

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H. Einsele

**Modulation der Expression der Tight Junctions in epithelialen Monolayern als
Antwort auf exogene Faktoren anhand der Untersuchung zweier Proteine
Occludin und ZO-1**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Theresa Constanze Pilar Gläser, geb. Marbe
aus Freiburg im Breisgau

Würzburg, Oktober 2010

Referent: Prof. Dr. med. W. Scheppach

Koreferent: Prof. Dr. med. M. Scheurlen

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.03.2012

Die Promovendin ist Ärztin.

MEINEM VATER

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung.....	1
2. Material und Methoden.....	9
2.2 Messung des transepithelialen Widerstandes (TER)	10
2.3 Doppelte Immunfluoreszenzfärbung	10
2.4 Taqman® Sonde/ Real-time RT-PCR-Sonden	11
2.5.1 RNA Extraktion und Aufreinigung.....	12
2.5.2 cDNA-Synthese	13
2.5.3 Real-Time PCR.....	13
3. Ergebnisse	16
3.1 Wirkungsweise der Proteinkinase C auf Transkription und Translation	16
3.1.1 Beteiligung der PKC an der Regulation des Transduktionsweges	16
3.1.2 Wirkung verschiedener Zellkaskadeninhibitoren und Resveratrol.....	18
3.2 Wirkung bakteriell pathogener Komponenten auf die Expression von ZO-1/ Occludin und die Funktionalität von Tight Junctions	23
3.3 Wirkung der inflammatorischen Cytokine TNF α und IFN γ	27
3.4 Einfluss von entzündungshemmenden Hydrocortison.....	30
3.5 Einfluss durch Temperaturerhöhung.....	32
4. Diskussion.....	34
5. Zusammenfassung.....	41
6. Literaturverzeichnis	43

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

Danksagung

Lebenslauf

1. Einleitung

Spezialisierte Verbindungen werden bei vielen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten in allen Geweben gebildet, sind jedoch bei Epithelien von herausragender Bedeutung. Eine besondere Beachtung gilt hier den Tight Junctions (TJ), die epitheliale Zellen so miteinander verbinden, dass durch ihre Barrierefunktion selbst niedermolekulare Bestandteile an einem Durchtritt gehindert werden können und eine Polarisierung in ein apikales und basolaterales Milieu entstehen kann (1 - 3).

Im Gegensatz zu dem lange angenommenen Modell der Tight junctions als statische Barriere zur Verhinderung eines parazellulären Transportes, lassen neuere Ergebnisse TJ als Elemente erscheinen, die sich durch eine hohe Dynamik auszeichnen (4, 5). Von Interesse sind hierbei nicht nur die Signaltransduktionwege, sondern auch die Beobachtung der Qualität der Verbindungen und der Einfluss einzelner Substanzen auf die TJ.

Theoretischer und empirischer Hintergrund

In den letzten Jahren wurden etwa 40 verschiedene Proteine entdeckt, die an der Bildung der TJ von Epithelien, Endothelien und myelinisierten Zellen beteiligt sind (6, 7). Diese Proteine werden in transmembrane Proteine und Plaqueproteine unterteilt (8). Eines dieser Proteine ist Occludin, welches 1993 das erste Mal beschrieben wurde (9) und dessen Namensgebung auf das lateinische Wort „occludere“, verschließen zurückzuführen ist. Occludin besitzt vier Transmembrandomänen, zytoplasmatische Stickstoff-(N)- und Carboxyl-(C)-Enden, einen intrazellulären Loop und zwei extrazelluläre Loops. Occludin und andere transmembrane Proteine wie Claudin und so genannte JAMs (Junction Adhesion Molecules) sind für eine klettverschlussartige Verbindung der Zellen verantwortlich (10). Occludin besteht aus 522 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 55.9 kDa (10). Mit dem intrazellulären Carboxylsegment bindet Occludin direkt an ZO-1 (11, 12), einem TJ Protein, welches den Plaqueproteinen angehört. Durch diese Bindung wird die Lokalisation der TJ bestimmt (10). ZO-1, dessen Name sich von der lateinischen Abkürzung für zonulae occludentes herleitet, wird zu den MAGUK (Membrane associated guanylate kinase homologues) Proteinen gezählt und hat ein Molekulargewicht von 210-225 kDa (13). ZO-1 ist

vernetzt mit Aktin und verbindet somit die TJ mit dem Zellzytoskelett in einer Ankerfunktion (8, 14). ZO-1 wurde in subkonfluenten Zellen im Nucleus gefunden. Bisherige Ergebnisse weisen darauf hin, dass sie an der Organisation der Zellkontakte beteiligt sind; ein Regulationsmechanismus im Zellzyklus und eine Beteiligung an der Genese von Brustkrebs wird angenommen (15 - 17). Eine schematische Darstellung einiger TJ Proteine liefert die Abbildung 1.

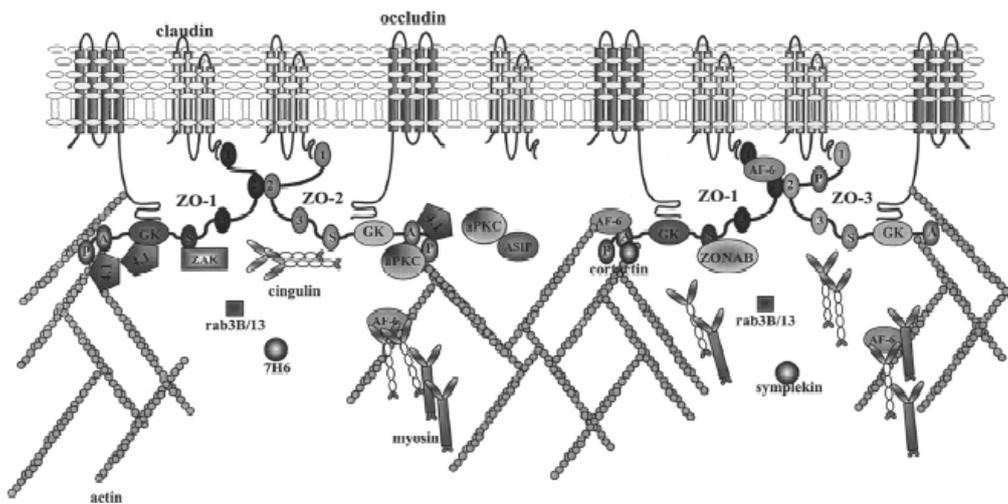


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung einiger TJ Proteine und ihrer Vernetzung, aus: Gonzalez-Mariscal, L. *MAGUK proteins: structure and role in the tight junction*, Semin Cell Dev Biol. 2000 Aug; **11**(4).

Signalkaskade

Neben der Suche nach TJ Bausteinen steht gleichzeitig die Erforschung von Regulationsmechanismen für Bildung, Zusammenbau und Instandhaltung der TJ im Vordergrund. Diese Mechanismen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Jedoch ist bekannt, dass diese durch klassische second Messenger und über Signalkaskaden beeinflusst werden (18 - 20). Die Permeabilität kann zum Beispiel über die Phosphorylierung von Tyrosin- und Serin/Threoninresten reguliert werden (21). Viele Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Proteinkinase C (PKC), eine Familie von Serin/Threoninkinasen, an der Regulation der TJ beteiligt ist (22 - 25). Entdeckt wurde die PKC 1977 als eine proteolytisch aktivierbare Proteinkinase (26). Inzwischen sind in der Familie der PKC elf verschiedene Subtypen bekannt, die in drei Gruppen eingeteilt werden: die konventionellen (conventional) PKC (cPKC: α , β I, β II, γ), die neuen (novel) PKC (nPKC: δ , ϵ , η , θ , μ) und die atypischen (atypical) PKC (aPKC: ζ , λ /i) (s.

Abb. 1.2) (27, 28). Die cPKC benötigen Diacetylguanin, Calcium und Phosphatidylserin für ihre Aktivierung, nPKC sind dagegen calciumunabhängig und aPKC benötigen lediglich Phosphatidylserin (29).

Um cPKC zu aktivieren sind heute zwei Möglichkeiten bekannt: die rezeptorvermittelte Produktion von Diacylglycerol (DAG) durch rezeptorassoziierte G-Proteine und die phorbolsterinduzierte direkte pharmakologische Aktivierung. Tumorbegünstigende Phorbolster wie 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA, auch als PMA in der Literatur bekannt) besitzen eine molekulare Struktur wie DAG, so dass TPA im Experiment substituierend für DAG eingesetzt werden kann. Beide führen zu einer gleichen Strukturveränderung und einer membranassoziierten Translokation. Außerdem wurde eine Aktivierung der cPKC durch Vitamin D₃ oder durch cis-ungesättigte Fettsäuren wie z.B. die Arachidon- und Linolensäure beobachtet (29, 30).

Die nPKC werden spezifisch durch Phosphatidylinositol und Phorbolster aktiviert (31, 29). Die Aktivierungsmechanismen von aPKC sind bislang nur zum Teil, z.B. durch Ceramide beschrieben (32).

Der PKC nachgeschaltet ist eine Vielzahl von Substraten bekannt, zu denen neben vielen Enzymen auch Proteine des Cytoskeletts und des Kerns gehören (29). Bei der Regulation von Zonulae adherentes, einer Form der Zell-Zellkontakte neben den Tight Junctions, wurde die Signalweiterleitung von PKC über MEK1 (mitogen-activated protein kinase kinase) mit folgender Phosphorylierung der MAPK (mitogen-activated protein kinase) gefunden (33). Die MAPK besteht aus drei Superfamilien, der p42/44 MAPK, der p38 MAPK und der c-Jun NH₂-terminal Kinase (JNK) (34). Ein anderer Weg der MEK führt über ERK1/2, was zur Stimulation von Transkriptionsfaktoren führt (35).

Zur Untersuchung diese Signalkaskaden können einige etablierte Inhibitoren eingesetzt werden. Die im Folgenden beschriebenen Inhibitoren werden in den Abbildungen 1.2 und 1.3 schematisch dargestellt. GF 109203X entspricht Bisindolylmaleimide I und hemmt selektiv PKC α , β I, β II, γ , δ , ϵ Isoenzyme (36). Der Inhibitor U0126 [1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]-butadien] ist ein potenter spezifischer Hemmstoff von MEK2 bei geringer Konzentration und inhibiert bei hoher Konzentration auch MEK1 (37). PD98059 [2'-Amino-3'-methoxyflavon], ein Flavonabkömmling wird als Inhibitor von MEK1/2 eingesetzt (38). SB202190 [4-(4-

Fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazol] ist ein spezifischer Inhibitor der p38 MAPK, jedoch ohne die ERK und JNK MAPK zu hemmen, SB203580 [4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)imidazol] hemmt ebenfalls die p38, aber keine JNK MAPK und p42 MAPK (39). Der Hemmstoff SB202474 [4-Ethyl-2-(p-methoxyphenyl)-5-(4'-pyridyl)-1H-imidazol] wird als Negativkontrolle für MAPK-Inhibitorstudien eingesetzt (40). Hispidin ist ein potenter Inhibitor der PKC β -Isoenzyme (41). Ro-31-8220 [1-[3-(Amidinothio)propyl-1H-indoyl-3-yl]-3-(1-methyl-1H-indoyl-3-yl)maleimidmethansulfonat] hemmt die PKC Isoenzyme bei gleichzeitiger Aktivierung der MAPK JNK (36). Resveratrol, ein Phytoalexin, welches zu den Polyphenolen zählt und unter anderem in Weintrauben, Himbeeren, Maulbeeren, Pflaumen, Erdnüssen, weissen Lilien und im Japanischen Staudenknöterich nachgewiesen werden konnte (115), wird als Inhibitor der phorbolsterinduzierten ERK1/2-Aktivierung über NF- κ B eingesetzt (42). In-vitro-Studien mit Resveratrol haben Hinweise auf eine mögliche Wirksamkeit gegen Krebszellen und einen proapoptotischen Effekt erbracht (116, 117); andere Untersuchungen mit Resveratrol zeigten positive Effekte bei Arteriosklerose und Herzerkrankungen (118), bei Infektionen (119) und bei der Alzheimer-Krankheit (120). In weiteren Studien zeigte Resveratrol insulinspiegel- und bei Hyperglycämien blutzuckersenkende Wirkungen (121, 122).

Ein weiterer Inhibitor ist das PKC ϵ -Inhibitorpeptid, das als Hemmstoff bei phorbolsterinduzierter PKC ϵ eingesetzt werden kann (43).

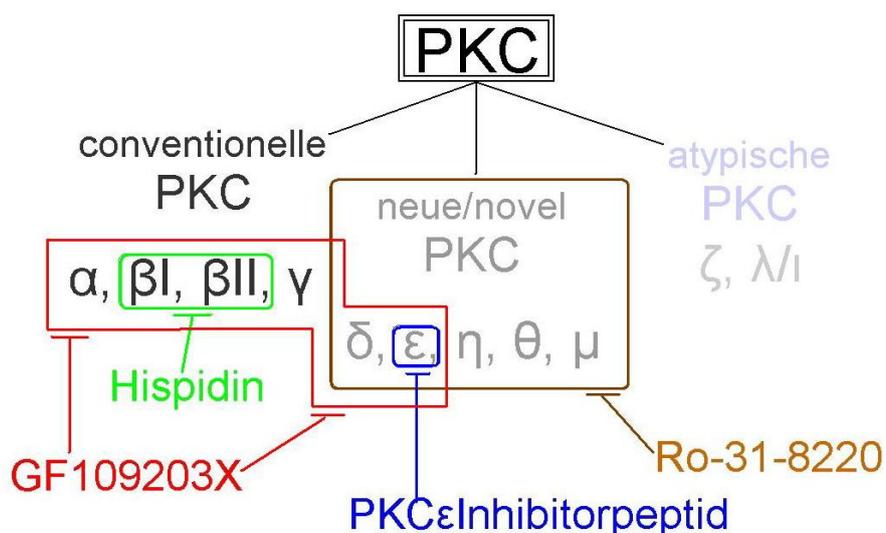


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Subtypen der PKC und ihrer Inhibitoren

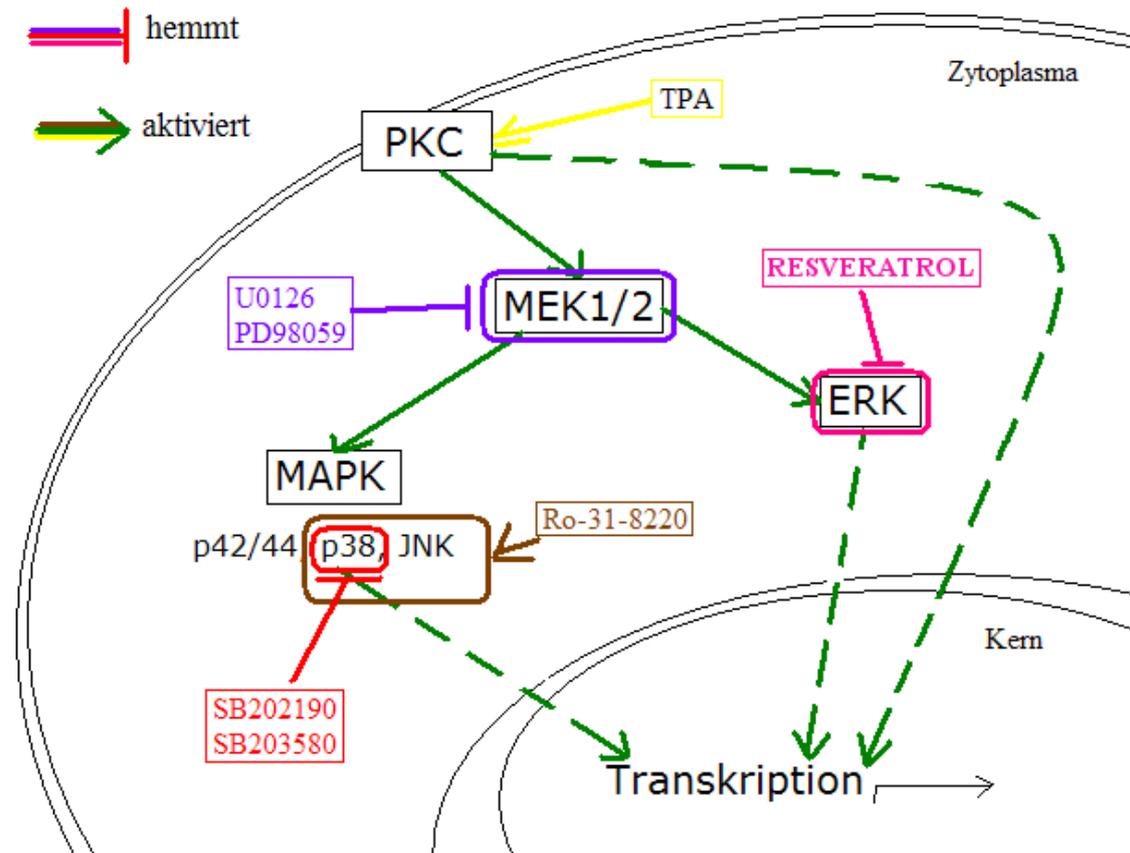


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der PKC-Signalkaskade flussabwärts mit einigen Inhibitoren/Aktivatoren

Exogene Faktoren

Neben der Untersuchung der Signalweiterleitung in epithelialen Zellen zu den TJ ist auch die Reaktion der TJ auf exogene Faktoren von Interesse. Da das Darmepithel vielen verschiedenen Einflüssen ausgesetzt ist, liegt besonderes Augenmerk auf denen mit pathophysiologischem Wert. Dabei hat sich gezeigt, dass vor allem die epitheliale Polarität eine signifikante Rolle in der Abwehr von Infektionen spielt und dass unter Anderem mikrobielle Faktoren für eine Zerstörung der Integrität und damit auch der Polarität sorgen können (44, 45). Es wurde zum Beispiel eine *Helicobacter pylori*-toxininduzierte Polaritätsstörung beschrieben, die über die PKC vermittelt ist und neben einem Abfall des TER zu einer Dislokation von ZO-1 führt (46). Auch das *Clostridium difficile*-Toxin B, das Enterotoxin von *Vibrio cholerae* und die Elastase von *Pseudomonas aeruginosa* führen zu einer Barrierefunktionsstörung des Darmepithels (47 - 49). Doch nicht nur bakterielle Toxine und Enzyme, sondern auch bakterielle

Komponenten wie Oberflächenantigene sind fähig, die Integrität des Epithels zu stören und als Kofaktor bei entzündlichen Reaktionen zu wirken; beispielsweise ist ein Anstieg der Permeabilität durch Lipopolysaccharide (LPS) oder eine proinflammatorische Wirkung von LPS und Lipoteichonsäuren (LTA) beschrieben worden (50, 51). Die Signaltransduktion dieser bakteriellen Bestandteile erfolgt über Aktivierung verschiedener TLR (toll-like receptors) der Zelle, welche zum angeborenen Immunsystem gehören (130).

Neben bakteriellen Einflüssen können auch viele andere Substanzen die Permeabilität der TJ modulieren, so zum Beispiel auch inflammatorische Cytokine (52). Proinflammatorische Cytokine, zum Beispiel Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) und Interferon γ (IFN γ) spielen eine wichtige Rolle bei der Unterhaltung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Bislang ist bekannt, dass erhöhte Werte von TNF α und IFN γ zu einer Zunahme der intestinalen Permeabilität und zu einer Abnahme der ZO-1 Menge führen (53 - 55). Es wird auch beschrieben, dass proapoptotische Effekte von TNF α und IFN γ zu einer Zerstörung der Barrierefunktion führen (56).

Eine andere Substanz, die bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und anderen, systemischen Entzündungen auf das Darmepithel einwirken kann, ist Hydrocortison (=Cortisol), welches als antiinflammatorisches bzw. immunsuppressives Medikament unter anderem eingesetzt wird, um die zelluläre Integrität zu schützen, um die Synthese von Cytokinen (auch von TNF α und IFN γ) zu unterdrücken und um die Proliferation von lymphatischen Zellen zu drosseln (57). In anderen Organen, zum Beispiel in der weiblichen Brustdrüse und in Gehirndothelien führt erhöhtes Hydrocortison zu einer Abnahme von löcherigen (leaky) TJ und zur Verminderung der Permeabilität (58, 59).

Neben einem medikamentösen Eingreifen in Krankheiten stehen dem Körper auch eigene Abwehrmechanismen und unterstützende Abwehrvorgänge zur Verfügung. Einer der unterstützenden Abwehrvorgänge ist die Sollwertverstellung der Körpertemperatur auf ein höheres Niveau, z.B. durch eine Steigerung der Prostaglandinsynthese bei der Akute-Phase-Reaktion (60, 61). Das entstehende Fieber kann über eine Beschleunigung biochemischer Reaktionen eigene Abwehrmechanismen unterstützen. Hierbei gilt die Van't-Hoff-Regel: Bei einer Erhöhung von 10°K nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit um das zwei- bis dreifache zu (62). Bei Fieberversuchen an TJ einer in-vitro

Bluthirnschranke kommt es zu einer Störung der TJ mit Veränderung des ZO-1 Transkriptlevels (63).

Ziel der vorliegenden Untersuchung

TJ im Darmepithel spielen als selektive Barriere eine wichtige Rolle in der Integrität und Funktionalität des Darms. Ziel der vorliegenden Arbeit war einerseits die Untersuchung der Signalkaskade der TJ, um Regulationsmechanismen und mögliche Angriffspunkte festlegen zu können, andererseits wurden Veränderungen an TJ durch endogene und exogene Faktoren untersucht, um zur Aufklärung pathophysiologischer Vorgänge an TJ beitragen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Zellen und Zellkulturexperimente

Verwendete Zelllinie

Für die Experimente wurden Zellen der Zelllinie T84 der American Type Culture Collection (CCL-248) verwendet. Diese Zelllinie wurde aus einer menschlichen Kolonkarzinommetastase in den Lungen gewonnen. Sie wächst als Monolayer und bildet Tight Junctions aus.

Zellkulturexperimente

T-84 Zellen wurden entweder auf Filterinserts (Falcon von BD, Heidelberg, Poren: 1µm, Oberfläche pro Insert: 4,2 cm², 6er Wells, Nr. 353102) oder 25 cm² Zellkulturflaschen (Falcon von BD, Heidelberg) in Ham's Nutrient Mixture F12 und Dulbecos Modified Eagle Medium (DMEM) Kulturmedien (Invitrogen, Karlsruhe) in einem Verhältnis von 1:1 kultiviert, denen 5% Vol. FBS, 2% (Penicillin/Streptomycin, Gibco, Karlsruhe) und 2,5 mM Glutamin (Gibco, Karlsruhe) zugesetzt war. Auf die Inserts wurden 5*10⁵ Zellen, in den 25 cm² Kulturflaschen wurden jeweils 1*10⁶ T-84 ausgesät. Die Kultur der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂. TPA (0,1µM Calbiochem, Darmstadt), Zellkaskadeninhibitoren: GF 109203X (0,5µM, Calbiochem, Darmstadt), SB 202474, U0126, PD98059 SB202190, SB 203580 (jeweils 10µM, Calbiochem, Darmstadt), Hispidin (100µM, Calbiochem, Darmstadt, RO-31-8220 (0,1µM, Calbiochem), Resveratrol (0,1 mM, Calbiochem), PKCεInhibitorpeptid (150µg/ml, Calbiochem), LPS *S. typhimurium* (10µg/ml Sigma-Aldrich, Schnelldorf), LTA *Str. faecalis* (10µg/ml Sigma-Aldrich, Schnelldorf), LTA *S. aureus* (10µg/ml Sigma-Aldrich), DNA *E.coli* (50µg/ml Sigma-Aldrich), TNFα (10µg/ml, Sigma-Aldrich), IFNγ (100U/ml, Sigma-Aldrich), Hydrocortison (500nM, 1µM Sigma-Aldrich), wurden in den jeweiligen Experimenten dem serumfreien Medium zugefügt, die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten weiterbehandelt. Bei den Fiebersuchen wurden die Zellen nach Anzucht über 24 h bei 42°C bzw. bei 37°C weiterkultiviert.

Alle Experimente wurden jeweils 3-fach durchgeführt.

Bei jedem Experiment wurden Zellen als Kontrolle in einfachem Medium mitgeführt und zeitgleich zu den Experimenten weiterbehandelt.

2.2 Messung des transepithelialen Widerstandes (TER)

Für die Messung des transepithelialen Widerstandes (TER: trans-epithelial Resistance) wurden die inkubierten Inserts zum jeweiligen Zeitpunkt 3-fach mit PBS gewaschen und dann in einem PBS-Medium, das mit $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,226 g/l) und $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,15g/l) angereichert wurde, in der Endohm 24 Kammer (WPI, Berlin) gemessen. Ein Leerwert wurde mit einem unbehandelten Insert ermittelt. Die Messung erfolgte in 3-fachem Ansatz. Bei jedem Experiment wurden Mediumkontrollen mitgeführt.

2.3 Doppelte Immunfluoreszenzfärbung

Die auf den Inserts (Falcon, Heidelberg) gewachsenen Zellen wurden mit Methanol (-20°C) für 5 Minuten fixiert, mit PBS (Raumtemperatur) rehydriert und gewaschen und anschließend mit 0,25% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS über 10 Minuten permeabilisiert. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte das Blocken unspezifischer Antikörperbindungsstellen mit 1% BSA (Dade, Behring, Marburg) in PBS über 30 Minuten. Der primäre ZO-1 Antikörper (BD Biosciences, Heidelberg) wurde in einer Konzentration von $1\mu\text{g/ml}$ in 1% BSA in PBS zugegeben und über 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur ein mit Cy3 gelabelter sekundärer Antikörper G α M (goat anti mouse; Jackson IR, West Grove, USA) $2,5\mu\text{g/ml}$ in 1% BSA in PBS zugegeben. Danach wurden die Inserts wieder mehrfach mit PBS gewaschen und mit einem FITCkonjugierten Occludin-Antikörper (Zymed, San Francisco, USA) in der Konzentration $2\mu\text{g/ml}$ in 1% BSA/PBS für weitere 1,5 Stunden inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen.

Die Membranen wurden im Anschluss mit einem Skalpell aus den Plastikwells ausgeschnitten, der Zellrasen mit dem Antifading-Medium Mowiol (Calbiochem, Darmstadt) mobilisiert und mit Kaisers Reagenz (Vectashield Mounting Media, Vector Laboratories, Merck, Darmstadt) auf einem Objektträger fixiert. Die gefärbten Präparate

wurden mit einem konfokalen Mikroskop (Nikon Eclipse 1, Düsseldorf) untersucht und digital fotografiert.

2.4 Taqman® Sonde / Real-time RT-PCR-Sonden

Die Sonden wurden mit der Hilfe des Beacon Designers 2.1 (Premier Biosoft, Palo Alto, USA) erstellt. Diese Sonden wurden ausgehend von Oligonucleotiden der Firma MWG (Ebersberg) synthetisiert.

Verwendet wurden die Sonden zur Ermittlung des DNA-Transkriptionslevels der cDNA in der real-time RT-PCR.

Die Sonden wurden am 5' Ende mit FAM bzw. am 3' Ende mit TAMRA gelabelt.

Für ZO-1 wurde folgende Sonden/Primerkombination eingesetzt:

Sonde	5'– CAC CAG CCA GCC GCA AAC CCA CA – 3'
forward primer	5'– ATG GTG TCC TAC CTA ATT CAA CTC AT – 3'
reverse primer	5'– GCC AGC TAC AAA TAT TCC AAC ATC A – 3'

und für Occludin folgende:

Sonde	5'– CTC ATC ACA GGA CTC GCC GCC AGT TG – 3'
forward primer	5'– AAG GTC AAA GAG AAC AGA GCA AGA – 3'
reverse primer	5'– TAT TCC CTG ATC CAG TCC TCC TC – 3' .

Für das Housekeeping GAPDH wurde eine vorgefertigte 5' Ende VIC/3' Ende TAMRA gelabelte Taqman®Sonde samt ihrer Primer verwendet (Applied Biosystems, Darmstadt).

FAM bzw. VIC agieren am 5'-Ende der Sonde als Reporterfarbstoff und werden bei intakter Sonde durch den zweiten Fluoreszenzfarbstoff (TAMRA) am 3'-Ende gequencht; beim Abbau der Sonde durch die PCR kommt es zu einer Zunahme des Reporterfarbstoffsignals. Je stärker dieses Signal ist, umso höher war der Transkriptionslevel der Probe.

2.5.1 RNA Extraktion und Aufreinigung

Zum jeweiligen Zeitpunkt wurde bei den Experimenten die Gesamt-RNA aus der adhären wachsenden Zellfraktion extrahiert. Dafür wurde das Nährmedium abgesaugt und Trifast (Peqlab, Erlangen) auf die Zellen gegeben (1 ml pro 25 cm² Zellkulturflasche, 1 ml pro Insert). Noch adhären Zellen wurden mit einem Zellschaber gelöst und das Lysat in Eppendorfgefäße überführt. Es wurde Chloroform (Sigma-Aldrich) zugesetzt (pro ml Trifast 0,2ml Chloroform), kräftig geschüttelt und für 15 Sekunden gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurden die Proben bei 13000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die nun entstandene gelbliche wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt (mind. 0,5 ml) und mit 0,5 ml Isopropanol versetzt. Das Gemisch wurde kurz gevortext und bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert, so dass es zur Ausfällung der Nucleinsäuren kam. Es folgte erneut eine Zentrifugation über 10 min (13000rpm, 4°C), bei der sich ein DNA/RNA-Pellet bildete. Nach Abziehen des Überstandes wurde das Pellet zweifach in 1ml 75% Ethanol durch Vortexen gelöst und wieder abzentrifugiert (jeweils 5 min bei 13000rpm und 4°C).

Das DNA/RNA-Pellet wurde anschließend für 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 100µl DEPC-H₂O sorgfältig gelöst.

Es folgte die RNA-Aufreinigung und DNase Behandlung mit Hilfe des RNeasy-Kits (Qiagen, Hildesheim): Die verwendeten Puffer und die DNase-Stocklösung sind Bestandteile des RNeasy-Kits.

Zunächst wurden die Puffer des Sets gebrauchsfertig gemischt, dabei wurde der RLT Puffer mit beta-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) versetzt (10µl pro ml Puffer) und das Pufferkonzentrat RPE wurde mit 4 Vol. abs. Ethanol angemischt.

Zum Binden an die Silica-Matrix wurden zu den 100µl RNA-Lösung 350µl RLT Puffer gegeben und gut gemischt, im Anschluss erfolgte die Zugabe von 250 µl 100% Ethanol und nach sorgfältigem Mischen wurde das gesamte Volumen auf RNeasy-column pipettiert. Es folgte die Zentrifugation über 30 sek bei 13000rpm und Raumtemperatur, anschließend wurde das Eluat verworfen. Es wurden 350 µl RW1 Puffer auf jede Säule gegeben und erneut 30 sek zentrifugiert (30 sek, 13000rpm) sowie das Eluat verworfen. Nun folgte der DNase Verdau indem jeder Säule 80µl DNase Mix zugegeben und über

30 min bei Zimmertempertur inkubiert wurde. Dieser Mix bestand aus DNase Stock Lösung und RDD Puffer im Verhältnis 1:7 und musste vorsichtig gemischt werden. Danach folgten die Zugabe von 350 µl RW1 Puffer und erneute Zentrifugation (30 sek, 13000rpm). Anschließend wurde die Säule in ein neues Gefäß gesetzt und zweimal mit 500 µl RPE Puffer gewaschen, zentrifugiert und das Eluat verworfen. Die Säule wurde in ein Eppendorfgefäß gesetzt, durch die Zugabe von 30 µl DEPC-H₂O die RNA eluiert und durch Zentrifugieren die isolierte und gereinigte RNA im Eppendorfgefäß aufgefangen und bei -80°C eingefroren.

2.5.2 cDNA-Synthese

Um eine einheitliche Menge an RNA einzusetzen wurden die Proben in einem Spectrophotometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences Europe, Freiburg) bei 260 und 280 nm gemessen und das Volumen bestimmt, welches 2 µg RNA enthielt. Dieses Volumen wurde für die cDNA-Synthese eingesetzt, mit DEPC-H₂O auf 10 µl aufgefüllt und bei 94°C über 5 min im GeneAmp® PCR-System 9700 (PE Applied Biosystems, USA) denaturiert. Zu diesen 10 µl RNA wurden 10 µl Reaktionsmix gegeben. Dieser Mix bestand aus 4 Teilen 5x First Strand Buffer, 1,5 Teilen 0.1M DTT, 1 Teil Reverse Transcriptase (200U/µl) (M-MLV-RT Set, Gibco Life Technologies, Gaithersburg, USA), 2 Teilen 2.5µM dNTP (Gibco), 0,5 Teilen 40U/µl rekombinantem RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega, Madison, USA) und 1 Teil (0.05µg/µl) N6/Random hexamer primer (Promega, Madison, USA). Eine Negativkontrolle wurde mitgeführt, die statt mit 10µl RNA Lösung mit 10µl reinem DEPC-H₂O angesetzt war. Im GeneAmp® PCR-System 9700 (PE Applied Biosystems, USA) wurden die Proben 45 min bei 40°C gewärmt, gefolgt von einem Temperaturanstieg auf 94°C für 5 min und Abkühlen der Proben auf 4°C. Die so synthetisierte cDNA wurde bei -20°C bis zum weiteren Gebrauch aufbewahrt.

2.5.3 Real-Time PCR (nach der Rerversen Transkriptase)

Zuerst wurden die Reaktionsmixe für die real-time PCR von humanGAPDH (Applied Biosystems, Darmstadt), ZO-1 und Occludin angesetzt. GAPDH wurde bei allen

Versuchen als Housekeeper mitbestimmt. Für jeweils einen Ansatz wurde für GAPDH 12,5 µl Absolut QPCR Master Mix (ABgene, Hamburg), 1,25 µl humanGAPDH-Sondenmix [20x] (Applied Biosystems), 11,25 µl RNase freies Wasser gemischt, für ZO-1 bzw. Occludin wurde pro Ansatz 12,5 µl Absolut QPCR Master Mix [2x] (ABgene, Hamburg), 2,5 µl forward primer, 2,5 µl reverse primer, 2,5 µl Sonde [20µM] und 5 µl RNase freies Wasser gemischt. Die GAPDH-Sonde war am 5'-Ende VIC, die Sonden für ZO-1 und Occludin waren am 5'-Ende FAM und alle am 3'-Ende TAMRA gelabelt. Diese Reaktionsmische wurden auf Eppendorfgefäße verteilt, pro Probe 96µl, und mit jeweils 4µl DEPC-H₂O, Standard-DNA-Lösung oder Proben-cDNA-Lösung aufgefüllt. Die Standard-DNA-Lösung wurde aus gepoolter cDNA Lösung angefertigt und in einer Verdünnungsreihe von 6 Stufen mitgeführt. Diese Proben wurden eingesetzt, um bei der Auswertung eine Standardkurve zu ermitteln. Bei GAPDH war die Verdünnung von Standard zu Standard 1:4, bei ZO-1 und Occludin 1:2. Die Eppendorfgefäße wurden kurz gevortext und dann 1 min bei 3000rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die 96-Well Optical Reaction Plate (ABgene) nach festgelegtem Schema, mit jeweils 25µl pro Well befüllt. Alle Werte wurden in Triplikaten bestimmt. Es wurden Optical-Caps (ABgene) aufgesetzt und die Platte unter Lichtabschluss für 24h bei 4°C gelagert. Kurz vor dem Start der real-time PCR wurde die Platte 1 min bei 1000rpm zentrifugiert und anschließend in den iCycler™ (Bio-Rad, München) eingesetzt. Der PCR Lauf wurde nach Eingabe der RNA-Starttranskriptwerte der jeweiligen Standardkurve und des Protokolls gestartet. Aufgrund der Farbverteilung mussten die Experimente auf zwei Platten durchgeführt werden. Auf die erste Platte wurden GAPDH und ZO-1 und auf die zweite Occludin aus denselben Verdünnungsreihen und Proben pipettiert. Das Protokoll für GAPDH/ZO-1 sah 40 Zyklen (je 15 sec bei 95°C und 1 min bei 60°C) vor. Es wurde bei der Wellenlänge für VIC (530 nm) und FAM (490nm) parallel gemessen. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Wellenlängen war die Doppelauswertung für VIC/FAM möglich. Die Platte mit Occludinsonde durchlief das gleiche Protokoll, allerdings wurde nur bei der Wellenlänge für FAM (490nm) gemessen. FAM bzw. VIC als Reporterfarbstoff am 5'-Ende wurden initial durch TAMRA am 3'-Ende durch die räumliche Nähe gequencht, was zu Beginn zu einer niedrigen Quantenausbeute und somit zu einem schwachen Signal der Fluoreszenz führte. Durch die Nuklease-Aktivität der

zugegebenen Taq-Polymerase wurden die Proben verstoffwechselt, so dass der Reporterfarbstoff freigesetzt wurde und die Fluoreszenz zunahm, welche während der PCR in „Echtzeit“ (*real time*) detektiert wurde. Die Differenz der Fluoreszenz im Verlauf im Vergleich zur Startfluoreszenz reflektiert die Menge an degradierter Hybridisierungsprobe (Sonde) und somit die relative Menge der initial vorhandenen RNA-Transkriptionsmenge.

Die mittels der Standardkurven von der iCycler™-Software berechneten Daten für die RNA-Starttranskriptmengen wurden anschließend in Microsoft Excel übertragen und eine semiquantitative Auswertung durchgeführt: Zunächst wurde der Quotient aus ZO-1/GAPDH bzw. Occludin/GAPDH Starttranskriptmenge für jede Probe gebildet und zur Berechnung der relativen Veränderung des Transkriptionslevels wurden die Quotienten für behandelte Zellen durch die Quotienten der unbehandelten Mediumwerte dividiert. Dabei wurde der jeweilige Zeitpunkt der Zellernte beachtet.

Die Experimente wurden 3-fach voneinander unabhängig wiederholt. Alle erhaltenen Ergebnisse wurden zusammengefasst, statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt. Für statistische Auswertungen wurde mit Sigmastat von SPSS Inc., San Rafael, USA gearbeitet.

3. Ergebnisse

3.1 Wirkungsweise der Proteinkinase C auf Transkription und Translation von Occludin und ZO-1 mit Untersuchung des Transduktionsweges

3.1.1 Beteiligung der PKC an der Regulation des Transduktionsweges

Zunächst wurde die Beteiligung der Proteinkinase C (PKC) an der Regulation der Tight Junctions (TJ) überprüft. Dazu wurde der Phorbolster TPA (0,1 μ M), welcher als Analogon von Diacylglycerol (DAG) einige Isoenzyme der PKC stimuliert, den Zellexperimenten beigefügt und über 0,5h, 1h, 2h, 3h und 24h belassen. Bei diesen Experimenten zeigte sich, dass eine signifikante ($p < 0,01$) Abnahme des TER erst nach 24 h erfolgte (Abb. 3.1.1), dass TPA aber bereits nach 2 h zu einem signifikanten Anstieg ($p < 0,05$) der Transkriptmenge führte, der nach 3 bzw. 24 h noch größer wurde (Abb. 3.1.2).

Zeitlicher Veränderung des TER unter TPA-Zugabe

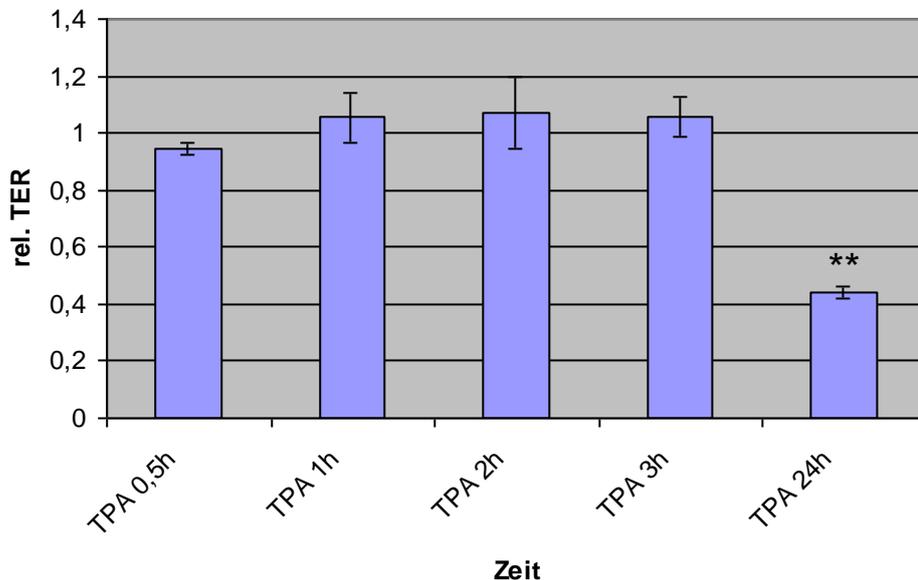


Abbildung 3.1.1: Veränderung des transepithelialen Widerstandes in Abhängigkeit des Phorbolsters TPA. T84 wurden bis zur Konfluenz auf Inserts kultiviert und 0,5, 1, 2, 3 bzw. 24h mit TPA (0,1 μ M) apikal und basolateral inkubiert. Die Experimente wurden in 3-facher Ausführung durchgeführt und auf Medienwerte bezogen. Nach 24h kam es zu einem signifikanten Abfall des TER (**: $p < 0,01$).

Modulation der ZO-1-/ Occludin-Expression durch TPA

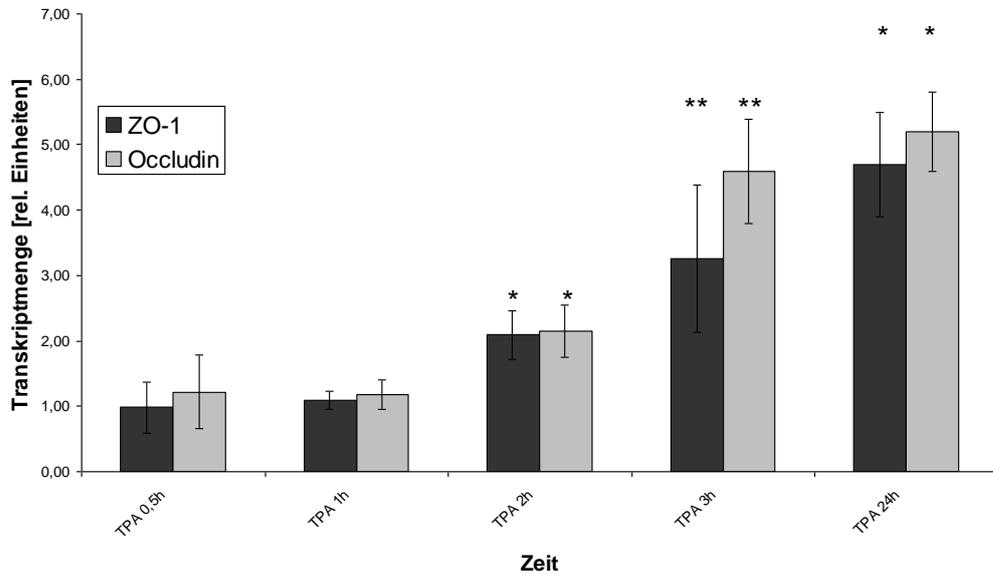


Abbildung 3.1.2: Semiquantitative Bestimmung der ZO-1-/Occludin-Transkriptmenge durch real-time RT-PCR in Abhängigkeit des Phorbolesters TPA. T84 Zellen wurden mit TPA (0,1 μ M) über 0,5h, 1, 2, 3 und 24h inkubiert. Auswertung der erhaltenen Werte unter der Berücksichtigung von GAPDH als Housekeeper. Die Experimente wurden in 3-facher Ausführung durchgeführt und auf Medienwerte bezogen. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$)

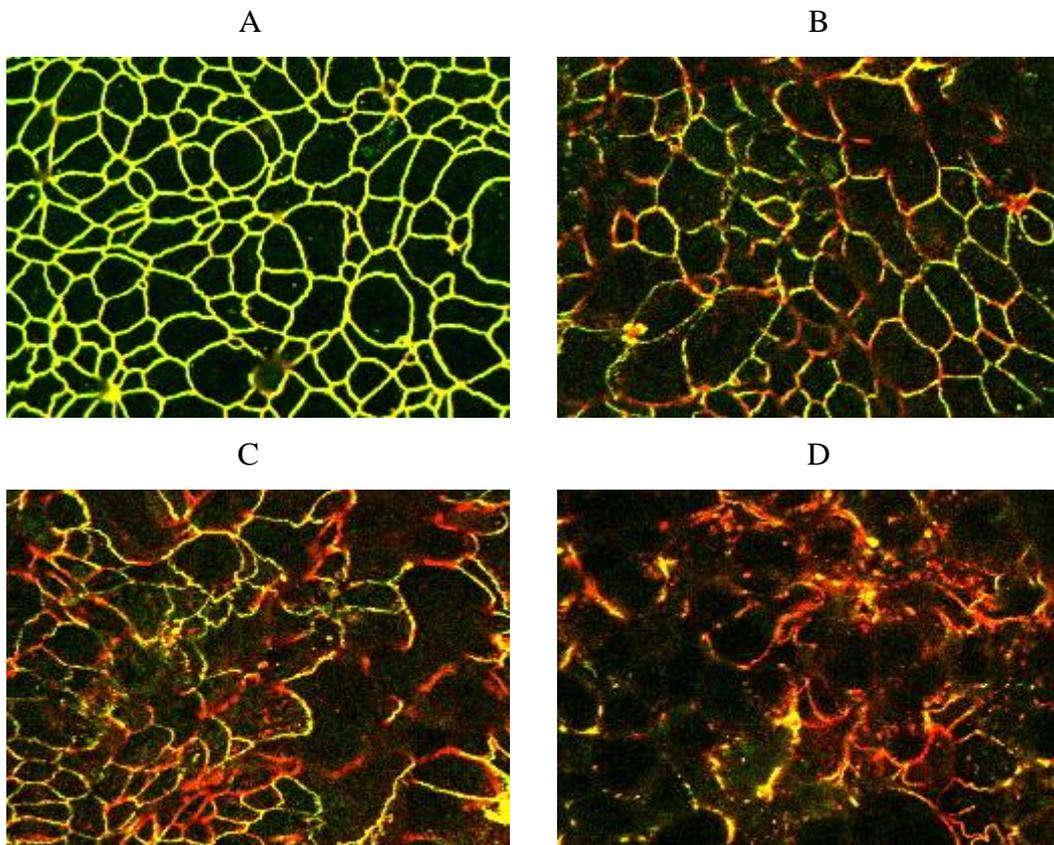


Abbildung 3.1.3: Zunehmende Dislokation der angefärbten TJ Proteine ZO-1 (Cy3) und Occludin (FITC) in einer doppelten Immunfluoreszenzfärbung im konfokalen Mikroskop, bei der kultivierte T84 (A) 0h = Kontrolle, (B) 1h, (C) 2h und (D) 24h mit TPA (0,1 μ M) inkubiert wurden. Die Bilder zeigen eine übereinandergelegte Darstellung der beiden Filterbilder des identischen Gewebssausschnittes.

Zusammenfassend führt die Enzymaktivierung durch TPA, die bereits nach 2h signifikant ist, nach 24h zu einer Reduktion des TER. Auf Proteinebene wurde bereits nach 1h ein diffuses Bild in der Immunfluoreszenz erkennbar, wobei ein normaler TER vorlag. TPA stimuliert über die PKC die Transkriptionsrate, doch trotz zunehmender Rate führt dies schließlich zu einem Funktionsverlust der TJ über 24h, was sich auch mit dem zunehmend dislozierten Aussehen in der Färbung vereinen lässt. Eine große Transkriptmenge garantiert nicht intakte TJ.

Das bedeutet, dass der Effekt der PKC Isoenzym-Aktivierung durch TPA direkt auf die Änderung der Transkriptionsmenge gerichtet ist und nicht durch unfunktionelle Tight Junctions bedingt wird, da diese Änderung vor einer TER-Veränderung einsetzt. TPA stimuliert die konventionellen PKC Isoenzyme α , β I, β II, und γ und die novel PKC Isoenzyme δ und ϵ (η , θ), so dass der Signalweg über eines oder mehrere dieser Enzyme verlaufen kann.

3.1.2 Wirkung verschiedener Zellkaskadeninhibitoren und Resveratrol

Zur genaueren Untersuchung der Signalkaskade zu ZO-1 und Occludin wurden T84 Zellen zusätzlich zu TPA (0,1 μ M) mit Resveratrol (0,1 mM) und verschiedenen Inhibitoren (GF109203X (0,5 μ M); U0126, PD 98059, SB202190, SB203580, SB202747 (jeweils 10 μ M); Hispidin (100 μ M); RO-31-8220 (0,1 μ M); PKC ϵ Inhibitorpeptid (150 μ g/ml)) über 24h inkubiert.

Bei der Koinkubation von SB202190, SB203580, SB202474, Hispidin und PKC ϵ Translokationsinhibitorpeptid kam es zu keiner signifikanten Änderung in Bezug auf die Inkubation mit TPA alleine, weder im TER noch bei der real-time RT-PCR (Abb. 3.1.4 und 3.1.5).

Unter Koinkubation von TPA mit dem Inhibitor Ro-31-8220 wurde nur die Anregung der Transkriptionsrate von ZO-1 durch TPA signifikant nivelliert, unter Inkubation von Resveratrol mit TPA wurde die Induktion der Transkription von ZO-1 und Occludin im Vergleich zur TPA Einzelinkubation signifikant vermindert.

TER nach 24h unter Zugabe von TPA plus Inhibitoren

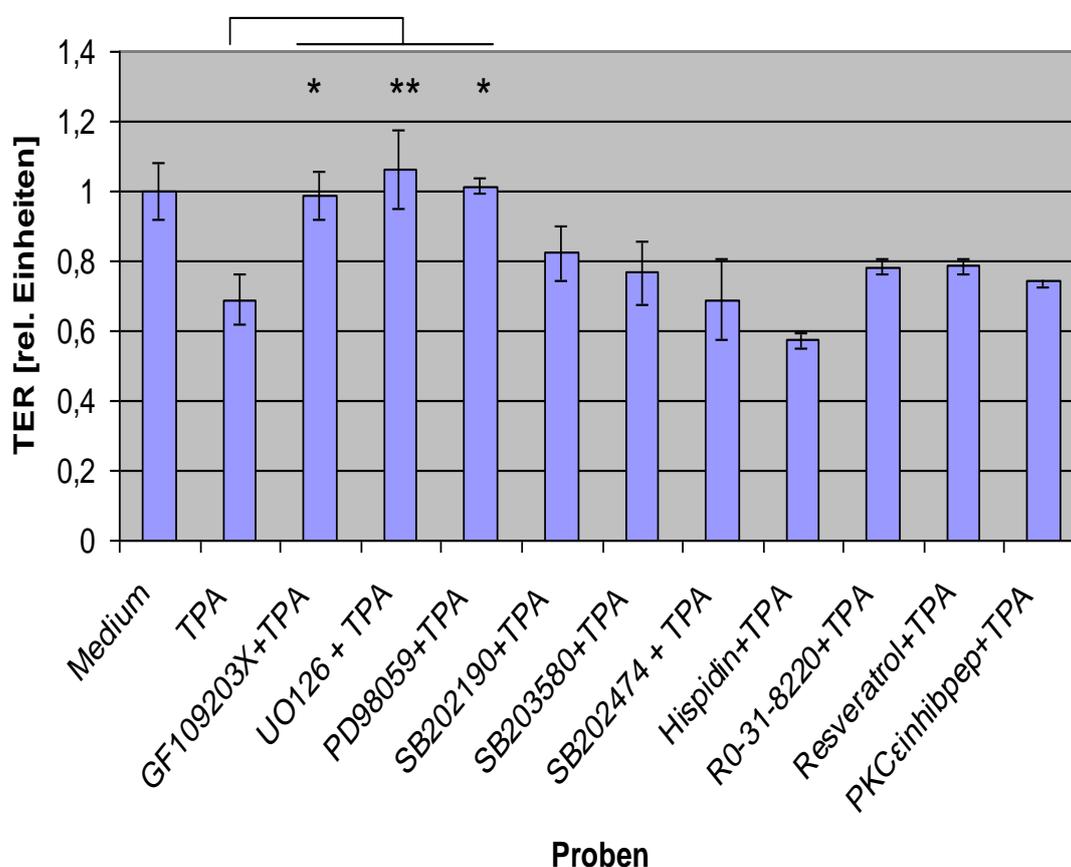


Abbildung 3.1.4: Veränderung des transepithelialen Widerstandes durch TPA unter Zugabe von Zellkaskadeninhibitoren. T84 wurden bis zur Konfluenz auf Inserts kultiviert und 24h mit TPA (0,1 μ M) bzw. mit 24 h mit TPA (0,1 μ M) plus Inhibitor (GF109203X: 0,5 μ M; U0126, PD 98059, SB202190, SB203580, SB202747: 10 μ M; Hispidin: 100 μ M; RO-31-8220: 0,1 μ M; Resveratrol: 0,1 mM; PKC ϵ Inhibitorpeptid: 150 μ g/ml) apikal und basolateral inkubiert. Die Experimente wurden in 3-facher Ausführung durchgeführt und auf Medienwerte bezogen. Die Werte GF109203X+TPA, U0126+TPA und PD98059+TPA unterscheiden sich signifikant von den Werten der Experimente mit TPA alleine (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Modulation der ZO-1-/Occludinexpression durch TPA plus Inhibitoren

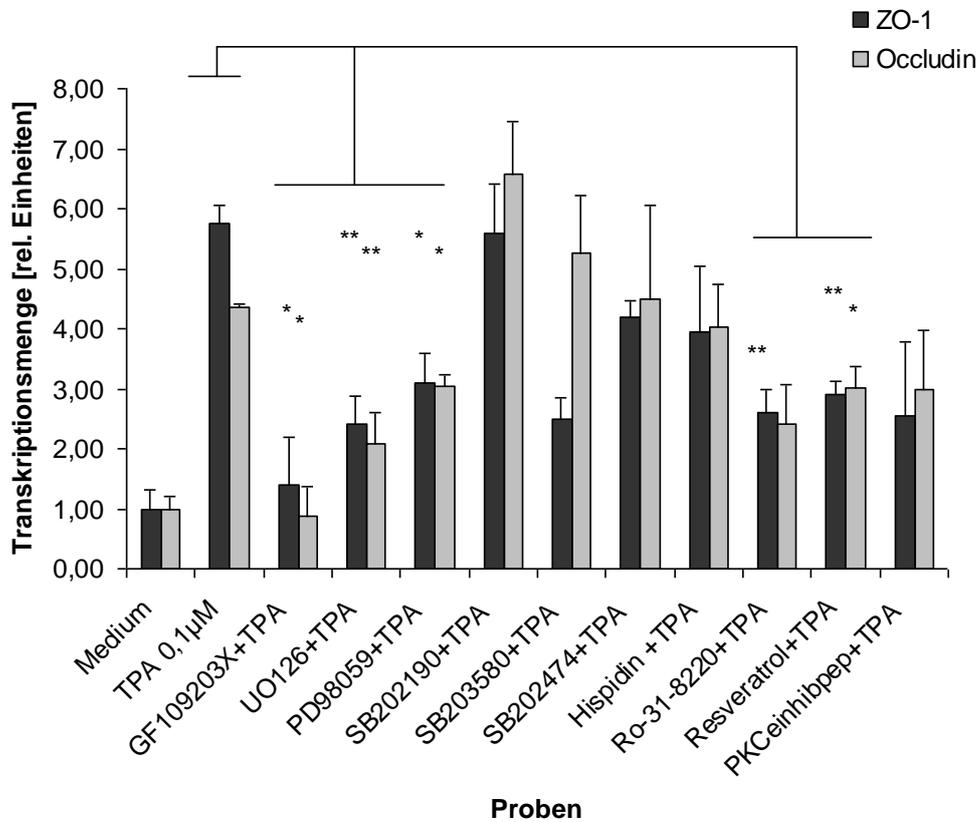


Abbildung 3.1.5: Semiquantitative Bestimmung der ZO-1-/Occludin-Transkriptmengen durch real-time RT-PCR in Abhängigkeit des Phorbolesters TPA bzw. TPA und Inhibitoren. Kultivierte T84 Zellen wurden mit TPA (0,1 µM) bzw. mit 24 h mit TPA (0,1 µM) plus Inhibitor (GF109203X: 0,5µM; U0126, PD 98059, SB202190, SB203580, SB202747: 10µM; Hispidin: 100µM; RO-31-8220: 0,1µM; Resveratrol: 0,1 mM; PKCεInhibitorpeptid: 150µg/ml) apikal und basolateral über 24h inkubiert. Auswertung der erhaltenen Werte unter der Berücksichtigung von GAPDH als Housekeeper. Die Experimente wurden in 3-facher Ausführung durchgeführt und auf Medienwerte bezogen. Die Signifikanzen beziehen sich auf den Wert der alleinigen Inkubation mit TPA (*: p<0,05;** p<0,01).

Die Verwendung von GF109203X, U0126 und PD98059 mit TPA zusammen führte bei der Messung des TER zu signifikant höheren Werten als bei der Inkubation mit TPA alleine. Die Werte lagen im Bereich der Kontrollwerte der nur mit Medium behandelten Zellen. Bei der Auswertung der real-time RT-PCR waren die Transkriptmengen bei GF109203X, U0126 und PD98059 mit TPA signifikant kleiner als bei Induktion nur durch TPA. Um eine Eigenwirkung von diesen drei Inhibitoren zu untersuchen, wurden Experimente ohne Zugabe von TPA durchgeführt.

Bestimmung des TER nach Zugabe von Inhibitoren

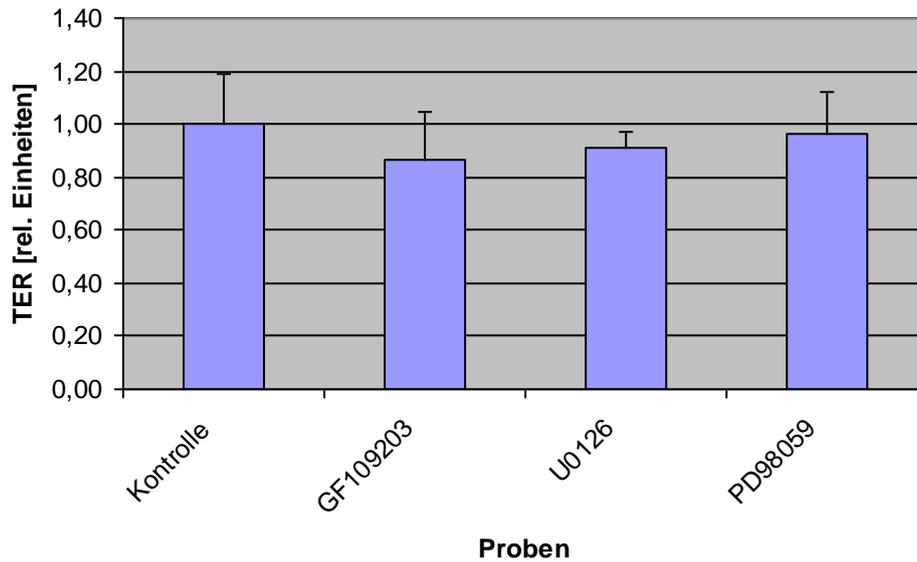


Abbildung 3.1.6: Messung des transepithelialen Widerstandes unter Zugabe von Zellkaskadeninhibitoren. T84 wurden bis zur Konfluenz auf Inserts kultiviert und 24h jeweils mit den Inhibitoren GF109203X (0,5 μ M), U0126 und PD 98059 (jeweils 10 μ M) apikal und basolateral inkubiert. Die Experimente wurden in 3-facher Ausführung durchgeführt und auf Kontrollwerte bezogen.

Modulation der ZO-1-/Occludin-Expression durch Inhibitoren

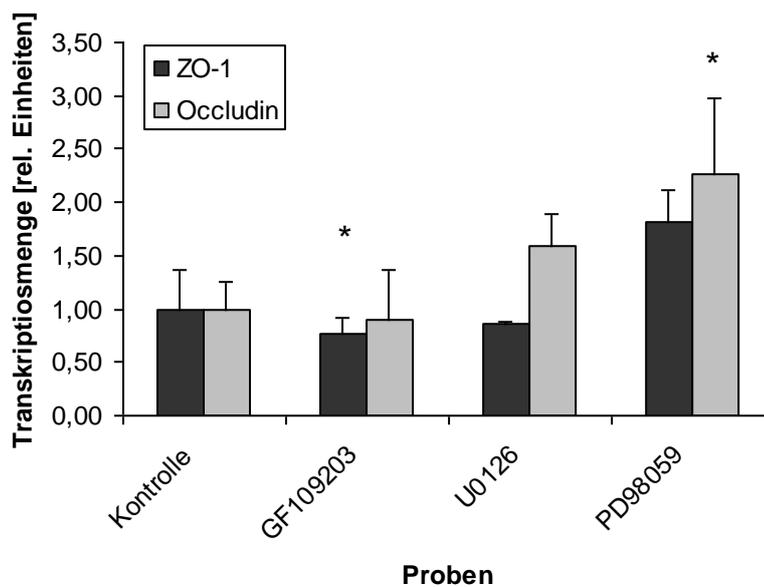


Abbildung 3.1.7: Semiquantitative Bestimmung der ZO-1-/Occludin-Transkriptmenge durch real-time RT-PCR in Abhängigkeit von Inhibitoren. Kultivierte T84 Zellen wurden apikal und basolateral über 24h

mit den Inhibitoren GF109203X (0,5 μ M), U0126 und PD98059 (jeweils 10 μ M) inkubiert. Auswertung der erhaltenen Werte unter der Berücksichtigung von GAPDH als Housekeeper. Die Experimente wurden in 3-facher Ausführung durchgeführt und auf Medienkontrollwerte bezogen. Die Induktion von Occludin durch PD98059 war signifikant erhöht, die ZO-1 Transkriptionsrate durch GF109203X signifikant erniedrigt mit *: $p < 0,05$.

Bei diesen Experimenten wurde der TER durch die Inkubation der Inhibitoren GF109203X, U0126 und PD98059 alleine nicht beeinflusst (Abb. 3.1.6). Bei der Auswertung der Modulation der Transkriptionsmenge von ZO-1 und Occludin zeigte sich, dass U0126 keinen Einfluss auf die Experimente hatte, jedoch der Inhibitor PD98059 zu einer signifikanten Erhöhung der Transkriptionsmenge von Occludin führte und GF103209X die Induktion von ZO-1 verminderte (Abb. 3.1.7).

In der Immunfluoreszenz der Experimente mit TPA und Inhibitoren zeigte sich bei der Inkubation mit GF109203X und bei der Kombination von U0126 mit TPA ein unauffälliges Bild. Allerdings war in den Kombinationen GF109203X mit TPA und PD98059 mit TPA eine deutliche morphologische Veränderung im Sinne einer Fältelung der Tight Junctions zu sehen, ohne Dislokation der angefärbten Proteine (Abb. 3.1.8).

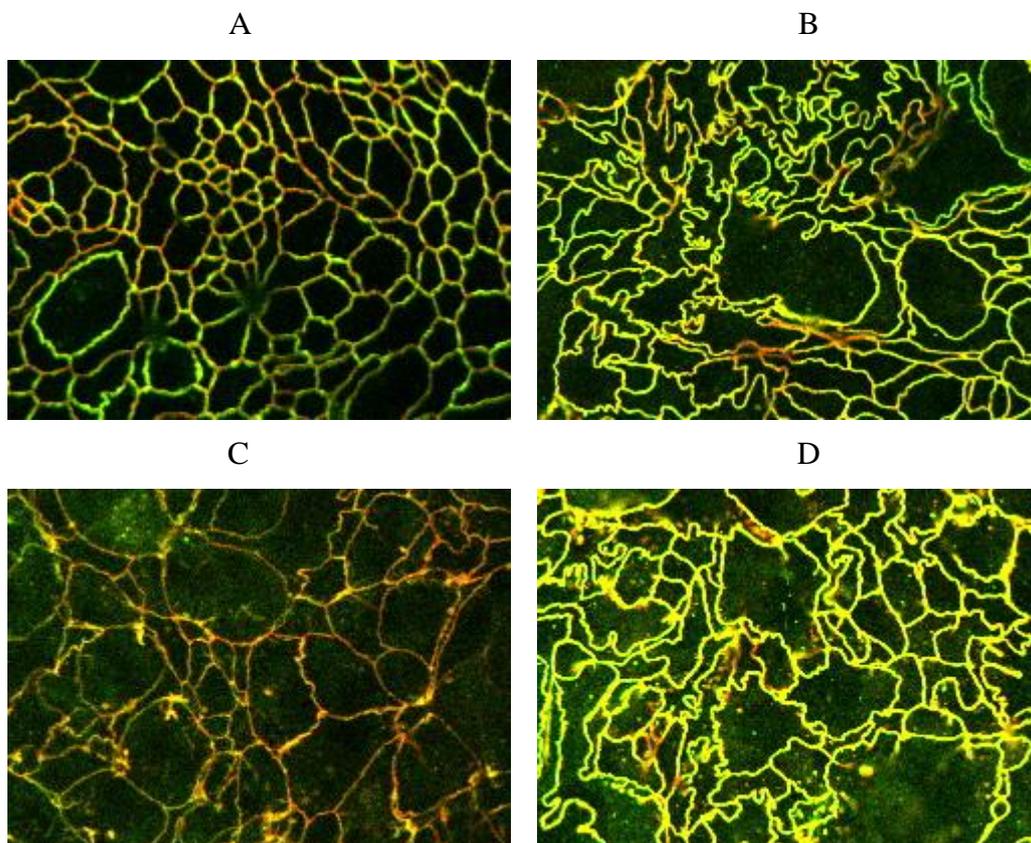


Abbildung 3.1.8: Darstellung der TJ Proteine ZO-1 (Cy3) und Occludin (FITC) in einer doppelten Immunfluoreszenzfärbung im konfokalen Mikroskop, bei der kultivierte T84 jeweils über 24h inkubiert wurden mit (A) GF109203X (0,5µM), (B) GF109203X (0,5µM)+TPA (0,1 µM), (C) U0126 (10µM)+ TPA (0,1 µM) und (D) PD98059 (10µM)+TPA (0,1 µM). Die Bilder zeigen eine übereinandergelegte Darstellung der beiden Filterbilder des identischen Gewebssausschnittes. Der Inhibitor GF109203X alleine und die Kombination aus U0126+TPA liefern ein Bild ähnlich Kontrollfärbungen s. Abb.4 A. Unter den Kombinationen GF109203X+TPA und PD98059+TPA zeigen die gefärbten Proteine starke Fältelung.

Zusammengefasst wirken der Inhibitor Ro-31-8220 und Resveratrol partiell hemmend auf die Enzymaktivierung durch den Phorbolster TPA, dies könnte auf eine Fortleitung der Signalkaskade über MAPK JNK oder über ERK1/2 hinweisen. Die Zugabe von SB202190 bzw. SB203580 zu TPA zeigte keine Wirkung auf TER und TPA assoziierte Transkriptionsänderung, so dass eine Signaltransduktion über p38 MAP ausgeschlossen werden kann (siehe auch Übersichtsschema Abb. 1.3.). Der Inhibitor GF109203X wirkt antagonistisch auf die Stimulation durch TPA, was eine Beteiligung der gehemmten PKC Isoenzyme an der Signalkaskade nahe legt. Dies zeigt bestätigend der Einzelversuch mit GF109203X, bei dem es durch die gehemmten Isoenzyme zu einer Induktionsverminderung bei ZO-1 kommt (Abb. 3.1.5 und 3.1.7). Auch unter Inkubation mit den Inhibitoren U0126 (MEK2-Inhibitor) und PD98059 (MEK1/2-Inhibitor) mit TPA kommt es zu einem Ausgleich des TPA Effekts, was zusammengefasst mit den Einzelinkubationen auf eine MEK1/MEK2 Transduktion hinweist. Dies kann aber nicht der einzige Weg der Signaltransduktion sein (Abb. 3.1.5 und 3.1.7).

Die morphologische Veränderung der Zell-Zell Kontaktflächen in der Immunfluoreszenz ist auffällig, jedoch ist der zugrunde liegende Mechanismus nicht durch die Ergebnisse erklärbar.

3.2 Wirkung bakteriell pathogener Komponenten auf die Expression von ZO-1 / Occludin und Funktionalität von Tight Junctions

Zur Untersuchung der Wirkung bakteriell pathogener Komponenten wurden T84 mit oberflächlichen bakteriellen Antigenen wie Lipopolysacchariden (LPS) und Lipoteichonsäuren (LTA) sowie mit bakterieller DNA inkubiert, die zum Beispiel beim Zerfall von Bakterien frei werden können und deren Signaltransduktion über Aktivierung von sogenannten Toll-Like Receptors, Bestandteilen des angeborenen Immunsystems, erfolgt.

Es wurden LPS von *Salmonella typhimurium*, LTA jeweils von *Streptococcus faecalis* und von *Staphylococcus aureus* (alle 10µg/ml) und DNA von *Echerichia coli* (50µg/ml) verwendet. Bei der Inkubation mit LPS *S.typhimurium* wurde weder TER (Abb. 3.2.1) noch Transkriptmenge signifikant verändert, allerdings wurde nach 6h eine stark gehobene Transkriptmenge sichtbar, deren Anstieg sich nach 24h zum Teil relativierte (Abb. 3.2.2). Bei den Experimenten mit LTA *Str.faecalis*, LTA *S.aureus* und DNA isoliert aus *E.coli* kam es nach 6h zu einem partiellen Verlust des TER, gleichzeitig waren bei LTA *Str.faecalis* und LTA *S.aureus* die Transkriptionsmengen sowohl für ZO-1 wie auch für Occludin erhöht. Die Transkriptmenge von ZO-1/Occludin blieb bei Inkubation mit aus *E.coli* isolierter bakterieller DNA über 6h unverändert. Der TER lag auch nach Inkubation über 24h mit LTA *Str.faecalis* und DNA *E.coli* weiterhin signifikant unter den Kontrollwerten, bei LTA *S.aureus* stieg der Wert zurück in den Kontrollwertebereich (Abb. 3.2.1). Zeitgleich verminderte sich nach 24h der transkriptionsinduzierende Effekt von LTA *Str.faecalis* und LTA *S.aureus* (Abb. 3.2.2).

Messung des TER unter Einwirkung bakterieller Komponenten

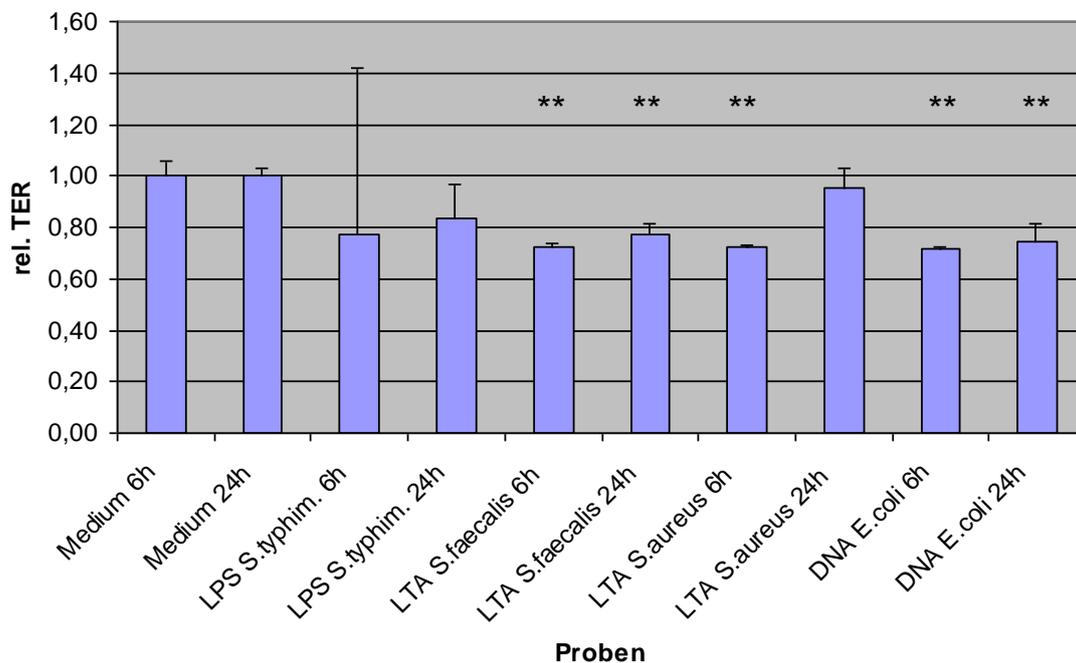


Abbildung 3.2.1: Messung des transepithelialen Widerstandes unter Zugabe von bakteriellen pathogenen Komponenten. T84 wurden bis zur Konfluenz auf Inserts kultiviert und 6 bzw. 24h jeweils mit LPS *S.typhimurium*, LTA *Str. faecalis*, LTA *S.aureus* (jeweils 10µg/ml) und DNA *E.coli* (50µg/ml) apikal und basolateral inkubiert. Die Experimente wurden in 3-facher Ausführung durchgeführt und auf zeitgleich bearbeitete Kontrollwerte bezogen. LTA *Str. faecalis* und DNA *E.coli* bei 6 und 24h und LTA *S.aureus* bei 6h zeigten eine signifikante Abnahme des TER (**: p<0,01).

Modulation der ZO-1-/Occludin-Expression durch bakterielle Komponenten

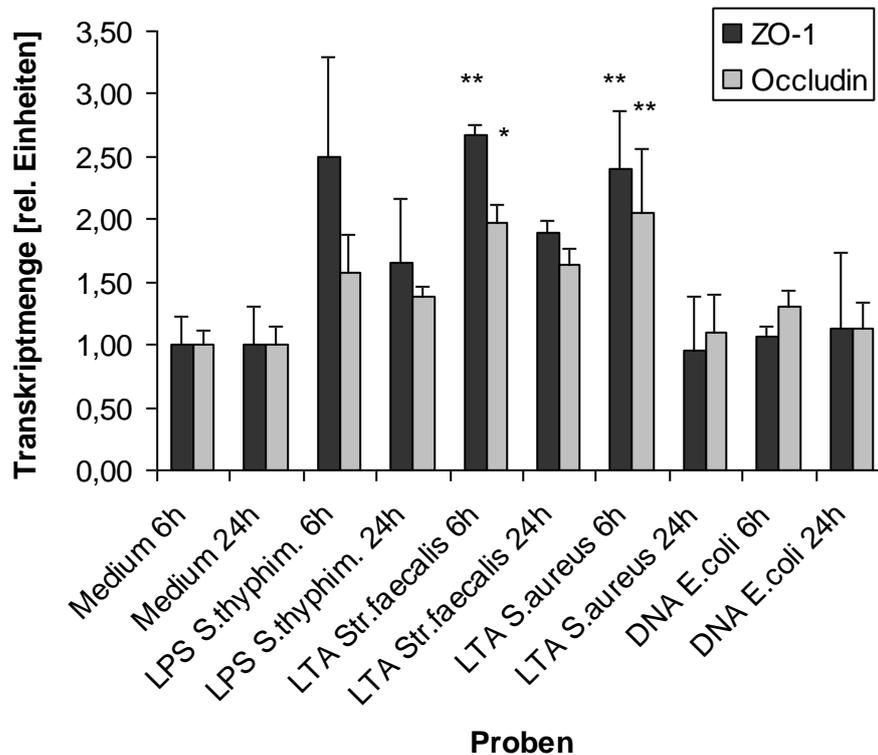
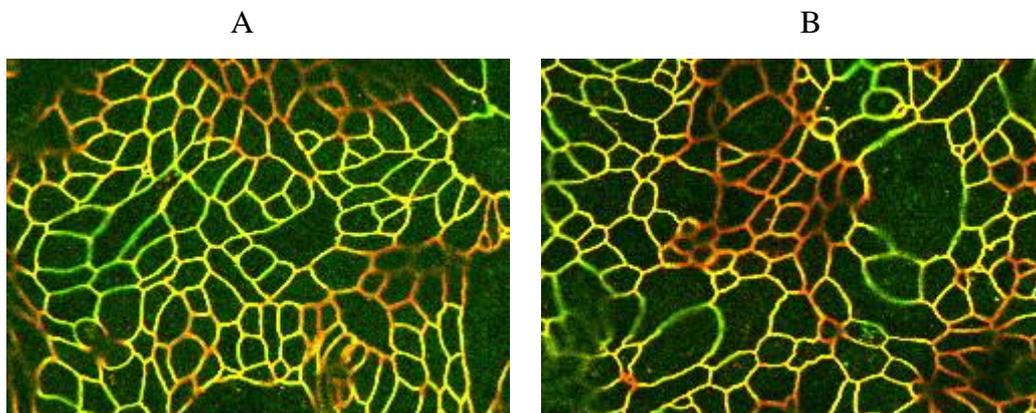


Abbildung 3.2.2: Semiquantitative Bestimmung der ZO-1-/Occludin-Transkriptmenge durch real-time RT-PCR in Abhängigkeit von bakteriellen pathogenen Komponenten. Kultivierte T84 Zellen wurden apikal und basolateral über 6 bzw. 24h jeweils mit LPS *S.typhimurium*, LTA *Str. faecalis*, LTA *S.aureus* (jeweils 10µg/ml) und DNA *E.coli* (50µg/ml) inkubiert. Auswertung der erhaltenen Werte unter der Berücksichtigung von GAPDH als Housekeeper. Die Experimente wurden in 3-facher Ausführung durchgeführt und auf Medienkontrollwerte bezogen. Bei LTA *Str.faecalis* und LTA *S.aureus* zeigten sich nach 6h ein signifikanter Anstieg beider Transkriptionsmengen (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).



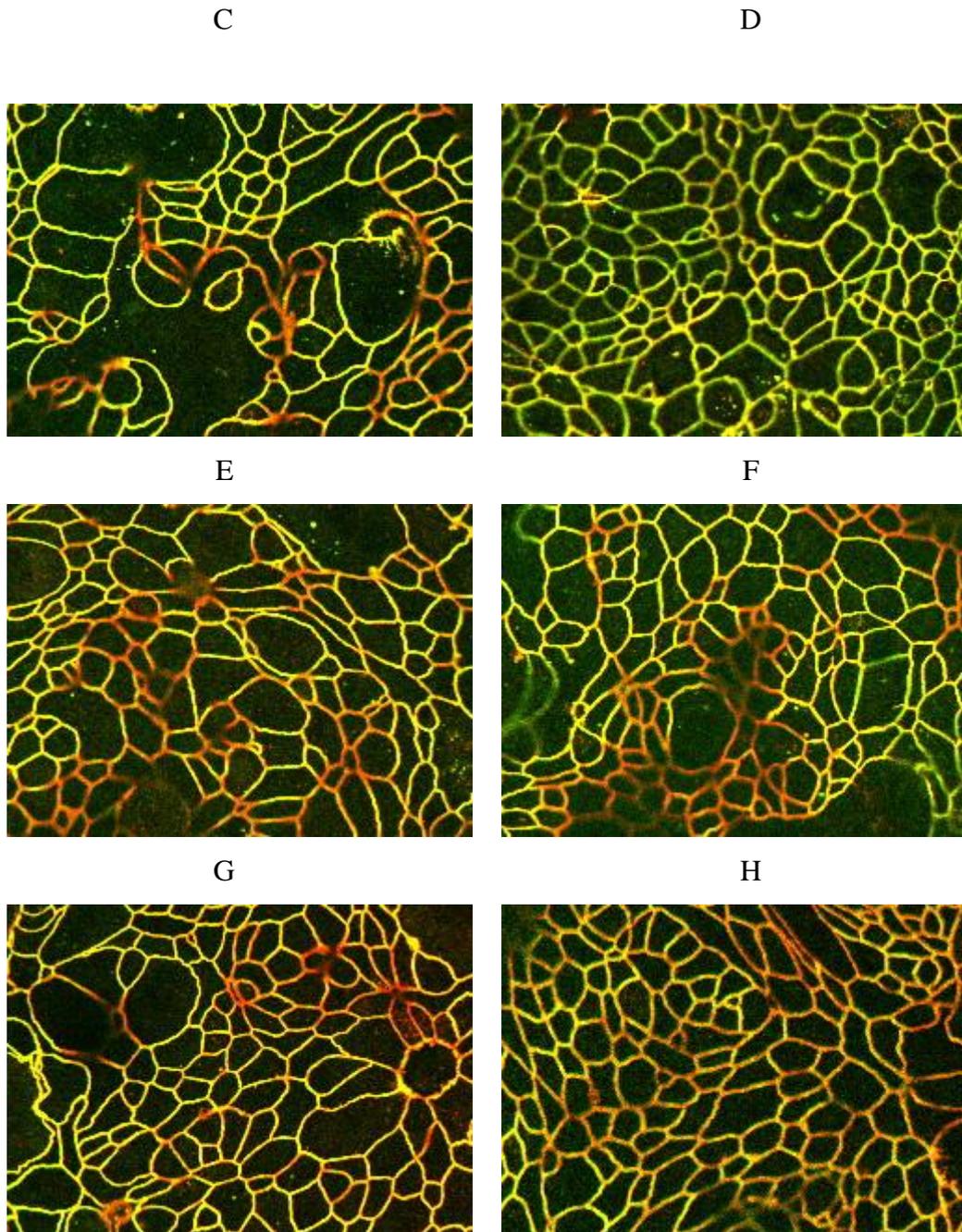


Abbildung 3.2.3: Darstellung der TJ Proteine ZO-1 (Cy3) und Occludin (FITC) in einer doppelten Immunfluoreszenzfärbung im konfokalen Mikroskop, bei der kultivierte T84 jeweils über 6 bzw. 24h inkubiert wurden mit LPS *S.thyphimurium* (10µg/ml) (A)6h, (B)24h, LTA *Str.faecalis* (10µg/ml) (C)6h, (D)24h, LTA *S.aureus* (10µg/ml) (E)6h, (F)24h und DNA *E.coli* (50µg/ml) (G)6h, (H)24h. Die Bilder zeigen eine übereinandergelegte Darstellung der beiden Filterbilder des identischen Gewebsausschnittes.

Die einzelnen Experimente zeigten sich in der Immunfluoreszenz eher unauffällig (Abb. 3.2.3).

Zusammenfassend wurde bei den Experimenten mit oberflächlichen Antigenen (LPS, LTA) eine tendenzielle oder signifikante Induktion der Transkriptmenge nach 6h

sichtbar. Dieser Effekt war nach 24h rückläufig. Eine Dislokation der Proteine ZO-1 und Occludin konnte in der Immunfluoreszenz nicht beobachtet werden und damit keinen direkten Anhalt für die Verminderung des TER liefern.

Die Abnahme des TER kann, muss aber nicht zu einer direkten Induktion der Transkriptionsrate führen; beide Effekte können aber auch auf die direkte Wirkung der zugesetzten Agenzien zurückzuführen sein.

3.3 Wirkung der inflammatorischen Cytokine TNF α und IFN γ

Zur Untersuchung der Wirkung inflammatorischer Cytokine auf TJ wurden TNF α (10ng/ml) und IFN γ (100U/ml) in den Experimenten eingesetzt. Diese wurden einzeln oder in Kombination verwendet und über 24h bzw. 72h den kultivierten Zellen beigefügt.

Messung des TER bei Inkubation mit TNF α /IFN γ 24h/72h

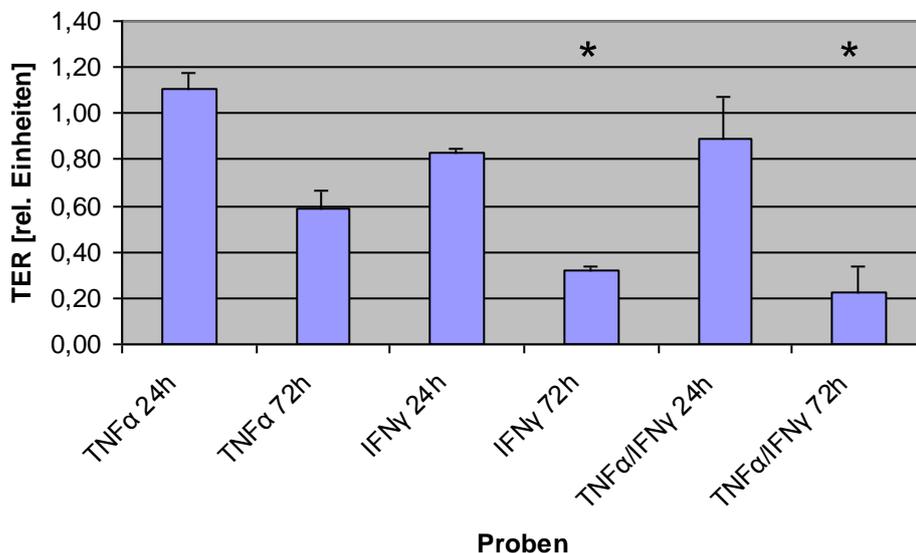


Abbildung 3.3.1: Veränderung des transepithelialen Widerstandes durch TNF α und IFN γ . T84 wurden bis zur Konfluenz auf Inserts kultiviert und 24 bzw. 72h mit TNF α (10ng/ml) und IFN γ (100 U/ml) apikal und basolateral inkubiert. Die Experimente wurden in 3-facher Ausführung durchgeführt und auf Medienwerte zeitgleich bearbeiteter Kontrollen bezogen. IFN γ führt alleine und in Kombination mit TNF α zu einem signifikanten Verlust des TER (*:p<0,05).

Bei der Messung des TER (Abb. 3.3.1) kam es bei allen 72h Experimenten zu einer Abnahme des Widerstandes im Vergleich zur Kontrollgruppe, bei $\text{IFN}\gamma$ und in der Kombination $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$ war diese signifikant ($p < 0,05$). In der real-time RT-PCR zeigte $\text{TNF}\alpha$ alleine keine Wirkung auf die Transkriptionsmenge von ZO-1 und Occludin. Der Transkriptlevel von ZO-1/Occludin unter $\text{IFN}\gamma$ stieg bereits nach 24h und erhöhte sich geringfügig nach 72h. In der Kombination beider Cytokine kam es nach 24h zu einem Anstieg, der sich bis 72h tendenziell fortsetzte (Abb. 3.3.2).

Modulation der ZO-1-/Occludin-Expression durch inflammatorische Cytokine

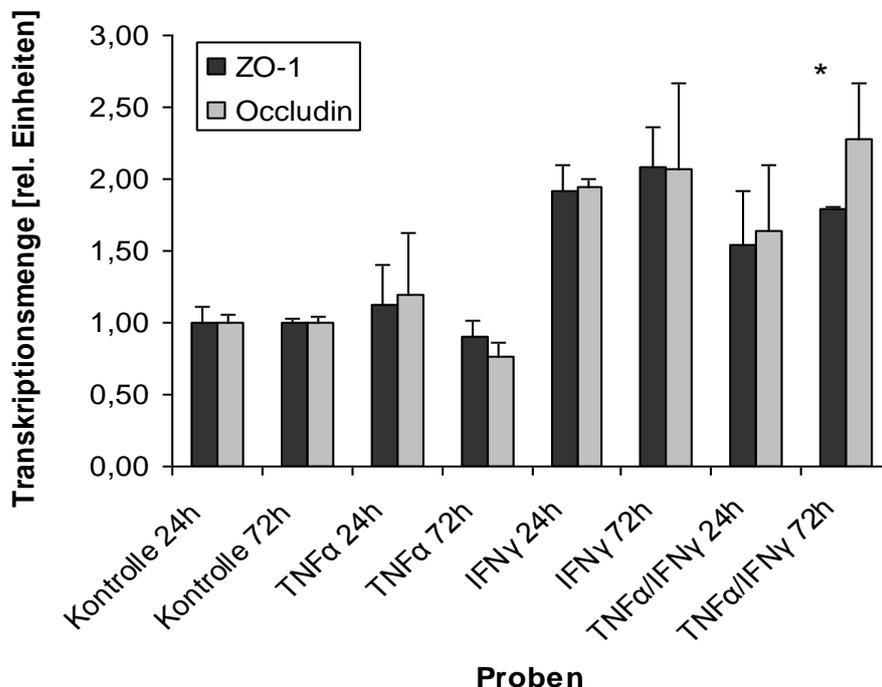


Abbildung 3.3.2: Semiquantitative Bestimmung der ZO-1-/Occludin-Transkriptmenge durch real-time RT-PCR in Abhängigkeit von $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$. T84 Zellen wurden über 24 bzw. 72h mit $\text{TNF}\alpha$ (10ng/ml) und $\text{IFN}\gamma$ (100 U/ml) apikal und basolateral inkubiert. Auswertung der erhaltenen Werte unter der Berücksichtigung von GAPDH als Housekeeper. Die Experimente wurden in 3-facher Ausführung durchgeführt und auf Medienwerte zeitgleich bearbeiteter Kontrollen bezogen. Die Induktion von ZO-1 durch $\text{TNF}\alpha/\text{IFN}\gamma$ 72h war signifikant erhöht mit *: $p < 0,05$. Bei den Experimenten mit $\text{IFN}\gamma$ in Kombination oder alleine waren die Werte nicht signifikant, aber hatten eine deutliche Tendenz.

Bei der Auswertung der Immunfluoreszenz konnte nach Behandlung mit $\text{IFN}\gamma$ über 72h eine starke Dislokation der Proteine ZO-1 und Occludin beobachtet werden. In der Kombination beider Cytokine kam es zu einem undeutlichen Bild der TJ mit diffuser Verteilung der Proteine (Abb. 3.3.3).

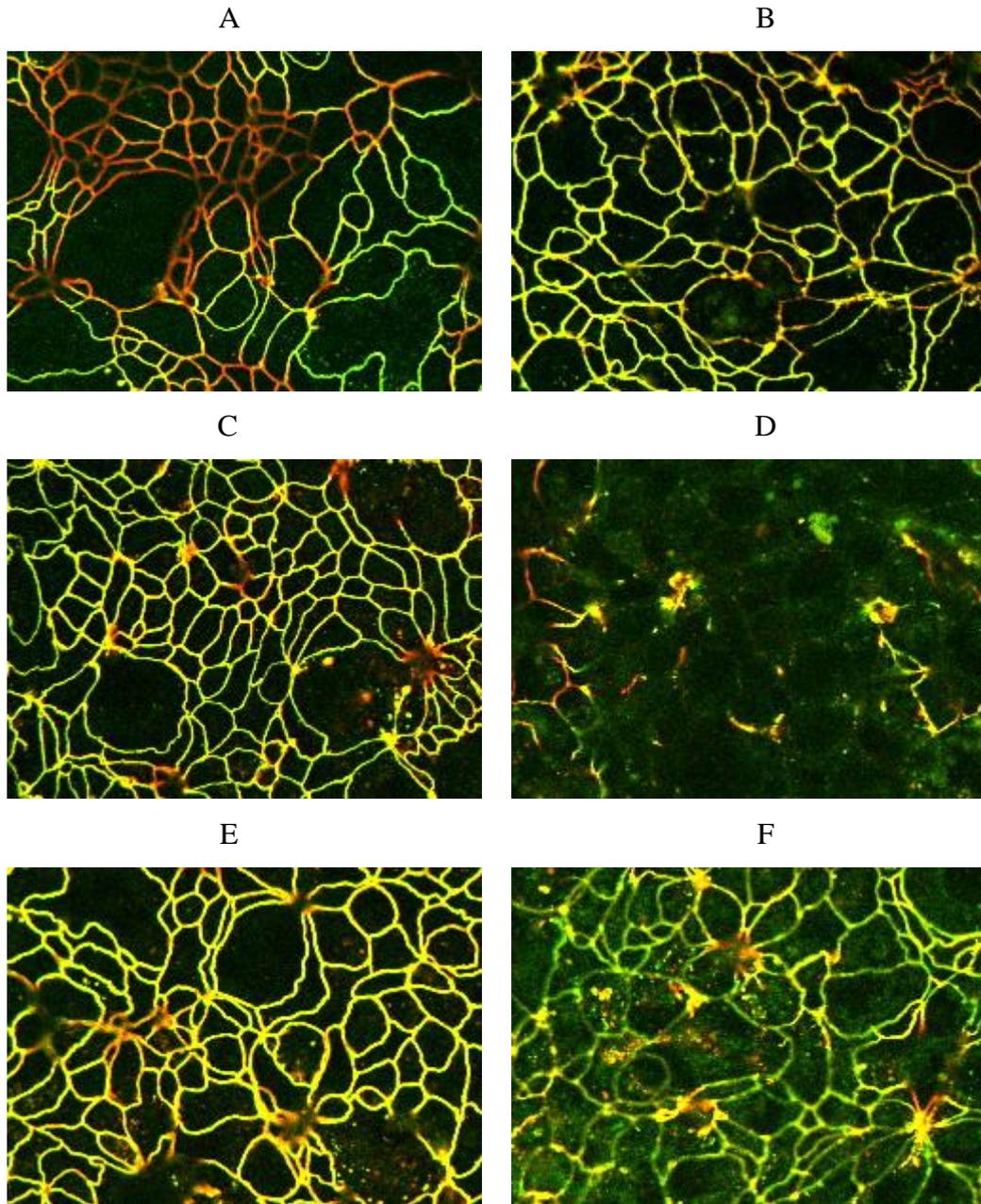


Abbildung 3.3.3: Darstellung der TJ Proteine ZO-1 (Cy3) und Occludin (FITC) in einer doppelten Immunfluoreszenzfärbung im konfokalen Mikroskop, bei der T84 jeweils über 24 bzw. 72h mit TNF α (10ng/ml) (A)24h, (B)72h und IFN γ (100 U/ml) (C)24h, (D)72h bzw. der Kombination TNF α + IFN γ (10ng/ml/100 U/ml) (E)24h, (F)72h inkubiert wurden. Die Bilder zeigen eine übereinandergelegte Darstellung der beiden Filterbilder des identischen Gewebsausschnittes. Unter TNF α ist nach 72h eine gewisse optische Ausdünnung der TJ zu erkennen. Bei IFN γ kommt es nach 72h zu einer starken Dislokation der Proteine, bei der Kombinationsbehandlung ist nach 72h auch deutlich eine Veränderung mit partieller Dislokation zu erkennen.

Zusammengefasst haben die Cytokine einen Effekt auf die TJ, vor allem IFN führt zu einer Zerstörung der Funktionalität und des Aufbaus der TJ, wobei es im Inneren der Zellen zu einer Induktion der Transkription der Gene von ZO-1 und Occludin kommt.

3.4 Einfluss von entzündungshemmendem Hydrocortison

Um eine Wirkung von entzündungshemmendem und proteinkatabolem Hydrocortison auf die TJ zu untersuchen, wurden Experimente mit Inkubation von Hydrocortison (500nM und 1µM) über 24, 72 und 144h durchgeführt.

**Messung des TER bei der Inkubation mit Hydrocortison
500nM/1µM über 24, 72 und 144h**

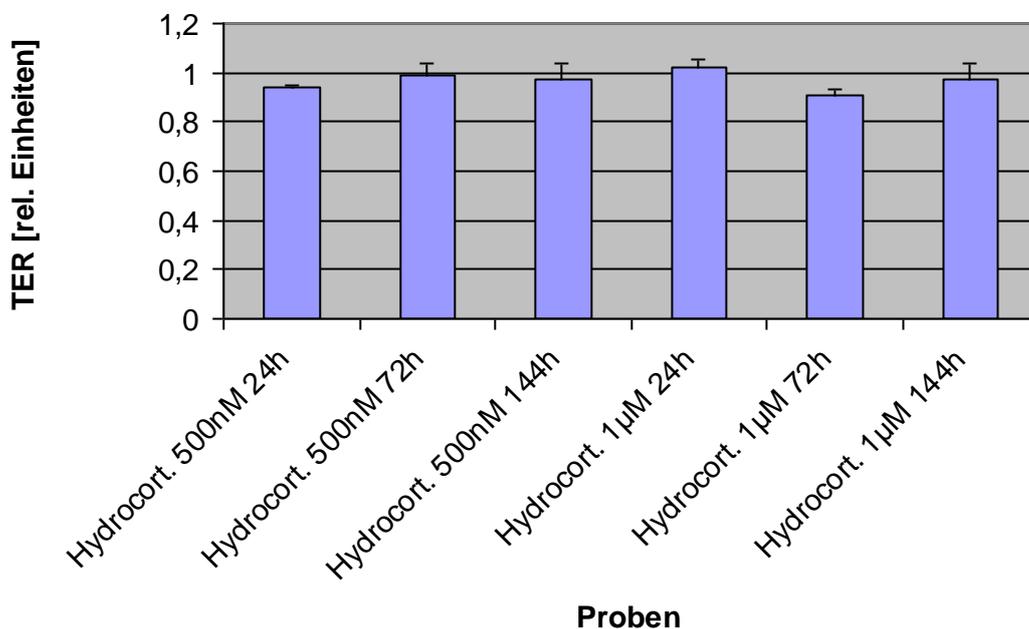


Abbildung 3.4.1: Veränderung des transepithelialen Widerstandes unter der Einwirkung von Hydrocortison. T84 wurden bis zur Konfluenz auf Inserts kultiviert und 24, 72 bzw. 144h mit Hydrocortison in den Konzentrationen 500nM und 1µM apikal und basolateral inkubiert. Die Experimente wurden in 3-facher Ausführung durchgeführt und auf Medienwerte zeitgleich bearbeiteter Kontrollen bezogen. Der TER bleibt unbeeinflusst durch Hydrocortison.

Die Experimente zeigten, dass Hydrocortison auch nach einer Inkubation über 144h keine Änderung des TER bewirkte (Abb. 3.4.1).

Modulation der ZO-1-/Occludin-Expression durch Hydrocortison

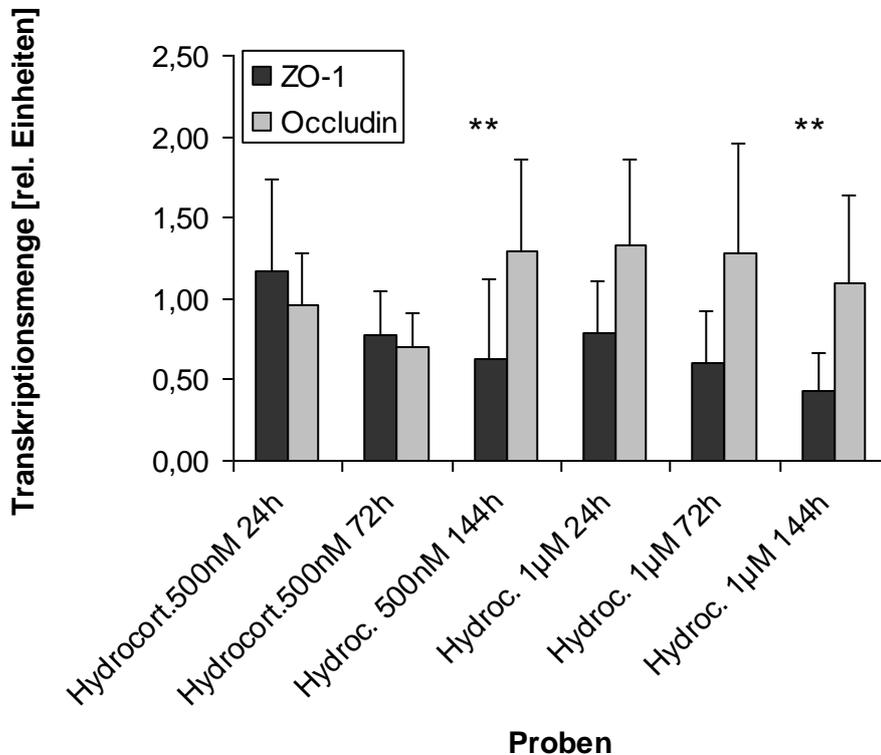


Abbildung 3.4.2: Semiquantitative Bestimmung der ZO-1-/Occludin-Transkriptmenge durch real-time RT-PCR unter der Einwirkung von Hydrocortison. T84 Zellen wurden über 24, 72 bzw. 144h mit Hydrocortison (500nM, 1µM) inkubiert. Auswertung der erhaltenen Werte unter der Berücksichtigung von GAPDH als Housekeeper. Die Experimente wurden in 3-facher Ausführung durchgeführt und auf Medienwerte zeitgleich bearbeiteter Kontrollen bezogen. Nach 144h kommt es bei beiden Konzentrationen zu einer signifikanten Reduktion der ZO-1 Transkriptionsmenge mit **: $p < 0,01$.

In der Auswertung der real-time RT-PCR (Abb. 3.4.2) wurde eine progressive Abnahme der Transkriptmengen von ZO-1 über die Zeit sichtbar. Eine signifikant kleinere Transkriptmenge von ZO-1 konnte bei beiden Konzentrationen von Hydrocortison (jeweils $p < 0,01$) nach 144h nachgewiesen werden. Die Transkriptionsmenge von Occludin blieb durch Hydrocortison unbeeinflusst.

Hydrocortison wirkt somit in Abhängigkeit der Einwirkzeit auf ZO-1, nicht aber auf Occludin bei unbeeinflusstem TER.

In dieser Untersuchung zeigte sich, dass ZO-1 und Occludin nicht zwangsläufig in die gleiche Richtung reguliert werden müssen. Es müssen daher unterschiedliche Wege der Regulation der Transkription beider Proteine existieren. Weiterhin wird deutlich, dass

ein Abfall an Transkriptionsmenge nicht unweigerlich mit einer Veränderung im TER einhergehen muss. Transkription und Funktion sind somit nicht zwangsläufig gekoppelt.

3.5 Einfluss durch Temperaturerhöhung

In diesem Versuch wurde Fieber für die Zellen simuliert, indem diese über 48h bei 42°C/5%CO₂ behandelt wurden.

Die Fieberbehandlung zeigte eine starke Wirkung auf den TER (Abb. 3.5.1). Jedoch zeigte die Auswertung der real-time RT-PCR, dass die Transkriptmenge von ZO-1 kaum durch die Fiebersimulation beeinträchtigt wurde (Abb. 3.5.2).

Messung des TER im Fieberversuch

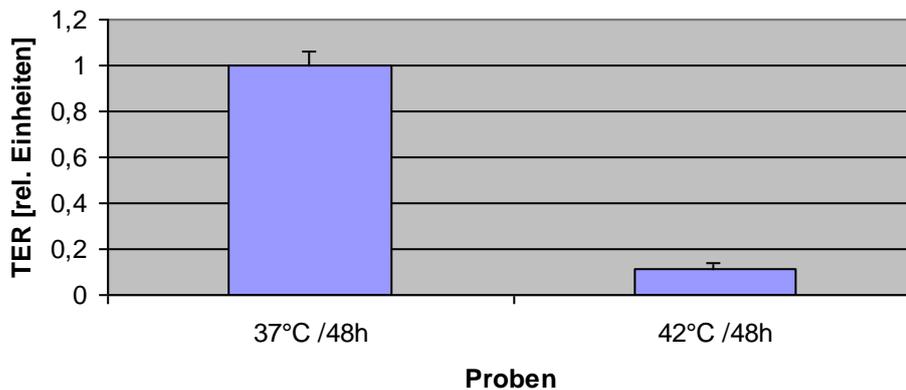


Abbildung 3.5.1: Veränderung des transepithelialen Widerstandes durch Fiebersimulation. T84 wurden bis zur Konfluenz auf Inserts kultiviert und danach über 48h bei 42°C/5%CO₂ weiterbehandelt. Die Experimente wurden in 3-facher Ausführung durchgeführt und auf zeitgleich bearbeitete Kontrollen (37°C/5%CO₂) bezogen.

Modulation der ZO-1-Expression unter Fieber

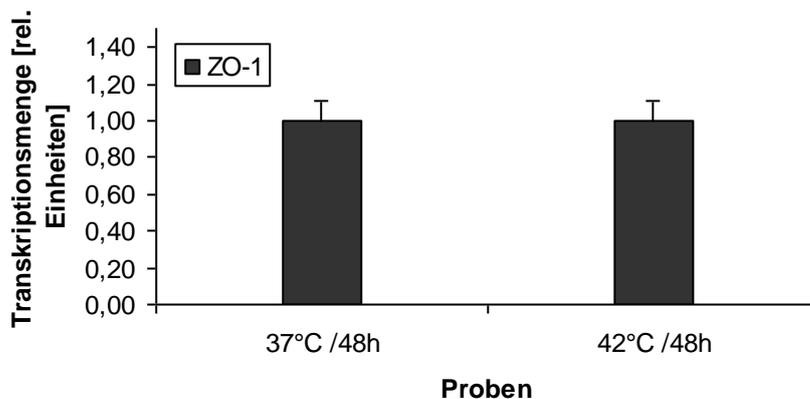


Abbildung 3.5.2: Semiquantitative Bestimmung der ZO-1-Transkriptmenge durch real-time RT-PCR im Fieberversuch. Kultivierte T84 Zellen wurden über 48h bei 42°C/5%CO₂ inkubiert. Auswertung der erhaltenen Werte unter der Berücksichtigung von GAPDH als Housekeeper. Die Experimente wurden in 3-facher Ausführung durchgeführt und auf die zeitgleich bearbeiteten Kontrollen (37°C/5%CO₂) bezogen.

In der Immunfluoreszenz wurde nach Fieberbehandlung eine Ausdünnung der TJ mit zusätzlich diffuser Verteilung der untersuchten Proteine ZO-1 und Occludin sichtbar (Abb. 3.5.3).

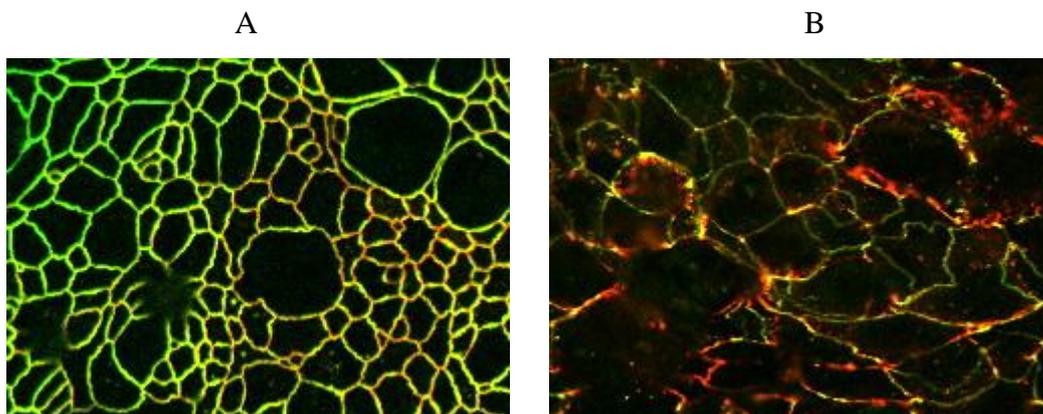


Abbildung 3.5.3: Darstellung der TJ Proteine ZO-1 (Cy3) und Occludin (FITC) in einer doppelten Immunfluoreszenzfärbung im konfokalen Mikroskop, bei der kultivierte T84 jeweils über 48h bei (A) 37°C/5%CO₂ und (B) bei 42°C/5%CO₂ inkubiert wurden. Die Bilder zeigen eine übereinandergelegte Darstellung der beiden Filterbilder des identischen Gewebsausschnittes. Unter Fieberbedingungen kommt es zu dislozierter, dünnerer Darstellung der TJ, wobei eine gewisse Struktur noch erkennbar ist.

Dieses Experiment deutet darauf hin, dass es unter Fieber zu einer Auflösung der Barrierefunktion der TJ kommt. Dies kann durch direkte Einwirkung des Fiebers oder durch einen stärkeren Zelluntergang aufgrund der Temperatur zurückzuführen sein. Da die Transkriptrate annähernd mediumgleich blieb, bedeutet dies entweder keine Induktion durch Fieber bei erhaltenen Zellen, oder, bei vermehrter Apoptose, eine Induktion. Die Immunfluoreszenz zeigte jedoch eher das Bild erhaltener Zellen mit zum Teil verdünnten TJ und diffus verteilten Proteinen.

4. Diskussion

Die Untersuchung von Expression und Funktionalität der Tight Junctions und ihrer Bestandteile ist von großem wissenschaftlichen Interesse, da sie als Zell-Zell-Verbindung eine Barriere selektiver Passierbarkeit bilden und somit entscheidend an der Bildung verschiedener Kompartimente beteiligt sind und der Verlust dieser Barriere schließlich zu Krankheiten führen kann (65, 66).

In der vorliegenden Arbeit wurde unter Verwendung von Taqman®Sonden für ZO-1 und Occludin eine real-time RT-PCR etabliert, die die Messung von relativen Transkriptmengen bei Verwendung von Mediumkontrollen als Referenz erlaubt. Mit dieser Methode und unterschiedlichen Experimenten konnte partiell die Signalkaskade zur Regulation der TJ aufgeklärt werden. Die Auswertung der Experimente der Modulation der TJ durch endogene und exogene Faktoren lieferte Ergebnisse, die zum Verständnis pathophysiologischer Veränderungen beitragen.

Neben der Untersuchungen durch real-time RT-PCR wurde zur Messung von Expression und Funktionalität die Bestimmung des transepithelialen Widerstandes (TER) und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Die TER-Messung diente zur Beurteilung der Funktionalität, d.h. der Dichtheit der TJ und in gewisser Weise auch zur Beurteilung der relativen Anzahl der TJ-Verbindungen der Zellen untereinander. Der TER steigt logarithmisch mit der Anzahl funktionsfähiger Verbindungen (67, 68). Um zusätzlich noch einen optischen Eindruck der TJ zu bekommen, wurden die Proteine ZO-1 und Occludin mit fluoreszierenden Antikörpern angefärbt und im konfokalen Mikroskop betrachtet. Dabei war wichtig, bei der Färbung nicht die Struktur und die relative apikale bzw. basale Lokalisation zu verändern. Aus diesem Grund wurde mit Triton X-100 vor Fixation gearbeitet (16, 69). Der Schwerpunkt der Transkriptmengenbestimmung lag jedoch bei der Methode der real-time RT-PCR. Zurzeit gilt die RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) als eine der sensitivsten Methoden um mRNA zu detektieren. In dieser Arbeit wurde mit fluoreszenz-basierter real-time RT-PCR im Sinne eines Taqman Assays mit Hydrolyse der Sonden gearbeitet. Diese Methode hat im Gegensatz zur einfachen RT-PCR eine höhere Reproduzierbarkeit und einen signifikant niedrigeren Variationskoeffizienten (unter 2%) bei gleich hoher Sensitivität (70, 71). Nachteil der real-time RT-PCR: sie

misst mRNA, was bedeutet, dass eigentlich nur die Vorstufe der Proteine ZO-1 und Occludin quantifiziert wird und keine direkte Aussage zur Proteinaktivität getroffen werden kann (73); viel produzierte mRNA wird jedoch häufig mit viel resultierendem Protein gleichgesetzt. Einige Autoren sehen in GAPDH nur ein eingeschränkt gutes Housekeepinggen, da es unter Messung in verschiedenen Geweben zu starken Schwankungen führen kann. (72). Dieser Effekt wurde minimiert durch konsequentes Arbeiten ausschließlich mit der Zelllinie T84, welche aus einer pulmonalen Kolonkarzinommetastase gezüchtet wurde und als Monolayer wachsend Tight Junctions ausbildet. Abgesehen davon, wurde die Arbeit an einem In-Vitro-Modell durchgeführt, wobei durch Anzucht der T84 Zellen auf Inserts und die Inkubation jeweils bei 37°C/5%CO₂ eine Annäherung an In-Vivo-Bedingungen erreicht werden soll.

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit der Untersuchung der Wirkungsweise der Proteinkinase C auf ZO-1 und Occludin. Dafür wurde zunächst mit dem Phorbolster TPA gearbeitet. TPA gilt als ein funktionelles Homolog zu DAG, einem second Messenger in rezeptorvermittelten Signalkaskaden. DAG ist an vielen zellulären Prozessen beteiligt, wie z.B. der Ausbildung der epithelialen Barriere der Lunge (74). In der vorliegenden Arbeit führte TPA zu einem Anstieg der Transkriptmenge von ZO-1 und Occludin, die bereits nach 2h signifikant war. Der Anstieg der Transkriptmenge von Occludin konnte durch Weiler et al. an mit dem Vector pPOccl-1 transfizierten T84, welcher ein Occludinpromotorstück vor einer eGFP codierenden Sequenz enthält, über einen Farbsignalanstieg durch eGFP und über eine FACS-Analyse bestätigt werden (131). Nach 3 bzw. 24h stieg die Transkriptmenge weiter an. Dieser Effekt lässt sich auf die Aktivierung von PKC-Isoenzymen zurückführen; betroffen sind dabei die konventionellen cPKC α , β I, β II, und γ und die neuen nPKC δ und ϵ , so dass der Signalweg über eines oder mehrere dieser Enzyme verlaufen kann. Die Induktion der Transkriptionsmengensteigerung wurde nicht durch einen Funktionsverlust der TJ ausgelöst, da der Anstieg vor einem Abfall des TER beobachtet wurde. Erst nach 24h kam es unter TPA zu einer signifikanten Abnahme der Funktionalität in der TER-Messung. Eine große Transkriptmenge garantiert jedoch nicht gleichzeitig intakte TJ. In der Immunfluoreszenz zeigte sich ein zunehmend diffuseres Bild der Proteine, welches nach 24h TPA zu einer kompletten Dislokation

fürhte. Dieses Ergebnis stimmt mit dem durch TER-Messung nachgewiesenen Funktionsverlust überein. Dieser Verlust der Barrierefunktion unter TPA konnte auch in epithelialen Zellen des Choroidplexus (75) oder in pulmonalen Epithelien (132) nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde beschrieben, dass eine fortgesetzte Aktivierung von PKC durch TPA über mehr als zwei Tage zu einer zunehmenden Erholung der TJ-Integrität führt, ohne weiteren Anstieg von Syntheseraten (76, 77). In der Arbeit von Mullin et al. konnte nach fünf Tagen in Nierenepithelzellen ein Wiederaufbau von etwa 75% der Barrierefunktion der TJ nachgewiesen werden, dieser Effekt wird auf eine PKC Degradierung durch Dauerstimulation zurückgeführt (78).

Die Untersuchung der Signaltransduktion zeigte, dass der Inhibitor Ro-31-8220 und Resveratrol partiell hemmend auf die Induktion durch TPA wirken; dies weist auf eine Fortleitung der Signalkaskade über MAPK JNK oder über ERK1/2 hin (42, 46). Wang et al. wiesen in humanen Corneazellen nach, dass es TPA-induziert über einen Signalweg über MAPK und ERK zu einer morphologischen Veränderung der TJ kommt (79). Dabei zeigte die Zugabe der Inhibitoren SB202190 und SB203580 zu TPA weder Wirkung auf den TER noch auf die TPA induzierte Transkriptionsänderung, so dass eine Signaltransduktion über p38 MAP ausgeschlossen werden kann. Beim Einsatz des Inhibitors GF109203X und TPA kam es zu einer Aufhebung der TPA-Wirkung bei TER und Transkriptionsinduktion, was eine Beteiligung der gehemmten PKC Isoenzyme an der Signalkaskade nahe legt. Bestätigend führt GF109203X auch alleine zu einer Abnahme der Transkriptionsmenge. Diese durch GF109203X allein herbeigeführte Abnahme beweist den Weg über die PKC, da ansonsten auch DAG (TPA) aktivierbare Signalwege unter Umgehung von PKC bekannt sind, diese aber hiermit ausgeschlossen werden können (80 - 82).

Der Signalweg zum Transkriptionslevel wird nur partiell über MEK übermittelt, mit Betonung über MEK2. Dies konnte durch Einsatz des MEK1/2 Inhibitors PD98059 und des MEK2 Inhibitors U0126 gezeigt werden. Beide führten zu einer signifikanten Antagonisierung des TPA Effektes, wobei es unter U0126 zu stärkeren Effekten kam. Bisher konnte ein hemmender und protektiver Effekt von PD98059 in MDCK Zellen gezeigt werden (83). Dies kann aber nicht der einzige Weg der Signaltransduktion sein, da es zu keiner kompletten Blockierung kommt. Die morphologische Fältelung unter

Koinkubation von TPA mit PD98059 und GF109203X in der Immunfluoreszenz bei erhaltenem TER und normal hoher Transkriptionsmenge ist auffällig, jedoch ist der zugrunde liegende Mechanismus nicht durch die Ergebnisse erklärbar.

Die Daten des ersten Teiles (Kapitel 3.1.-3.1.2) zeigen, dass an der Regulation der Lokalisation und Funktion und am Genexpressionslevel der TJ Proteine ZO-1 und Occludin unterschiedliche Prozesse beteiligt sind und dass sich diese Prozesse nur zum Teil überschneiden. In einer Arbeit über MDR1 (multi drug resistance) konnte gezeigt werden, dass TPA aktivierte PKC im Kern direkt zu einer Transkription von MDR1 führen kann (35). Eine andere Arbeit an der Froschblase beobachtete, dass auch die dynamische Barrierefunktion, die zu einer normalen Funktion notwendig ist, über PKC geregelt wird, da das Öffnen der TJ durch einen PKC Hemmstoff namens H7 komplett unterbunden werden konnte (84).

Im zweiten Teil der Arbeit (Kapitel 3.2-3.5) lag der Schwerpunkt in der Untersuchung reaktiver Veränderungen der TJ Proteine ZO-1 und Occludin auf endogene und exogene Noxen. Dafür wurden Experimente mit pathogenen bakteriellen Strukturen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass es unter Inkubation mit oberflächlichen Antigenen (LPS und LTA) zu einer tendenziellen, teilweise auch signifikanten Steigerung der Transkriptmenge nach 6h kam. Die Steigerung war nach 24h wieder rückläufig. Gleichzeitig wurde unter LTA Einwirkung ein Einbruch des TER nach 6h beobachtet, der nach 24h nur teilweise rückläufig war. Bei komplett unauffälliger Morphologie und Verteilung der Proteine in der Immunfluoreszenz spräche dies für einen Fehlzusammenbau am rechten Ort oder für ein Fehlen oder eine Fehlfunktion in anderen Komponenten der TJ. Diese Fehlfunktion zeigte sich auch in der Arbeit von Sheth et al., in der Lipopolysaccharide über Aktivierung von Toll-Like Receptor 4 über mehrerer Transduktionsschritte über NFκB zu einem Verlust der Funktionalität führten (129).

Die Untersuchung der Wirkung bakterieller Pathogene in Verbindung mit PKC zeigte bei Chen et al. (46), dass die *C.difficile*-Toxinwirkung über PKC vermittelt und bei Philpott et al. (85), dass die Reaktion des Epithels auf enterohämorrhagische *E.coli* auch über PKC transduziert wird und beide zu Störungen der Barrierefunktion führen.

Weiter konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Cytokine einen Effekt auf die Proteine ZO-1 und Occludin bzw. auf deren Transkriptionsmengen haben. Unter $\text{TNF}\alpha$, aber vor allem unter der Einwirkung von $\text{IFN}\gamma$ kommt es zu einer Absenkung des TER im Sinne einer Zerstörung der Funktionalität und zu einer diffusen Verteilung der Proteine in den Zellen. Die Funktionsstörung geht einher mit steigenden Transkriptmengen. Diese Feststellungen können für pathophysiologische Mechanismen in der Entstehung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen von Bedeutung sein. Es ist bekannt, dass $\text{TNF}\alpha$ weniger, $\text{IFN}\gamma$ jedoch stark im entzündlichen Gewebe der Colitis ulcerosa vermehrt nachzuweisen ist (86). Beim M.Crohn werden noch höhere Werte der Cytokine gefunden, auch hier mit Betonung auf $\text{IFN}\gamma$ (87, 88). Durch die Wirkungsweisen dieser Cytokine an den TJ kann die Unterhaltung der Entzündung und die progrediente Störung der Epithelfunktion miterklärt werden. Durch die Zerstörung der normalen Barriere kann es zu einem vermehrten Eindringen von Bakterien in die Schleimhaut kommen und damit eine Entzündung von neuem initiiert werden. Hierbei spielen vor allem unterschiedliche Toll-like Rezeptoren – wie auch bei der Erkennung von Endotoxinen - eine Rolle (89). Ein Problem der neu initiierten Entzündungen liegt in der Präsentation der Antigene auf der basolateralen Seite der Epithelzellen. Dort existieren weitere Rezeptoren für Antigene, deren Aktivierung andere, aggressivere Reaktionen hervorrufen (90). Die Entzündung schreitet schneller voran - es kommt zu einem Circulus vitiosus. Dieser wird heutzutage bei refraktären Verläufen durch die Gabe von $\text{TNF}\alpha$ -Antikörper versucht zu unterbrechen (91). Neben der Wirkung der Cytokine auf TJ sind noch viele weitere entzündungsunterhaltende Wirkungen bekannt; beispielsweise die Induktion von NOD2 Genen, die an der Einleitung der Immunantwort und am programmierten Zelltod beteiligt sind (92). Eine Veränderung der TJ in T84 durch $\text{TNF}\alpha$ wurde auch von Yoo et al. (93) gezeigt. In dieser Arbeit kam es zu starken, signifikanten Veränderungen und es konnte nachgewiesen werden, dass der Effekt von $\text{TNF}\alpha$ mit einer Erhöhung von PKC einhergeht. Dagegen konnte durch Ferro et al. (94) im Lungenendothel und durch Coyne et al. (95) im Lungenepithel eine Übermittlung der $\text{TNF}\alpha$ -Wirkung über PKC nachgewiesen werden. Zusammenfassend bedeutet dies, dass der Signalweg von $\text{TNF}\alpha$ in verschiedenen Geweben unterschiedlich sein kann. Einen synergistischen Effekt der beiden Cytokine auf Verlust der Barrierefunktion beziehungsweise auf die Zusammensetzung der Fette/Fettsäuren der

Membranen der T84 beschreiben Byleveld et al. (96) und Li Q et al. (97). Hanada et al. beobachtete die synergistische Zerstörung der TJ durch TNF α und IFN γ in Cholangiocyten (98).

Bei den Experimenten mit Hydrocortison konnten weitere grundlegende Einsichten in TJ gewonnen werden. Es zeigte sich, dass durch Hydrocortison nur die Transkriptionsmenge des ZO-1 signifikant gesenkt werden konnte. Dies wiederum bedeutet, dass ZO-1 und Occludin nicht zwangsläufig in die gleiche Richtung reguliert werden müssen, was eine unterschiedliche Signalweiterleitung zumindest partiell nahe legt. Trotz der Veränderung des ZO-1-Levels blieb die Funktionalität in der Messung des TER auch nach 144h erhalten. Diese Ergebnisse wurden sowohl unter 500nM wie auch unter 1 μ M Hydrocortison beobachtet. Die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion unter Hydrocortison wurde auch in anderen Studien an Epithelien und dem Endothel der Retina gezeigt, in denen sie mit einer Steigerung der mRNA Expression von Occludin einherging (99, 100). Die Absenkung der ZO-1 Transkriptmenge wurde ebenfalls bei Balda et al. (101) beobachtet. Diese Publikation beschreibt, dass der ZO-1 Gehalt in konfluenten Zellen stabil ist, und dass eine Zelldichteregulation und Zellproliferation direkt durch ZO-1 assoziiert an ZONAB (ZO nucleic acid binding protein) reguliert werden kann. Eine andere Arbeit zeigte, dass die Erhaltung der Barriere unter Hydrocortison auf eine morphologische Zelloberflächenveränderung zurückführbar ist (59).

Durch Fieber bzw. Hyperthermie kommt es zu einer Auflösung der Barrierefunktion der TJ. Dies kann durch direkte Einwirkung des Fiebers oder durch einen stärkeren Zelluntergang aufgrund der Temperatur zurückzuführen sein. Die Proteine stellten sich als ausgedünnte TJ mit zusätzlich diffuser Verteilung dar, bei gleichbleibenden Transkriptionsleveln. Zelllöcher durch Apoptose waren sehr selten, so dass eher Fieber selbst zur Funktionsschädigung führt. In der Arbeit von Dokladny et al. (102) wurde bei Temperaturen von 39-41°C eine Zunahme der Permeabilität der TJ mit kompensatorischem Anstieg der Occludinmenge beobachtet.

In Zukunft könnte die Untersuchung der Signalkaskade zu den Tight Junctions noch weiter verfeinert werden durch weitere Inhibitoren und Kombinationen mit anderen PKC isoenzymspezifischen Aktivatoren. Daneben gibt es eine Reihe weiterer Substanzen, deren Untersuchung in ihrer Wirkungsweise auf TJ von Interesse ist (z.B. die Untersuchung der Wirkung von Probiotika wie *Lactobacillus acidophilus* oder *Bifidobacterium lactis*). Dahan et al. (103) konnten bereits einen TJ schützenden Effekt vor enterohämorrhagischen *E.coli* durch die Hefe *Saccharomyces boulardii* nachweisen. Des Weiteren ist die Auswertung und Untersuchung des finalen Zusammenbaus der TJ interessant. Chen et al. (104) fanden diesbezüglich bereits eine Nonrezeptor-Tyrosinkinase namens c-Yes, die beim Zusammenbau der TJ durch Phosphorylierung von Occludin mitwirkt. Meyer et al. (105) zeigten, dass der Zusammenbau der TJ durch $G\alpha_{12}$ über eine SRC Tyrosinkinase getriggert wird. $G\alpha_{12}$ ist die Alphauntereinheit eines G-Proteins, welches indirekt mit dem ZO-1-Komplex assoziiert ist. Ein weiteres beeinflussendes Element fanden Nunbhakdi-Craig et al. (106): sie konnten die regulierende Funktion von A β C, einem PP2A (ProteinPhosphatase)-Holoenzym nachweisen. A β C wirkt über atypische PKC und induziert Phosphorylierung und Zusammenbau der TJ. Weitere Untersuchungen könnten auf die Aufklärung des Zusammenhangs zwischen leaky TJ und der Entstehung von Adenokarzinomen abzielen. Bislang ist bekannt, dass in hyperplastischen und adenomatösen Darmpolypen die TJ Barrierefunktion haben, dass es im Gegensatz dazu aber bei Adenokarzinomen des Darms häufig nur noch zur Ausbildung von sogenannten leaky TJ kommt (107, 108).

Diese und weitere Forschungsansätze können dazu beitragen, tiefere Einblicke in die Regulation der TJ zu bekommen, um daraus kurative Ansätze beispielsweise in Bezug chronisch entzündlicher Darmerkrankungen oder neue onkologische Strategien zu entwickeln. Bei allen Untersuchungen sollte nicht vergessen werden, dass die Barriere der Epithelien im menschlichen Organismus nicht nur aus der Funktionalität der TJ besteht, sondern auch lokale Immunantwort und residente mikrobiotische Flora zur gesunden Abgrenzung der Kompartimente beitragen (109).

5. Zusammenfassung

Eine essentielle Funktion von Epithelien und Endothelien besteht darin, verschiedene Kompartimente im Körper zu schaffen und den Austausch von Substanzen zwischen einzelnen Kompartimenten zu regulieren. Die Ausbildung von Tight Junctions (TJ) spielt dabei eine wichtige Rolle, da sie, wie ein Zaun zwischen den Zellen, die parazelluläre Diffusion regulieren und für eine Aufrechterhaltung der Polarität zwischen apikaler und basolateraler Umgebung sorgen. Aus einer Dysregulation dieser Barriere können verschiedene Krankheiten, wie beispielsweise ischämische Retinopathie, hereditäre Taubheit und Hypomagnesiämie, Lungenödem, chronisch entzündliche Darmerkrankungen und Nephropathien resultieren, bei welchen durch Veränderung der normalen Zellbedingungen die Zerstörung der TJ bis zu einem Organversagen führen können. (10, 110).

Durch das zunehmende Forschungsinteresse an Tight Junctions wurden in den vergangenen Jahren mehr als 40 verschiedene Proteine entdeckt, die zur Bildung der TJ beitragen und es wurde gezeigt, dass ihre Permeabilität durch eine Vielzahl unterschiedlicher Stoffe, z.B. durch Phorbolster, Ca^{2+} , Cytokine, bakterielle Toxine und ATP, beeinflusst werden kann (47, 56, 111, 112). Neben Beeinflussung der Permeabilität stand die Erforschung der zugrunde liegenden Regulierungsmechanismen und des Zusammenbaus der TJ-Proteine im Vordergrund. In diesem Zusammenhang wird immer wieder Proteinkinase C als wichtiges regulierendes Enzym gefunden (113, 114).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Proteinkinase C auf die Expression der Tight Junction Proteine ZO-1 und Occludin überprüft und versucht, einen weiteren Fortgang der Signalkaskade aufzuklären. Des Weiteren wurde der Einfluss einiger bakterieller pathogener Komponenten sowie der Einfluss der inflammatorischen Cytokine $TNF\alpha$ und $IFN\gamma$ und die Wirkung von Hydrocortison und Fieber auf die Expression von ZO-1 und Occludin untersucht.

Zu diesem Zwecke wurde eine real-time RT-PCR etabliert, mit der man die Modulation der Transkription von ZO-1 und Occludin in T84 Zellen messen kann.

Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von PKC durch den Phorbolster TPA zu einer Induktion der Transkription, eine Hemmung der PKC zu einer Abnahme

der Transkription von ZO-1 und Occludin führt. Das Signal der PKC wird partiell über MEK1/2 weitergeleitet. Eine Weiterleitung über MAPK p38 konnte ausgeschlossen werden. Trotz Induktion der Transkription durch TPA kam es zu einem Funktionsverlust der TJ mit Dislokation der Proteine ZO-1 und Occludin; Funktionsverlust und Dislokation konnten durch den PKC Inhibitor GF109203X und die MEK Inhibitoren U0126 und PD98059 verhindert werden.

Es konnte eine Transkriptionsinduktion mit Funktionsstörung durch die Zugabe von Lipoteichonsäure von *Streptococcus faecalis* nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung der Cytokine zeigte sich eine Funktionsstörung mit Dislokation der Proteine bei gleichzeitigem Anstieg der Transkription v. a. unter dem Einfluss von IFN γ . Unter Hydrocortison senkte sich einseitig die Transkription von ZO-1 bei erhaltener Barrierefunktion, dagegen zeigte sich bei 42°C „Fieber“ eine normale Transkription mit Verlust der Barrierefunktion.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen zum Verständnis molekularer Regulationsmechanismen und zur Aufklärung pathophysiologischer Vorgänge beitragen.

6. Literaturverzeichnis

1. Balda MS, Matter K. *Tight junctions*. J Cell Sci. 1998 Mar; **111** (Pt 5):541-7.
2. Anderson JM. *Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport*. News Physiol Sci. 2001 Jun; **16**:126-30.
3. Yap AS, Mullin JM, Stevenson BR. *Molecular analyses of tight junction physiology: insights and paradoxes*. J Membr Biol. 1998 Jun 1; **163**(3):159-67.
4. Mitic LL, Van Itallie CM, Anderson JM. *Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2000 Aug; **279**(2):G250-4.
5. Denker BM, Nigam SK. *Molecular structure and assembly of the tight junction*. Am J Physiol. 1998 Jan; **274**(1 Pt 2):F1-9.
6. Niessen CM. *Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function*. J Invest Dermatol. 2007 Nov; **127**(11):2525-32.
7. Miyamoto T, Morita K, Takemoto D, Takeuchi K, Kitano Y, Miyakawa T, Nakayama K, Okamura Y, Sasaki H, Miyachi Y, Furuse M, Tsukita S. *Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice*. J Cell Biol. 2005 May 9; **169**(3):527-38.
8. González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. *Tight junction proteins*. Prog Biophys Mol Biol. 2003 Jan; **81**(1):1-44.
9. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. *Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions*. J Cell Biol. 1993 Dec; **123**(6 Pt 2):1777-88.
10. Harhaj NS, Antonetti DA. *Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology*. Int J Biochem Cell Biol. 2004 Jul; **36**(7):1206-37.
11. Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. *Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions*. J Cell Biol. 1994 Dec; **127**(6 Pt 1):1617-26.
12. Wittchen ES, Haskins J, Stevenson BR. *Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3*. J Biol Chem. 1999 Dec 3; **274**(49):35179-85.
13. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. *Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia*. J Cell Biol. 1986 Sep; **103**(3):755-66.

14. González-Mariscal L, Betanzos A, Avila-Flores A. *MAGUK proteins: structure and role in the tight junction*. Semin Cell Dev Biol. 2000 Aug; **11**(4):315-24.
15. Islas S, Vega J, Ponce L, González-Mariscal L. *Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells*. Exp Cell Res. 2002 Mar 10; **274**(1):138-48.
16. Gottardi CJ, Arpin M, Fanning AS, Louvard D. *The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Oct 1; **93**(20):10779-84.
17. Hoover KB, Liao SY, Bryant PJ. *Loss of the tight junction MAGUK ZO-1 in breast cancer: relationship to glandular differentiation and loss of heterozygosity*. Am J Pathol. 1998 Dec; **153**(6):1767-73.
18. Anderson JM, Van Itallie CM. *Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability*. Am J Physiol. 1995 Oct; **269**(4 Pt 1):G467-75.
19. Schneeberger EE, Lynch RD. *Structure, function, and regulation of cellular tight junctions*. Am J Physiol. 1992 Jun; **262**(6 Pt 1):L647-61.
20. Tsukita S, Furuse M. *Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players?* Trends Cell Biol. 1999 Jul; **9**(7):268-73.
21. Stuart RO, Nigam SK. *Regulated assembly of tight junctions by protein kinase C*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Jun 20; **92**(13):6072-6.
22. Nigam SK, Denisenko N, Rodriguez-Boulan E, Citi S. *The role of phosphorylation in development of tight junctions in cultured renal epithelial (MDCK) cells*. Biochem Biophys Res Commun. 1991 Dec 16; **181**(2):548-53.
23. Balda MS, González-Mariscal L, Contreras RG, Macias-Silva M, Torres-Marquez ME, García-Sáinz JA, Cerejido M. *Assembly and sealing of tight junctions: possible participation of G-proteins, phospholipase C, protein kinase C and calmodulin*. J Membr Biol. 1991 Jun; **122**(3):193-202.
24. Clarke H, Marano CW, Peralta Soler A, Mullin JM. *Modification of tight junction function by protein kinase C isoforms*. Adv Drug Deliv Rev. 2000 Jun 30; **41**(3):283-301.
25. Venkatachalam K, Zheng F, Gill DL. *Control of TRPC and store-operated channels by protein kinase C*. Novartis Found Symp. 2004; **258**:172-88.
26. Inoue M, Kishimoto A, Takai Y, Nishizuka Y. *Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain*. J Biol Chem. 1977 Nov 10; **252**(21):7610-6.

27. Newton AC. *Regulation of protein kinase C*. Curr Opin Cell Biol. 1997 Apr; **9**(2):161-7.
28. Glazer RI. *The protein kinase ABC's of signal transduction as targets for drug development*. Curr Pharm Des. 1998 Jun; **4**(3):277-90.
29. Liu JP. *Protein kinase C and its substrates*. Mol Cell Endocrinol. 1996 Jan 15; **116**(1):1-29.
30. Slater SJ, Kelly MB, Taddeo FJ, Larkin JD, Yeager MD, McLane JA, Ho C, Stubbs CD. *Direct activation of protein kinase C by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3*. J Biol Chem. 1995 Mar 24; **270**(12):6639-43.
31. Toker A, Meyer M, Reddy KK, Falck JR, Aneja R, Aneja S, Parra A, Burns DJ, Ballas LM, Cantley LC. *Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P2 and PtdIns-3,4,5-P3*. J Biol Chem. 1994 Dec 23; **269**(51):32358-67.
32. Begum N. *Stimulation of protein phosphatase-1 activity by insulin in rat adipocytes. Evaluation of the role of mitogen-activated protein kinase pathway*. J Biol Chem. 1995 Jan 13; **270**(2):709-14.
33. Barbosa LA, Goto-Silva L, Redondo PA, Oliveira S, Montesano G, De Souza W, Morgado-Díaz JA. *TPA-induced signal transduction: a link between PKC and EGFR signaling modulates the assembly of intercellular junctions in Caco-2 cells*. Cell Tissue Res. 2003 Jun; **312**(3):319-31.
34. Chiang LL, Kuo CT, Wang CH, Chen TF, Ho YS, Kuo HP, Lin CH. *Involvement of nuclear factor-kappaB in lipoteichoic acid-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW 264.7 macrophages*. J Pharm Pharmacol. 2003 Jan; **55**(1):115-23.
35. Osborn MT, Berry A, Ruberu MS, Ning B, Bell LM, Chambers TC. *Phorbol ester induced MDR1 expression in K562 cells occurs independently of mitogen-activated protein kinase signaling pathways*. Oncogene. 1999 Oct 14; **18**(42):5756-64.
36. Hers I, Tavaré JM, Denton RM. *The protein kinase C inhibitors bisindolylmaleimide I (GF 109203x) and IX (Ro 31-8220) are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity*. FEBS Lett. 1999 Nov 5; **460**(3):433-6.
37. DeSilva DR, Jones EA, Favata MF, Jaffee BD, Magolda RL, Trzaskos JM, Scherle PA. *Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase blocks T cell proliferation but does not induce or prevent anergy*. J Immunol. 1998 May 1; **160**(9):4175-81.
38. Means TK, Pavlovich RP, Roca D, Vermeulen MW, Fenton MJ. *Activation of TNF-alpha transcription utilizes distinct MAP kinase pathways in different macrophage populations*. J Leukoc Biol. 2000 Jun; **67**(6):885-93.

39. Gallagher TF, Seibel GL, Kassis S, Laydon JT, Blumenthal MJ, Lee JC, Lee D, Boehm JC, Fier-Thompson SM, Abt JW, Soreson ME, Smietana JM, Hall RF, Garigipati RS, Bender PE, Erhard KF, Krog AJ, Hofmann GA, Sheldrake PL, McDonnell PC, Kumar S, Young PR, Adams JL. *Regulation of stress-induced cytokine production by pyridinylimidazoles; inhibition of CSBP kinase*. Bioorg Med Chem. 1997 Jan; **5**(1):49-64.
40. Nath R, McGinnis K, Dutta S, Shivers B, Wang KK. *Inhibition of p38 kinase mimics survival signal-linked protection against apoptosis in rat cerebellar granule neurons*. Cell Mol Biol Lett. 2001; **6**(2):173-84.
41. Gonindard C, Bergonzi C, Denier C, Sergheraert C, Klæbe A, Chavant L, Hollande E. *Synthetic hispidin, a PKC inhibitor, is more cytotoxic toward cancer cells than normal cells in vitro*. Cell Biol Toxicol. 1997 Mar; **13**(3):141-53.
42. Stewart JR, O'Brian CA. *Resveratrol antagonizes EGFR-dependent Erk1/2 activation in human androgen-independent prostate cancer cells with associated isozyme-selective PKC alpha inhibition*. Invest New Drugs. 2004 Apr; **22**(2):107-17.
43. Yedovitzky M, Mochly-Rosen D, Johnson JA, Gray MO, Ron D, Abramovitch E, Cerasi E, Neshler R. *Translocation inhibitors define specificity of protein kinase C isoenzymes in pancreatic beta-cells*. J Biol Chem. 1997 Jan 17; **272**(3):1417-20.
44. Balkovetz DF, Katz J. *Bacterial invasion by a paracellular route: divide and conquer*. Microbes Infect. 2003 Jun; **5**(7):613-9.
45. Fleiszig SM, Evans DJ, Do N, Vallas V, Shin S, Mostov KE. *Epithelial cell polarity affects susceptibility to Pseudomonas aeruginosa invasion and cytotoxicity*. Infect Immun. 1997 Jul; **65**(7):2861-7.
46. Chen ML, Pothoulakis C, LaMont JT. *Protein kinase C signaling regulates ZO-1 translocation and increased paracellular flux of T84 colonocytes exposed to Clostridium difficile toxin A*. J Biol Chem. 2002 Feb 8; **277**(6):4247-54.
47. Hecht G, Koutsouris A, Pothoulakis C, LaMont JT, Madara JL. *Clostridium difficile toxin B disrupts the barrier function of T84 monolayers*. Gastroenterology. 1992 Feb; **102**(2):416-23.
48. Fasano A, Baudry B, Pumphlin DW, Wasserman SS, Tall BD, Ketley JM, Kaper JB. *Vibrio cholerae produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Jun 15; **88**(12):5242-6.
49. Azghani AO. *Pseudomonas aeruginosa and epithelial permeability: role of virulence factors elastase and exotoxin A*. Am J Respir Cell Mol Biol. 1996 Jul; **15**(1):132-40.
50. Hirase T, Kawashima S, Wong EY, Ueyama T, Rikitake Y, Tsukita S, Yokoyama M, Staddon JM. *Regulation of tight junction permeability and occludin*

- phosphorylation by Rhoa-p160ROCK-dependent and -independent mechanisms. J Biol Chem.* 2001 Mar 30; **276**(13):10423-31.
51. Otte JM, Cario E, Podolsky DK. *Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells.* Gastroenterology. 2004 Apr; **126**(4):1054-70.
 52. Citi S, Volberg T, Bershadsky AD, Denisenko N, Geiger B. *Cytoskeletal involvement in the modulation of cell-cell junctions by the protein kinase inhibitor H-7.* J Cell Sci. 1994 Mar; **107** (Pt 3):683-92.
 53. Poritz LS, Garver KI, Tilberg AF, Koltun WA. *Tumor necrosis factor alpha disrupts tight junction assembly.* J Surg Res. 2004 Jan; **116**(1):14-8.
 54. Youakim A, Ahdieh M. *Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin.* Am J Physiol. 1999 May; **276**(5 Pt 1):G1279-88.
 55. Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ, Scholz P, Detjen K, Mankertz J, Bode H, Epple HJ, Riecken EO, Schulzke JD. *Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6.* J Cell Sci. 1999 Jan; **112** (Pt 1):137-46.
 56. Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, Nusrat A. *Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms.* J Immunol. 2003 Dec 1; **171**(11):6164-72.
 57. Mutschler E. *Immunmodulatoren. Arzneimittelwirkungen .* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 2001; **8**(13.3): 925-931.
 58. Stelwagen K, van Espen DC, Verkerk GA, McFadden HA, Farr VC. *Elevated plasma cortisol reduces permeability of mammary tight junctions in the lactating bovine mammary epithelium.* J Endocrinol. 1998 Oct; **159**(1):173-8.
 59. Weidenfeller C, Schrot S, Zozulya A, Galla HJ. *Murine brain capillary endothelial cells exhibit improved barrier properties under the influence of hydrocortisone.* Brain Res. 2005 Aug 16; **1053**(1-2):162-74.
 60. Soszyński D. *The pathogenesis and the adaptive value of fever.* Postepy Hig Med Dosw. 2003; **57**(5):531-54.
 61. Conti B, Tabarean I, Andrei C, Bartfai T. *Cytokines and fever.* Front Biosci. 2004 May 1; **9**:1433-49.
 62. Hildebrandt H, Zink, C. *Van't-Hoff-Regel.* Pschyrembel Medizinisches Wörterbuch 1993; **257**:1610.
 63. Chen YZ, Xu RX, Huang QJ, Xu ZJ, Jiang XD, Cai YQ. *Effect of hyperthermia on tight junctions between endothelial cells of the blood-brain barrier model in vitro.* Übersetzung Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao. 2003 Jan; **23**(1):21-4.

64. Aubry JP, Blaecke A, Lecoanet-Henchoz S, Jeannin P, Herbault N, Caron G, Moine V, Bonnefoy JY. *Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity*. Cytometry. 1999 Nov 1; **37**(3):197-204.
65. Jovov B, Van Itallie CM, Shaheen NJ, Carson JL, Gambling TM, Anderson JM, Orlando RC. *Claudin-18: a dominant tight junction protein in Barrett's esophagus and likely contributor to its acid resistance*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2007 Dec; **293**(6):G1106-13.
66. Herouy Y, Kahle B, Idzko M, Eberth I, Norgauer J, Pannier F, Rabe E, Jünger M, Bruckner-Tuderman L. *Tight junctions and compression therapy in chronic venous insufficiency*. Int J Mol Med. 2006 Jul; **18**(1):215-9.
67. Claude P, Goodenough DA. *Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia*. J Cell Biol. 1973 Aug; **58**(2):390-400.
68. Claude P. *Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens*. J Membr Biol. 1978 Mar 10; **39**(2-3):219-32.
69. Balda MS, Whitney JA, Flores C, González S, Cerejido M, Matter K. *Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein*. J Cell Biol. 1996 Aug; **134**(4):1031-49.
70. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. *Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential*. Biotechniques. 1999 Jan; **26**(1):112-22, 124-5.
71. Gérard HC, Branigan PJ, Schumacher HR Jr, Hudson AP. *Synovial Chlamydia trachomatis in patients with reactive arthritis/Reiter's syndrome are viable but show aberrant gene expression*. J Rheumatol. 1998 Apr; **25**(4):734-42.
72. Bustin SA. *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. J Mol Endocrinol. 2000 Oct; **25**(2):169-93.
73. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. *Correlation between protein and mRNA abundance in yeast*. Mol Cell Biol. 1999 Mar; **19**(3):1720-30.
74. Bonfil RD, Momiki S, Fridman R, Reich R, Reddel R, Harris CC, Klein-Szanto A. *Enhancement of the invasive ability of a transformed human bronchial epithelial cell line by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate and diacylglycerol*. Carcinogenesis. 1989 Dec; **10**(12):2335-8.
75. Angelow S, Zeni P, Höhn B, Galla HJ. *Phorbol ester induced short- and long-term permeabilization of the blood-CSF barrier in vitro*. Brain Res. 2005 Nov 30; **1063**(2):168-79.

76. Chang ZF, Huang DY. *Decline of protein kinase C activation in response to growth stimulation during senescence of IMR-90 human diploid fibroblasts.* Biochem Biophys Res Commun. 1994 Apr 15; **200**(1):16-27.
77. Young S, Parker PJ, Ullrich A, Stabel S. *Down-regulation of protein kinase C is due to an increased rate of degradation.* Biochem J. 1987 Jun 15; **244**(3):775-9.
78. Mullin JM, Snock KV, Shurina RD, Noe J, George K, Misner L, Imaizumi S, O'Brien TG. *Effects of acute vs. chronic phorbol ester exposure on transepithelial permeability and epithelial morphology.* J Cell Physiol. 1992 Jul; **152**(1):35-47.
79. Wang Y, Zhang J, Yi XJ, Yu FS. *Activation of ERK1/2 MAP kinase pathway induces tight junction disruption in human corneal epithelial cells.* Exp Eye Res. 2004 Jan; **78**(1):125-36.
80. Wang QJ, Bhattacharyya D, Garfield S, Nacro K, Marquez VE, Blumberg PM. *Differential localization of protein kinase C delta by phorbol esters and related compounds using a fusion protein with green fluorescent protein.* J Biol Chem. 1999 Dec 24; **274**(52):37233-9.
81. Brose N, Rosenmund C. *Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters.* J Cell Sci. 2002 Dec 1; **115**(Pt 23):4399-411.
82. Betz A, Ashery U, Rickmann M, Augustin I, Neher E, Südhof TC, Rettig J, Brose N. *Munc13-1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitter release.* Neuron. 1998 Jul; **21**(1):123-36.
83. Chen Y, Lu Q, Schneeberger EE, Goodenough DA. *Restoration of tight junction structure and barrier function by down-regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in ras-transformed Madin-Darby canine kidney cells.* Mol Biol Cell. 2000 Mar; **11**(3):849-62.
84. Lacaz-Vieira F. *Tight junction dynamics: oscillations and the role of protein kinase C.* J Membr Biol. 2000 Nov 15; **178**(2):151-61.
85. Philpott DJ, McKay DM, Mak W, Perdue MH, Sherman PM. *Signal transduction pathways involved in enterohemorrhagic Escherichia coli-induced alterations in T84 epithelial permeability.* Infect Immun. 1998 Apr; **66**(4):1680-7.
86. Noguchi A, Watanabe K, Narumi S, Yamagami H, Fujiwara Y, Higuchi K, Oshitani N, Arakawa T. *The production of interferon-gamma-inducible protein 10 by granulocytes and monocytes is associated with ulcerative colitis disease activity.* J Gastroenterol. 2007 Dec; **42**(12):947-56.
87. Autschbach F, Giese T, Gassler N, Sido B, Heuschen G, Heuschen U, Zuna I, Schulz P, Weckauf H, Berger I, Otto HF, Meuer SC. *Cytokine/chemokine messenger-RNA expression profiles in ulcerative colitis and Crohn's disease.* Virchows Arch. 2002 Nov; **441**(5):500-13.

88. MacDonald TT, Hutchings P, Choy MY, Murch S, Cooke A. *Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine*. Clin Exp Immunol. 1990 Aug; **81**(2):301-5.
89. Cario E, Brown D, McKee M, Lynch-Devaney K, Gerken G, Podolsky DK. *Commensal-associated molecular patterns induce selective toll-like receptor-trafficking from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium*. Am J Pathol. 2002 Jan; **160**(1):165-73.
90. Hershberg RM. *The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. V. Polarized compartmentalization of antigen processing and Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2002 Oct; **283**(4):G833-9.
91. Braun J, Dormann A. *Chronisch entzündliche Darmerkrankungen*. Klinikleitfaden Innere Medizin Urban&Fischer München/Jena 2003; **9**: 342-4.
92. Rosenstiel P, Fantini M, Bräutigam K, Kühbacher T, Waetzig GH, Seegert D, Schreiber S. *TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells*. Gastroenterology. 2003 Apr; **124**(4):1001-9.
93. Yoo J, Nichols A, Song JC, Mammen J, Calvo I, Worrell RT, Cuppoletti J, Matlin K, Matthews JB. *Bryostatins attenuates TNF-induced epithelial barrier dysfunction: role of novel PKC isozymes*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2003 Apr; **284**(4):G703-12.
94. Ferro T, Neumann P, Gertzberg N, Clements R, Johnson A. *Protein kinase C-alpha mediates endothelial barrier dysfunction induced by TNF-alpha*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2000 Jun; **278**(6):L1107-17.
95. Coyne CB, Vanhook MK, Gambling TM, Carson JL, Boucher RC, Johnson LG. *Regulation of airway tight junctions by proinflammatory cytokines*. Mol Biol Cell. 2002 Sep; **13**(9):3218-34.
96. Byleveld PM, Pang GT, Clancy RL, Roberts DC. *Fish oil feeding delays influenza virus clearance and impairs production of interferon-gamma and virus-specific immunoglobulin A in the lungs of mice*. J Nutr. 1999 Feb; **129**(2):328-35.
97. Li Q, Zhang Q, Wang M, Zhao S, Ma J, Luo N, Li N, Li Y, Xu G, Li J. *Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha disrupt epithelial barrier function by altering lipid composition in membrane microdomains of tight junction*. Clin Immunol. 2008 Jan; **126**(1):67-80.
98. Hanada S, Harada M, Koga H, Kawaguchi T, Taniguchi E, Kumashiro R, Ueno T, Ueno Y, Ishii M, Sakisaka S, Sata M. *Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma directly impair epithelial barrier function in cultured mouse cholangiocytes*. Liver Int. 2003 Feb; **23**(1):3-11.

99. Antonetti DA, Wolpert EB, DeMaio L, Harhaj NS, Scaduto RC Jr. *Hydrocortisone decreases retinal endothelial cell water and solute flux coincident with increased content and decreased phosphorylation of occludin.* J Neurochem. 2002 Feb; **80**(4):667-77.
100. Jiang WG. *Regulation of cell adhesion, a central mechanism in the anticancer action of essential fatty acids (review).* Int J Mol Med. 1998 Mar; **1**(3):621-5.
101. Balda MS, Garrett MD, Matter K. *The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density.* J Cell Biol. 2003 Feb 3; **160**(3):423-32.
102. Dokladny K, Moseley PL, Ma TY. *Physiologically relevant increase in temperature causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2006 Feb; **290**(2):G204-12.
103. Dahan S, Dalmaso G, Imbert V, Peyron JF, Rampal P, Czerucka D. *Saccharomyces boulardii interferes with enterohemorrhagic Escherichia coli-induced signaling pathways in T84 cells.* Infect Immun. 2003 Feb; **71**(2):766-73.
104. Chen YH, Lu Q, Goodenough DA, Jeansonne B. *Nonreceptor tyrosine kinase c-Yes interacts with occludin during tight junction formation in canine kidney epithelial cells.* Mol Biol Cell. 2002 Apr; **13**(4):1227-37.
105. Meyer TN, Hunt J, Schwesinger C, Denker BM. *Galpha12 regulates epithelial cell junctions through Src tyrosine kinases.* Am J Physiol Cell Physiol. 2003 Nov; **285**(5):C1281-93.
106. Nunbhakdi-Craig V, Machleidt T, Ogris E, Bellotto D, White CL 3rd, Sontag E. *Protein phosphatase 2A associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex.* J Cell Biol. 2002 Sep 2; **158**(5):967-78.
107. Mullin JM, Laughlin KV, Ginanni N, Marano CW, Clarke HM, Peralta Soler A. *Increased tight junction permeability can result from protein kinase C activation/translocation and act as a tumor promotional event in epithelial cancers.* Ann N Y Acad Sci. 2000; **915**:231-6.
108. Soler AP, Miller RD, Laughlin KV, Carp NZ, Klurfeld DM, Mullin JM. *Increased tight junctional permeability is associated with the development of colon cancer.* Carcinogenesis. 1999 Aug; **20**(8):1425-31.
109. McCracken VJ, Lorenz RG. *The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota.* Cell Microbiol. 2001 Jan; **3**(1):1-11.
110. Sawada N, Murata M, Kikuchi K, Osanai M, Tobioka H, Kojima T, Chiba H. *Tight junctions and human diseases.* Med Electron Microsc. 2003 Sep; **36**(3):147-56.

111. Farshori P, Kachar B. *Redistribution and phosphorylation of occludin during opening and resealing of tight junctions in cultured epithelial cells.* J Membr Biol. 1999 Jul 15; **170**(2):147-56.
112. Tsukamoto T, Nigam SK. *Role of tyrosine phosphorylation in the reassembly of occludin and other tight junction proteins.* Am J Physiol. 1999 May; **276**(5 Pt 2):F737-50.
113. Andreeva AY, Krause E, Müller EC, Blasig IE, Utepbergenov DI. *Protein kinase C regulates the phosphorylation and cellular localization of occludin.* J Biol Chem. 2001 Oct 19; **276**(42):38480-6.
114. Avila-Flores A, Rendón-Huerta E, Moreno J, Islas S, Betanzos A, Robles-Flores M, González-Mariscal L. *Tight-junction protein zonula occludens 2 is a target of phosphorylation by protein kinase C.* Biochem J. 2001 Dec 1; **360**(Pt 2):295-304.
115. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. *Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone?* Clin Biochem. 1997 Mar; **30**(2):91-113.
116. Kraft TE, Parisotto D, Schempp C, Efferth T. *Fighting cancer with red wine? Molecular mechanisms of resveratrol.* Crit Rev Food Sci Nutr. 2009 Oct; **49**(9):782-99.
117. Cal C, Garban H, Jazirehi A, Yeh C, Mizutani Y, Bonavida B. *Resveratrol and cancer: chemoprevention, apoptosis, and chemo-immunosensitizing activities.* Curr Med Chem Anticancer Agents. 2003 Mar; **3**(2):77-93.
118. Wu JM, Wang ZR, Hsieh TC, Bruder JL, Zou JG, Huang YZ. *Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine (Review).* Int J Mol Med. 2001 Jul; **8**(1):3-17.
119. Campagna M, Rivas C. *Antiviral activity of resveratrol.* Biochem Soc Trans. 2010 Feb; **38**(Pt 1):50-3.
120. Vingtdoux V, Dreses-Werringloer U, Zhao H, Davies P, Marambaud P. *Therapeutic potential of resveratrol in Alzheimer's disease.* BMC Neurosci. 2008 Dec 3; **9** Suppl 2:S6.
121. Szkudelski T. *The insulin-suppressive effect of resveratrol - an in vitro and in vivo phenomenon.* Life Sci. 2008 Feb 13; **82**(7-8):430-5.
122. Palsamy P, Subramanian S. *Resveratrol, a natural phytoalexin, normalizes hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide induced experimental diabetic rats.* Biomed Pharmacother. 2008 Nov; **62**(9):598-605.
123. Sheth P, Delos Santos N, Seth A, LaRusso NF, Rao RK. *Lipopolysaccharide disrupts tight junctions in cholangiocyte monolayers by a c-Src-, TLR4-, and LBP-dependent mechanism.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2007 Jul; **293**(1):G308-18.

130. L.A.J. O'Neill. *Signal Transduction Pathways Activated by the IL-1 Receptor/Toll-Like Receptor Superfamily*. Toll-Like Receptor Family Members and Their Ligands. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 2002; **3**:47-63.
131. Weiler F, Marbe T, Scheppach W, Schaubert J. *Influence of protein kinase C on transcription of the tight junction elements ZO-1 and occludin*. J Cell Physiol. 2005 Jul; **204**(1):83-6.
132. Wray C, Mao Y, Pan J, Chandrasena A, Piasta F, Frank JA. *Claudin-4 augments alveolar epithelial barrier function and is induced in acute lung injury*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2009 Aug; **297**(2):L219-27.

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung einiger TJ Proteine und ihrer Vernetzung ---	2
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Subtypen der PKC und ihrer Inhibitoren	5
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der PKC-Signalkaskade flussabwärts mit einigen Inhibitoren/Aktivatoren-----	5
Abbildung 3.1.1: Veränderung des transepithelialen Widerstandes in Abhängigkeit des Phorbolesters TPA -----	17
Abbildung 3.1.2: Semiquantitative Bestimmung der ZO-1-/Occludin-Transkriptmerte durch real-time RT-PCR in Abhängigkeit des Phorbolesters TPA -----	17
Abbildung 3.1.3: TJ Proteine ZO-1 (Cy3) und Occludin (FITC) in einer doppelten Immunfluoreszenzfärbung im konfokalen Mikroskop in Abhängigkeit des Phorbolesters TPA -----	18
Abbildung 3.1.4: Veränderung des transepithelialen Widerstandes durch TPA unter Zugabe von Zellkaskadeninhibitoren -----	19
Abbildung 3.1.5: Semiquantitative Bestimmung der ZO-1-/Occludin-Transkriptmengen durch real-time RT-PCR in Abhängigkeit des Phorbolesters TPA bzw. TPA und Inhibitoren-----	20
Abbildung 3.1.6: Messung des transepithelialen Widerstandes unter Zugabe von Zellkaskadeninhibitoren-----	21
Abbildung 3.1.7: Semiquantitative Bestimmung der ZO-1-/Occludin-Transkriptmenge durch real-time RT-PCR in Abhängigkeit von Inhibitoren -----	22
Abbildung 3.1.8: TJ Proteine ZO-1 (Cy3) und Occludin (FITC) in einer doppelten Immunfluoreszenzfärbung im konfokalen Mikroskop in Abhängigkeit von Inhibitoren-----	23
Abbildung 3.2.1: Messung des transepithelialen Widerstandes unter Zugabe von bakteriellen pathogenen Komponenten -----	25
Abbildung 3.2.2: Semiquantitative Bestimmung der ZO-1-/Occludin-Transkriptmenge durch real-time RT-PCR in Abhängigkeit von bakteriellen pathogenen Komponenten -----	26
Abbildung 3.2.3: TJ Proteine ZO-1 (Cy3) und Occludin (FITC) in einer doppelten Immunfluoreszenzfärbung im konfokalen Mikroskop in Abhängigkeit bakteriell pathogener Komponenten-----	27

Abbildung 3.3.1: Veränderung des transepithelialen Widerstandes durch TNF α und IFN γ -----	28
Abbildung 3.3.2: Semiquantitative Bestimmung der ZO-1-/Occludin-Transkriptmenge durch real-time RT-PCR in Abhängigkeit von TNF α und IFN γ -----	29
Abbildung 3.3.3: TJ Proteine ZO-1 (Cy3) und Occludin (FITC) in einer doppelten Immunfluoreszenzfärbung im konfokalen Mikroskop in Abhängigkeit von TNF α und IFN γ -----	30
Abbildung 3.4.1: Veränderung des transepithelialen Widerstandes unter der Einwirkung von Hydrocortison -----	31
Abbildung 3.4.2: Semiquantitative Bestimmung der ZO-1-/Occludin-Transkriptmenge durch real-time RT-PCR unter der Einwirkung von Hydrocortison-----	32
Abbildung 3.5.1: Veränderung des transepithelialen Widerstandes durch Fiebersimulation -----	33
Abbildung 3.5.2: Semiquantitative Bestimmung der ZO-1-Transkriptmenge durch real-time RT-PCR im Fieberversuch -----	34
Abbildung 3.5.3: TJ Proteine ZO-1 (Cy3) und Occludin (FITC) in einer doppelten Immunfluoreszenzfärbung im konfokalen Mikroskop unter Fiebersimulation -----	34

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

Abb.	Abbildung
BSA	bovines Serumalbumin
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecos modified eagle medium
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP+dCTP+dGTP+dTTP)
DTT	Dithiothreitol
eGFP	enhanced green fluorescent protein
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FACS	fluorescence activated cell sorting (Durchfluscytometrie)
FAM	Fluoresceinamidid (fluoreszierender Farbstoff)
FBS	fetalbovines Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat (fluoreszierender Farbstoff)
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
G α M	goat anti mouse Antikörper
IFN	Interferon
JAMs	Junction adhesion molecules
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal Kinase
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Lipoteichonsäuren
MAGUK	Membrane associated guanylate kinase homologues
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDR 1	Multi-Drug-Resistance-Gen 1
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
N6	Random Hexamer-Oligonukleotide
NF-kB	Nuclear Factor kappa B
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction
PKC	Proteinkinase C
pPOccl-1	Vektor, enthält Occludinpromotorstück vor eGFP codierenden Region

Real-time RT-PCR	Real time Reverse Transkriptase Polymerase chain reaction
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase chain reaction
TAMRA	Carboxytetramethylrhodamin (fluoreszierender Farbstoff)
TER	transepithelialer Widerstand
TJ	Tight junction
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TPA	12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetat
VIC	fluoreszierender Farbstoff der Firma Applied Biosystems
ZO	Zonula occludens
ZONAB	ZO nucleic acid binding protein

RLT, RPE, RW1, RDD *spezifische Puffer des RNeasy-Kits*

Inhibitoren

GF 109203X	Bisindolylmaleimid
SB 202474	4-Ethyl-2-(p-methoxyphenyl)-5-(4'-pyridyl)-1H-imidazol
U0126	1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]-butadien
PD 98059	2'-Amino-3'-methoxyflavon
SB 202190	4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazol
SB 203580	4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)imidazol
RO-31-8220	1-[3-(Amidinothio)-propyl-1H-indoyl-3-yl]-3-(1-methyl-1H-indoyl-3-yl)maleimidmethansulfonat

Danksagung

„Leider läßt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken.“

Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)

Dennoch möchte ich an dieser Stelle meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. W. Scheppach für die Ermöglichung dieser spannenden Arbeit von ganzem Herzen danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. M. Scheurlen für die Übernahme des Koreferats.

Frau Prof. Dr. A.-M. Waaga-Gasser danke ich herzlichst für die Übernahme des Zweitgutachtens in meinem Rigorosum.

Herrn Dr. rer. nat. Frank Weiler danke ich sehr für seine unermüdliche Geduld und freundlichen Hilfestellungen.

Vielen Dank den Mitarbeitern des Gastrolabors, insbesondere Frau Ines Holub für die Unterstützung.

Besonders möchte ich meinem Vater danken, mir das Studium der Medizin möglich gemacht zu haben. Dankeschön.

Schließlich bedanke ich mich bei meiner ganzen lieben Familie, und dabei ganz besonders bei meinem Ehemann und meiner Tochter - schön, dass es Euch gibt.

Danke.