

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. J. Waschke

Bedeutung der desmosomalen Adhäsion und Rolle der Rho-
GTPasen RhoA, Rac1 und cdc42 für die Regulation der
Darmbarriere

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

vorgelegt von
Michael Meir
aus Würzburg

Würzburg, 16.03.2013

Referent: Priv.-Doz. Dr. Nicolas Schlegel

Korreferent: Prof. Dr. Jens Waschke

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

Der Promovend ist Arzt

Für Jule

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1.	Bedeutung der Darmbarriere	1
1.2.	Aufbau der Darmbarriere	1
1.2.1.	Occludenskontakte	3
1.2.2.	Adherenskontakte	6
1.2.3.	Desmosomen	7
1.3.	Regulation der Darmbarriere	8
1.3.1.	Regulation der Occludenskontaktproteine	9
1.3.2.	Bedeutung des Actinzytoskeletts für Veränderungen der intestinalen Barriere.	10
1.4.	Fragestellung	15
2.	Material und Methoden	16
2.1.	Zellkultur	16
2.2.	Bakterielle Toxine und Mediatoren	17
2.2.1.	Bakterielle Toxine	17
2.2.2.	Testreagenzien	19
2.3.	Antikörper	19
2.3.1.	Primärantikörper	19
2.3.2.	Sekundärantikörper	20
2.4.	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie	20
2.5.	Western Blot	21
2.5.1.	Amidoschwarz Proteinbestimmung	21
2.5.2.	SDS Page Gelelektrophorese	22
2.5.3.	Immunoblot	23
2.6.	GLISA	25
2.7.	Dispaseassay	26
2.8.	Messungen des transepithelialen elektrischen Widerstandes	26
2.9.	Permeabilitätsmessung mittels Transwellfiltersystemen	28
2.10.	Viabilitätsassay	29
2.11.	Absorptionsversuche	29
2.12.	Abschätzungen der Junctionslänge	30

2.12. Statistische Auswertung	30
3. Ergebnisse	32
3.1. Charakterisierung der Caco2 Zelllinie	32
3.2. Veränderung der Barrierefunktion durch Applikation von Dsg2 ED	39
3.2.1. Applikation von Dsg2 ED erhöhte die Anzahl der Zellfragmente im Dipaseassay	39
3.2.2. Applikation von Dsg2 ED verringerte den TER und erhöhte den P_E	41
3.2.3 Applikation von Dsg2 ED veränderte die Morphologie der Occludenskontakte	44
3.3. Veränderungen der Barriere durch Änderung der Aktivität der Rho- GTPasen	46
3.3.1. Eine Veränderung der Aktivität der Rho- GTPasen änderte die Morphologie der Occludnes- und Adherens Kontakte	46
3.3.2. Eine Veränderung der Aktivität der Rho- GTPasen führte zu einer Veränderung des TER und des FITC- Dextran Flux	50
3.3.3. Applikation von Toxinen/Mediatoren führte nicht zum Zelltod	56
3.3.4. Eine Veränderung der Aktivität von RhoA destabilisierte die Barriere, eine Erhöhung der Rac1 und Cdc42 Aktivität wirkte Barriere protektiv	57
4. Diskussion	60
4.1. Die Caco2 Zelllinie stellt ein geeignetes Modell der Darmbarriere dar	61
4.2. Die Dsg2- vermittelte desmosomale Adhäsion ist wichtig für die Aufrechterhaltung der Darmbarriere	62
4.3. Rolle der Rho- GTPasen in der Regulation der Darmbarriere	63
5. Aussicht	68
6. Zusammenfassung	69
7. Literaturverzeichnis	71
8. Anhang	81
8.1. Abkürzungsverzeichnis	81
8.2. Danksagung	82
8.3. Lebenslauf	2

1 Einleitung

1.1. Bedeutung der Darmbarriere

Der Darm stellt mit einer Oberfläche von bis zu 200 m² die größte Grenzfläche des menschlichen Körpers mit seiner Umwelt dar (Luellmann-Rauch 2003). Zum einen hindert der Darm Bakterien, die sich physiologischer Weise im Darmlumen befinden, vom Eintritt in den Körper und zum anderen nimmt er Proteine, Fette, Kohlenhydrate, Elektrolyte und Wasser selektiv auf. Neben der Integrität der Enterozyten sind die Zell- Zellkontakte für die Abdichtung der Interzellulargapen und damit für die Aufrechterhaltung der Darmbarriere essentiell (Laukoetter et al. 2008).

Viele Erkrankungen stören diese Barrierefunktion, wie zum Beispiel chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (Kreisel 2006), virale und bakterielle Enteritiden (Berkes et al. 2003), Zöliakie (Guandalini und Setty 2008) und ischämische Enteropathien (Elder et al. 2009). Eine durch diese Erkrankungen vermittelte gesteigerte parazelluläre Permeabilität der Darmbarriere führt zum Eintritt von Bakterien in den Körper und kann zu einer schweren systemischen Sepsis führen (Jorgensen et al. 2006). Ein genaueres Verständnis der Regulation der Darmbarriere und der Bedeutung der einzelnen Komponenten ist daher wichtig. Es kann wesentlich für künftige Therapien und einer Prävention von schweren Komplikationen bei oben genannten Erkrankungen sein.

1.2. Aufbau der Darmbarriere

Dün- und Dickdarm sind, wie alle Bestandteile des Rumpfdarms (Oesophagus, Gaster, Intestinum tenue et crassum) aus den typischen Wandschichten aufgebaut (Benninghoff and Drenckhahn 2008, siehe Abb. 1).

Die Barrierefunktion des Darmes wird durch ein Zusammenwirken biochemischer, immunologischer und morphologischer Strukturen gewährleistet. Zu allererst verhindert eine durch Becherzellen und Drüsen sezernierte, IgA-haltige Muzinschicht einen ständigen Kontakt von Bakterien mit dem Dünndarmepithel (Johansson et al. 2008).

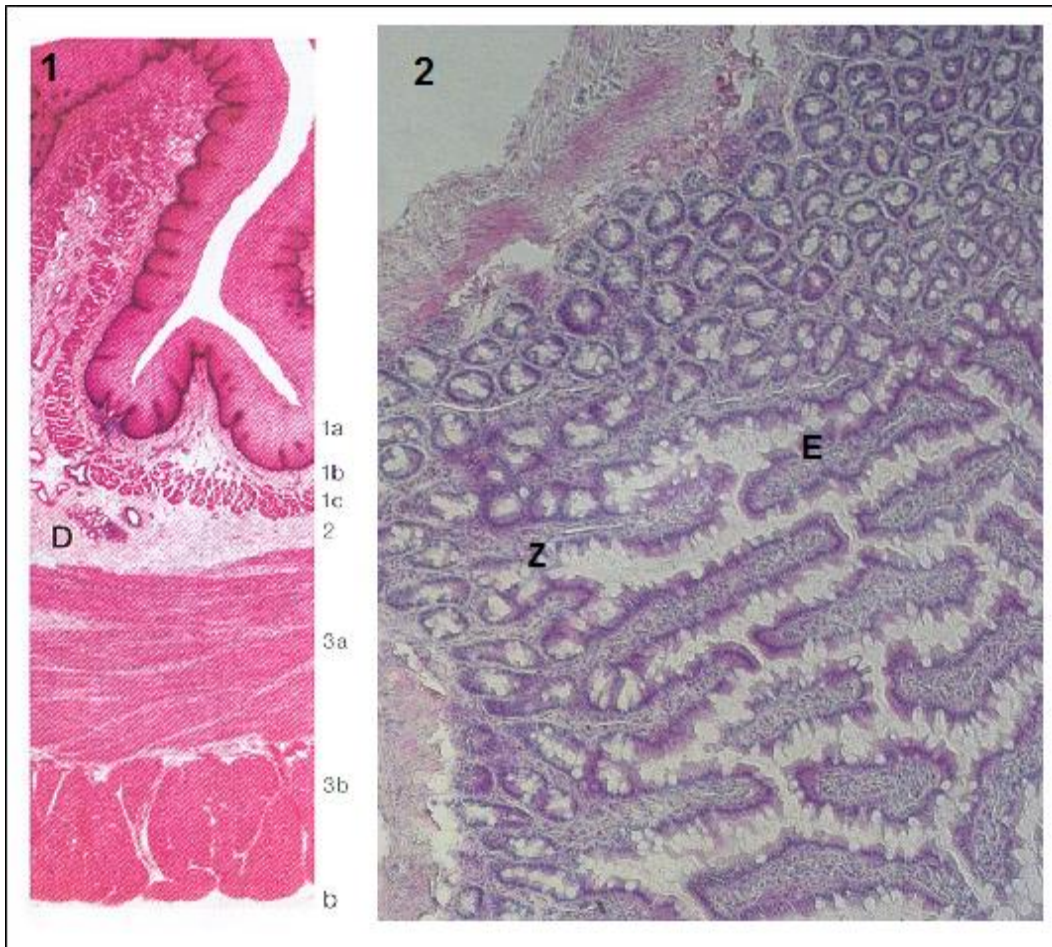


Abbildung 1: Histologische Schnitte des Darmes

1: Wandaufbau des Darms: 1. Tunica mucosa mit a) Epithelium mucusae b) Lamina propria Mucosae c) Lamina muscularis Mucosae. 2. Tela submucosa mit Drüsen (D) 3. Tunica muscularis mit a) Stratum circulare, b) Stratum longitudinale (Beninghoff 2008)

2: Histologischer Schnitt des Dünndarms. Man erkennt die typischen Zotten und Krypten sowie die Enterozyten (E), die zusammen mit Becherzellen (Z) das Lumen auskleiden

Den bedeutendsten Anteil an der Barrierefunktion liefern die Enterozyten, die als einschichtiges Zylinderepithel den Darm luminal auskleiden. Die Zellmembran der Enterozyten spielt für die Aufrechterhaltung der Darmbarriere qualitativ die größte Rolle. Hydrophile Stoffe können diese Membran kaum ohne spezifischen Transport überwinden (Turner 2009). Bedeutender für die Pathogenese bei Erkrankungen, die mit einer Veränderung der Darmpermeabilität einhergehen, sind jedoch die Zell-Zellkontakte der einzelnen

Enterozyten, die für die Versiegelung der Interzellularspalten von Bedeutung sind.

Enterozyten weisen im apikalen Bereich hintereinander folgende Zellkontakte auf (Luellmann-Rauch 2003), welche als Schlussleistenkomplex beziehungsweise als Haftkomplex bezeichnet wird (Abb. 2) Dieser Haftkomplex besteht luminal aus einer Zonula occludens (tight junction) darunter einer Zonula adherens und basal der Macula Adherens, den Desmosomen.

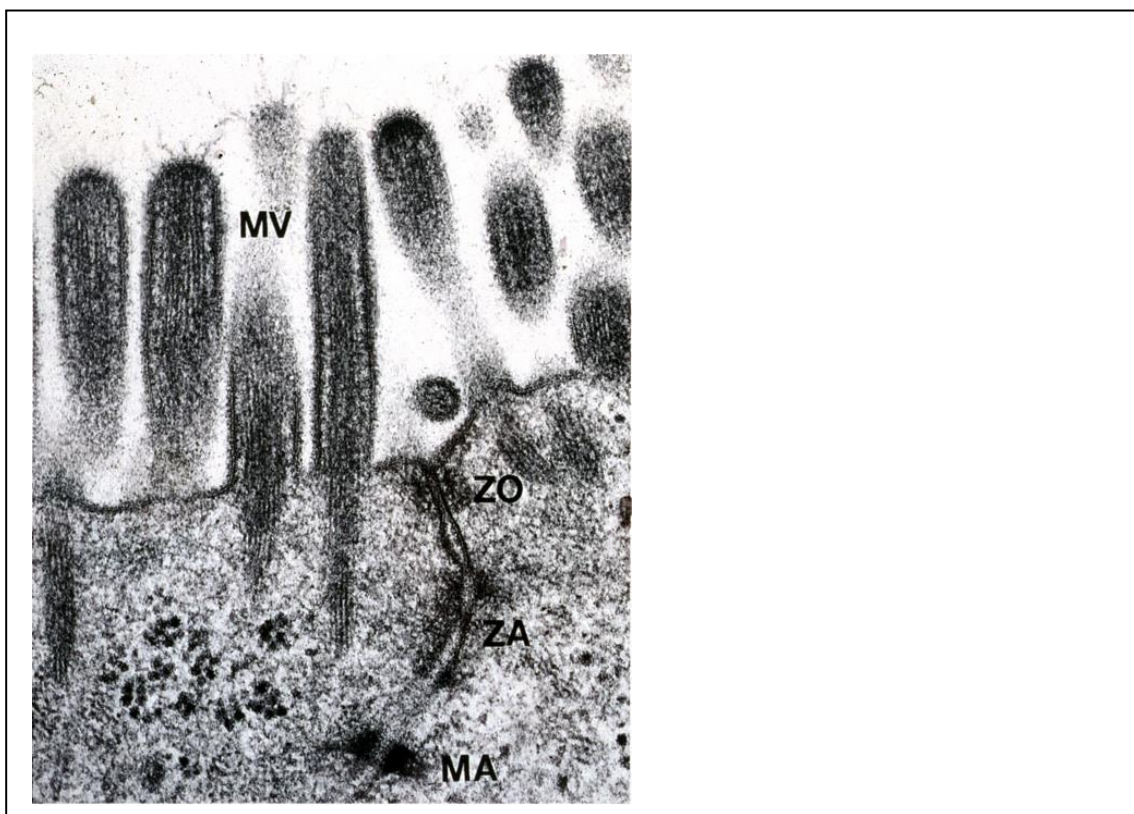


Abbildung 2: Schlussleistenkomplex

Elektronenmikroskopische Aufnahme des Schlussleistenkomplexes zwischen zwei Enterozyten.

Man erkennt die Abfolge der Junctionen von luminal (oben) nach basal (unten):

ZO: Zona Occludens, Tight Junction ZA: Zona Adherens MA: Macula Adherens, Desmosom

MV: Mikrovilli (Beninghoff Drenckhahn, Band I 2002)

1.2.1. Occludenskontakte

Als Occludenskontakte werden Komplexe aus verschiedenen Proteinen bezeichnet, die benachbarte Zellen so eng miteinander verbinden, dass der Interzellularspalt gürtelförmig zwischen 0,2nm bis 0,8nm klein wird (Madara 1994). Des Weiteren sind sie für die Zellpolarität verantwortlich.

Die Occludenskontakte werden von Claudinen und Occludin gebildet. Diese Proteine ragen jeweils mit zwei extrazellulären Domänen über diesen Interzellularspalt und korrespondieren dort mit den Domänen der Nachbarzelle. Beide Proteine besitzen vier Transmembrandomänen, die N- und C-terminalen Enden ragen ins Zytosol. Sowohl Claudine als auch Occludine können über ihr C-terminales Ende mit den Adapterproteinen ZO1-3, Cingulin und Afadin (AF-6) interagieren und sind über diese an die zytoskelettalen Actinfilamente verbunden (Furuse et al. 1993; Mitic et al. 2000).

Bei polarisierten Zellen, wie den Enterozyten, verhindern die Occludenskontakte nicht nur einen ungerichteten parazellulären Transport, sondern auch den intramembranären Austausch von Membranproteinen der äußeren Membran und grenzen damit den apikalen vom basalen Membrananteil der Zelle ab (Mitic and Anderson 1998).

Es wird unterschieden zwischen dichten Occludenskontakten, wie sie beispielsweise im aufsteigenden Ast der Henleschleife zu finden sind und durchlässigen Occludenskontakten, zu denen die Occludenskontakte des Darmes gezählt werden können. Diese ermöglichen eine Diffusion von kleinen Partikeln bis 20 Angström vom Lumen ins Interstitium (Mitic and Anderson 1998).

Die unterschiedliche Dichtigkeit der Occludenskontakte lässt sich vor allem durch eine unterschiedliche Expression von verschiedenen Claudinen erklären (Turner 2009). Inzwischen sind 24 Claudintypen bekannt (Tsukita 2001; Forster 2008). Die Expression von Claudintypen ist nicht nur Gewebe- und Spezies spezifisch, sondern kann sich auch in den einzelnen Zellen selbst im Laufe ihrer Differenzierung, ihres Wachstums, oder veränderter Umweltbedingungen verändern (Weber et al. 2008). Im humanem Gastrointestinaltrakt finden sich Claudine der Typen 1, 2, 3, 4, 5, 15 und 20 (Heiskala et al. 2001). Die Bedeutung des 21-32 kDa schweren Claudin unterstreicht auch die Tatsache, dass Mäuse mit einer Knockoutmutation im Gen für Claudin 5 (Nitta et al. 2003) oder Claudin 1 (Lal-Nag und Morin 2009) wenige Stunden nach der Geburt versterben.

Obwohl das 65kDa Protein Occludin als erstes Protein der Zonulae occludentes entdeckt wurde (Furuse et al. 1993), ist seine Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Darmbarriere noch nicht abschließend geklärt. Die Occludenskontakte einer Occludin-defizienten Maus sind morphologisch nicht vom Wildtyp zu unterscheiden, jedoch leiden diese Mäuse unter einer chronischen Entzündung und einer Hyperplasie des Darmepithels (Furuse 2009). Occludin scheint somit ein wichtiges Protein in der Regulation und Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der Occludenskontakte zu sein. Beispielsweise führt eine Überexpression von Occludin in MDCK-Zellen zu einem erhöhten transepithelialen Elektrischen Widerstand (TER; McCarthy et al. 1996), während eine Blockierung der extrazellulären Interaktion mit den Occludinschleifen der Nachbarzelle dagegen zu einem Abfall des TER führt (Wong and Gumbiner 1997).

Weitere membranintegrale Proteine sind die JAMs (Junctional Adhesion Molecules), die sowohl in den Occludenskontakten als auch den Adherens Kontakten (AJs) vorkommen. Die JAMs bestehen aus zwei extrazellulären Schleifen, die einem Immunglobulin ähneln, einem einzelnen intramembranären Segment und einem kurzen zytoplasmatischen Anteil (Severson and Parkos 2009). Die JAMs haben nicht nur eine wichtige Aufgabe in der Aufrechterhaltung der Darmbarriere, sondern auch bei entzündlichen Prozessen (Laukoetter et al. 2007), der Angiogenese (Parise 2003) und Leukozytenmigration (Ostermann et al. 2002). Im gastrointestinalen Epithel haben sie zum einen adhäsive Aufgaben, aber vor allem regulatorische Bedeutung für die TJs. Für JAM-A konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es wichtig für die Anordnung der Occludenskontakte ist (Vetrano und Danese 2009).

An die Transmembranproteine der Occludenskontakte binden im Zytosol sogenannte Adapterproteine oder „Scaffold Proteine“ und verknüpfen diese mit dem Actinzytoskelett. Zu diesen zählen die Proteine ZO-1, ZO-2 und ZO-3, die der Familie der Membran-assoziierten-Guanylat-Kinase-Superfamilie angehören. Vor allem das 220kDa schwere ZO-1 und das 132 kDa schwere ZO-2 scheinen essentiell für die Rekrutierung und Regulation der

Occludenskontaktproteine und damit für den Erhalt der Zellpolarität zu sein. So sind Mäuse mit Knockoutmutationen für ZO-1 und ZO-2 nicht überlebensfähig (Hunziker et al. 2009). Sowohl ZO-1- als auch ZO-2-defiziente epitheliale Zelllinien weisen morphologisch veränderte TJs auf (Fanning and Anderson 2009). Im Gegensatz dazu sind ZO-3-defiziente Mäuse voll überlebensfähig und zeigen keine veränderten Occludenskontakte.

1.2.2. Adherenskontakte

Die Adherenskontakte sind - ihrem Namen entsprechend - für die mechanische Stabilität und die Adhäsion der Zellen verantwortlich. Ohne diese mechanische Stabilität der Adherenskontakte ist eine Aufrechterhaltung der Darmbarriere nicht möglich (Turner 2009). Des Weiteren spielen sie eine wichtige Rolle bei der Regulation der Transkription der Zelle.

In polarisierten Epithelien findet sich meist eine Zonula Adherens, eine gürtelförmige (lat. Zonula= Gürtel) Struktur, die sich durch eine Verdichtung von Adherenskontaktproteinen und eines dazu parallel laufenden Actinrings darstellt (Farquhar and Palade 1963). Der Interzellularspalt ist an der Zonula Adherens zwischen 0,2-0,5µm weit (Niessen and Gottardi 2008). Die mechanische Stabilität wird durch zwei Proteinkomplexe gewährleistet: Das Cadherin /Catenin und das Nektin/ Afadin System.

Die 120 kDa schweren Cadherine sind Glykoproteine. Sie bilden homophile Calcium- abhängige Bindungen. Das Vorkommen verschiedener Cadherine ist gewebeabhängig. So finden sich N-Cadherine in Muskel- und Neuronenzellen, VE-Cadherin in Endothelien und E-Cadherin in Epithelien. Diese Bindung ist essentiell für die Differenzierung der Zelle. Ein Verlust der E-Cadherin-vermittelten Bindung führt zum Wandel einer epithelialen Zelle in eine mesenchymalen Zelle und damit unter anderem zum Verlust der Barrierefunktion (Lozano et al. 2003). Die Cadherine sind an ihrer zytoplasmatischen Domäne über die Catenine, α - (Vinculin), β -, γ - (Plakoglobin), δ - (p120) Catenin mit dem Actinzyotskelett verbunden (Ozawa et al. 1989). Dadurch ist es möglich, dass extrazelluläre Informationen ins Zellinnere gelangen. β -, γ -Catenin sind essentiell für die Aufrechterhaltung der

Adhäsion (Huelsenken et al. 2000). β -Catenin ist ständig an E-Cadherin gebunden und ist verantwortlich für die Rekrutierung an die Zellmembran, nach der Synthese im Endoplasmatischen Retikulum (Chen et al. 1999; Adams et al. 1996) und schützt E-Cadherin vor einer zelleigenen Proteolyse (Huber et al. 2001). α -Catenin (Vinculin) kann direkt auf das Actinzytoskelett einwirken. In vitro zeigte sich jedoch, dass eine gleichzeitige Bindung von α -Catenin an F-Actin und β -Catenin nicht möglich ist. Deshalb wird vermutet, dass α -Catenin nicht starr das Actinzytoskelett mit den Cadherinen (über β -Catenin) verbindet, sondern einen ständigen Wechsel zwischen F-Actin und β -Catenin vollzieht, der eine Regulation der Actinpolymerisation erlaubt (Drees et al. 2005). p120 Catenin verhindert die Endozytose von Cadherinen und kann RhoA inhibieren und damit die Actinpolymerisation verstärken (siehe 1.3.)

Das Transmembranprotein Nektin kann eine Calcium- unabhängige homo- oder heterophile Bindung eingehen. Die Extrazellulärdomäne von Nektin besteht aus drei Domänen, die IgG Molekülen ähnlich ist. Intrazellulär bindet Nektin an Afadin (AF6). Afadin verbindet Nektin nicht nur mit dem Actinzytoskelett, sondern kann auch mit den Ras/Rap-GTPasen, ZO1 und α -Catenin interagieren (Niessen and Gottardi 2008). Damit ist der Nektin/Afadin Komplex nicht nur eine Alternative zum Cadherin/Catenin Komplex, sondern stellt auch eine Verbindung der Adherenskontakte zu den Occludenskontakten dar.

1.2.3. Desmosomen

Die Desmosomen wurden in ihren Erstbeschreibungen als Punktnähte bezeichnet, die benachbarte Zellen miteinander verbinden. Ihnen wurde lange vor allem die Aufgabe zugewiesen als Kleber die Zellen zusammenzuhalten und physikalischen Stress auf benachbarte Zellen zu verteilen (Farquhar und Palade 1963). In den letzten Jahren wurde bekannt, dass sie nicht nur adhäsive Aufgaben erfüllen, sondern auch wichtig für die Zelldifferenzierung, Gewebeentwicklung und in der Zellapoptose sind (Green and Simpson 2007; Nava et al. 2007). Desmosomen werden aus zwei Transmembranproteinen den Desmogleinen und den Desmocollinen gebildet, die den Interzellularraum überspannen. Desmogleine (Dsg) aber auch verschiedene Desmocolline (Dsc) können nicht nur eine Calcium- abhängige, homophile - das heißt eine Bindung

mit dem Dsg2 bzw. Dsc der Nachbarzellen- sondern auch eine heterophile Cadherinbindung eingehen (Heupel et al. 2008; Spindler et al. 2009; Waschke et al. 2005). Im Darm kommen die desmosomalen Cadherine Dsg2 und Dsc2 vor (Laukoetter 2008). Ähnlich wie bei den Occludens- und Adherenskontakten sind an das C-terminale Ende der Cadherin Proteine gebunden, welche die Desmosomen mit dem Zytoskelett verknüpfen. Bei den Desomsomen verbinden Plakoglobin und Plakophiline diese mit den Intermediärfilamenten des Zytoskeletts.

Besonders gut erforscht sind die Desmosomen der Haut durch die Autoimmunerkrankung Pemphigus, bei Autoantikörper gegen desomsomale Proteine, wie Dsg1 und Dsg3, zur Blasenbildung und zum Ablösen der Haut führen (Spindler und Waschke 2011). Inwieweit die Erkenntnisse aus der Pemphigusforschung auf die Bedeutung der Desmosomen im Darm übertragbar sind ist noch unklar. Im Darm gibt es bisher keine Studien, welche die Rolle der desmosomalen Adhäsion für die Aufrechterhaltung der Darmbarriere untersucht haben. In verschiedenen Übersichtsarbeiten (Turner, 2009; Laukoetter, 2008) werden die Desmosomen als „Kleber“ der Zellen bezeichnet, ohne dass dies funktionell überprüft wurde. Aufgrund der Tatsache, dass Mäuse mit einer Knockoutmutation im Gen für Dsg2 nicht überlebensfähig sind (Eshkind 2002), liess sich bisher keine Aussage über die Bedeutung der desmosomalen Adhäsion in der Darmbarriere im Tiermodell treffen.

1.3. Regulation der Darmbarriere

Die Regulation der Darmbarriere geschieht über zwei verschiedene Ansatzpunkte. Eine Möglichkeit die Darmbarriere zu beeinflussen, ist die Veränderung der Expression, Rekrutierung und Konformation der Occludenskontaktproteine (Turner 2009).

Eine weitere Möglichkeit stellen Veränderungen der Adhäsion der Interzellularkontakte dar. Es ist aus Forschungen an der Endothelbarriere gut bekannt, dass Veränderungen des Actinzytoskeletts durch die Kopplung der Zellkontaktproteine mit dem Actinzytoskelett, mit Veränderungen der

Permeabilität der Barriere einhergehen (Spindler et al. 2010). Die kleinen GTPasen der Rho (Ras-Homologie-Familie) und die Myosinleichtkettenkinase (MLCK) spielen hierbei eine wichtige Rolle (Turner 2009).

Selbstverständlich sind diese beiden Ansatzpunkte in der Realität eng miteinander verwoben und werden hier nur aus didaktischen Gründen separat aufgelistet.

1.3.1. Regulation der Occludenskontaktproteine

Alle Prozesse, die eine Permeabilitätsveränderung der Darmbarriere verursachen, induzieren letztendlich Veränderungen an den Occludenskontakten. Veränderungen der Barriereigenschaften der Occludenskontakte führen zu einer Veränderung der Gesamtbarriere (Turner 2009).

Die Occludenskontakte können auf Ebene der Transkription, Rekrutierung und Konformation beeinflusst werden. Wie bereits erwähnt, ist die unterschiedliche Dichtigkeit der Occludenskontakte im Körper vor allem durch eine unterschiedliche Expression der Claudintypen erklärbar. So konnte gezeigt werden, dass beispielsweise eine vermehrte Expression von Claudin 4 barriere-stabilisierend wirkt (Groschwitz and Hogan 2009), während eine vermehrte Expression von Claudin 2 mit einer erhöhten Permeabilität korreliert. Dies ist vor allem aus der Forschung über die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen bekannt, bei denen die Interleukine 13 und 17 zu einem vermehrten Einbau von Claudin 2 in die Occludenskontakte führen (Heller 2005), sowie Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) und Interferon (INF) eine verringerte Expression von Claudin 3 und 4 bewirken.

Für den Einbau in die Occludenskontakte und für die Interaktion mit ZO1 müssen sowohl Occludin als auch Claudin phosphoryliert werden. Die benötigte Phosphorylierung geschieht an Serin und Threonin an der zytoplasmatischen Seite der Proteine und wird zum Beispiel durch die Proteinkinase C und die Thyrosinkinase c-Yes vermittelt (Chen et al. 2002). Andererseits können Phosphatasen, wie die Protein Phosphatase 2A diese Phosphorylierung

aufheben und damit die Rekrutierung der Proteine stören, was zu einer Verringerung der Barrierefunktion führt (Suzuki et al. 2009).

Ebenso konnte gezeigt werden, dass Occludin, JAMs und Claudin 4 bei der Pathogenese der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen clathrinvermittelt endozytiert werden, was ebenfalls zu einer Erhöhung der parazellulären Permeabilität führt (Ivanov et al. 2004).

1.3.2. Bedeutung des Actinzytoskeletts für Veränderungen der intestinalen Barriere.

Durch Veränderungen der Adhäsion und des Actinzytoskeletts ergeben sich Möglichkeiten die Darmbarriere kurzfristig zu ändern. Dies nutzt der Körper physiologisch, um beispielsweise auf eine erhöhte Glucosekonzentration im Lumen zu reagieren und mehr Glucose aufnehmen zu können (Turner, 2000).

1.3.2.1 Bedeutung der Rho- GTPasen

Es ist bekannt, dass nicht nur die mechanische Stabilität des Schlussleistenkomplexes und die Adhäsion maßgeblich für eine intakte Darmbarriere ist, sondern auch, dass Veränderungen des Actinzytoskeletts entscheidend für die Regulation der Darmbarriere sind. Es konnte gezeigt werden, dass die Rho-GTPasen eine Schlüsselrolle in der Regulation beider Mechanismen spielen. Vor allem über die Beteiligung der Rho-GTPasen in der Regulation der Endothelbarriere konnten in den letzten Jahren wichtige Erkenntnisse gewonnen werden (Spindler et al. 2010). Die Rho-GTPasen (Guanosintriphosphatase) zählen zu den Ras (Rat Sarcoma)-homologen GTPasen. Bis jetzt sind 23 verschiedene Subtypen der Rho-GTPasen beschrieben (Bustelo et al. 2007), von denen die am besten charakterisierten Rho-GTPasen RhoA, Cdc42 und Rac1 sind (Hall 1992; Lamarche et al. 1996; Lim et al 1996; Spindler et al. 2010).

Rho-GTPasen haben eine Größe von 21-25 kDa, die eine Vielzahl von Prozessen in der Zelle steuern können. Man unterscheidet bei den Rho-GTPasen einen aktiven, an der Zellmembran gebundenen Konformationszustand, bei dem GTP gebunden ist und einen inaktiven GDP-

gebundenen Konformationszustand im Zytosol (Hall 1990). Im aktiven Zustand könne die Rho-GTPasen über zwei „switch“ Regionen Effekte an ihren Zielproteinen auslösen. Allein für RhoA, Cdc42 und Rac1 sind bereits über 50 Effektorproteine identifiziert worden. Dabei handelt es sich unter anderem um Proteinkinasen (Serin/Threoninkinasen und Tyrosinkinasen), Lipidkinasen, Phospholipasen, Oxidasen und Proteine zur Regulation des Zytoskeletts (Hall 2005).

1.3.2.2. Regulation der Rho-GTPasen

Die Rho-GTPasen besitzen eine intrinsische Hydrolyseaktivität, die nach einer Zeit GTP zu GDP hydrolysiert und damit vom aktiven in den inaktiven Konformationszustand überführt. Dieser Übergang ist durch drei Proteinklassen, den Guanin Nukleotid Dissoziationsinhibitoren (guanine nucleotide dissociation inhibitors, GDIs), Guanin Nukleotid Austauschfaktoren (guanine nucleotide exchange factors, GEFs) und GTPase-aktivierende Proteine (GTPase activating proteins, GAPs) reguliert (Narumiya 1996; Spindler et al. 2010) (Siehe Abb. 3).

GEFs katalysieren das Ablösen von GDP. Da im Zytosol zehnmal mehr GTP als GDP vorhanden ist, kommt es häufiger zur Bindung von GTP und damit zur Aktivierung der GTPasen. Insgesamt wurden bis heute 70 verschiedene GEFs im humanen Genom identifiziert (Heasman und Ridley 2008). Diese regulatorischen Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Übertragung von Informationen von extrazellulär nach intrazellulär. Beispielsweise werden Informationen von Tyrosinkinaserzeptoren über GEFs auf die Rho-GTPasen übertragen (Yang und Kazanietz 2007).

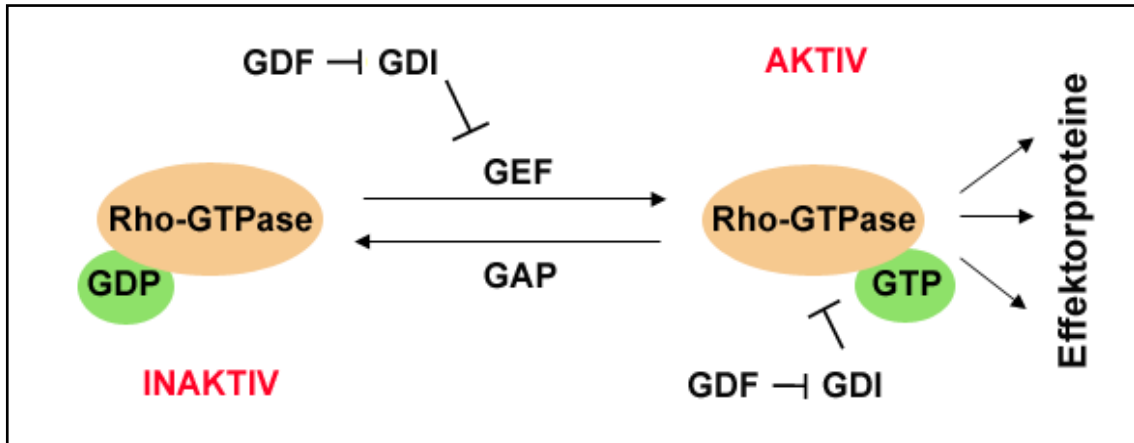


Abbildung 3: Regulation der Rho-GTPasen

Schema der Regulation der Rho-GTPasen. GEFs katalysieren die Überführung der Rho-GTPasen in ihren aktiven Zustand, während GAPs sie wieder in ihre inaktive Form überführen. GDIs hemmen GEFs und wirken direkt auf die Rho-GTPasen. GDFs stoppen diese Inhibition (modifiziert nach DerMardirossian und Gary M. Bokoch 2005).

GAPs verstärken die intrinsische Hydrolyse Fähigkeit der Rho-GTPasen und führen damit zu einer insgesamt verringerten Aktivität der Rho-GTPasen. Im humanen Genom sind derzeit über 80 verschiedene GAPs bekannt (DerMardirossian und Bokoch 2005).

Drei GDIs wurden bisher beschrieben. Über drei Mechanismen führen die GDIs zu einer Inaktivierung der Rho-GTPasen. Ihr Name beschreibt den ersten Mechanismus: GDIs binden an Rho-GTPasen und verhindern die Dissoziation von GDP und inhibieren gleichzeitig die Wirkung der GEFs. Des Weiteren wirken sie an aktiven GTP-gebundenen Rho-GTPasen und verhindern Interaktionen mit deren Zielproteinen. Drittens hemmen sie den Lokalisationswechsel der Rho-GTPasen vom Zytosol an die Zellmembran. Durch diese Mechanismen gelingt es den GDIs Rho-GTPasen über einen längeren Zeitraum still zu legen. Auch über die GDIs ist es möglich, extrazelluläre Informationen ins Zellinnere weiterzugeben. So wurden GDI Dissoziationsfaktoren (GDI displacement factors GDF) identifiziert, die nach einer Aktivierung durch den Neutropin Rezeptor zu einer Dissoziation der GDIs

von den Rho- GTPasen führen und dadurch diese wieder reaktiviert werden (DerMardirossian und Bokoch 2005).

Von den vielen Funktionen der Rho-GTPasen führt vor allem ihre Beeinflussung des Zytoskeletts zu starken Veränderungen der Darmbarriere. Insbesondere viele Virulenzfaktoren von Bakterien nutzen diese Effekte der Rho-GTPasen und bewirken damit eine Veränderung der Barriestabilität, um diese Barriere überwinden zu können (Groschwitz and Hogan 2009). Im Folgenden werden die Effekte der Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 genauer erläutert.

1.3.2.3. Effektorproteine der Rho-GTPasen

RhoA beeinflusst das Actinzytoskelett, indem es die Actin-Myosin Kontraktion und die Actinpolymerisation reguliert. Die Actin-Myosin Kontraktilität wird über die zwei Serin/Threoninkinasen, die Rho-associated coiled coil Kinasen (ROCK I und II) vermittelt. Über ROCK und direkte Effekte inaktiviert RhoA die Myosin Leichtketten Phosphatase (Myosin light chain phosphatase MLCP) durch Phosphorylierung der MLCP (Amano et al. 1996; Kimura et al. 1996). Dadurch erhöht sich die Anzahl phosphatgebundener Leichtketten, was zu einer vermehrten Bildung von Stressfasern und damit zu einer erhöhten Kontraktilität des Actinzytoskeletts führt. Für das gastrointestinale Epithel konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Kontraktilität des Actinzytoskeletts zu einer Erhöhung der parazellulären Permeabilität führt (Turner 2009).

Die Beeinflussung der Actinpolymerisation geschieht über das RhoA Zielprotein mammalian Diaphanous protein 1 (mDia). Eine Aktivierung von mDia vermittelt über zwei Mechanismen eine vermehrte Actinpolymerisation. Zum einen erhöht es über Profilin die Polymerisation von G-Actin, zum anderen kann sich mDia an das Plusende der Actinfilamente binden und verhindert damit das „capping“ der Filamente bspw. durch Gelsolin, das eine weitere Actinpolymerisation verhindern würde (Bishop and Hall 2000).

Rac1 und Cdc42 werden oftmals als Gegenspieler von RhoA angesehen. Über die Serin/Threoninkinase der PAK Familie (p21-aktivierte Kinasen) hemmen Rac1 und Cdc42 die Myosin Leichtketten Kinase (*myosin light chain kinase* MLCK). Im Gegensatz zu RhoA führt eine Aktivierung von Rac1 und Cdc42

damit zu einer verminderten Anzahl phosphorylierter Leichtketten und damit zu einer verminderten Kontraktilität und Stressfaserbildung (Bokoch 2003). Des Weiteren führen PAKs zu einer Aktivierung der Lim Kinase, die Cofilin inhibiert. Dadurch führen Rac1 und Cdc42 zu einer Stabilisierung der Actinfilamente (Ridley 2001). Ein weiterer Effekt von Rac1 und Cdc42 wird über Arp2/3 (Actin related Protein), dass von Rac1 über IRSp53 (*insuline receptor substate p53*) in Verbindung mit WAVE (*Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin-homologous protein*) (Schwartz 2004), von Cdc42 direkt mit seinem Effektor WASP (Wiscott-Aldrich-Syndrom-Protein) vermittelt. Diese beiden Komplexe aus WASP/Arp2/3 und WAVE/Arp2/3 führen jeweils zu einer vermehrten Actinpolymerisation.

Viele pro- inflammatorische Mediatoren, aber auch physiologische Regulationssysteme verändern vor allem die Aktivität der Myosin Leichtketten Kinase. Dies kann auch über eine Veränderung der Rho-GTPasen geschehen. Die meisten pro- inflammatorischen Mediatoren wie TNF-alpha und INF interagieren aber entweder direkt mit der MLCK oder beeinflussen die Expression der MLCK (Groschwitz and Hogan 2009). Physiologisch ist es beispielsweise notwendig, dass bei einem erhöhten Nahrungsangebot im Darmlumen die Barrierestabilität abnimmt, damit neben der Na⁺ Kotransport-vermittelten Glucoseaufnahme auch parazellulär Nährstoffe resorbiert werden können. So führt eine Aktivierung der Na⁺ D-Glucose Cotransporter im menschlichen Jejunum ex vivo zu einer direkten Erhöhung der Aktivität der MLCK und damit zu einer vermehrten Kontraktilität des Akin Myosin Systems (Berglund et al. 2001).

Es werden mehrere Mechanismen vermutet, wie eine Permeabilitätssteigerung durch eine Erhöhung der Kontraktilität erklärbar ist. Am einfachsten ist eine mechanistische Erklärung, dass durch Zellkontraktion die Interaktion des Schlussleistenkomplexes mechanisch gelockert wird. In den letzten Jahren konnte aber auch gezeigt werden, dass durch die Aktivierung der MLCK die Junctionsproteine direkt beeinflusst werden (Yu 2010)

Die Rolle der Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 in der Regulation der Darmbarriere konnte bisher noch nicht abschließend geklärt werden. Es ist gut bekannt, dass die Rho-GTPasen eine wichtige Rolle in der Regulation der Zell-Zell Kontakte spielen (Nusrat et al. 1995; Gerhard et al. 1998; Hopkins et al. 2003; Kapus and Szaszi 2006). Allerdings blieb ihre Rolle in der Regulation der intestinalen Barriere noch unklar, da über die Bedeutung der einzelnen Rho-GTPasen unterschiedliche Ergebnisse publiziert wurden. So postulierten Nusrat et al. (Nusrat et al. 1995), dass die eine Inhibition von RhoA zu einer Barriere destabilisierung führt. Andererseits zeigten Hopkins et al. (Hopkins et al. 2003), dass eine Aktivierung der Rho- GTPasen ebenfalls zu einer Destabilisierung der Barriere führt. Deswegen wurde postuliert, dass ein adäquates Gleichgewicht der Rho- GTPasen nötig sei, um eine intakte Darmbarriere zu garantieren (Shen and Turner 2006).

1.4. Fragestellung

Die vorliegende Arbeit hatte zum einen das Ziel, die Bedeutung desmosomaler Adhäsion für die Darmbarriere zu untersuchen. Hierbei wurde untersucht welche Bedeutung die Dsg2- vermittelte Adhäsion für die Integrität der Darmbarriere hat.

Ein zweites Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der einzelnen Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und cdc42 für die Regulation der Darmbarriere genauer zu analysieren um zu testen, ob die Aktivierung oder Inaktivierung der einzelnen GTPasen eine jeweils spezifische Rolle in der Regulation der Darmbarriere spielt

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

Für unsere Versuche verwendeten wir Caco2 Zellen (Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland), eine Zelllinie aus einem colorektalen Adenocarcinom, die erstmals in den 70iger Jahren etabliert wurde (Fogh et al. 1977). Caco2 Zellen haben die Eigenschaft sich nach Erreichen ihrer Konfluenz zu einem Monolayer aus Enterozyten-ähnlichen Zellen zu differenzieren. Aus diesem Grund werden sie häufig zu Resorptionsuntersuchungen von Medikamenten und Analysen von enteralen Transportsystemen genutzt (Sun and Yu 2004).

Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37° Celsius, 80% Luftfeuchte und 5% CO₂ in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM Sigma Aldrich, München), mit einer Konzentration von 1,8 mmol/L Ca²⁺ sowie 4,5 g/L Glucose unter Zusatz von 50 U/ml Penicillin G und 50 µg Streptomycin (P/S, Sigma, Deisenhofen) sowie 10% fetalem Kälberserum (FCS, Biochrom, Berlin), kultiviert. Ein Austausch des Mediums erfolgte dreimal pro Woche.

Die Zellen wurden nach Erreichen ihrer Konfluenz passagiert und im Verhältnis 1:6 auf T25 und T75 Zellkulturflaschen, Deckgläschen, Transwellfiltern und Elektroden ausgesät. Vier bis fünf Tage danach erreichten die Zellen erneute Konfluenz auf den Zellkulturmaterialien. Für die Passagierung wurde zuerst die Zelladhäsion durch die Cadherine geschwächt, indem durch Inkubation von von EDTA-Lösung (1% EDTA in PBS) für mindestens 20 Minuten Calcium Ionen durch Chelatbildung depletiert wurden. Anschließend wurden durch Zugabe der Serinprotease Trypsin (0,05% (w/v) Trypsin, 0,02% (w/v) EDTA in PBS) die Zellen gelöst und gründlich resuspendiert. Zur besseren Adhäsion und Kultivierbarkeit der Caco2 Zellen wurden diese auf gelatinieren Zellkulturmaterialien gehalten. Dies erfolgte durch eine sterile Inkubation von Gelatinelösung für 30 Minuten. Diese wurde danach abgesaugt und die Zellkulturmaterialien zweimal mit PBS gewaschen. Deckgläschen wurden zusätzlich mit einer 2 % Glutaraldehydlösung für 30 min unter sterilen Bedingungen quervernetzt (Schnittler et al. 1990). Das Glutaraldehyd wurde

abschließend abgenommen und die Deckgläschen wurden dreimal mit PBS gründlich gewaschen. Die Aufbewahrung gelatinierter und quervernetzter Deckgläschen erfolgte bei 4°C in PBS, welches mit 10000 U P/S versetzt wurde.

2.2. Bakterielle Toxine und Mediatoren

In Tabelle 1 sind die verwendeten bakteriellen Toxine und Mediatoren, die applizierten Konzentrationen und die Hersteller aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Toxine und Testreagenzien

Toxin / Testreagenz	Konzentration	Hersteller
CNF-1	300 ng/ml	Gudula Schmidt (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Freiburg)
CNF- γ	900 ng/ml	Gudula Schmidt (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Freiburg)
LT	300 ng/ml	Gudula Schmidt (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Freiburg)
Toxin B	300 ng/ml	Holger Barth (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Ulm)
C3TF	300 ng/ml	Holger Barth (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Ulm)
Y27632	30 μ M	Calbiochem, La Jolla, Californien, Vereinigte Staaten von Amerika

2.2.1. Bakterielle Toxine

Viele Virulenzfaktoren von Bakterien beruhen auf einer posttranslationalen Veränderung der Rho-GTPasen. Im Umkehrschluss können durch die Verwendung von bakteriellen Toxinen und Exoenzymen Aussagen über die Bedeutung der einzelnen Rho-GTPasen für die Aufrechterhaltung der Darmbarriere gewonnen werden. Im Folgenden möchte ich den molekularen Mechanismus und die Versuchsbedingungen unter Verwendung der einzelnen Toxine darstellen.

CNF1

Cytotoxic Necrotizing Factor 1 (CNF) wird von uropathogenen *E. Coli* Stämmen produziert. CNF1 aktiviert die Rho-GTPasen Rac, Cdc42 und Rho A durch

Deamidierung von Glutamin in Glutamat an der Stelle 63 für RhoA, bzw. 61 für Rac und Cdc42 (Lerm et al. 1999). Diese Deamidierung führt zu einer konstitutiven Aktivierung der GTPasen durch eine Hemmung sowohl der intrinsischen als auch der GAP-vermittelten Hydrolyse von GTP. Der Nutzen für das Bakterium ist unklar, da ein Großteil anderer bakterieller Toxine die Rho-GTPasen inaktiviert, allerdings induziert CNF1 die Bildung von Actin Stressfasern in Epithelien (Fiorentini et al. 1997).

CNFy

Ein CNF1 strukturell sehr ähnliches Toxin wird von *Yersinia pseudotuberculosis* produziert. Allerdings führt CNFy zu einer selektiven Deamidierung von RhoA, während die Aktivität von Rac und Cdc42 unverändert bleibt. Damit führt CNFy zu einer selektiven Aktivierung von RhoA (Hoffmann et al. 2004).

LT

Letales Toxin (LT), aus *Clostridium sordellii* führt zu einer Inaktivierung von Ras und Rac durch eine Glykosylierung von Threonin an Position 35 mittels UDP-Glucose (Rawadi, 1999).

Toxin B

Toxin B, einer der Hauptvirulenzfaktoren von *Clostridium difficile*, führt, ähnlich wie LT, zu einer Glykosylierung von Rho-GTPasen (Just et al. 1995). Ziele sind allerdings RhoA, B, C, Rac1-3, Cdc42, sowie TC10 (einem Mitglied der Cdc42-Untergruppe) mit Glykosylierung von Threonin 37 im Falle von Rho A sowie Threonin 35 bei Rac 1 und Cdc42 (Alfa et al. 2000).

C3 Transferase:

C3 ähnliche ADP- Ribosyl-Transferasen (C3TF) werden von mehreren Bakterien wie, *Clostridium botulinum*, *Clostridium limosum*, *Bacillus cereus*, und *Staphylococcus aureus*, produziert. Sie führen durch ADP Ribosylierung an der *switch*-Region zur Inaktivierung von RhoA, RhoB und RhoC, ohne die RhoGTPasen der Rac und Cdc42 Familie zu beeinträchtigen (Aktories et al. 2000).

2.2.2. Testreagenzien

Y27632

Y27632 inhibiert die Rho-assoziierte Protein Kinase (Rho-Kinase), einen der wichtigsten Effektoren von RhoA. Dadurch kann man zwar keine direkten Rückschlüsse ziehen, aber die Inhibition des „*RhoA/Rho Kinase pathways*“ gibt deutliche Hinweise auf die Bedeutung von RhoA (Uehata et al. 1997).

2.3. Antikörper

2.3.1. Primärantikörper

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die verwendeten Primärantikörper, die Hersteller und die Konzentrationen, in denen sie für Immunfluoreszenzen und Western Blots verwendet wurden.

Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Konzentration		Hersteller
	IF	WB	
a- E- Cadherin (monoklonal, Maus)	1 : 100	1 : 1000	BD Biosciences, Heidelberg, D
a- Occludin (polyklonal Kaninchen)	1 : 100	1 : 1000	Zymed/Invitrogen, Carlsbad, CA
a- Clauin1, 2, 3, 4 und 5 (polyklonal Kaninchen)	1 : 100	1 : 1000	Zymed/Invitrogen, Carlsbad, CA
a- ZO1, 2 und 3 (polyklonal Ratte)	1 : 100	1 : 1000	Zymed/Invitrogen, Carlsbad, CA
a- Dsg1 (monoklonal Maus)	1 : 100	1 : 1000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
a- Dsg2 (monoklonal Maus)	1 : 100	1 : 1000	Acris, Herford, D
a- Dsg2 (polyklonal Kaninchen)	1 : 100	1 : 1000	Prof. Leube Aachen, D
a- Dsg3 (monoklonal Maus)	1 : 100	1 : 1000	Zymed, San Francisco, CA

2.3.2. Sekundärantikörper

Tabelle 3 beschreibt die verwendeten Sekundärantikörper, die Hersteller und die Konzentrationen, in denen sie für Immunfluoreszenzen und Western Blots verwendet wurden

Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Konzentration		Hersteller
	IF	WB	
Ziege gegen Maus (gam)	1 : 600	1 : 3000	Dianova, Hamburg, D
Ziege gegen Ratte (gart)	1 : 600	1 : 3000	Dianova, Hamburg, D
Ziege gegen Kaninchen (garb)	1 : 600	1 : 3000	Dianova, Hamburg, D

2.4. Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Durch die indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie können spezifisch markierte Proteine in den Zellen beurteilt werden und damit Veränderungen der Lokalisation und Konzentration von Proteinen erkennen. Dies gelingt durch eine spezifische Bindung eines Primärantikörpers an Epitope der Zielproteine. Der Fc-Teil dieser gebundenen Primärantikörper wird wiederum von einem zugegebenem Sekundärantikörper erkannt, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Dieser Fluoreszenzfarbstoff kann durch Lichtstrahlen bestimmter Wellenlänge dazu angeregt werden, selbst Licht sichtbarer Wellenlänge zu emittieren. So leuchtet der Cyaninfarbstoffe Cy3 rot, Cy2 grün, Alexa Phalloidin 488 grün und DAPI blau.

Für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurden Zellen auf \varnothing 12 mm große, gelatinierte Deckgläschen im Verhältnis 1:6 ausgesät, und diese in einer Petrischale mit DMEM kultiviert. Nach Inkubation mit einem Testreagenz oder mit einem Toxin wurden die Zellen mit 2% Formalin über 10 min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend für 15 min mit 0,1% (w/v) Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die

Deckgläschen auf Objektträger überführt und unspezifische Antikörperbindungsstellen mit 20 µl BSA-NGS (0,1% (w/v) Rinderserumalbumin mit 10% (w/v) Ziegen Serum in PBS) für 30 Minuten bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach Entfernung des BSA-NGS wurden die Deckgläschen mit den entsprechenden Primärantikörpern, im oben genannten Verhältnis, in einer feuchten Kammer bei 4° Celsius inkubiert. Am Folgetag wurden die nicht gebundenen Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS über fünf Minuten entfernt und anschließend mit dem entsprechenden Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Inkubation mit Alexa Phalloidin 488 zur Visualisierung des Actin Zytoskeletts erfolgte ebenfalls in diesem Schritt für eine Stunde bei Raumtemperatur, die Inkubation mit DAPI (1: 3000) erfolgte für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS über jeweils 5 min wurden die Deckgläschen auf einen Objektträger mit einem Tropfen NPG [1% (w/v) n-propyl-Gallat mit 60% (v/v) Glycerin in PBS] mit der Zellseite nach unten verbracht. NPG vermindert das Ausbleichen des Präparates durch kurzwelliges Licht (Giloh and Sedat 1982). Die Immunfluoreszenzen wurden mit einem Confokalen Mikroskop (LSM, Zeiss, Jena) photographiert und die Bilder wurden anschließend mit Adobe Photoshop CS2 bearbeitet und zusammengestellt.

2.5. Western Blot

Western Blots dienen dem Nachweis des Vorhandenseins bestimmter Proteine oder dem Auftreten von Mengenveränderungen eines Proteins in einem Zellysate, welches mittels Probenpuffer gewonnen wurde (Renart et al. 1979).

2.5.1. Amidoschwarz Proteinbestimmung

Für eine Verwendung identischer Proteinmengen beim Western Blot muss zuerst eine Quantifizierung der Proteinmenge der einzelnen Proben mittels Amidoschwarz Proteinbestimmung erfolgen. Eine Proteingehaltsbestimmung mit Amidoschwarz (Zlatanova et al. 1994) erlaubt eine genaue Bestimmung in Anwesenheit hoher Konzentrationen an Detergentien und ermöglicht so die Messung von Proben, die in SDS-Probenpuffer gelöst sind.

Der Farbstoff Amidoschwarz 10B bindet unter sauren Bedingungen an die Amidostickstoffe des Proteingemisches und kann danach photometrisch bei 620 nm quantifiziert werden.

Zuerst wurde eine Zelluloseacetatfolie in 1 cm² große Felder aufgeteilt und mit zwei Metallklammern frei schwebend aufgehängt. Je 5 µl der mit SDS-Probenpuffer versetzten Proben, sowie als Proteinstandard BSA in den Konzentrationen 1,25; 2,5; 5; 10; 20 und 40 µg pro 10 µl wurden auf ein entsprechend beschriftetes Feld schlangenlinienförmig aufgetragen. Nach dem Trocknen wurde die Zelluloseacetatfolie in der Amidoschwarzlösung [0,5% (w/v) Amidoschwarz, 45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure und 45% (v/v) Aqua dest.] auf dem Schüttler 10 Minuten bei RT gefärbt. Danach wurde ein nicht-Protein gebundener Farbstoff mit der Entfärbelösung [47,5% (v/v) Methanol, 5% (v/v) Essigsäure und 47,5% (v/v) Aqua dest.] entfernt. Nach erneuter Trocknung wurden die einzelnen Streifen Eppendorf Caps mit der Lyselösung [2% (w/v) Trichloressigsäure, 16% (v/v) Ameisensäure, 2% (v/v) Essigsäure, 82% (v/v) Aqua dest.] für 30 Minuten bei 60° Celsius aufgelöst. Nach kräftigem Vortexen wurden die Extinktion der einzelnen Proben photometrisch bestimmt und anhand der Eichgeraden des BSA Standards die Proteinmenge quantifiziert.

2.5.2. SDS Page Gelelektrophorese

Um Aussagen über spezifische Proteine mittels Westernblot zu ermöglichen, müssen die einzelnen Proteine aus dem Proteingemisch des Zellysats voneinander getrennt werden. Dies geschieht mit der von Laemmli (1970) beschriebenen Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli 1970). Das Prinzip der SDS-PAGE besteht in der unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit von verschiedenen großen Molekülen durch eine Gelmatrix aus Acrylamid und Bisacrylamid in einem elektrischen Feld. Hierzu wird der zu untersuchenden Probe das anionische Detergens SDS (Natrium- Dodecyl- Sulfat) zugegeben. Die Anlagerung von SDS an das Protein führt einerseits zur Auflösung von Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine, andererseits zur Maskierung der unterschiedlichen Ladungen. Somit sind die Moleküle einheitlich negativ geladen und liegen in einem linearisierten Zustand vor. Die Denaturierung wird durch Erhitzen der Probe auf 95°C

unterstützt. Somit wird eine Beeinflussung des Ergebnisses durch die räumliche Struktur und der Ladung der einzelnen Proteine vermieden, und die Proteine wandern allein aufgrund ihrer Masse unterschiedlich schnell zur Anode.

Für die Auftrennung wurden vertikale Gelelektrophoresesysteme (Biorad, München) verwendet. Die Flachbettgele wurden zwischen zwei Glasplatten, die durch ca. 1 mm dicke Abstandhalter voneinander getrennt und in einer Halterung eingespannt waren, gegossen. Die Polymerisierung der Gele wurde durch Ammoniumpersulfat (APS) initiiert und Tetramethylethyldiamin (TEMED) diente als Katalysator. Zunächst wurde die 7,5 %, 10 % und 15 % Trenngellösung zwischen die Platten gefüllt und mit Wasser überschichtet, um Sauerstoff fernzuhalten und für eine gerade Oberfläche zu sorgen. Nach dessen Polymerisation wurde das Wasser wieder entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Taschenkamm, der für das Einfüllen der Proben für Aussparungen im Sammelgel sorgte, eingesetzt. Die Proben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 3:1 mit dreifach konzentriertem Probenpuffer mit DTT (Dithiothreitol, spaltet intra- bzw. intermolekulare Disulfidbrücken) vermischt und für 5 min auf 56°C erhitzt. Der Auftragspuffer enthielt Glycerin, damit die Gesamtprobe durch ihre höhere Dichte in die Taschen sank, und den Farbstoff Bromphenolblau zum visuellen Verfolgen des Auftrags- und Elektrophoreseprozesses. Neben den Proben wurde ein Größenmarker aufgetragen (Prestained protein ladder; PPL Marker; Fermentas, St. Leon – Rot). Die Elektrophorese wurde in 1 x Elektrophoresepuffer bei einer Spannung von 80 V im Sammelgel und bis zu 160 V im Trenngel durchgeführt, bis die durch den Farbstoff markierte Lauffront aus dem Gel herausgelaufen war. Anschließend wurde das Gel für einen Immunoblot genutzt.

2.5.3. Immunoblot

Nach der SDS- PAGE Gelelektrophorese werden die, der Größe nach aufgetrennten Proteine, auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond-C extra, Amersham, Braunschweig) geblottet. Dies geschieht im halbtrockenen Verfahren nach Towbin (Towbin et al. 1979) Dabei werden das SDS Gel und eine Nitrozellulosemembran ummantelt von jeweils zwei mit Transferpuffer [25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol] angefeuchteten Filterpapieren in

eine Horizontal-Blot-Kammer (Biorad, München) gelegt. Das Gel wird dabei auf der Seite der Kathode, die Membran auf der Seite der Anode platziert, da die Proteine im elektrischen Feld in Richtung Anode laufen. Der Transfer erfolgte bei 0,8 mA/cm² Gel über 90 min. Transferierte Proteine wurden zunächst zur Kontrolle des Transfers mit Ponceau für 1-2 min gefärbt. Nach Entfärben mit H₂O wurde das Proteinmuster sichtbar, und bei Bedarf konnten so verschiedene Spuren voneinander getrennt werden.

Die Detektion der Proteine erfolgt, ähnlich wie bei der Immunfluoreszenz Mikroskopie über eine Erkennung Protein-spezifischer Epitope durch den Primärantikörper und anschließend durch einen Zweitantikörper gegen den fc-Teil des Erstantikörpers.

Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran durch Schwenken in 5 % Magermilchpulver in PBS + 0,05 % Tween für 30 Minuten blockiert. Danach wurde die Membran mit Erstantikörper in oben genannten Konzentrationen über Nacht bei 4° Celsius inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde die Membran bei Raumtemperatur in 5 % Magermilch in PBS + 0,05 % Tween verdünnten Zweitantikörper geschwenkt. An diesen Zweitantikörper ist eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, die eine Reaktion von Luminol, in Gegenwart von H₂O₂, zu Carbonyl katalysiert. Bei dieser Reaktion werden Photonen frei, die mit Hilfe einem photosensiblen Röntgenfilm sichtbar gemacht werden. Dafür wird zuerst nicht gebundener Zweitantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS + 0,05 % Tween abgewaschen und anschließend die Nitrocellulosemembran für eine Minute in einer 1:1 Mischung von ECL I Lösung (enthält Luminol) und ECL II Lösung (enthält H₂O₂) inkubiert. In einer Dunkelkammer wurde die Membran in eine lichtundurchlässige Röntgenkassette gelegt, mit einem Röntgen Detektionsfilm bedeckt und je nach Intensität des ECL-Signals entsprechend lange belichtet. Abschließend wurde der Röntgenfilm für 1 min in der Entwicklerlösung gebadet, kurz in Aqua dest. geschwenkt und daraufhin für eine Minute in die Fixierlösung verbracht. Anschließend erfolgte die Trocknung, Digitalisierung und Auswertung.

2.6. GLISA

Ein GTPase-linked immunosorbent assay (GLISA, Cytoskeleton Inc., Denver, USA) ist eine spezielle Form des ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), der dazu dient die Konzentration aktiver (d.h. GTP-gebundener GTPasen) Rho-GTPasen zu messen. Ein GLISA ermöglicht damit eine detaillierte Aussage über die Aktivität einer Rho-GTPase in einem Zelllysate und dadurch können genaue Aussagen über die Bedeutung der Rho-GTPasen getroffen werden (Schlegel und Waschke 2009). Eine 96-well Platte wurde vom Hersteller mit Effektormolekülen beschichtet (PAK für Rac1 und Cdc42, Rhotekin für Rho A). Nur aktive, GTP-gebundene GTPasen binden an ihre Effektormoleküle. Für die GLISAs wurden die Zellen in 35mm Petrischalen ausgesät und gegebenenfalls mit Toxinen und Mediatoren inkubiert. Nach dem Waschen mit 0° C kaltem PBS wurden die Zellen unter Zugabe von Lysepuffer abgeschabt und lysiert. Durch Zentrifugation für 2 min bei 15000g und 4°C konnte die Lysatfraktion gewonnen werden. 10µl des Überstands wurden zur Proteinkonzentrationsbestimmung genutzt, der Rest bei -70°C Schock gefroren, um eine Veränderungen der Rho-GTPasen Aktivität bei RT zu verhindern. Nach erfolgter Proteinbestimmung wurden Proben von je 50µl mit identischer Proteinkonzentration durch die Zugabe von Lysepuffer hergestellt und in die entsprechenden Wells hinzugefügt. Als Positiv- bzw. Negativkontrolle diente nicht hydrolysierbares Rac1 bzw. Rho A. Bei 4°C und 400 rpm für 30 min auf dem Schüttler konnten aktive Rho-GTPasen an ihre Effektorproteine binden. Nicht gebundene Rho-GTPasen wurden anschließend mit Waschpuffer bei RT durch zweimaliges Waschen entfernt. Zur besseren Bindung des Erstantikörpers wurde jede Probe mit 200µl Antigen Präsentationspuffer für zwei Minuten bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden 50 µl des Rho A- oder Rac 1- Erstantikörpers (1:200 verdünnt in Antikörper-Verdünnungspuffer) in jede Vertiefung gegeben und dies für 45 min bei RT auf einem Mikroplatten-Orbitalschüttler bei 400 rpm belassen. Wie beim Westernblot wurde anschließend überschüssiger Erstantikörper durch wiederholtes dreimaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt und danach 50 µl des HRP-gebundenen Zweitantikörpers (1:100 verdünnt) zugegeben. Dieser inkubierte erneut 45 min

bei 400 rpm und RT. Nach letztmaligem dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde 50µl der HRP Detektionslösung für 15 Minuten und 37° C zugegeben, welche HRP ermöglicht Chemolumineszenz zu erstellen. 50µl HRP-Stopplösung beendete die Reaktion und so konnte bei 490 nm mittels eines Mikroplattenspektrometers (Sunrise, Tecan GmbH, Crailsheim Germany) die entstandene Chemolumineszenz detektiert werden.

2.7. Dispaseassay

Der Dispaseassay ermöglicht Aussagen über die mechanische Stabilität der Zell- Zelljunctionen. Im Assay werden die Zellen mechanischem Stress ausgesetzt und anschließend die entstanden Zellfragmente gezählt (Calautti et al. 1998). Für den Dispaseassay wurden die Caco2 Zellen auf eine 12-well Platte ausgesät und im Stadium C14, nach ihrer Differenzierung, mit verschiedenen Toxinen und Mediatoren inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und bei 37° C für 30 Minuten mit Dispase II (2.4 U/ml, Sigma) behandelt. Danach wurde die Dispaselösung vorsichtig abgenommen und die Zellen in 0,5ml PBS aufgelöst. Dann wurden die Zellen durch zehnmalsiges Pipettieren mit einer 1ml Pipette mechanischem Stress ausgesetzt. Schließlich wurde die Dissoziation der Enterozyten durch manuelles Zählen der Zellfragmente unter dem Mikroskop in drei definierten Gebieten quantifiziert. Der Dispaseassay wurde für jede Bedingung in vierfacher Ausfertigung fünfmalig durchgeführt und der Mittelwert der Zellfragmente mit den Fragmenten unter Kontrollbedingungen verglichen.

2.8. Messungen des transepithelialen elektrischen Widerstandes

Eine Methode funktionelle Barriereveränderungen der Epithelschicht kontinuierlich zu quantifizieren, stellen Messungen des transepithelialen elektrischen Widerstandes (transepithelial electric resistance TER) dar (Tiruppathi et al. 1992, Kiliani et al. 2004, Schlegel et al. 2009).

Der TER wurde mit Hilfe des ECIS 1600R (Applied BioPhysics Inc., USA) bestimmt. Dieses Gerät misst mit 40 Elektroden auf einer Fläche von 0,15 cm² die Spannung über dem Caco2 Monolayer bei einer Stromstärke von 1µA bei

400 Hz. Die Stromleitung durch den Caco2 Monolayer geschieht hierbei über Ionen, die sich im Medium befinden. Aus dem Spannungsabfall kann der elektrische Widerstand des Systems bestimmt werden. Für die Leitfähigkeit ist vor allem die parazelluläre Diffusion der Ionen verantwortlich. Deswegen erlauben Messungen des TER Aussagen über die Veränderungen in der Epithelschicht. Ein Abfall des TER korreliert mit einer Erhöhung der parazellulären Permeabilität und umgekehrt.

Caco2- Zellen wurden auf die 8 wells der ECIS- Elektroden ausgesät und im Stadium nach ihrer Differenzierung genutzt, bzw. zur Messung der Veränderung der Permeabilität im Rahmen der Differenzierung der Caco2 Zellen die Zellen in verschiedenen Stadien der Zellkultur verwendet. Nach einem Mediumwechsel wurden 200µl Medium in die Vertiefung der Lochplatte gegeben und diese in die Messkammer eingespannt. Nach kurzer Äquilibration von 5-10 min wurden für weitere 45 min die Basalwerte der TER ermittelt. Danach wurden weitere 200µl Medium, das wahlweise Toxin oder Mediatoren enthielt, zugegeben. Kontrollen erhielten nur 200µl Medium. Sofort nach Zugabe wurde die Messung fortgeführt.

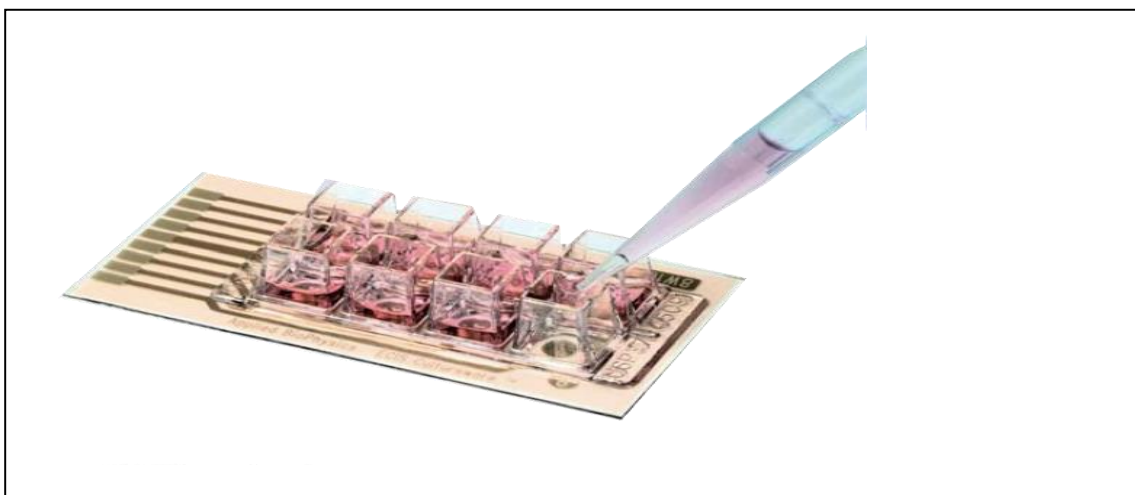


Abbildung 5: ECIS

Bild einer Goldelektrode zur Bestimmung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TER; <http://www.biophysics.com>)

2.9. Permeabilitätsmessung mittels Transwellfiltersystemen

Eine andere Möglichkeit die Permeabilität der Epithelbarriere zu beurteilen, ist die Quantifizierung des Flusses eines fluoreszierenden Farbstoffes durch eine Caco2 Zellschicht. Dafür wurden die Caco2 Zellen auf semipermeablen Filtern (0,4µm Porengröße; Falcon, Heidelberg) ausgesät, die eine 12-well Platte in ein oberes und unteres Kompartiment aufteilen (siehe Abb. 5). Hatten die Zellen ihre Differenzierung erreicht, wurden sie mit Toxinen oder Mediatoren inkubiert.

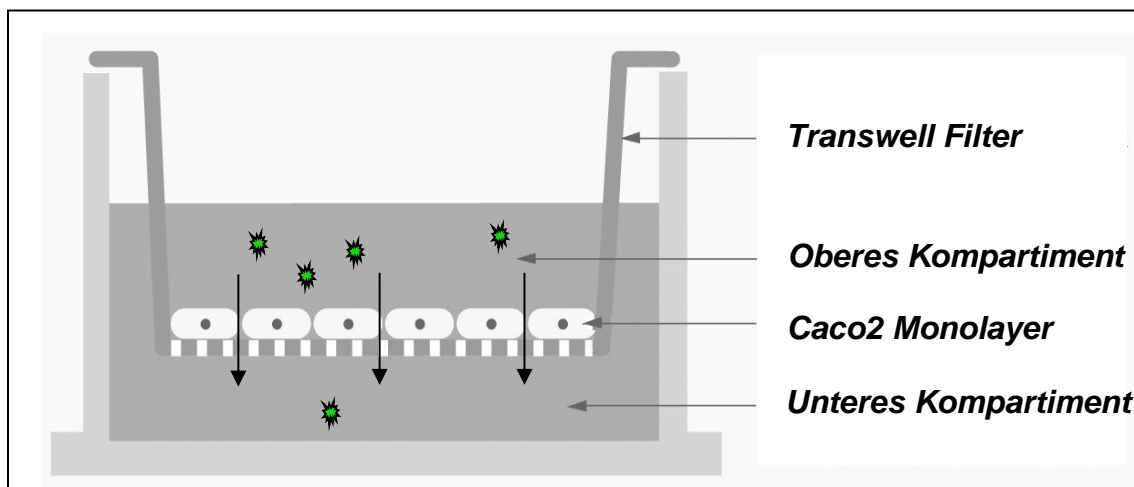


Abbildung 5: Transwellfilter

Schematische Abbildung des Transwellfiltersystems. FITC- Dextran wird in das obere Kompartiment pipettiert und anschließend alle 30 min Proben aus dem Unteren Kompartiment entnommen, um den Flux von FITC- Dextran durch den Caco2 Monolayer zu messen.

Zur Messung der Veränderung der Permeabilität im Rahmen der Differenzierung der Caco2 Zellen wurden die Zellen in den verschiedenen Stadien ihrer Differenzierung verwendet. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und mehrmals vorsichtig mit PBS gewaschen, damit alle Medienreste entfernt wurden, da evtl. verbleibendes Phenolrot aus dem Medium die Fluoreszenzmessung falsch positiv beeinflussen könnte. In das untere Kompartiment wurden danach 1,5 ml Medium ohne Phenolrot gegeben. In das obere Kompartiment wurden 1,35 ml Medium ohne Phenolrot und Toxin bzw. Mediator gefüllt. 150 µl einer 10 mg/ml FITC-Dextran (4 kDa, 70kDa)-Lösung wurden zusätzlich in das obere Kompartiment gegeben. Es

erfolgte sofort danach die erste Probenabnahme von 50µl aus dem oberen Kompartiment. Die entnommenen Proben wurden in eine 96-Loch-Platte überführt. Der Nullwert, also die erste Probennahme, wurde mit 50 µl Medium verdünnt. Die 12-Loch-Platte mit den Filtereinsätzen wurde bei 37°C auf einem horizontalen Schüttler weiter inkubiert. Danach erfolgte in 30 min-Abständen eine Abnahme von 100 µl Probe aus den unteren Kompartimenten in die 96-Loch-Platte. Nach zwei bis zu sechs Stunden Probenabnahme wurde die Fluoreszenz der 100 µl Aliquots der 96-Loch-Platte mit dem Victor2-Spectrophotometers (Wallac Viktor2, Perkin Elmer) bei einer Exzitation von 485 nm und der Emission von 535 nm gemessen.

2.10. Viabilitätsassay

Durch einen Viabilitätsassay kann das Überleben von Zellen nach Inkubation mit Mediatoren untersucht werden. Der MTT Assay nutzt eine Eigenschaft von Mitochondrien, die nur in vitalen Zellen dazu in der Lage sind, Formazan zu verstoffwechseln. Dafür wurden die Caco2 Zellen auf einer 96-well Platte ausgesät und anschließend mit den Toxinen und Mediatoren inkubiert. Anschließend wurden die Toxine und Mediatoren mit Hank's buffered saline solution (HBSS) abgewaschen und mit 100µl 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid (MTT, Sigma Aldrich; 5 mg/ml in HBSS) für eine Stunde bei 37° Celsius inkubiert. Das gelbe MTT wird in Mitochondrien in blaues Formazan umgewandelt und intrazellulär abgelagert. Überschüssiges MTT wurde mit dreimaligem Waschen mit HBSS entfernt und danach wurden die Zellen mit 100µl Lyse Puffer, aus 10% SDS, 50% DMSO, 2,5% Essigsäure, 2,5% HCl, pH 4.7 o/n bei 37°C, lysiert. Abschließend wurde die Farbänderung photometrisch (Wallac Viktor 2, Perkin Elmer, USA) bei 570nm gemessen und mit Kontrollbedingungen verglichen (Waschke et al. 2006).

2.11. Absorptionsversuche der Dsg2- Antikörper

Für die Testung der Spezifität der Auswirkungen der Dsg2- Antikörper, die gegen die Extrazellulärdomäne gerichtet sind, wurden Absorptionsversuche des Antikörpers durch Antigen- beschichtete Nickelperlen (Beads) (Invitrogen, Karlsruhe, D.) durchgeführt. Zur Herstellung der Beads wurden 50µl der Beads

zweimalig mit HBSS gewaschen und anschließend mit 10µg Dsg2- Fc Protein in 700µl HBSS, für 10 Minuten, bei Raumtemperatur inkubiert.

Das Dsg2- Fc Protein wurde durch Dr. Moritz Heupel generiert. Dafür wurde die DNS- Sequenz der Extrazellulärdomäne von Dsg2- gekoppelt an die Sequenz des Fc Fragments von humanem IgG mittels Efectene (Quiagen, Hilden, D) in CHO Zellen (Sammlung für Mikororganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland) transfiziert und stabil transfizierte Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie identifiziert. Aus dem Überstand der transfizierten Zellen wurde durch Protein A Agarose (Oncogene, Cambridge, MA) das Dsg2- Fc Protein aufgereinigt.

Nach viermaligem Waschen mit HBSS wurde mit dem Dsg2- Fc Protein beschichteten Beads mit Medium inkubiert, in welches vorher die polyklonalen bzw. die monoklonalen Antikörper gegen die ED von Dsg2 gegeben worden waren. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurden die mit Antikörper gesättigten Beads durch einen Magneten aus dem Medium entfernt. Der Erfolg der Absorption wurde durch Analyse des Mediums in Western Blot Analysen verifiziert.

2.12. Messungen der Junktionslänge

Um eine Aussage über die unterschiedlichen Junktionslängen bei den Caco2 Zellen in den unterschiedlichen Differenzierungsstufen treffen zu können, wurden auf einem Deckgläschen 4 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder fotografiert und anschließend die Zellzahl aus diesen Felder ausgezählt. Mittels ImageJ (Rasband, NIH, USA) wurden danach die Länge der Zellzellkontakte ausgemessen und aus der Division Gesamtjunktionslänge durch Zellzahl eine Durchschnittsjunktionslänge pro Gesichtsfeld berechnet.

2.12. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte über eine One way Anova mittels Sigma Stat 2.0 (Jandel Scientific Software, USA). In Abhängigkeit der Normalverteilung der Daten und des dadurch, durch das Statistikprogramm vorgeschlagenen Test, erfolgte ein Mann Withney Rank Sum Test, oder ein

Student T- Test (Microsoft Excel, USA). Statistische Signifikanz wurde angenommen für $p < 0,05$. Die Bilder wurden mittels eines confokalen Mikroskops (Zeiss, Jena) aufgenommen und die Bilder anschließend mit ImageJ (Rasband, NIH, USA) bzw. Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc, USA) bearbeitet.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Caco2 Zelllinie

Zu Beginn wurde untersucht, ob die Caco2 Zelllinie ein geeignetes in vitro Modell für die Darmbarriere darstellt. Caco2 Zellen wurden erstmals in den 70iger Jahren aus einem Colon Carcinom extrahiert. Sie haben die Eigenschaft einen Monolayer aus Zellen zu bilden und sich zu Enterozyten- ähnlichen Zellen zu differenzieren. Da differenzierte Caco2 Zellen in Abhängigkeit der Zellkulturdauer Barriereeigenschaften entwickeln, die der intestinalen epithelialen Barriere entsprechen, wurden diese zunächst untersucht. Wir bewerteten die Zellen zu den Zeitpunkten nach Erreichen der Konfluenz (C0) sieben Tage (C7) 14 Tage (C14) und 21 Tage (C21) nach Konfluenz anhand morphologischer und funktioneller Kriterien.

Zuerst erfolgten Immunfluoreszenzanalysen zur Charakterisierung des in vitro Zellkulturmodells (Abb. 6). Darin erkennt man, dass bereits zum Zeitpunkt der Konfluenz E-Cadherin (E-Cad) als Marker der Adherensjunctionen (Abb. 6 a-d) und Desmoglein 2 (Dsg2) für Desmosomen (siehe Abb. 6 e-h) regelmäßig an den Zellgrenzen lokalisiert waren. Dagegen zeigte die Immunfärbung der Occludenskontakte Proteine Occludin, Claudin 1 und ZO-1 zu diesem Zeitpunkt kaum ein Signal an den Zellgrenzen (Abb. 6 i, n, r). Nach sieben Tagen fanden sich einige Zellen mit einem linearen Signal an den Zellgrenzen, während andere noch Zellen noch ein lückenhaftes Signal aufwiesen (Abb. 6 j, o, s). Erst 14 Tage nach Erreichen der Konfluenz zeigte sich eine regelmäßige Verteilung der Occludensjunctionsproteine Occludin, Claudin 1 und ZO-1 an den Zellgrenzen (siehe Abb. 6 l, p, t). Die Immunfluoreszenzfärbungen 21 Tage nach Erreichen der Konfluenz zeigten keine Veränderung im Vergleich zu den Immunfärbungen zum Zeitpunkt C14.

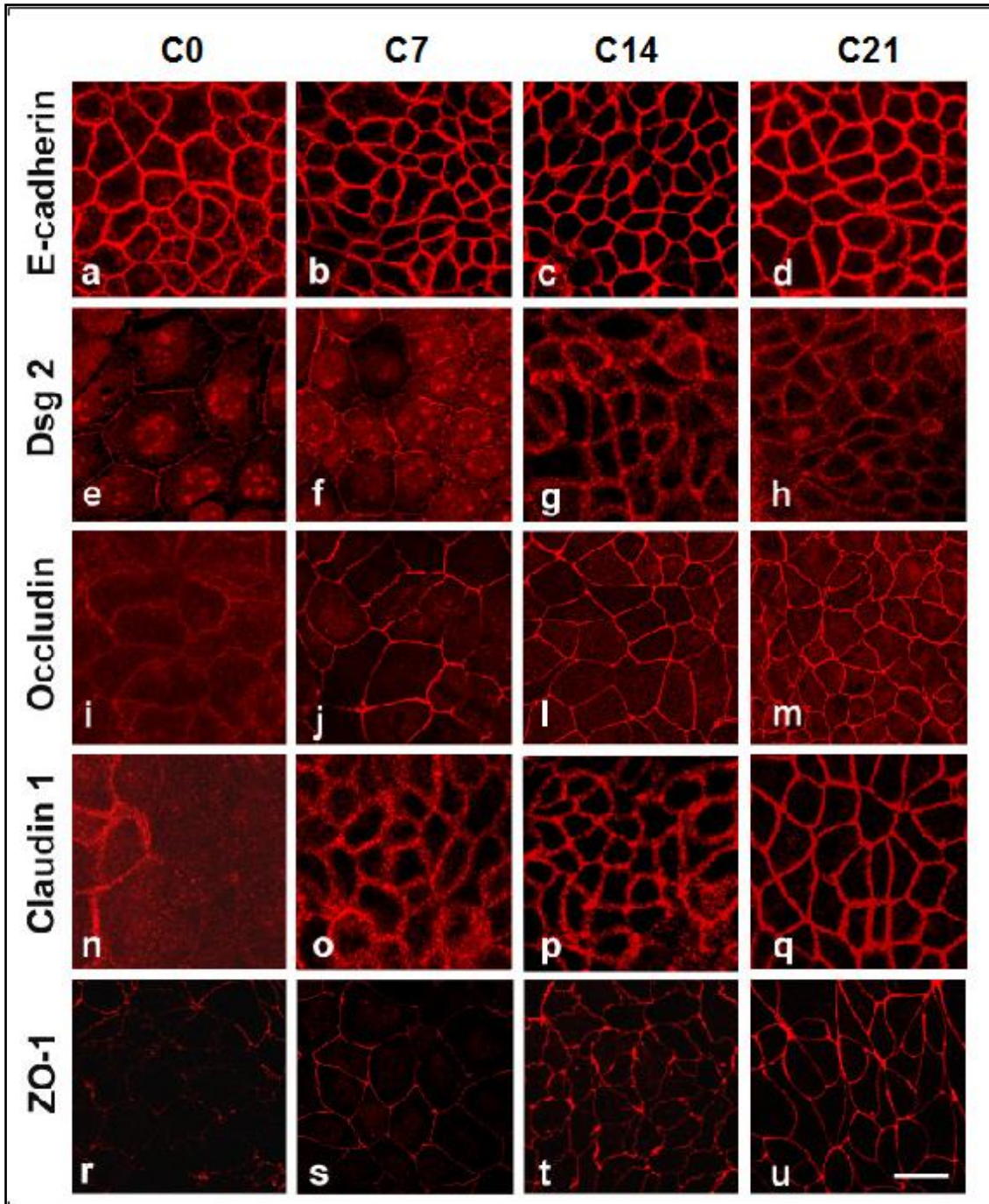


Abbildung 6: IF (Entwicklung der Junctionsproteine)

Immunfluoreszenzen der Junctionsproteine E- Cadherin (a-d), Dsg2 (e-h), Occludin (i-m), Claudin1 (n-q) und ZO-1 (r-u) im Verlauf vom Zeitpunkt der Konfluenz C0 bis zur vollständigen Entwicklung des Schlussleistenkomplexes zum Zeitpunkt C14 (Anzahl der Versuche $n > 4$; Maßstab: 20 μ m)

Anschließend wurde untersucht welche Claudine und Proteine der Desmogleinfamilie in Caco2 Zellen exprimiert werden. Immunfluoreszenzen zeigten, dass Claudin 1, 4 und 5, nicht aber Claudin 2 und 3 in Caco2 regelmäßig an den Zellgrenzen verteilt sind (Abb. 7 A). Western Blot Analysen der Proteine zeigten, dass aus der Familie der Desmogleine Dsg2 nicht aber Dsg1 und Dsg3 exprimiert werden (Abb. 7 B).

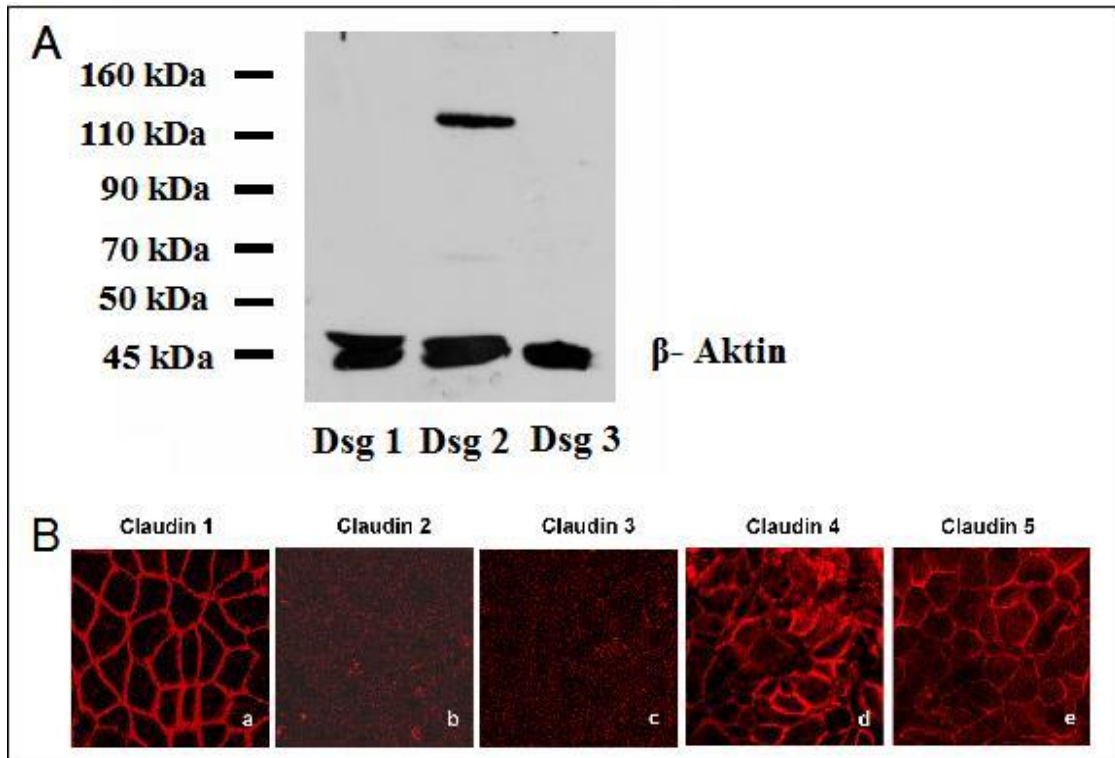


Abbildung 7: WB und IF (Claudin- und Desmogleinsubtypen)

A: Der Westernblot zeigt, dass Caco2 Zellen Dsg2 mit einer Größe von ungefähr 116kDa exprimieren. Dsg1 und Dsg3 kommen im Darm nicht vor. Als Ladekontrolle diente β -Actin. (Anzahl der Versuche n= 7).

B: Mit Immunfluoreszenzen untersuchten wir, welche Claudin-subtypen in Caco2 Zellen vorkommen. Man findet Claudin1, 4 und 5 (a,d,e). Claudin 2 und 3 wurden nicht angefärbt (Anzahl der Versuche n> 6)

In den Western Blot Analysen wurden das enterozytäre Markerprotein Villin sowie die Proteine E- Cadherin, Dsg2, Occludin, Claudin 1 und ZO-1 zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht (Abb. 8). Hierbei erkennt man, dass bereits zum Zeitpunkt der Konfluenz alle Proteine nachweisbar waren. In der

weiteren Differenzierung veränderte sich die Konzentration von E- Cadherin und Dsg2 nach Erreichen der Konfluenz nicht mehr, während die Konzentration der Occludenskontaktproteine Occludin und Claudin1 stetig anstieg. Hinweisend für eine vollständige Differenzierung ist auch der Anstieg der Konzentration des Enterozyten Markers Villin zum Zeitpunkt C14 im Vergleich zu C7.

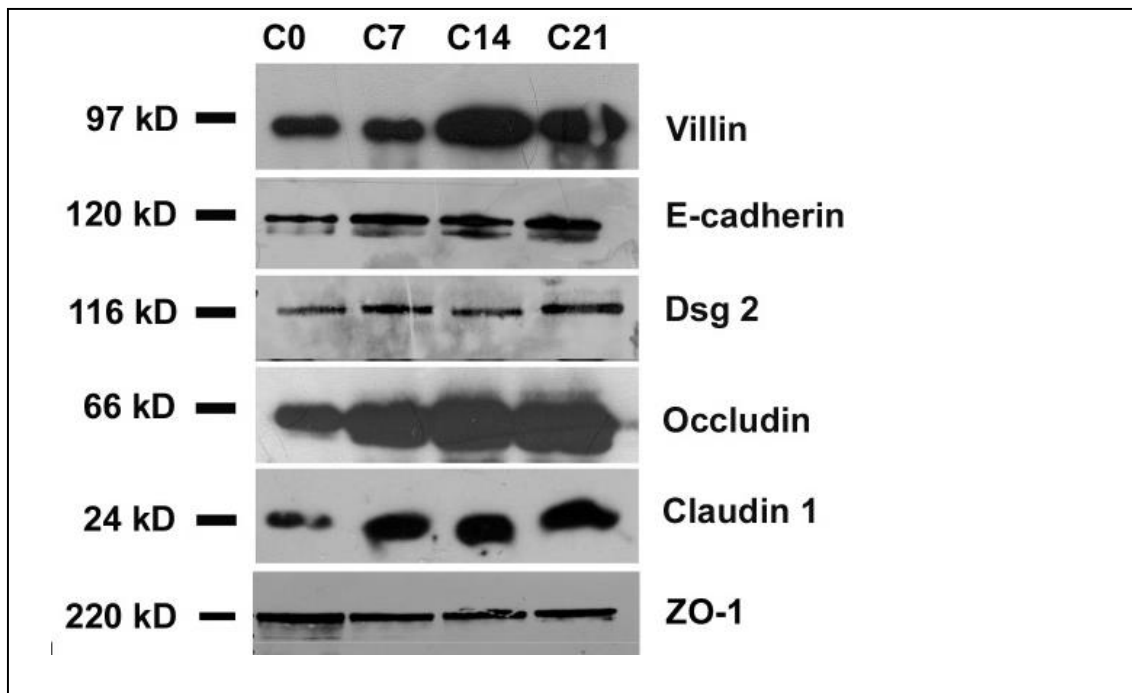


Abbildung 8: WB (Entwicklung der Proteinmenge)

Westernblots zeigten die Veränderungen der Proteinmenge von Villin, E-Cadherin, Dsg 2 Occludin, Claudin 1 und ZO-1 im Verlauf der Differenzierung vom Zeitpunkt C0 bis zum Zeitpunkt C21. Man erkennt insbesondere das Occludenskontaktprotein Occludin und der Enterozytenmarker Villin bis zum Zeitpunkt C14 ein verstärktes Signal im Western Blot zeigen (Anzahl der Versuche n>4).

Des Weiteren erfolgten funktionelle Messungen des in vitro Modells der Darmbarriere durch Messungen des Permeabilitätskoeffizienten mittels Transwellfiltern und Messungen des transepithelialen elektrischen Widerstandes. Der Permeabilitätskoeffizient (P_E) erreichte zum Zeitpunkt der Konfluenz für 70kDa FITC markiertes Dextran einen Wert von $1.6 \pm 0.23 \text{ cm/s} \cdot 10^{-6}$, wohin gegen der P_E bei 4kDa FITC Dextran einen signifikant

höheren Wert von $3.3 \pm 0.19 \text{ cm/s} \cdot 10^{-6}$ aufwies. Der P_E nahm im Verlauf der Differenzierung kontinuierlich, signifikant vom Zeitpunkt der Konfluenz über den Zeitpunkt C7 bis zum Zeitpunkt C14 ab, an dem für 70 kDa FITC Dextran ein P_E von $0.11 \pm 0.01 \text{ cm/s} \cdot 10^{-6}$ und für 4 kDa FITC Dextran ein P_E von $0.28 \pm 0.04 \text{ cm/s} \cdot 10^{-6}$ gemessen wurde. Diese P_E Werte veränderten sich zwischen den Zeitpunkten C14 und C21 nicht signifikant (siehe Abb. 9).

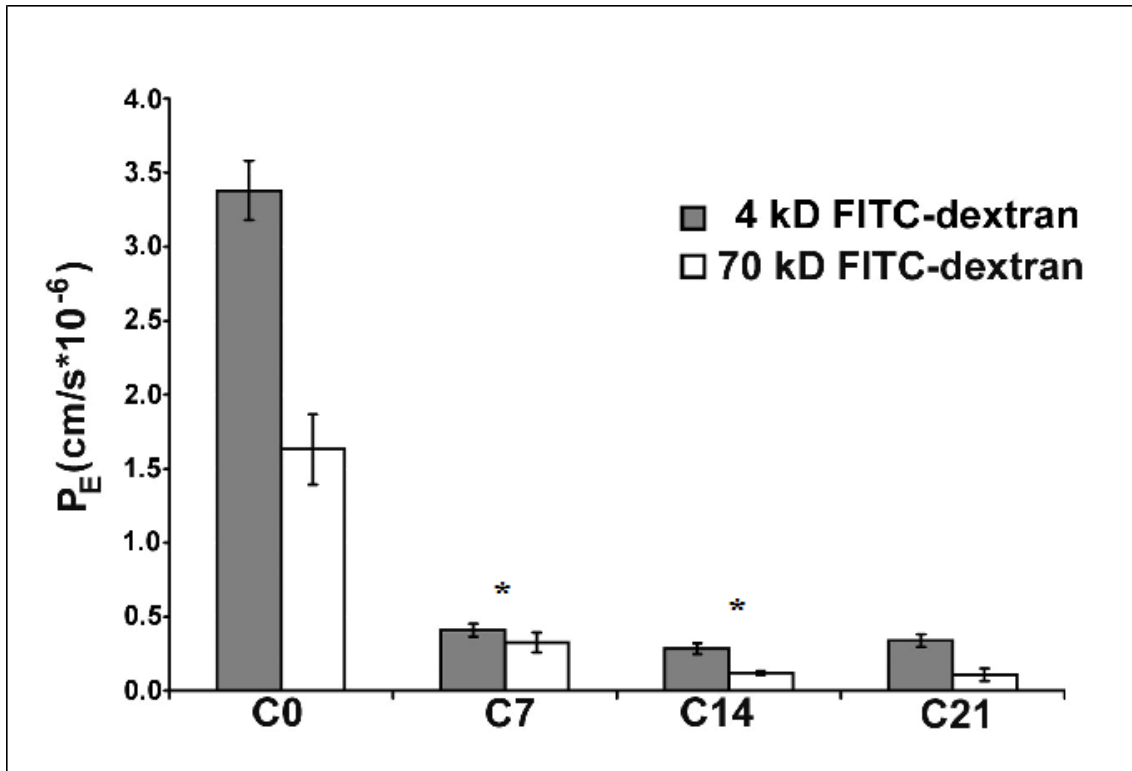


Abbildung 9: Transwell (Entwicklung des P_E)

Messungen des Fluxes von 4kDa bzw. 70kDa schwerem FITC- Dextran während der Differenzierung der Caco2 Zellen zu den Zeitpunkten C0 bis C21 (Anzahl der Versuche $n > 6$; * = Signifikanz gegenüber Kontrollen, Student t-test, $p < 0.05$)

Der TER stieg zum Zeitpunkt der Konfluenz auf einen Wert von $141 \pm 1 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (siehe Abb. 10). Im Verlauf der Differenzierung fiel der TER zunächst signifikant zum Zeitpunkt C7 auf $101 \Omega \cdot \text{cm}^2$, sowie zum Zeitpunkt C14 auf $92 \pm 0.2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ab, bevor er zum Zeitpunkt C21 wieder auf $113 \pm 0.6 \Omega \cdot \text{cm}^2$ anstieg.

Um diese unerwartete Beobachtung näher zu untersuchen, wurden zu den verschiedenen Zeitpunkten zufällige Gesichtsfelder fotografiert und die

Junktionslänge der einzelnen Zellen mittels Image J quantifiziert. Aus diesen Werten extrapolierten wir einen Wert für eine durchschnittliche Junktionslänge pro Zelle. Die geschätzte Junktionslänge nahm von C0 bis C14 um 230% zu und veränderte sich danach nicht mehr. Dies könnte eine Verringerung des TER im Verhältnis zu den vorausgegangenen morphologischen und funktionellen Messungen erklären (siehe Abb. 11).

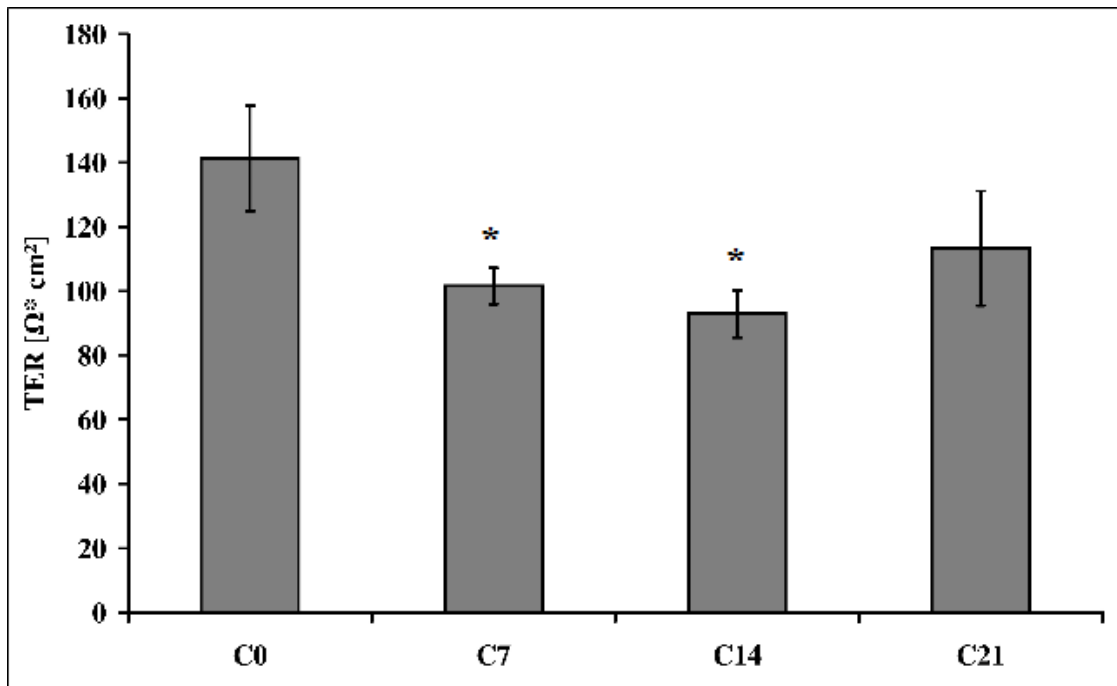


Abbildung 10: TER (Entwicklung der TER)

Der TER erniedrigte sich signifikant im Verlauf der Differenzierung und stabilisierte sich erst nach dem Zeitpunkt C14 (Anzahl der Versuche $n > 4$; * = Signifikanz gegenüber Kontrollen, Student t-test, $p < 0.05$)

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass CaCo2 Zellen 14 Tage nach dem Erreichen der Konfluenz vollständig differenziert sind, so dass wir für unsere Experimente immer Zellen verwendeten, die dieses Stadium erreicht hatten.

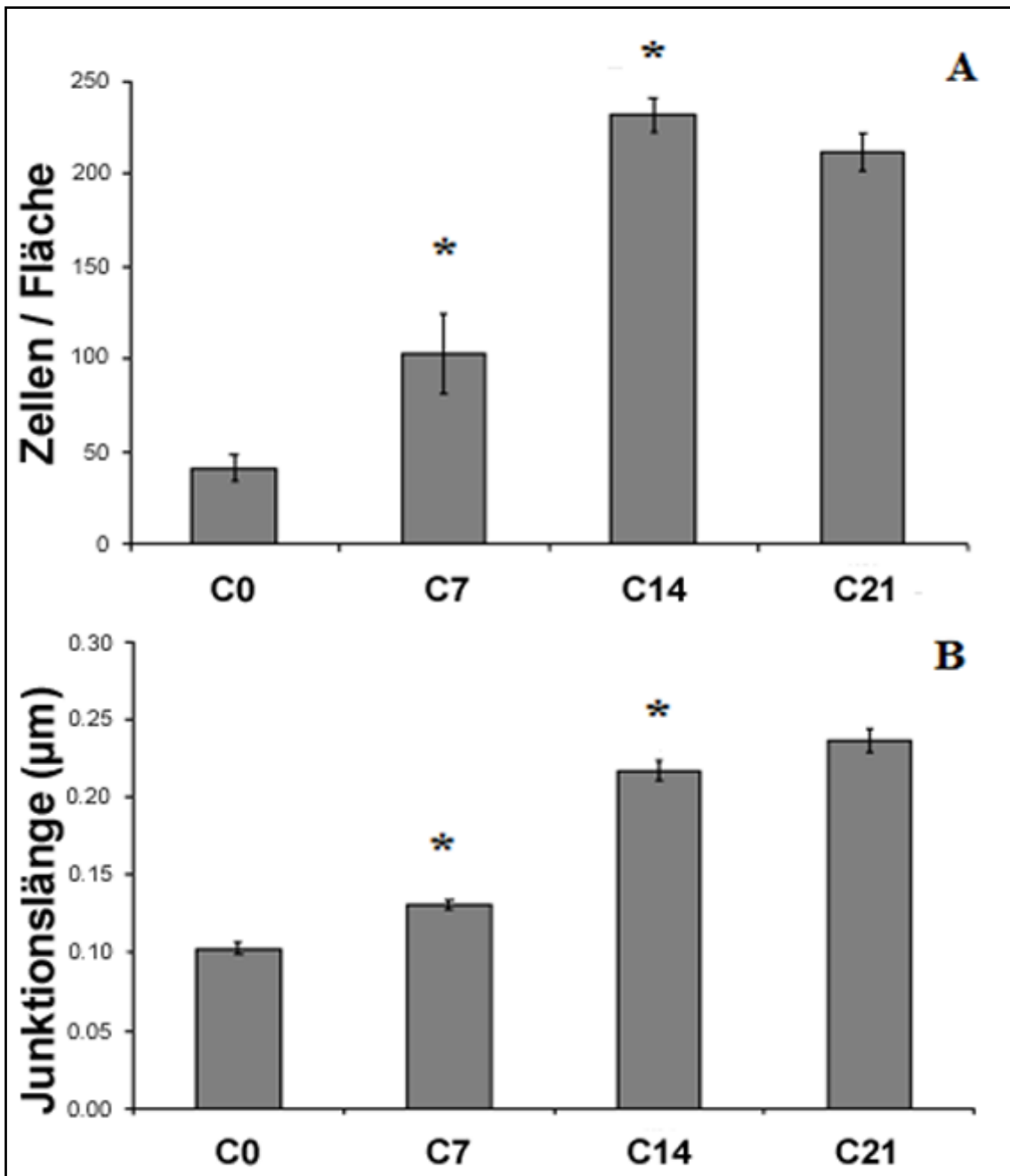


Abbildung 11: Entwicklung von Zellzahl und Junktionslänge

Anhand der Zellzahlen und Junktionslänge von zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern wurden die Werte für die Caco2 Zellen geschätzt. Im Verlauf der Entwicklung der Caco2 Zellen erhöhte sich sowohl die Zellzahl (Abb 11, A), als auch die Junktionslänge/ μm^2 (Abb 11, B) signifikant vom Zeitpunkt C0 bis zum Zeitpunkt C14. Dies könnte erklären, warum der TER im Verlauf der Charakterisierung initial abfällt. (Anzahl der Versuche $n > 4$; * = Signifikanz gegenüber Vorwert, Student t-test, $p < 0.05$)

3.2. Veränderung der Barrierefunktion durch Applikation von Dsg2 ED

Im zellfreien System mittels Atomkraftmikroskopie wurde gezeigt, dass die von uns verwendeten Antikörper gegen die Extrazellulärdomäne (ED) von Dsg2 in der Lage sind die desmosomale Adhäsion spezifisch zu inhibieren (Schlegel et al. 2010). Das Ziel der folgenden Versuche war nun, durch die Applikation von Antikörpern gegen die Extrazellulärdomäne von Dsg2 (Dsg2 ED) auf differenzierte Caco2 Zellen die desmosomale Adhäsion inhibieren und damit Aussagen über die Bedeutung der desmosomalen Adhäsion für die Darmbarriere zu gewinnen.

3.2.1. Applikation von Dsg2 ED erhöhte die Anzahl der Zellfragmente im Dispase-basierten Enterozyten Dissoziationsassay

Um die Bedeutung Dsg2-vermittelter Adhäsion für die interzelluläre Adhäsion und die mechanische Stabilität zu bestimmen, führten wir einen Dispase-basierten Enterozyten Dissoziationsassay durch. Als Kontrolle dienten Caco2 Zellen ohne vorausgegangene Applikation eines Antikörpers gegen die ED von Dsg2. Es erfolgte die Inkubation der differenzierten Caco2 Zellen mit, gegen die ED von Dsg2 gerichteten Antikörper für 24h. Diese Zellen wurden in einem Versuchsansatz mit einem polyklonalen Antikörper und in einem weiteren mit einem monoklonalen Antikörper gegen Dsg2 inkubiert. Zur Positivkontrolle wurde Caco2 Zellen mit EGTA inkubiert.

In der Kontrolle wurden durchschnittlich 8 ± 1 Fragmente des Zellmonolayers pro Gesichtsfeld gezählt (siehe Abb. 12). Durch die Applikation eines Antikörpers gegen die ED von Dsg2 erhöhte sich die Anzahl der Fragmente signifikant auf das $6.0 \pm 0,5$ -fache im Verhältnis zu den Kontrollen nach Inkubation mit einem polyklonalen, bzw auf das $5,5 \pm 0,5$ -fache der Kontrolle nach Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper (siehe Abb. 12). In der Positivkontrolle führte die Inkubation mit EGTA zu einer Erhöhung auf 115 ± 10 Fragmente pro Gesichtsfeld. Um zu beweisen, dass dieser Effekt spezifisch

durch die Wirkung des Antikörpers gegen die ED von Dsg2 und nicht auf etwaige Adjuvantien im Lösungsmittel des Antikörpers zurückzuführen waren, verringerten wir die Konzentration des Antikörpers gegen Dsg2 durch vorausgegangene Absorption des Antikörpers mittels Dsg2-fc-Konstrukt beschichteter Beads. Nach Reduktion der Konzentration des polyklonalen und monoklonalen Antikörpers gegen die ED von Dsg2 zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zellfragmentzahl im Dispaseassay auf das $3 \pm 0,3$ fache bzw. $3 \pm 0,1$ fache der Kontrollen (siehe Abb. 12).

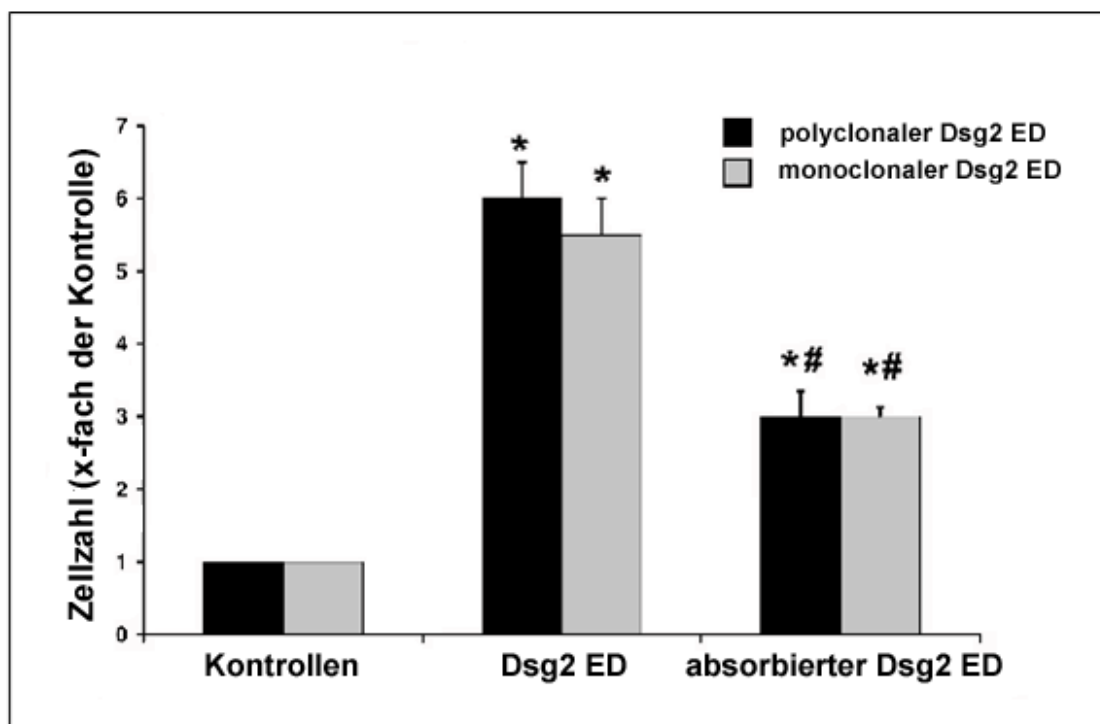
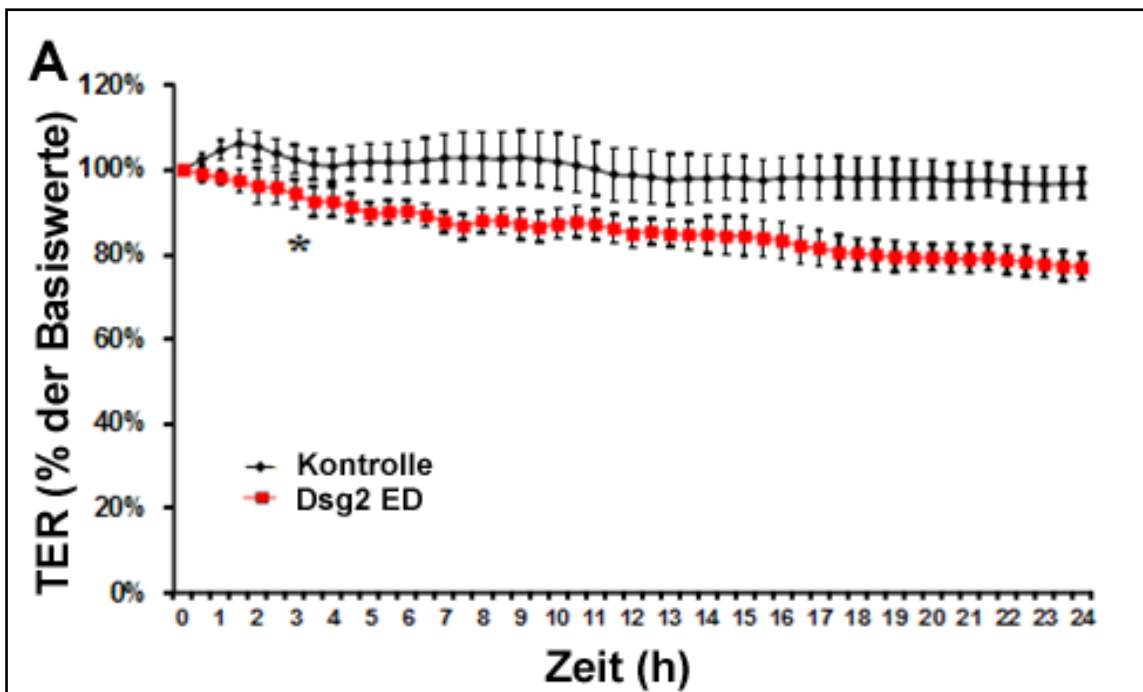


Abbildung 12: Dispaseassay

Im Dispaseassay erhöhte sich die Anzahl der Zellfragmente signifikant durch Applikation des Dsg2 ED. Dieser Effekt konnte durch eine vorausgegangene Absorption des Dsg2 ED mittels Beads signifikant reduziert werden. (Anzahl der Versuche $n > 6$; * Signifikanz gegenüber Kontrollen; # Signifikanz. gegenüber Dsg2 1:20, Student t-test, $p < 0.05$)

3.2.2. Applikation von Dsg2 ED verringerte den TER und erhöhte den P_E

Die Applikation des Antikörpers gegen die Extrazellulärdomäne von Dsg2 (Konzentration 1:20) führte zu einer signifikanten Reduzierung des TER. Im Falle des polyklonalen Antikörpers zeigte sich ein Abfall des TER auf $77 \pm 3\%$ im Verhältnis zur Kontrolle $97 \pm 3\%$ nach 24 Stunden, übereinstimmend führte die Applikation des monoklonale Antikörpers zu einer Reduktion auf $85 \pm 3\%$ nach 24 Stunden (siehe Abb. 13.)



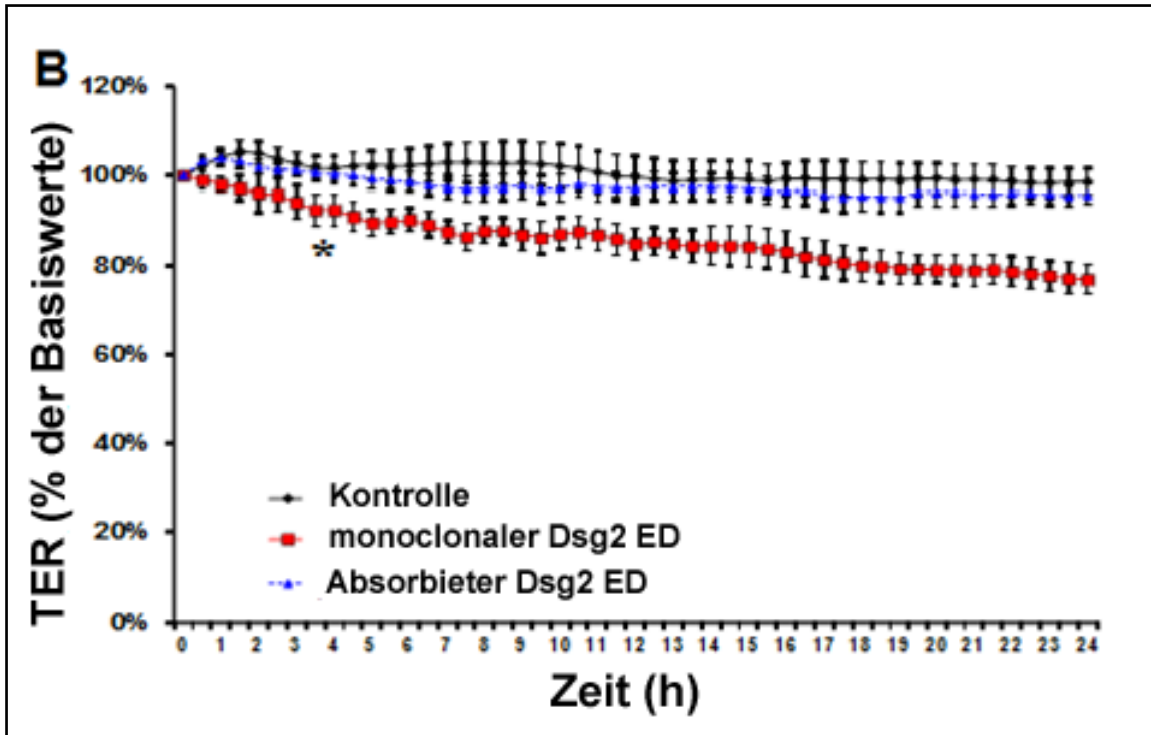


Abbildung 13: ECIS (Veränderungen des TER durch den Dsg2 ED)

Nach Applikation des Dsg2 ED fällt der TER signifikant auf 77% (A) respektive 85% unter Verwendung des monoklonalen Dsg2 ED (B) der Kontrollen ab. Wird die Antikörperkonzentration vor Applikation mit Dsg2-fc Konstrukt beschichteten Beads reduziert, verändert sich der TER nicht signifikant (Anzahl der Versuche $n > 6$ (A) $n = 4$ (B); * = Signifikanz gegenüber Kontrollen; Student t-test, $p < 0.05$).

Dagegen führte ein Antikörperserum, bei dem die Konzentration des Antikörpers durch Absorption mittels Dsg2 fc-Konstrukt beschichteter Beads reduziert wurde, zu keinem signifikanten Abfall des TER nach 24 Stunden (Siehe Abb. 13 B).

In Messungen des Fluxes von 4 kDa FITC Dextran zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Permeabilitätskoeffizienten auf $1,82 \text{ cm/s } 10^{-6} \pm$ im Vergleich zum Kontroll P_E von $0,28 \text{ cm/s } 10^{-6}$ (siehe Abb. 14).

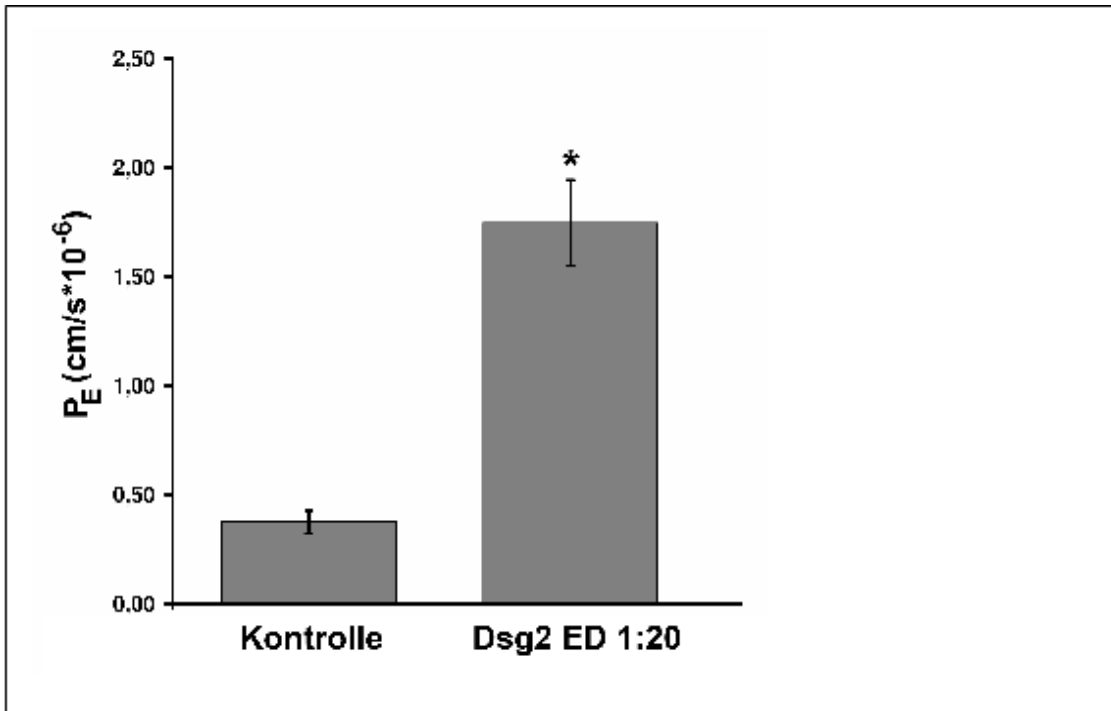


Abbildung 14: Permeabilitätsmessung (Dsg2 ED Antikörper)

Durch Applikation des Dsg2 ED steigt auch die Permeabilität von FITC- Dextran 4kDa signifikant auf $1,82 \text{ cm/s } 10^{-6}$ im Vergleich zu den Kontrollbedingungen, bei denen die Permeabilität $0,28 \text{ cm/s } 10^{-6}$ ist (Anzahl der Versuche $n=4$; * =Signifikanz gegenüber Kontrollen; Student t-test, $p < 0.05$).

3.2.3 Applikation von Dsg2 ED veränderte die Morphologie der Occludenskontakte

In Immunfluoreszenzen, die 14 Tage nach Konfluenz der Caco2 Zellen durchgeführt wurden, konnte man unter Kontrollbedingungen erkennen, dass man bei allen Junctionsproteinen ein lineares Signal an den Zellgrenzen sah (siehe Abb. 15 a, d, g, j). Die Applikation des Antikörpers gegen die Extrazellulärdomäne von Dsg2 (1:20) führte nach 24h zu einer Reduktion des Immunfluoreszenzsignals von Occludin (siehe Abb. 15b), Claudin 1 (siehe Abb. 15e), sowie ZO-1 Occludin (siehe Abb. 15h), von den Zellgrenzen. Interessanterweise wurde durch die Applikation des Antikörpers gegen die Extrazellulärdomäne von Dsg2 das Immunfluoreszenzsignal von E-Cadherin nicht verändert. Wie in der Kontrolle war auch nach Applikation der Antikörper das Immunfluoreszenzsignal weiterhin regelmäßig linear an den Zellgrenzen zu erkennen (siehe Abb. 15k). Die Effekte nach Applikation des Dsg2 ED in den Immunfluoreszenzen ließen sich auch nicht durch unspezifische Färbung durch den Sekundärantikörper erklären, wie wir anhand der Kontrollimmunfluoreszenzen, in denen wir nur mit dem Sekundärantikörper inkubierten, zeigen konnten.

Dieser Verlust korrelierte allerdings nicht mit einer Reduzierung der absoluten Proteinmengen, wie wir aufgrund von Western Blot Analysen zeigen konnten (siehe Abb. 16).

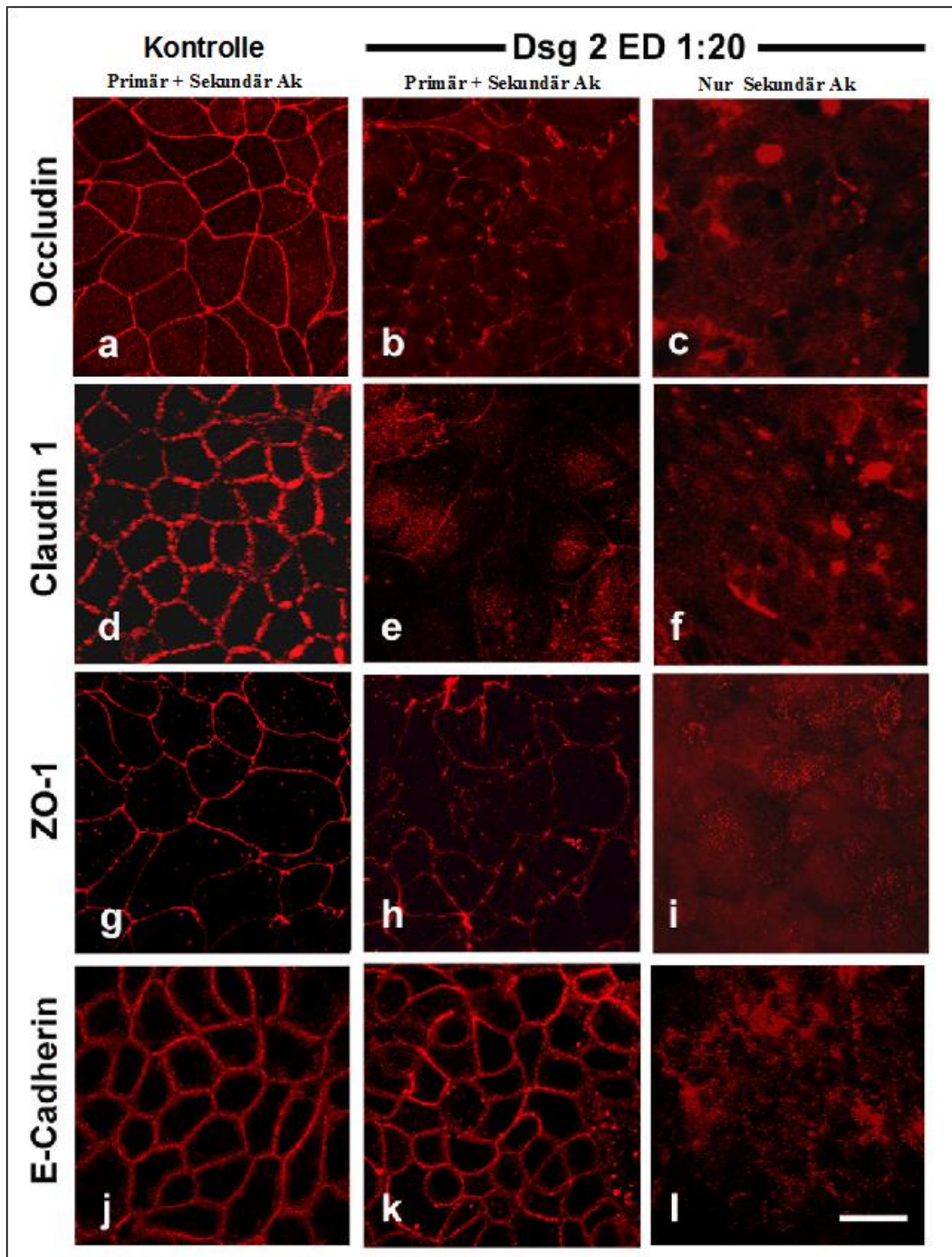


Abbildung 15: IF (Wirkung des Dsg2 ED auf die Junctionsproteine)

Die Inkubation mit Dsg2 ED führte zu einer Reduktion des Immunfluoreszenzsignals der TJ Proteine Claudin1, Occludin und ZO-1 (b, e, h). Diese Veränderung war nicht durch eine unspezifische Färbung des Sekundärantikörpers erklärbar (c,f,i). (Anzahl der Versuche $n > 6$, Maßstab 20 μ m)

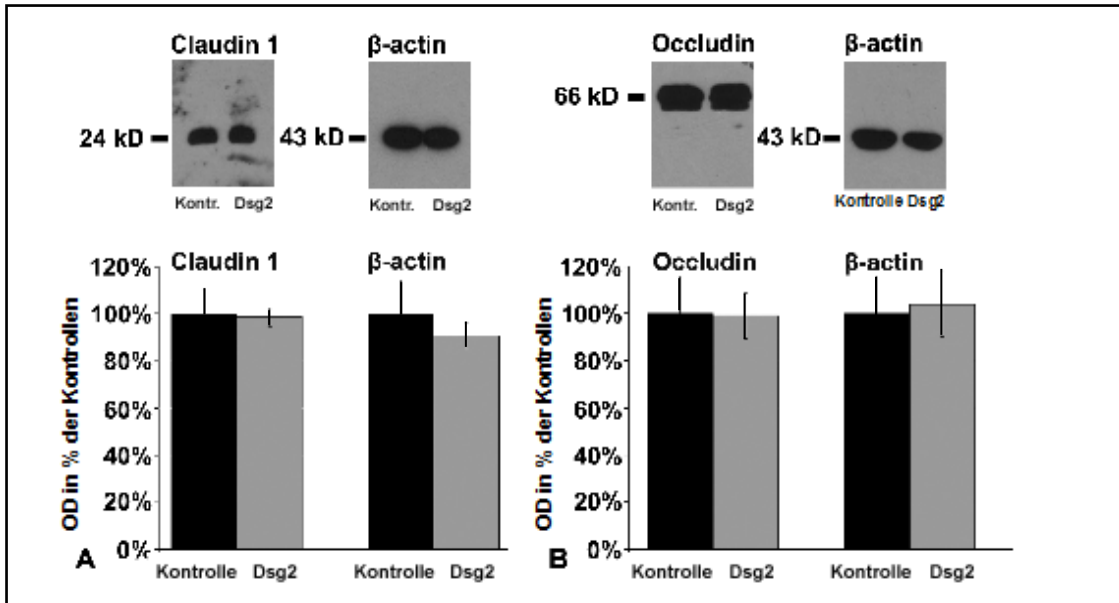


Abbildung 16: WB (Wirkungen von Dsg2 ED auf Proteinkonz. der TJ Proteine)

Die Veränderungen der TJ Proteine in den Immunfluoreszenzen nach Applikation eines Dsg2 ED, ließen sich nicht durch eine Reduktion der Proteinmenge von Claudin1 (A) und Occludin (B) erklären. Im Westernblot führte der Dsg2 ED nicht zu einem signifikanten Unterschied der Proteinmenge (Anzahl der Versuche n=3, Signifikanz gegenüber Kontrollen, $p < 0.05$).

3.3. Veränderungen der Barriere durch Änderung der Aktivität der Rho- GTPasen

3.3.1. Eine Veränderung der Aktivität der Rho- GTPasen änderte die Morphologie der Occludens- und Adherens Kontakte

Unter Kontrollbedingungen zeigte sich, dass die Junctionsproteine E-Cadherin, Occludin und Claudin1 (Abb. 17 a, b, c) ein lineares Signal an den Zellgrenzen bildeten. Initial untersuchten wir die Wirkung von CNF-1, das zu einer Aktivierung von RhoA, Rac1 und Cdc42 führt (Schmidt et al. 1998; Aktories et al. 2000).

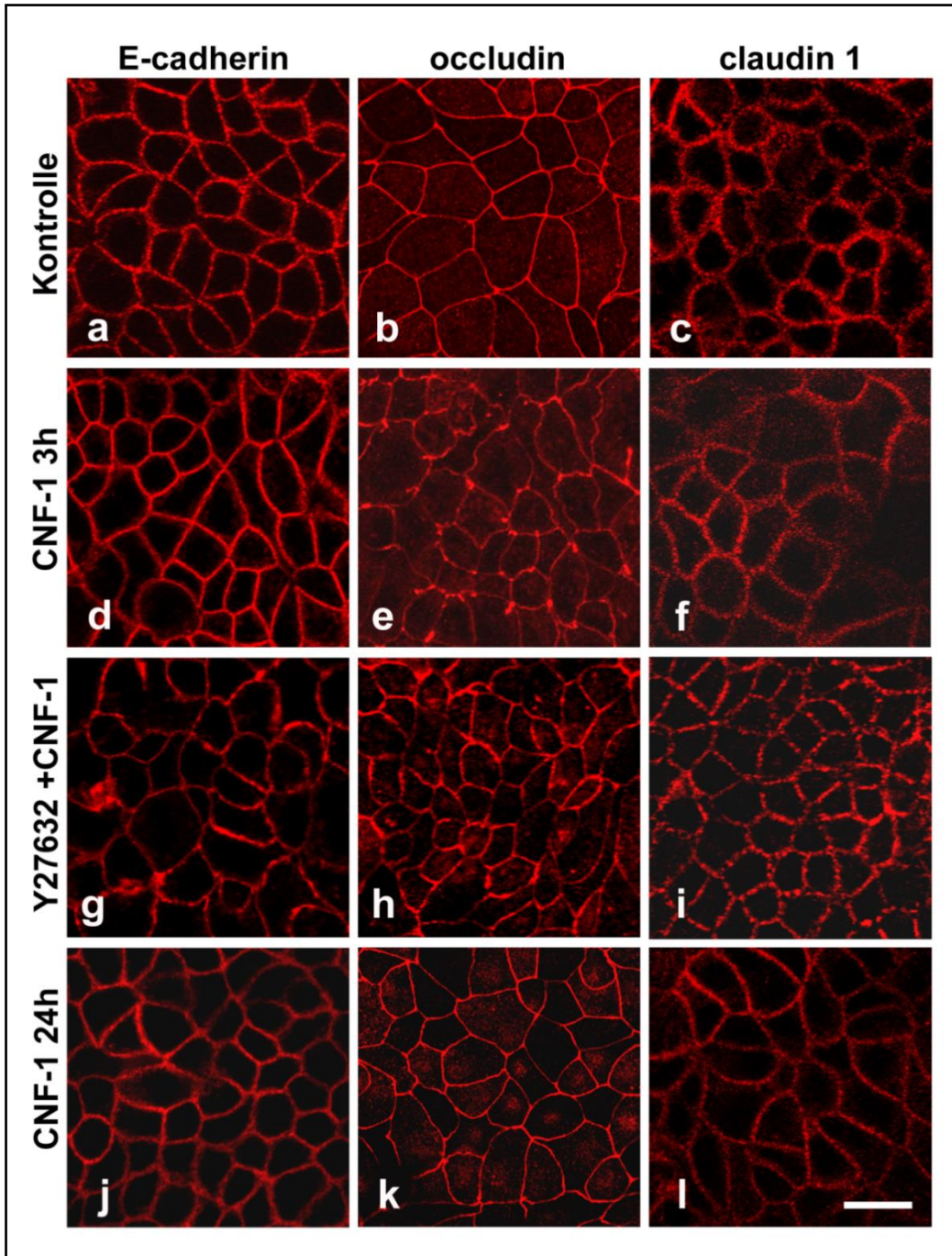


Abbildung 17: IF (Wirkungen von Toxinen auf Junctionsproteine)

Unter Kontrollbedingungen (a-c) waren die Junctionsproteine linear an den Zellgrenzen verteilt. Nach 3h Inkubation mit CNF-1 (d-f) zeigte sich eine Reduzierung der TJ Proteine. Während das Adhärenzprotein E-Cadherin unverändert erschien. Diese Effekte auf die TJ ließen sich durch Vorinkubation mit Y27632 (g-i) und einer damit verbundenen Hemmung der Rho-kinase aufheben. Nach einer 24h Inkubation mit CNF-1 (j-l) waren die Junctionsproteine wieder ähnlich wie unter Kontrollbedingungen (Anzahl der Versuche $n > 6$; Maßstab $20\mu\text{m}$).

Nach Inkubation mit CNF-1 für 3h (Abb. 17 d) erkannte man in den Immunfluoreszenzen, dass E-Cadherin weiterhin regelmäßig, wie unter Kontrollbedingungen an den Zellgrenzen verteilt war. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass die Färbung von Occludin insgesamt an den Zellgrenzen, bis auf einige trianguläre Punkte, an denen drei oder mehr Zellen zusammentreffen, reduziert war (Abb. 17 e). Auch die Claudin1 Färbung stellte sich nach einer Inkubation mit CNF-1 für 3h generell abgeschwächt (Abb. 17 f) dar. Eine Vorinkubation mit dem Rho-kinase Inhibitor Y27632 für eine Stunde vor Applikation von CNF-1 für 3h führte zu Verhinderung dieser Effekte, so dass die Signale der Occludensproteine in den Immunfluoreszenzen (Abb. 17 g-j), ähnlich wie unter Kontrollbedingungen waren.

Anschließend untersuchten wir, ob diese Effekte durch eine längere Inkubation mit CNF-1 für 24h stärker ausgeprägt waren. Es zeigte sich jedoch, dass nach 24h Inkubation mit CNF-1 im Gegensatz zur Inkubation von 3h die Junctionsproteine wieder regelmäßig an den Zellgrenzen verteilt waren (Abb. 17 j-l).

Um die Rolle die Bedeutung der einzelnen Rho-GTPasen genauer untersuchen zu können, verwendeten wir in weiteren Versuchen Mediatoren, die spezifisch die einzelnen Rho-GTPasen inhibieren oder aktivieren können. Zum einen untersuchten wir die Bedeutung der RhoA Aktivität durch die Inkubation des RhoA Inhibitors C3-Transferase für 36h und die Bedeutung des RhoA Effektorproteins Rho-kinase durch die Inkubation mit Y27632 für 4h (Abb. 18 a-c). Die Applikation von CNF γ zeigte keine Veränderung in der Morphologie der Junctionen (Abb. 18 m-o). Die Inkubation mit C3-Transferase führte zu einer leichten Reduktion der Signalintensität von Claudin1 und zu einer Fragmentierung der Occludinfärbung an den Zellgrenzen (Abb. 18 d-f). Im Gegensatz dazu zeigte sich nach Inkubation mit Y27632 (Abb. 18 a-c) eine leichte Reduktion der Signalintensität von Occludin und Claudin1. In beiden Fällen blieb die E-Cadherin Färbung unverändert im Vergleich zu Kontrollen.

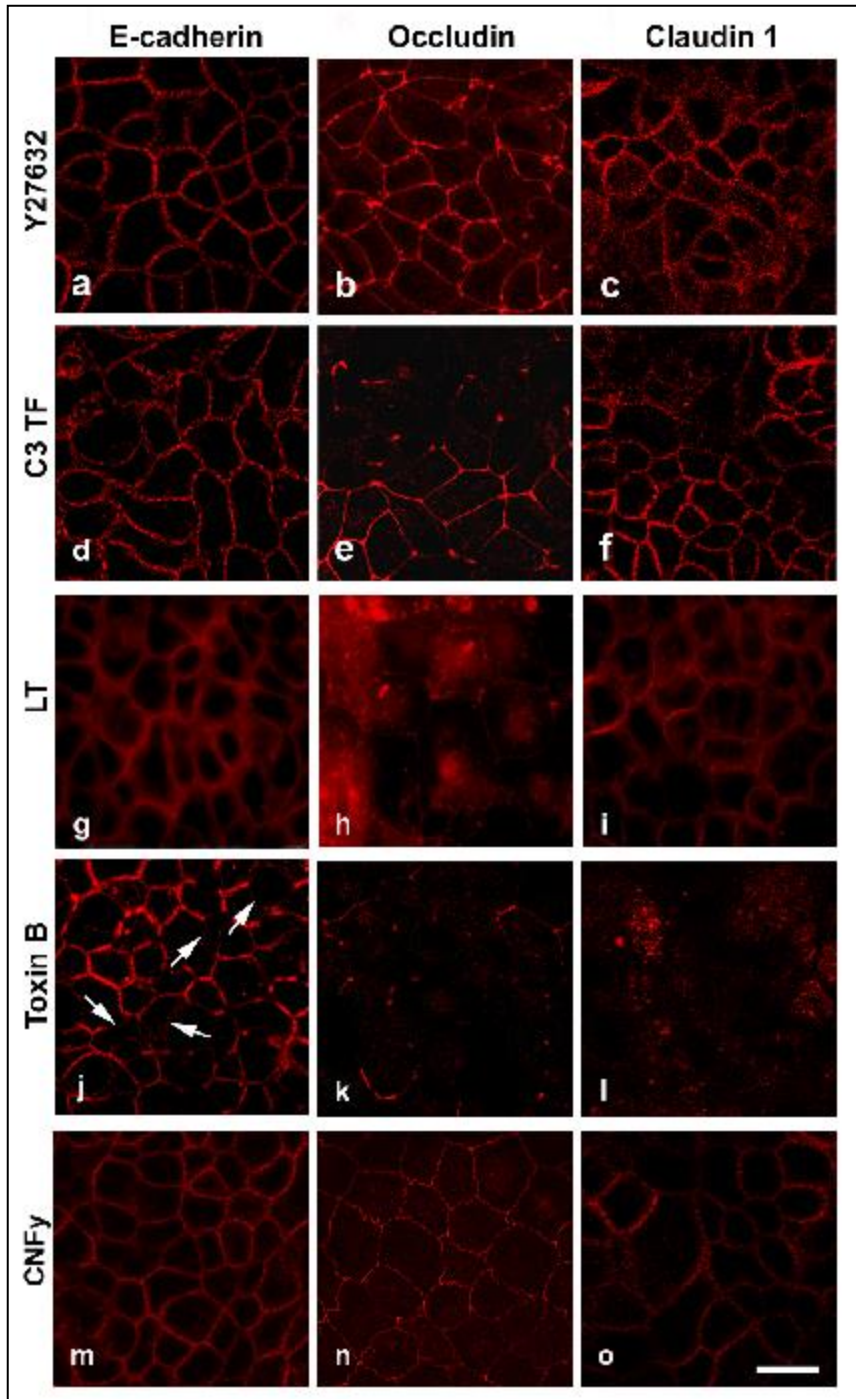


Abbildung 18: Wirkung der Toxine auf Junctionsproteine

Nach einer Inaktivierung von RhoA durch C3TF (d-f) oder die Inhibition der Rho-kinase durch Y27632 (a-c) zeigte sich in den Immunfluoreszenzen im Gegensatz zu den Kontrollen (Abb. 16 a-c) eine Reduzierung (b,c) bzw. Fragmentierung (e,f) der TJ Proteine Occludin und Claudin. Die Adherens Junctionen (a,d) schienen im Vergleich zu Kontrollfluoreszenzen unverändert. Inaktiviert man hingegen Rac1 durch LT (g-i) so trat in den Immunfluoreszenzen neben der Reduktion der TJ Proteine auch eine diffusere Färbung von E-Cadherin auf. Nach einer

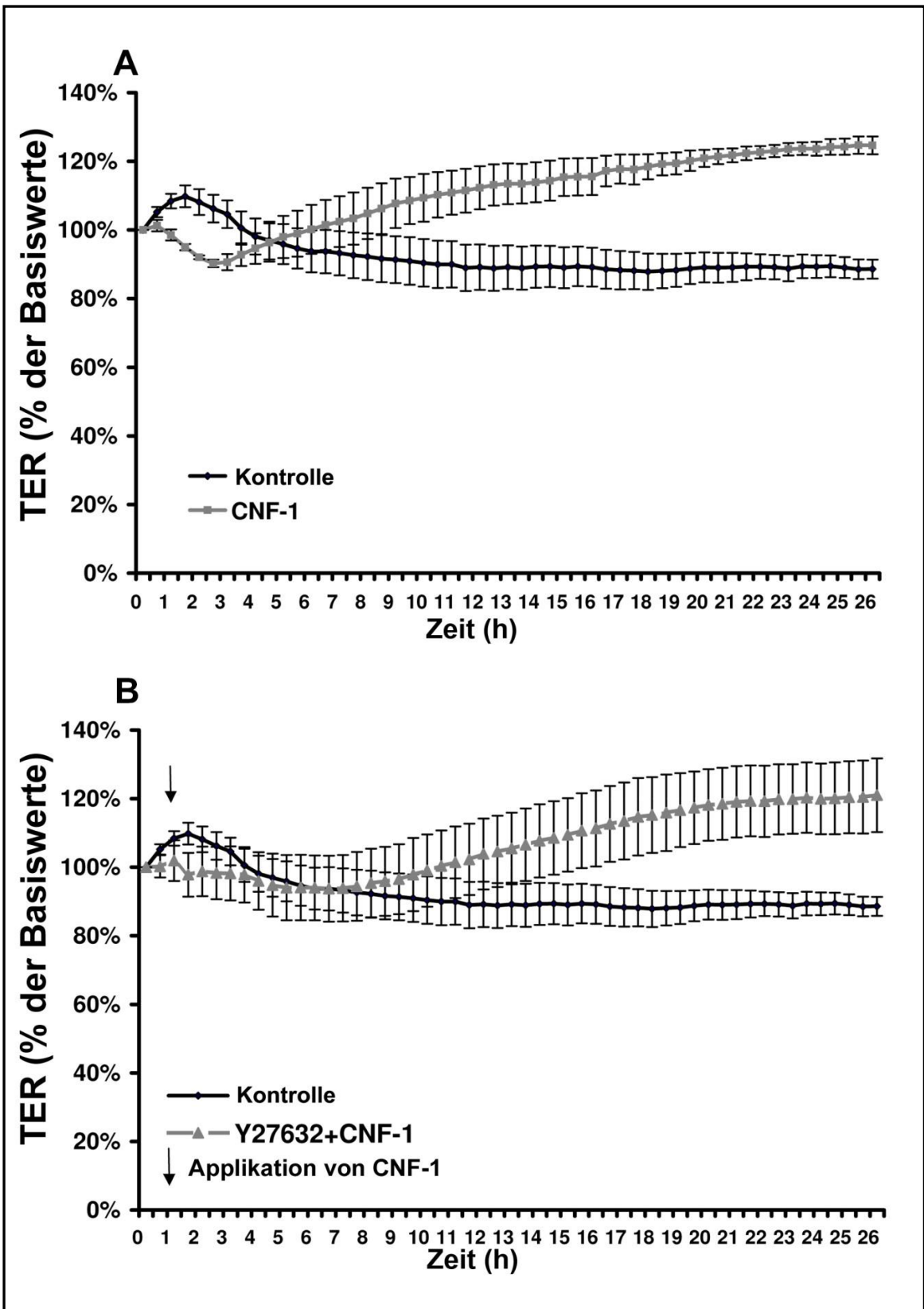
Inaktivierung von Rac1 und RhoA durch Toxin B zeigte sich eine Fragmentierung von E-Cadherin (j Pfeile) und die komplette Entfernung der TJ Proteine von den Zellgrenzen (k,l). Nach Applikation von CNF γ ließ sich kein Unterschied zu den Kontrollen feststellen (Anzahl der Versuche n > 6; Maßstab 20 μ m).

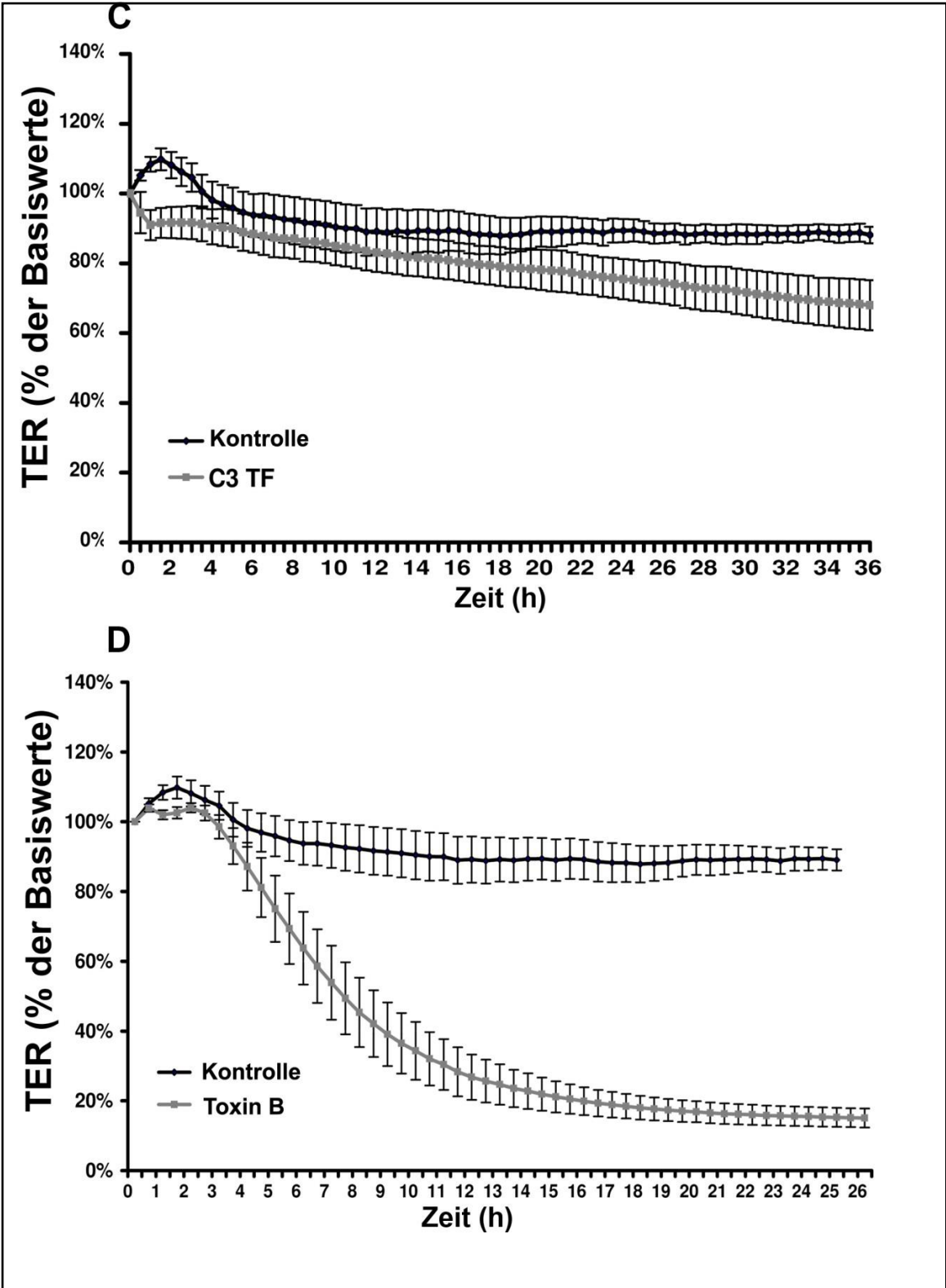
Des Weiteren untersuchten wir die Wirkung des Rac1 Inhibitors LT (Abb. 18 g-i). Eine Inkubation mit LT für 24h führte zu einer diffuseren Färbung von E-Cadherin und Claudin1, sowie zu einer Reduktion des Occludinsignals an den Zellgrenzen und zu einer vermehrten Occludin Färbung im Zytoplasma. Schließlich untersuchten wir die Wirkung von ToxinB (Abb. 18 j-l), das zu einer Inaktivierung von RhoA und Rac1 führt. Nach Inkubation mit ToxinB für 24h zeigte sich eine leichte Reduzierung der E-Cadherin Färbung. Die Occludensproteine Claudin1 und Occludin waren nicht mehr an den Zellgrenzen, sondern eher in Vesikeln im Zytoplasma zu sehen.

3.3.2. Eine Veränderung der Aktivität der Rho-GTPasen führte zu einer Veränderung des TER und des FITC- Dextran Flux

Zuerst untersuchten wir den transepithelialen Widerstand nach Applikation von Mediatoren und Toxinen, um eine funktionelle Aussage über die Darmbarriere durch Veränderung der Aktivität der Rho-GTPasen treffen zu können (siehe Abb. 19)

Wir untersuchten den transepithelialen Widerstand nach Applikation von CNF-1. Eine Stunde nach Applikation fiel der TER signifikant auf Werte unter dem Kontrollniveau und erholte sich nach 4h unter der Inkubation mit CNF-1 kontinuierlich. 24h nach Applikation von CNF-1 stieg der TER auf 122% \pm 2%, im Verhältnis zu den Kontrollen, signifikant an. Danach führten wir eine Vorinkubation der Caco2 Zellen mit Y27632 eine Stunde vor Applikation von CNF-1 durch. Diese Vorinkubation führte dazu, dass der von CNF-1- induzierte Abfall des TER innerhalb der ersten 4h nicht mehr zu beobachten war. Vergleichbar mit dem Effekt unter alleiniger Inkubation mit CNF-1 stieg der TER nach 24h auf 120% \pm 10% signifikant im Verhältnis zu den Kontrollen an.





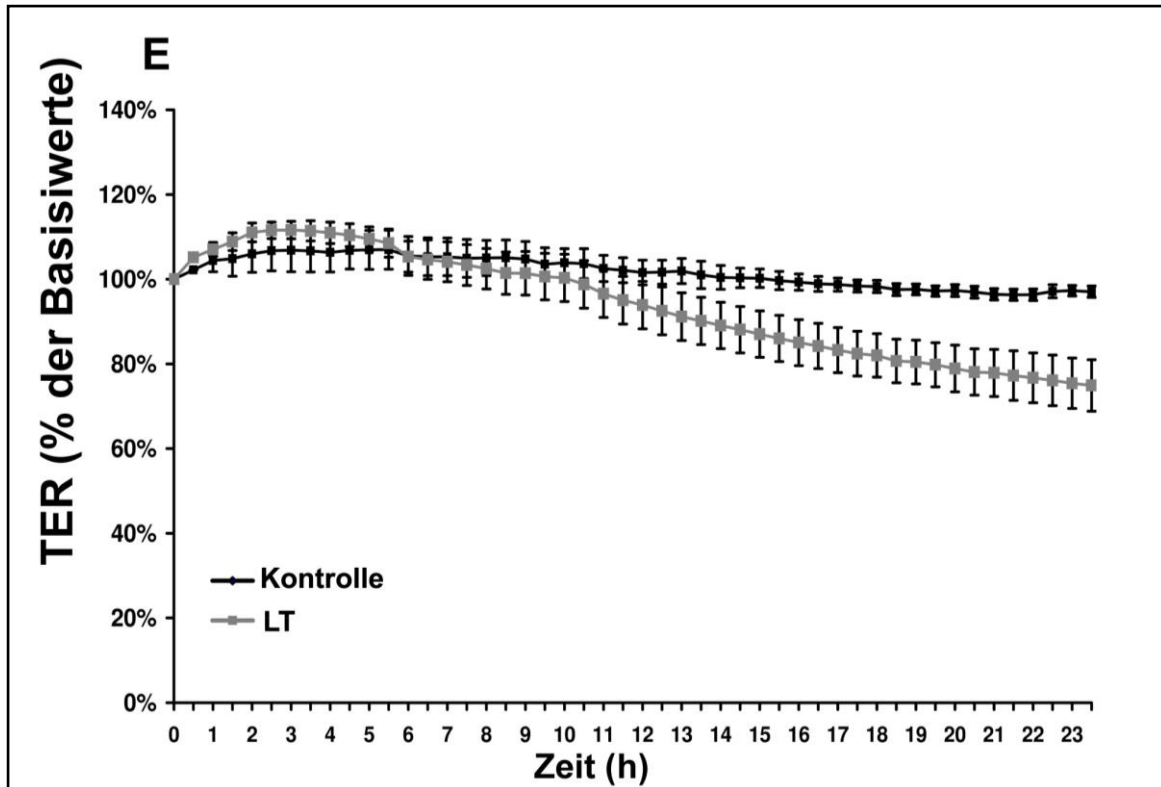


Abbildung 19: ECIS (Veränderungen des TER durch Toxine)

Der TER sank nach Applikation von CNF-1 (A) zuerst signifikant unter die Kontrollwerte, erholte sich dann und stieg nach 24h signifikant über Kontrollniveau. Dieser initiale Abfall, ließ sich durch Vorinkubation mit Y27632 aufheben (B). Die Inkubation von C3TF führte zu einem Abfall des TER (C). Ebenfalls führte die Applikation von LT zu einem signifikanten Abfall des TER (E). Ein dramatischer Abfall zeigte sich nach Applikation von Toxin B (Anzahl der Versuche $n > 4$; * Zeitpunkt der Signifikanz gegenüber Kontrollen, Student t-test, $p < 0.05$).

Die morphologischen Änderungen des Schlussleistenkomplexes korrelierten mit den funktionellen Veränderungen. Wie zu erwarten führte eine alleinige Inhibition von RhoA durch C3 Transferase nicht zu einer Stabilisierung der Barriere, sondern zu einem signifikanten Abfall des TER auf $68\% \pm 7\%$ im Verhältnis zu den Kontrollen. Auch die Applikation von LT und die damit verbundene Inaktivierung von Rac1 führte zu einem signifikanten Abfall des TER auf $75\% \pm 6\%$ im Verhältnis zu den Kontrollen. Am deutlichsten wurde der Abfall nach Applikation von Toxin B. Eine gleichzeitige Inaktivierung von Rac1

und RhoA führte zu einer signifikanten Reduktion des TER nach 6h. Nach 24h fiel der TER schließlich auf $16\% \pm 3\%$ im Vergleich zu den Kontrollen ab.

Als nächstes untersuchten wir den Flux von 4 kDa FITC-Dextran über einen Transwellfilter, unter identischen Bedingungen wie bei den Messungen des TER und berechneten aus diesem Flux den Permeabilitätskoeffizienten (P_E). Unter Kontrollbedingungen beobachteten wir einen P_E von $0.21 \pm 0.04 * 10^{-6}$ cm/s. Nach Inkubation mit CNF-1 für 3h erhöhte sich der P_E signifikant auf $0.37 \pm 0.06 * 10^{-6}$ cm/s, was 174% im Verhältnis zu Kontrollbedingungen entsprach (Abb 20). Diese Steigerung des Fluxes von FITC Dextran durch CNF-1 nach 3h wurde durch eine Vorinkubation mit Y27632 für 1h verhindert. Der P_E erreichte unter dieser Bedingung einen Wert von $0.21 \pm 0.02 * 10^{-6}$ cm/s was 95 % im Verhältnis zu den Kontrollen entsprach. Eine 24h Inkubation mit CNF-1 verringerte den P_E auf $0.05 \pm 0.02 * 10^{-6}$ cm/s oder 22% im Verhältnis zur Kontrolle. Allerdings war eine alleinige Inhibition der Rho-kinase und damit des RhoA/ROCK Signalweges nicht protektiv. Die Applikation von Y27632 führte nach 4h zu einer Erhöhung des P_E auf $0.71 \pm 0.18 * 10^{-6}$ cm/s oder 330% im Verhältnis zu den Kontrollen. In ähnlicher Weise führte eine direkte Hemmung von RhoA durch C3-Transferase zu einer Erhöhung des P_E auf $0.85 \pm 0.25 * 10^{-6}$ cm/s (391% der Kontrollen). Auch eine Inhibierung von Rac1 durch LT führte zu einer Erhöhung der Permeabilität. 24h nach Applikation von LT konnten wir einen P_E von $2.98 \pm 0.51 * 10^{-6}$ cm/s (790 % der Kontrollen) messen. Noch drastischer zeigte sich der Zusammenbruch der Barrierefunktion nach Applikation von Toxin B. Nach 24h Inkubation mit Toxin B konnten wir einen P_E von $3.38 \pm 0.98 * 10^{-6}$ cm/s messen, was 1642 % im Verhältnis zu Kontrollbedingungen entsprach.

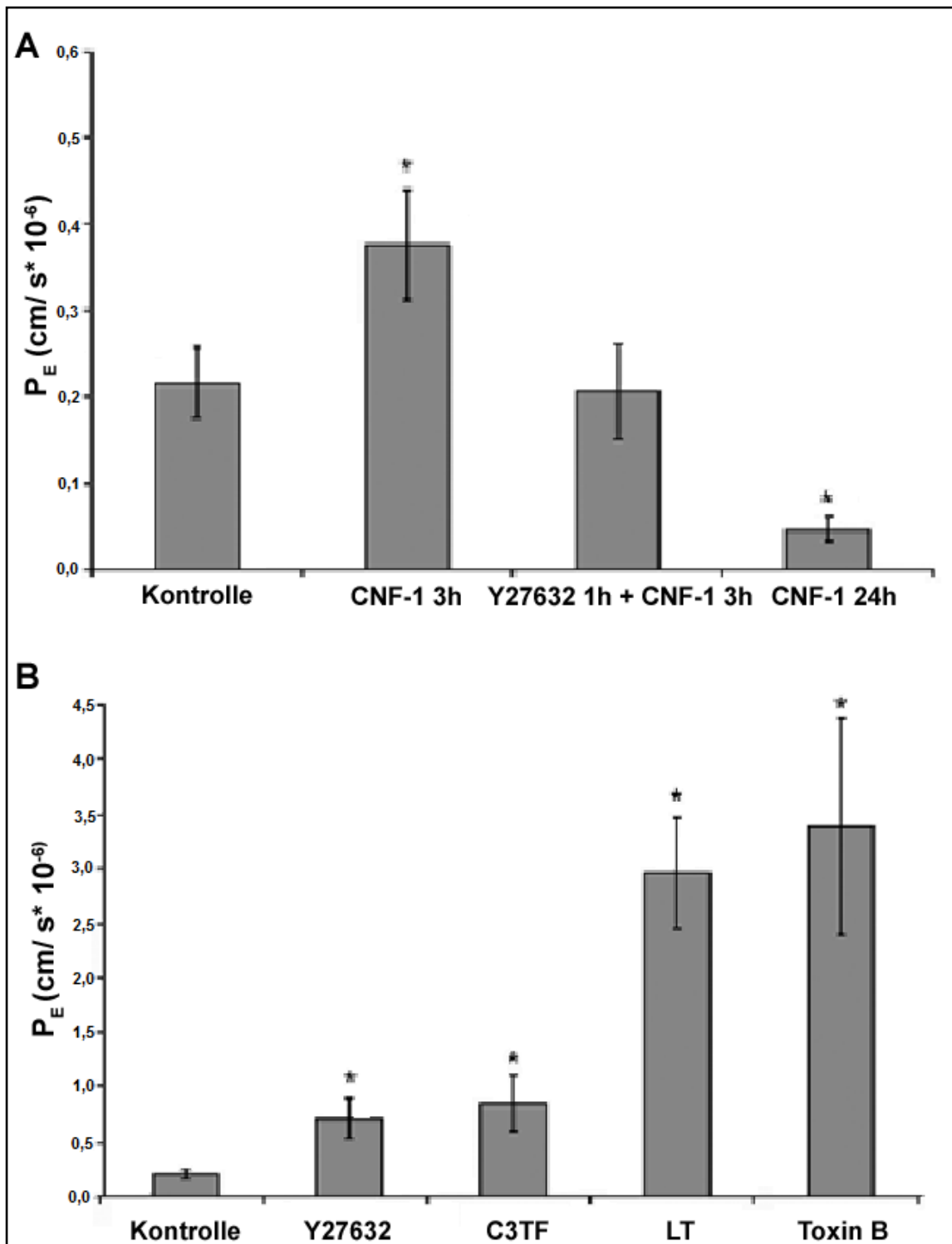


Abbildung 20: Transwell (Veränderungen des P_E durch Toxine)

Nach 3h Inkubation mit CNF-1 (A) stieg der P_E signifikant an. Diese Barriere Destabilisierung ließ sich durch vorausgegangene Applikation von Y27632 hemmen. Allerdings stabilisierte sich die Barrierefunktion der Caco2 Zellen 24h nach Applikation von CNF-1. Der P_E fiel nach 24 Stunden auf signifikant niedrigere Werte im Vergleich zu Kontrollbedingungen ab. (B) Hingegen führte die Inaktivierung von RhoA oder die Inhibition der Rho-kinase zu einer signifikant

erhöhten Permeabilität. Besonders drastisch war der Zusammenbruch der Barriere nach einer Inaktivierung von Rac1 durch LT oder einer kombinierten Inaktivierung von Rac1 und RhoA durch Toxin B (Anzahl der Versuche $n > 6$; * =Signifikanz gegenüber Kontrollen; Student t-test, $p < 0.05$).

Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass CNF-1 auf differenzierte Caco2 Zellen im Zeitverlauf zuerst zu einer Barriere destabilisierung und später zu einer Barriere stabilisierung führt. Die destabilisierenden Effekte scheinen dabei über die Rho-kinase vermittelt zu sein. Allerdings führt auch eine Hemmung von RhoA, oder seines Effektors Rho-kinase, zu einer Destabilisierung der Barriere. Gleichsam führt auch die Inhibition von Rac1 durch LT, oder noch dramatischer die gleichzeitige Hemmung von Rac1 und RhoA durch Toxin B, zur Erhöhung der Permeabilität und zur Erniedrigung des TER.

3.3.3. Applikation von Toxinen/Mediatoren führte nicht zum Zelltod

Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte der Barriereveränderung auf den Zelltod von Caco2 Zellen durch toxische Wirkung der Mediatoren und Toxine zurückzuführen waren, führten wir einen MTT-basierten Viabilitätsassay durch. (Abb. 21). Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich, dass die photometrische Absorption bei Zellen, die durch Hitze inaktiviert wurden, auf 10 ± 2 % abnahm. Nach Inkubation mit CNF-1 und LT zeigten sich keine Veränderungen im Verhältnis zu Kontrollbedingungen, was impliziert, dass die Erhöhung der Permeabilität und die Verringerung des TER unter diesen Bedingungen, spezifisch, durch die Wirkung der Toxine auf die Rho-GTPasen erklärbar war. Zu einer geringfügigen, aber signifikanten Erniedrigung der Viabilität kam es nach Inkubation von Toxin B nach 3h auf 88 ± 3 %. Allerdings kam es im Verlauf zu keinem weiteren, signifikanten Zellsterben (81 ± 11 % nach 24h), obwohl die Stabilität der Barriere in diesem Zeitraum dramatisch einbrach.

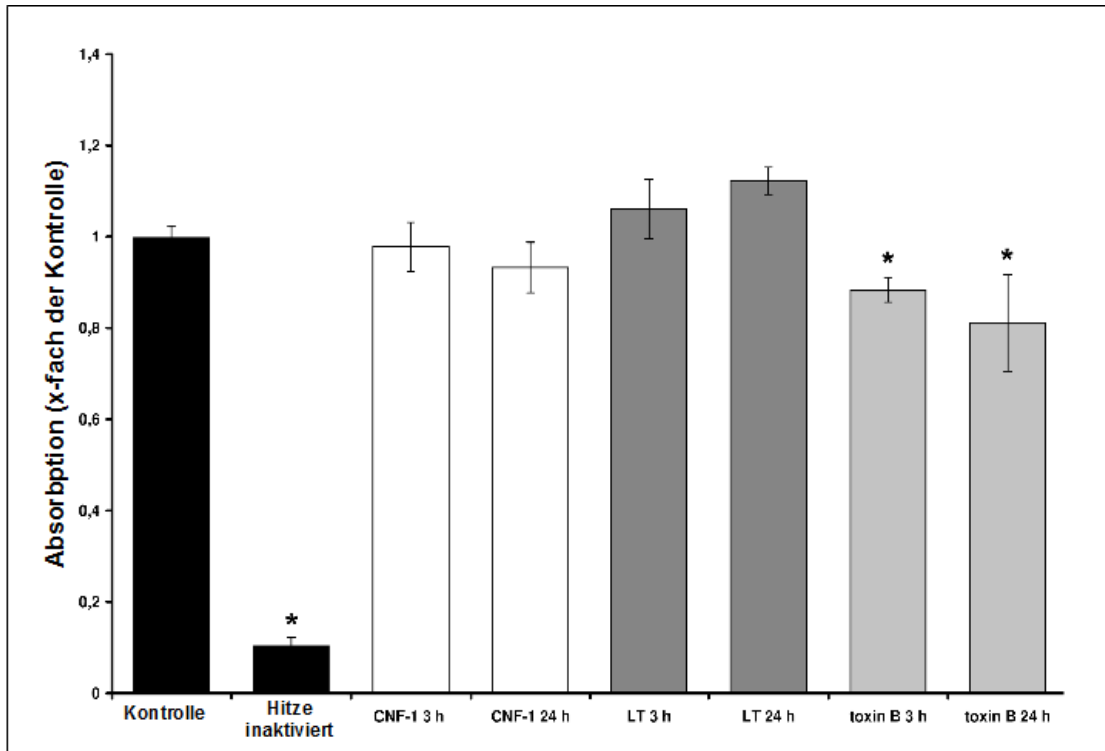
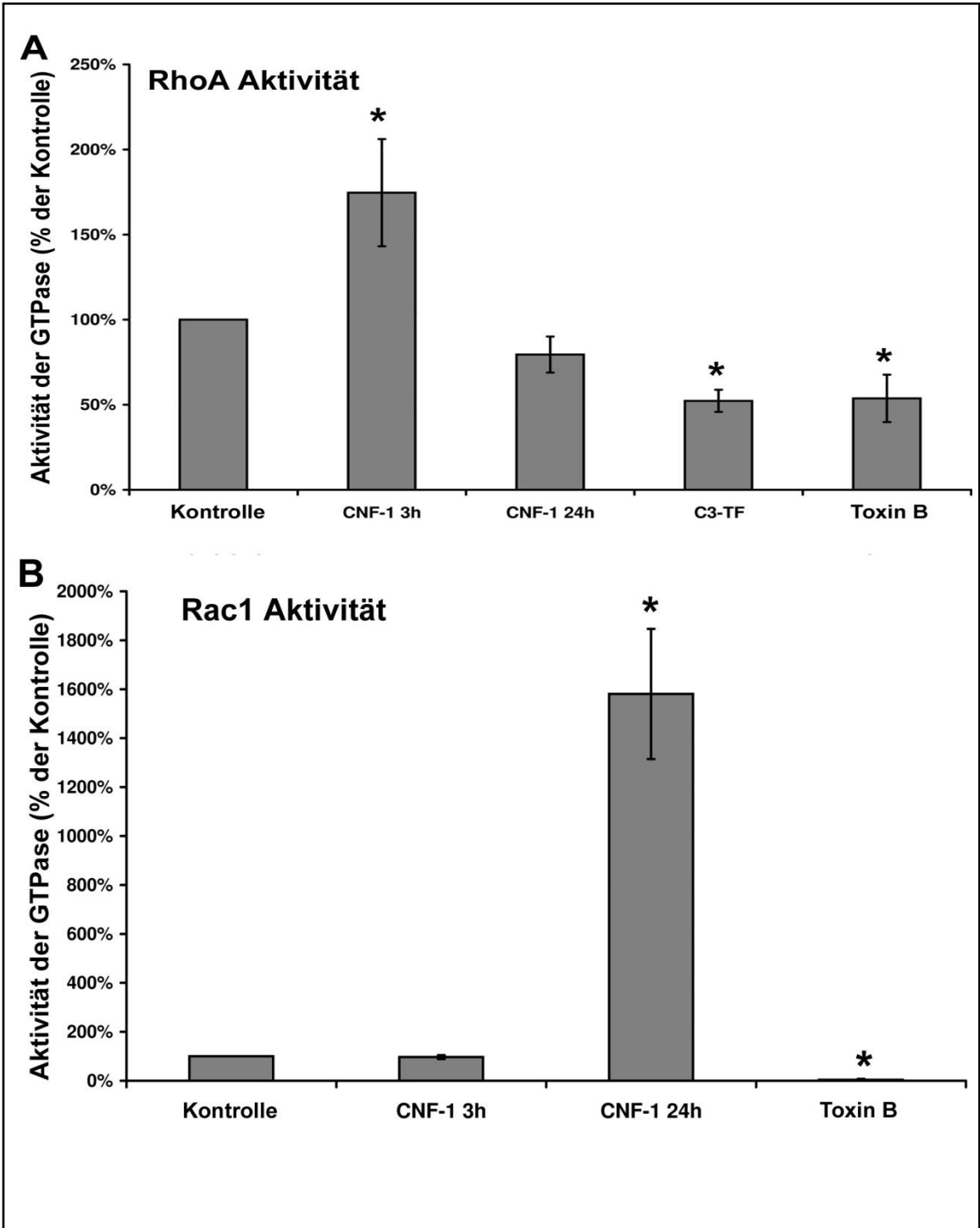


Abbildung 21: MTT- Assay (Toxizität der Toxine und Mediatoren)

Die Effekte, die wir nach Applikation der Toxine und Mediatoren beobachten konnten, ließen sich nicht durch das Absterben von Caco2 Zellen erklären. Lediglich nach Inkubation mit Toxin B fiel die Absorption auf leicht erniedrigte, aber signifikante Werte ab (Anzahl der Versuche $n > 6$; * = Signifikanz gegenüber Kontrollen, Student t-test, $p < 0.05$).

3.3.4. Eine Veränderung der Aktivität von RhoA destabilisierte die Barriere, eine Erhöhung der Rac1 und Cdc42 Aktivität wirkte barriere-protektiv

Da wir bei den funktionellen und morphologischen Untersuchungen nach Applikation von CNF-1 im Zeitverlauf unterschiedliche Effekte beobachtet haben, untersuchten wir die Aktivität der einzelnen Rho-GTPasen mittels eines RhoA-, Rac1- und Cdc42- spezifischen GLISAs (siehe Abb. 22). Nach Inkubation mit CNF-1 für 3h – zu einem Zeitpunkt, an dem die Permeabilität signifikant erhöht war- beobachteten wir eine isolierte, signifikante Erhöhung der Aktivität von RhoA auf $175 \pm 32\%$ im Verhältnis zu den Kontrollen, während die Aktivität von Rac1 und Cdc42 unverändert blieb ($97 \pm 8\%$ für Rac1 und $90 \pm 5\%$ für Cdc42).



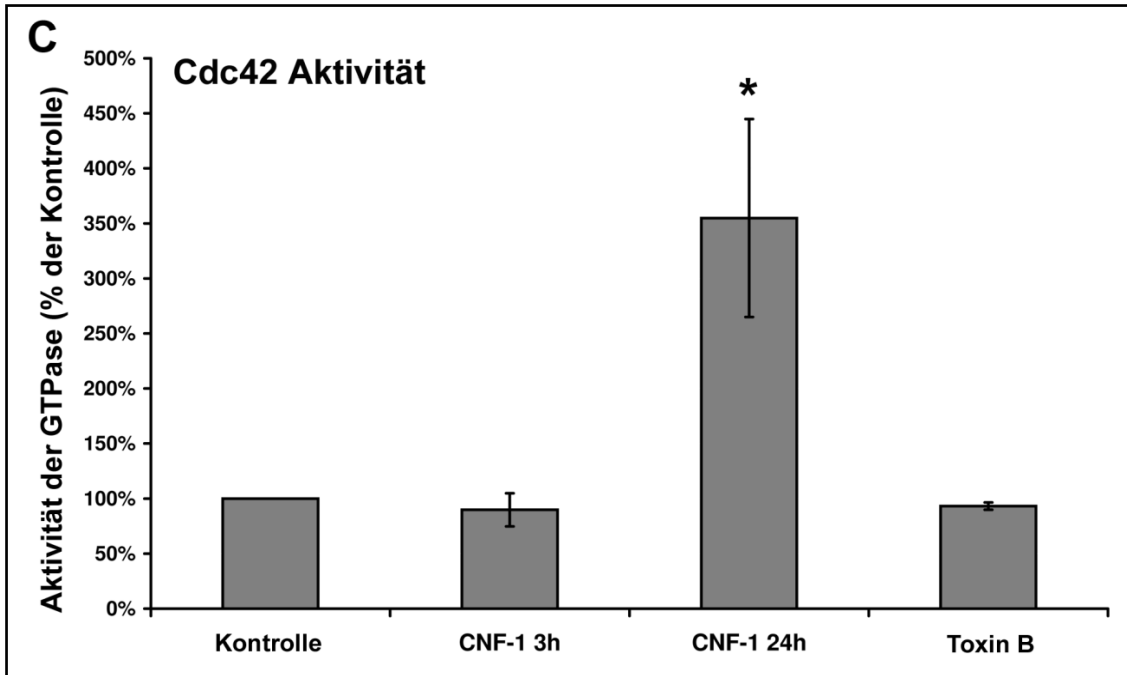


Abbildung 22: GLISA (Veränderung der Aktivität der GTPasen durch Toxine und Mediatoren)

Durch GLISA Messungen konnten wir zeigen, dass widersprüchliche morphologische und funktionelle Ergebnisse durch unterschiedliche Veränderungen der Aktivität der GTPasen erklärbar sind. Man erkennt, dass sowohl eine Steigerung, als auch eine Erniedrigung der Aktivität von RhoA mit einem Zusammenbruch der Barriere korrelierten. Andererseits konnten wir zeigen, dass eine vermehrte Rac1 und Cdc42 Aktivität, wie sie bei CNF-1 24h vorkommt Barriere protektiv war, wohingegen eine Verringerung der Aktivität von Rac1 zu einer Destabilisierung der Barriere führte. Insbesondere die funktionellen und morphologischen Ergebnisse nach Applikation von LT und Toxin B im Vergleich zu denen nach Inkubation mit C3TF ließen eine besondere Bedeutung von Rac1 für die Aufrechterhaltung der Darmbarriere vermuten (Anzahl der Versuche n= 4; * signifikanz gegenüber Kontrollen, Student t-test; p< 0.05).

Im Zustand der Barriestabilisierung nach 24h Inkubation mit CNF-1 war die Aktivität von RhoA signifikant verringert auf $79 \pm 11\%$ der Kontrollen, die Aktivität von Rac1 und Cdc42 hingegen signifikant erhöht auf $1581 \pm 266\%$ der Kontrollen für Rac1 und $355 \pm 90\%$ der Kontrollen für Cdc42.

Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich zum einen mit der Bedeutung der desmosomalen Adhäsion für die Aufrechterhaltung der Darmbarriere, zum anderen untersuchten wir die Effekte einer Änderung der Aktivität der Rho GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass Caco2 Zellen Dsg2, E- Cadherin, Claudin 1, 4, 5 und Occludin exprimierten. 14 Tage nach Konfluenz waren bei Caco2 Zellen die Junctionsproteine Claudin1, Occludin, ZO-1, E- Cadherin und Dsg2 linear an den Zellgrenzen verteilt. Der Permeabilitätskoeffizient nahm im Verlauf der Differenzierung bis zum Zeitpunkt C14 signifikant ab. Der TER fiel initial während der Entwicklung der Zellen signifikant ab, stieg jedoch nach dem Zeitpunkt C14 wieder an. Des Weiteren nahm im Verlauf der Differenzierung die Junctionslänge signifikant zu.

Wir konnten zeigen, dass die Applikation eines Antikörpers gegen Dsg2 ED zu einer Reduktion der Occludensproteine von den Zellgrenzen, zu signifikant erhöhten Fragmenten im Dispaseassay, sowie zu einem signifikanten Anstieg der P_E und einem signifikanten Abfall des TER führte.

Durch Untersuchungen der Aktivität der Rho-GTPasen konnten wir demonstrieren, dass eine Verringerung der Aktivität von RhoA durch Inkubation mit C3TF für 36h, sowie eine Erhöhung der Aktivität von RhoA durch eine Inkubation mit CNF1 für 3h, zu einer Fragmentierung der Occludensproteine in den IF, zu einer signifikanten Erhöhung des P_E und zu einem signifikanten Abfall des TER führten. Ebenso führte eine Inaktivierung von Rac1 durch Inkubation mit LT für 24h zu einem signifikanten Abfall des TER und Anstieg des P_E und einer Reduktion der Occludensproteine von den Zellgrenzen. Eine Steigerung der Aktivität von Rac und Cdc42 durch Inkubation mit CNF-1 für 24h führte hingegen zu einem signifikanten Anstieg des TER und zu einem signifikanten Abfall des P_E . Die Inkubation der Toxine, in den von uns eingesetzten Konzentrationen und Zeiten, führten nicht zum Zelltod der Caco2 Zellen.

4.1. Die Caco2 Zelllinie stellt ein geeignetes Modell der Darmbarriere dar

Obwohl die Zelllinie ursprünglich aus einem Colon Adenocarcinom extrahiert wurde, wurden CaCo-2 Monolayer vielfach in der Vergangenheit verwendet, um sie als in vitro Zellkulturmodell für Barriere- und Absorptionsversuche der Darmbarriere zu nutzen (Sambuy et al. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass, abhängig von der Zellkultur Methodik, Caco2 Zellen einen Monolayer aus polarisierten Zellen bildeten, dessen Zellen sich nach ihrer Konfluenz zu sowohl morphologisch, als auch funktionell Enterozyten-ähnlichen Zellen differenzierten. Durch unsere Charakterisierung wird deutlich, dass die Caco2 Zelllinie ein geeignetes Zellkulturmodell für Untersuchungen an der Darmbarriere ist.

Um optimale Bedingungen zu finden, die Rückschlüsse auf die Darmbarriere in vivo zulassen, hatten wir die Differenzierung der Zelllinie sowohl morphologisch, als auch funktionell charakterisiert. Wir konnten zeigen, dass 14 Tage nach Konfluenz die Zellen morphologisch, anhand von Immunfluoreszenzen und Western Blot Analysen, sowie funktionell, durch Messungen des TER und Flux Messungen mit FITC markiertem Dextran vollständig differenziert waren. Dieses Ergebnis wird auch in der Literatur mehrfach unterstützt (Wang et al. 2008; Matsumoto et al. 1990; Artursson et al. 1993). Zusätzlich nahm der TER zum Zeitpunkt C14 mit $92 \pm 0.2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ einen Wert an, der mit Messungen an Mukosa von adulten Ratten ex vivo vergleichbar ist (Artursson 1993), auch wenn unsere Versuche vermuten lassen, dass ein Vergleich absoluter Werte des TER ohne Korrelation der Junktionslänge fraglich ist. Diese Aussage wird auch durch die Arbeiten von Claude und Goddenough (Claude and Goodenough 1973; Claude 1978) gestützt, die postulierten, dass die Dichtigkeit von Epithelien von der Junktionslänge abhängig ist.

4.2. Die Dsg2-vermittelte desmosomale Adhäsion ist wichtig für die Aufrechterhaltung der Darmbarriere

Für die Aufrechterhaltung der mechanischen Stabilität und der Adhäsion zwischen den Enterocyten wurden vor allem die Adhärenz Junctionen verantwortlich gemacht. Auch konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass intakte Adhärenz Junctionen essentiell für die Integrität der Occludenskontakte ist (Turner 2009). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit untermauern diese Befunde dadurch, dass wir anhand der Immunfluoreszenzen bereits zum Zeitpunkt der Konfluenz ein lineares, an den Zellgrenzen lokalisiertes Signal für E-Cadherin sahen, während die Occludensproteine erst 14 Tage später ein adäquates Signal in der Immunfluoreszenz zeigten.

Eine ähnliche Bedeutung für die mechanische Stabilität und Adhäsion wurde zwar für die Desmosomen postuliert, die als „Kleber“ der Zellen bezeichnet wurden, ohne dass dies in Enterozyten systematisch untersucht wurde. Die Ergebnisse zeigten zum ersten Mal, dass die desmosomale Adhäsion, die durch Desmoglein2 vermittelt wird, wichtig für die Aufrechterhaltung der Darmbarriere ist. Dr. W. -M. Heupel konnte zeigen, dass durch Applikation eines Antikörpers gegen die Extrazellulärdomäne von Desmoglein 2 die desmosomale Adhäsion spezifisch gehemmt wurde (Schlegel et al. 2010). Die mechanische Stabilität der Darmbarriere in unserem Zellkulturmodell nahm nach Inhibierung der desmosomalen Adhäsion signifikant ab, wie durch den Enterozytendissoziationsassay deutlich wurde.

Der Verlust der desmosomalen Adhäsion führte aber auch zu einer Erhöhung der Permeabilität in den Transwellversuchen, sowie zu einem Abfall des TER. Durch den Verlust der desmosomalen Adhäsion wurde folglich die Funktionalität in unserem Zellkulturmodell der Darmbarriere eingeschränkt. Dieser Effekt war morphologisch durch den Verlust des Tight Junction Proteinsignals von den Zellgrenzen in den Immunfluoreszenzen erkennbar. Deswegen kann postuliert werden, dass die desmosomale Adhäsion für die Aufrechterhaltung der TJ notwendig ist. Im Gegensatz dazu stehen von Collins

et al. publizierte Daten (Collins et al. 1995), dass Desmosomen sich embryonal erst nach Ausbildung der TJ ausbilden.

Der relativ geringe Verlust des TER auf nur 80% im Verhältnis zu den Kontrollen in 24h lässt sich vielleicht damit erklären, dass noch nicht alle Areale des Caco2 Monolayers vom Verlust der Occludensproteine von den Zellgrenzen betroffen waren. Es konnte zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht geklärt werden, über welchen Mechanismus der Verlust der desmosomalen Adhäsion zu einer Beeinträchtigung der Occludenskontakte führt. Genauso fraglich ist der Weg, wie die, von apikal applizierten Antikörper in der Lage sind die Barriere der Occludenskontakte zu durchdringen und die basal gelegenen Desmosomen zu erreichen. Denkbar sind zwei mögliche Mechanismen. Am wahrscheinlichsten ist, dass einzelne Antikörper die Barriere der TJ überwinden und dann an den Desmosomen zu einem Verlust der Dsg2-vermittelten, desmosomalen Adhäsion führen. Dies führt zu einer Reduktion der Barrierefunktion des Schlussleistenkomplexes, so dass weitere Antikörper die Barriere durchdringen können und die Barriere letztlich zusammenbricht. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Antikörper an einzelne Dsg2 Moleküle binden, die auch außerhalb der Desmosomen exprimiert werden und dadurch einen Signalweg induzieren, der zur Reduzierung der Barrierefunktion führt und damit eine Translokation von Antikörpern nach basal ermöglicht.

4.3. Rolle der Rho-GTPasen für die Regulation der Darmbarriere

Es ist gut bekannt, dass die Rho-GTPasen eine wichtige Rolle in der Regulation der Zell- Zell Kontakte spielen (Nusrat et al. 1995; Gerhard et al. 1998; Hopkins et al. 2003; Kapus and Szaszi 2006). Allerdings war ihre Rolle in der Regulation der intestinalen Barriere noch unklar, da über die Bedeutung der einzelnen Rho-GTPasen unterschiedliche Ergebnisse publiziert wurden. So zeigten Nusrat et al. (Nusrat et al. 1995), dass die Applikation von C3-Transferase zu einer Reduktion von ZO-1 in den Immunfluoreszenzen und zu einer Barrieredestabilisierung führt. Andererseits zeigten Hopkins et al. 2003 (Hopkins et al. 2003), dass eine Aktivierung der Rho-GTPasen durch CNF-1, nach 1h Inkubation zu einer Barrieredestabilisierung führt. Folglich wurde

postuliert, dass die richtige Balance der Rho-GTPasen nötig ist, um die intestinale Barriere intakt zu halten (Shen and Turner 2006). Die beiden Arbeiten kamen zu dieser Schlussfolgerung anhand der bekannten Effekte der Toxine CNF-1 und C3-Transferase in anderen Zelllinien. Die Aktivität der einzelnen Rho-GTPasen, nach Applikation der Toxine wurde in diesen Arbeiten nicht quantifiziert. Dadurch wurde eine adäquate Aussage über die Bedeutung der einzelnen Rho-GTPasen für die intestinale Barriere nur bedingt nachvollziehbar.

Deswegen führen die Ergebnisse dieser Arbeit zu einer neuen Einsicht in der Bedeutung der Rho-GTPasen für die Regulation der Darmbarriere. Wir konnten zeigen, dass CNF-1 nicht zu einer gleichzeitigen Aktivierung aller Rho-GTPasen führte, sondern sequentiell zuerst RhoA aktiviert und erst nach 4h eine signifikant vermehrte Aktivierung von Rac1 und Cdc42 festzustellen war. Wir beobachteten, dass in den ersten 4h die isolierte Steigerung der Aktivität von RhoA zu einer Destabilisierung der Barriere führte. Diese Schlussfolgerung wird dadurch untermauert, dass durch eine Inhibition des Haupteffektormoleküls von RhoA- der Rho-Kinase mittels Y27632 diese Destabilisierung aufgehoben werden konnte. Hingegen führte eine Erhöhung der Aktivität von Rac1 und Cdc42 nach 4h Inkubation mit CNF-1 zur Stabilisierung der Barriere, wie durch den erniedrigten P_E im Transwellfiltersystem und durch den erhöhten TER deutlich wurde. Im Gegensatz dazu führte eine Verringerung der Aktivität von Rac1 durch LT zu einem erhöhten P_E und zu einem erniedrigten TER.

Aber auch eine Erniedrigung der Aktivität von RhoA führte zur Destabilisierung der Barriere, wie die Versuche mit C3-Transferase zeigten. Die Inkubation mit Toxin B und die damit verbundene Erniedrigung von Rac1 und RhoA führten zu einem drastischen Zusammenbruch der Barriere.

Die Erniedrigung des TER und die Erhöhung des Fluxes von FITC Dextran korrelierten unter allen Bedingungen mit einer Veränderung der Morphologie des Schlussleistenkomplexes. Vor allem das Immunfluoreszenzsignal der TJ Proteine Claudin 1 und Occludin war unter diesen Bedingungen stark verändert,

während die Immunfluoreszenz des Adherens Junctionsproteins E-Cadherin, bis auf einzelne kleine Punkte nach Inkubation mit Toxin B, unverändert schien.

Über die Frage, warum durch CNF-1 initial zuerst RhoA und erst zeitverzögert Rac1 und Cdc42 aktiviert wurde, kann nur spekuliert werden. Es ist bekannt, dass die Rho-GTPasen sich ständig gegenseitig beeinflussen (Nusrat 1996; Hall 1996; Spindler et al. 2011). Deshalb ist zu vermuten, dass die vermehrte Aktivierung von Rac1 und Cdc42 4h nach Applikation von CNF-1 zu einer Verringerung der Aktivität von RhoA führte. Diese zeitversetzte Aktivierung hat es uns aber erlaubt in derselben Zelllinie die Bedeutung der einzelnen Rho-GTPasen genauer zu untersuchen. Die Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass eine vermehrte Aktivierung von Rac1 und Cdc42 Barriere protektiv wirkt. Diese These wird dadurch gestützt, dass Caco2 Zellen während ihrer Differenzierung GAPs und GEFs von RhoA herabregulieren, während jene von Rac1 und Cdc42 unverändert blieben (Halbleib et al. 2007). Da wir zeigen konnten, dass es im Verlauf der Differenzierung von Caco2 Zellen auch zu einer Stabilisierung der Barriere kommt, lässt den Schluss zu, dass eine vermehrte Aktivierung von Rac1 und Cdc42 wichtig für die Darmbarriere ist. Dies scheint insbesondere für Rac1 zu gelten, da eine Verringerung der Aktivität von Rac1 durch Toxin B zu einem drastischen Zusammenbruch der Barriere führte. Ein Problem in der Verwendung von Toxinen wie Toxin B und CNF-1 ist, dass man nicht ausschließen kann, dass sie auch auf andere Subtypen der Rho-GTPasen wirken, die ebenfalls eine Wirkung auf die Barrierefunktion haben könnten (Aktories et al. 2000). Von CNFy ist bekannt, dass es selektiv nur RhoA aktiviert und eine Applikation von CNFy wäre damit ein guter Ansatz, um dieses Problem zu umgehen. Blumenthal et al. zeigten, dass CNFy nicht zu einer Aktivierung von RhoA in Caco2 Zellen führt (Blumenthal et al. 2007). Wir konnten dieses Ergebnis bestätigen, da wir nach Applikation von CNFy keine Veränderung in den Immunfluoreszenzen und der Permeabilität gesehen haben. Durch die Inhibition von Rac1 durch LT besteht eine andere Möglichkeit eine Rho GTPase selektiv zu beeinflussen. Nach 24h Inkubation mit LT konnten wir einen verringerten TER, eine erhöhte Permeabilität und eine Veränderung des Schlussleitenkomplexes in den Immunfluoreszenzen feststellen. Man

erkannte in den Immunfluoreszenzen den Verlust von Occludens- und Adherens Proteinen an den Zellgrenzen. Das könnte auch der drastische Zusammenbruch der Barriere nach Applikation von Toxin B, im Vergleich zu den Auswirkungen von Y27632 und C3 Transferase, erklären, da eine isolierte Veränderung der Aktivität von RhoA, oder seines Effektors Rho-kinase die Adherensjunctionen nicht beeinträchtigte. Dies unterstreicht die Bedeutung von Rac1 für die Aufrechterhaltung der Darmbarriere.

Es könnte sein, dass dieser Antagonismus zwischen Rac1 und Cdc42 auf der einen und RhoA auf der anderen Seite auch eine Rolle bei inflammatorischen Prozessen im Darm spielt. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass der Virulenzfaktor Lymphostatin, der in gramnegativen Bakterien, wie beispielsweise pathogenen *E. Coli* produziert wird, zu einer Erhöhung der Aktivität von RhoA und zu einer Erniedrigung der Aktivität von Cdc42 führt und es dadurch zu einem Zusammenbruch der Barriere kommt (Babbin et al. 2009). Zum anderen ist bekannt, dass die Rho-GTPasen eine wichtige Rolle in der Regulation des parazellulären Transports von Glucose in der Niere spielen (Turner 2000). Dabei führt eine Depolarisation durch die Na⁺ Kanäle zu einer Erhöhung der parazellulären Permeabilität über die Veränderung der Aktivität von RhoA bzw. ihrem Effektor Rho-kinase. Es ist durchaus vorstellbar, dass ein ähnlicher Mechanismus auch im intestinalen Epithel zur Veränderung der Permeabilität führt.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit bestätigen zum einen die Veröffentlichung von Gerhard et al. (Gerhard et al. 1998), da wir ebenfalls eine Erhöhung der Permeabilität der Darmbarriere 1h nach Applikation von CNF-1 messen konnten. Zum anderen können wir die Ergebnisse von Hopkins (Hopkins et al. 2003) mit T84 Zellen reproduzieren, der beschreibt, dass eine Erhöhung der Permeabilität durch CNF-1 mit einer veränderten Morphologie der Occludenskontakte einhergeht, während das Adherensprotein E-Cadherin größtenteils unbeeinflusst bleibt. Allerdings zeigen unsere Ergebnisse, dass dieser Permeabilitätserhöhung auf eine signifikante Steigerung der Aktivität von RhoA nach 3h korreliert, während in diesem Zeitraum die Aktivität von Rac1 und Cdc42 nicht signifikant verändert war. Dies deutet darauf hin, dass eine

isolierte Aktivitätssteigerung von RhoA ausreicht, um zum Zusammenbruch der Darmbarriere zu führen. Unsere Ergebnisse werden gestützt durch die Ergebnisse von Samarin et al., die in T84 Zellen nachweisen konnten, dass RhoA und die Rho-kinase II eine essentielle Rolle beim Zusammenbruch der Barriere, nach Depletion von extrazellulärem Ca^{2+} , spielen (Samarin et al. 2007). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Endozytose von Occludensproteinen, nach Stimulation mit Interferon- γ , über RhoA und die Rho-kinase vermittelt werden (Utech et al. 2005). Dies erklärt unsere Ergebnisse, bei denen Y27632 in der Lage war, durch Inhibition der Rho-kinase, die barriere-destabilisierenden Effekte von CNF-1 innerhalb der ersten 4h, zu stoppen. Neben den Effekten die wir nach einer Aktivitätssteigerung von RhoA beobachten konnten, stellten wir auch, nach einer Inhibierung der Rho-kinase und Erniedrigung der Aktivität von RhoA, eine Destabilisierung der Barriere fest. In ähnlicher Weise zeigte Fujita (Fujita et al. 2000), dass eine durch RhoA-vermittelte Aktivierung der Rho-kinase, in der Stabilisierung der Occludenskontakte in Epithelzellen involviert ist. Diese und andere Arbeiten (Nusrat et al. 1995; Walsh et al. 2001) stützen unsere Hypothese, dass RhoA und die Rho Kinase den perijunctionalen F-Actin Ring regulieren und damit die Morphologie und Funktion der Occludensproteine beeinflussen. Dadurch könnte sowohl eine Aktivitätssteigerung, als auch eine Erniedrigung der Aktivität von RhoA zu einer Destabilisierung des F- Actin Ringes führen und damit zum Zusammenbruch der intestinalen Barriere führen (Samarin et al. 2007).

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass eine gewisse basale Aktivität der Rho- GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 notwendig ist, um die Darmbarriere zu stabilisieren. Eine Aktivitätssteigerung von Rac1 und Cdc42 führt zu einer vermehrten Stabilität der Barriere, während eine vermehrte Aktivität von RhoA und der Rho-kinase zu einem Zusammenbruch der Darmbarriere führt.

4. Aussicht

Mit dieser Arbeit konnten wir neue Erkenntnisse über die Bedeutung der desmosomalen Adhäsion und die Rolle der Rho- GTPasen für die Aufrechterhaltung der Darmbarriere gewinnen. Diese Ergebnisse wurden allerdings nur durch in vitro Versuche gewonnen. Um eine eindeutige Aussage treffen zu können, fehlen noch ergänzende in vivo Versuche. Eine Möglichkeit wäre es, beispielsweise die Permeabilitätsversuche im Tiermodell zu wiederholen. Durch eine Duodenalsonde könnte man Toxine, Mediatoren und den Antikörper gegen Dsg2 zusammen mit einem Marker, der nicht transzellulär transportiert wird – zum Beispiel FITC Dextran- direkt an die Mucosa des Tieres bringen und durch eine abschließende Blutentnahme die Translokation quantifizieren.

Des Weiteren gilt es auch noch zu klären, über welchen Mechanismus die Applikation des Dsg2 ED Antikörpers zur Veränderung der Tight Junctions führt. Man weiß aus der Pemphigusforschung, dass die Autoantikörper gegen Dsg1 und Dsg3 die Barrierefunktion der Haut durch eine Veränderung der Aktivität von RhoA beeinflussen (Spindler 2011). Dies geschieht über die p38MAP Kinase. Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch im Darm denkbar.

Zum anderen sind die Rho-GTPasen ein Ziel vieler Entzündungsmediatoren, wie Interleukine und Cytokine. Insbesondere Erkenntnisse aus der Pathogenese von M. Crohn oder der Dysregulation der Endothelbarriere bei Sepsis zeigen, dass die Rho-GTPasen Schlüsselenzyme in der Regulation von Barrierefunktionen sind (Weber und Turner 2007). Die Frage stellt sich, ob die Ergebnisse dieser Arbeit dazu beitragen können bestimmte Krankheitsbilder besser zu verstehen, in dem man Proben der Darmmucosa von Patienten mit einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung im Vergleich zu gesunden Patienten auf eine veränderte Aktivität der Rho-GTPasen untersucht.

5. Zusammenfassung

Eine intakte Darmbarriere ist überlebensnotwendig. Bei einigen Erkrankungen kann eine Störung der Darmbarriere zur Translokation von Bakterien aus dem Lumen des Darmes in den menschlichen Körper führen, die septische Entzündungsprozesse auslösen können. In dieser Arbeit untersuchten wir zum einen die Bedeutung der desmosomalen Adhäsion für die Darmbarriere und zum anderen die Rolle der Rho-GTPasen in der Regulation der Darmbarriere.

Für unsere Untersuchungen charakterisierten wir Caco2 Zellen, von denen wir nachweisen konnten, dass sie ein geeignetes Modell für die Darmbarriere sind. Wir konnten zeigen, dass Caco2 Zellen 14 Tage nach ihrer Konfluenz einen vollständigen Schlussleistenkomplex ausbilden und funktionell ähnlich Permeabilitäseigenschaften, wie die Mukosa von Ratten ex vivo aufweisen.

Um die Bedeutung der desmosomalen Adhäsion zu klären, applizierten wir einen gegen die Extrazellulärdomäne von Dsg2 gerichteten Antikörper. Dieser Antikörper war spezifisch in der Lage Dsg2 vermittelte Adhäsion zu blockieren. Nach Applikation des Dsg2 ED konnten wir eine Fragmentierung der Occludensproteine, sowie eine gestörte Barrierefunktion mit erhöhter Permeabilität und erniedrigtem transepithelialen Widerstand nachweisen. Damit konnten wir zeigen, dass die Dsg2 vermittelte Adhäsion essentiell für die Aufrechterhaltung der Darmbarriere ist.

Des Weiteren untersuchten wir die Rolle der Rho-GTPasen. Wir veränderten die Aktivität der Rho-GTPasen durch Applikation von bakteriellen Toxinen, wie CNF-1, CNF-y, Toxin B, C3-TF und LT sowie Mediatoren, wie Y27632 und quantifizierten die Änderung anschließend durch die Aktivitätsmessung der Rho-GTPasen mittels GLISA. In Immunfluoreszenzen konnten wir zeigen, dass sowohl eine Steigerung als auch eine Erniedrigung der Aktivität von RhoA mit einer Fragmentierung der Occludensproteine einhergeht, während die Adherens Junctionen unbeeinflusst bleiben. Diese morphologische Veränderung korreliert mit einer signifikant erhöhten Permeabilität und einem erniedrigtem transepithelialelektrischen Widerstand. Im Gegensatz dazu, konnten wir zeigen, dass eine Erhöhung der Aktivität von Rac1 und Cdc42 in

der Immunfluoreszenz zu keinen sichtbaren Veränderungen führt, die funktionellen Ergebnisse, mit einem erhöhten transepithelialen elektrischen Widerstand und einer erniedrigten Permeabilität auf eine Stabilisierung der Barriere hinweisen. Eine Erniedrigung der Aktivität von Rac1 und Cdc42 führt hingegen zu einer Destabilisierung der Barriere. Morphologisch führte die Verringerung der Aktivität von Rac1 durch LT zu einer Reduzierung der Occludensproteine an den Zellgrenzen und zu einer diffuseren Färbung des Adhärenz Junctionsprotein E- Cadherin. Zum anderen zeigte sich in diesem Fall eine deutliche Reduzierung der Barrierefunktion mit einem erniedrigten transepithelialen elektrischen Widerstand und einer erhöhten Permeabilität.

Letzlich konnte diese Arbeit durch ihre Erkenntnisse einen Teil dazu beizutragen, dass die komplexe Regulation der Darmbarriere besser verstanden wird. Dieses bessere Verständnis soll künftig zur Entwicklung neuer Therapieoptionen für Patienten dienen, die unter den septischen Folgen einer Störung der Darmbarriere leiden.

6. Literaturverzeichnis

- Adams, C. L., W. J. Nelson, and S. J. Smith. 1996. Quantitative analysis of cadherin-catenin-actin reorganization during development of cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 135 (6 Pt 2):1899-1911.
- Aktorics, K., G. Schmidt, and I. Just. 2000. Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. *Biol Chem* 381 (5-6):421-426.
- Alfa, M. J., A. Kabani, D. Lyerly, S. Moncrief, L. M. Neville, A. Al-Barrak, G. K. Harding, B. Dyck, K. Olekson, and J. M. Embil. 2000. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile* responsible for a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Microbiol* 38 (7):2706-2714.
- Amano, M., M. Ito, K. Kimura, Y. Fukata, K. Chihara, T. Nakano, Y. Matsuura, and K. Kaibuchi. 1996. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* 271 (34):20246-20249.
- Artursson, P., A. L. Ungell, and J. E. Lofroth. 1993. Selective paracellular permeability in two models of intestinal absorption: cultured monolayers of human intestinal epithelial cells and rat intestinal segments. *Pharm Res* 10 (8):1123-1129.
- Babbin, B. A., M. Sasaki, K. W. Gerner-Schmidt, A. Nusrat, and J. M. Klapproth. 2009. The bacterial virulence factor lymphostatin compromises intestinal epithelial barrier function by modulating rho GTPases. *Am J Pathol* 174 (4):1347-1357.
- Benninghoff, A., and D. Drenckhahn. 2008. *Taschenbuch Anatomie*. München ; Jena: Elsevier, Urban & Fischer.
- Benninghoff, A., and D. Drenckhahn. 2008. *Anatomie Band 1* München ; Jena: Elsevier, Urban & Fischer.
- Berglund, J. J., M. Riegler, Y. Zolotarevsky, E. Wenzl, and J. R. Turner. 2001. Regulation of human jejunal transmucosal resistance and MLC phosphorylation by Na(+)-glucose cotransport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281 (6):G1487-1493.
- Berkes, J., V. K. Viswanathan, S. D. Savkovic, and G. Hecht. 2003. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* 52 (3):439-451.
- Bishop, A. L., and A. Hall. 2000. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348 Pt 2:241-255.

- Blumenthal, B., C. Hoffmann, K. Aktories, S. Backert, and G. Schmidt. 2007. The cytotoxic necrotizing factors from *Yersinia pseudotuberculosis* and from *Escherichia coli* bind to different cellular receptors but take the same route to the cytosol. *Infect Immun* 75 (7):3344-3353.
- Bokoch, G. M. 2003. Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem* 72:743-781.
- Bustelo, X. R., V. Sauzeau, and I. M. Berenjano. 2007. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays* 29 (4):356-370.
- Calautti, E., S. Cabodi, P. L. Stein, M. Hatzfeld, N. Kedersha, and G. Paolo Dotto. 1998. Tyrosine phosphorylation and src family kinases control keratinocyte cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 141 (6):1449-1465.
- Chen, M. L., C. Pothoulakis, and J. T. LaMont. 2002. Protein kinase C signaling regulates ZO-1 translocation and increased paracellular flux of T84 colonocytes exposed to *Clostridium difficile* toxin A. *J Biol Chem* 277 (6):4247-4254.
- Chen, Y. T., D. B. Stewart, and W. J. Nelson. 1999. Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* 144 (4):687-699.
- Claude, P. (1978). "Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens." *J Membr Biol* 39(2-3): 219-232.
- Claude, P. and D. A. Goodenough (1973). "Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia." *J Cell Biol* 58(2): 390-400.
- Collins, J. E., J. E. Lorimer, D. R. Garrod, S. C. Pidsley, R. S. Buxton, and T. P. Fleming. 1995. Regulation of desmocollin transcription in mouse preimplantation embryos. *Development* 121 (3):743-753.
- DerMardirossian, C., and G. M. Bokoch. 2005. GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol* 15 (7):356-363.
- Drees, F., S. Pokutta, S. Yamada, W. J. Nelson, and W. I. Weis. 2005. Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* 123 (5):903-915.
- Elder, K., B. A. Lashner, and F. Al Solaiman. 2009. Clinical approach to colonic ischemia. *Cleve Clin J Med* 76 (7):401-409.
- Eschkind, L., Tian, Q., Schmid, A., Franke, W.W., Windoffer, R. and Leube, R.E. Loss of desmoglein 2 suggests essential functions for early

embryonic development and proliferation of embryonal stem cells, *Eur. J. Cell Biol.* 81; pp. 592-598

Fanning, A. S., and J. M. Anderson. 2009. Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Ann N Y Acad Sci* 1165:113-120.

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

Fiorentini, C., A. Fabbri, G. Flatau, G. Donelli, P. Matarrese, E. Lemichez, L. Falzano, and P. Boquet. 1997. Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1), a toxin that activates the Rho GTPase. *J Biol Chem* 272 (31):19532-19537.

Fogh, J., J. M. Fogh, and T. Orfeo. 1977. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59 (1):221-226.

Forster, C. 2008. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol* 130 (1):55-70.

Fujita, H., H. Katoh, H. Hasegawa, H. Yasui, J. Aoki, Y. Yamaguchi, and M. Negishi. 2000. Molecular decipherment of Rho effector pathways regulating tight-junction permeability. *Biochem J* 346 Pt 3:617-622.

Furuse, M. 2009. Knockout animals and natural mutations as experimental and diagnostic tool for studying tight junction functions in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1788 (4):813-819.

Furuse, M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita, and S. Tsukita. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123 (6 Pt 2):1777-1788.

Gerhard, R., G. Schmidt, F. Hofmann, and K. Aktories. 1998. Activation of Rho GTPases by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1 increases intestinal permeability in Caco-2 cells. *Infect Immun* 66 (11):5125-5131.

Giloh, H., and J. W. Sedat. 1982. Fluorescence microscopy: reduced photobleaching of rhodamine and fluorescein protein conjugates by n-propyl gallate. *Science* 217 (4566):1252-1255.

Green, K. J., and C. L. Simpson. 2007. Desmosomes: new perspectives on a classic. *J Invest Dermatol* 127 (11):2499-2515.

Groschwitz, K. R., and S. P. Hogan. 2009. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 124 (1):3-20; quiz 21-22.

Guandalini, S., and M. Setty. 2008. Celiac disease. *Curr Opin Gastroenterol* 24 (6):707-712.

Halbleib, J. M., A. M. Saaf, P. O. Brown, and W. J. Nelson. 2007. Transcriptional modulation of genes encoding structural characteristics of differentiating enterocytes during development of a polarized epithelium in vitro. *Mol Biol Cell* 18 (11):4261-4278.

Hall, A. 1990. The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* 249 (4969):635-640.

Hall A 1996. Ras-related GTPases and the cytoskeleton. *Eur J Biochem.* 1;242(2):171-85.

Hall, A. 2005. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* 33 (Pt 5):891-895.

Heasman, S. J., and A. J. Ridley. 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (9):690-701.

Heiskala, M., P. A. Peterson, and Y. Yang. 2001. The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport. *Traffic* 2 (2):93-98.

Heller, F. e. a. 2005. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 129:550–564.

Heupel, W. M., D. Zillikens, D. Drenckhahn, and J. Waschke. 2008. Pemphigus vulgaris IgG directly inhibit desmoglein 3-mediated transinteraction. *J Immunol* 181 (3):1825-1834.

Hoffmann, C., M. Pop, J. Leemhuis, J. Schirmer, K. Aktories, and G. Schmidt. 2004. The *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxic necrotizing factor (CNFY) selectively activates RhoA. *J Biol Chem* 279 (16):16026-16032.

Hopkins, A. M., S. V. Walsh, P. Verkade, P. Boquet, and A. Nusrat. 2003. Constitutive activation of Rho proteins by CNF-1 influences tight junction structure and epithelial barrier function. *J Cell Sci* 116 (Pt 4):725-742.

Huber, A. H., D. B. Stewart, D. V. Laurents, W. J. Nelson, and W. I. Weis. 2001. The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *J Biol Chem* 276 (15):12301-12309.

Huelsken, J., R. Vogel, V. Brinkmann, B. Erdmann, C. Birchmeier, and W. Birchmeier. 2000. Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *J Cell Biol* 148 (3):567-578.

Hunziker, W., T. K. Kiener, and J. Xu. 2009. Vertebrate animal models unravel physiological roles for zonula occludens tight junction adaptor proteins. *Ann N Y Acad Sci* 1165:28-33.

Ivanov, A. I., A. Nusrat, and C. A. Parkos. 2004. The epithelium in inflammatory bowel disease: potential role of endocytosis of junctional proteins in barrier disruption. *Novartis Found Symp* 263:115-124; discussion 124-132, 211-118.

Johansson, M. E., M. Phillipson, J. Petersson, A. Velcich, L. Holm, and G. C. Hansson. 2008. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (39):15064-15069.

Jorgensen, V. L., S. L. Nielsen, K. Espersen, and A. Perner. 2006. Increased colorectal permeability in patients with severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 32 (11):1790-1796.

Just, I., J. Selzer, M. Wilm, C. von Eichel-Streiber, M. Mann, and K. Aktories. 1995. Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* 375 (6531):500-503.

Kapus, A., and K. Szaszi. 2006. Coupling between apical and paracellular transport processes. *Biochem Cell Biol* 84 (6):870-880.

Kimura, K., M. Ito, M. Amano, K. Chihara, Y. Fukata, M. Nakafuku, B. Yamamori, J. Feng, T. Nakano, K. Okawa, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi. 1996. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273 (5272):245-248.

Kreisel, W. 2006. [Pathogenesis of chronic inflammatory bowel diseases]. *Praxis (Bern 1994)* 95 (50):1965-1973.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680-685.

Lal-Nag, M., and P. J. Morin. 2009. The claudins. *Genome Biol* 10 (8):235.

Lamarche N, Tapon N, Stowers L, Burbelo PD, Aspenström P, Bridges T, Chant J, Hall A 1996. Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell* 1;87(3):519-29.

Laukoetter, M. G., P. Nava, W. Y. Lee, E. A. Severson, C. T. Capaldo, B. A. Babbin, I. R. Williams, M. Koval, E. Peatman, J. A. Campbell, T. S. Dermody, A. Nusrat, and C. A. Parkos. 2007. JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J Exp Med* 204 (13):3067-3076.

Laukoetter, M. G., P. Nava, and A. Nusrat. 2008. Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 14 (3):401-407.

Lerm, M., G. Schmidt, U. M. Goehring, J. Schirmer, and K. Aktories. 1999. Identification of the region of rho involved in substrate recognition by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1). *J Biol Chem* 274 (41):28999-29004. *Eur J Biochem.* 1;242(2):171-85.

Lim L, Manser E, Leung T, Hall C 1996. Regulation of phosphorylation pathways by p21 GTPases. The p21 Ras-related Rho subfamily and its role in phosphorylation signalling pathways *Eur J Biochem.* 1;242(2):171-85.

Lozano, E., M. Betson, and V. M. Braga. 2003. Tumor progression: Small GTPases and loss of cell-cell adhesion. *Bioessays* 25 (5):452-463.

Luellmann-Rauch, R., ed. 2003. *Histologie Verstehen- Lernen - Nachschlagen*. Translated by 1. 1 ed. 1 vols. Vol. 1. Auflage. Kiel: Georg Thieme Verlag.

Kilani, M.M., Mohammed, K.A., Nasreen, N., Hardwick, J.A., Kaplan, M.H., Tepper, R.S., Antony, V.B. (2004) Respiratory syncytial virus causes increased bronchial epithelial permeability, *Chest* 126(1):186-91

Narumiya S. 1996. The small GTPase Rho: Cellular functions and signal transduction *J Biochem;* 120(2):215-228

Madara, J. 1994. The functional morphology of the mucosa of the small intestine. *Physiology of the gastrointestinal tract*, 1577-1622.

Matsumoto, H., R. H. Erickson, J. R. Gum, M. Yoshioka, E. Gum, and Y. S. Kim. 1990. Biosynthesis of alkaline phosphatase during differentiation of the human colon cancer cell line Caco-2. *Gastroenterology* 98 (5 Pt 1):1199-1207.

McCarthy, K. M., I. B. Skare, M. C. Stankewich, M. Furuse, S. Tsukita, R. A. Rogers, R. D. Lynch, and E. E. Schneeberger. 1996. Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci* 109 (Pt 9):2287-2298.

Mitic, L. L., and J. M. Anderson. 1998. Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol* 60:121-142.

Mitic, L. L., C. M. Van Itallie, and J. M. Anderson. 2000. 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* 279 (2):G250-254.

- Nava, P., M. G. Laukoetter, A. M. Hopkins, O. Laur, K. Gerner-Smidt, K. J. Green, C. A. Parkos, and A. Nusrat. 2007. Desmoglein-2: a novel regulator of apoptosis in the intestinal epithelium. *Mol Biol Cell* 18 (11):4565-4578.
- Niessen, C. M., and C. J. Gottardi. 2008. Molecular components of the adherens junction. *Biochim Biophys Acta* 1778 (3):562-571.
- Nitta, T., M. Hata, S. Gotoh, Y. Seo, H. Sasaki, N. Hashimoto, M. Furuse, and S. Tsukita. 2003. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* 161 (3):653-660.
- Nusrat, A., M. Giry, J. R. Turner, S. P. Colgan, C. A. Parkos, D. Carnes, E. Lemichez, P. Boquet, and J. L. Madara. 1995. Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (23):10629-10633.
- Ostermann, G., K. S. Weber, A. Zerneck, A. Schroder, and C. Weber. 2002. JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat Immunol* 3 (2):151-158.
- Ozawa, M., H. Baribault, and R. Kemler. 1989. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *Embo J* 8 (6):1711-1717.
- Parise, L. V. 2003. JAM-1 regulation of endothelial cell migration: implications for angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23 (12):2119-2120.
- Rawadi, G., J. L. Zugaza, et al. (1999). "Involvement of small GTPases in Mycoplasma fermentans membrane lipoproteins-mediated activation of macrophages." *J Biol Chem* 274(43): 30794-30798.
- Renart, J., J. Reiser, and G. R. Stark. 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (7):3116-3120.
- Ridley, A. J. 2001. Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol* 11 (12):471-477.
- Samarin, S. N., A. I. Ivanov, G. Flatau, C. A. Parkos, and A. Nusrat. 2007. Rho/Rho-associated kinase-II signaling mediates disassembly of epithelial apical junctions. *Mol Biol Cell* 18 (9):3429-3439.
- Sambuy, Y., I. De Angelis, G. Ranaldi, M. L. Scarino, A. Stamatii, and F. Zucco. 2005. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* 21 (1):1-26.

Schlegel, N., Y. Baumer, D. Drenckhahn, and J. Waschke. 2009. Lipopolysaccharide-induced endothelial barrier breakdown is cyclic adenosine monophosphate dependent in vivo and in vitro. *Crit Care Med* 37 (5):1735-1743.

Schlegel, N., M. Meir, W. M. Heupel, B. Holthofer, R. E. Leube, and J. Waschke. Desmoglein 2-mediated adhesion is required for intestinal epithelial barrier integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298 (5):G774-783.

Schlegel, N., M. Meir, V. Spindler, C. T. Germer, and J. Waschke. Differential role of Rho GTPases in intestinal epithelial barrier regulation in vitro. *J Cell Physiol* 226 (5):1196-1203.

Schlegel, N., and J. Waschke. 2009. Impaired cAMP and Rac 1 signaling contribute to TNF-alpha-induced endothelial barrier breakdown in microvascular endothelium. *Microcirculation* 16 (6):521-533.

Schmidt, G., J. Selzer, M. Lerm, and K. Aktories. 1998. The Rho-deamidating cytotoxic necrotizing factor 1 from *Escherichia coli* possesses transglutaminase activity. Cysteine 866 and histidine 881 are essential for enzyme activity. *J Biol Chem* 273 (22):13669-13674.

Schnittler, H. J., A. Wilke, T. Gress, N. Suttorp, and D. Drenckhahn. 1990. Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium. *J Physiol* 431:379-401.

Schwartz, M. 2004. Rho signalling at a glance. *J Cell Sci* 117 (Pt 23):5457-5458.

Severson, E. A., and C. A. Parkos. 2009. Mechanisms of outside-in signaling at the tight junction by junctional adhesion molecule A. *Ann N Y Acad Sci* 1165:10-18.

Shen, L., and J. R. Turner. 2006. Role of epithelial cells in initiation and propagation of intestinal inflammation. Eliminating the static: tight junction dynamics exposed. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290 (4):G577-582.

Spindler, V., W. M. Heupel, A. Efthymiadis, E. Schmidt, R. Eming, C. Rankl, P. Hinterdorfer, T. Muller, D. Drenckhahn, and J. Waschke. 2009. Desmocollin 3-mediated binding is crucial for keratinocyte cohesion and is impaired in pemphigus. *J Biol Chem* 284 (44):30556-30564.

Spindler, V., N. Schlegel, and J. Waschke. Role of GTPases in control of microvascular permeability. *Cardiovasc Res*.

Spindler, V., and J. Waschke. Role of Rho GTPases in desmosomal adhesion and pemphigus pathogenesis. *Ann Anat* 193 (3):177-180.

Sun, D., L. X. Yu, et al. (2004). "In vitro testing of drug absorption for drug 'developability' assessment: forming an interface between in vitro preclinical data and clinical outcome." *Curr Opin Drug Discov Devel* 7(1): 75-85.

Suzuki, T., B. C. Elias, A. Seth, L. Shen, J. R. Turner, F. Giorgianni, D. Desiderio, R. Guntaka, and R. Rao. 2009. PKC ϵ regulates occludin phosphorylation and epithelial tight junction integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (1):61-66.

Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (9):4350-4354.

Tiruppathi, C., Malik, A.B., Del Vecchio, P.J., Keese, C.R., and Giaever, I., (1992). Electrical method for detection of endothelial cell shape change in real time, *PNAS USA* 89, 7919-7923.

Tsukita, S., Furuse, M. and Itoh, M.(2001) Multifunctional strands in tight junction *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, pp. 285-293.

Turner, J. R. 2000. Show me the pathway! Regulation of paracellular permeability by Na(+)-glucose cotransport. *Adv Drug Deliv Rev* 41 (3):265-281.

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

Uehata, M., T. Ishizaki, H. Satoh, T. Ono, T. Kawahara, T. Morishita, H. Tamakawa, K. Yamagami, J. Inui, M. Maekawa, and S. Narumiya. 1997. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 389 (6654):990-994.

Utech, M., A. I. Ivanov, S. N. Samarin, M. Bruewer, J. R. Turner, R. J. Mrsny, C. A. Parkos, and A. Nusrat. 2005. Mechanism of IFN- γ -induced endocytosis of tight junction proteins: myosin II-dependent vacuolarization of the apical plasma membrane. *Mol Biol Cell* 16 (10):5040-5052.

Vetrano, S., and S. Danese. 2009. The role of JAM-A in inflammatory bowel disease: unrevealing the ties that bind. *Ann N Y Acad Sci* 1165:308-313.

Walsh, S. V., A. M. Hopkins, J. Chen, S. Narumiya, C. A. Parkos, and A. Nusrat. 2001. Rho kinase regulates tight junction function and is necessary for tight junction assembly in polarized intestinal epithelia. *Gastroenterology* 121 (3):566-579.

Wang, Q., X. L. Guo, D. Wells-Byrum, G. Noel, T. A. Pritts, and C. K. Ogle. 2008. Cytokine-induced epithelial permeability changes are

regulated by the activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in cultured Caco-2 cells. *Shock* 29 (4):531-537.

Waschke, J., W. Baumgartner, R. H. Adamson, M. Zeng, K. Aktories, H. Barth, C. Wilde, F. E. Curry, and D. Drenckhahn. 2004. Requirement of Rac activity for maintenance of capillary endothelial barrier properties. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286 (1):H394-401.

Waschke, J., P. Bruggeman, W. Baumgartner, D. Zillikens, and D. Drenckhahn. 2005. Pemphigus foliaceus IgG causes dissociation of desmoglein 1-containing junctions without blocking desmoglein 1 transinteraction. *J Clin Invest* 115 (11):3157-3165.

Waschke, J., V. Spindler, P. Bruggeman, D. Zillikens, G. Schmidt, and D. Drenckhahn. 2006. Inhibition of Rho A activity causes pemphigus skin blistering. *J Cell Biol* 175 (5):721-727.

Weber, C. R., S. C. Nalle, M. Tretiakova, D. T. Rubin, and J. R. Turner. 2008. Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. *Lab Invest* 88 (10):1110-1120.

Weber, C. R., and J. R. Turner. 2007. Inflammatory bowel disease: is it really just another break in the wall? *Gut* 56 (1):6-8.

Wong, V., and B. M. Gumbiner. 1997. A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. *J Cell Biol* 136 (2):399-409.

Yang, C., and M. G. Kazanietz. 2007. Chimaerins: GAPs that bridge diacylglycerol signalling and the small G-protein Rac. *Biochem J* 403 (1):1-12.

Yu, D., A. M. Marchiando, et al. (2010). "MLCK-dependent exchange and actin binding region-dependent anchoring of ZO-1 regulate tight junction barrier function." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(18): 8237-8241.

Zlatanova, J., E. Paneva, and J. Yaneva. 1994. A spot test for protein detection and semiquantitative estimation in small samples. *Cytobios* 78 (314):135-138.

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxydisulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BSA	Rinderserumalbumin
C3TF	C3- Transferase
Ca ²⁺	Calcium
Cl	Claudin
CNF-1	Cytotoxic necrotizing factor 1
CNFy	Cytotoxic necrotizing factor y
Cy3	Indocarbocyanin
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eaglemedium
Dsc	Desmocollin
Dsg	Desmoglein
Dsg2 ED Ak	Antikörper der gegen die Extrazellulärdomäne von Dsg2 gerichtet ist
E-Cad	Epitheliales Cadherin
ED	Extrazellulärdomäne
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
F-Actin	Filamentäres Actin
FCS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
gam	Goat anti-mouse
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
garb	Goat anti-rabbit
gart	Goat anti-rat
GDI	Guanosin-Nukleotid-Austauschinhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanosin-Nukleotid-Austauschfaktor
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphat -Hydrolase7 Anhang 89
h	Stunde
HE	Hämatoxylin und Eosin
HbSS	Hank's gepufferte Salzlösung
IF	Immunfluoreszenzmikroskopie
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LT	Letales Toxin
M	Molar [g/mol]
mA	Milliampere
Mg ²⁺	Magnesium

Min	Minute
ml	Milliliter
MLC	Myosin-Leichtketten
MLCK	Myosin- Leichtketten Kinase
MLCP	MLC-Phosphatase
mm	Millimeter
MTT	3-[4,5-Dimethyldiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolimbromid
NGS	Normales Ziegenserum
NPG	N-Propylgallat
p38MAPK	p38 Mitogen-aktivierte Kinase
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
PAK	p21-aktivierte Kinase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH-Wert
PKC	Proteinkinase C
POX	Meerrettichperoxidase
PPL	Prestained protein ladder
Oc	Occludin
Rho	Ras homolog
ROCK	Rho associated coiled-coil containing protein kinases
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TER	transepithelialer elektrischer Widerstand
U	Umdrehungen
U	Units
V	Volt
W	Watt

8.2. Danksagung

Danken möchte ich Prof. Dr. Jens Waschke für die Überlassung dieser Arbeit, sein Vertrauen in mich und seine konstruktive Kritik. Er hatte immer ein offenes Ohr für mich und ist für mich ein wahres Vorbild als Wissenschaftler.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Nicolas Schlegel. In unzähligen Stunden und Gesprächen unterstützte und förderte er mich. Er motivierte mich an frustrierenden Tagen und gab nötige Denkanstöße, um die Arbeit voran zu bringen. Seine Motivation und seine Neugier sind ansteckend und weckten in mir die Begeisterung für Forschung.

Des Weiteren möchte ich mich beim Team der Anatomie III bedanken. Vor allem Frau Nadja Niedermeier und Frau Lisa Berberich die einem „kleinen“ Medizinstudenten das nötige Handwerkszeug beigebracht haben und die Atmosphäre im Labor durch ihre Herzlichkeit unvergleichlich gemacht haben. Frau Alexia Witchen und Veronika Heimbach für ihre Arbeit und ihre Unterstützung. Schließlich noch bei meinen Mitdoktoranden Wolfgang- Moritz Heupel, für seine Erklärung biochemischer Zusammenhänge und bei Alex, Franzi und Dominik für lustige Abende im Institut für Anatomie und Zellbiologie

Entschuldigen möchte ich mich auch bei meinen Bundesbrüdern der KDStV Markomania, die meine Erklärungen zu Rho und Caco2 Zellen an manchem Montagabend ertragen mussten.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern. Ohne sie wären das Studium der Medizin und meine Promotion nicht möglich gewesen. Sie waren immer ein Pol der Ruhe und Kraft in den letzten Jahren.

Letztlich gilt mein größter Dank meiner Freundin Juliane Rother. Sie musste für kleine Darmzellen einige Male auf mich verzichten und hat mich doch immer voll und ganz unterstützt.