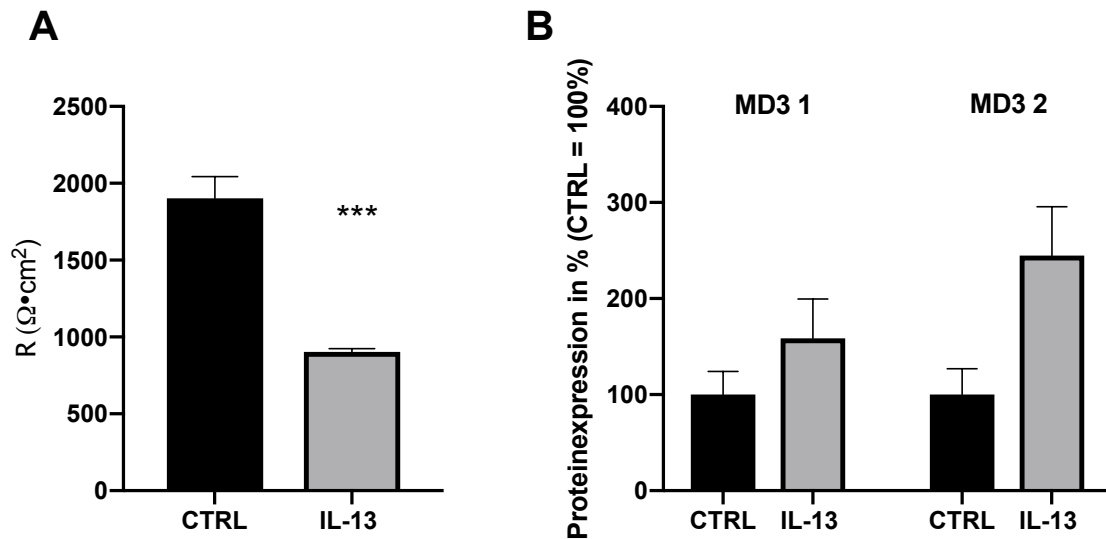


Abb. 16: TER und MarvelD3-Expression von HT-29/B6-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit IL-13.

A TER nach Inkubation mit IL-13. (CTRL = $1903 \pm 140,72 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n = 6$, IL-13 = $902,4 \pm 22,34 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n = 5$) Es zeigte sich eine signifikante Veränderung des TER ($p \cdots = 0,0002$).

B MarvelD3-Expression nach Inkubation mit IL-13. Ein gleichzeitig erstellter Western Blot mit derselben Probenbeladung wurde mit β -Aktin-Antikörpern inkubiert und für die Normalisierung der Densitometriewerte verwendet. Die densitometrische Auswertung der Western Blots wurde entsprechend der β -Aktin-Werte korrigiert und relativ zu den Kontrollen dargestellt (CTRL = 100%).

Die Expression von MarvelD3 veränderte sich nach der Inkubation mit IL-13 nicht signifikant (**MD3 1**: CTRL = $100 \pm 24,29\%$, $n = 6$, IL-13 = $158,54 \pm 41,10\%$, $n = 6$; $p = 0,4964$, **MD3 2**: CTRL = $100 \pm 27,08\%$, $n = 6$, IL-13 = $244,72 \pm 51,03\%$, $n = 6$; $p = 0,0624$).

4.1.7 IL-4 + IL-13

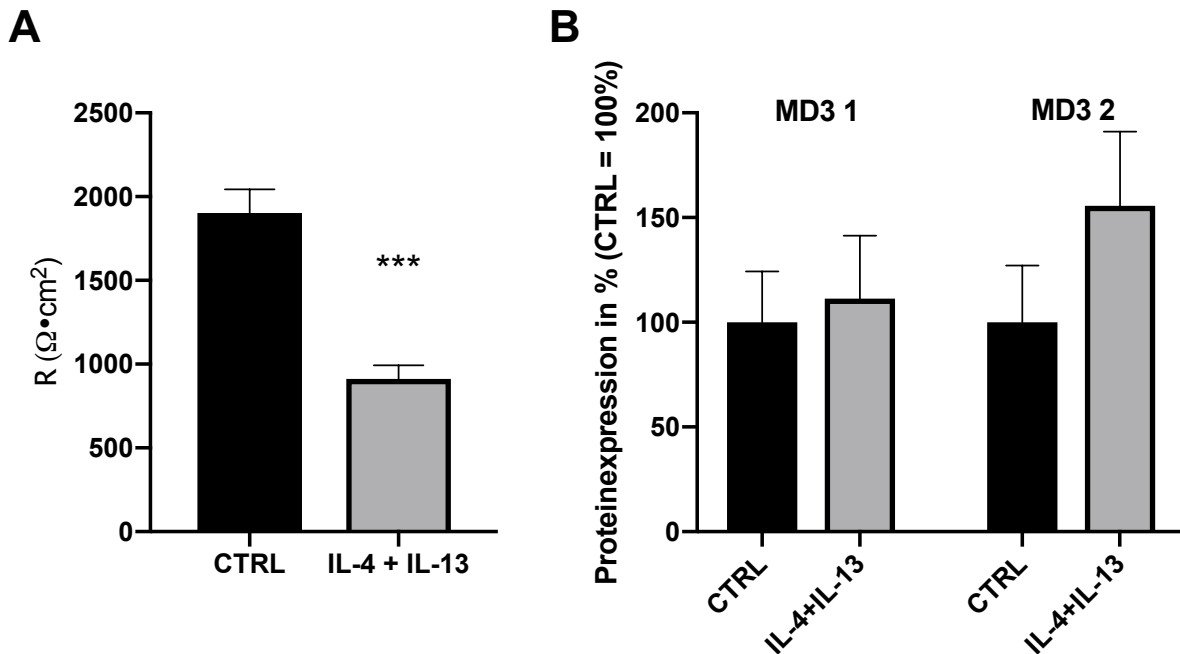


Abb. 17: TER und der MarvelD3-Expression von HT-29/B6-Zellen nach gleichzeitiger, 48-stündiger Inkubation mit IL-4 und IL-13.

A TER nach gleichzeitiger Inkubation mit IL-4 und IL-13. (CTRL = 1903 ± 140,72 Ω·cm², n = 6, IL-4+IL-13 = 912 ± 81,70 Ω·cm², n = 5) Es zeigte sich eine signifikante Veränderung des TER ($p \dots = 0,0003$).

B MarvelD3-Expression nach gleichzeitiger Inkubation mit IL-4 und IL-13. Ein gleichzeitig erstellter Western Blot mit derselben Probenbeladung wurde mit β-Aktin-Antikörpern inkubiert und für die Normalisierung der Densitometriewerte verwendet. Die densitometrische Auswertung der Western Blots wurde entsprechend der β-Aktin-Werte korrigiert und relativ zu den Kontrollen dargestellt (CTRL = 100%).

Die Expression von MarvelD3 veränderte sich nach der Inkubation mit IL-4+IL-13 nicht signifikant (**MD3 1**: CTRL = 100 ± 24,29%, n = 6, IL-4+IL-13 = 111,34 ± 29,98%, n = 5, p = 0,7728; **MD3 2**: CTRL = 100 ± 27,08%, n = 5, IL-4+IL-13 = 155,61 ± 35,37%, n = 5; p = 0,2472).

4.1.8 Claudin 2-Expression von HT-29/B6-Zellen nach der Inkubation mit IL-4, IL-13 und deren Kombination

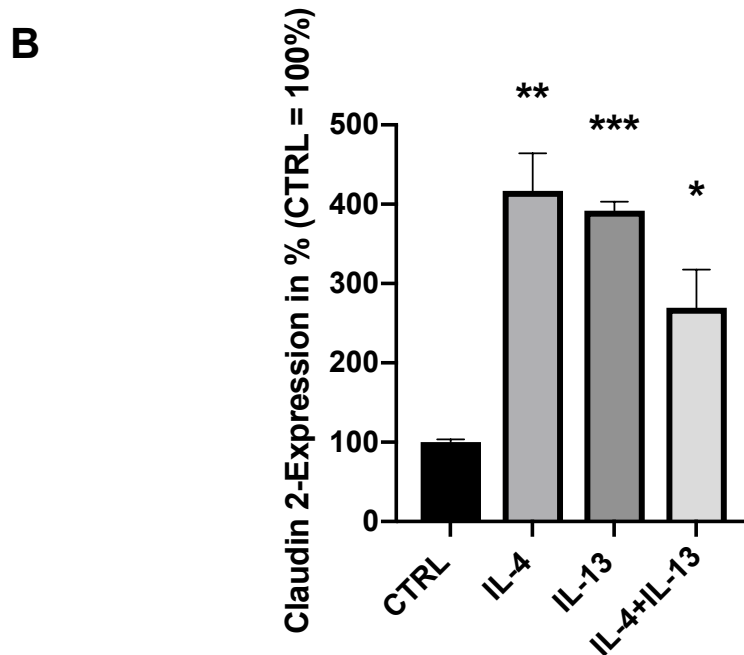
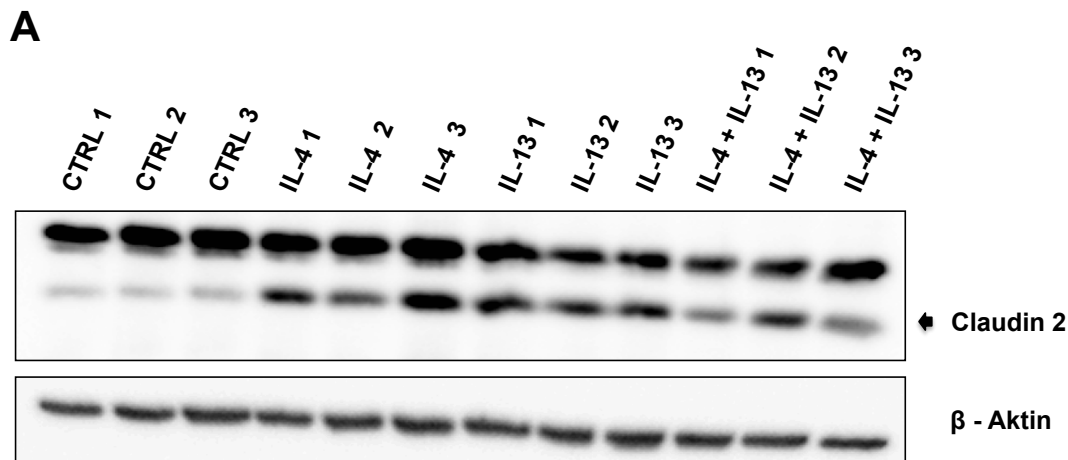


Abb. 18: Claudin 2-Expression von HT-29/B6-Zellen nach Inkubation mit IL-4, IL-13 und IL-4+IL-13.

A Western Blot mit Claudin 2- und β -Aktin-Antikörpern nach 48-stündiger Inkubation mit IL-4, IL-13 und deren Kombination

B Die densitometrische Auswertung der Western Blots wurde entsprechend der β -Aktin-Werte korrigiert und relativ zu den Kontrollen dargestellt (CTRL = 100%). Die Expression von Claudin 2 veränderte sich nach 48-stündiger Inkubation mit IL-4, IL-13 und IL-4+IL-13 signifikant (CTRL = $100 \pm 3,71\%$, $n = 3$, IL-4 = $416,86 \pm 47,39\%$, $n = 3$, $p \cdot \cdot = 0,0052$; IL-13 = $391,95 \pm 11,12\%$, $n = 3$, $p \cdot \cdot \cdot = 0,0003$, IL-4+IL-13 = $269,33 \pm 48,09\%$, $n = 3$, $p \cdot = 0,0247$).

4.2 Überexpression von MarvelD3 in MDCK-Zellen

Da in bisherigen Studien nicht abschließend geklärt werden konnte, welchen Einfluss eine MarvelD3-Überexpression auf die Barriereigenschaften von Epithelzellen hat, wurden MarvelD3-Überexpressionsklone der Zelllinien MDCK II und I hergestellt und auf ihre elektrophysiologischen Eigenschaften hin untersucht.

4.2.1 Überprüfung der Transfektion der MDCK-Zellen

Mittels der Inkubation mit einem FLAG-Antikörper wurde der Erfolg der Transfektion überprüft. Hiernach erfolgte eine Auswahl geeigneter Klone (Abb. 19). Der FLAG-Tag ist eine Sequenz von Aminosäuren, welche an das Expressionsprodukt des in den Expressionsvektor eingebrachten Gens angehängt wird und somit eine Überprüfung des Transfektionserfolges, sowie eine Lokalisationsanalyse vereinfacht.

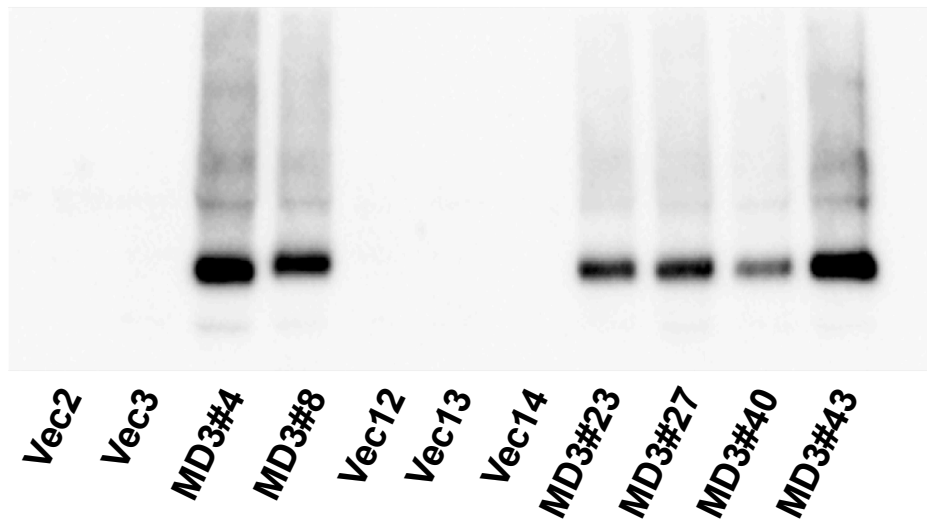


Abb. 19 Western Blot mit dem Antikörper mFLAG der Vektorkontrollen (Vec2, Vec3) und MarvelD3-Überexpressionsklone (MD3#4, MD3#8) der Zelllinie MDCK I, sowie der Vektorkontrollen (Vec12, Vec13, Vec14) und MarvelD3-Überexpressionsklone (MD3#23, MD3#27, MD3#40, MD3#43) der Zelllinie MDCK II.

4.2.2 Überexpression von MarvelD3 in MDCK II-Zellen

4.2.2.1 Tight Junction-Proteinexpressionsprofil der MarvelD3-Überexpressionsklone und der dazugehörigen Vektorkontrollen

Um die Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchungen der transfizierten Zellen und die Funktion von MarvelD3 in Bezug zueinander setzen zu können, erfolgte zunächst die Charakterisierung der Zellen hinsichtlich ihrer Expression verschiedener Tight Junction-Proteine. Hierbei wurden zwei bis sieben Zellpassagen der Vektorkontrollen und MarvelD3-Überexpressionsklone mithilfe von Western Blots auf ihre

Proteinexpression hin untersucht (Abb. 20). Die Vektorkontrolle Vec14 stellte sich aufgrund ihrer Claudin 2-Expression und ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften als ungeeignete Kontrollpopulation heraus und wird hier daher nicht dargestellt (siehe Abschnitt 4.2.2.2).

MD3#27, MD3#40 und MD3#43 zeigten wie erwartet eine Überexpression von MarvelD3 Isoform 1 (Vec12 = 100%, MD3#27 = 257,07 ± 88,18%, MD3#40 = 228,22 ± 66,55%, MD3#43 = 456,68 ± 301,73%, n = 2) sowie Isoform 2 (Vec12 = 100%, MD3#27 = 249,78 ± 122,27%, MD3#40 = 182,87 ± 97,16%, MD3#43 = 314,16 ± 220,41%, n = 2). Ebenso zeigten sie eine höhere Claudin 2-Expression. (siehe Abschnitt 4.2.2.2, Abb.22.B) Die restlichen Tight Junction-Proteine zeigten sich weitestgehend unverändert. Die Inkubation mit Antikörpern gegen MarvelD3 und Occludin führten nur bei zwei der sieben Passagen zu auswertbaren Western Blots. Dies lag vor allem an der Qualität der verfügbaren Antikörper.

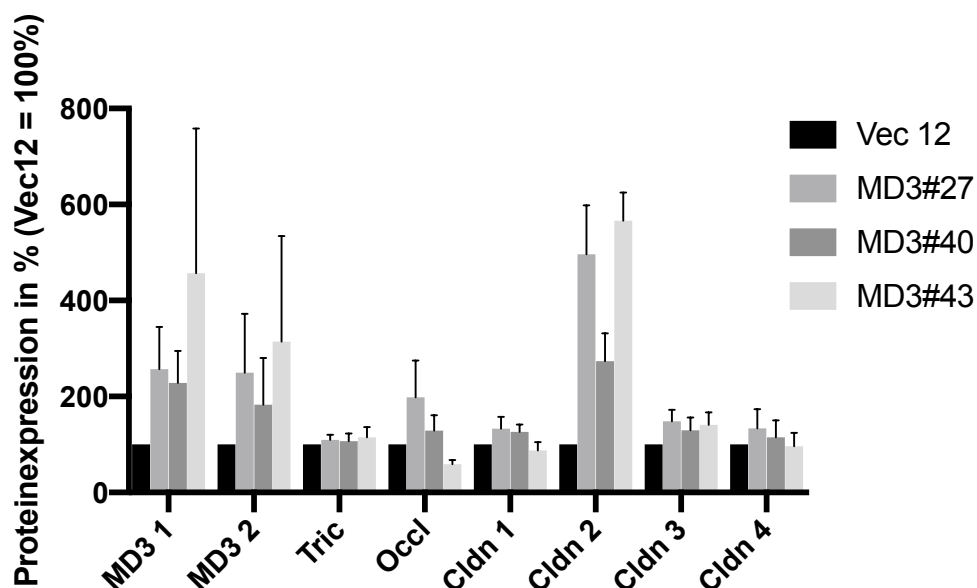


Abb. 20: Densitometrische Auswertung der Western Blots zur Charakterisierung der Vektorkontrolle Vec12 und der Marvel D3-Überexpressionsklone der Zelllinie MDCK II. Marvel D3 Isoform 1 und 2 (MD3 1 und MD3 2), Tricellulin (Tric), Occludin (Occl), Claudin 1 (Cldn 1), Claudin 2 (Cldn 2), Claudin 3 (Cldn 3), Claudin 4 (Cldn 4). Die densitometrischen Werte wurden jeweils auf β -Aktin-Werte desselben oder auf die eines parallel laufenden Western Blots mit identischen Proben normalisiert, auf die Vektorkontrolle bezogen und dann zusammengeführt.

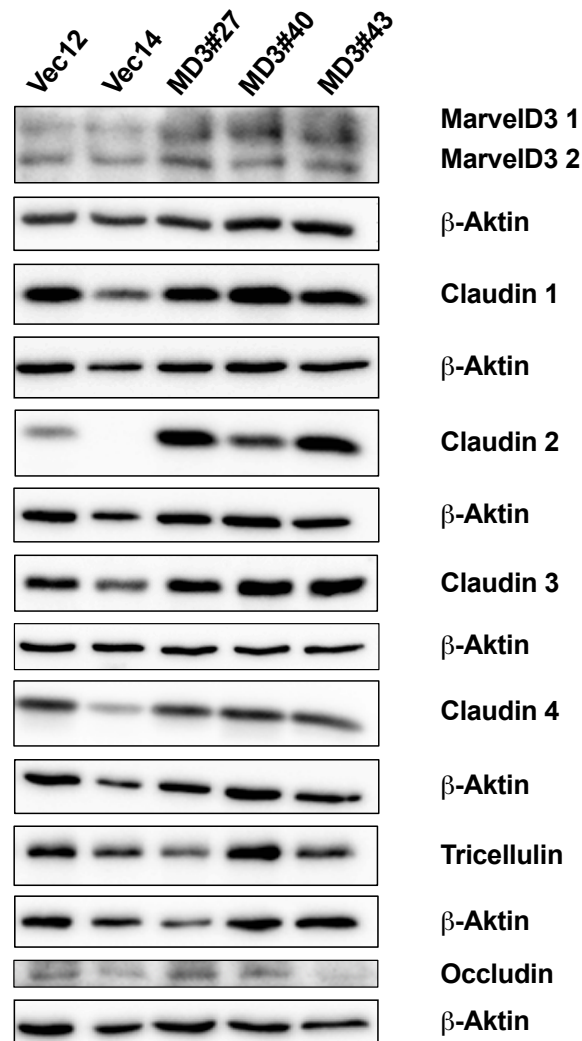


Abb. 21: Exemplarische Western Blots zur Charakterisierung der Vektorkontrollen *Vec12*, *Vec14* und der *MarvelD3*-Überexpressionsklone der Zelllinie *MDCK II*. Darstellung exemplarischer Western-Blots der *MDCK-II*-Vektorkontrollen und der *MarvelD3*-Überexpressionsklone. Die densitometrischen Werte wurden jeweils auf β -Aktin-Werte desselben oder auf die eines parallel laufenden Western Blots mit identischen Proben normalisiert.

4.2.2.2 Ausschluss der Vektorkontrolle *Vec14* aus der Auswertung

Die *MarvelD3*-überexprimierenden Klone zeigten im Vergleich zur Vektorkontrolle *Vec14* eine hundertfach höhere *Claudin 2*-Expression. (*Vec14* = 100%, *MD3#27* = $2106.67 \pm 621.47\%$, $n = 6$, *MD3#40* = $1204.88 \pm 451.99\%$, $n = 6$, *MD3#43* = $2557.47 \pm 769.72\%$, $n = 6$, Abb. 22.A) Im Vergleich zu der Vektorkontrolle *Vec12* zeigte sich in den Überexpressionsklonen ebenfalls eine erhöhte *Claudin 2*-Expression, wobei der Unterschied hier weniger stark ausgeprägt war. (*Vec12* = 100%, *MD3#27* = $496,30 \pm 102,26\%$, $n = 6$, *MD3#40* = $273,42 \pm 58.22\%$, $n = 7$, *MD3#43* = $566,03 \pm 59.27\%$, $n = 6$, Abb. 22.B). Im Vergleich zur Vektorkontrolle *Vec12* war die Expression von *Claudin 2* in der Vektorkontrolle *Vec14* deutlich herabgesetzt. (*Vec12* = 100%, *Vec14* = $52,01 \pm 21,32\%$, $n = 7$, Abb. 22.C) Die Ergebnisse der densito-

metrischen Auswertung der Western Blots spiegeln sich ebenfalls in der Messung der Dilutionspotentiale wider. (siehe Abschnitt 4.2.2.4, Abb. 27)

Da diese Tatsachen darauf hindeuten, dass es sich um eine ungeeignete Kontrolle handelt, wurde Vec14 aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Zu erwähnen sei außerdem an dieser Stelle, dass der Claudin 2-Antikörper wie auch in den Zytokinversuchen eine zweite unspezifische Bande zeigte, welche nicht zur Auswertung herangezogen wurde (siehe Abschnitte 4.1. und 4.1.8, Abb. 18).

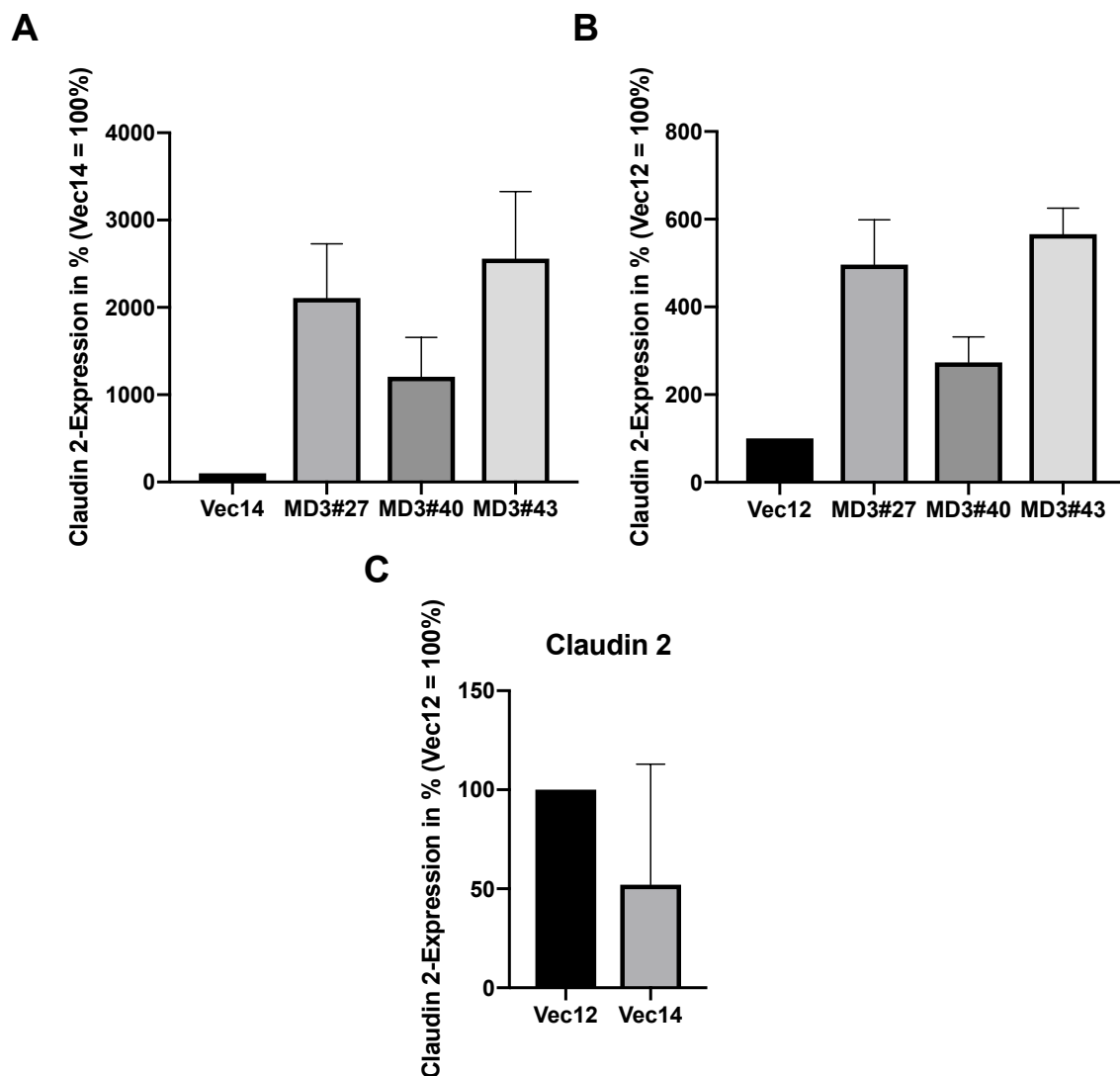


Abb. 22: Claudin 2-Expression der Vektorkontrollen und der MarvelD3-Überexpressionsklone der Zelllinie MDCK II. **A** Vergleich der Claudin 2-Expression zwischen Vec14 und den MarvelD3-Überexpressionsklonen. Die β -Aktin-korrigierten densitometrischen Werte der Überexpressionsklone wurden jeweils auf jene der Vektorkontrolle bezogen, welche dann auf 100% normiert wurde. **B** Vergleich der Claudin 2-Expression zwischen Vec12 und den MarvelD3-Überexpressionsklonen. Die β -Aktin korrigierten densitometrischen Werte der Überexpressionsklone wurden jeweils auf jene der Vektorkontrolle bezogen, welche dann auf 100% normiert wurde. **C** Vergleich der Claudin 2-Expression der Vektorkontrollen. Die normalisierten densitometrischen Werte von Vec14 wurden jeweils auf die normalisierten Werte von Vec12 bezogen und zusammengeführt.

4.2.2.3 Lokalisationsanalyse von MarvelD3 in MDCK II-Zellen

Zur Darstellung der Überexpression und Lokalisation von MarvelD3 in den MarvelD3-Überexpressionsklonen der Zelllinie MDCK II wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Die Färbung bestätigte die Überexpression von MarvelD3 in den Überexpressionsklonen im Vergleich zur Vektorkontrolle Vec12. Lokalisiert war das überexprimierte MarvelD3 vor allem in den Tight Junctions, geringfügig jedoch auch intrazellulär (Abb. 23).

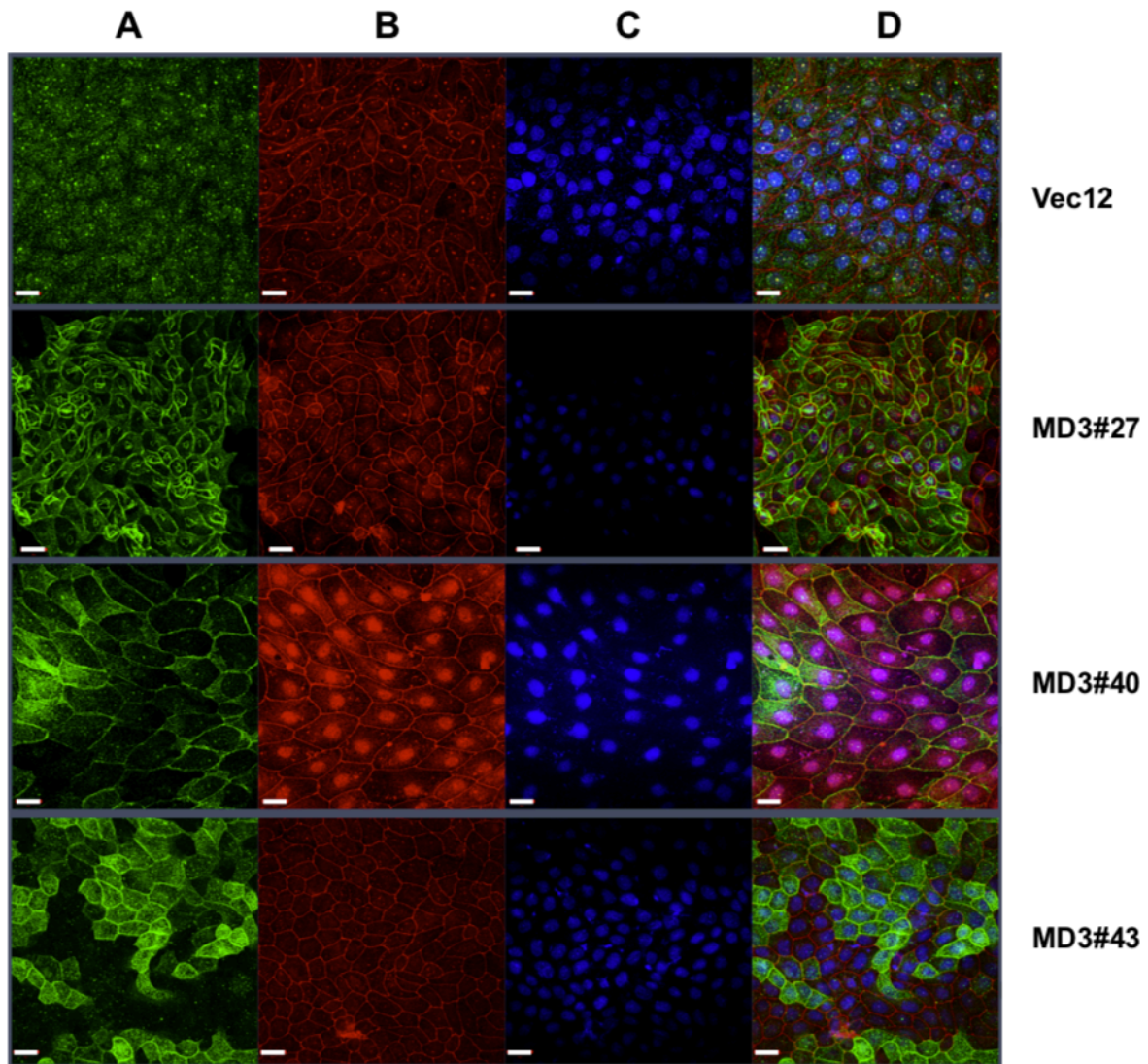


Abb. 23: Immunfluoreszenzbilder der Vektorkontrolle Vec12 und der MarvelD3-Überexpressionsklone (MD3#27, MD3#40, MD3#43) der Zelllinie MDCK II. Balken = 20µm. **A** überexprimiertes MarvelD3 (mFLAG-Antikörper) **B** ZO-1 (rbZO-1-Antikörper) **C** Zellkerne (DAPI) **D** Überlagerung (Merge) aller Färbungen

4.2.2.4 Einfluss von MarvelD3 auf den transepithelialen Widerstand und die Permeabilität: Widerstands- und Dilutionspotentialmessung in MDCK II-Zellen

Um den Einfluss einer Überexpression von MarvelD3 auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von MDCK II-Zellen zu überprüfen, wurden Widerstands- und Dilutionspotentialmessungen durchgeführt. In den Ergebnissen der TER-Messung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den MarvelD3-überexprimierenden Klonen und der Vektorkontrolle (Vec12 = $93,39 \pm 14,31 \Omega \cdot \text{cm}^2$, n = 7, MD3#27 = $76,18 \pm 9,77 \Omega \cdot \text{cm}^2$, n = 10, MD3#40 = $96,96 \pm 7,85 \Omega \cdot \text{cm}^2$, n = 10, MD3#43 = $83,20 \pm 9,48 \Omega \cdot \text{cm}^2$, n = 10, ANOVA $p = 0,4391$, Abb. 24).

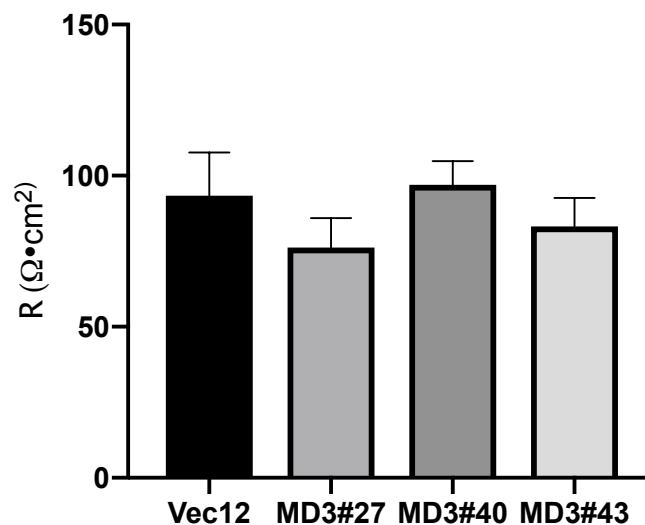


Abb. 24: TER-Messung der Vektorkontrolle Vec12 und der MarvelD3-Überexpressionsklone (MD3#27, MD3#40, MD3#43) der Zelllinie MDCK II in der Ussing-Kammer. Die TER-Werte zeigten keine signifikanten Unterschiede (ANOVA: $p = 0,4391$).

In den Dilutionspotentialmessungen zeigten sich für die Klone MD3#27, MD3#40 und MD3#43 im Vergleich zur Vektorkontrolle für Na^+ und Cl^- keine signifikanten Unterschiede in den Permeabilitäten. (P_{Na} : Vec12 = $22,87 \pm 3,87 \cdot 10^{-6} \text{cm/s}$, n = 7, MD3#27 = $24,48 \pm 2,98 \cdot 10^{-6} \text{cm/s}$, n = 10, MD3#40 = $17,21 \pm 1,42 \cdot 10^{-6} \text{cm/s}$, n = 10, MD3#43 = $21,73 \pm 2,33 \cdot 10^{-6} \text{cm/s}$, n = 10, ANOVA $p = 0,2320$, Abb. 25.A; P_{Cl} : Vec12 = $2,67 \pm 0,33 \cdot 10^{-6} \text{cm/s}$, n = 7, MD3#27 = $7,61 \pm 1,82 \cdot 10^{-6} \text{cm/s}$, n = 10, MD3#40 = $5,44 \pm 1,01 \cdot 10^{-6} \text{cm/s}$, n = 10, MD3#43 = $7,04 \pm 2,2 \cdot 10^{-6} \text{cm/s}$, n = 10, ANOVA $p = 0,2184$, Abb. 25.B) Dies spricht dagegen, dass die Überexpression von Claudin 2 in diesen Klonen einen großen Einfluss auf die Barriereigenschaften der Zellen hatte. Wenn Claudin 2 in den Klonen voll funktionsfähig wäre, würde man hier eine Verschiebung der Permeabilitäten zur Kationenselektivität hin erwarten, da Claudin 2 parazelluläre, kationenselektive Kanäle bildet und gegen Anionen abdichtet. (Amasheh *et al.*, 2002;

Krug *et al.* 2009) Dies ist aber wie das Verhältnis P_{Na}/P_{Cl} zeigt (Abb. 26) nicht der Fall.

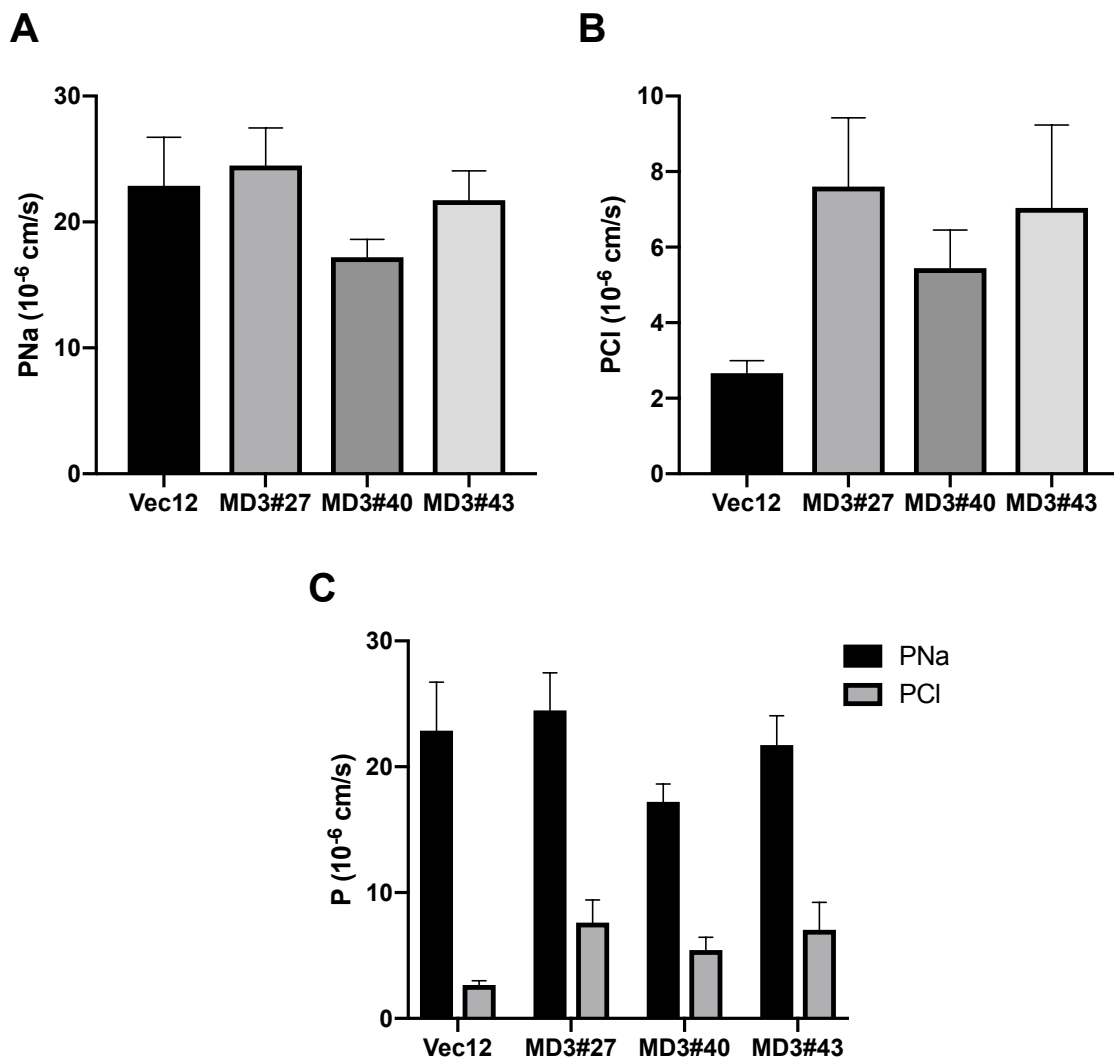


Abb. 25: Dilutionspotentialmessungen der Vektorkontrolle Vec12 und der MarvelD3-Überexpressionsklone (MD3#27, MD3#40, MD3#43) der Zelllinie MDCK II. Die Dilutionspotentialmessungen ergaben keine signifikanten Unterschiede in den Permeabilitäten für **A** Na^+ (ANOVA $p = 0,232$) und **B** Cl^- (ANOVA $p = 0,2184$). **C** Gegenüberstellung der Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- .

Das Verhältnis beider Permeabilitäten zueinander unterschied sich beim Klon MD3#40 signifikant von dem der Vektorkontrolle (P_{Na}/P_{Cl} : Vec12 = $9,83 \pm 2,16$, $n = 7$, MD3#40 = $4,19 \pm 0,78$, $n = 10$, $p = 0,0405$, Abb. 26). Bei den restlichen Klonen zeigte das Verhältnis beider Permeabilitäten keinen signifikanten Unterschied zur Vektorkontrolle, war tendenziell aber etwas niedriger (P_{Na}/P_{Cl} : Vec12 = $9,83 \pm 2,16$, $n = 7$, MD3#27 = $4,97 \pm 1,19$, $n = 10$, $p = 0,0506$, MD3#43 = $4,88 \pm 0,88$, $n = 10$, $p = 0,0606$, Abb. 26 und 27).

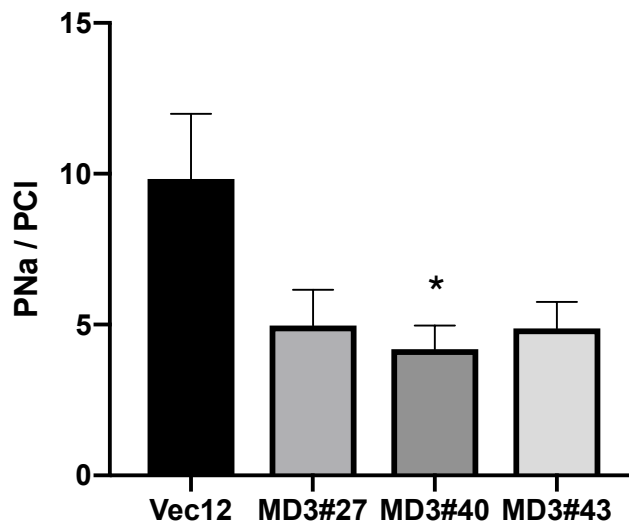


Abb. 26: Verhältnis der Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- der Vektorkontrolle Vec12 und der MarvelD3-Überexpressionsklone (MD3#27, MD3#40, MD3#43) der Zelllinie MDCK II. Das Verhältnis der Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- unterschied sich ausschließlich bei dem Klon MD3#40 signifikant von der Vektorkontrolle ($p = 0,0405$).

Wie bereits erwähnt, bestätigte sich auch in der Messung der Dilutionspotentiale, dass es sich bei der Vektorkontrolle Vec14 um eine ungeeignete Vektorkontrolle handelte. Hier zeigte die Vektorkontrolle Vec14 ein für die Zelllinie untypisches Dilutionspotentialprofil. ($P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$: Vec14 = 1.55 ± 0.13 , $n = 8$, Abb. 27).

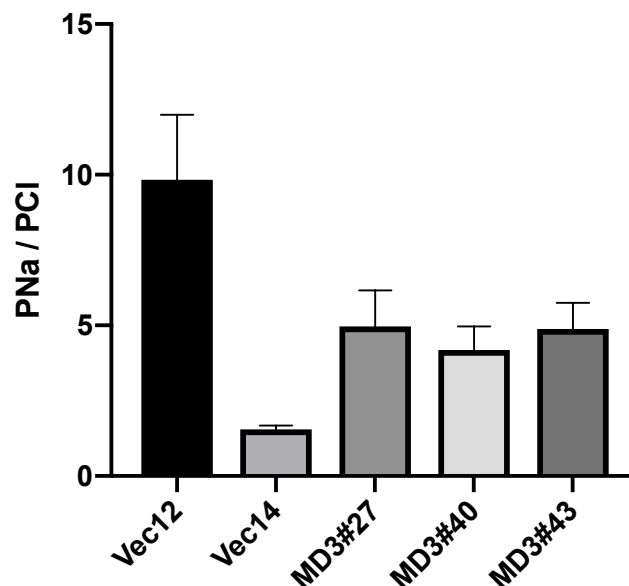


Abb. 27: Verhältnis der Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- der Vektorkontrollen Vec12, Vec14 und der MarvelD3-Überexpressionsklone der Zelllinie MDCK II (MD3#27, MD3#40, MD3#43). Die Vektorkontrolle Vec14 zeigte ein für die Zelllinie MDCK II untypisches Dilutionspotentialprofil. Daher wurde sie von der statistischen Auswertung der Ergebnisse ausgeschlossen.

4.2.3 Überexpression von MarvelD3 in MDCK I-Zellen

Die MarvelD3-Überexpression führte in MDCK II-Zellen zu einer großen Claudin 2-Variabilität und hatte keinen direkten Einfluss auf die epitheliale Barriere. Daher wurden die Experimente auch an den hochohmigen MDCK I-Zellen durchgeführt, welche kein Claudin 2 exprimieren. (Furuse *et al.*, 2001) Aufgrund von Problemen mit den Messelektroden konnten am Ende nur einzelne der durchgeführten Versuche ausgewertet werden. Diese Arbeit stellt dementsprechend nur den Anfang einer Untersuchung der Funktion von MarvelD3 in MDCK I-Zellen dar. Ob die Probleme bei der Messung auch an untypischen Eigenschaften der Zellen gelegen haben können oder rein technischer Natur waren, konnte nicht geklärt werden.

4.2.3.1 Tight Junction-Proteinexpressionsprofil der MarvelD3-Überexpressionsklone MD3#4 und MD3#8 und deren Vektorkontrollen Vec2 und Vec3

Die Untersuchung der TJ-Proteinkonzentrationen in Vektorkontrollen und MarvelD3-überexprimierenden Klonen erfolgte mittels Western Blot. Es wurden die Ergebnisse von zwei bis sieben Zellpassagen ausgewertet (Abb. 28). Hier zeigten MD3#4 und MD3#8 im Vergleich zur Vektorkontrolle Vec2 wie erwartet eine Überexpression von MarvelD3 1 (Vec2 = 100%, MD3#4 = $879,88 \pm 616,79\%$, n = 2, MD3#8 = $454,74 \pm 271,03\%$, n = 2) und MarvelD3 2 (Vec2 = 100%, MD3#4 = $657,47 \pm 418,91\%$, n = 2, MD3#8 = $285,50 \pm 124,67\%$, n = 2). Dies zeigte sich auch im Vergleich zur Vektorkontrolle Vec3 für MarvelD3 1 (Vec3 = 100%, MD3#4 = $284,65 \pm 47,40\%$, n = 2, MD3#8 = $163,34 \pm 2,32\%$, n = 2) und MarvelD3 2 (Vec3 = 100%, MD3#4 = $380,90 \pm 84,76\%$, n = 2, MD3#8 = $188,55 \pm 11,10\%$, n = 2). In beiden MarvelD3-Überexpressionsklonen, vor allem aber im Klon MD3#4 zeigte sich eine deutlich erniedrigte endogene Expression von Claudin 1, sowohl im Vergleich zu Vec2 (Vec2 = 100%, MD3#4 = $4,72 \pm 2,03\%$, MD3#8 = $31,86 \pm 6,93\%$) als auch Vec3 (Vec3 = 100%, MD3#4 = $7,70 \pm 3,08\%$, MD3#8 = $57,15 \pm 6,12\%$). Die Expression von Claudin 3 und 4 war in den Klonen MD3#4 und MD3#8 im Vergleich zu den Vektorkontrollen leicht erhöht. Dies zeigte sich sowohl im Vergleich zur Vektorkontrolle Vec2 (**Claudin 3**: Vec2 = 100%, MD3#4 = $262,92 \pm 73,41\%$, n=6, MD3#8 = $167,89 \pm 28,10\%$, n=6, **Claudin 4**: Vec2 = 100%, MD3#4 = $172,39 \pm 18,02\%$, n=6, MD3#8 = $153,10 \pm 21,39\%$, n=6) als auch im Vergleich zur Vektorkontrolle Vec3 (**Claudin 3**: Vec3 = 100%, MD3#4 = $310,37 \pm 53,22\%$, n=7, MD3#8 = $208,79 \pm 26,28\%$, n=7, **Claudin 4**: Vec3 = 100%, MD3#4 = $173,39 \pm 29,10\%$, n=7, MD3#8 = $168,76 \pm$

37,17%, n=7). Die restlichen Tight Junction-Proteine zeigten sich weitestgehend unverändert. Im Vergleich zur Vektorkontrolle Vec2 zeigte der Klon Vec3 eine erniedrigte Claudin 1- und Tricellulin-Expression bei erhöhter MarvelD3-Expression. Die Inkubation mit Antikörpern gegen MarvelD3 und Occludin führten nur bei zwei der sieben Passagen zu auswertbaren Western Blots. Dies lag vor allem an der Qualität der verfügbaren Antikörper.

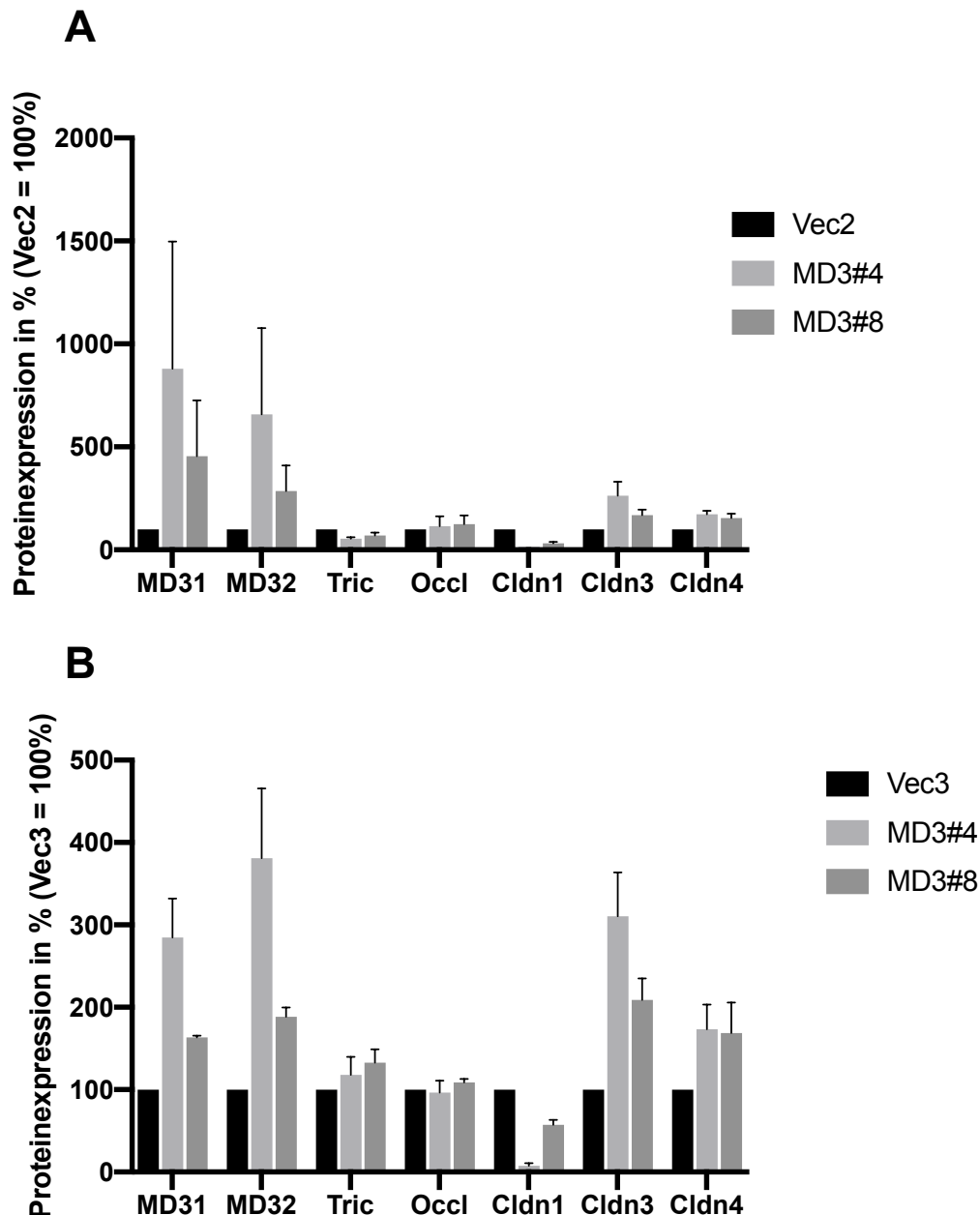


Abb. 28: Western Blot-Charakterisierung der Vektorkontrollen Vec2, Vec3 und MarvelD3-Überexpressionsklone MD3#4 und MD3#8 der Zelllinie MDCK I. Marvel D3 1 und 2, Tricellulin (Tric), Occludin (Occl), Claudin (Cldn) 1, 3 und 4. Die densitometrischen Werte wurden auf β -Aktin-Werte desselben oder auf die eines parallel laufenden Western Blots mit identischen Proben normalisiert, auf die Vektorkontrolle bezogen und dann zusammenggeführt. **A** Vergleich der MD3-Überexpressionsklone mit der Vektorkontrolle Vec2 **B** Vergleich der MD3-Überexpressionsklone mit der Vektorkontrolle Vec3.

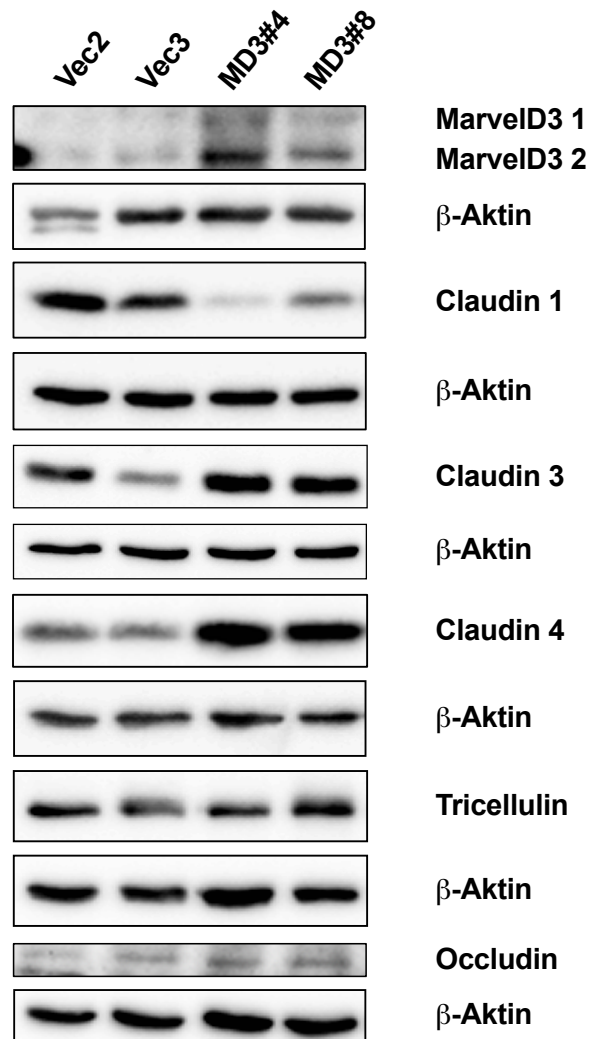


Abb. 29: Exemplarische Western Blots zur Charakterisierung der Vektorkontrollen und der MarvelD3-Überexpressionsklone der Zelllinie MDCK I. Darstellung exemplarischer Western Blots der MDCK I-Vektorkontrollen und MarvelD3-Überexpressionsklone. Die densitometrischen Werte wurden jeweils auf β -Aktin-Werte desselben oder auf die eines parallel laufenden Western Blots mit identischen Proben normalisiert.

4.2.3.2 Lokalisationsanalyse von MarvelD3 in MDCKI-Zellen

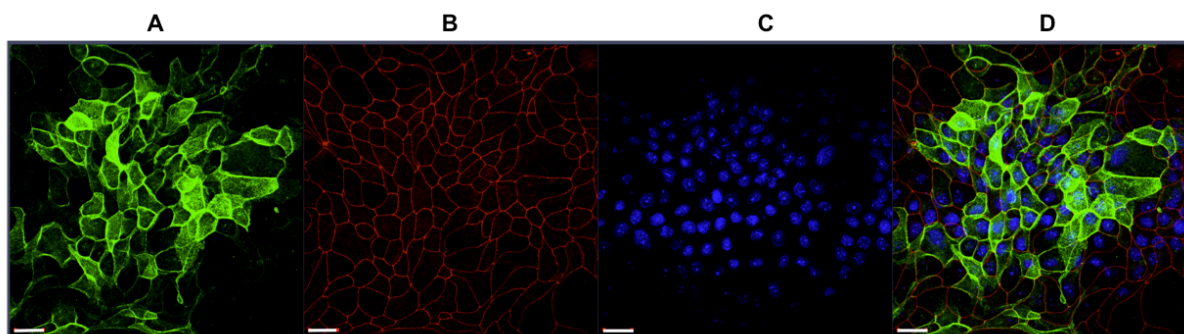


Abb. 30: Immunfluoreszenzbilder des MarvelD3-Überexpressionsklons MD3#8 der Zelllinie MDCK I. Balken = 20 μ m. **A** überexprimiertes MarvelD3 (mFLAG-Antikörper) **B** ZO-1 (rbZO-1-Antikörper) **C** Zellkerne (DAPI) **D** Überlagerung (Merge) aller Färbungen

Zur Darstellung der Überexpression und Lokalisation von MarvelD3 in den MarvelD3-Überexpressionsklonen der Zelllinie MDCK I wurden ebenfalls orientierende Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Die Färbung bestätigte die Überexpression von MarvelD3 im Überexpressionsklon MD3#8. Lokalisiert war das überexprimierte MarvelD3 wie bei den Überexpressionsklonen der Zelllinie MDCK II vor allem in den Tight Junctions, sowie geringfügig intrazellulär (Abb. 30). Die Immunfluoreszenzfärbungen der Vektorkontrollen und der restlichen Überexpressionsklone zeigten diverse Artefakte, wurden bisher jedoch noch nicht wiederholt und werden daher nicht abgebildet.

4.2.3.3 Einfluss von MarvelD3 auf den transepithelialen Widerstand und die Permeabilität: Widerstands- und Dilutionspotentialmessung in MDCK I-Zellen

Obwohl nur vereinzelte elektrophysiologische Versuche ausgewertet wurden konnten, sind diese im Folgenden dargestellt.

In den Ergebnissen der Widerstandsmessung zeigte sich der niedrigste TER in den Zellklonen Vec3 und MD3#4 und der höchste Widerstand im MarvelD3-Überexpressionsklon MD3#8 (Vec2 = $4517,57 \pm 1204,86 \Omega \cdot \text{cm}^2$, n = 1, Vec3 = $1647,3932 \pm 798,60 \Omega \cdot \text{cm}^2$, n = 2, MD3#4: $2896,01 \pm 408,80 \Omega \cdot \text{cm}^2$, n = 1, MD3#8 = $6234,12 \pm 1476,73 \Omega \cdot \text{cm}^2$, n = 1, Abb. 31).

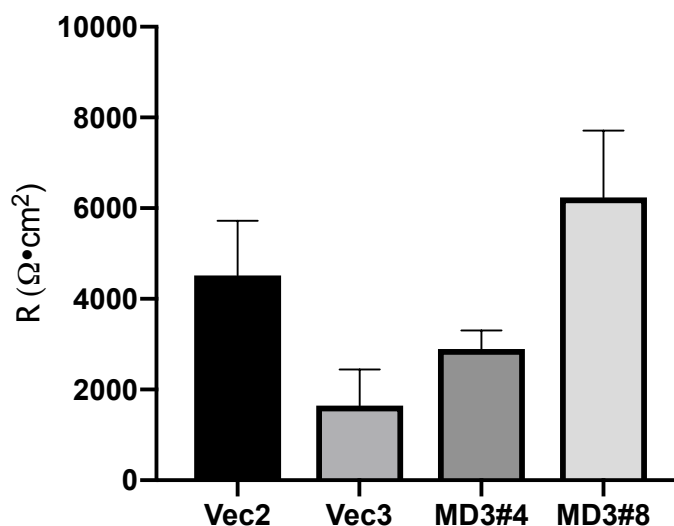


Abb. 31: TER-Messung der Vektorkontrollen Vec2, Vec3 und der MarvelD3-Überexpressionsklone MD3#4 und MD3#8 der Zelllinie MDCK I in der Ussing-Kammer.

Die Vektorkontrolle Vec3 zeigte die höchsten Permeabilitäten für Natrium und Chlorid. Der Überexpressionsklon MD3#8 zeigte hier die umgekehrte Tendenz. Das Verhältnis beider Permeabilitäten schien sich unter den Klonen nicht deutlich zu unterscheiden. (P_{Na} : Vec2 = $0,29 \pm 0,06 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$, $n = 1$, Vec3 = $0,96 \pm 0,44 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$, $n = 2$, MD3#4 = $0,42 \pm 0,04 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$, $n = 1$, MD3#8 = $0,208 \pm 0,04 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$, $n = 1$, Abb. 32.A; P_{Cl} : Vec2 = $0,18 \pm 0,07 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$, $n = 1$, Vec3 = $0,77 \pm 0,36 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$, $n = 2$, MD3#4 = $0,30 \pm 0,06 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$, $n = 1$, MD3#8 = $0,13 \pm 0,04 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$, $n = 1$, Abb. 32.B; P_{Na}/P_{Cl} : Vec2 = $1,71 \pm 0,34$, $n = 1$, Vec3 = $1,30 \pm 0,08$, $n = 2$, MD3#4 = $1,38 \pm 0,12$, $n = 1$, MD3#8 = $1,61 \pm 0,20$, $n = 1$, Abb. 32.D) Dass auch bei $n = 1$ ein Standardfehler angegeben wird, liegt daran, dass in einem Versuch sowohl die Werte für die apikale als auch für die basale Zellfilterseite einfließen.

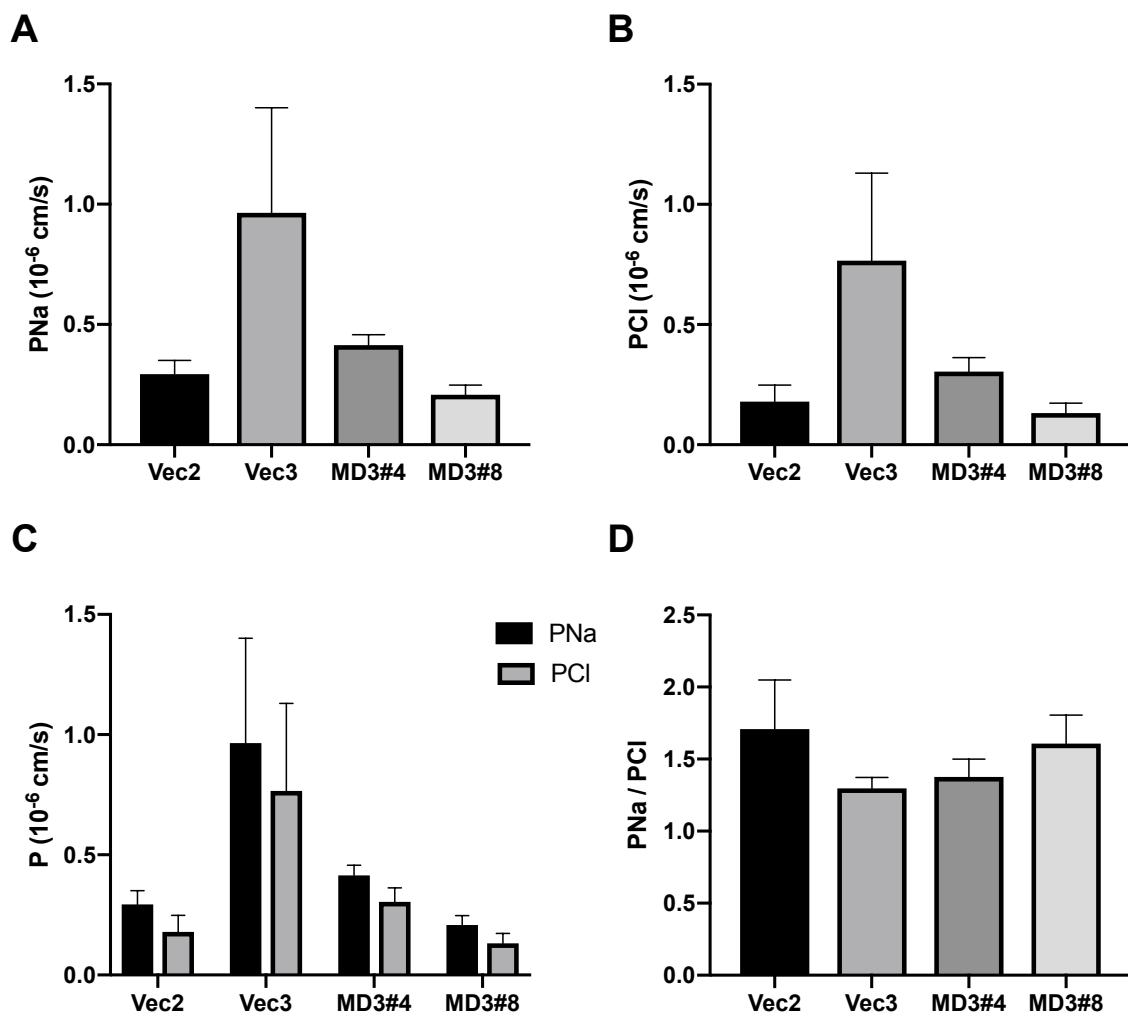


Abb. 32: Dilutionspotentialmessungen der Vektorkontrollen Vec2 und Vec3 und der MarvelD3-Überexpressionsklone MD3#4 und MD3#8 der Zelllinie MDCK I. **A** Permeabilität für Na^+ **B** Permeabilität für Cl^- **C** Gegenüberstellung der Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- **D** Verhältnis der Permeabilitäten für Na^+ und Cl^-

5 Diskussion

Die Tight Junction gilt als integraler Bestandteil der epithelialen Barriere, welche wiederum die Voraussetzung für die Funktionalität vieler Organe und die Abgrenzung des Organismus von der Außenwelt darstellt. Je nach Proteinzusammensetzung erlaubt die Tight Junction den parazellulären Übertritt von mehr oder weniger Soluten und Wasser. Die Proteine der TAMP-Familie, Occludin, Tricellulin und MarvelD3, sind zwar anders als die Claudine nicht essenziell für die Ausbildung von TJ-Strängen, kommen jedoch ubiquitär in TJs vor und können so Einfluss auf deren Funktion nehmen. (Günzel und Fromm, 2012)

Die Rolle, welche dem TJ-Protein MarvelD3 in der intestinalen Inflammation im Rahmen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen und der Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere zukommt ist noch nicht abschließend untersucht. Diese Arbeit beschäftigte sich daher mit der Auswirkung verschiedener Zytokine auf den TER und die MarvelD3-Expression in HT-29/B6-Zellen, sowie dem Effekt einer MarvelD3-Überexpression auf den transepithelialen Widerstand und die Dilutionspotentiale in den Zelllinien MDCK II und I.

5.1 Bedeutung von Zytokinen, veränderter Tight Junction-Proteinexpression und MarvelD3 für die Pathophysiologie der CED

Die Mediatoren der für die CED verantwortlichen Immunantwort sind vordergründig die T-Lymphozyten, welche den Phänotyp von TH1, TH2- oder TH17-Zellen aufweisen und jeweils unterschiedliche Immunantworten initiieren. Sie können durch verschiedene Antigen-präsentierende Zellen in der Darmmukosa aktiviert werden und sezernieren hiernach jeweils unterschiedliche Zytokine (Abb. 33). Beim Morbus Crohn ist eher mit einer TH1-Antwort mit hohen Konzentrationen an IFN γ und TNF α zu rechnen, während bei der Colitis ulcerosa eher die TH2-Antwort mit dem Schlüsselzytokin IL-13 eine Rolle zu spielen scheint. (Heller *et al.*, 2005; Clayburgh, Shen und Turner, 2004) Dieses Paradigma wurde zwar aufgrund widersprüchlicher Befunde hinsichtlich der Produktion und Wirkung von IL-13 und der IL-4-Konzentration in der Darmmukosa von CED-Patient*innen in Frage gestellt (Geremia *et al.*, 2014; Fuss *et al.*, 2004; Siegmund, 2020), in dieser Arbeit jedoch als pathophysiologisches Modell vorausgesetzt. Da die Zytokine der TH17-Immunantwort in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden, wird auf diesen Zweig der Pathophysiologie nicht weiter eingegangen.

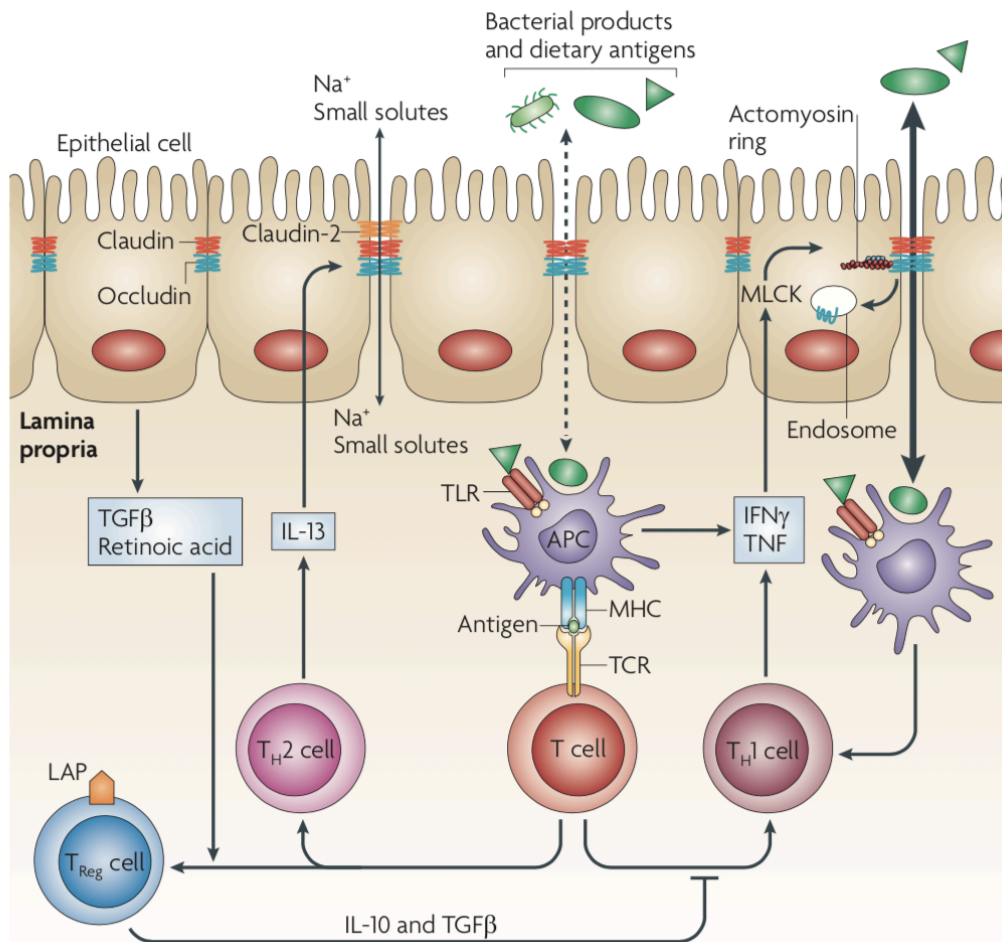


Abb. 33: Modell der intestinalen Immunantwort auf luminale Antigene (Turner, 2009, Figure 3). Luminale Antigene und Bakterienbestandteile werden von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) in der Lamina propria über verschiedene Pattern-Recognition-Rezeptoren, z.B. Toll-like-Rezeptoren (TLR) erkannt und daraufhin T-Zellen (T cell) präsentiert. Je nachdem, welches Zytokinprofil von den APC vornehmlich sezerniert wird, differenzieren die T-Zellen zu TH1-Zellen (TH1 cell), TH2-Zellen (TH2 cell) oder regulatorischen T-Zellen (TReg cell). Diese sezernieren ihrerseits pro- oder antiinflammatorische Zytokine. Je nachdem welche T-Zell-Antwort überwiegt, kommt es zur Initiierung und Aufrechterhaltung einer Inflammation oder einer Homöostase. (Turner, 2009; Clayburgh, Shen und Turner, 2004) Als Beispiel für einen Signalweg, mithilfe dessen die Zytokine Einfluss auf die epitheliale Barriere und die Aufrechterhaltung der Inflammation nehmen, ist hier die Myosin light chain kinase (MLCK) aufgeführt, welche zu Veränderungen am Aktinmyosinring und einer veränderten Distribution von TJ-Proteinen führen kann. (Shen et al., 2006; Clayburgh, Shen und Turner, 2004) Eine Zunahme der Aufnahme luminaler Antigene und Bakterien durch eine gestörte epitheliale Barriere in Kombination mit einer komplexen Dysregulation der Immunantwort kann eine intestinale Inflammation verstärken und zur Entwicklung von CED führen. (Schulzke et al., 2009; Baumgart und Carding, 2007) TCR = T-Zell-Rezeptor

Zytokine gelten bei Patient*innen mit CED als zentraler Bestandteil der intestinalen Inflammationsreaktion. So wurden in der Darmmukosa von Patient*innen mit CED erhöhte Konzentrationen von $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ gemessen. (Bruewer et al., 2003; Clayburgh, Shen und Turner, 2004; Ma et al., 2004) Auch in Serum- und Stuhlproben

von Patient*innen mit Morbus Crohn wurden erhöhte TNF α -Konzentrationen festgestellt. (Ma *et al.*, 2004)

In der Darmmukosa von Patient*innen mit CED konnte ebenfalls eine erhöhte Konzentration von IL-1 gemessen werden. Während die Konzentration von IL-1 α und IL-1 β in makroskopisch intakter Darmschleimhaut nur bei Patient*innen mit Morbus Crohn erhöht ist, findet sich diese Erhöhung bei Patient*innen mit Colitis ulcerosa nur in sichtbar entzündeter Darmmukosa wieder. (Ashwood *et al.*, 2004; Dionne *et al.*, 1998; Andus *et al.*, 1997)

Auch die Konzentration von TGF β ist in entzündeter Mukosa von Patient*innen mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa erhöht. (Ashwood *et al.*, 2004; Ihara, Hirata und Koike, 2017; Babyatsky, Rossiter und Podolsky, 1996) Bei Patient*innen mit Colitis ulcerosa zeigte sich vor allem in mäßig entzündeter Mukosa eine erhöhte TGF β -Sekretion, während in stark entzündeter Darmmukosa vor allem IL-1 α signifikant vermehrt sekretiert wurde. (Ashwood *et al.*, 2004) Ein gutes Ansprechen auf eine antiinflammatorische Therapie korrelierte bei Patient*innen mit Colitis ulcerosa mit einer signifikanten Zunahme der TGF β -Spiegel im Serum. (Sambuelli *et al.*, 2000)

Die Transkription von IL-4 und IL-13 war in Biopsien von Patient*innen mit Colitis ulcerosa im Vergleich zu nicht entzündlich veränderten Kontrollbiopsien deutlich erhöht. Auch die Aktivität der Inflammation hatte einen Einfluss auf die Transkription beider Zytokine. (Inoue *et al.*, 1999) Dies wurde in einer anderen Studie bestätigt, in der Monozyten in der Lamina propria von Patient*innen mit Colitis ulcerosa eine deutlich höhere IL-13-Produktion aufwiesen als Kontrollzellen aus der Darmschleimhaut gesunder Patient*innen oder Patient*innen mit Morbus Crohn. (Heller *et al.*, 2005) Die Proteinexpression von IL-4 in Darmbiopsien von Patient*innen mit Colitis ulcerosa zeigte sich jedoch in anderen Studien erniedrigt, sodass hier keine eindeutige Aussage getroffen werden kann. (Fuss *et al.*, 1996)

Auf molekularer Ebene zeigt sich in der Darmmukosa von Patient*innen mit CED eine veränderte Struktur der Tight Junctions, welche u.a. durch eine veränderte Proteinexpression zustande kommt. (Zeissig *et al.*, 2007) Für den Verlust von Wasser ins intestinale Lumen und damit die Leak-Flux-Diarrhoe wird u.a. auch die erhöhte Expression von Claudin 2 in der Mukosa von CED-Patient*innen verantwortlich gemacht. (Prasad *et al.*, 2005) Die erhöhte Claudin 2-Expression konnte sowohl an Darmproben von Patient*innen mit Morbus Crohn als auch von Patient*innen mit

Colitis ulcerosa nachgewiesen werden, wobei sie bei der Colitis ulcerosa deutlicher ausgeprägt ausfiel als bei Patient*innen mit Morbus Crohn. (Prasad *et al.*, 2005; Zeissig *et al.*, 2007; Heller *et al.*, 2005) Die Expression von Occludin, sowie Claudin 1 und 4 zeigte sich in der Darmschleimhaut von Patient*innen mit Colitis ulcerosa niedriger als in Kontrollbiopsien. (Heller *et al.*, 2005)

Claudin 3 und 4 wiesen bei CED-Patient*innen teilweise eine veränderte Lokalisation auf. (Prasad *et al.*, 2005) In der Darmmukosa von Patient*innen mit Morbus Crohn zeigten sich Occludin und die abdichtenden Claudine 3, 5 und 8 herunterreguliert. Claudin 5 und 8 erfuhren zudem eine Redistribution von der Tight Junction weg. (Zeissig 2007) Die Expression von Tricellulin zeigte sich in der Darmmukosa von Patient*innen mit Colitis ulcerosa im Vergleich zu Patient*innen mit Morbus Crohn erniedrigt. (Krug *et al.*, 2018)

Ob MarvelD3 eine Rolle in der Pathophysiologie der CED einnimmt ist unzureichend geklärt. In unserem Labor wurden Darmbiopsien aus dem Sigma von Patient*innen mit CED auf ihre Expression von MarvelD3 hin untersucht. Hier zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von MarvelD3 Isoform 1 in den Darmproben von Patient*innen mit Colitis ulcerosa. Auch in den Proben von Patient*innen mit Morbus Crohn zeigte sich andeutungsweise ein Anstieg der Isoform 1 gegenüber den Kontrollbiopsien. Die Isoform 2 zeigte sich in den untersuchten Gruppen unverändert (Abb. 34, Krug 2010, unveröffentlicht). Somit scheint auch MarvelD3 möglicherweise eine Rolle in den durch Zytokine ausgelösten komplexen Veränderungen bei Patient*innen mit CED eine Rolle zu spielen.

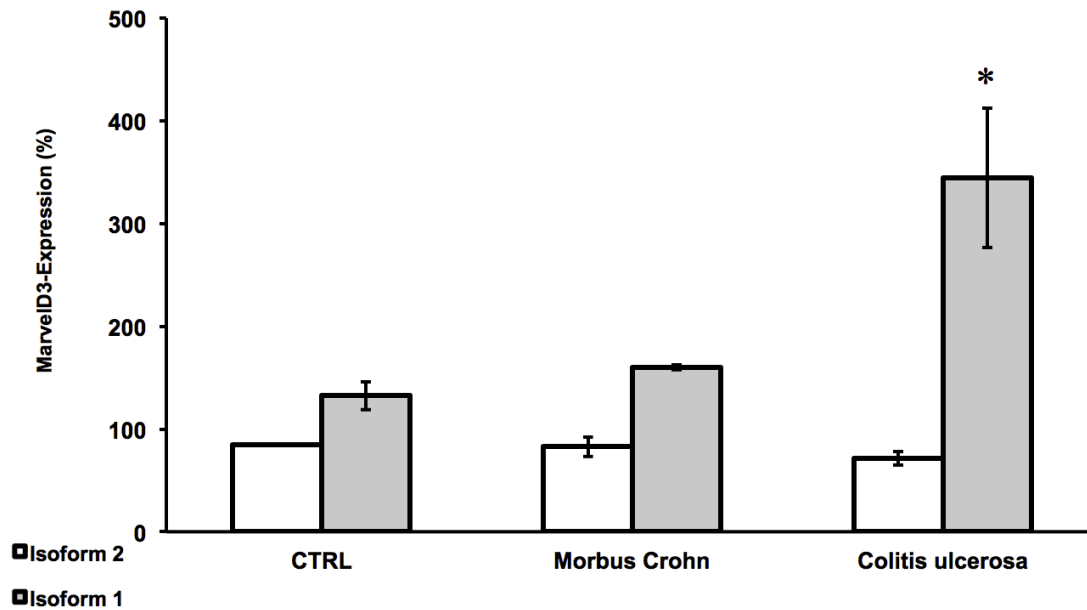


Abb. 34: MarvelD3-Expression in Darmbiopsien von Patient*innen mit CED (Krug 2010, unveröffentlicht). Aufgezeigt sind die Unterschiede zwischen der Expression von MarvelD3 (Isoformen 1 und 2) in Kontrollbiopsien (CTRL) und Biopsien aus dem Sigma von Patient*innen mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (n=8). In der Western Blot-Analyse zeigte sich ein signifikanter Anstieg der MarvelD3-Expression in Darmbiopsien von Patient*innen mit Colitis ulcerosa ($p < 0,05$).

5.2 Zytokine und Tight Junctions

Zytokine können Tight Junctions über zahlreiche Mechanismen verändern. Hierzu gehören die Regulation der Transkription und Translation, veränderte Proteinhalbwertszeiten, eine veränderte Distribution der Proteine, sowie molekulare Modifikationen von TJ-Proteinen. Diese Effekte werden über komplexe Signalwege vermittelt. (Schulzke und Fromm, 2009) Zusammen mit anderen Effekten der Zytokine resultiert dies in einer gestörten epithelialen Barriere mit Wasser- und Solutverlusten und einer vermehrten Aufnahme luminaler Bakterien und anderer Antigene. (Schulzke *et al.*, 2009)

Nachdem die Untersuchungen der Sigmabiopsien darauf hindeuten, dass die Expression von MarvelD3 in der Darmmukosa von Patient*innen mit CED verändert ist (Krug 2010, unveröffentlicht), stellt sich die Frage, durch welche Zytokine dies vornehmlich verursacht wird. Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit Monolayer der intestinalen Zelllinie HT-29/B6 mit verschiedenen Zytokinen behandelt, welche an der intestinalen Inflammation im Rahmen der CED beteiligt sind.

Die Zelllinie HT-29/B6 wurde als geeignetes Zelllinienmodell für die Untersuchung der Effekte von Zytokinen auf die intestinale Barriere beschrieben, da die zeitliche

Dynamik der Barrierestörung in HT-29/B6-Monolayern nach einer Inkubation mit $\text{TNF}\alpha$ der bei CED beobachteten ähnelt. (Schmitz *et al.*, 1999) Zudem wachsen sie als eine höchst polarisierte epitheliale Zellschicht und weisen einen TER auf, der dem des Kolons ähnelt. (Mankertz *et al.*, 2000; Kreusel *et al.*, 1991)

In HT-29/B6-Zellen zeigte sich, dass nur eine basolaterale Gabe von $\text{TNF}\alpha$ eine Auswirkung auf die epitheliale Barriere hatte, was zu der Vermutung führte, dass die entsprechenden Rezeptoren für $\text{TNF}\alpha$ auch nur auf der basolateralen Seite der Epithelzellen zu finden sind. (Schmitz *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2004) Die Lokalisation der $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptoren an der basalen Zellseite konnte unter anderem durch Wang *et al.* bestätigt werden. (Wang *et al.*, 2006) Auch bei $\text{IFN}\gamma$ zeigte sich in T84-Zellen, dass nur eine Inkubation auf der basalen Zellseite einen Effekt auf den TER der epithelialen Zellmonolayer hatte. (Adams, Planchon und Roche, 1993) Die Wirkung von $\text{TGF}\beta$ auf T84-Zellmonolayer zeigte sich auf der basolateralen Seite deutlicher als apikal. (Planchon *et al.*, 1994) In HT-29/B6-Zellen führte auch die Inkubation mit IL-13 nur auf der basolateralen Seite zu einem TER-Abfall. (Heller *et al.* 2005) Gleiches wurde für IL-4 in T84-Zellen gezeigt. (Colgan *et al.*, 1994).

Daher erfolgte die Gabe der Zytokine auch in der vorliegenden Arbeit auf der basalen Seite der Zellmonolayer.

5.3 Auswirkung von Zytokinen auf den TER von HT-29/B6-Zellen und anderen epithelialen Zelllinien

Der TER der Zytokin-behandelten Zellmonolayer wurde in der vorliegenden Arbeit bestimmt, um die möglicherweise entstandenen Veränderungen der MarvelD3-Expression in Zusammenhang mit der epithelialen Barrierefunktion setzen zu können. Nach einer 24-stündigen Inkubation von HT-29/B6-Zellen mit $\text{TNF}\alpha$, und einer 48-stündigen Inkubation mit $\text{TGF}\beta 1$, IL-4, IL-13 und der Kombination von IL-4 und IL-13 wurde ein signifikanter Abfall des TER gemessen. Die Inkubation mit den Zytokinen $\text{IFN}\gamma$, IL-1 α , sowie $\text{TGF}\beta 2$ hingegen hatte keine signifikante Veränderung des TER zur Folge.

Schmitz *et al.* stellten in HT-29/B6 Zellen ebenfalls eine dosisabhängige Reduktion des TER infolge einer Inkubation mit $\text{TNF}\alpha$ fest, welche sich nicht allein auf proapoptische Effekte des Zytokins zurückführen ließ. Vielmehr zeigte sich eine verminderte Anzahl und Tiefe der TJ-Stränge und eine dadurch erhöhte parazelluläre

Permeabilität. (Schmitz *et al.*, 1999)

Ma *et al.* schreiben den TNF α -Effekt auf die epitheliale Barriere vor allem einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B zu. Dieser führte in ihrer Arbeit an Caco-2-Zellen zu einer verminderten Expression von ZO-1 und einer Umstrukturierung der Tight Junction. Auch hier zeigte TNF α keine apoptotische Wirkung auf die Epithelzellen. (Ma *et al.*, 2004)

Wang *et al.* stellten in ihren Versuchen an Caco-2-Zellen fest, dass TNF α nur nach einer Inkubation mit IFN γ zu einer reduzierten Barrierefunktion führte. Dies konnte auf eine Erhöhung der Expression von TNF α -Rezeptoren an der basalen Zellmembran durch eine Vorinkubation mit IFN γ zurückgeführt werden. (Wang *et al.*, 2006) Der Effekt von TNF α auf die epitheliale Barriere wurde hierbei durch den TNF-Rezeptor 2 vermittelt. Die hochregulierte Expression des TNF-Rezeptor 2 durch IFN γ sowie eine experimentell herbeigeführte Überexpression des Rezeptors führten zu einem vermehrten Effekt von TNF α auf die epitheliale Barrierefunktion. Dieser bestand beispielsweise in einer veränderten Distribution der TJ-Proteine Occludin und ZO-1 und der damit verbundenen Reorganisation der TJ. Die Aktivierung des TNF-Rezeptor 2 führte zu einer erhöhten Expression der *Myosin light chain kinase* (MLCK) und zur Phosphorylierung der *Myosin II regulatory light chain* (MLC) (Wang *et al.*, 2006)

Zahlreiche Komponenten der TJ interagieren mit dem Zytoskelett. F-Aktin und Myosin haben dabei einen stabilisierenden und regulativen Einfluss auf die TJ. (Clayburgh, Shen und Turner, 2004) Dass die Kontraktion des perijunktionalen Aktinmyosinrings und die daraus resultierende physikalische Krafteinwirkung auf die TJ eine Rolle in der Regulation der parazellulären Permeabilität spielt, wurde bereits früh beschrieben. (Turner *et al.*, 1997; Hecht *et al.*, 1996) Eine über die Phosphorylierung der MLC vermittelte Reorganisation von F-Aktin führt zudem zu einer veränderten Lokalisation von ZO-1 und Occludin. (Shen *et al.*, 2006) Wang *et al.* sehen in der NF κ B-unabhängigen Induktion einer vermehrten MLC-Phosphorylierung den zentralen Wirkmechanismus von TNF α und IFN γ auf die TJ und damit die epitheliale Barriere. (Wang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006)

Bereits in frühen Untersuchungen zeigte sich auch ein Effekt von IFN γ alleine auf die epitheliale Barrierefunktion. So führte eine Inkubation von T84-Zellmonolayern mit IFN γ über 72 Stunden zu einem verminderten TER sowie einer erhöhten Permeabilität. (Madara und Stafford, 1989)

Eine Inkubation von HT-29/B6-Zellen mit IFN γ hatte in den Untersuchungen von Schmitz et al. ebenfalls erst nach einer Inkubationsdauer von 72 Stunden deutliche Auswirkungen auf den TER. Nach 24 Stunden beeinflusste IFN γ den TER nur in Kombination mit TNF α deutlich. (Schmitz et al., 1999) In Untersuchungen an T84-Zellen führte eine Inkubation mit IFN γ zu einer veränderten Lokalisation von Occludin, sowie Claudin 1 und Claudin 4 von der TJ weg. Eine Blockade der Zytokin-induzierten Apoptose konnte die Entstehung der Barrierestörung nicht verhindern. (Bruewer et al., 2003) Auch die gleichzeitige Inkubation mit TNF α und IFN γ führte zu einer Redistribution von Claudin 4 und einem TER-Abfall. (Prasad et al., 2005)

In T84-Zellen konnte dann auch gezeigt werden, dass IFN γ eine Internalisierung von TJ-Proteinen auslöst, welche dem Vorgang der Makropinozytose ähnelt und einen entsprechenden Abfall des TER nach sich zieht. Die internalisierten Proteine konnten in endosomalen Kompartimenten nachgewiesen werden. Eine Inkubation mit IFN γ führte nach 48 Stunden zu einer Internalisierung von TJ-Proteinen und einem deutlichen TER-Abfall. (Bruewer et al., 2005)

In welchem Ausmaß auch die Apoptose in HT-29/B6-Zellen eine Rolle in der Herabsetzung des TER und der Erhöhung der epithelialen Permeabilität durch TNF α und IFN γ hat, ist nicht abschließend geklärt. Während die apoptotische Wirkung von TNF α in einigen Arbeiten nicht mit dem Ausmaß der Barrierestörung korrelierte (Schmitz et al., 1999; Bruewer et al. 2003), wurde der Apoptose in anderen Arbeiten eine größere Rolle zugeschrieben. (Gitter et al., 2000) Klar ist jedoch, dass auch die Apoptose mit einer veränderten epithelialen Barriere mit erniedrigtem TER und einer erhöhten Permeabilität einhergeht. (Bojarski et al., 2001)

Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein signifikanter Effekt von TNF α auf die epitheliale Barriere. Andeutungsweise war dieser ebenfalls dosisabhängig. Obwohl eine Inkubation mit IFN γ nach 48 Stunden im Vergleich zu Kontrollzellen zu keinem signifikanten TER-Unterschied führte, ließ sich ein erster TER-Abfall beobachten. Im Hinblick auf vorangegangene Studien hätte dieser nach einer längeren Inkubationsdauer eventuell ausgeprägter ausfallen können. In welchem Ausmaß welche der beschriebenen molekularen Mechanismen eine Rolle gespielt haben, wurde nicht untersucht. Zusammenfassend ist jedoch davon auszugehen, dass es sich um ein komplexes Zusammenspiel der beschriebenen Signalwege und intrazellulären Prozesse handelt.

Die Inkubation von Caco-2-Zellen mit IL-1 β führte in vorhergehenden Studien nach 12 Stunden zu einer Senkung des TER und einer erhöhten Permeabilität, welche mit einer erhöhten MLCK-Expression einhergingen. (Al-Sadi *et al.*, 2008)

TGF β 1 nimmt in der Regulation der Inflammation verschiedener Zellen u.a. die Rolle des Gegenspielers von IL-1 ein. So führt das antiinflammatorische Zytokin zu einer reduzierten Sekretion von IL-1, einer verminderten Anzahl an IL-1-Rezeptoren und einer erhöhten Expression von IL-1-Rezeptorantagonisten. (Ashwood *et al.*, 2004; Karres *et al.*, 1996; Turner *et al.*, 1991; Dubois *et al.*, 1990)

Eine Inkubation von T84-Zellmonolayern mit TGF β zeigte bereits nach 16 Stunden einen signifikanten Anstieg des TER, welcher nach 72 Stunden noch ausgeprägter ausfiel. Als Teile des Signalweges von TGF β wurden die MAP-Kinase (*mitogen-activated-protein kinase*) und SMAD-Proteine identifiziert. (Howe *et al.*, 2005)

In einer anderen Studie an T84-Zellmonolayern erhöhte eine Inkubation mit TGF β den TER nach 48 Stunden. Zudem neutralisierte TGF β den Effekt von IFN γ auf die Epithelzellen. Dies zeigte sich darin, dass eine gleichzeitige Inkubation mit beiden Zytokinen in einem deutlich höheren TER als eine Inkubation mit IFN γ alleine resultierte. (Planchon *et al.*, 1994) Ein ähnlicher Effekt konnte auch an HT-29/B6-Zellen nachgewiesen werden. (Hering *et al.*, 2011)

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich weder ein TER-Abfall durch die Inkubation der HT-29/B6-Zellen mit IL-1 α noch eine Zunahme des TER durch die Inkubation mit TGF β 1 und 2.

Eine Inkubation mit TGF β 1 hatte im Gegenteil eine Senkung des TER zur Folge. Durch welche Mechanismen diese zustande kam, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Da TGF β bisher nur eine protektive Wirkung auf die epitheliale Barriere zugeschrieben wurde, könnte man zytotoxische oder apoptotische Effekte durch eine zu hohe Konzentration von TGF β 1 oder eine zu lange Einwirkdauer hinter dem TER-Abfall vermuten. Zu erwähnen sei auch, dass es unter den TGF β 1-Zellfiltern auch einen Filter mit einem erhöhten Widerstand gab, dieser jedoch aus der statistischen Wertung herausgenommen wurde, da er durch den Grubbs-Test als Ausreißer identifiziert wurde.

In vorhergegangenen Studien führte eine Inkubation der basolateralen Zellseite von HT-29/B6-Zellmonolayern mit IL-13 nach 48 Stunden zu einer dosisabhängigen Senkung des TER und einer erhöhten parazellulären Permeabilität. Ursächlich für den

Effekt auf die epitheliale Barriere waren die durch IL-13 induzierte erhöhte Apoptose-rate und erhöhte Claudin 2-Expression. Auch die Restitution des Epithels wurde durch IL-13 verlangsamt. Eine Inkubation mit IL-4 hingegen hatte keinen Effekt auf die Barrierefunktion der Zellmonolayer. (Heller *et al.*, 2005) In T84-Zellen zeigte sich bereits nach 24 Stunden sowohl nach der Inkubation mit IL-13 als auch IL-4 ein verminderter TER. (Ceponis *et al.*, 2000; Wisner *et al.*, 2008) IL-4 induzierte einen sowohl dosis- als auch inkubationszeitabhängigen, reversiblen TER-Abfall, welcher sich nicht auf zytotoxische Effekte zurückführen ließ. (Colgan *et al.*, 1994)

Die teils synergistische Wirkung beider Zytokine liegt zum Teil in der Tatsache begründet, dass sich IL-13- und IL-4-Rezeptoren eine Rezeptorkette teilen und somit ähnliche Signalkaskaden auslösen können. So bindet IL-4 an den Rezeptor IL-4R α und rekrutiert dann entweder den Rezeptor IL-2R γ c oder IL-13R α 1 in den Rezeptorkomplex hinzu. IL-13 bindet an IL-13R α 1, welcher entweder in einem Heteromer mit IL-4R α oder als Monomer wirken kann. Über die Aktivierung dieser Rezeptoren bewirkte IL-13 in HT-29/B6-Zellen die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT-6. (Heller *et al.*, 2005) TNF α verstärkte diesen Effekt noch zusätzlich. (Heller *et al.*, 2005; Lugli *et al.*, 1997)

In anderen Arbeiten wurde jedoch postuliert, dass die Wirkung von IL-4 und IL-13 auf die epitheliale Barriere vorrangig über die Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) vermittelt wird, da eine PI3K-Inhibition im Gegensatz zu einer Inhibition der STAT-6-Aktivierung den TER-Abfall durch IL-4 und IL-13 in T84-Monolayern größtenteils verhindern konnte. (Ceponis *et al.*, 2000)

In der vorliegenden Arbeit hatte eine Inkubation von HT-29/B6-Zellen mit IL-4, IL-13 sowie der Kombination beider Zytokine einen signifikanten TER-Abfall zur Folge. Dies bestätigt die synergistische, die TJs beeinflussende Wirkung beider Zytokine.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der TER ein gutes erstes Maß für die Funktion der epithelialen Barriere ist, welche durch verschiedene Zytokine beeinflusst werden kann. Um genauere Aussagen über die zugrundeliegende Veränderung der Eigenschaften der Tight Junctions zu treffen, müssen zusätzlich Aussagen über die Permeabilität, die Ionenselektivität, die Apoptoserate und die Proteinexpression getroffen werden. Der Einfluss verschiedener Signal-transduktionswege kann beispielsweise mithilfe von Inhibitoren untersucht werden.

Da eine Vielzahl verschiedener TJ-Proteine für die Aufrechterhaltung des TER zuständig ist, kann die Veränderung des TER durch die Behandlung mit Zytokinen nicht ohne weiteres auf eine veränderte Expression oder Funktionalität von MarvelD3 zurückgeführt werden. Um die Auswirkung der Zytokine auf MarvelD3 zu beleuchten, ist es also nötig sich dessen Expression im Detail anzusehen.

5.4 Auswirkung von Zytokinen auf die Expression von MarvelD3 und anderen Tight Junction-Proteinen

Die Auswirkungen von Zytokinen auf den TER werden unter anderem über eine veränderte Expression von Tight Junction-Proteinen vermittelt. Dass proinflammatorische Zytokine auch auf transkriptioneller Ebene Einfluss auf die intestinale Barriere nehmen können, konnten Mankertz et al. zeigen. So führten $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ in HT-29/B6-Zellen zu einer Reduktion der Promotoraktivität des Occludin-Gens und damit einer Reduktion der Occludin-mRNA. (Mankertz *et al.*, 2000) Ebenfalls an HT-29/B6-Zellen konnte eine durch die Inkubation mit $\text{TNF}\alpha$ erhöhte Expression von Claudin 2 nachgewiesen werden, welche zu einem deutlichen Abfall des parazellulären Widerstandes beitrug. (Mankertz *et al.*, 2009) In T84-Zellen führte die Inkubation mit $\text{IFN}\gamma$ zu einer reduzierten Expression von ZO-1 und einer veränderten Organisation des Aktin-Zytoskeletts in der apikalen Zellregion. (Youakim und Ahdieh, 1999) Eine gleichzeitige Inkubation mit $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ führte zu einer veränderten Distribution von Claudin 4. (Prasad *et al.*, 2005)

In Kolonproben von Ratten führten $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ zu einem erniedrigten TER mit erniedrigter Expression der Claudine 1, 5, 7 und Occludin, sowie einer deutlichen Erhöhung der Claudin 2-Expression. (Amasheh *et al.*, 2009a)

Eine Inkubation von T84-Zellmonolayern mit $\text{TGF}\beta$ über 72 Stunden führte zu einer vermehrten Expression von Claudin 1 und beugte einer Pathogen-bedingten Reduktion der Expression von Claudin 2, Occludin und ZO-1 vor. (Howe *et al.*, 2005) Eine Studie an HT-29/B6-Zellen führte die Wirkung einer Inkubation mit $\text{TGF}\beta$ 1 auf den TER auf eine erhöhte Expression von Claudin 4 zurück. (Hering *et al.*, 2011)

Eine Inkubation mit IL-4 führte in T84-Monolayern zu einer erhöhten Claudin 2-Expression. (Wisner *et al.*, 2008) Auch IL-13 induzierte sowohl in HT-29/B6-Zellen (Heller *et al.*, 2005) als auch in T84-Zellen (Prasad *et al.*, 2005) eine erhöhte Expression von Claudin 2. In HT-29/B6-Zellen führte eine Inkubation mit IL-13 zudem zu einer verminderten Expression von Tricellulin. (Krug *et al.*, 2018)

Auch auf die Expression von MarvelD3 haben Zytokine einen Einfluss. Raleigh et al. isolierten jejunale Epithelzellen und intaktes Jejunum aus Mäusen, welche zuvor eine intraperitoneale TNF-Injektion erhalten hatten. Bereits 45 Minuten nach der Gabe von TNF zeigte sich eine vermehrte Transkription von MarvelD3 und Tricellulin in den Enterozyten. Dementsprechend stiegen auch die Translation und die Expression beider Proteine an. Der Gehalt an Occludin-mRNA und die Occludin-Expression hingegen blieben unverändert. Auch die Verteilung der TAMP veränderte sich durch die Gabe von TNF. Das vermehrt exprimierte MarvelD3 fand sich in der TJ, der apikolateralen Zellmembran und innerhalb zytoplasmatischer Vesikel. Tricellulin war sowohl an trizellulären als auch an bizellulären TJs und im Zytoplasma vermehrt nachweisbar. (Raleigh *et al.*, 2010)

In der vorliegenden Arbeit konnte im Western Blot nach der Inkubation von HT-29/B6-Zellen mit verschiedenen Zytokinen lediglich nach der Inkubation mit IL-4 eine signifikant erhöhte Expression der MarvelD3 Isoform 2 nachgewiesen werden. Nach der Inkubation mit den restlichen Zytokinen trat keine signifikant erhöhte Expression der beiden MarvelD3-Isoformen auf. Während die Expression von MarvelD3 nach TNF-Exposition *in vivo* bereits nach weniger als einer Stunde angestiegen war (Raleigh *et al.*, 2010), zeigte sich in den aktuellen Versuchen eher die Tendenz einer dosisabhängigen Reduktion der Expression von MarvelD3 nach Inkubation mit TNF α . Da es jedoch zu keinem signifikanten Effekt kam, ist entweder von einer zu kurzen Inkubationsdauer auszugehen oder in Erwägung zu ziehen, dass die Expression von MarvelD3 in Zellmonolayern nicht so stark durch TNF α beeinflusst wird wie *in vivo*. Auch IFN γ induzierte allenfalls eine leichte Veränderung der MarvelD3-Expression. So zeigte sich die Expression beider Isoformen gegenüber den Kontrollzellen leicht erhöht. Die Inkubation mit IL-1 α sowie TGF β 1 und 2 führte zu kaum merkbaren Veränderungen der Expression von MarvelD3. Auch bei diesen Versuchen kann eine zu kurze Inkubationsdauer als Grund für das Ausbleiben eines Effektes nicht ausgeschlossen werden.

Vor allem die Inkubation der HT-29/B6-Zellen mit den Zytokinen IL-4 und IL-13 führte zu einer deutlicheren Steigerung der MarvelD3-Expression. Nach der Inkubation mit IL-4 zeigte sich eine signifikante Steigerung der Expression der MarvelD3 Isoform 2. Eine ähnliche Tendenz zeigte sich auch nach der Inkubation mit IL-13 und der Kombination beider Zytokine. Auch die Expression der Isoform 1 zeigte sich durch die Inkubation mit IL-4 und IL-13 gegenüber den Kontrollzellen leicht erhöht.

Um diesen Effekt bestätigen zu können, müssen weitere Untersuchungen folgen. Auch eine Untersuchung *in* oder *ex vivo* könnte aufschlussreiche Erkenntnisse liefern. Die erhöhte Expression von MarvelD3 nach Inkubation der HT-29/B6-Monolayer mit IL-4, IL-13 und deren Kombination könnte darauf hindeuten, dass MarvelD3 vor allem in der TH2-vermittelten Immunantwort und damit vornehmlich bei Patient*innen mit Colitis ulcerosa eine Rolle spielt. Die Ergebnisse wären also mit der erhöhten Expression von MarvelD3 im Sigma von Patient*innen mit Colitis ulcerosa zu vereinbaren.

Wie auch in vorherigen Studien (Wisner *et al.*, 2008; Heller *et al.*, 2005; Prasad *et al.*, 2005) führte die Inkubation der HT-29/B6-Zellen mit IL-4, IL-13 und deren Kombination zu einer erhöhten Claudin 2-Expression. Dass sich der TER nach der Inkubation mit IL-4 und IL-13 erniedrigt zeigte, ist demnach in erster Linie auf die signifikante Erhöhung von Claudin 2 zurückzuführen und kann nicht allein als Auswirkung der erhöhten MarvelD3-Expression gewertet werden.

Zu diskutieren bleibt weiterhin, ob die erhöhte MarvelD3-Expression zum TER-Abfall beitrug oder die MarvelD3-Expression als Kompensationsmechanismus der Zelle zum Schutz der epithelialen Barriere zu sehen ist.

Da die gestörte intestinale Barriere in der Pathophysiologie der CED eine zentrale Rolle spielt und bislang widersprüchliche Ergebnisse zum Einfluss von MarvelD3 auf die epitheliale Barriere vorlagen (Raleigh *et al.*, 2010; Steed *et al.*, 2009), wurde der Effekt einer Überexpression von MarvelD3 auf die Barrierefunktion epithelialer Zellmonolayer untersucht.

5.5 Auswirkung der MarvelD3-Überexpression auf die Widerstands- und Dilutionspotentialmessungen in MDCK II-Zellen

Die Überexpression von MarvelD3 in MDCK II-Zellen ergab in der Messung des TER und der Permeabilitäten für Natrium und Chlorid keine signifikanten Unterschiede zu den Zellen der Vektorkontrolle.

Das Verhältnis beider Permeabilitäten (P_{Na}/P_{Cl}) war im Vergleich zur Vektorkontrolle ausschließlich bei einem der Überexpressionsklone (MD3#40) signifikant verändert. Hier zeigte sich durch eine Abnahme der Permeabilität für Natriumionen und eine Zunahme der Permeabilität für Chloridionen eine Zunahme der Anionenselektivität. Einen signifikanten Einfluss auf den transepithelialen Widerstand und damit auf die Dichtigkeit des Zellverbandes hatte diese Veränderung nicht zur Folge. Ob die

gemessene Reduktion von P_{Na}/P_{Cl} ausschließlich durch die Überexpression von MarvelD3 bedingt wurde, konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Unklar ist, ob der Effekt der MarvelD3-Überexpression durch die gleichzeitig erhöhte endogene Claudin 2-Expression in den Überexpressionsklonen abgeschwächt worden sein könnte. Dafür spräche, dass der MarvelD3-Überexpressionsklon, bei dem die Überexpression von MarvelD3 den deutlichsten Effekt auf die Ionenselektivität zeigte, auch derjenige mit der niedrigsten Claudin 2-Expression war. Gegen diese Abwägung spricht jedoch, dass das überexprimierte Claudin 2 in allen Überexpressionsklonen aller Wahrscheinlichkeit nach nicht voll funktionsfähig war (siehe Abschnitt 5.6).

Die anderen beiden Überexpressionsklone (MD3#27 und MD3#43) wiesen im Vergleich zur Vektorkontrolle einen leicht erniedrigten TER, eine ähnliche Permeabilität für Natriumionen und eine erhöhte Permeabilität für Chloridionen auf. Auch bei ihnen zeigte sich im Vergleich zur Vektorkontrolle eine Reduktion des Verhältnisses von P_{Na} zu P_{Cl} . Der etwas deutlichere Effekt auf den TER und die größere Permeabilität für Chloridionen könnte bei diesen beiden Überexpressionsklonen darauf zurückzuführen sein, dass sie eine höhere MarvelD3-Expression als der Klon MD3#40 aufweisen. Die erhaltene Permeabilität für Natrium könnte trotz Funktionalitätseinbußen aufgrund der im Vergleich zum Klon MD3#40 höheren Claudin 2-Expression in den beiden Überexpressionsklonen zustande gekommen sein.

Zusammenfassend wurde die Anionenselektivität in MDCK II-Zellen durch MarvelD3 oder andere, nicht untersuchte Faktoren begünstigt, hatte jedoch vorerst keinen Einfluss auf den TER und damit die epitheliale Barriere. Zudem führte die Überexpression von MarvelD3 zu einer Zunahme der endogenen Claudin 2-Expression (siehe Abschnitt 5.6).

Steed et al. maßen erhöhte TER-Werte in Caco-2-Zellen mit MarvelD3-Depletion. Daraus schlossen sie, dass MarvelD3 eine Determinante der parazellulären Permeabilität für Ionen darstellen muss. (Steed *et al.*, 2009) Raleigh et al. stellten infolge einer Suppression der MarvelD3-Expression in Caco-2-Zellen eine verzögerte Entwicklung des TER im Vergleich zu Kontrollzellen fest. Vor der Entwicklung des TER in unveränderten Caco-2-Monolayern maßen sie zudem eine erhöhte Transkriptionsrate von MarvelD3 1. (Raleigh *et al.*, 2010)

Die Unterschiede in den Ergebnissen, zu denen die beiden Arbeitsgruppen infolge der MarvelD3-Depletion in Caco-2-Zellen kamen, können zahlreiche Gründe haben.

Allen voran kann eine Zelllinie in verschiedenen Laboren und sogar in unterschiedlichen Zellpassagen unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Die Claudin 2-Expression ist in beiden Arbeiten nicht explizit erwähnt worden und könnte somit auch dort einen Einfluss auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der MarvelD3-depletierten Zellen gehabt haben. Auch die Expression oder Lokalisation anderer nicht untersuchter TJ-Proteine könnte verändert gewesen sein und gleichzeitig einen großen Einfluss auf die funktionellen Eigenschaften der Zellen gehabt haben.

Dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weder die Ergebnisse von Steed et al. noch von Raleigh et al. bekräftigen, kann auch hier an der Verwendung unterschiedlicher Zelllinien, an unterschiedlichen Proteinexpressionsprofilen, an Unterschieden in der MarvelD3-Funktionalität und Unterschieden in der Lokalisation der TJ-Proteine liegen.

Insgesamt ist basierend auf allen Ergebnissen davon auszugehen, dass MarvelD3 ausschließlich regulative Eigenschaften aufweist und keinen direkten Einfluss auf die epitheliale Barriere nimmt.

5.6 Erhöhte Claudin 2-Expression in MarvelD3-Überexpressionsklonen der Zelllinie MDCK II

Bereits in früheren Publikationen zeigte sich, dass die Überexpression eines TJ-Proteins in einer Zelllinie die Expression anderer TJ-Proteine beeinflussen kann. So kam es beispielsweise bei der Überexpression von Claudin 8 in MDCK II-Zellen zu einer Reduktion der endogenen Claudin 2-Expression, auf welche sich schlussendlich die gemessenen elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen zurückführen ließen. (Milatz, 2010; Yu *et al.*, 2003; Angelow, Schneeberger und Yu, 2007) Neben der Transkription von Claudin 2 setzte die Überexpression von Claudin 8 auch den Transport bzw. Einbau des Claudin 2 in die TJ herab. (Angelow, Schneeberger und Yu, 2007) In unserem Labor zeigte sich in Claudin 3-überexprimierenden MDCK II-Zellen größtenteils eine reduzierte Claudin 2-Expression. Da dies jedoch nicht alle Überexpressionsklone betraf, wurde nicht von einem regulatorischen Einfluss des Claudin 3 auf die Claudin 2-Expression, sondern eher von einer Auswirkung des Transfektionsprozesses ausgegangen. (Milatz, 2010; Milatz *et al.*, 2010) Ebenfalls in unserem Labor kam es bei Tricellulin-überexprimierenden MDCK II-Klonen zu einer erhöhten Expression von Claudin 2, welche sich jedoch nicht in den elektrophysiologischen Eigenschaften der Überexpressionsklone widerspiegelte.

Immunfluoreszenzfärbungen zeigten hier, dass sich das überexprimierte Claudin 2 vor allem intrazellulär ansammelte und somit keinen direkten Einfluss auf die Eigenschaften der TJ nehmen konnte (Abb. 35). (Krug *et al.*, 2009)

Diese Effekte scheinen auch bei der Überexpression von MarvelD3 zum Tragen zu kommen. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei der Charakterisierung bei allen MarvelD3-Überexpressionsklonen der Zelllinie MDCK II eine deutlich erhöhte Expression von Claudin 2, während dies bei den Vektorkontrollen nicht der Fall war. Der Überexpressionsklon MD3#43 wies sowohl die höchste MarvelD3- als auch die höchste Claudin 2-Expression unter den Zellklonen auf.

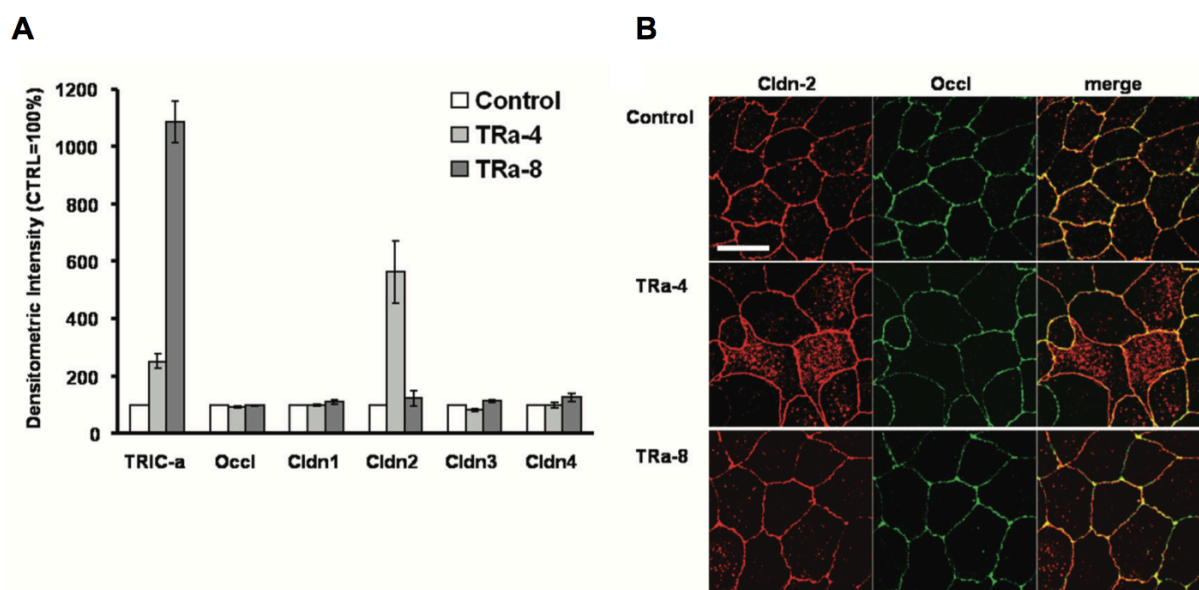


Abb. 35: Überexpression von Claudin 2 in Tricellulin-Überexpressionsklonen der Zelllinie MDCK II. (Krug *et al.*, 2009, Figure 2)

A Densitometrische Auswertung von Western Blots zweier Tricellulin-Überexpressionsklone (TRa-4 und TRa-8), sowie einer Vektorkontrolle (Control). Es zeigt sich eine Überexpression von Claudin 2 vor allem im Klon TRa-4. **B** Immunfluoreszenzbilder der Vektorkontrolle und Tricellulin-Überexpressionsklone. In der Immunfluoreszenz zeigt sich im Klon TRa-4, der eine Überexpression von Claudin 2 aufweist, eine deutliche intrazelluläre Ansammlung des Claudin 2.

Umgekehrt exprimierte der Überexpressionsklon MD3#40 vergleichsweise sowohl am wenigsten MarvelD3 als auch am wenigsten Claudin 2. Es kann also vermutet werden, dass die Überexpression von MarvelD3 mit der endogenen Claudin 2-Expression korreliert.

Claudin 2 dient in der TJ als Kanal für mono- und divalente Kationen, sowie Wasser. (Amasheh *et al.*, 2002; Rosenthal *et al.*, 2010; Rosenthal *et al.*, 2017) Die erhöhte Claudin 2-Expression könnte als Gegenregulation in Folge der durch MarvelD3 oder

andere Faktoren bedingten Zunahme der Anionenselektivität gewertet werden. Die Expressionserhöhung des Claudin 2 erfolgte jedoch nicht in dem Maße, dass sie die ursprüngliche Selektivität wiederherstellen konnte. Da sich in der Messung der Dilutionspotentiale in den MarvelD3-Überexpressionsklonen keine Verschiebung der Permeabilitäten zur Kationenselektivität hin zeigte, ist auch davon auszugehen, dass das überexprimierte Claudin 2 nicht voll funktionsfähig oder nicht in der TJ lokalisiert war.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Eigenschaften von Überexpressionsklonen als Auswirkungen sowohl der endogenen als auch der exogenen Proteinexpression verstanden werden müssen. Daher sollte bei der Überexpression einzelner TJ-Proteine immer auch die Expression der anderen TJ-Proteine berücksichtigt werden. (Angelow, Schneeberger und Yu, 2007, Milatz, 2010)

5.7 Eignung der MarvelD3-Überexpression in den Zelllinien MDCK I und II zur Untersuchung der Funktion von MarvelD3

MDCK-Zellen eignen sich u.a. aufgrund ihrer Polarität, ihrer gut ausgeprägten Zellkontakte und ihrer hohen Wachstumsrate gut für die Untersuchung der Eigenschaften von Epithelzellen. Während Monolayer aus MDCK I-Zellen sehr dichte Epithelien repräsentieren können, stellen Monolayer aus MDCK II-Zellen Modelle für eher durchlässige Epithelien dar. (Dukes, Whitley und Chalmers, 2011) Aufgrund der Unterschiede in ihren Eigenschaften können die beiden Zelllinien erheblich unterschiedlich auf die veränderte Expression von TJ-Proteinen reagieren. Hierbei bestimmt die Dichtigkeit der Epithelzellmonolayer wie deutlich der Effekt einer veränderten Proteinexpression auf den TER messbar wird. Wird beispielsweise vermutet, dass ein TJ-Protein eine abdichtende Funktion einnimmt, würde dies durch eine Überexpression in einem lecken Epithel deutlicher zur Geltung kommen als in einem ohnehin bereits dichten Epithel. Hier würde sich der Unterschied im TER, welchen die Überexpression eines abdichtenden Proteins ausmacht, weniger stark gegen den grundlegend höheren TER-Wert abheben. Umgekehrt konnte die Zunahme der Leckheit des Epithels durch Claudin 2 sehr gut an den dichten MDCK I-Zellen gezeigt werden. (Furuse *et al.*, 2001)

Auf den TER hat hierbei unter anderem die parazelluläre Permeabilität für Ionen einen Einfluss, welche durch die Messungen von Dilutionspotentialen untersucht werden kann. Hierfür ist die Proteinzusammensetzung der TJs maßgeblich. Auch der

Einfluss auf die Ionenselektivität eines Epithels lässt sich in verschiedenen Zellmodellen unterschiedlich gut abbilden. (Angelow, Schneeberger und Yu, 2007) So führte eine Expression von Claudin 2 und Claudin 15 in LLC-PK₁-Zellen, welche für gewöhnlich anionenselektive Eigenschaften aufweisen, zu einer Verschiebung zur Kationenselektivität hin. In MDCK II-Zellen hingegen, welche vergleichsweise kationenselektive Eigenschaften aufweisen, zeigte sich die Ionenselektivität unverändert. Die Überexpression von Claudin 4 und 11 hatte in MDCK II-Zellen eine Verschiebung zur Anionenselektivität hin zur Folge, welche in LLC-PK₁-Zellen ausblieb. Diese Beobachtungen führen zu der Annahme, dass eine Zunahme der Kationen- oder Anionenselektivität vor allem in solchen Zellen gut nachweisbar ist, die vorher die entgegengesetzte Ionenselektivität besaßen. (Angelow, Schneeberger und Yu, 2007; Van Itallie, Fanning und Anderson, 2003)

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine große Claudin 2-Variabilität unter den MarvelD3-Überexpressionsklonen der Zelllinie MDCK II. Dieser Effekt kann in MDCK I-Zellen umgangen werden, da diese keine endogene Claudin 2-Expression aufweisen. (Furuse *et al.*, 2001) Zudem konnte in MDCK II-Zellen vorerst kein signifikanter Einfluss einer MarvelD3-Überexpression auf die epitheliale Barriere nachgewiesen werden. Wenn MarvelD3 die Eigenschaften von TJs eher in Richtung einer verstärkten Permeabilität und Kationenselektivität verschieben würde, wäre dies mit Hinblick auf die oben genannten Überlegungen auch ein Grund dafür, dies in hochohmigen Zellen mit geringer Permeabilität für Kationen nachzuweisen. Daher wäre es wichtig, die Untersuchung um Messungen an MarvelD3-Überexpressionsklonen einer hochohmigen Zelllinie zu ergänzen. Leider konnten in dieser Arbeit nur vereinzelte Messungen an MDCK I-Zellen ausgewertet werden, da der Großteil der Messungen keine typischen Dilutionspotentiale ergab. Dies lag aller Wahrscheinlichkeit nach an Problemen mit den Messelektroden der Ussing-Kammer bei höheren transepithelialen Widerständen. Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass die MarvelD3-Überexpressionsklone der Zelllinie MDCK I sich untypisch verhielten und dies der Grund dafür war, dass keine auswertbaren Dilutionspotentiale zustande kamen. Dies könnte beispielsweise durch die Aktivierung von Transportern und anderen Membranproteinen ausgelöst worden sein, welche für gewöhnlich nicht im selben Ausmaß von der Zelllinie exprimiert werden. Allerdings lässt sich diesbezüglich auf Grundlage der vorliegenden Arbeit und vorheriger Publikationen keine belastbare Aussage treffen.

5.8 Auswirkung der MarvelD3-Überexpression auf die Widerstands- und Dilutionspotentialmessungen in MDCK I-Zellen

Obwohl die n-Zahl zu gering war, um eine Aussage über die Funktion von MarvelD3 in hochohmigen Zellen treffen zu können, ließen sich gewisse erste Tendenzen beobachten. In beiden MarvelD3-Überexpressionsklonen der Zelllinie MDCK I (MD3#4 und MD3#8) zeigte sich vor allem im Vergleich zur Vektorkontrolle Vec3 eine erhöhte Expression der Claudine 3 und 4, aber auch eine erniedrigte Claudin 1-Expression. Es könnte gemutmaßt werden, dass eine höhere MarvelD3-Expression in MDCK I-Zellen mit einer niedrigeren Claudin 1-Expression einherging. So zeigte MarvelD3#4 die höchste MarvelD3- und die niedrigste Claudin 1-Expression, während Vec2 die niedrigste MarvelD3- und die höchste Claudin 1-Expression aufwies. Ob die MarvelD3-Expression in Folge der niedrigen Claudin 1-Expression kompensatorisch erhöht war oder die Claudin 1-Expression infolge der MarvelD3-Expression herunterreguliert wurde, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Eine erniedrigte Claudin 1- und eine erhöhte MarvelD3-Expression zeigte sich jedoch auch in der Vektorkontrolle Vec3 gegenüber Vec2.

Tendenziell zeichnete sich in den elektrophysiologischen Versuchen ab, dass der MarvelD3-Überexpressionsklon MD3#8 den höchsten transepithelialen Widerstand und die geringste Permeabilität für Natrium- und Chloridionen aufwies. Der Unterschied zum MarvelD3-Überexpressionsklon MD3#4 könnte u.a. auf dessen stark erniedrigter Claudin 1-Expression beruhen. Ob MarvelD3, Claudin 3 oder 4 beim Klon MD3#4 eine kompensatorisch abdichtende Rolle einnehmen konnten und der Klon daher noch einen höheren TER und niedrigere Permeabilitäten aufweist als die Vektorkontrolle Vec3, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Das Verhältnis der Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- zueinander ließ bei keinem der Klone eine Verschiebung zur Kationen- oder Anionenselektivität vermuten. Insgesamt scheint die Überexpression von MarvelD3 auch hier eher einen indirekten, also durch die Expressionsänderung anderer TJ-Proteine vermittelten, Effekt auf die Barriere zu haben. Solche Änderungen könnten auch einen Hinweis darauf geben, dass MarvelD3 die Differenzierung der Zellen beeinflussen konnte und somit die in der Literatur beschriebenen regulativen Eigenschaften stützen (Steed *et al.* 2014)

5.9 Limitationen

Im Folgenden sollen zusätzlich zu den bereits diskutierten Limitationen weitere Limitationen der vorliegenden Arbeit in Kürze dargestellt werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellmonolayer der Zelllinien HT-29/B6, sowie MDCK I und II stellen zwar geeignete Modelle für Epithelzellgewebe dar, können das intestinale Epithel *in vivo* jedoch nicht in allen Eigenschaften vollständig abbilden.

Die Zellmonolayer wurden zudem nur auf die Expression einer Auswahl an TJ-Proteinen hin untersucht. Selbstverständlich können auch andere, nicht untersuchte TJ-Proteine einen Einfluss auf die beobachteten elektrophysiologischen Eigenschaften genommen haben.

Die vorhandenen Antikörper für MarvelD3 und Occludin, welche anders als die Claudin-Antikörper im Western Blot zahlreiche Banden anfärben und teils keine gute Abgrenzung der verschiedenen Banden voneinander zulassen, stellen eine weitere Limitation dieser Arbeit dar. Überdurchschnittlich viele Western Blot-Versuche verliefen nicht erfolgreich und konnten somit nicht ausgewertet werden.

Aus technischen Gründen wurden in der vorliegenden Arbeit Gesamtproteinextraktionen durchgeführt, welche neben Membranproteinen auch intrazelluläre Proteine aus den Zellen extrahieren. Durch eine zusätzliche Membranproteinextraktion können genauere Aussagen bezüglich der Zusammensetzung der TJ getroffen werden.

Bei den Western Blots wurden die densitometrischen Werte in einigen Experimenten aus technischen Gründen auf die β -Aktin-Werte parallel und mit identischen Proben durchgeführter Western Blots bezogen. Dies ermöglicht es, Proteinkonzentrationschwankungen zwischen den Proben zu erkennen und mit in die Auswertung einzubeziehen, schließt jedoch Fehler beim Beladen der Probentaschen bei der Gelelektrophorese nicht gänzlich aus.

In Zellmonolayern wurde in einigen Arbeiten eine längere Inkubationsdauer benötigt, um durch die Zugabe von Zytokinen signifikante Effekte auf den TER und die Expression von TJ-Proteinen zu erzielen. Dies ließe sich beispielsweise dadurch begründen, dass Veränderungen der Proteinexpression mit einer gewissen Latenz auftreten können. Es ist also nicht auszuschließen, dass die in dieser Arbeit gewählte Inkubationsdauer für einige der Zytokine in diesem Zellmodell zu kurz war, um signifikante Proteinexpressionsunterschiede zu induzieren.

Um auszuschließen, dass die gemessenen Effekte der Zytokine auf den TER der HT-29/B6-Zellen an einer Zunahme der Nekrose- oder Apoptoserate lagen, sollten die vorliegenden Versuche in Zukunft um entsprechende Untersuchungen der Zellviabilität erweitert werden. Zudem sollte ergänzend die Auswirkung weiterer CED-relevanter Zytokine, wie der Schlüsselzytokine der TH17-Immunantwort, auf die MarvelD3-Expression untersucht werden.

In den MDCK II-Überexpressionsklonen stehen Immunfluoreszenz-Färbungen mit einem Antikörper gegen Claudin 2 aus, um die vermutete intrazelluläre Lokalisation des überexprimierten Claudin 2 bestätigen zu können. Auch von den MDCK I-Überexpressionsklonen müssen für weitere funktionelle Untersuchungen die fehlenden Immunfluoreszenz-Färbungen angefertigt werden.

Da der TER nur ein relativ grobes Maß für den parazellulären Ionentransport darstellt und auch von Änderungen des transzellulären Transportverhaltens und subzellulärer Widerstände abhängt (Günzel *et al.* 2010), sollten die Untersuchungen zudem um weitere elektrophysiologische Messungen wie die Impedanzspektroskopie und Fluxmessungen erweitert werden, um ein noch detaillierteres Bild von der Funktion von MarvelD3 zu erhalten.

5.10 Schlussfolgerung

Ob MarvelD3 eine Rolle in der Pathophysiologie der CED einnimmt, ist nicht abschließend geklärt. Die Inkubation der Epithelzelllinie HT-29/B6 mit IL-4 führte in 48 Stunden zu einer signifikanten Erhöhung der Expression der MarvelD3 Isoform 2. Auch nach der Inkubation der Zellmonolayer mit IL-13 zeichnete sich eine im Vergleich zu den Kontrollzellen eine erhöhte MarvelD3-Expression ab. Dies ist unter der Annahme, dass es sich bei der Colitis ulcerosa um eine TH2-vermittelte Erkrankung handelt, vereinbar mit der Beobachtung, dass MarvelD3 vor allem in der Darmmukosa von Patient*innen mit Colitis ulcerosa erhöht gemessen werden konnte. (Krug 2010, unveröffentlicht) Weiterführende Studien werden klären müssen, ob eine veränderte Expression von MarvelD3 demnach ein Bestandteil der Immunantwort bei Patient*innen mit Colitis ulcerosa ist und eine Interventionsmöglichkeit im Inflammationsablauf der CED aufzeigt.

In MDCK II-Zellen führte die Überexpression von MarvelD3 zu einer Zunahme der Anionenselektivität und einer erhöhten endogenen Claudin 2-Expression. Ein Einfluss auf den TER zeigte sich jedoch nicht. Auch in ersten Versuchen an MDCK I-

Zellen zeigte sich keine deutliche Tendenz für eine direkte Barrierefunktion von MarvelD3. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass dem Tight Junction-Protein MarvelD3 am ehesten eine regulative Funktion innerhalb der Barriereentwicklung von Epithelzellen zukommt. Die Rolle von MarvelD3 ist zudem insgesamt im Kontext der gesamten TAMP-Proteinfamilie zu sehen, deren Mitglieder teils unterschiedliche, teils überlappende Funktionen ausüben. (Raleigh et al. 2010)

Literaturverzeichnis

- Adams, R. B., Planchon, S. M. and Roche, J. K. (1993)** 'IFN-gamma modulation of epithelial barrier function. Time course, reversibility, and site of cytokine binding', *J Immunol*, 150(6), pp. 2356-63.
- Ahluwalia, B., Moraes, L., Magnusson, M. K. and Öhman, L. (2018)** 'Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies', *Scand J Gastroenterol*, 53(4), pp. 379-389.
- Al-Sadi, R., Ye, D., Dokladny, K. and Ma, T. Y. (2008)** 'Mechanism of IL-1beta-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability', *J Immunol*, 180(8), pp. 5653-61.
- Amasheh, M., Grotjohann, I., Amasheh, S., Fromm, A., Söderholm, J. D., Zeitz, M., Fromm, M. and Schulzke, J. D. (2009a)** '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*, 44(10), pp. 1226-35.
- Amasheh, S., Dullat, S., Fromm, M., Schulzke, J. D., Buhr, H. J. and Kroesen, A. J. (2009b)** 'Inflamed pouch mucosa possesses altered tight junctions indicating recurrence of inflammatory bowel disease', *Int J Colorectal Dis*, 24(10), pp. 1149-56.
- Amasheh, S., Fromm, M. and Günzel, D. (2011)** 'Claudins of intestine and nephron - a correlation of molecular tight junction structure and barrier function', *Acta Physiol (Oxf)*, 201(1), pp. 133-40.
- Amasheh, S., Meiri, N., Gitter, A. H., Schöneberg, T., Mankertz, J., Schulzke, J. D. and Fromm, M. (2002)** 'Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells', *J Cell Sci*, 115(Pt 24), pp. 4969-76.
- Ananthakrishnan, A. N. (2015)** 'Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: a review', *Dig Dis Sci*, 60(2), pp. 290-8.
- Anderson, J. M. and Van Itallie, C. M. (2009)** 'Physiology and function of the tight junction', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(2), Article a002584.
- Andus, T., Daig, R., Vogl, D., Aschenbrenner, E., Lock, G., Hollerbach, S., Köllinger, M., Schölmerich, J. and Gross, V. (1997)** 'Imbalance of the interleukin 1 system in colonic mucosa-association with intestinal inflammation and interleukin 1 receptor antagonist [corrected] genotype 2', *Gut*, 41(5), pp. 651-7.
- Angelow, S., Schneeberger, E. E. and Yu, A. S. (2007)** 'Claudin-8 expression in renal epithelial cells augments the paracellular barrier by replacing endogenous claudin-2', *J Membr Biol*, 215(2-3), pp. 147-59.
- Ashwood, P., Harvey, R., Verjee, T., Wolstencroft, R., Thompson, R. P. H. and Powell, J. J. (2004)** 'Functional interactions between mucosal IL-1, IL-1ra and TGF-beta 1 in ulcerative colitis', *Inflamm Res*, 53(2), pp. 53-9.

- Babyatsky, M. W., Rossiter, G. and Podolsky, D. K. (1996)** 'Expression of transforming growth factors alpha and beta in colonic mucosa in inflammatory bowel disease', *Gastroenterology*, 110(4), pp. 975-84.
- Balda, M. S. and Matter, K. (2009)** 'Tight junctions and the regulation of gene expression', *Biochim Biophys Acta*, 1788(4), pp. 761-7.
- Barker, G. and Simmons, N. L. (1981)** 'Identification of two strains of cultured canine renal epithelial cells (MDCK cells) which display entirely different physiological properties', *Q J Exp Physiol*, 66(1), pp. 61-72.
- Baumgart, D. C. and Carding, S. R. (2007)** 'Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology', *Lancet*, 369(9573), pp. 1627-40.
- Bojarski, C., Gitter, A. H., Bendfeldt, K., Mankertz, J., Schmitz, H., Wagner, S., Fromm, M. and Schulzke, J. D. (2001)** 'Permeability of human HT-29/B6 colonic epithelium as a function of apoptosis', *J Physiol*, 535(Pt 2), pp. 541-52.
- Brewer, M., Luegering, A., Kucharzik, T., Parkos, C. A., Madara, J. L., Hopkins, A. M. and Nusrat, A. (2003)** 'Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms', *J Immunol*, 171(11), pp. 6164-72.
- Brewer, M., Utech, M., Ivanov, A. I., Hopkins, A. M., Parkos, C. A. and Nusrat, A. (2005)** 'Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process', *FASEB J*, 19(8), pp. 923-33.
- Brüning, A. and Homann, N. (2012)** 'Magen-Darm-Trakt', in Renz-Polster, H. and Krautzig, S. (eds.) *Basislehrbuch Innere Medizin*. 5 edn. München: Elsevier GmbH, pp. 463-573.
- Ceponis, P. J., Botelho, F., Richards, C. D. and McKay, D. M. (2000)** 'Interleukins 4 and 13 increase intestinal epithelial permeability by a phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Lack of evidence for STAT 6 involvement', *J Biol Chem*, 275(37), pp. 29132-7.
- Cereijido, M., Contreras, R. G., Shoshani, L., Flores-Benitez, D. and Larre, I. (2008)** 'Tight junction and polarity interaction in the transporting epithelial phenotype', *Biochim Biophys Acta*, 1778(3), pp. 770-93.
- Chen, T. R., Drabkowski, D., Hay, R. J., Macy, M. and Peterson, W. (1987)** 'WiDr is a derivative of another colon adenocarcinoma cell line, HT-29', *Cancer Genet Cytogenet*, 27(1), pp. 125-34.
- Chichlowski, M. and Hale, L. P. (2008)** 'Bacterial-mucosal interactions in inflammatory bowel disease: an alliance gone bad', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 295(6), pp. G1139-49.
- Clarke, L. L. (2009)** 'A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296(6), pp. G1151-66.
- Clayburgh, D. R., Shen, L. and Turner, J. R. (2004)** 'A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease', *Lab Invest*, 84(3), pp. 282-91.

Colgan, S. P., Resnick, M. B., Parkos, C. A., Delp-Archer, C., McGuirk, D., Bacarra, A. E., Weller, P. F. and Madara, J. L. (1994) 'IL-4 directly modulates function of a model human intestinal epithelium', *J Immunol*, 153(5), pp. 2122-9.

Cording, J., Berg, J., Käding, N., Bellmann, C., Tscheik, C., Westphal, J. K., Milatz, S., Günzel, D., Wolburg, H., Piontek, J., Huber, O. and Blasig, I. E. (2013) 'In tight junctions, claudins regulate the interactions between occludin, tricellulin and marvelD3, which, inversely, modulate claudin oligomerization', *J Cell Sci*, 126(Pt 2), pp. 554-64.

Dionne, S., D'Agata, I. D., Hiscott, J., Vanounou, T. and Seidman, E. G. (1998) 'Colonic explant production of IL-1 and its receptor antagonist is imbalanced in inflammatory bowel disease (IBD)', *Clin Exp Immunol*, 112(3), pp. 435-42.

Dubois, C. M., Ruscetti, F. W., Palaszynski, E. W., Falk, L. A., Oppenheim, J. J. and Keller, J. R. (1990) 'Transforming growth factor beta is a potent inhibitor of interleukin 1 (IL-1) receptor expression: proposed mechanism of inhibition of IL-1 action', *J Exp Med*, 172(3), pp. 737-44.

Dukes, J. D., Whitley, P. and Chalmers, A. D. (2011) 'The MDCK variety pack: choosing the right strain', *BMC Cell Biol*, 12, 43.

Eder, P., Linke, K. and Witowski, J. (2016) 'Update on the mechanisms of action of anti-TNF- α antibodies and their clinical implications in inflammatory bowel disease', *Pol Arch Med Wewn*, 126(10), pp. 772-780.

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

Fromm, M. (2010) 'Transport in Membranen und Epithelien', in Schmidt, R.F., Lang, F., Heckmann, M. (eds.) *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 31 edn. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, pp. 36-48.

Furuse, M. (2010) 'Molecular basis of the core structure of tight junctions', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(1), Article a002907.

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

Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A. and Tsukita, S. (2002) 'Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice', *J Cell Biol*, 156(6), pp. 1099-111.

Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S. and Tsukita, S. (1993) 'Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions', *J Cell Biol*, 123(6 Pt 2), pp. 1777-88.

Fuss, I. J., Heller, F., Boirivant, M., Leon, F., Yoshida, M., Fichtner-Feigl, S., Yang, Z., Exley, M., Kitani, A., Blumberg, R. S., Mannon, P. and Strober, W. (2004) 'Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis', *J Clin Invest*, 113(10), pp. 1490-7.

Fuss, I. J., Neurath, M., Boirivant, M., Klein, J. S., de la Motte, C., Strong, S. A., Fiocchi, C. and Strober, W. (1996) 'Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5', *J Immunol*, 157(3), pp. 1261-70.

Garfin, D. E. (2009) 'One-Dimensional Gel Electrophoresis', in Burgess, R.R. and Deutscher, M.P. (eds.) *Methods in Enzymology: Vol. 463 Guide to Protein Purification*. 2 edn. Elsevier Inc., pp. 497-513.

Gekle, M. (2010) 'Ernährung, Energiehaushalt und Verdauung', in Gekle, M., Wischmeyer, E., Gründer, S., Petersen, M., Schwab, A., Markwardt, F., Klöcker, N., Baumann, R. and Marti, H. (eds.) *Taschenlehrbuch Physiologie*. 1 edn. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, pp. 408-484.

Geremia, A., Biancheri, P., Allan, P., Corazza, G. R. and Di Sabatino, A. (2014) 'Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease', *Autoimmun Rev*, 13(1), pp. 3-10.

Gitter, A. H., Bendfeldt, K., Schulzke, J. D. and Fromm, M. (2000) 'Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis', *FASEB J*, 14(12), pp. 1749-53.

González-Mariscal, L., Domínguez-Calderón, A., Raya-Sandino, A., Ortega-Olvera, J. M., Vargas-Sierra, O. and Martínez-Revollar, G. (2014) 'Tight junctions and the regulation of gene expression', *Semin Cell Dev Biol*, 36, pp. 213-23.

González-Mariscal, L., Lechuga, S. and Garay, E. (2007) 'Role of tight junctions in cell proliferation and cancer', *Prog Histochem Cytochem*, 42(1), pp. 1-57.

González-Mariscal, L., Quiros, M., Diaz-Coranguez, M. and Bautista, P. (2012) 'Tight Junctions', in Najman, S. (ed.) *Current Frontiers and Perspectives in Cell Biology*: IntechOpen, pp. 1-30. <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

González-Mariscal, L., Tapia, R. and Chamorro, D. (2008) 'Crosstalk of tight junction components with signaling pathways', *Biochim Biophys Acta*, 1778(3), pp. 729-56.

Günzel, D. and Fromm, M. (2012) 'Claudins and other tight junction proteins', *Compr Physiol*, 2(3), pp. 1819-52.

Günzel, D., Krug, S. M., Rosenthal, R. and Fromm, M. (2010) 'Biophysical Methods to Study Tight Junction Permeability', in Yu, A.S.L. (ed.) *Claudins: Vol. 65 of Current Topics in Membranes*. 1 edn: Academic Press, Elsevier Inc., pp. 40-78.

Günzel, D., Stuiver, M., Kausalya, P. J., Haisch, L., Krug, S. M., Rosenthal, R., Meij, I. C., Hunziker, W., Fromm, M. and Müller, D. (2009) 'Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function', *J Cell Sci*, 122(Pt 10), pp. 1507-17.

Günzel, D. and Yu, A. S. (2009) 'Function and regulation of claudins in the thick ascending limb of Henle', *Pflugers Arch*, 458(1), pp. 77-88.

Hecht, G., Pestic, L., Nikcevic, G., Koutsouris, A., Tripuraneni, J., Lorimer, D. D., Nowak, G., Guerriero, V., Elson, E. L. and Lanerolle, P. D. (1996) 'Expression of the catalytic domain of myosin light chain kinase increases paracellular permeability', *Am J Physiol*, 271(5 Pt 1), pp. C1678-84.

Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A. H., Bürgel, N., Fromm, M., Zeitz, M., Fuss, I., Strober, W. and Schulzke, J. D. (2005) 'Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution', *Gastroenterology*, 129(2), pp. 550-64.

Hering, N. A., Andres, S., Fromm, A., van Tol, E. A., Amasheh, M., Mankertz, J., Fromm, M. and Schulzke, J. D. (2011) 'Transforming growth factor- β , a whey protein component, strengthens the intestinal barrier by upregulating claudin-4 in HT-29/B6 cells', *J Nutr*, 141(5), pp. 783-9.

Higashi, T., Tokuda, S., Kitajiri, S., Masuda, S., Nakamura, H., Oda, Y. and Furuse, M. (2013) 'Analysis of the 'angulin' proteins LSR, ILDR1 and ILDR2--tricellulin recruitment, epithelial barrier function and implication in deafness pathogenesis', *J Cell Sci*, 126(Pt 4), pp. 966-77.

Hou, J. (2020) 'Biophysical approaches for tight junction', in Hou, J. (ed.) *A Laboratory Guide to the Tight Junction*. 1 ed: Academic Press, Elsevier Inc. All.

Hou, J., Gomes, A. S., Paul, D. L. and Goodenough, D. A. (2006) 'Study of claudin function by RNA interference', *J Biol Chem*, 281(47), pp. 36117-23.

Howe, K. L., Reardon, C., Wang, A., Nazli, A. and McKay, D. M. (2005) 'Transforming growth factor-beta regulation of epithelial tight junction proteins enhances barrier function and blocks enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7-induced increased permeability', *Am J Pathol*, 167(6), pp. 1587-97.

Ihara, S., Hirata, Y. and Koike, K. (2017) 'TGF- β in inflammatory bowel disease: a key regulator of immune cells, epithelium, and the intestinal microbiota', *J Gastroenterol*, 52(7), pp. 777-787.

Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H. and Tsukita, S. (2005) 'Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells', *J Cell Biol*, 171(6), pp. 939-45.

Ikenouchi, J., Sasaki, H., Tsukita, S., Furuse, M. and Tsukita, S. (2008) 'Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin', *Mol Biol Cell*, 19(11), pp. 4687-93.

Inoue, S., Matsumoto, T., Iida, M., Mizuno, M., Kuroki, F., Hoshika, K. and Shimizu, M. (1999) 'Characterization of cytokine expression in the rectal mucosa of ulcerative colitis: correlation with disease activity', *Am J Gastroenterol*, 94(9), pp. 2441-6.

Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M. and Tsukita, S. (1999) 'Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins', *J Cell Biol*, 147(6), pp. 1351-63.

- John, L. J., Fromm, M. and Schulzke, J. D. (2011)** 'Epithelial barriers in intestinal inflammation', *Antioxid Redox Signal*, 15(5), pp. 1255-70.
- Kaplan, G. G. and Ng, S. C. (2017)** 'Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease', *Gastroenterology*, 152(2), pp. 313-321.e2.
- Karres, I., Kremer, J. P., Steckholzer, U., Kenney, J. S. and Ertel, W. (1996)** 'Transforming growth factor-beta 1 inhibits synthesis of cytokines in endotoxin-stimulated human whole blood', *Arch Surg*, 131(12), pp. 1310-7.
- Kitajiri, S. and Katsuno, T. (2016)** 'Tricellular Tight Junctions in the Inner Ear', *Biomed Res Int*, 2016, pp. 6137541.
- Kojima, T., Takasawa, A., Kyuno, D., Ito, T., Yamaguchi, H., Hirata, K., Tsujiwaki, M., Murata, M., Tanaka, S. and Sawada, N. (2011)** 'Downregulation of tight junction-associated MARVEL protein marvelD3 during epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells', *Exp Cell Res*, 317(16), pp. 2288-98.
- Kominsky, S. L. (2006)** 'Claudins: emerging targets for cancer therapy', *Expert Rev Mol Med*, 8(18), pp. 1-11.
- Kreusel, K. M., Fromm, M., Schulzke, J. D. and Hegel, U. (1991)** 'Cl⁻ secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6)', *Am J Physiol*, 261(4 Pt 1), pp. C574-82.
- Krug, S. M., Amasheh, S., Richter, J. F., Milatz, S., Günzel, D., Westphal, J. K., Huber, O., Schulzke, J. D. and Fromm, M. (2009)** 'Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability', *Mol Biol Cell*, 20(16), pp. 3713-24.
- Krug, S. M., Bojarski, C., Fromm, A., Lee, I. M., Dames, P., Richter, J. F., Turner, J. R., Fromm, M. and Schulzke, J. D. (2018)** 'Tricellulin is regulated via interleukin-13-receptor $\alpha 2$, affects macromolecule uptake, and is decreased in ulcerative colitis', *Mucosal Immunol*, 11(2), pp. 345-356.
- Krug, S. M., Günzel, D., Conrad, M. P., Rosenthal, R., Fromm, A., Amasheh, S., Schulzke, J. D. and Fromm, M. (2012)** 'Claudin-17 forms tight junction channels with distinct anion selectivity', *Cell Mol Life Sci*, 69(16), pp. 2765-78.
- Laemmli, U. K. (1970)** 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227(5259), pp. 680-5.
- Laffafian, I. and Hallett, M. B. (2007)** 'Lipid-protein cargo transfer: a mode of direct cell-to-cell communication for lipids and their associated proteins', *J Cell Physiol*, 210(2), pp. 336-42.
- Lameris, A. L., Huybers, S., Kaukinen, K., Mäkelä, T. H., Bindels, R. J., Hoenderop, J. G. and Nevalainen, P. I. (2013)** 'Expression profiling of claudins in the human gastrointestinal tract in health and during inflammatory bowel disease', *Scand J Gastroenterol*, 48(1), pp. 58-69.

Lichtman, M. K., Otero-Vinas, M. and Falanga, V. (2016) 'Transforming growth factor beta (TGF- β) isoforms in wound healing and fibrosis', *Wound Repair Regen*, 24(2), pp. 215-22.

Lopetuso, L. R., Chowdhry, S. and Pizarro, T. T. (2013) 'Opposing Functions of Classic and Novel IL-1 Family Members in Gut Health and Disease', *Front Immunol*, 4, Article 181.

Lugli, S. M., Feng, N., Heim, M. H., Adam, M., Schnyder, B., Etter, H., Yamage, M., Eugster, H. P., Lutz, R. A., Zurawski, G. and Moser, R. (1997) 'Tumor necrosis factor alpha enhances the expression of the interleukin (IL)-4 receptor alpha-chain on endothelial cells increasing IL-4 or IL-13-induced Stat6 activation', *J Biol Chem*, 272(9), pp. 5487-94.

Lüllmann-Rauch, R. (2009) *Taschenlehrbuch Histologie*. 3 edn. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, pp. 31-40, 95-96, 100-101, 379-389.

Lüttig, J. (2016) *Protektiver Effekt von 6-Shogaol, Elligsäure und Myrrhe auf die intestinale epithelial Barriere*. Dissertation, Universität Potsdam.

Ma, T. Y., Iwamoto, G. K., Hoa, N. T., Akotia, V., Pedram, A., Boivin, M. A. and Said, H. M. (2004) 'TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 286(3), pp. G367-76.

Madara, J. L. and Stafford, J. (1989) 'Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers', *J Clin Invest*, 83(2), pp. 724-7.

Mahmood, T. and Yang, P. C. (2012) 'Western blot: technique, theory, and trouble shooting', *N Am J Med Sci*, 4(9), pp. 429-34.

Mankertz, J., Amasheh, M., Krug, S. M., Fromm, A., Amasheh, S., Hillenbrand, B., Tavalali, S., Fromm, M. and Schulzke, J. D. (2009) 'TNFalpha up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling', *Cell Tissue Res*, 336(1), pp. 67-77.

Mankertz, J., Tavalali, S., Schmitz, H., Mankertz, A., Riecken, E. O., Fromm, M. and Schulzke, J. D. (2000) 'Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma', *J Cell Sci*, 113 (Pt 11), pp. 2085-90.

Markov, A. G., Veshnyakova, A., Fromm, M., Amasheh, M. and Amasheh, S. (2010) 'Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine', *J Comp Physiol B*, 180(4), pp. 591-8.

Michielan, A. and D'Incà, R. (2015) 'Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut', *Mediators Inflamm*, 2015, Article 628157.

Milatz, S. (2010) *Funktionelle Charakterisierung des Tight Junction-Proteins Claudin-3 in Epithel- und Endothelzellen*. Dissertation, Humboldt-Universität Berlin.

Milatz, S., Krug, S. M., Rosenthal, R., Günzel, D., Müller, D., Schulzke, J. D., Amasheh, S. and Fromm, M. (2010) 'Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes', *Biochim Biophys Acta*, 1798(11), pp. 2048-57.

Mineta, K., Yamamoto, Y., Yamazaki, Y., Tanaka, H., Tada, Y., Saito, K., Tamura, A., Igarashi, M., Endo, T., Takeuchi, K. and Tsukita, S. (2011) 'Predicted expansion of the claudin multigene family', *FEBS Lett*, 585(4), pp. 606-12.

Moldoveanu, A. C., Diculescu, M. and Braticevici, C. F. (2015) 'Cytokines in inflammatory bowel disease', *Rom J Intern Med*, 53(2), pp. 118-27.

Molodecky, N. A., Soon, I. S., Rabi, D. M., Ghali, W. A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H. W. and Kaplan, G. G. (2012) 'Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review', *Gastroenterology*, 142(1), pp. 46-54.e42.

Mueller, C. (2012) 'Danger-associated molecular patterns and inflammatory bowel disease: is there a connection?', *Dig Dis*, 30 Suppl 3, pp. 40-6.

Mülhardt, C. (2013) *Der Experimentator - Molekularbiologie/Genomics*. 7 edn. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 184-189.

Müller, H.-J. and Prange, D. R. (2016) 'Einleitung', in Müller, H.-J. and Prange, D.R. (eds.) *PCR-Polymerase-Kettenreaktion*. 2 edn. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 1-8, 23-24.

Neurath, M. F. (2014) 'Cytokines in inflammatory bowel disease', *Nat Rev Immunol*, 14(5), pp. 329-42.

New England Biolabs (2021) *Phusion High Fidelity DNA Polymerase*. Available at: <https://www.neb-online.de/pcr-dna-amplifikation/high-fidelity-pcr/phusion-high-fidelity-dna-polymerase/> Accessed: March, 26, 2021.

O'Driscoll, M. C., Daly, S. B., Urquhart, J. E., Black, G. C. M., Pilz, D. T., Brockmann, K., McEntagart, M., Abdel-Salam, G., Zaki, M., Wolf, N. I., Ladda, R. L., Sell, S., D'Arrigo, S., Squier, W., Dobyns, W. B., Livingston, J. H. and Crow, Y. J. (2010) 'Recessive mutations in the gene encoding the tight junction protein occludin cause band-like calcification with simplified gyration and polymicrogyria', *Am J Hum Genet*, 87(3), pp. 354-64.

Petnicki-Ocwieja, T., Hrcir, T., Liu, Y. J., Biswas, A., Hudcovic, T., Tlaskalova-Hogenova, H. and Kobayashi, K. S. (2009) 'Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(37), pp. 15813-8.

Planchon, S. M., Martins, C. A. P., Guerrant, R. L. and Roche, J. K. (1994) 'Regulation of intestinal epithelial barrier function by TGF-beta 1. Evidence for its role in abrogating the effect of a T cell cytokine', *J Immunol*, 153(12), pp. 5730-9.

Podolsky, D. K. (2002) 'Inflammatory bowel disease', *N Engl J Med*, 347(6), pp. 417-29.

Powell, D. W. (1981) 'Barrier function of epithelia', *Am J Physiol*, 241(4), pp. G275-88.

Prasad, S., Mingrino, R., Kaukinen, K., Hayes, K. L., Powell, R. M., MacDonald, T. T. and Collins, J. E. (2005) 'Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells', *Lab Invest*, 85(9), pp. 1139-62.

Promega Corporation (2021) *Transfection: Protocols for transfection and information on optimization*. Available at:

<https://www.promega.de/resources/guides/cell-biology/transfection/#factors-influencing-transfection-efficiency-46ec6224-e4ee-42c7-aef6-13c3bd25e91c>

Accessed: March, 25, 2021.

Qiagen (2013-21) *Key Steps In Plasmid Purification Protocols*. Available at:

<https://www.qiagen.com/es/knowledge-and-support/knowledge-hub/technology-and-research/plasmid-resource-center/key-steps-in-plasmid-purification-protocols/>

Accessed: March 25, 2021.

Qian, H., Tao, Y., Jiang, L., Wang, Y., Lan, T., Wu, M., Pang, J., Appiah-Kubi, K., Chen, Y. and Wu, Y. (2018) 'PKG II effectively reversed EGF-induced protein expression alterations in human gastric cancer cell lines', *Cell Biol Int*, 42(4), pp. 435-442.

Rachow, S., Zorn-Kruppa, M., Ohnemus, U., Kirschner, N., Vidal-y-Sy, S., von den Driesch, P., Börnchen, C., Eberle, J., Mildner, M., Vettorazzi, E., Rosenthal, R., Moll, I. and Brandner, J. M. (2013) 'Occludin is involved in adhesion, apoptosis, differentiation and Ca²⁺-homeostasis of human keratinocytes: implications for tumorigenesis', *PLOS One*, 8(2), Article e55116.

Raleigh, D. R., Marchiando, A. M., Zhang, Y., Shen, L., Sasaki, H., Wang, Y., Long, M. and Turner, J. R. (2010) 'Tight junction-associated MARVEL proteins *marveld3*, *tricellulin*, and *occludin* have distinct but overlapping functions', *Mol Biol Cell*, 21(7), pp. 1200-13.

Rehm, H. and Letzel, T. (2010) *Der Experimentator Proteinbiochemie/Proteomics*. 6 edn. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, Springer, pp. 2-3, 8-11, 25-31.

Ren, J., Karna, S., Lee, H. M., Yoo, S. M. and Na, D. (2019) 'Artificial transformation methodologies for improving the efficiency of plasmid DNA transformation and simplifying its use', *Appl Microbiol Biotechnol*, 103(23-24), pp. 9205-9215.

Resta-Lenert, S., Smitham, J. and Barrett, K. E. (2005) 'Epithelial dysfunction associated with the development of colitis in conventionally housed *mdr1a*^{-/-} mice', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 289(1), pp. G153-62.

Riazuddin, S., Ahmed, Z. M., Fanning, A. S., Lagziel, A., Kitajiri, S., Ramzan, K., Khan, S. N., Chattaraj, P., Friedman, P. L., Anderson, J. M., Belyantseva, I. A., Forge, A. and Friedman, T. B. (2006) 'Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing', *Am J Hum Genet*, 79(6), pp. 1040-51.

Rosenthal, R., Günzel, D., Krug, S. M., Schulzke, J. D., Fromm, M. and Yu, A. S. (2017) 'Claudin-2-mediated cation and water transport share a common pore', *Acta Physiol (Oxf)*, 219(2), pp. 521-536.

Rosenthal, R., Günzel, D., Piontek, J., Krug, S. M., Ayala-Torres, C., Hempel, C., Theune, D. and Fromm, M. (2020) 'Claudin-15 forms a water channel through the tight junction with distinct function compared to claudin-2', *Acta Physiol (Oxf)*, 228(1), Article e13334.

Rosenthal, R., Milatz, S., Krug, S. M., Oelrich, B., Schulzke, J. D., Amasheh, S., Günzel, D. and Fromm, M. (2010) 'Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel', *J Cell Sci*, 123(Pt 11), pp. 1913-21.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N. (1985) 'Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia', *Science*, 230(4732), pp. 1350-4.

Saitou, M., Fujimoto, K., Doi, Y., Itoh, M., Fujimoto, T., Furuse, M., Takano, H., Noda, T. and Tsukita, S. (1998) 'Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions', *J Cell Biol*, 141(2), pp. 397-408.

Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J. D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T. and Tsukita, S. (2000) 'Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands', *Mol Biol Cell*, 11(12), pp. 4131-42.

Sambuelli, A., Diez, R. A., Sugai, E., Boerr, L., Negreira, S., Gil, A., Camartino, G., Huernos, S., Doldán, I., Felstiner, D. and Bai, J. C. (2000) 'Serum transforming growth factor-beta1 levels increase in response to successful anti-inflammatory therapy in ulcerative colitis', *Aliment Pharmacol Ther*, 14(11), pp. 1443-9.

Sánchez-Pulido, L., Martín-Belmonte, F., Valencia, A. and Alonso, M. A. (2002) 'MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events', *Trends Biochem Sci*, 27(12), pp. 599-601.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) 'DNA sequencing with chain-terminating inhibitors', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12), pp. 5463-7.

Schmitz, H., Fromm, M., Bentzel, C. J., Scholz, P., Detjen, K., Mankertz, J., Bode, H., Epple, H. J., Riecken, E. O. and Schulzke, J. D. (1999) 'Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6', *J Cell Sci*, 112 (Pt 1), pp. 137-46.

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

Schulzke, J. D. and Fromm, M. (2009) 'Tight junctions: molecular structure meets function', *Ann N Y Acad Sci*, 1165, pp. 1-6.

Schulzke, J. D., Gitter, A. H., Mankertz, J., Spiegel, S., Seidler, U., Amasheh, S., Saitou, M., Tsukita, S. and Fromm, M. (2005) 'Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice', *Biochim Biophys Acta*, 1669(1), pp. 34-42.

Schulzke, J. D., Ploeger, S., Amasheh, M., Fromm, A., Zeissig, S., Troeger, H., Richter, J., Bojarski, C., Schumann, M. and Fromm, M. (2009) 'Epithelial tight junctions in intestinal inflammation', *Ann N Y Acad Sci*, 1165, pp. 294-300.

Shen, L., Black, E. D., Witkowski, E. D., Lencer, W. I., Guerriero, V., Schneeberger, E. E. and Turner, J. R. (2006) 'Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure', *J Cell Sci*, 119(Pt 10), pp. 2095-106.

Shen, L., Weber, C. R., Raleigh, D. R., Yu, D. and Turner, J. R. (2011) 'Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo', *Annu Rev Physiol*, 73, pp. 283-309.

Siegmund, B. (2020) 'Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen', in Hoffmann, J.C., Klump, B., Kroesen, A. and Siegmund, B. (eds.) *Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen in Klinik und Praxis*. 3 edn. Berlin: Springer Nature, pp. 51-72.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. (1985) 'Measurement of protein using bicinchoninic acid', *Anal Biochem*, 150(1), pp. 76-85.

Steed, E., Elbediwy, A., Vacca, B., Dupasquier, S., Hemkemeyer, S. A., Suddason, T., Costa, A. C., Beaudry, J. B., Zihni, C., Gallagher, E., Pierreux, C. E., Balda, M. S. and Matter, K. (2014) 'MarvelD3 couples tight junctions to the MEKK1-JNK pathway to regulate cell behavior and survival', *J Cell Biol*, 204(5), pp. 821-38.

Steed, E., Rodrigues, N. T., Balda, M. S. and Matter, K. (2009) 'Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family', *BMC Cell Biol*, 10, Article 95.

Stichtenoth, D. O. and Bachmann, O. (2020) 'Pharmakologie der CED-Medikamente', in Hoffmann, J.C., Klump, B., Kroesen, A. and Siegmund, B. (eds.) *Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen in Klinik und Praxis*. 3 edn. Berlin: Springer Nature, pp. 207-228.

Stiffler, M. A., Chen, J. R., Grantcharova, V. P., Lei, Y., Fuchs, D., Allen, J. E., Zaslavskaja, L. A. and MacBeath, G. (2007) 'PDZ domain binding selectivity is optimized across the mouse proteome', *Science*, 317(5836), pp. 364-9.

Taghipour-Sheshdeh, A., Nemati-Zargaran, F., Zarepour, N., Tahmasebi, P., Saki, N., Tabatabaiefar, M. A., Mohammadi-Asl, J. and Hashemzadeh-Chaleshtori, M. (2019) 'A novel pathogenic variant in the MARVELD2 gene causes autosomal recessive non-syndromic hearing loss in an Iranian family', *Genomics*, 111(4), pp. 840-848.

Tamura, A., Hayashi, H., Imasato, M., Yamazaki, Y., Hagiwara, A., Wada, M., Noda, T., Watanabe, M., Suzuki, Y. and Tsukita, S. (2011) 'Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na⁺ deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine', *Gastroenterology*, 140(3), pp. 913-23.

Tayal, V. and Kalra, B. S. (2008) 'Cytokines and anti-cytokines as therapeutics--an update', *Eur J Pharmacol*, 579(1-3), pp. 1-12.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) 'Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications', *Proc Natl Acad Sci USA*, 76(9), pp. 4350-4.

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

Turner, J. R. (2009) 'Intestinal mucosal barrier function in health and disease', *Nat Rev Immunol*, 9(11), pp. 799-809.

Turner, J. R., Rill, B. K., Carlson, S. L., Carnes, D., Kerner, R., Mrsny, R. J. and Madara, J. L. (1997) 'Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation', *Am J Physiol*, 273(4), pp. C1378-85.

Turner, M., Chantry, D., Katsikis, P., Berger, A., Brennan, F. M. and Feldmann, M. (1991) 'Induction of the interleukin 1 receptor antagonist protein by transforming growth factor-beta', *Eur J Immunol*, 21(7), pp. 1635-9.

Turpin, W., Lee, S. H., Raygoza Garay, J. A., Madsen, K. L., Meddings, J. B., Bedrani, L., Power, N., Espin-Garcia, O., Xu, W., Smith, M. I., Griffiths, A. M., Moayyedi, P., Turner, D., Seidman, E. G., Steinhart, A. H., Marshall, J. K., Jacobson, K., Mack, D., Huynh, H., Bernstein, C. N., Paterson, A. D., Crohn's and Colitis Canada Genetic Environmental Microbial Project Research Consortium; CCC GEM Project recruitment site directors include Abreu, M., Croitoru K. (2020) 'Increased Intestinal Permeability Is Associated With Later Development of Crohn's Disease', *Gastroenterology*, 159(6), pp. 2092-2100.e5.

Ussing, H. H. (1949) 'The active ion transport through the isolated frog skin in the light of tracer studies', *Acta Physiol Scand*, 17(1), pp. 1-37.

Vacca, B., Sanchez-Heras, E., Steed, E., Balda, M. S., Ohnuma, S. I., Sasai, N., Mayor, R. and Matter, K. (2016) 'MarvelD3 regulates the c-Jun N-terminal kinase pathway during eye development in *Xenopus*', *Biol Open*, 5(11), pp. 1631-1641.

Vacca, B., Sanchez-Heras, E., Steed, E., Busson, S. L., Balda, M. S., Ohnuma, S. I., Sasai, N., Mayor, R. and Matter, K. (2018) 'Control of neural crest induction by MarvelD3-mediated attenuation of JNK signalling', *Sci Rep*, 8(1), Article 1204.

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

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

Van Itallie, C. M., Fanning, A. S. and Anderson, J. M. (2003) 'Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins', *Am J Physiol Renal Physiol*, 285(6), pp. F1078-84.

Van Itallie, C. M., Fanning, A. S., Holmes, J. and Anderson, J. M. (2010) 'Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers', *J Cell Sci*, 123(Pt 16), pp. 2844-52.

Van Itallie, C. M., Rogan, S., Yu, A., Vidal, L. S., Holmes, J. and Anderson, J. M. (2006) 'Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities', *Am J Physiol Renal Physiol*, 291(6), pp. F1288-99.

Vatn, M. H. and Sandvik, A. K. (2015) 'Inflammatory bowel disease', *Scand J Gastroenterol*, 50(6), pp. 748-62.

Vaupel, P. (2010) 'Funktionen des Magen-Darm-Trakts', in Schmidt, R.F., Lang, F. and Heckmann, M. (eds.) *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 31 edn. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, pp. 792-833.

Venugopal, S., Anwer, S. and Szászi, K. (2019) 'Claudin-2: Roles beyond Permeability Functions', *Int J Mol Sci*, 20(22), Article 5655.

Wada, M., Tamura, A., Takahashi, N. and Tsukita, S. (2013) 'Loss of claudins 2 and 15 from mice causes defects in paracellular Na⁺ flow and nutrient transport in gut and leads to death from malnutrition', *Gastroenterology*, 144(2), pp. 369-80.

Walker, J. M. (1994) 'The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantification', in Walker, J.M. (ed.) *Basic Protein and Peptide Protocols*. Methods in Molecular Biology, 32, Totowa, New Jersey: Humana Press, pp. 5-8.

Wang, F., Graham, W. V., Wang, Y., Witkowski, E. D., Schwarz, B. T. and Turner, J. R. (2005) 'Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression', *Am J Pathol*, 166(2), pp. 409-19.

Wang, F., Schwarz, B. T., Graham, W. V., Wang, Y., Su, L., Clayburgh, D. R., Abraham, C. and Turner, J. R. (2006) 'IFN-gamma-induced TNFR2 expression is required for TNF-dependent intestinal epithelial barrier dysfunction', *Gastroenterology*, 131(4), pp. 1153-63.

Wehkamp, J., Götz, M., Herrlinger, K., Steurer, W. and Stange, E. F. (2016) 'Inflammatory Bowel Disease', *Dtsch Arztebl Int*, 113(5), pp. 72-82.

Wisner, D. M., Harris, L. R., Green, C. L. and Poritz, L. S. (2008) 'Opposing regulation of the tight junction protein claudin-2 by interferon-gamma and interleukin-4', *J Surg Res*, 144(1), pp. 1-7.

Youakim, A. and Ahdieh, M. (1999) 'Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin', *Am J Physiol*, 276(5), pp. G1279-88.

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

Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A. J., Zeitz, M., Fromm, M. and Schulzke, J. D. (2007) 'Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease', *Gut*, 56(1), pp. 61-72.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Carolina Czichos, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Regulation und Funktion des Tight Junction-Proteins MarvelD3 / Regulation and function of the tight junction protein MarvelD3 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

CURRICULUM VITAE

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

Publikationsliste

Rosenthal, R., Günzel, D., Theune, D., Czichos, C., Schulzke, J. D. and Fromm, M. (2017) 'Water channels and barriers formed by claudins', *Ann N Y Acad Sci*, 1397(1), pp. 100-109.

Czichos, C., Wawrzynów, B., Chamalis, C. and von Jagow, B. (2021) 'Beidseitige Nivolumab-assoziierte Vogt-Koyanagi-Harada-artige Uveitis bei einem Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom', *Klin Monbl Augenheilkd.*

Danksagung

Mein erster und größter Dank gilt meiner Doktormutter PD Dr. Susanne Krug, die mich mit unerschöpflicher Geduld und Optimismus all die Jahre lang begleitet und mir sowohl bei praktischen Schwierigkeiten im Laboralltag als auch bei theoretischen Fragen in der Ergebnisauswertung und dem Schreiben dieser Monographie stets hilfsbereit zur Seite stand. Die Erstellung dieser Arbeit wäre ohne sie nicht möglich gewesen.

Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke und Prof. Dr. Michael Fromm möchte ich für die Möglichkeit danken, an ihrem Institut zu forschen.

Bei Prof. Dr. Michael Fromm bedanke ich mich zudem für die ersten Jahre der Betreuung, seine stete Gesprächsbereitschaft und Unterstützung.

Mein herzlicher Dank gilt ebenfalls PD Dr. Rita Rosenthal, die sowohl für technische und theoretische Fragestellungen als auch Sorgen jeglicher Art immer ein offenes Ohr und gute Ratschläge parat hatte.

In-Fah Lee und Anja Fromm danke ich ebenfalls für ihre Unterstützung im Laboralltag und die vielen motivierenden Worte.

Allen Mitarbeiter*innen des Instituts danke ich herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die lehrreiche Zeit und viele schöne Begegnungen, die ich nicht missen möchte.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei der AG Jerrold Turner für die Bereitstellung des Klonierungsvektors und der MarvelD3-Antikörper.