

CHARITÉ – UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN, CAMPUS BENJAMIN FRANKLIN

INSTITUT FÜR KLINISCHE PHYSIOLOGIE

---

**Protektiver Effekt von  
6-Shogaol, Ellagsäure und Myrrhe  
auf die intestinale epitheliale Barriere**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

“doctor rerum naturalium“

**(Dr. rer. nat.)**

in der Wissenschaftsdisziplin

“Biochemie und Pathobiochemie“

**eingereicht an der**

MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT

der UNIVERSITÄT POTSDAM

**Julia Lüttig**

Ökotrophologin (MSc)

Potsdam, den 16. Dezember 2016

Online veröffentlicht auf dem  
Publikationsserver der Universität Potsdam:  
URN urn:nbn:de:kobv:517-opus4-102571  
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-102571>

Ist man in kleinen Dingen nicht geduldig,  
bringt man die großen Vorhaben zum Scheitern.

Konfuzius





# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>V</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>VII</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>3</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Charakterisierung der untersuchten Pflanzen bzw. Pflanzeninhaltsstoffe .....</b>	<b>4</b>
1.1.1 Bioaktiver Scharfstoff des Ingwers: 6-Shogaol.....	4
1.1.2 Bioaktive Phenolsäure: Ellagsäure .....	5
1.1.3 Gummiharz: Myrrhe.....	6
<b>1.2 Die intestinale epitheliale Barriere.....</b>	<b>8</b>
1.2.1 Aufbau und Funktion der intestinalen epithelialen Barriere .....	8
1.2.2 Struktur und Funktion der Tight Junction (TJ).....	9
1.2.3 Tight Junction-Proteinfamilie: Claudine.....	11
1.2.4 Barrieredysfunktion in chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.....	13
1.2.5 Zellmodelle HT-29/B6 und Caco-2 für die intestinale Barriere.....	13
<b>1.3 Protektive Wirkung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe auf die intestinale         Barrierefunktion .....</b>	<b>15</b>
1.3.1 Alkaloid: Berberin .....	15
1.3.2 Flavonoid: Quercetin .....	16
<b>2 ZIELSETZUNG.....</b>	<b>17</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1 Zellkultur von HT-29/B6- und Caco-2-Zellen .....</b>	<b>18</b>

<b>3.2 Zytotoxizitätstest .....</b>	<b>19</b>
<b>3.3 Elektrophysiologische Messungen .....</b>	<b>20</b>
3.3.1 Manuelle Widerstandsmessung der Zellkulturfilter.....	20
3.3.2 Die Ussing-Kammer .....	21
3.3.3 Bestimmung der Permeabilität für Fluoreszein und FITC-Dextran 4000 .....	23
3.3.4 Messung von Dilutionspotentialen .....	25
<b>3.4 Proteinanalytik .....</b>	<b>26</b>
3.4.1 Proteinextraktion mittels Lysepuffer .....	26
3.4.2 Proteinquantifizierung nach Pierce .....	26
3.4.3 Proteinauftrennung durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese .....	27
3.4.4 Proteintransfer mittels Western Blot .....	28
3.4.5 Immundetektion von Proteinen .....	28
<b>3.5 Immunfluoreszenzfärbung von Epithelzellen.....</b>	<b>29</b>
3.5.1 Fixierung und immunhistochemische Färbung.....	29
3.5.2 Prinzip des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops .....	29
<b>3.6 Gefrierbruch und Elektronenmikroskopie.....</b>	<b>31</b>
<b>3.7 Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>32</b>
3.7.1 Isolation und Quantitätsbestimmung der RNA aus den Zellfiltern .....	32
3.7.2 Reverse Transkription .....	32
3.7.3 Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion.....	33
<b>3.8 Statistische Verfahren .....</b>	<b>34</b>
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Protektive Wirkung von 6-SG auf die TNF-<math>\alpha</math>-induzierte Barrieredysfunktion .....</b>	<b>35</b>
4.1.1 Charakterisierung des Barriere-protektiven 6-SG Effektes an der Kolonkarzinomzelllinie HT-29/B6 .....	35
4.1.1.1 <i>Wirkung auf den TER, die Tight Junction-Proteinexpression und die Apoptose..</i>	35
4.1.1.2 <i>Wirkung von 6-SG und TNF-<math>\alpha</math> auf die Zellvitalität.....</i>	37

4.1.1.3 Wirkung auf die Permeabilität für Fluoreszein .....	38
4.1.1.4 Wirkung auf die Ultrastruktur des Tight Junction-Netzwerkes .....	39
4.1.1.5 Einfluss auf den NFκB-Signalweg .....	40
4.1.1.6 Rolle des Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor γ (PPARγ) .....	44
4.1.2 Wirkung von 6-SG auf die Kolonkarzinom-Zelllinie Caco-2 .....	46
<b>4.2 Steigerung der Barrierefunktion durch Ellagsäure.....</b>	<b>47</b>
4.2.1 Wirkung der Ellagsäure auf Barrierefunktion der Kolonkarzinom-Zelllinie Caco-2.....	47
4.2.1.1 Wirkung auf den epithelialen Widerstand und die Ionenpermeabilität.....	47
4.2.1.2 Einfluss auf die Proteinexpression Barriere-relevanter Tight Junction-Proteine ..	50
4.2.1.3 Wirkung auf Lokalisation von Barriere-relevanten Claudinen.....	51
4.2.1.4 Wirkung auf die Ultrastruktur des Tight Junction-Netzwerkes .....	54
4.2.1.5 Einfluss auf intrazelluläre Signalwege .....	55
4.2.1.6 Wirkung von Ellagsäure auf die TNF-α-induzierte Barrieredysfunktion an .....	56
4.2.2 Wirkung von Ellagsäure auf die TNF-α-induzierte Barrieredysfunktion an HT-29/B6-Kolonzellen .....	57
<b>4.3 Steigerung der intestinalen Barrierefunktion und Inhibition des TNF-α-induzierten Barriedefekts durch Myrrhe .....</b>	<b>58</b>
4.3.1 Wirkung von Myrrhe auf die Barrierefunktion der Kolonkarzinom-Zelllinie Caco-2 .....	58
4.3.1.1 Wirkung auf den epithelialen Widerstand und die Permeabilität .....	58
4.3.1.2 Einfluss auf Expression und Lokalisation relevanter Tight Junction-Proteine.....	60
4.3.1.3 Wirkung auf die Ultrastruktur des Tight Junction-Netzwerkes .....	62
4.3.1.4 Einfluss auf intrazelluläre Signalwege .....	63
4.3.2 Wirkung der Myrrhe in HT-29/B6-Kolonzellen.....	64
4.3.2.1 Wirkung auf die TNF-α-induzierte Barrieredysfunktion .....	64
4.3.2.2 Einfluss auf die Proteinexpression Barriere-relevanter Claudine .....	66
4.3.2.3 Wirkung von die Myrrhe auf Lokalisation von Claudin-1 .....	68
4.3.2.4 Einfluss auf die Ultrastruktur der Tight Junction.....	69
4.3.2.5 Einfluss auf intrazelluläre Signalwege .....	70

<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>73</b>
<b>5.1 Relevanz bioaktiver Pflanzeninhaltsstoffe bei der Behandlung von entzündlichen Erkrankungen .....</b>	<b>73</b>
<b>5.2 Wirkung der pflanzlichen Substanzen 6-Shogaol, Ellagsäure und Myrrhe in Caco-2- und HT-29/B6-Zellen.....</b>	<b>74</b>
5.2.1 Relevanz von TNF- $\alpha$ als proinflammatorisches Zytokin in der CED .....	76
5.2.2 Relevanz und Regulation der intestinalen Claudine.....	77
5.2.2.1 <i>NF<math>\kappa</math>B und Claudin-1-Regulation</i> .....	78
5.2.2.2 <i>PI3K/STAT6-abhängige Claudin-2-Regulation</i> .....	79
5.2.3 Ultrastruktur und durchlässige Darmbarriere .....	81
5.2.4 Darreichungsform und Pharmakokinetik .....	82
<b>5.3 Fazit .....</b>	<b>85</b>
<b>6 LITERATUR .....</b>	<b>87</b>
<b>ANHANG .....</b>	<b>98</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>108</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Chemische Strukturen der Ingwerscharfstoffe 6-Gingerol und 6-SG.....	5
Abbildung 2: Chemische Strukturen von dem Ellagitannin Punicalagin (in Granatapfel) und dessen Metaboliten Ellagsäure und Urolithin A.....	5
Abbildung 3: Aufbau der TJ.....	10
Abbildung 4: Interaktionsformen zwischen Claudinen.....	11
Abbildung 5: Gelbe Naturfarbstoffe Alkaloid Berberin und Flavonoid Quercetin.....	15
Abbildung 6: Mechanisches Widerstandmessgerät zur TER-Messung von Zellmonolayern in PCF-Filtern in Zellkulturschalen.....	20
Abbildung 7: Anordnung Ussing-Kammer.....	22
Abbildung 8: Schematische Darstellung für die Auswertung des TJ-Netzwerkes mittels eines Gitternetzes.....	31
Abbildung 9: Effekte von 6-SG und TNF- $\alpha$ auf die Barrierefunktion der HT-29/B6-Zellen.....	36
Abbildung 10: Effekte von 6-SG und TNF- $\alpha$ auf die TJ-Proteinexpression in den HT-29/B6-Zellen.....	37
Abbildung 11: Effekt von 6-SG auf die Permeabilität für Fluoreszein in HT-29/B6-Zellen.....	38
Abbildung 12: TJ-Ultrastruktur nach 24 h Behandlung unter Kontrollbedingungen, 250 U/ml TNF- $\alpha$ , und TNF- $\alpha$ +100 $\mu$ M 6-SG in HT-29/B6-Zellen.....	39
Abbildung 13: Die Effekte von 6-SG und TNF- $\alpha$ auf die Signalwege in HT-29/B6-Zellen.....	41
Abbildung 14: Effekt der Inhibitoren auf die TNF- $\alpha$ -vermittelte Barrierefunktion im Vergleich zu 6-SG.....	42
Abbildung 15: Effekte von 6-SG und TNF- $\alpha$ auf die subzelluläre Verteilung des TJ-Proteins Claudin-1 in HT-29/B6-Zellen.....	43
Abbildung 16: Effekt des PPAR $\gamma$ -Antagonisten GW9662 auf den TNF- $\alpha$ -vermittelten Barriereverlust.....	45
Abbildung 17: Effekt des PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon auf den TNF- $\alpha$ -vermittelten Barriereverlust der HT-29/B6-Monolayer.....	45
Abbildung 18: Protektiver Effekt von 6-SG gegen eine TNF- $\alpha$ -vermittelte Barrierefunktion in den Caco-2-Zellen.....	46
Abbildung 19: Effekt von Ellagsäure auf die Barriere von Caco-2-Zellen.....	48
Abbildung 20: Einfluss von Ellagsäure auf die Permeabilitätseigenschaften der Caco-2-Zellen.....	49
Abbildung 21: Die Wirkung von Ellagsäure auf die Expression der Claudine in Caco-2-Zellen.....	50
Abbildung 22: Effekte von Ellagsäure auf die subzelluläre Verteilung der TJ-Proteine Claudin-1 und Claudin-2 in Caco-2-Zellen.....	51

Abbildung 23: Effekte von Ellagsäure auf die subzelluläre Verteilung der TJ-Proteine Claudin-3 und Claudin-4 in Caco-2-Zellen. ....	52
Abbildung 24: Effekte von Ellagsäure auf die subzelluläre Verteilung des TJ-Proteins Claudin-15 in Caco-2-Zellen. ....	53
Abbildung 25: Darstellung der TJ-Ultrastruktur mit einer 51,000× Vergrößerung beispielhaft unter Kontrollbedingungen und 150 µM Ellagsäure in Caco-2-Zellen.....	54
Abbildung 26: Die Effekte von Ellagsäure auf die Signalwege in Caco-2-Zellen. ....	55
Abbildung 27: Effekt von Ellagsäure gegen eine TNF- $\alpha$ -vermittelte Barrieredysfunktion in den Caco-2-Zellen. ....	56
Abbildung 28: Ellagsäure zeigt keine Wirkung gegen eine TNF- $\alpha$ -vermittelte Barrieredysfunktion in HT-29/B6-Zellen. ....	57
Abbildung 29: Effekt von Myrrhe auf die Barriere von Caco-2-Monolayern.....	59
Abbildung 30: Die Wirkung von Myrrhe auf die Expression der Claudine in Caco-2-Zellen.....	60
Abbildung 31: Effekt von Myrrhe auf die subzelluläre Verteilung von Claudin-2 in Caco-2-Zellen. ....	61
Abbildung 32: Effekt von Myrrhe auf die TJ-Ultrastruktur in Caco-2-Zellen. ....	62
Abbildung 33: Die Effekte von Myrrhe auf die Signalwege in Caco-2-Zellen.....	63
Abbildung 34: Einfluss von des PI3K/Akt-Inhibitors LY294002 auf die TJ-Proteinexpression.....	63
Abbildung 35: Der Effekt von Myrrhe auf die Barrierefunktion der HT-29/B6-Zelllinie. ....	65
Abbildung 36: Die Wirkung von Myrrhe und TNF- $\alpha$ auf die Expression der Claudine in HT-29/B6-Zellen.....	67
Abbildung 37: Effekte von Myrrhe und TNF- $\alpha$ auf die subzelluläre Verteilung des TJ-Proteins Claudin-1 in HT-29/B6-Zellen.....	68
Abbildung 38: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der TJ-Ultrastruktur.....	69
Abbildung 39: Die Effekte von Myrrhe und TNF- $\alpha$ auf die Signalwege in HT-29/B6-Zellen. ....	71
Abbildung 40: Einfluss des STAT6-Signalweges auf die Claudin-2-Expression in HT-29/B6-Zellen.....	72
Abbildung 41: Vereinfachte Darstellung der protektiven Wirkung von 6-SG und Myrrhe auf die TNF- $\alpha$ -induzierte Barrieredysfunktion in der Kolonzelllinie HT-29/B6. ....	85

**TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Expression der im humanen Darm vorherrschenden Claudine.....	12
Tabelle 2: Übersicht der auf den Zellen eingesetzten Substanzen, Lösungsmittel und Konzentrationen. ....	19
Tabelle 3: Proteinextraktionspezifikationen der unterschiedlichen Lysepuffer. ....	26
Tabelle 4: TJ-Morphometrie der HT-29/B6-Monolayer unter 6-SG und TNF- $\alpha$ . ....	39
Tabelle 5: TJ-Morphometrie der Caco-2-Monolayer unter Ellagsäure. ....	54
Tabelle 6: TJ-Morphometrie der Caco-2-Monolayer unter Myrrhe.....	62
Tabelle 7: TJ-Morphometrie der HT-29/B6-Monolayer unter Myrrhe und TNF- $\alpha$ . ....	69

im Anhang

Tabelle 8: Verbrauchslösungen für die Zellkultur. ....	98
Tabelle 9: Testsubstanzen.....	98
Tabelle 10: Chemikalien und Gebrauchskits.....	99
Tabelle 11: Primär- und Sekundärantikörper.....	101
Tabelle 12: Rezepturen der angesetzten Lösungen.....	102
Tabelle 13: Übersicht der Verbrauchsmaterialien.....	105
Tabelle 14: Übersicht der verwendeten Geräte.....	106
Tabelle 15: Programme zur Erhebung und Auswertung der Daten. ....	107

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Akt	Gen der Protein Kinase B
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchoninic acid (Bicinchoninsäure)
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CBF	Campus Benjamin Franklin
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankung
Cldn	Claudin
COX	Cyclooxygenase
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DSS	Dextran-sulfat-sodium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FBS	Fetal bovine serum (Fötales Kälberserum)
FD4	FITC-Dextran 4000
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IF	Immunofluoreszenz
iNOS	inducible nitric oxide synthases (induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase)
IQR	Interquartile range (Interquartilsabstand)
LSM	Laser-Scanning Mikroskopie
MAGI	Membrane-associated guanylate kinases inverted proteins
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (mitogenaktivierte Proteinkinase)
MUPP	Multi-PDZ Domain Protein
MW	Mittelwert
NFκB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO	Nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
n. s.	nicht signifikant
P	Permeabilität



PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SAHA	Suberoylanilide Hydroxamic Acid
Ser	Serin
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumlaurylsulfat)
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standard Error of the Mean
6-SG	6-Shogaol
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TBST	Tris-buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)/Tween <sup>®</sup> -20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TER	transepithelial resistance (transepitheliale Widerstand)
Thr	Threonin
TJ	Tight Junction
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TNFR1	TNF-receptor type 1 (TNF-Rezeptor Typ1)
TRADD	TNFR1-associated death domain protein (TNFR1-assoziiertes Todesdomäne Protein)
TRAF	TNF-receptor-associated factor (TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor)
Tyr	Tyrosin
U	Units
vs.	versus
WB	Western Blot
ZO	Zonula occludens



## ZUSAMMENFASSUNG

Viele bioaktive Pflanzeninhaltsstoffe bzw. Pflanzenmetabolite besitzen antiinflammatorische Eigenschaften. Diese versprechen ein hohes Potential für den Einsatz in der Phytotherapie bzw. Prävention von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Eine intestinale Barrieredysfunktion ist ein typisches Charakteristikum von CED Patienten, die dadurch an akuter Diarrhoe leiden.

In dieser Arbeit werden die Pflanzenkomponenten 6-Shogaol, Ellagsäure und Myrrhe an den intestinalen Kolonepithelzellmodellen HT-29/B6 und Caco-2 auf ihr Potential hin, die intestinale Barriere zu stärken bzw. eine Barrieredysfunktion zu verhindern, untersucht. Hauptschwerpunkt der Analysen ist die parazelluläre Barrierefunktion und die Regulation der dafür entscheidenden Proteinfamilie der Tight Junctions (TJs), der Claudine.

Die Barrierefunktion wird durch Messung des transepithelialen Widerstands (TER) und der Fluxmessung in der Ussing-Kammer bestimmt. Dazu werden die HT-29/B6- und Caco-2-Monolayer mit den Pflanzenkomponenten (6-Shogaol, Ellagsäure, Myrrhe), dem proinflammatorischen Zytokin TNF- $\alpha$  oder der Kombination von beiden Substanzen für 24 oder 48 h behandelt. Außerdem wurden zur weiteren Charakterisierung die Expression sowie die Lokalisation der für die parazelluläre Barriere relevanten Claudine, die TJ-Ultrastruktur und verschiedene Signalwege analysiert.

In Caco-2-Monolayern führten Ellagsäure und Myrrhe, nicht aber 6-Shogaol, allein zu einem TER-Anstieg bedingt durch eine verringerte Permeabilität für Natriumionen. Myrrhe verminderte die Expression des Kationenkanal-bildenden TJ-Proteins Claudin-2 über die Inhibierung des PI3K/Akt-Signalweges, während Ellagsäure die Expression der TJ-Proteine Claudin-4 und -7 reduzierte. Alle Pflanzenkomponenten schützten in den Caco-2-Zellen vor einer TNF- $\alpha$ -induzierten Barrieredysfunktion.

An den HT-29/B6-Monolayern änderte keine der Pflanzenkomponenten allein die Barrierefunktion. Die HT-29/B6-Zellen reagierten auf TNF- $\alpha$  mit einer deutlichen Verminderung des TER und einer erhöhten Fluoreszein-Permeabilität. Die TER-Abnahme war durch eine PI3K/Akt-vermittelte gesteigerte Claudin-2-Expression sowie eine NF $\kappa$ B-vermittelte Umverteilung des abdichtenden TJ-Proteins Claudin-1 gekennzeichnet. 6-Shogaol konnte den TER-Abfall partiell hemmen sowie die PI3K/Akt-induzierte Claudin-2-Expression und die NF $\kappa$ B-bedingte Claudin-1-Umverteilung verhindern. Ebenso inhibierte Myrrhe, nicht aber Ellagsäure, den TNF- $\alpha$ -induzierten TER-Abfall. Dabei konnte Myrrhe zwar den Claudin-2-Expressionsanstieg und die Claudin-1-Umverteilung unterbinden, jedoch weder die NF $\kappa$ B- noch die PI3K/Akt-Aktivierung hemmen. Diese Arbeit zeigt, dass auch STAT6 an dem Claudin-2-Expressionsanstieg durch

TNF- $\alpha$  in HT-29/B6-Zellen beteiligt ist. So wurde durch Myrrhe die TNF- $\alpha$ -induzierte Phosphorylierung von STAT6 und die erhöhte Claudin-2-Expression inhibiert.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Pflanzenkomponenten 6-Shogaol, Ellagsäure und Myrrhe mit unterschiedlichen Mechanismen stärkend auf die Barriere einwirken. Zur Behandlung von intestinalen Erkrankungen mit Barrieredysfunktion könnten daher Kombinationspräparate aus verschiedenen Pflanzen effektiver sein als Monopräparate.

## SUMMARY

Many bioactive phytonutrients or plant metabolites have anti-inflammatory properties promising a high potential as therapeutic application or preventive medicine in inflammatory bowel disease (IBD). An intestinal barrier dysfunction along with diarrhea is a typical characteristic of IBD patients. In this work the plant components 6-shogaol, ellagic acid and myrrh were examined for their potential to strengthen the intestinal barrier or to prevent a barrier dysfunction in two intestinal colonic epithelial cell models: HT-29/B6 and Caco-2. Focusing on paracellular barrier function the protein family of tight junctions (TJs), especially the claudins and their regulation, was studied.

The barrier integrity was evaluated measuring transepithelial resistance (TER) and tracer fluxes in the Ussing chamber. Prior to analyses, HT-29/B6 and Caco-2 monolayers were incubated with plant components (6-shogaol, ellagic acid, myrrh) unchallenged or challenged with the pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  for 24 or 48 hours. In addition, the expression and localization of the paracellular barrier-relevant claudins, the TJ-ultrastructure and various signaling pathways were analyzed, in order to elucidate underlying mechanisms.

In Caco-2 monolayers ellagic acid and myrrh, but not 6-shogaol, increased TER and reduced permeability for sodium ions. The effect of myrrh was accompanied by a reduced expression of the channel forming TJ protein claudin-2 due to the inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway, while ellagic acid decreased the expression of claudin-4 and -7 without affecting any of the analyzed signaling pathways. All employed plant components prevented TNF- $\alpha$ -induced barrier dysfunction in Caco-2 cells.

In HT-29/B6 monolayers, none of the plant components changed the basal barrier function. Monolayers challenged by TNF- $\alpha$  showed increased fluorescein permeability and reduction in TER accompanied by a PI3K/Akt-mediated increase in claudin-2 expression and a NF $\kappa$ B-mediated redistribution of sealing TJ protein claudin-1 off the TJ. 6-shogaol could partially inhibit the TNF- $\alpha$ -induced TER decrease by inhibiting the PI3K/Akt-mediated claudin-2 expression and the NF $\kappa$ B-mediated claudin-1 redistribution. Likewise, myrrh, but not ellagic acid, prevented the decrease in TER, increase in claudin-2 expression, and claudin-1 redistribution without affecting the signaling pathways NF $\kappa$ B and PI3K/Akt. Instead, the STAT6 pathway was additionally involved in TNF- $\alpha$ -mediated regulation of claudin-2 expression. Thus, myrrh prevented the TNF- $\alpha$ -induced STAT6 phosphorylation as well as the increase in claudin-2 expression.

This work demonstrates that the three plant components strengthen the intestinal barrier in different ways. For the treatment of intestinal diseases with barrier dysfunctions, combination preparations of different plant compounds could be more effective than mono preparations.

# 1 EINLEITUNG

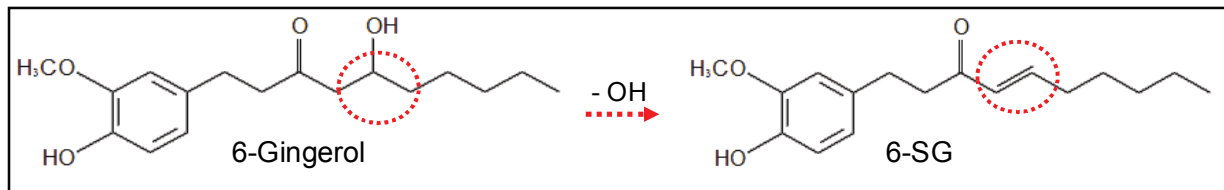
In dieser Arbeit wird die Wirkung der bioaktiven Pflanzenkomponenten 6-Shogaol (aus dem Ingwer, *Zingiber officinale*) sowie Ellagsäure (aus dem Granatapfel, *Punica granatum*), und des Pflanzenharzes Myrrhe (der Pflanze *Commiphora myrrha*) auf die intestinale epitheliale Barrierefunktion an den intestinalen Epithelzellmodellen HT-29/B6 und Caco-2 untersucht. Die Wahl der Pflanzen beruht auf dem seit Jahrhunderten traditionellen Einsatz bei gastrointestinalen Beschwerden. Ihre Wirkungsweise auf die intestinale Barriere ist jedoch bisher kaum untersucht worden. Zu Beginn werden die in dieser Arbeit untersuchten drei Pflanzen bzw. Pflanzeninhaltsstoffe vorgestellt und beschrieben. Im zweiten Kapitel der Einleitung folgen der Aufbau sowie die Funktion der Darmbarriere. Der letzte Abschnitt diskutiert zwei Beispiele von bereits untersuchten Pflanzeninhaltsstoffen hinsichtlich der Wirkung auf die Darmbarriere.

## 1.1 Charakterisierung der untersuchten Pflanzen bzw. Pflanzeninhaltsstoffe

Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe kommen in geringeren Mengen als die primären Pflanzenstoffe bzw. Makronährstoffe wie Kohlenhydrate, Aminosäuren und Fette in Pflanzen vor. Dafür gehören sie zu den bioaktiven Inhaltsstoffen und bedingen die für den Menschen gesundheitsfördernden bzw. pharmakologischen Wirkungen dieser Pflanzen.

### 1.1.1 Bioaktiver Scharfstoff des Ingwers: 6-Shogaol

Ingwer, *Zingiber officinale* Roscoe, gehört zu der Pflanzenfamilie der Ingwergewächse, *Zingiberaceae*, und wächst in den Tropen Südostasiens. Der Gebrauch der Ingwerwurzel, dem Rhizom, als Gewürz für Speisen und als Heilpflanze zur Behandlung von Volkskrankheiten erfolgt schon seit Jahrtausenden, in der Traditionellen Chinesischen Medizin seit über 5000 Jahren (Bode and Dong 2011). Auch in experimentellen Versuchsreihen konnten positive Effekte der Ingwerwurzel nachgewiesen werden. So weist das Rhizom antidiabetogene, antiemetische, antioxidative, antientzündliche, antikanzerogene, antimikrobielle und cholesterinsenkende Eigenschaften auf (Ali et al. 2008; Chrubasik et al. 2005). Ursächlich dafür sind bioaktive Komponenten, die auch für die Schärfe des Ingwers mitverantwortlich sind, wie verschiedene Gingerole, Shogaole und Paradole (Kundu et al. 2009). Der Scharfstoff 6-Shogaol (**6-SG**), (E)-1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)dec-4-en-3-one, ein Vanilloid und die dehydrierte Form von 6-Gingerol, kommt vermehrt im getrocknetem Ingwer vor (Strukturformeln in **Abbildung 1**).

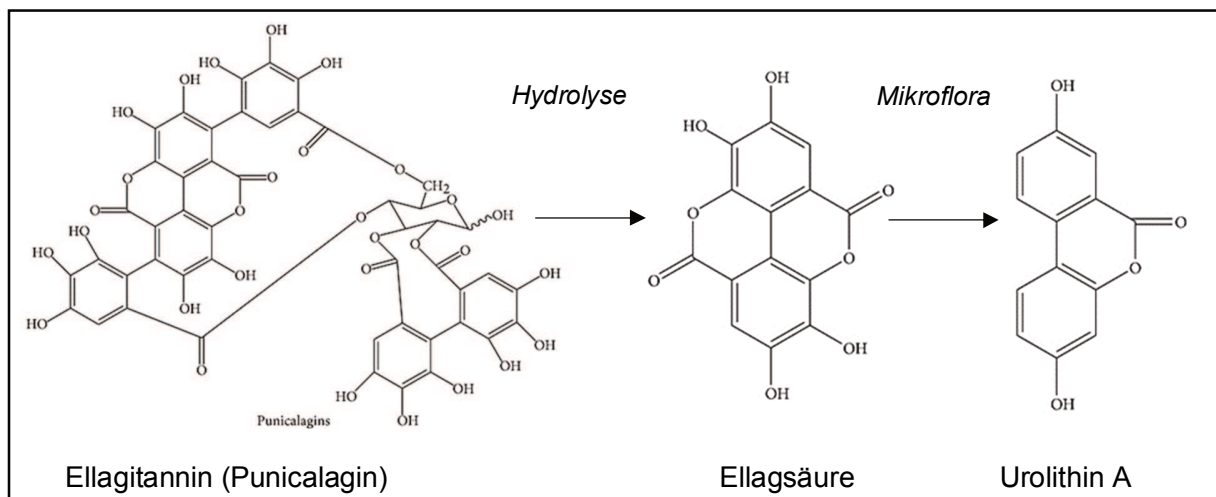


**Abbildung 1: Chemische Strukturen der Ingwerscharfstoffe 6-Gingerol und 6-SG.**  
 6-SG entsteht durch Dehydrierung aus 6-Gingerol.

Aufgrund der ungesättigten Verbindung ist die antioxidative und antientzündliche Wirkung von 6-SG größer als die von 6-Gingerol (Dugasani et al. 2010). Viele Mechanismen, die durch 6-SG ausgelöst werden, scheinen für die antiinflammatorische Wirkung ursächlich zu sein, z. B. die Hemmung von in Entzündungen aktiviertem NFκB (Ling et al. 2010; Pan et al. 2008; Sohn et al. 2013). In meiner Masterarbeit wurden bereits einige Untersuchungen zum Barriere-protectiven Effekt veröffentlicht. Diese werden im Kapitel 4.1.1.1 nochmals zusammengefasst dargestellt.

### 1.1.2 Bioaktive Phenolsäure: Ellagsäure

Ellagsäure (4,4',5,5',6,6'-Hexahydroxydiphenic acid 2,6,2',6'-dilactone, siehe **Abbildung 2**) gehört zu den Polyphenolen und kommt in höheren Mengen in Himbeeren (*Rubus idaeus*) und Erdbeeren (*Fragaria*) vor.



**Abbildung 2: Chemische Strukturen von dem Ellagitannin Punicalagin (im Granatapfel) und dessen Metaboliten Ellagsäure und Urolithin A.**

Punicalagin zerfällt durch saure Hydrolyse u.a. zu Ellagsäure und wird durch Bakterien schrittweise weiter zu Urolithin A metabolisiert.

Ellagsäure entsteht aber auch durch saure Hydrolyse der Ellagitannine (wie z.B. Punicalagin und Pedunculagin), welche in hohen Konzentrationen neben den schon genannten Beeren auch in

Granatäpfeln, Walnüssen und Barrigueweinen vorkommen (Cerde et al. 2005). Ellagsäure wiederum wird von den Bakterien des Dickdarms zu Urolithin A (3,8-Dihydroxy-6H-dibenzopyran-6-one, siehe **Abbildung 2**) und dessen monohydroxyliertem Analog Urolithin B metabolisiert. Ellagitannine, Ellagsäure und Urolithine sind potente Antioxidantien und zeigten in mehreren Studien antiinflammatorische und antikanzerogene Wirkungen (Landete 2011; Zhang et al. 2014; Espin et al. 2013). Ellagsäure zeigte diese antiinflammatorische Wirkung ebenfalls im Colitis ulcerosa Mausmodell, in der eine Colitis durch Dextran-Sulfat-Natrium (DSS) induziert worden war (Marin et al. 2013). Der Krankheitsprogress dieser Mäuse verbesserte sich bei Ellagsäureapplikation dadurch, dass Entzündungsmediatoren wie Cyclooxygenase-2 (COX-2) und induzierbare Stickstoffmonoxidsynthetase (iNOS) verringert und proinflammatorische Signalwege wie NF $\kappa$ B und STAT3 inhibiert wurden, wodurch die gesamte Entzündung im Darm schwächer ausgeprägt war als durch alleinige DSS-Gabe (Marin et al. 2013).

### 1.1.3 Gummiharz: Myrrhe

Der Myrrhebaum (Gattung: *Commiphora*) produziert ein Gummiharz Myrrhe, aus Harz- und Gummibestandteilen bestehend, welches bei Schnitten am Stamm und Ästen austritt. Es besteht ungefähr aus 60 % Gummi, 35 % Harz und 5 % ätherischem Öl. Zu den mehr als 300 enthaltenen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen gehören: Triterpensäuren, Steroide, Flavonoide, Lignane sowie im ätherischen Öl u. a. Sesquiterpene, Furanosesquiterpene und Furanoeudesma-1,3-dien (Shen and Lou 2008). In dieser Arbeit wurde das Harz der Myrrhe untersucht. Das Harz wird durch ethanolischen Auszug des Myrrhepulvers sowie durch eine sich anschließende Wasserdistillation gewonnen. Somit werden sowohl die Proteine, Schleimstoffe, ätherischen Öle als auch wasserlösliche Gummibestandteile entfernt. Im Harz verbleiben u. a.  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - Commiphorsäuren, Myrrholsäureester, Commiphorsäure, Harzphenole, Terpene und Steroide (El Ashry et al. 2003). Myrrhe wird schon seit Jahrtausenden in der Medizin hauptsächlich als Wundheilmittel eingesetzt. Die ätherischen Öle oder Myrrheextrakte sind bekannt für ihre antibakteriellen, fungizid, analgetischen (schmerzlindernd) und antiinflammatorischen Eigenschaften (Shen and Lou 2008, Shalaby, 2014 #229; Su et al. 2012). In der traditionellen Medizin wie der Traditionellen Indischen Medizin, dem Ayurveda, und der Traditionellen Chinesischen Medizin wird es allein oder in Kombination mit anderen Substanzen schon seit Jahrtausenden eingesetzt (Shen et al. 2012). Das europäische Herbal Medicinal Product Committee (EMA/HMPC/96911/2010 2010) hat Myrrhe als traditionelles pflanzliches Arzneimittel eingestuft. Demgemäß kann Myrrhe zur Behandlung kleiner Geschwüre und Entzündungen der Mundschleimhaut als auch für kleinere Wunden und Geschwüren der Haut verwendet werden, häufig in Form einer Tinktur. In



Deutschland ist Myrrhe zusätzlich für die traditionelle Anwendung zur „Unterstützung der Magen-Darm-Funktion“ in Kombination mit Kamille und Kaffeekohle in Kapseln, Myrrhinil-Intest<sup>®</sup>, erhältlich (Repha GmbH). Jedoch fehlt für die Arzneimittelzulassung nach heutigen Kriterien der wissenschaftliche Beleg, z.B. einer effektiven Wirkung bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Daher veranlasste der Hersteller eine randomisierte klinische Studie an Colitis ulcerosa Patienten, in der das Präparat Myrrhinil-Intest<sup>®</sup> gegen den Therapiestandard Mesalazin getestet wurde (Langhorst et al. 2013). Über zwölf Monate sollten Patienten entweder 500 mg Mesalazin oder dreimal vier Kapseln des pflanzlichen Kombipräparats (eine Kapsel enthält 100 mg Myrrhepulver, 50 mg Kaffeekohlepulver und 70 mg Kamillentrockenextrakt) einnehmen. Gemessen wurden der Colitis-Aktivitätsindex als Maß für die Entzündungsaktivität der Schleimhaut, der Anteil der Patienten mit Rezidiven sowie die Dauer bis zum ersten Rezidiv und die Lebensqualität mittels Fragebögen (Inflammatory Bowel Disease Questionnaire). Beide Therapien wiesen keinen signifikanten Unterschied in diesen Faktoren auf (Langhorst et al. 2013). In einer weiteren klinischen Studie zeigten mit dem Kombipräparat Myrrhinil-Intest<sup>®</sup> behandelte CED Patienten mit akuter Diarrhoe eine gute Toleranz und vergleichbar gute Effektivität gegenüber anderen Therapien (Albrecht et al. 2014). Somit stellt Myrrhinil-Intest<sup>®</sup> eine sehr gute pflanzliche Alternative zur Standardtherapie dar, jedoch fehlten bisher weitere Studien, die die Wirksamkeit mechanistisch belegen.

## 1.2 Die intestinale epitheliale Barriere

Dieses Kapitel gibt einen Überblick zum Aufbau und zur Funktion der intestinalen Barriere, die Rolle der Tight Junction(TJ)-Proteine, insbesondere die der Proteinfamilie der Claudine, im Kontext mit CED und Pflanzenstoffen bzw. -metaboliten.

### 1.2.1 Aufbau und Funktion der intestinalen epithelialen Barriere

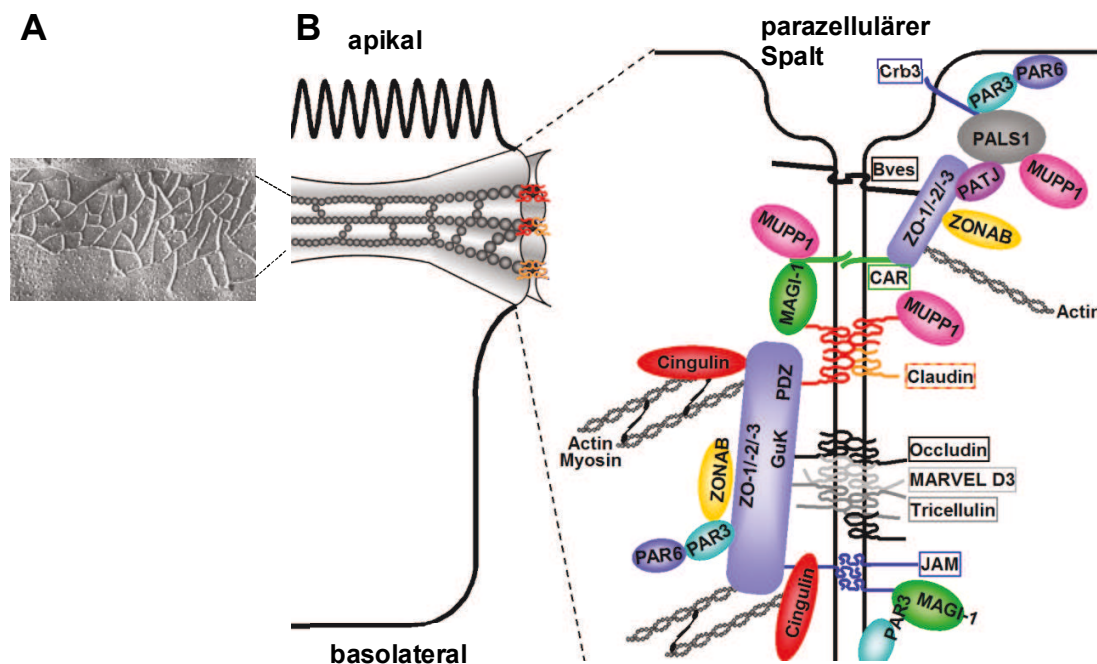
Epithelien schützen den Organismus vor z.B. externen Einflüssen entlang der gesamten Körperoberfläche wie die der Haut, der Lunge oder des Gastrointestinaltraktes (GIT). Das intestinale Epithel bildet eine Grenzfläche zwischen der funktionellen Oberfläche, also dem Lumen des Darms, und dem Stroma (Interstitium). Hauptfunktionen dieses Epithels sind die Bildung einer Barriere zwischen innerem und äußerem Kompartiment und der transepitheliale Transport. Zur epithelialen Transportfunktion gehören sowohl die Resorption als auch die Sekretion von Soluten und Wasser, was eine selektive Permeabilität des Epithels voraussetzt. Vor allem aber dient die epitheliale Barriere dem Organismus zum Schutz vor Toxinen, pathogenen Bakterien und Antigenen. Eine gestörte oder beeinträchtigte Barrierefunktion kann diesen Substanzen ein Durchdringen des Epithels ermöglichen und zur Immunaktivierung sowie zu Entzündungen führen. Die Patienten mit CED wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa weisen beispielsweise eine Barriestörung auf.

Die Darmschleimhaut (Tunica mucosa) ist in Krypten (Einstülpungen) und Villi (Ausstülpungen) gefaltet. Sie setzt sich aus einem einschichtigen Zylinderepithel, der Bindegewebsschicht (Lamina propria mucosae) und der Schleimhautmuskelschicht (Lamina muscularis mucosae) zusammen und trennt das Darmlumen von Bindegewebe (Tela submucosa) und Muskelschicht (Tunica muscularis) (Koop 2013). Die intestinalen Epithelzellen, hauptsächlich Enterozyten, aber auch Paneth-, Goblet- und Stammzellen, bilden eine polare Epithelzellschicht mit einer apikalen (zum Darmlumen gewandt) und einer basolateralen Seite (zur Blutseite gewandt). Zur weiteren Oberflächenvergrößerung sind die Epithelzellen apikal mit einem sogenannten Bürstensaum (Mikrovilli) versehen, wodurch die Darmschleimhaut eine Oberfläche von ungefähr 32 m<sup>2</sup> erreicht (Helander and Fandriks 2014). Über diese vergrößerte Oberfläche findet sowohl transzellulärer Transport von Ionen und Molekülen, bei dem die Passage durch die Zelle hindurch erfolgt, als auch parazellulärer Transport, bei dem die Passage zwischen den Zellen hindurch erfolgt, statt. Transzellulärer Transport erfolgt dabei über Kanäle, Carrier und Pumpen, aber auch über rezeptorgesteuerte Transzytose. Während der parazelluläre Transport passiv einem elektrischen und/oder chemischen Gradienten folgt, kann der transzelluläre Transport auch aktiv bzw. unter Verbrauch metabolischer Energie entgegen einem elektrischen und/oder chemischen Gradienten erfolgen (Anderson 2001). Benachbarte Epithelzellen sind lateral über Zell-Zell-Kontakte wie den

Tight Junctions (TJs), den darunterliegenden Adherens Junctions (AJs) und Desmosomen verbunden. Die parazelluläre Barriere und der parazelluläre Transport werden durch die TJs bestimmt, während AJs und Desmosomen strukturelle und signalvermittelnde Rollen aufweisen (Shen et al. 2009). Der Abdichtungsgrad bzw. die Leckheit eines Epithels variiert zwischen den Epithelien und hängt von dem Verhältnis von parazellulärer Permeabilität zu transzellulärer Permeabilität für Ionen ab. So ist die parazelluläre Ionen-Barriere in proximalen Segmenten von Organen wie im Dünndarm oder im proximalen Nierentubulus durchlässiger als die transzelluläre, während dieses Verhältnis in distalen Segmenten wie im Dickdarm oder im Nierensammelrohr umgekehrt ist. So werden Erstere auch als „lecke Epithelien“ und Letztere als „dichte Epithelien“ bezeichnet (Fromm 2010). Zusätzlich kann der Abdichtungsgrad, bedingt durch die Proteinzusammensetzung und Struktur der TJs, im gleichen Gewebe variieren bzw. reguliert werden, wie z.B. unter pathologischen Einflüssen.

### 1.2.2 Struktur und Funktion der Tight Junction (TJ)

Die zwischen benachbarten Epithelzellen liegenden TJ-Proteinkomplexe begrenzen die apikale und laterale Zellmembran. Gefrierbruch-elektronenmikroskopische Aufnahmen dieser Komplexe zeigen, dass die TJs wie ein Gürtel um die Zelle herum parallel angeordnete Stränge bilden, die mit quer verlaufenden Abschnitten ein Netzwerk ausbilden (Staehein et al. 1969) (**Abbildung 3**). In einem dichten Epithel ist das Netzwerk häufig komplexer und enthält mehr TJ-Stränge als in einem lecken Epithel. So weist der Magen der Maus, ein dichtes Epithel, mehr als sechs horizontale TJ-Stränge und der proximale Nierentubulus, ein leckes Epithel, nur ein bzw. zwei Stränge auf (Claude and Goodenough 1973). Daraufhin wurde geschlossen, dass die Anzahl der TJ-Stränge logarithmisch mit dem transepithelialen Widerstand (**TER**) zusammenhängt (Claude 1978). Der TER ist ein Maß für die Dichtigkeit eines Epithels für Ionen. Inzwischen wird davon ausgegangen, dass die Zusammensetzung der TJ-Proteine, die die Stränge bilden, entscheidender für die Dichtigkeit des Epithels bzw. den TER ist als die Strangzahl (Anderson and Van Itallie 2009). Zu den bedeutendsten Membranproteinfamilien der TJs gehören: die Tetraspanmembranproteine wie die TAMPs (tight junction-associated MARVEL proteins) (Steed et al. 2009) und die Claudine (Mineta et al. 2011) sowie die Monospanmembranproteine wie die JAMs (junction adhesion molecule) (Martin-Padura et al. 1998) (siehe **Abbildung 3**). Mit dem Zytoskelett sind diese über intrazelluläre Gerüstproteine verbunden wie ZO-1, -2, -3, MUPP-1, und MAGI-1, -2, -3.



### Abbildung 3: Aufbau der TJ.

(A) Elektronenmikrographie einer TJ aus dem Dünndarm einer Ratte (Staehein 1973).

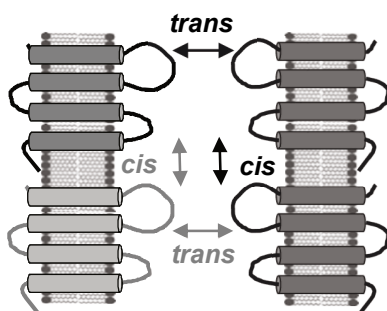
(B) Schematische Skizzierung der TJ-Proteine und TJ-assoziierten Proteine in der Zelle (modifiziert nach Günzel and Fromm 2012). Die TJ-Proteine durchziehen die apikolaterale Membran der gesamten Zelle wie einen Gürtel, der aus mehreren Strängen besteht, die sich wiederum aus einem Komplex verschiedener Membranproteine zusammensetzen. Die Tetraspanmembranproteine wie Claudine und TAMPs; sowie die Monospanmembranproteine wie JAM und CAR interagieren mit intrazellulären Gerüstproteinen wie ZO-1, -2, -3 sowie regulatorischen Proteinen wie MAGI-1, und mit den netzwerkbildenden TJ-Proteinen der Nachbarzelle. Diese Interaktion bestimmt die parazelluläre Diffusion von der apikalen zur basolateralen Epithelseite und umgekehrt. Tight Junction-assoziierte MARVEL Proteine, TAMP; Tight Junction, TJ.

Zu den TAMPs gehören Occludin (Furuse et al. 1993), Tricellulin (Ikenouchi et al. 2005) und MarvelD3 (Steed et al. 2009). Diese drei Proteine weisen sowohl überlappende als auch voneinander unabhängige Eigenschaften auf (Raleigh et al. 2010). Die Beteiligung an der epithelialen Barrierefunktion ist für alle TAMPs unzureichend geklärt und wird kontrovers diskutiert (Van Itallie and Anderson 2014). JAMs sind an zellulären Prozessen wie Zellpolarität, Adhäsion und Signalvermittlung beteiligt (Garrido-Urbani et al. 2014). Bisher wurde keine direkte Beteiligung an der epithelialen Barrierefunktion nachgewiesen, jedoch nimmt z.B. JAM-A indirekten Einfluss über die Regulation der Claudinexpression (Laukoetter et al. 2007). Die Claudine bestimmen dagegen direkt die Dichtigkeit des parazellulären Spalts (siehe Kapitel 1.2.3) (Anderson and Van

Itallie 2009). Prinzipiell übt der TJ-Komplex nicht nur eine Barrierefunktion aus, sondern führt auch zu einer selektiven Permeabilität des Epithels, auch *gate*-Funktion genannt, bedingt durch die gewebsspezifische Zusammensetzung der Claudine (Hewitt et al. 2006). Dabei wird der parazelluläre Durchfluss von Soluten und Wasser gewebssabhängig unterschiedlich reguliert. Zusätzlich wird durch die TJs und der damit einhergehenden Trennung der apikalen von der basolateralen Membranseite die Zellpolarität gewährleistet, auch als *fence*-Funktion bezeichnet (Shin et al. 2006).

### 1.2.3 Tight Junction-Proteinfamilie: Claudine

Claudine weisen vier Transmembrandomänen, zwei extrazelluläre Schleifen sowie eine intrazelluläre Schleife und die intrazellulären N- und C-Termini auf (Singh et al. 2010). Die extrazellulären Schleifen der Claudine interagieren dabei mit den extrazellulären Schleifen der Claudine der Nachbarzelle, *trans*-Interaktionen genannt (Piontek et al. 2008). Daneben gibt es *cis*-Interaktionen zwischen den Claudinen in der gleichen Zellmembran, die die Strangbildung ermöglichen (siehe **Abbildung 4**) (Blasig et al. 2006).



**Abbildung 4: Interaktionsformen zwischen Claudinen.**

*Interaktionen mit der Nachbarzelle werden als trans-Interaktionen und Interaktionen zwischen benachbarten Claudinen derselben Zelle als cis-Interaktionen bezeichnet. Homophile Interaktionen, in schwarz dargestellt, finden zwischen gleichen Claudinen statt, als heterophil, in grau dargestellt, bezeichnet man Interaktionen mit einem anderen Mitglied der Claudin-Familie.*

Im Menschen sind 26 verschiedene Mitglieder der Claudin-Familie nachgewiesen, von denen es abdichtende und Kanal-bildende gibt (Mineta et al. 2011). Claudin-1 (Furuse et al. 2002), Claudin-3 (Milatz et al. 2010) und Claudin-5 (Amasheh et al. 2005) gehören u. a. zu den abdichtenden TJ-Proteinen, während andere Claudine parazelluläre ionenselektive Kanäle ausbilden. Claudin-2 ist ein kationenselektiver Kanal (Amasheh et al. 2002) sowie ein Wasserkanal (Rosenthal et al. 2010). Auch Claudin-10b (Van Itallie et al. 2006; Günzel et al. 2009) und Claudin-15 (Van Itallie et al. 2006; Tamura et al. 2011) bilden parazelluläre Kationenkanäle aus, wohingegen Claudin-17 (Krug et al. 2012) und die Splicevariante Claudin-10a (Van Itallie et al. 2006; Günzel et al. 2009) Anionenkanäle formen. Ebenso gibt es Claudine, die nicht eindeutig nach der Funktion zu klassifizieren sind. Beispiele hierfür sind Claudin-4 und Claudin-7. Claudin-4 und Claudin-7 blockieren in MDCK II-Zellen (=Madin-Darby canine kidney II, Nierenzelllinie aus dem Hund) die

Na<sup>+</sup>-Permeabilität, während beide in LLC-PK1-Zellen (Nierenzelllinie aus dem Schwein) als Cl-Kanäle fungieren (Hou et al. 2006). Die Funktion von Claudin-4 und -7 hängt demnach vom zellulären Hintergrund bzw. der Expression anderer TJ-Proteine ab und demzufolge liegen möglicherweise unterschiedliche Bindungspartner in den beiden Zelllinien vor (Hou et al. 2006). Von den 26 im Menschen vorkommenden Claudinen sind nur etwa ein Drittel auch im Darm exprimiert. In **Tabelle 1** sind die im Darm typischerweise vorkommenden Claudine aufgelistet und nach Dünndarm und Dickdarm unterschieden. So nimmt die Expression der Kanalbildner Claudin-2 und -15 vom Dünndarm zum dichteren Epithel des Dickdarms hin ab, während abdichtende Claudine wie Claudin-3 und -8 in ihrer Expression entlang des Darmrohrs zunehmen (Lameris et al. 2013).

**Tabelle 1: Expression der im humanen Darm vorherrschenden Claudine.**  
(Luettig et al. 2015)

Claudin-	Dünndarm	Dickdarm	Literatur
<b>1</b>	++	++	(Bürgel et al. 2002; Oshima et al. 2008; Wang et al. 2010; Zeissig et al. 2007)
<b>2</b>	++	+	(Lameris et al. 2013; Oshima et al. 2008; Bürgel et al. 2002; Zeissig et al. 2007)
<b>3</b>	+	++	(Lameris et al. 2013; Oshima et al. 2008; Bürgel et al. 2002; Zeissig et al. 2007)
<b>4</b>	+	++	(Bürgel et al. 2002; Lameris et al. 2013; Oshima et al. 2008; Wang et al. 2010; Zeissig et al. 2007)
<b>5</b>		++	(Zeissig et al. 2007; Bürgel et al. 2002)
<b>7</b>	+	++	(Lameris et al. 2013; Zeissig et al. 2007; Oshima et al. 2008)
<b>8</b>	+	++	(Lameris et al. 2013; Zeissig et al. 2007)
<b>12</b>	++	++	(Lameris et al. 2013)
<b>15</b>	++	+	(Lameris et al. 2013)

+ schwach exprimiert; ++ stark exprimiert

#### **1.2.4 Barrieredysfunktion in chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen**

Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind die beiden häufigsten chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Im Jahr 2010 gab es in Europa zirka 500 Personen von 100.000 Einwohnern mit Colitis ulcerosa und 320 von 100.000 Einwohnern mit Morbus Crohn (Molodecky et al. 2012). Bei CED wird eine Störung der intestinalen Barriere beobachtet und trägt über den Leckflux zur Diarrhoe sowie durch erhöhte Antigenaufnahme zur gesteigerten Inflammation bei (Zeissig et al. 2007; Hering et al. 2012). Der Begriff Leckflux-Diarrhoe bedeutet eine vermehrte Abgabe von Soluten und Wasser aus dem Blut ins Lumen, welche nicht mehr resorbiert werden können, während die Antigene und andere Toxine bei einer Barrieredysfunktion über den umgekehrten Weg vom Lumen ins Blut gelangen. Eine erhöhte Produktion pro-entzündlicher Zytokine bzw. ein Ungleichgewicht zwischen den pro- und anti-entzündlichen Zytokinen ist an der Störung der Barriere beteiligt (Neurath 2014). Ein Schlüsselzytokin bei CED, sowohl bei Morbus Crohn als auch bei Colitis ulcerosa, ist Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Reimund et al. 1996; Reinecker et al. 1993). Bei Morbus Crohn-Patienten kommt es zu ultrastrukturellen und molekularen Veränderungen. Ultrastrukturell zeigt sich, dass TNF- $\alpha$  das TJ-Netzwerk so verändert, dass es zu einer intestinalen Barrieredysfunktion führt (Neurath 2014; Zeissig et al. 2007). Kolonbiopsien von Morbus Crohn Patienten zeigten einen verringerten TER, welcher die Barrieredysfunktion widerspiegelt (Zeissig et al. 2007). Ebenso verringerte sich die Komplexität des TJ-Netzwerkes, was sich in einer Reduktion der TJ-Stranganzahl sowie TJ-Tiefe und in einer erhöhten Anzahl von TJ-Strangbrüchen äußerte. Als deutlichste molekulare Veränderung zeigte sich, dass das Kanal-bildende TJ-Protein Claudin-2 in Biopsien von Erkrankten deutlich hochreguliert war, während andere abdichtende TJ-Proteine wie Claudin-3, -5 und -8 herunterreguliert oder umverteilt waren (Zeissig et al. 2007). Auch bei der Colitis ulcerosa war die Claudin-2-Expression im Kolon gesteigert, während die Expression von Claudin-3 unverändert und Claudin-1, -4 und -7 herunterreguliert waren (Heller et al. 2005; Oshima et al. 2008). Neben diesen Veränderungen der TJ-Proteine, die vor allem zur Leckflux-Diarrhoe beitragen, ermöglichen weitere pathologische Veränderungen des Epithels wie z.B. erhöhte Apoptoserate und Läsionen den epithelialen Durchtritt für schädliche Antigene (Heller et al. 2005; Zeissig et al. 2007).

#### **1.2.5 Zellmodelle HT-29/B6 und Caco-2 für die intestinale Barriere**

Die humane Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29/B6 (Kreusel et al. 1991), Klon der HT-29-Zelllinie aus dem Jahre 1991, bildet ein geeignetes Kolon-Modellepithel zur Untersuchung der Barrierefunktion unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen. HT-29/B6-Zellen bilden



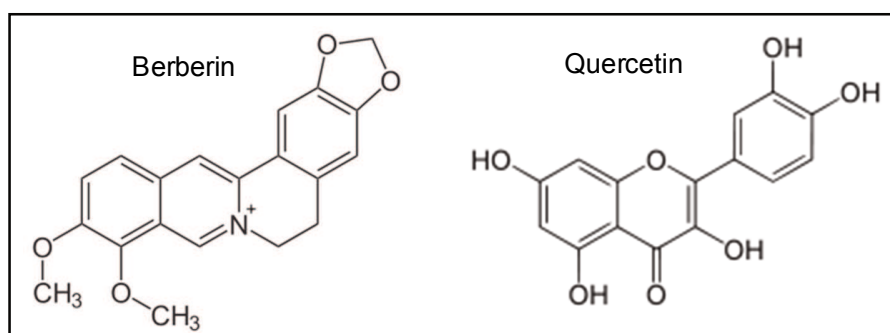
konfluente Monolayer mit einer apikalen und einer basolateralen Membran und haben funktionelle Eigenschaften von Kryptenzellen des Dickdarmepithels, u. a. apikaler Bürstensaum, cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat)-vermittelte Chloridsekretion, Mukussektion und zwischen den Zellen liegende TJs (Gitter et al. 2000). Die polarisierten HT-29/B6-Monolayer reagieren zudem auf das Zytokin TNF- $\alpha$  mit einem TER-Abfall und Veränderungen der TJ-Proteinexpression und -verteilung (Amasheh et al. 2010; Mankertz et al. 2009; Schmitz et al. 1999b). TNF- $\alpha$  führt zu einer gesteigerten Expression von Claudin-2 über die Aktivierung von Phosphatidylinositid 3-Kinase (PI3K)/Akt (Mankertz et al. 2009) und einer subzellulären Umverteilung von Claudin-1 aus der TJ heraus (Amasheh et al. 2010).

Die humane Kolonkarzinom-Zelllinie Caco-2 bildet ebenso dichte polarisierte Monolayer mit TJ-Proteinen, jedoch mit mehr Ähnlichkeit zum Dünndarm und eignet sich ebenfalls zur Untersuchung der epithelialen Barrierefunktion (Hidalgo et al. 1989). Auf TNF- $\alpha$  reagiert sie im TER jedoch schwächer als die HT-29/B6-Zelllinie und oftmals nur in Kombination mit dem Zytokin IFN- $\gamma$  (Wang et al. 2005).



### 1.3 Protektive Wirkung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe auf die intestinale Barrierefunktion

Die intestinale Barrierefunktion bei CED ist trotz umfangreicher Forschung bisher nicht vollständig mechanistisch geklärt. So wird mittels Substanzen wie z.B. sekundären Pflanzeninhaltsstoffen nicht nur präventiv und therapeutisch bei CED einzusetzenden Substanzen gescreent, sondern auch der Mechanismus hinter der CED-begleitenden Barriestörung analysiert. Dieses Kapitel behandelt daher die am Zell- bzw. Tiermodell gut erforschten Pflanzenkomponenten Berberin sowie Quercetin (siehe **Abbildung 5**).



**Abbildung 5: Gelbe Naturfarbstoffe Alkaloid Berberin (links) und Flavonoid Quercetin (rechts).**

#### 1.3.1 Alkaloid: Berberin

Berberin (**Abbildung 5**) ist ein Alkaloid und ein gelber Chinolinfarbstoff, welcher in diversen Pflanzen vorkommt, unter ihnen die namensgebende Pflanze, die Berberitze *Berberis aristata* (Althaus 2009; Nietzki 1897). Berberin wirkt antioxidativ, antiinflammatorisch, antibiotisch und antidiabetisch (Li et al. 2014; Tillhon et al. 2012). Aufgrund seiner antisekretorischen Wirkung im Darm zählt Berberin auch zu den Antidiarrhoica (Althaus 2009). In humanen Kolonepithelzellen blockiert Berberin Kaliumionenkanäle (Taylor et al. 1999). Eine positive Wirkung von Berberin bei entzündlichen Erkrankungen des Darms zeigte sich in mehreren Studien. DSS-behandelte Mäuse erholten sich schneller bei gleichzeitiger Gabe von Berberin von der Colitis, u. a. durch die Senkung proinflammatorischer Zytokine und der Erhaltung der intestinalen Barrierefunktion (Yan et al. 2012). In Caco-2-Kolonepithelzellen schützte Berberin vor der TNF- $\alpha$ - und IFN $\gamma$ -induzierten Barrierefunktion, die durch einen TER-Abfall und eine erhöhte Permeabilität für FITC-Dextran 4000 nach 72 h gekennzeichnet war (Li et al. 2010). Dabei konnte Berberin die Zytokin-induzierte Zerstörung des TJ-Netzwerkes, gezeigt durch die Internalisierung des TJ-Proteins Occludin, hemmen. Eine ähnlich durchgeführte Studie, allerdings nach 48 h Inkubation, zeigte ebenso, dass

Berberin die Zytokin-bedingte Umverteilungen von ZO-1 und des abdichtenden TJ-Proteins Claudin-1 hemmte. Zudem konnte Berberin die Zytokin-induzierte Phosphorylierung von MLC über MLCK und HIF-1 $\alpha$  hemmen (Cao et al. 2013). An Caco-2-BBE-Zellen wurde gezeigt, dass Berberin allein nach 12-17 h die Expression des Kanal-bildenden TJ-Proteins Claudin-2 reduzierte und die der abdichtenden TJ-Proteine Claudin-3 und Claudin-5 erhöhte (Valenzano et al. 2015). In einem anderen Zellmodell, der humanen Kolonzelllinie HT-29/B6 sowie im Rattenkolonepithel inhibierte Berberin den TNF- $\alpha$ -induzierten TER-Abfall. In den HT-29/B6-Zellen wurde der Barriere-protective Effekt von Berberin über die Hemmung der Signalwege NF $\kappa$ B und der Tyrosinkinase Src vermittelt, wodurch die TNF- $\alpha$ -induzierte Umverteilung von Claudin-1 sowie der Expressionsanstieg von Claudin-2 inhibiert wurde (Amasheh et al. 2010).

### 1.3.2 Flavonoid: Quercetin

Das Flavonol Quercetin, 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavon (siehe **Abbildung 5**), gehört zu den polyphenolischen Flavonoiden und stellt wie Berberin einen Farbstoff dar (Ross and Kasum 2002). Als ein weit verbreiteter Pflanzenmetabolit kommt Quercetin in besonders hohen Konzentrationen in Kapern, Zwiebeln, rohem Spargel und Blaubeeren vor (Bhagwat 2014). Das Flavonol zeigt protective Wirkungen bei Infektionen, Tumoren, Allergien, Entzündungen und Diabetes (D'Andrea 2015; Li et al. 2016). In Caco-2-Zellen stärkte Quercetin nach 48 h die Barrierefunktion, indem es die Promotoraktivität und die mRNA des TJ-Proteins Claudin-4 mit abdichtender Funktion hochreguliert, was sich in vermehrtem Einbau in die TJ in den Färbungen bestätigte (Amasheh et al. 2008; Suzuki and Hara 2009). An den Caco-2 BBE-Zellen zeigte sich, dass unter Quercetin allein nach 48 h nur ein leichter Anstieg des TER stattfand und dass sowohl die Expression von Claudin-2 als auch die von Claudin-4 und Claudin-5 stark erhöht waren (Valenzano et al. 2015). Quercetin konnte außerdem den TNF- $\alpha$ -induzierten TER-Abfall in der Kolonzelllinie HT-29/B6 teilweise inhibieren sowie auch den durch TNF- $\alpha$  und IFN $\gamma$  verursachten TER-Abfall im Rattenkolonepithel (Amasheh et al. 2012).

## 2 ZIELSETZUNG

Bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) liegt vor allem in den aktiven Phasen, auch Schübe genannt, eine intestinale Barrieredysfunktion vor. Diese führt zur Leckflux-Diarrhoe, einem erhöhten passiven Flux von Soluten und Wasser ins Darmlumen. Entscheidend dafür ist die parazelluläre Barriere, an der vor allem die TJ-Proteinfamilie der Claudine beteiligt ist. Der Einsatz von Phytotherapeutika bei CED bietet die Chance den Einsatz von konventionellen oder synthetisch erzeugten Medikamenten mit vielen Nebenwirkungen zu minimieren, z. B. TNF- $\alpha$ -Antikörper oder die Glukokortikoide. Letztere können in hohen Dosen beispielsweise zu Glukoseintoleranz und erhöhter Infektanfälligkeit sowie bei Langzeitanwendung auch zu Osteoporose führen (Mowat et al. 2011). Dabei ist gerade die Langzeitanwendung bei CED ein Problem und die Phytotherapie, ergänzend zur Standardtherapie, ist in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung gerückt. Phytotherapeutika könnten gastrointestinale Beschwerden bei CED abschwächen, indem sie beispielsweise schubfreie Perioden verlängern oder die Intensität dieser Schübe senken.

Ziel dieser Arbeit ist, die Wirkmechanismen der drei Pflanzenkomponenten 6-SG, Ellagsäure und des Pflanzenharzes Myrrhe auf die intestinale Barrierefunktion, vor allem der parazellulären Barriere, unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen *in vitro* zu ermitteln.

Dazu werden die gut etablierten Kolonzellmodelle HT-29/B6 und Caco-2 verwendet. Zur Bestimmung der Barrierefunktion dient die Messung des TER. Zur Aufklärung der funktionell gemessenen Veränderungen dienen weitere Methoden wie Permeabilitätsmessungen in der Ussing-Kammer, Western Blot-Analysen zur Proteinexpression und Aktivierung von Signalwegen, Immunfluoreszenzfärbungen in Verbindung mit konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie zur Proteinlokalisierung und Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie zur Visualisierung der TJ-Ultrastruktur.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

Das in dieser Arbeit verwendete Material ist im Anhang hinterlegt. Dazu gehören die in der Zellkultur verwendeten Verbrauchslösungen (**Tabelle 8**, S. 98) und Testsubstanzen (**Tabelle 9**, S. 98), sowie Chemikalien und Gebrauchskits (**Tabelle 10**, S. 99), Primär- und Sekundärantikörper (**Tabelle 11**, S. 101), Verbrauchsmaterialien (**Tabelle 13**, S. 105) und Geräte (**Tabelle 14**, S. 106). Ebenso sind die Rezepturen angesetzter Lösungen (**Tabelle 12**, S. 102) sowie eine Liste der verwendeten Programme (**Tabelle 15**, S. 107) im Anhang aufgeführt.

#### 3.1 Zellkultur von HT-29/B6- und Caco-2-Zellen

In dieser Arbeit werden die humane Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29/B6, Klon B6 aus der Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29 (Kreusel et al. 1991), und die Caco-2 HTB-3™ (ATCC®) verwendet. Die Zelllinien HT-29/B6 und Caco-2 werden in Zellkulturflaschen bei 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % relativer Luftfeuchte und bei 37 °C bis zur Konfluenz in Brutschränken kultiviert. Die Caco-2-Zellen erhalten das Minimum Essential Medium Eagle Aqmedia™ mit 15 % FBS und 1 % Penicillin-Streptomycin. Die HT-29/B6-Zellen werden in RPMI-1640 Medium mit 10 % FBS und 1 % Penicillin-Streptomycin kultiviert. Der Mediaaustausch erfolgt dreimal wöchentlich. Um die Caco-2- und die HT-29/B6-Zellen über einen längeren Zeitraum in Kultur halten zu können, normalerweise bis zu 10 Wochen, werden sie alle zwei Wochen passagiert.

Das Passagieren erfolgt, indem die konfluenten Zellmonolayer in der Zellkulturflasche (25 cm<sup>2</sup>) erst mit PBS gespült und dann 5 min in 3 ml Trypsin-EDTA (5 ml in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen) zur Verwerfung beschädigter Zellen enzymatisch vorverdaut werden. In erneut zugegebene 1 ml Trypsin-EDTA (3 ml in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen) verbleiben die Zellen bis zur vollständigen Ablösung vom Flaschenboden. Die enzymatische Verdauung des Trypsin-EDTA-Zellen-Gemisches wird in der zehnfachen Menge an Medium gestoppt. Im Anschluss werden die Zellen durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren resuspendiert und vereinzelt. Die Zellsuspension wird in neue Flaschen für die Aufrechterhaltung der Zellkultur oder in PCF-Filter (Zellkultureinsatz aus Polykarbonat) für die Versuche verwendet. Für die Zellversuche werden die 8. bis 15. Passagen der HT-29/B6-Zellen und die 4. bis 14. Passagen der Caco-2-Zellen verwendet.

Für die Kultivierung in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen werden 1,5 ml der Suspension mit 5,5 ml Medium vermischt. Die Zellzahl für die Versuche wird mit der Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Ungefähr 400.000 HT-29/B6-Zellen werden auf PCF-Filter mit 3,0 µm Porengröße und 300.000 Caco-2-Zellen auf PCF-Filter mit 0,4 µm Porengröße ausgesät. Es werden drei bis vier Filter je Zellkulturschale ausgesät (siehe **Abbildung 6A**). Die Caco-2-Monolayer werden nach zwei Wochen Differenzierung und die HT-29/B6-Monolayer nach sieben

bis neun Tagen verwendet. Zeigen TER-Messungen (siehe **3.3.1**) die für die Experimente notwendige Dichtigkeit der Zellmonolayer kann mit den Zellversuchen gestartet werden. Dafür wird das Medium mit den Substanzen zugegeben (siehe **Tabelle 2**). Den Kontrollen wird Medium mit der entsprechenden Lösungsmittelkonzentration (DMSO oder Ethanol) zugefügt.

Für die Induktion der Entzündung an den Zellmonolayern wird das Zytokin TNF- $\alpha$  in einer Aktivität von 250 U/ml oder 500 U/ml dem basalen Zellkulturmedium 2 h nach Vorinkubation mit den in der **Tabelle 2** gelisteten Substanzen zugegeben und vorsichtig mit einer 1000-Mikroliterpipette durch zweimaliges Auf- und Abpipettieren gemischt.

Zur Untersuchung der Signalwege werden die Filter/Schalen für 4 h serumfrei gesetzt, d. h. im Medium ohne FBS, bevor die Testsubstanzen zugegeben werden. Bei den Caco-2-Zellen werden die Monolayer für 30 min mit den Testsubstanzen inkubiert und die HT-29/B6-Monolayer dagegen für 60 min und nach TNF- $\alpha$  Zugabe weitere 20 min.

**Tabelle 2: Übersicht der auf den Zellen eingesetzten Substanzen, Lösungsmittel und Konzentrationen.**

Substanz	Lösungsmittel	Konzentration	Verdünnung	Endkonzentration
	Stock bei -20 °C		im Medium	
6-Shogaol	DMSO	100 mM	1:1000 <sup>1</sup>	100 $\mu$ M <sup>1</sup>
Ellagsäure	DMSO	100 mM	1:750 <sup>1</sup>	150 $\mu$ M <sup>1</sup>
Myrrhe	Ethanol	500 g/l	1:1000 <sup>1</sup> HT-29/B6	500 $\mu$ g/ml <sup>1</sup>
			1:500 <sup>1</sup> Caco-2	1000 $\mu$ g/ml <sup>1</sup>
BAY 11-7082	DMSO	50 mM	1:5000	10 $\mu$ M
LY29002	Ethanol	50 mM	1:5000	10 $\mu$ M
GW9662	DMSO	50 mM	1:1000	50 $\mu$ M
Rosiglitazon	DMSO	50 mM	1:5000	10 $\mu$ M

<sup>1</sup> In den Konzentrationsreihen variieren die Verdünnungen und Endkonzentrationen dieser Substanzen im Medium. Es sind die eingesetzten Konzentrationen aufgelistet, die am wirksamsten waren.

### 3.2 Zytotoxizitätstest

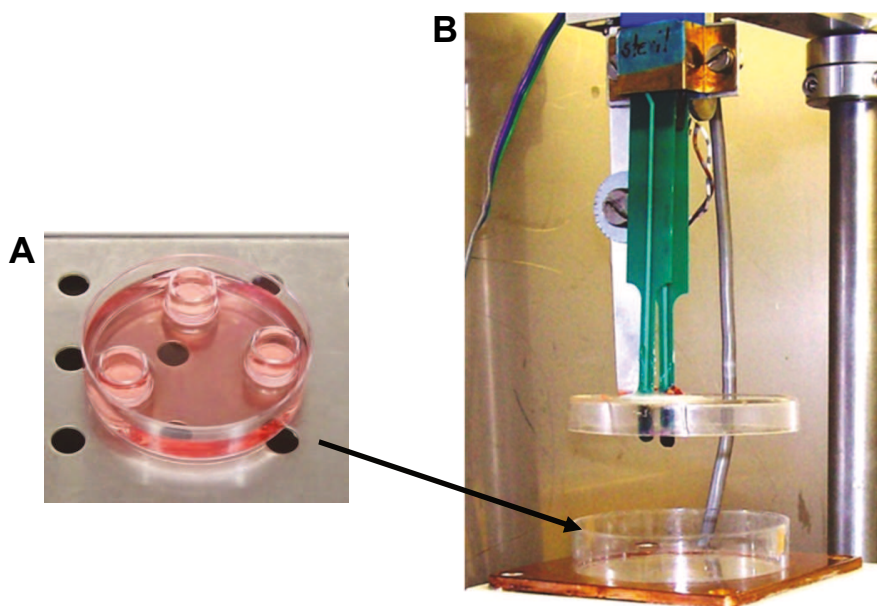
Zur Messung der Zytotoxizität an den HT-29/B6-Zellen wird das Cell Counting Kit-8 Assay verwendet. Dabei wird mit Hilfe der Dehydrogenaseaktivität der lebenden Zellen die Vitalität und somit auch die Zytotoxizitätswirkung von Substanzen gemessen. Dazu werden 5.000 Zellen pro Vertiefung (well, Fläche 34 mm<sup>2</sup>) einer Zellkulturtestplatte bzw. Lochplatte mit 96 Vertiefungen ausgesät. Nach 72 h Proliferationszeit werden die Substanzen in verschiedenen Konzentrationen

in 100  $\mu$ l Medium zugegeben und nach 24 h mit 10  $\mu$ l CCK-8-Lösung versetzt. Die Absorptionsmessung erfolgt nach einer Stunde (bei 37 °C) bei 450 nm im Mikrotiterplatten-Lesegerät Infinite M200.

### 3.3 Elektrophysiologische Messungen

#### 3.3.1 Manuelle Widerstandsmessung der Zellkulturfilter

Mittels eines halb-automatisierten Widerstandsmessgeräts (**Abbildung 6B**) kann der TER unter einer Sterilwerkbank gemessen werden. Der TER gibt Auskunft über die Dichtigkeit für Ionen und somit über einen wesentlichen Parameter der Barriereigenschaften eines Epithels. Dabei tauchen zwei an einem Zellkulturschalendeckel fixierte Elektroden gleichzeitig in den Zellkulturfilter, der apikalen Seite, und in das Medium der Zellkulturschale, der basolateralen Seite des Epithels. Zur Vermeidung von Kontaminationen werden die Elektroden vor und nach jeder Messung in 80 % Ethanol eingetaucht.



**Abbildung 6: Mechanisches Widerstandmessgerät (A) zur TER-Messung von Zellmonolayern in PCF-Filtern in Zellkulturschalen (B).**

Messgerät wurde von Ingenieur Detlef Sorgenfrei, Institut für Klinische Physiologie, Charité, CBF, entwickelt.

Georg Simon Ohm formulierte das nach ihm benannte Gesetz (Ohm'sches Gesetz) der Proportionalität von Spannung  $U$  und Strom  $I$  in einem Leiterstück (Ohm 1827):  $U \sim I$ . Da der Widerstand temperaturabhängig ist, sorgt eine Wärmeplatte unter der Zellkulturschale für die Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur von 37 °C, so dass temperaturbedingte Einflüsse

auf den elektrischen Widerstand vermieden werden. Der Ohm'sche Widerstand  $R$  (Einheit Ohm -  $\Omega$ ) ergibt sich aus dem Quotienten von Spannung (Einheit Volt - V) und Strom (Einheit Ampere - A):  $R = \frac{U}{I}$ .

Bei der Widerstandsmessung mittels Ohmmeter wird ein definierter Strom appliziert und aus der resultierenden Spannungsänderung der Widerstand berechnet. Von den gemessenen Widerstandswerten wird der Widerstand des Leerfilters subtrahiert und anschließend mit der Epithelfläche im Filter von  $0,6 \text{ cm}^2$  multipliziert. Der korrigierte Wert ist der TER, angegeben in  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ . Für die Experimente wiesen die konfluenten Zellmonolayer folgende TER-Bereiche auf:

600 bis 1100  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  für HT-29/B6-Zellen

400 bis 1000  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  für Caco-2-Zellen.

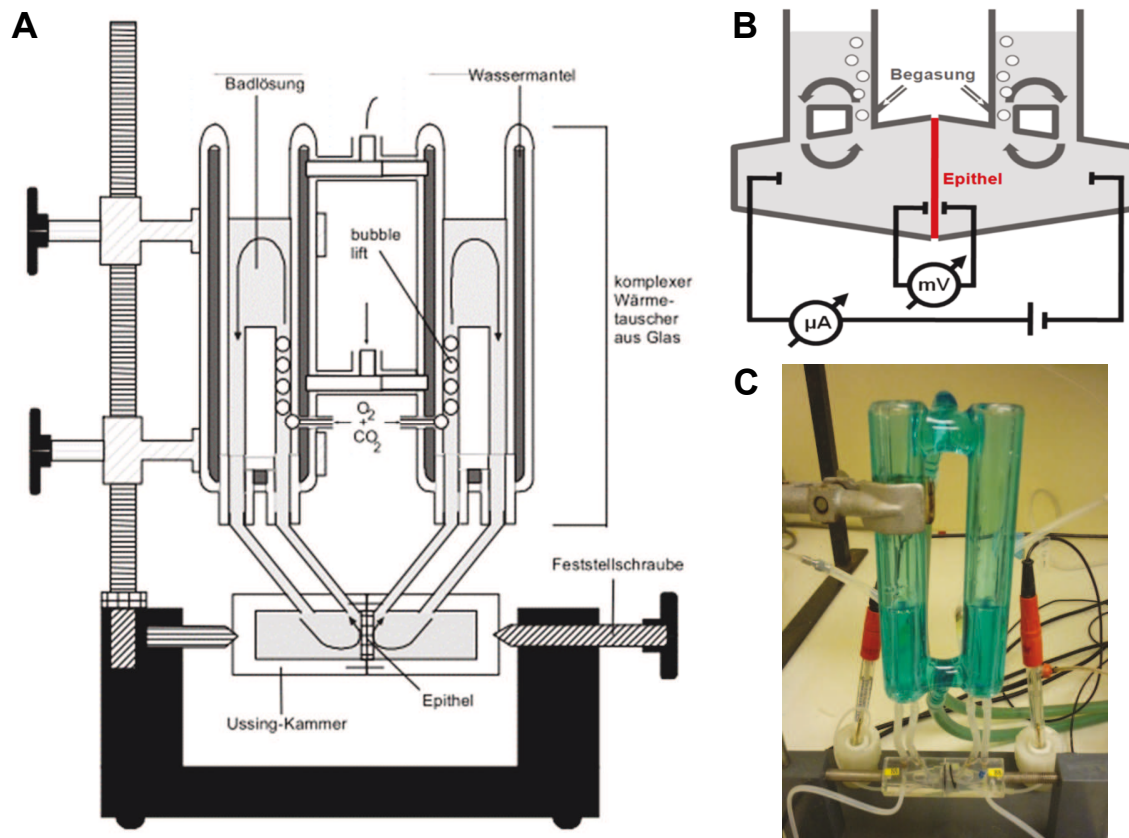
Um behandlungsbedingte Veränderungen im TER zu quantifizieren, werden die TER-Werte zum untersuchten Zeitpunkt, z. B. 24 h nach der Behandlung, prozentual auf den Zeitpunkt vor der Behandlung, dem Ausgangs-TER, bezogen. Die als Bezugswert dienenden Ausgangs-TER-Werte werden dabei auf 100 % gesetzt.

### 3.3.2 Die Ussing-Kammer

Die Ussing-Kammer ermöglicht an Epithelien eine kontinuierliche Messung elektrophysiologischer Parameter: den TER, die transepitheliale Spannung sowie den Kurzschlussstrom und somit den aktiven Ionentransport. Je nach Modifikation können *in vitro*-Zellmonolayer auf Filtern und tierische sowie menschliche *ex vivo*-Gewebeexplantate vermessen werden. Die von dem dänischen Physiologen Hans Ussing 1949 entwickelte Kammer besteht aus zwei Plexiglaskammern, die nur durch das vertikal eingesetzte Epithel getrennt sind (Ussing 1949) (**Abbildung 7**). Dadurch kann ein Stoffaustausch ausschließlich über das Epithel erfolgen. Die Kammer ist über Silikonschläuche mit doppelwandigen Flüssigkeitsbehältern aus Glas verbunden. Somit kann das Epithel mit einer Elektrolytlösung (z. B. Ringerlösung) versorgt werden. Zur Gewährleistung physiologischer Konditionen, wie eine konstante Temperatur von  $37^\circ\text{C}$ , wird warmes Wasser durch die doppelwandige Kammer gepumpt. Ebenso sorgt eine Begasung der Elektrolytlösung mit Carbogen für die Versorgung mit Sauerstoff, die Stabilisierung des pH-Wertes von 7,4 und die Zirkulation der Elektrolytlösung in den Kammern. Jede Kammerhälfte enthält zwei Agarbrücken (gefüllt mit 3 g Agar in 100 ml 1,8 % NaCl-Lösung), die in mit 3 M KCl-gefüllte Behälter eingetaucht sind. Die Epithel-nahe Agarbrücke führt zu dem Behälter mit der Spannungselektrode, und die Epithel-ferne Agarbrücke zu dem mit der Stromelektrode.



Diese Elektroden sind an eine computergesteuerte Spannungsmesseinheit (Voltmeter) sowie Stromeinspeiseeinheit (Gleichstromquelle, Amperemeter) angeschlossen.



**Abbildung 7: Anordnung Ussing-Kammer.**

(A) Schematische Darstellung einer Ussing-Kammer und Zubehör (Barmeyer 2002).

(B) Schematische Darstellung einer Ussing-Kammer mit Strom- und Spannungselektrodenzugang (modifiziert nach Milatz 2010).

(C) Fotografie der in die Halterung eingebauten Ussing-Kammer, welche über Silikonschläuche mit den Flüssigkeitsbehältern verbunden ist.

Durch aktiven Ionentransport wird ein elektrischer Gradient über dem Epithel verursacht, der zu einer transepithelialen Potentialdifferenz führt. Zur Vermeidung der Potentialdifferenz wird bei Fluxmessungen das transepitheliale Potential auf 0 mV gesetzt (=Spannungsklemme). Dazu wird die entsprechende Strommenge appliziert, die so groß ist wie der durch aktiven Transport verursachte Strom des Epithels. Durch die simultane und gleichhohe Befüllung beider Flüssigkeitsbehälter mit der gleichen Elektrolytlösung werden zudem der hydrostatische Druckgradient und der Konzentrationsgradient in den Kammern eliminiert. Aus dem regelmäßig applizierten Strom ( $I$  in  $\mu A$ ) und der Messung der resultierenden transepithelialen Spannungsänderung ( $U$  in mV) wird der Widerstand ( $R$  in  $\Omega$ ) ( $R=U/I$ ) ermittelt. Zur TER-



Berechnung der Zellfilter werden die gemessenen Werte um die Leerwerte und die Epithelfläche von 0,6 cm<sup>2</sup> korrigiert.

Zur Vorbereitung der Versuche in den Ussing-Kammern werden die Flüssigkeitsbehälter mehrmals mit bidestilliertem Wasser gespült, auf 37 °C temperiert und mit Elektrolytlösung gefüllt. Leerwerte werden vor Einbau der Filter gemessen und von der Software Analogon gespeichert. Nachdem die Filter vorsichtig in die wieder geleerten Kammern eingebaut werden, erfolgt simultan eine beidseitige Zugabe der Elektrolytlösung. Nach einer kurzen Phase der Äquilibration werden die Experimente durchgeführt.

### 3.3.3 Bestimmung der Permeabilität für Fluoreszein und FITC-Dextran 4000

Fluoreszein (332 Da) und FITC-Dextran 4000 (4000 Da bzw. 4 kDa) dienen als parazelluläre Markersubstanzen unterschiedlicher Größe, weshalb deren unidirektionaler Flux durch das Epithel von apikal nach basolateral in der Ussing-Kammer gemessen wird. Im Gegensatz zu einer einfachen Versuchsanordnung mit Filter in der Zellkulturschale vermeidet die kontinuierliche Begasung von Carbogen in der Ussing-Kammer eine erhöhte Konzentration an Grenzschichten und sorgt für eine gute Durchmischung des Markers in der Elektrolytlösung. Auch kann während der gesamten Messung in der Ussing-Kammer die Barrierefunktion in Form des TER überprüft werden.

#### Fluoreszein

Die Flüssigkeitsreservoirs beider Kammerhälften werden mit 10 ml Ringerlösung aufgefüllt. Die Spannungsklemme wird aktiviert. Dann werden 300 µl basolateral entnommen und mit frischer Ringerlösung ersetzt. Anschließend werden apikal 10 µl einer 100 mM Fluoreszeinstammllösung (Endkonzentration 100 µM) zugegeben. Danach werden basolateral in regelmäßigen Zeitintervallen 300 µl Lösung abgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt, um anschließend die durchgegangene Fluoreszeinmenge zu bestimmen. Nach jeder Abnahme werden wieder 300 µl frische Ringerlösung aufgefüllt. Es werden mindestens vier Abnahmen nach Fluoreszeinzugabe durchgeführt und für eine Doppelbestimmung in eine 96-Lochplatte überführt. Für die Konzentrationsbestimmung wird eine Eichreihe mit dem Fluoreszein in der Ringerlösung angesetzt. Zusammen mit den Abnahmen des Versuches wird diese spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 520 nm in dem Mikrotiterplatten-Lesegerät Infinite M200 gemessen.

Der Flux einer Markersubstanz  $J$  wird angegeben als Konzentration pro Zeiteinheit und Austauschfläche des Epithels und errechnet sich aus folgender Gleichung:

$$J = \frac{(c_1 - c_2) \cdot V_{ap}}{\Delta t \cdot A \cdot \left(\frac{V_{ap}}{V_{bl}}\right)}$$

J	Flux [nmol/h/cm <sup>2</sup> ]
c	gemessene Konzentrationen [nmol/ml] zum Zeitpunkt 1 und 2
Δt	Zeitintervall [h] zwischen Zeitpunkt 1 und 2
V	Volumen [ml] auf apikaler (ap)/basolateraler (bl) Seite des Epithels
A	Fläche des Epithels [0,6 cm <sup>2</sup> ]

Mithilfe des Fluxes  $J$  und der Ausgangskonzentration  $c_A$  apikal kann die Permeabilität  $P$  für die Markersubstanz berechnet werden:  $P [10^{-6} \text{ cm/s}] = \frac{J [\text{nmol/h/cm}^2]}{C_A [\text{nmol/l}] \cdot 3,6}$

#### FITC-Dextran 4000 (FD4)

Der Unterschied zur Fluoreszeinmessung liegt vor allem in der Vorbereitung des Markers. Um überschüssiges FITC und kurzkettige FITC-Dextrane zu entfernen wird FD4 spätestens drei Tage vor dem Versuch in Ringer-Lösung dialysiert. In einer Dialysekammer wird 20 mM FD4 eingefüllt. Die Kammer wird in ein großes Becherglas mit 20 mM Dextran-Ringerlösung gehängt. Die 20 mM Dextran-Ringerlösung wird täglich erneuert und durch einen Magnetrührer im Dunkeln bei 4 °C permanent vermischt.

Die Durchführung der Messung und die anschließende Berechnung der Permeabilität für FD4 entsprechen der von Fluoreszein. Die Endkonzentration beträgt apikal 200 μM. Im Intervall von 30 min werden mindestens vier Abnahmen auf der basolateralen Seite der Monolayer durchgeführt. Wie bei Fluoreszein wird aus der FD4-Stammlösung und der Ringer-Lösung eine Eichreihe produziert und zusammen mit den Proben in eine 96-Lochplatte appliziert und in einer Doppelbestimmung im Mikrotiterplatten-Lesegerät Infinite M200 gemessen.

### 3.3.4 Messung von Dilutionspotentialen

Um die Permeabilität für Natrium-Ionen (Na<sup>+</sup>) und Chlorid-Ionen (Cl<sup>-</sup>) zu bestimmen, werden Dilutionspotentiale gemessen. Dazu werden die Zellkulturfilter in Natrium-Ringer, 10 ml in jeder Kammerhälfte, equilibriert. Anschließend wird die Hälfte der Badlösung (5 ml) auf der apikalen Seite durch Mannitol-Ringer ersetzt, in der Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> isoosmotisch durch das ungeladene Molekül Mannitol ersetzt sind. Der so erzeugte Gradient führt zum Nettodurchtritt von Na<sup>+</sup> und/oder Cl<sup>-</sup> durch das Epithel, wodurch sich eine bestimmte Potentialdifferenz, das Dilutionspotential  $U_m$ , einstellt. Wird anschließend auf der basolateralen Seite die Hälfte der Badlösung durch Mannitol ersetzt und stellt sich das ursprüngliche Potential wieder ein, kann davon ausgegangen werden, dass das Dilutionspotential durch einen parazellulären Ionentransport bedingt ist. Das Dilutionspotential ergibt sich aus der Goldman-Hodkin-Katz-Gleichung (Goldman 1943) und durch Auflösen der Gleichung kann das Verhältnis der relativen Permeabilitäten für Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> berechnet werden:

$$U_m = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{P_{Na} [Na]^{ap} + P_{Cl} [Cl]^{bl}}{P_{Na} [Na]^{bl} + P_{Cl} [Cl]^{ap}} \longrightarrow \frac{P_{Na}}{P_{Cl}} = \frac{e^{\frac{U_m \cdot F}{R \cdot T}} \cdot [Cl]^{ap} - [Cl]^{bl}}{[Na]^{ap} \cdot e^{\frac{U_m \cdot F}{R \cdot T}} - [Na]^{bl}}$$

$U_m$	Dilutionspotential (basolateral minus apikal) in Volt [V]
R	universelle Gaskonstante [8,31 J/mol/K]
T	Temperatur in Kelvin [310 K]
F	Faradaykonstante [96485,3 C/mol]
$P_{Na}; P_{Cl}$	Permeabilität für Na <sup>+</sup> oder Cl <sup>-</sup> [cm/s]
$[Na]^{ap}; [Cl]^{ap}$	apikale Konzentration von Na <sup>+</sup> oder von Cl <sup>-</sup> [mol/l]
$[Na]^{bl}; [Cl]^{bl}$	basolateral Konzentration von Na <sup>+</sup> oder von Cl <sup>-</sup> [mol/l]

Die transepitheliale Potentialdifferenz ist positiv auf der verdünnten Seite, wenn die Permeabilität für Na<sup>+</sup> größer ist als die Permeabilität für Cl<sup>-</sup> und negativ, wenn es umgekehrt ist. Mittels der Gesamtleitfähigkeit  $G$  des Epithels, die dem Kehrwert des TER entspricht, sind die absoluten Permeabilitäten für Na<sup>+</sup> ( $P_{Na}$ ) und Cl<sup>-</sup> ( $P_{Cl}$ ) mit folgenden Gleichungen berechenbar:

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

### 3.4 Proteinanalytik

#### 3.4.1 Proteinextraktion mittels Lysepuffer

Die Zellkulturfilter werden zweimal mit PBS<sup>+</sup> gespült und die Zellen anschließend mit Lysepuffer vom Filter geschabt. Die **Tabelle 3** liefert eine Übersicht zur Durchführung der Proteinextraktion mit zwei unterschiedlichen Lysepuffern. Der Gesamtlysepuffer wird für die Untersuchung der TJ-Proteine und von Caspase-3 verwendet. Für Caspase-3 wird zusätzlich der Überstand in den Filtern genutzt, da sich darin vom Monolayer abgelöste apoptotische Zellen befinden können. Der PI3K-Puffer wird für die Untersuchung der Signalwege, wie für Phosphokinasen, verwendet. Um einen proteolytischen Abbau der Proteine zu vermeiden, werden neben dem Einsatz von Proteaseinhibitoren alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Die Quantifizierung der Proteine im Lysat erfolgt entweder unmittelbar danach oder nach einer Lagerung bei -20 °C oder -80 °C.

**Tabelle 3: Proteinextraktionspezifikationen der unterschiedlichen Lysepuffer.**

Lysepuffer	Menge/ Filter (Zelllinie)	Dauer auf Eis	Homogenisieren	Zentrifugation	Verdünnung für Pierce
Gesamt	150 µl (HT-29/B6)	~60 min	gelegentliches	5 min, 4 °C,	1:5
	120 µl (Caco-2)		vortexen	18.000 × g	1:2
PI3K	beide 100 µl	keine	Ultraschallstab (15 × 0,5 Cycle , 50 Amplitude)	5 min, 4 °C, 18.000 × g	Keine Bestimmung nach Pierce

#### 3.4.2 Proteinquantifizierung nach Pierce

Um im Western Blot vergleichbare Proteinmengen in den Proben zu gewährleisten, werden die Proben zuvor mittels BCA (bicinchoninic acid) Protein Assay nach Pierce nach Herstellerangaben quantifiziert. Dabei reduzieren Proteine im alkalischen Milieu zweiwertige Kupferionen (Cu<sup>2+</sup>) zu einwertigen Kupferionen (Cu<sup>+</sup>) und diese bilden mit der Bicinchoninsäure violette Komplexe, die quantitativ messbar sind. Für die PI3K-Lysate ist die Bestimmung nach Pierce aufgrund der Beeinträchtigung durch den Chelatbildner EDTA im PI3K-Lysepuffer nicht geeignet. Für die anderen Proteinlysate im Gesamtlysepuffer wird in einer 96-Lochplatte in einer Doppelbestimmung 10 µl (Verdünnung siehe **Tabelle 3**) mit 190 µl der BCA-Gebrauchslösung vereint. Ebenso werden für eine Eichreihe 10 µl der verschiedenen Konzentrationen 0,2, 0,8 und 1,2 g/ml BSA in bidestilliertem Wasser mit 190 µl BCA versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation bei

37 °C wird die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 562 nm in dem Mikrotiterplatten-Lesegerät Spectra Classic durchgeführt. Anhand der Eichgeraden werden die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt. Alle Proben werden auf gleiche Volumina verdünnt und enthalten 15 µg Protein.

PI3K-Lysate wurden direkt unverdünnt verwendet. Zur Kontrolle der auf das Gel geladenen Proteinmenge wurde am Ende der Proteinauftrennung und des -transfers  $\beta$ -Aktin (42 kDa) verwendet. Die Ladungskontrolle  $\beta$ -Aktin wurde generell bei allen Western Blot Versuchen detektiert.

### 3.4.3 Proteinauftrennung durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Auftrennung der Proteine gelingt mittels Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli 1970). Dabei trennt sich das Proteingemisch aufgrund einer angelegten elektrischen Spannung (100 V) nach der Molekülgröße auf. Die Dauer der Gelelektrophorese im „Mini-PROTEAN® tetra cell“ vertikalem Elektrophoresensystem beträgt 1,5 bis 2 h und wird durch das Bromphenolblau (im Laemmli-Puffer) der Lauffront überwacht. Das negativ geladene Tensid SDS überdeckt die Eigenladung der Proteine. Die dadurch negativ geladenen Proteine wandern während der Elektrophorese zur Anode, wobei kleine Proteine schneller als große Proteine durch das Trenngel wandern.

Zur Vorbereitung der Elektrophorese werden 1,5 mm dicke Trenngel hergestellt. Je nach Acrylamidgehalt wird die Porengröße des Trenngels bestimmt, je geringer, z. B. 8,5 %, je größer die Poren im Gel. Für die Auftrennung von kleineren Proteinen wie den Claudinen (ca. 22 kDa) wird daher ein 12,5 % acrylamidhaltiges Trenngel verwendet. APS als Polymerisationsinitiator und TEMED als Katalysator dienen der Vernetzung von Acrylamid mit Bisacrylamid. Auf das polymerisierte Trenngel wird das Sammelgel aufgeschichtet und mit einem Kamm zur Formung von Probenaschen für die spätere Applikation der Proben versehen. Das Sammelgel weist einen geringen Acrylamidgehalt und einen neutralen pH auf, wodurch Proteine an der Grenzschicht akkumulieren und ein simultaner Eintritt ins Trenngel ermöglicht wird. Die Elektrophoresekammer mit dem eingebauten Gel wird mit EPHO-Puffer gefüllt. Die Proben werden vor dem Auftrag mit Laemmli-Probenpuffer im Verhältnis 5:1 vermischt und zur Denaturierung bei 95 °C für 5 min erhitzt. Nach Entfernung des Kamms werden die Taschen des Gels mit dem Größenmarker (wie der Page-Ruler Prestained Ladder) und den vorbereiteten Proben beladen.

### 3.4.4 Proteintransfer mittels Western Blot

Um die Proteine immunologisch nachzuweisen, werden die aufgetrennten Proteine vom Gel in der Transferzelle Mini Trans-blot® (100 V, 1 h) auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Transfer erfolgt im Nassblotverfahren. Dazu wird die PVDF-Membran für mindestens 5 min in Ethanol aktiviert und danach wie auch das ausgebaute Trenngel, zwei Filterpapiere und zwei Schwämme in Transferpuffer äquilibriert. Diese Komponenten werden in einer Blot-Halterung mit folgender Reihenfolge geschichtet:

- Schwamm – Filterpapier – PVDF – Membran – Trenngel – Filterpapier – Schwamm +  
**Kathode** **Anode**

Die Übertragung von Gel auf die Membran erfolgt in der mit gekühltem Transferpuffer gefüllten Transferzelle.

### 3.4.5 Immundetektion von Proteinen

Im Anschluss an den Transfer wird die Membran kurz in TBST gespült und zur Blockierung freier unspezifischen Antikörperbindungsstellen in Blockierlösung für 2 h inkubiert. Mit einem spezifischen Primärantikörper (siehe **Tabelle 11**, S. 101), angesetzt in der Blockierlösung, wird die Membran über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Danach erfolgen drei Waschschrte in TBST für 10 min um ungebundene Antikörperreste zu entfernen. Die Verweildauer der Membranen in 1 % Blocking-Reagenz von Lumi-Light in TBST mit dem Sekundärantikörper (siehe **Tabelle 11**, S. 101), entweder gegen Maus oder Kaninchen gerichtet, beträgt 60 min. Nach wiederholtem Waschen folgt die Inkubation in Lumi-LightPLUS Reagenz (5 min, abgedunkelt) mit sich direkt anschließender Detektion der Chemilumineszenz, resultierend aus der an den Sekundärantikörper gekoppelten Peroxidase und dem Luminol im Reagenz, im FUSION Fx7. Die Membran wird dazu zwischen zwei Transparentfolien fixiert. Mittels des Größenmarkers wird die Bandenhöhe des gesuchten Proteins mit bekanntem Molekulargewicht überprüft und anschließend mit der Software AIDA densitometrisch ausgewertet.

### 3.5 Immunfluoreszenzfärbung von Epithelzellen

#### 3.5.1 Fixierung und immunhistochemische Färbung

Die Immunfluoreszenz-Färbung der fixierten Zellmonolayer direkt auf dem Filter ermöglicht die Lokalisation der TJ-Proteine innerhalb der Zelle zu analysieren. Dazu werden die behandelten Zellkulturfilter mit PBS<sup>+</sup> gewaschen und 20 min in 2 % PFA ad PBS<sup>+</sup> bei RT fixiert. Anschließend werden die Zellen mittels 0,5-prozentiger Triton-X-100 ad PBS<sup>+</sup> für 7 min permeabilisiert und 60 min in Blockierlösung inkubiert. Die Blockierlösung sorgt dafür, dass freie Bindungsstellen an den Proteinen blockiert werden und unspezifische Bindungen der Antikörper vermindert werden. Die Zellmonolayer werden über Nacht bei 4 °C in Blockierlösung mit zwei verschiedenen spezifischen Primäantikörpern, einem aus der Maus und einem aus dem Kaninchen stammend (siehe **Tabelle 11**, S. 101), inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min erfolgt für 1 h bei 37 °C im Dunkeln die Inkubation mit den fluoreszenzmarkierten Sekundäantikörpern (**Tabelle 11**), die sich gegen den Primäantikörper (Maus oder Kaninchen) richten und später bei den Wellenlängen  $\lambda = 488$  nm oder 594 nm optisch sichtbar gemacht werden. Zur Färbung der Strukturen im Zellkern wird der Nukleinsäurefarbstoff DAPI (1:1000) für mindestens 10 min im Dunkeln bei RT zugegeben. Nach mehrmaligem Waschen in PBS<sup>+</sup> und Wasser werden die Monolayer zwischen Objektträger und Glasplättchen in MountFluor eingebettet und anschließend bis zur Mikroskopie im Kühlschrank gelagert.

#### 3.5.2 Prinzip des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops

Die ausgehärteten fluoreszenzmarkierten HT-29/B6- oder Caco-2-Zellpräparate werden mit dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop LSM 510 META der Firma Carl Zeiss analysiert. Mittels Anregung mit monochromatischem Licht definierter Wellenlänge werden die Fluoreszenzfarbstoffe an den Sekundäantikörpern angeregt. Die emittierten Lichtsignale der Wellenlängen 405 nm (blau, DAPI), 488 nm (grün) oder 594 nm (rot) werden aufgenommen. Bei Koloalysierungen ergeben sich additiv blaugrüne, violette und gelbe Färbungen. Über Z-Achsen-Scans (z-stacks), stufenweises Aufzeichnen tiefendefinierter Schichten, entsteht eine dreidimensionale Darstellung des Zellpräparats mit Längen- (X-), Breiten-(Y-) und Tiefenachse (Z-Achse).

Die zelluläre Lokalisation der Claudine wird mit den TJ-Markern ZO-1 und Occludin überprüft. Die Lokalisierung von Claudin-1 innerhalb der TJ wird mittels der ZEN Software quantifiziert. Dazu wird der gewichtete Koloalysationskoeffizient  $M_g$  über eine z-stack-Tiefe von 4  $\mu$ m gemittelt.

---

Ebenso werden für die Quantifizierung mindestens drei unabhängige Färbungen durchgeführt. Abgeleitet wird der Koeffizient nach Manders et al. 1993 (Manders et al. 1993).

$$M_g = \frac{\sum_i \text{Signal1}_{i,coloc}}{\sum_i \text{Signal1}_i}$$

Das *Signal1* (z.B. von Claudin-1) setzt sich aus den Pixeln und der Intensität der summierten Pixel zusammen. Der Wert für jeden Pixel ist gleich dem Intensitätswert des Signals. Wenn sich also hellere Pixel eines Signals in der Kolokalisierung (mit z.B. ZO-1) befinden und weniger helle Pixel außerhalb der Kolokalisation, spiegelt sich das in dem Wert des Koeffizienten wider. Der  $M_g$  variiert von 0 bis 1.

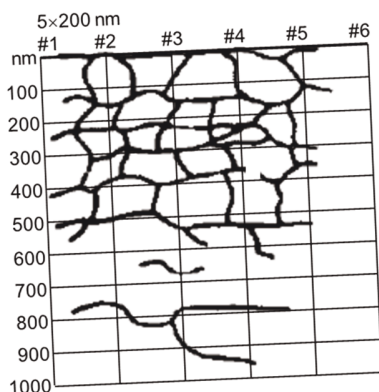


### 3.6 Gefrierbruch und Elektronenmikroskopie

Zur Analyse der TJ-Ultrastruktur werden die Zellmonolayer mittels Gefrierbruch für die Elektronenmikroskopie aufgearbeitet. Durch den Gefrierbruch entsteht ein Bruch innerhalb der Zellmembran. Auf den Bruchflächen zeigen sich an einigen Stellen die TJ auf der exoplasmatischen Seite (E-Face) als Vertiefung und auf der gegenüberliegenden Fläche, der plasmatischen Seite (P-Face), als Relief.

Experimentell werden die behandelten Zellfilter dafür zweimal in PBS<sup>+</sup> gewaschen und in Glut1-Puffer für 2 h bei RT fixiert. Bis zum Gefrierbruch werden die Filter in Glut2-Puffer bei 4 °C gelagert. Ab hier wird der weitere experimentelle Ablauf bis einschließlich der Aufnahmen am Elektronenmikroskop von Frau I.M. Lee (MTA im Institut für Klinische Physiologie, Charité CBF) durchgeführt. Dazu werden die Proben schrittweise in 10 %, 20 % und 30 % Glycerol bei RT entwässert. Anschließend werden die Zellen in flüssigen stickstoffgekühlten R442D eingefroren. Die tiefgekühlten Proben werden demnach in einer entsprechenden Gefrierbruchhalterung fixiert und im Gefrierbruchgerät bei -100 °C unter Vakuum gebrochen sowie mit Platin und anschließend dazu um 45° versetzt mit Kohlenstoff bedampft. Letzteres sorgt für die Hervorhebung der Strukturen des Abdruckes an der Zellbruchstelle. Die organischen Reste werden mit Natriumhypochlorit weggeätzt und übrig bleiben Repliken aus Platin und Kohlenstoff. Nach einem Waschschrift mit bidestilliertem Wasser werden die Repliken auf ein Kupfer-Trägernetz (Grid) appliziert und mit Essigsäurepentylester gespült. Von den Repliken werden digitale Aufnahmen an einem Elektronenmikroskop mittels einer Videokamera (iTEM, Olympus Soft Imaging Solution, Veleta) erzeugt.

Zur Analyse der Morphometrie wird ein Gitternetz mit Abständen von 200 nm (vertikal) × 100 nm (horizontal) senkrecht zu den am weitesten apikal gelegenen TJ-Strängen angelegt (siehe **Abbildung 8**). Damit lassen sich die horizontale TJ-Stranganzahl und die vertikale Tiefe des TJ-Netzwerkes (in nm) bestimmen. Zusätzlich werden Strangbrüche in den horizontalen TJ-Strängen größer als 20 nm gezählt und die TJ-Stränge in partikelartig oder kontinuierlich eingeordnet.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung für die Auswertung des TJ-Netzwerkes mittels eines Gitternetzes.**

Entlang der Zähllinien #1 bis #6 kann man die horizontalen TJ-Stränge zählen und die Ausdehnung in nm ablesen. Zwischen #4 und #5 erkennt man einen Strangbruch (= Lücke > 20 nm). (modifiziert nach Schmitz et al. 1999a)

## 3.7 Molekularbiologische Methoden

### 3.7.1 Isolation und Quantitätsbestimmung der RNA aus den Zellfiltern

Für die quantitative Analyse der RNA erfolgt zuerst die RNA-Extraktion aus den Zellmonolayern mittels peqGold RNAPure™, welches Phenol, Guanidiniumthiocyanat und Mercaptoethanol enthält, nach der Methode von Chomczynski and Sacchi (Chomczynski and Sacchi 1987). Nachdem zweimaligen Waschen mit PBS<sup>+</sup> werden 250 µl peqGold RNAPure™ pro Filter zugegeben. Das Lysat von zwei Filtern wird in ein Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Alle weiteren Schritte werden ebenfalls auf Eis durchgeführt. Nach 10 min Inkubation wird zu dem Homogenisat zur Phasentrennung 100 µl Chloroform gegeben, gut durchmischt und nach 5 min bei 12 000 × g für 10 min zentrifugiert. Danach folgt die RNA-Ausfällung mit 250 µl Isopropanol, welches zur wässrigen Phase gegeben wird. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit und zweimaligem Waschen mit 1 ml 75 % Ethanol wird nach der letzten Zentrifugation (10 min, 12.000 × g) das Pellet getrocknet und in 30 µl RNase-freiem Wasser im Wärmebad bei 56 °C gelöst. Anschließend wird die RNA-Konzentration spektralphotometrisch bei 260 nm im NanoDrop ND 2000 bestimmt.

### 3.7.2 Reverse Transkription

Das Umschreiben der RNA in cDNA, die im Gegensatz zur genomischen DNA keine Introns, sondern nur kodierende Exons enthält, erfolgt im Thermal Cycler. Die Synthese von DNA-Kopien (cDNA) aus den isolierten RNA-Strängen wird durch das Enzym Reverse Transkriptase aus dem Retrovirus ermöglicht. Dazu werden 2 µg RNA (ad 13,7 µl RNase-freies Wasser) mit 6,3 µl des „Master Mix“ (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit) versetzt. Der „Master Mix“ wiederum ergibt sich aus:

- 2,0 µl optimierter Reverse Transkriptase-Puffer (10x)
- 0,8 µl dNTP's
- 2,0 µl Random Hexamer Primer
- 0,5 µl RNase
- 1,0 µl MultiScribe™ MuLV Reverse Transkriptase

Die angesetzten Proben werden im Thermal Cycler für 10 min bei 25 °C und danach für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die erstellte cDNA kann dann als Matrize für die Real-Time-PCR verwendet werden. Bis dahin wird sie entweder kurz bei 4 °C oder langfristig bei -20 °C gelagert.

### 3.7.3 Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion

Zur Vervielfältigung bzw. Amplifizierung eines bestimmten DNA-Abschnitts und somit zum Nachweis auf Veränderungen bestimmter Genexpressionen wird die Polymerase Kettenreaktion (PCR) genutzt. Mit Hilfe der DNA-Polymerase zur Amplifizierung und spezifischen TaqMan-Sonden kann fluoreszenzoptisch eine Quantifizierung durchgeführt werden. Die TaqMan-Sonde ist komplementär zur Zielsequenz, enthält am 3'-Ende einen Quencher und am 5'-Ende den Reporterfarbstoff (VIC oder FAM). Während der PCR wird diese Sonde durch die Polymerase abgebaut, wodurch der Reporter verdrängt wird. Dadurch wird die supprimierende Wirkung des Quenchers auf den Reporter aufgehoben und das vom Reporter ausgehende Fluoreszenzlicht ist detektierbar. 2 µl der cDNA-Matrizen werden in einer 96-Lochplatte (96-Well Reaction Plate) in Doppelbestimmung, sowohl für *TaqMan*<sup>®</sup>Sonde CLDN15 als auch für GAPDH, das Housekeeping-Gen als endogene Kontrolle, angesetzt:

- 2 µl cDNA
- 10 µl 2x *TaqMan*<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix
- 1 µl *TaqMan*<sup>®</sup>Sonde
- 7 µl Wasser (RNase-frei)

Die mit Folie versiegelte Platte wird anschließend kurz zentrifugiert und im 7500 Fast Real-Time PCR Gerät mit folgender Einstellung detektiert:

10 min	-	bei 95 °C	1 x zur Denaturierung
15 s	-	bei 95 °C	} 45 Zyklen zur Amplifizierung
1 min	-	bei 60 °C	

Die Ergebnisse werden mit der systemeigenen Software und Microsoft Excel ausgewertet.

### 3.8 Statistische Verfahren

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden als Mittelwert  $MW \pm$  dessen Standardfehler  $SEM$  angegeben. Dazu werden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt und Ausreißer mit dem Grubbs-Test identifiziert und eliminiert. Der Vergleich zweier Gruppen erfolgt mittels zweiseitigem Student's t-Test. Wenn die dabei ermittelte Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  beträgt, wird ein Unterschied der beiden Gruppen als statistisch signifikant (\*) bewertet (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen (multiple Testung) wird zunächst die Varianzanalyse (ANOVA) als globaler Test durchgeführt. Dieser gibt bei Signifikanz zwar Auskunft über das Vorhandensein eines Unterschiedes zwischen den getesteten Gruppen, jedoch nicht zwischen welchen Gruppen genau. Daher wird bei signifikanten Ergebnis der ANOVA der Student's t-Test mit dem Post-hoc-Test nach Holm-Bonferroni als Korrektur der  $\alpha$ -Fehlerkumulierung bei multipler Testung durchgeführt (Holm 1979). Die statistischen Analysen werden mit Microsoft Excel und GraphPad Prism durchgeführt.

## 4 ERGEBNISSE

Die drei untersuchten Pflanzenkomponenten werden nacheinander dargestellt, zuerst der Ingwerscharfstoff 6-SG, dessen Wirkung auf die epitheliale Barriere an den HT-29/B6-Monolayern schon in meiner Masterarbeit Gegenstand war. Die ergänzenden Untersuchungen der Signalwege und die Wirkung von 6-SG auf ein zweites Zellmodell sind Teil dieser Dissertation. Daran anschließend folgen die Resultate zu dem Polyphenol Ellagsäure und dem Pflanzenharz Myrrhe an den Zelllinien HT-29/B6 und Caco-2.

### 4.1 Protektive Wirkung von 6-SG auf die TNF- $\alpha$ -induzierte Barrierefunktion

In der Vorarbeit der Dissertation zeigte sich, dass der Ingwerscharfstoff 6-SG die TNF- $\alpha$ -induzierte Barrierefunktion an den HT-29/B6-Monolayern teilweise inhibieren konnte. Dieser protektive Effekt wurde in den TER-Messungen gezeigt, und wird von der Inhibierung der Zytokin-induzierten Phosphorylierung des PI3K/Akt-Signalweges und somit der Hemmung der PI3K/Akt-vermittelten Expression des Kanal-bildenden TJ-Proteins Claudin-2 begleitet. 6-SG inhibierte zudem die Umverteilung des abdichtenden TJ-Proteins Claudin-1 durch TNF- $\alpha$ . Bisher jedoch wurde nicht geklärt, wie diese Umverteilung von 6-SG beeinflusst wird, und ob diese Veränderungen auch in der Ultrastruktur der TJ-Stränge nachzuweisen sind. Daher wurden weitere Untersuchungen zur Charakterisierung des Barriere-protaktiven Effektes von 6-SG an den HT-29/B6-Monolayern durchgeführt. Diese umfassen den Einfluss von 6-SG und TNF- $\alpha$  auf Veränderungen der Zellvitalität (4.1.1.2), der Permeabilität für Fluoreszein (4.1.1.3), der TJ-Ultrastruktur (0) und regulatorischer Prozesse (4.1.1.5 und 4.1.1.6) in den HT-29/B6-Zellen.

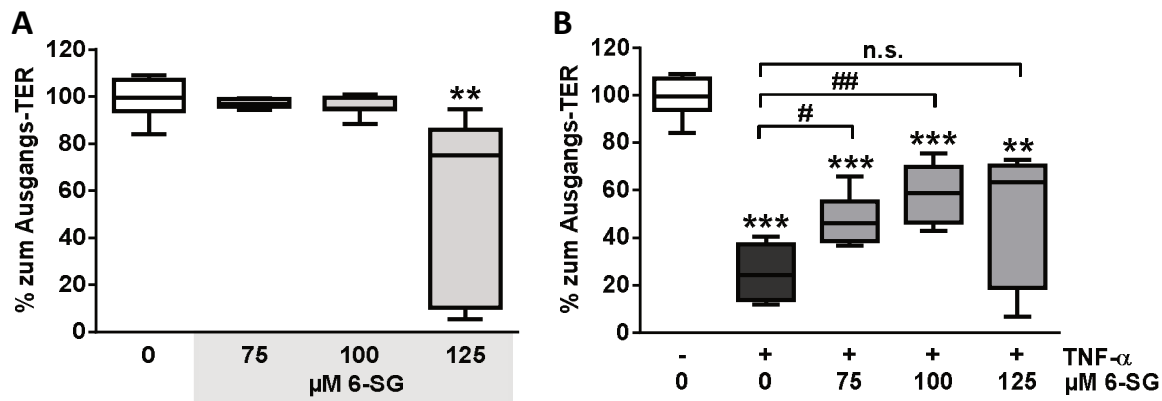
Um der limitierenden Aussage, die von Untersuchungen an nur einem Zellmodell ausgehen, entgegenzuwirken, wurde der antiinflammatorische Effekt von 6-SG an einem zweiten Zellmodell, den Caco-2-Kolonepithelzellen, überprüft (4.1.2). Alle hier gezeigten Ergebnisse zu 6-SG sind bereits veröffentlicht (Luettig et al. 2016).

#### 4.1.1 Charakterisierung des Barriere-protaktiven 6-SG Effektes an der Kolonkarzinomzelllinie HT-29/B6

##### 4.1.1.1 Wirkung auf den TER, die Tight Junction-Proteinexpression und die Apoptose

Mithilfe der Messung des TER wurde die Barrierefunktion der HT-29/B6-Monolayer überprüft. Durch die Präinkubation mit 100  $\mu$ M 6-SG wurde der durch das proinflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  (250 U/ml) induzierte TER-Abfall nach 24 h (TNF- $\alpha$  25  $\pm$  4 %,  $p < 0,001$  vs. Kontrolle 99  $\pm$  3 %,  $p < 0,001$  vs. Kontrolle 99  $\pm$  3 %,  $p < 0,001$  vs. Kontrolle 99  $\pm$  3 %).

n=8) um die Hälfte reduziert (TNF- $\alpha$ +100  $\mu$ M 6-SG  $59 \pm 4$  %,  $p < 0,01$  vs. TNF- $\alpha$ , n=8) (Luettig et al. 2016). Niedrigere Konzentrationen wie 75  $\mu$ M zeigten eine schwächere Inhibition der TNF- $\alpha$ -induzierten Barrierestörung (TNF- $\alpha$ +75  $\mu$ M 6-SG  $47 \pm 3$  %,  $p < 0,05$  vs. TNF- $\alpha$ , n=8) (siehe **Abbildung 9B**), während höhere Konzentrationen wie 125  $\mu$ M 6-SG allein schon negativ auf die Barriere wirkten (125  $\mu$ M 6-SG  $56 \pm 13$  %,  $p < 0,01$  vs. Kontrolle, n=8) (siehe **Abbildung 9A**).



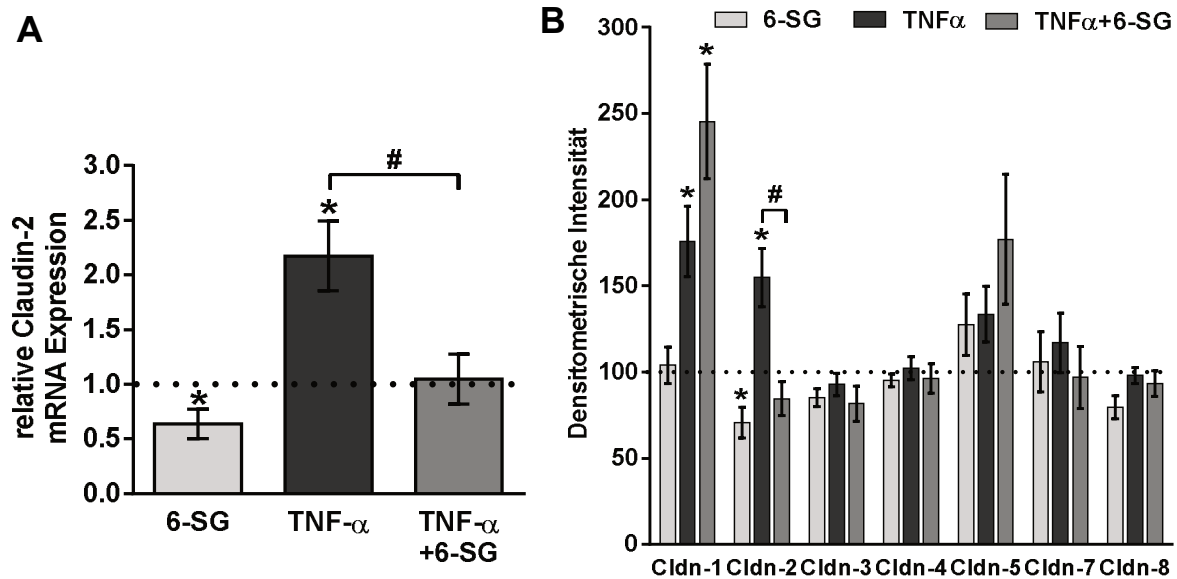
**Abbildung 9: Effekte von 6-SG und TNF- $\alpha$  auf die Barrierenfunktion der HT-29/B6-Zellen.**

(A) Einfluss von 6-SG in den Konzentrationen 75, 100 und 125  $\mu$ M nach 24 h auf den TER, n = 8.

(B) Abfall des TER durch TNF- $\alpha$  (250 U/ml) nach 24 h kann durch 6-SG (75 und 100  $\mu$ M) partiell gehemmt werden, n = 8.

(A,B) Die Ergebnisse sind in Box-Whisker-Plots mit Median (mittlere horizontale Linie der Box), den mittleren 50 % der Werte (Begrenzungen der Box = IQR), und dem niedrigsten sowie höchsten Wert innerhalb des  $1,5 \times$ IQR (Antenne=Whisker) dargestellt. \* Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . # Signifikant unterschiedlich zu TNF- $\alpha$ , #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ .

Die protektive Wirkung von 6-SG lag unter anderem in der Verringerung des durch TNF- $\alpha$  erhöhten Claudin-2-mRNA-Levels sowie der Claudin-2-Proteinexpression (siehe **Abbildung 10**), welche über eine Inhibition der Akt-Phosphorylierung vermittelt wurde (Luettig et al. 2016). Zudem konnte gezeigt werden, dass 6-SG zwar nicht die Expression von Claudin-1 beeinflusste, aber die Verteilung in der Zelle. Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass 6-SG die TNF- $\alpha$ -induzierte Umverteilung von Claudin-1 aus der TJ ins Zytosol teilweise hemmte und Claudin-1 in der TJ stabilisierte. Die Färbungen sind in dem Zusammenhang mit den dem Effekt zugrunde liegenden Signalwegen im Kapitel 4.1.1.5 dargestellt. Unverändert durch TNF- $\alpha$  und 6-SG blieben die Expression der TJ-Proteine Claudin-3, -4, -5, -7 und -8 (siehe **Abbildung 10**) (Luettig et al. 2016). Außerdem wurde gezeigt, dass 250 U/ml TNF- $\alpha$  sowie 100  $\mu$ M 6-SG nach 24 h Einwirkzeit auf den HT-29/B6-Monolayern die Caspase(cysteine-aspartic acid protease)-3 Level, sowohl die inaktivierte Form als auch die aktiven Spaltprodukte als Indikator für Apoptose, nicht beeinflussen.



**Abbildung 10: Effekte von 6-SG und TNF- $\alpha$  auf die TJ-Proteinexpression in den HT-29/B6-Zellen.**

- (A) Die quantitative Analyse zeigt, dass die Claudin-2 mRNA durch TNF- $\alpha$  erhöht und durch 6-SG wieder reduziert ist,  $n = 9$ .
- (B) Densitometrische Analyse von Western Blots zeigen die Effekte von 6-SG und TNF- $\alpha$  auf die TJ-Protein Expression von Claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7 und -8 mit der Ladungskontrolle  $\beta$ -Aktin normiert. 6-SG hemmt die TNF- $\alpha$ -induzierte Claudin-2-Proteinexpression, während es bei den anderen Claudinen keinen Unterschied zwischen TNF- $\alpha$  und der Koinkubation mit 6-SG gibt,  $n = 6-12$ .
- (A,B) Die Kontrolle ist als gestrichelte Linie dargestellt und auf 1.0 bzw. 100 % gesetzt. Die Werte sind in  $MW \pm SEM$  angegeben. \* Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle,  $*p < 0,05$ . # Signifikant unterschiedlich zu TNF- $\alpha$ ,  $\#p < 0,05$ .

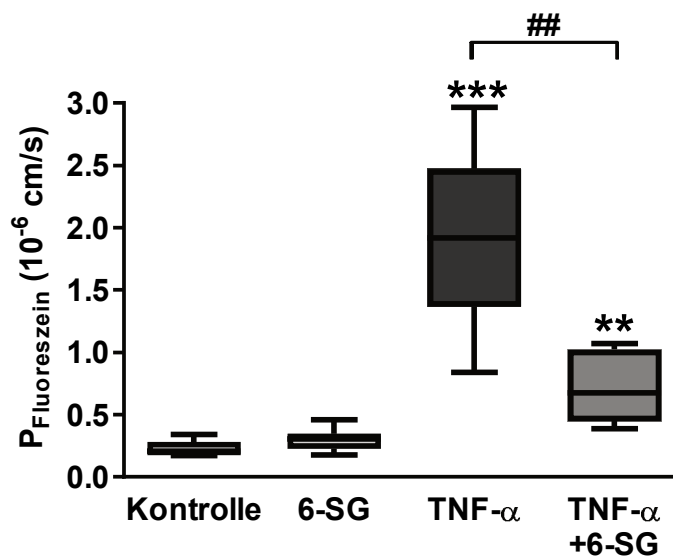
#### 4.1.1.2 Wirkung von 6-SG und TNF- $\alpha$ auf die Zellvitalität

Um einen Einfluss auf die Vitalität der HT-29/B6-Zellen auszuschließen, wurde ein Zytotoxizitätstest mit dem CCK-8 Kit durchgeführt. Die Messwerte der unterschiedlich behandelten HT-29/B6-Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede ( $n=6$ ):

Kondition	MW $\pm$ SEM
Kontrolle	0,31 $\pm$ 0,009
75 $\mu$ M 6-SG	0,36 $\pm$ 0,017
100 $\mu$ M 6-SG	0,30 $\pm$ 0,011
125 $\mu$ M 6-SG	0,36 $\pm$ 0,017
TNF- $\alpha$ 250 U/ml	0,26 $\pm$ 0,020

#### 4.1.1.3 Wirkung auf die Permeabilität für Fluoreszein

Neben dem Widerstand, der die Barriere für Ionen, vor allem  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$ , beschreibt, gibt die Messung des Fluoreszeinfluxes (332 Da) Aufschluss über die Barriereigenschaften gegenüber größeren Soluten der HT-29/B6-Monolayer unter 6-SG und/oder TNF- $\alpha$ . Dabei inhibierte 6-SG den durch TNF- $\alpha$  bedingten Anstieg der Permeabilität für Fluoreszein (TNF- $\alpha$   $1,9 \pm 0,34 \cdot 10^{-6}$  cm/s,  $p < 0,001$  vs. Kontrolle  $0,2 \pm 0,03 \cdot 10^{-6}$  cm/s; 6-SG+TNF- $\alpha$   $0,7 \pm 0,19 \cdot 10^{-6}$  cm/s,  $p < 0,01$  vs. TNF- $\alpha$ ,  $n=9-10$ ) (siehe **Abbildung 11**).



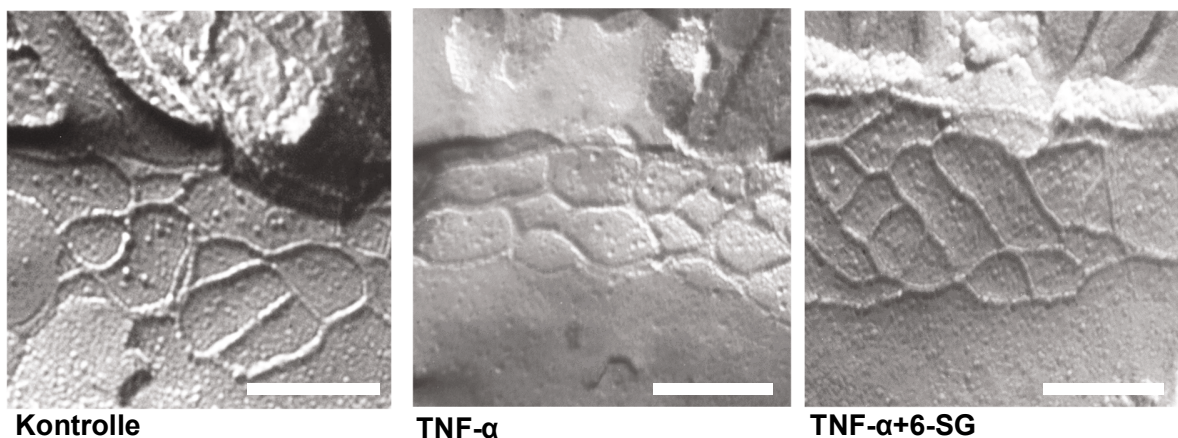
**Abbildung 11: Effekt von 6-SG auf die Permeabilität für Fluoreszein in HT-29/B6-Zellen.**

100  $\mu\text{M}$  6-SG inhibierte die durch 250 U/ml TNF- $\alpha$  erhöhte Permeabilität für das TJ-Markermolekül Fluoreszein (332 Da),  $n = 9-10$ . Die Ergebnisse sind in Box-Whisker-Plots mit Median (mittlere horizontale Linie der Box), den mittleren 50 % der Werte (Begrenzungen der Box = IQR), und dem niedrigsten sowie höchsten Wert innerhalb des  $1,5 \times \text{IQR}$  (Antenne=Whisker) dargestellt. \* Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . # Signifikant unterschiedlich zu TNF- $\alpha$ , ##  $p < 0,01$ .



#### 4.1.1.4 Wirkung auf die Ultrastruktur des Tight Junction-Netzwerkes

Da die Expression und Lokalisation der TJ-Proteine Einfluss auf die Ultrastruktur des TJ-Netzwerkes besitzt, wurde dieses mithilfe des Gefrierbruchs und der Elektronenmikroskopie untersucht. Der Vergleich der Ultrastruktur des TJ-Netzwerkes der verschiedenen behandelten HT-29/B6-Monolayer lieferte keine Unterschiede (**Abbildung 12**). Weder gab es einen Unterschied in der TJ-Netzwerktiefe noch in der Anzahl der horizontalen TJ-Stränge und der Anzahl der TJ-Strangbrüche zwischen den drei Gruppen nach 24 h Behandlung: Kontrolle, TNF- $\alpha$  und TNF- $\alpha$ +6-SG (**Tabelle 4**).



**Abbildung 12: TJ-Ultrastruktur nach 24 h Behandlung unter Kontrollbedingungen, 250 U/ml TNF- $\alpha$ , und TNF- $\alpha$ +100  $\mu$ M 6-SG in HT-29/B6-Zellen.**

51.000  $\times$  Vergrößerung, Balken = 200 nm.

**Tabelle 4: TJ-Morphometrie der HT-29/B6-Monolayer unter 6-SG und TNF- $\alpha$ .**

	Stränge <sup>1</sup>	Tiefe (nm) <sup>2</sup>	Dichte <sup>3</sup>	Strangbrüche <sup>4</sup>	n
<b>Kontrolle</b>	4,2 $\pm$ 0,2	247 $\pm$ 17	16,8 $\pm$ 1,5	0,10 $\pm$ 0,05	26
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	4,2 $\pm$ 0,3	318 $\pm$ 34	13,2 $\pm$ 1,6	0,11 $\pm$ 0,03	27
<b>TNF-<math>\alpha</math>+6-SG</b>	4,0 $\pm$ 0,2	262 $\pm$ 17	15,1 $\pm$ 1,2	0,06 $\pm$ 0,03	28

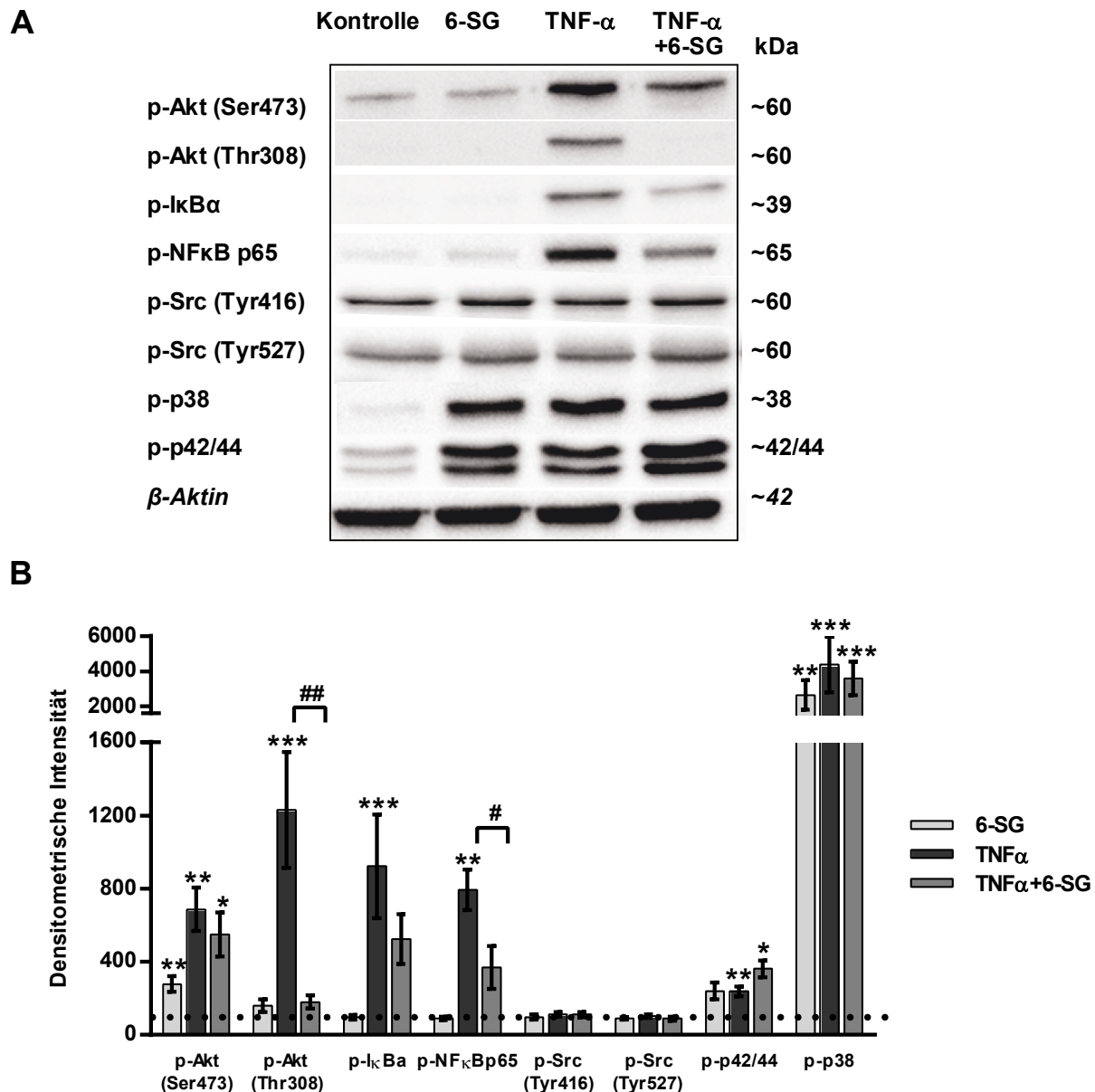
Die TJ-Morphometrie wurde nach 24 h Behandlung unter Kontrollbedingungen und unter TNF- $\alpha$  (250 U/ml) und TNF- $\alpha$ +6-SG (100  $\mu$ M) bestimmt. Die Werte sind als MW  $\pm$  SEM angegeben. <sup>1</sup> Anzahl der horizontal orientierten TJ-Stränge. <sup>2</sup> Tiefe des TJ-Netzwerkes. <sup>3</sup> Die TJ-Dichte gibt die Anzahl der TJ-Stränge pro  $\mu$ m wieder. <sup>4</sup> Anzahl TJ-Strangbrüche  $\geq$  20 nm pro  $\mu$ m Stranglänge.

#### 4.1.1.5 Einfluss auf den NFκB-Signalweg

Die densitometrische Auswertung der PI3K/Akt (Tyr308, Ser473) und MAPK (p-p38, Erk1/2 p-p42/44) Signalwege wurde bereits in meiner Masterarbeit thematisiert. Zur Vollständigkeit werden hier alle untersuchten Signalwege noch einmal aufgeführt und sowohl die repräsentativen Blots als auch die densitometrische Auswertung gezeigt (**Abbildung 13**). 6-SG konnte die Phosphorylierung von Akt am Threonin(Thr)308 durch TNF-α hemmen (6-SG+TNF-α  $310 \pm 123$  %,  $p < 0,05$  vs. TNF-α  $1397 \pm 437$  %,  $n=7$ ), nicht aber die zweite, durch TNF-α aktivierte Phosphorylierungsstelle am Serin(Ser)473 (6-SG+TNF-α  $441 \pm 112$  %, n.s. vs. TNF-α  $789 \pm 436$  %,  $n=7$ ). Die Phosphorylierungen der MAPK, p38 und Erk1/2 p42/44, waren unter alleiniger Inkubation mit 6-SG oder TNF-α im Vergleich zur Kontrolle erhöht, jedoch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Phosphorylierung zwischen 6-SG+TNF-α und TNF-α allein. Die Expression von Claudin-2 in HT-29/B6-Zellen wurde über den PI3K/Akt-Signalweg vermittelt, wie schon in früheren Arbeiten in diesem Zellmodell gezeigt wurde (Amasheh et al. 2010; Mankertz et al. 2009).

In der Literatur ist der hemmende Effekt von 6-SG auf den NFκB-Signalweg bekannt (Ling et al. 2010; Pan et al. 2008; Sohn et al. 2013), daher wurde die Phosphorylierung dieses Signalweges im Western Blot untersucht. Die densitometrische Auswertung der phosphorylierten Form zeigte, dass TNF-α sowohl NFκB p65 (TNF-α  $715 \pm 89$  %,  $p < 0,01$  vs. Kontrolle  $\triangleq 100$  %,  $n=8$ ) als auch IκBα (TNF-α  $1652 \pm 562$  %,  $p < 0,001$  vs. Kontrolle  $\triangleq 100$  %,  $n=10$ ) aktivierte, 6-SG jedoch nur die Phosphorylierung von NFκB p65 hemmte (6-SG+TNF-α  $209 \pm 58$  %,  $p < 0,05$  vs. TNF-α,  $n=8$ ; **Abbildung 13B**). Aufgrund der hohen Streuung der Werte ist die optisch erkennbare Hemmung der TNF-α-induzierten Phosphorylierung von IκBα (siehe **Abbildung 13A**) durch 6-SG nicht signifikant (6-SG+TNF-α  $524 \pm 171$  %, n.s. vs. TNF-α  $1652 \pm 562$  %,  $n=9$ ).

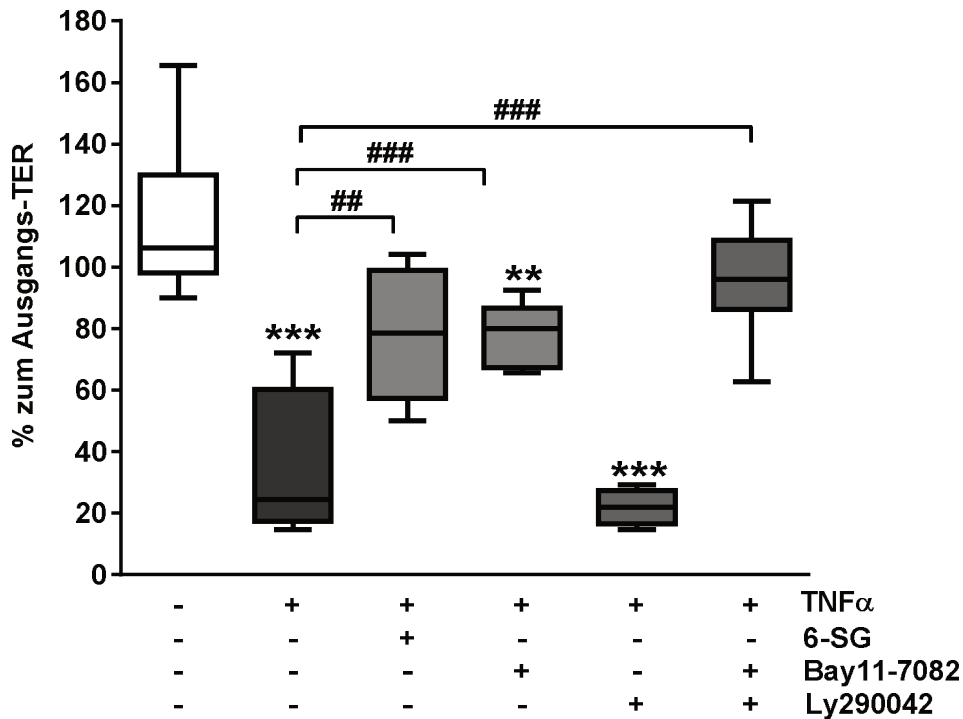
Um aufzuklären, ob der NFκB-Signalweg alleine oder in Kombination mit dem PI3K/Akt-Weg für die Inhibierung des TNFα-induzierten TER-Abfalls durch 6-SG verantwortlich ist, wurden Inhibitoren dieser Signalwege, BAY 11-7082 (10 μm) für NFκB und LY294002 (10 μM) für PI3K, eingesetzt. Die Verwendung von Inhibitoren kann nur indirekt die Rolle der Signalwege, die von 6-SG beeinflusst werden, in der Regulation der Barrierefunktion beweisen. Nur BAY 11-7082 konnte die durch TNF-α induzierte Barrieredysfunktion inhibieren (BAY 11-7082+TNF-α  $78 \pm 4$  %,  $p < 0,001$  vs. TNF-α  $36 \pm 8$  %,  $n=8$ ) (siehe **Abbildung 14**).



**Abbildung 13: Die Effekte von 6-SG und TNF- $\alpha$  auf die Signalwege in HT-29/B6-Zellen.**

(A) Dargestellt sind repräsentative Western Blots der phosphorylierten Form von NFkappa B, IkBa, Akt, Src und MAPK. Als Ladungskontrolle diente  $\beta$ -Aktin.

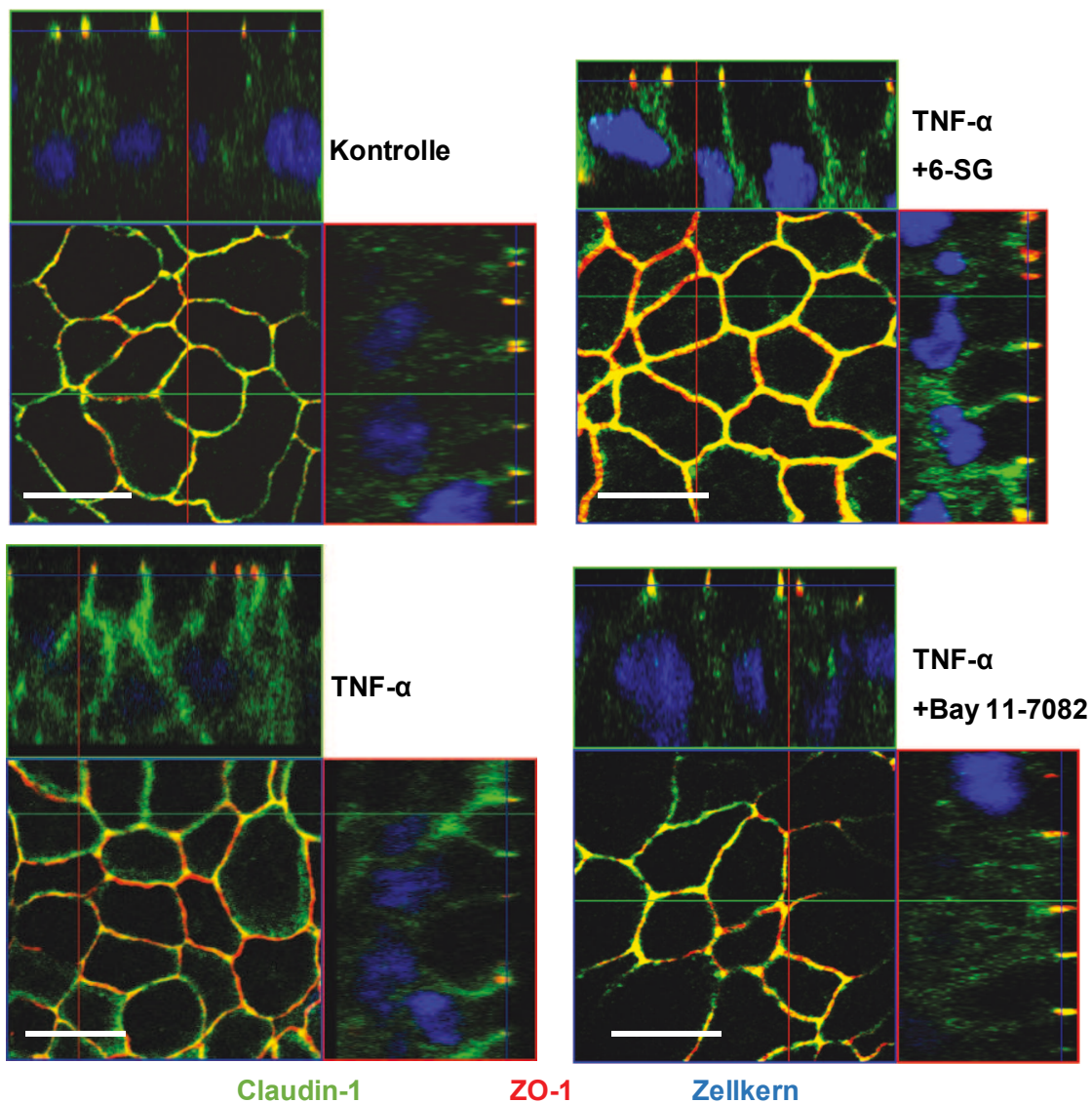
(B) Densitometrische Analysen der phosphorylierten Formen von Akt(Ser473 sowie Thr308), IkBa, NFkappa B p65, Src(Tyr416 sowie Tyr527) und MAPK(p42/44, p38) in 100  $\mu$ M 6-SG, 250 u/ml TNF- $\alpha$  oder 6-SG mit TNF- $\alpha$ . Die Werte wurden mit  $\beta$ -Aktin normalisiert und sind in Prozent zu den Kontrollen (gestrichelte Linie, auf 100 % gesetzt) als MW  $\pm$  SEM dargestellt mit n = 8-12. TNF- $\alpha$ -behandelte HT-29/B6-Monolayer zeigten eine gesteigerte Phosphorylierung von Akt(Ser473), Akt(Thr308), IkBa und NFkappa Bp65. Die Vorinkubation von 6-SG hemmte die TNF- $\alpha$ -induzierte Phosphorylierung von Akt(Thr308) und NFkappa Bp65, nicht aber die von Akt(Ser473) und IkBa. \* Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001. # Signifikant unterschiedlich zu TNF- $\alpha$ , # p < 0,05, ## p < 0,01.



**Abbildung 14: Effekt der Inhibitoren auf die TNF- $\alpha$ -vermittelte Barrieredysfunktion im Vergleich zu 6-SG.**

Die Vorinkubation mit dem NF $\kappa$ B-Inhibitor BAY 11-7082 (10  $\mu$ M) zeigte nach 24 h eine vergleichbare Hemmung des TNF- $\alpha$ -induzierten TER-Abfalls wie durch 6-SG (100  $\mu$ M). Der PI3K-Inhibitor LY294002 (10  $\mu$ M) zeigte keinen inhibitorischen Effekt in den Widerstandsmessungen. Die Ergebnisse sind in Box-Whisker-Plots mit Median (mittlere horizontale Linie der Box), den mittleren 50 % der Werte (Begrenzungen der Box = IQR), und dem niedrigsten sowie höchsten Wert innerhalb des 1,5 $\times$ IQR (Antenne=Whisker) dargestellt, n = 8. \* Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001. # Signifikant unterschiedlich zu TNF- $\alpha$ , # p < 0,05, ## p < 0,01.

Die durch TNF- $\alpha$  in den Immunfärbungen beobachtete Umverteilung von Claudin-1 aus der TJ im Vergleich zur Kontrolle konnte ebenfalls durch BAY 11-7082 inhibiert werden (**Abbildung 15**). Die Umverteilung von Claudin-1 durch TNF- $\alpha$  wurde von 6-SG insofern beeinflusst, dass trotz unveränderter Expression mehr Claudin-1 in der TJ vorlag als in den nur mit TNF- $\alpha$ -behandelten HT-29/B6-Zellen. Dies bestätigte sich durch die Quantifizierungsanalyse mittels des gewichteten Kollokalisationskoeffizienten, der bei 6-SG+TNF- $\alpha$ -behandelten Monolayern um bis zu 30 % mehr kolokalisiertes Claudin-1 aufweist als bei TNF- $\alpha$  behandelten Monolayern (6-SG+TNF- $\alpha$  0,36  $\pm$  0,07, p < 0,05 vs. TNF- $\alpha$  0,27  $\pm$  0,04, n=6).



**Abbildung 15: Effekte von 6-SG und TNF- $\alpha$  auf die subzelluläre Verteilung des TJ-Proteins Claudin-1 in HT-29/B6-Zellen.**

Immunfluoreszenzaufnahmen als Z-stacks (mehrschichtige Aufnahmen), die die laterale Ansicht auf die TJ ermöglichen, der behandelten Zellmonolayer Kontrolle, TNF- $\alpha$  (250 U/ml), TNF- $\alpha$ +6-SG (100  $\mu$ M) und TNF- $\alpha$ +BAY 11-7082 (10  $\mu$ M), zeigen Claudin-1 (grün), den TJ-Marker ZO-1 (rot) und deren Kolokalisationen (gelb). Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). 6-SG verhindert partiell und BAY 11-7082 vollständig die TNF- $\alpha$ -induzierte Umverteilung von Claudin-1 aus dem TJ-Kompartiment hin zur basolateralen Membran ins zytosolische Kompartiment. Balken = 10  $\mu$ m.

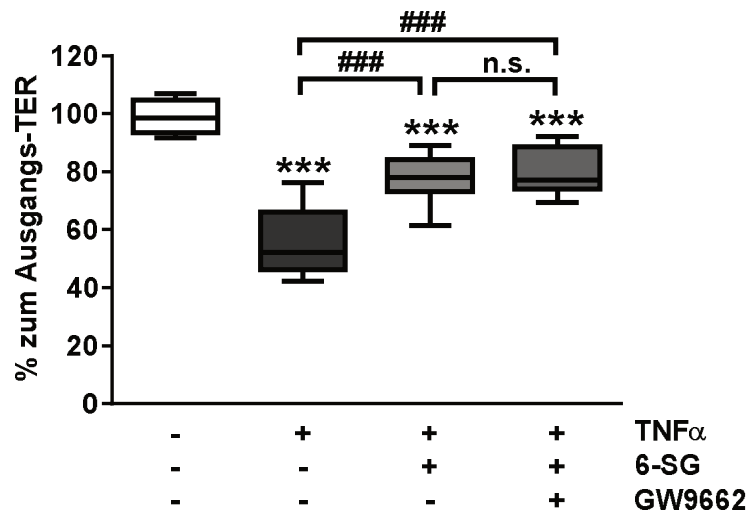


#### 4.1.1.6 Rolle des Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )

Weitere Untersuchungen sollten zeigen, ob der Effekt von 6-SG über den intrazellulären Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor (PPAR) $\gamma$  vermittelt wurde. In kanzerogenen Brust- und Kolonzellen wurde 6-SG als PPAR $\gamma$ -Agonist beschrieben, der durch die PPAR $\gamma$ -Aktivierung die NF $\kappa$ B-Aktivität hemmte (Tan et al. 2013). Dazu wurden sowohl der Antagonist GW9662 als auch der Agonist Rosiglitazon auf den HT-29/B6-Monolayern untersucht. Mit dem Antagonisten des PPAR $\gamma$  sollte überprüft werden, ob die Wirkung von 6-SG an den HT-29/B6-Zellen aufgehoben werden kann. Dagegen sollte der PPAR $\gamma$ -Agonist Rosiglitazon, wenn 6-SG in den Zellen als PPAR $\gamma$ -Agonist fungiert, ebenso wie 6-SG den TNF- $\alpha$ -induzierten TER-Abfall inhibieren.

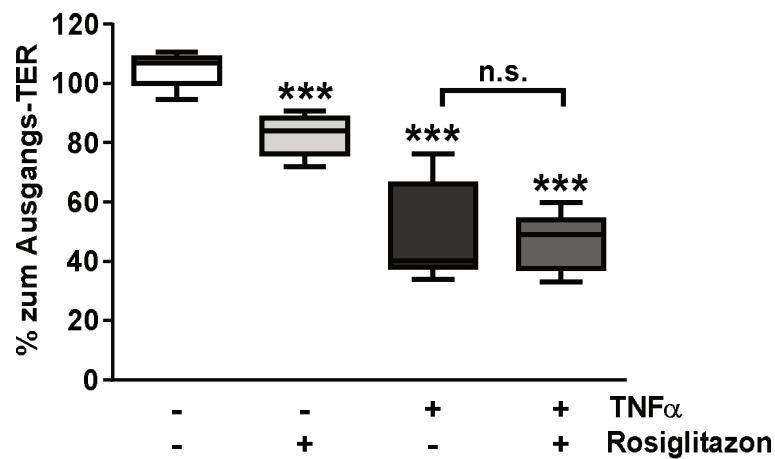
In den Widerstandsmessungen zeigte sich, dass der PPAR $\gamma$ -Antagonist GW9662 allein keine direkte Wirkung nach 24 h auf die HT-29/B6-Zellen ausübte. So gab es keine Unterschiede zwischen den behandelten Zellen mit GW9662 (10  $\mu$ M) und der jeweiligen Gruppe ohne GW9662 (n=9, GW9662  $99 \pm 3$  % vs. Kontrolle  $99 \pm 2$  %, n. s.). Auch in Gegenwart von TNF- $\alpha$  hatte der Antagonist keinen Einfluss (TNF- $\alpha$ +GW9662  $62 \pm 5$  %, n. s. vs. TNF- $\alpha$   $56 \pm 4$  %, n=9), ebenso wie in Gegenwart von 6-SG (6-SG+GW9662  $96 \pm 2$  %, n. s. vs. 6-SG  $89 \pm 4$  %, n=6). GW9662 konnte den präventiven 6-SG-Effekt gegen TNF- $\alpha$  nicht verhindern (TNF- $\alpha$ +6-SG+GW9662  $80 \pm 3$  %, n. s. vs. TNF- $\alpha$ +6-SG  $78 \pm 3$  %, n=8-9) (siehe **Abbildung 16**).

Der PPAR $\gamma$ -Agonist Rosiglitazon (10  $\mu$ M) verursacht allein nach 24 h einen geringen Widerstandsabfall an den HT-29/B6-Monolayern ( $82 \pm 2$  % vs. Kontrolle  $104 \pm 2$  %,  $p < 0,001$ , n=8). Dieser Abfall wird auch von einer geringen Konzentration wie 1  $\mu$ M ( $81 \pm 6$  %, n=3) oder 0,1  $\mu$ M ( $80 \pm 7$  %, n=3) verursacht. Neben dem TER-senkenden Effekt von Rosiglitazon allein konnte der Agonist im Vergleich zu 6-SG (Kapitel 4.1.1.1) dem TNF- $\alpha$ -induzierten TER-Abfall nicht entgegenwirken (TNF- $\alpha$ +Rosiglitazon  $47 \pm 3$  %, n. s. vs. TNF- $\alpha$   $51 \pm 5$  %, n=9) (siehe **Abbildung 17**).



**Abbildung 16: Effekt des PPAR $\gamma$ -Antagonisten GW9662 auf den TNF- $\alpha$ -vermittelten Barriereverlust.**

Die HT-29/B6-Zellen zeigten keinen Unterschied zwischen TNF- $\alpha$ (250 U/ml)+6-SG(100  $\mu$ M) und der Inkubation mit dem Antagonisten GW9662 (10  $\mu$ M). Die Werte sind in Box-Whisker-Plots mit Median (mittlere horizontale Linie der Box), den mittleren 50 % der Werte (Begrenzungen der Box = IQR), und dem niedrigsten sowie höchsten Wert innerhalb des 1,5 $\times$ IQR (Antenne=Whisker) dargestellt, n = 9. \*\*\* p < 0,001 Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, ### p < 0,001 signifikant unterschiedlich zur TNF- $\alpha$ .

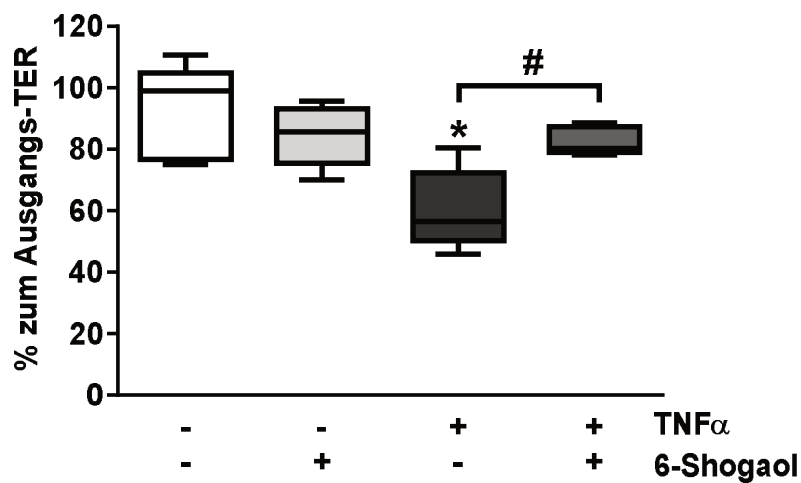


**Abbildung 17: Effekt des PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon auf den TNF- $\alpha$ -vermittelten Barriereverlust der HT-29/B6-Monolayer.**

Rosiglitazon (10  $\mu$ M) senkte allein den TER und hatte keinen Effekt auf den TNF- $\alpha$ -vermittelten TER-Abfall. Die Werte sind in Box-Whisker-Plots mit Median (mittlere horizontale Linie der Box), den mittleren 50 % der Werte (Begrenzungen der Box = IQR), und dem niedrigsten sowie höchsten Wert innerhalb des 1,5 $\times$ IQR (Antenne = Whisker) dargestellt, n = 9. \*\*\* p < 0,001 Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

#### 4.1.2 Wirkung von 6-SG auf die Kolonkarzinom-Zelllinie Caco-2

Die Caco-2-Zellen wurden als zweites intestinales in vitro Modell verwendet, um die Limitation der aus einem in vitro Modell abgeleiteten Aussage über die antiinflammatorische Wirkung von 6-SG auf die epitheliale intestinale Barrierefunktion zu vermeiden. An den Caco-2-Zellen verursachten 500 U/ml TNF- $\alpha$  nach 48 h einen TER-Abfall um 40 % (TNF- $\alpha$   $60 \pm 6$  %,  $p < 0,01$  vs. Kontrolle  $92 \pm 7$  %,  $n=5$ ) (siehe **Abbildung 18**). Dieser Abfall konnte teilweise wie an den HT-29/B6-Zellen durch beidseitige Gabe von 100  $\mu$ M 6-SG inhibiert werden (TNF- $\alpha$ +6-SG  $82 \pm 2$  %,  $p < 0,05$  vs. TNF- $\alpha$ ,  $n=5$ ).



**Abbildung 18: Protektiver Effekt von 6-SG gegen eine TNF- $\alpha$ -vermittelte Barrieredysfunktion in den Caco-2-Zellen.**

100  $\mu$ M 6-SG inhibierten partiell den 500 U/ml TNF- $\alpha$ -induzierten TER-Abfall. Die Werte sind in Box-Whisker-Plots mit Median (mittlere horizontale Linie der Box), den mittleren 50 % der Werte (Begrenzungen der Box = IQR), und dem niedrigsten sowie höchsten Wert innerhalb des 1,5 $\times$ IQR (Antenne=Whisker) dargestellt,  $n = 5$ . \*\*  $p < 0,01$  Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle und #  $p < 0,05$  signifikant unterschiedlich zu TNF- $\alpha$ .



## 4.2 Steigerung der Barrierefunktion durch Ellagsäure

Die Wirksamkeit von Ellagsäure wurde ebenfalls an den beiden humanen Zelllinien Caco-2 und HT-29/B6 getestet. Zudem wurde die antiinflammatorische Wirkung mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF- $\alpha$  untersucht. Die Barrierewirkung von Ellagsäure an den intestinalen Zelllinien wurde durch Messung des TER untersucht.

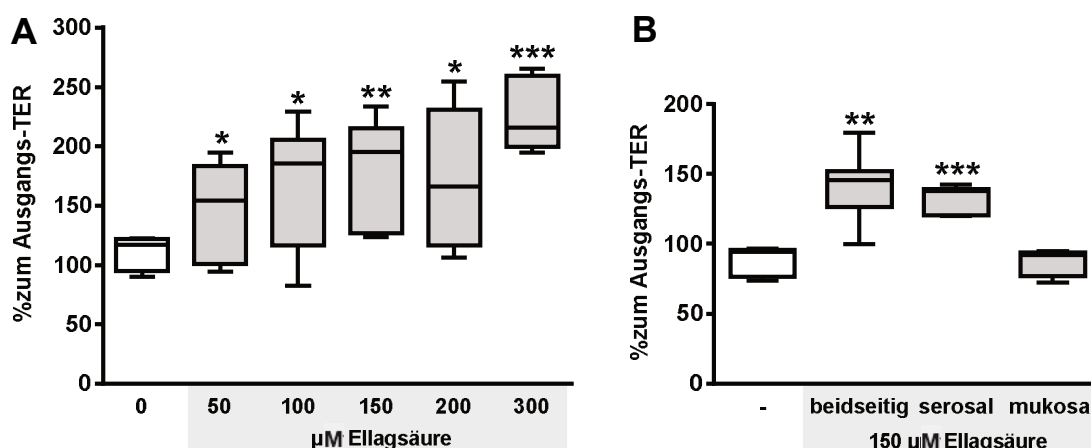
### 4.2.1 Wirkung der Ellagsäure auf Barrierefunktion der Kolonkarzinom-Zelllinie Caco-2

#### 4.2.1.1 Wirkung auf den epithelialen Widerstand und die Ionenpermeabilität

Ellagsäure wurde in einer Konzentrationsreihe an Caco-2-Zellen für 24 h überprüft. Zur Ermittlung der effektiven Konzentration an Caco-2-Monolayern wurden verschiedene Konzentrationen von Ellagsäure eingesetzt. Im Vergleich zur Kontrolle ( $104 \pm 9 \%$ ,  $n=8$ ) erhöht Ellagsäure den TER in allen eingesetzten Konzentrationen (siehe **Abbildung 19A**):

- 50  $\mu$ M Ellagsäure  $147 \pm 13 \%$ ,  $p<0,05$ ,  $n=9$
- 100  $\mu$ M Ellagsäure  $167 \pm 17 \%$ ,  $p<0,05$ ,  $n=9$
- 150  $\mu$ M Ellagsäure  $180 \pm 14 \%$ ,  $p<0,01$ ,  $n=9$
- 200  $\mu$ M Ellagsäure  $173 \pm 25 \%$ ,  $p<0,05$ ,  $n=6$  und
- 300  $\mu$ M Ellagsäure  $225 \pm 12 \%$ ,  $p<0,001$ ,  $n=6$ .

Jedoch nimmt die Löslichkeit von Ellagsäure mit steigender Konzentration immer mehr ab und zugleich steigt die Lösungsmittelkonzentration, hier DMSO, an. Um die Konzentration von DMSO gering zu halten wurden die folgenden Experimente mit 150  $\mu$ M Ellagsäure durchgeführt, das Verhältnis von DMSO zu Medium betrug 1:750. Ellagsäure wirkte von der basolateralen Seite der Zellmembran (basolateral  $p<0,01$  und apikal n. s. versus Kontrolle,  $n=7$ ) (siehe **Abbildung 19B**). Alle weiteren Experimente wurden weiterhin mit beidseitiger Inkubation durchgeführt.



**Abbildung 19: Effekt von Ellagsäure auf die Barriere von Caco-2-Zellen.**

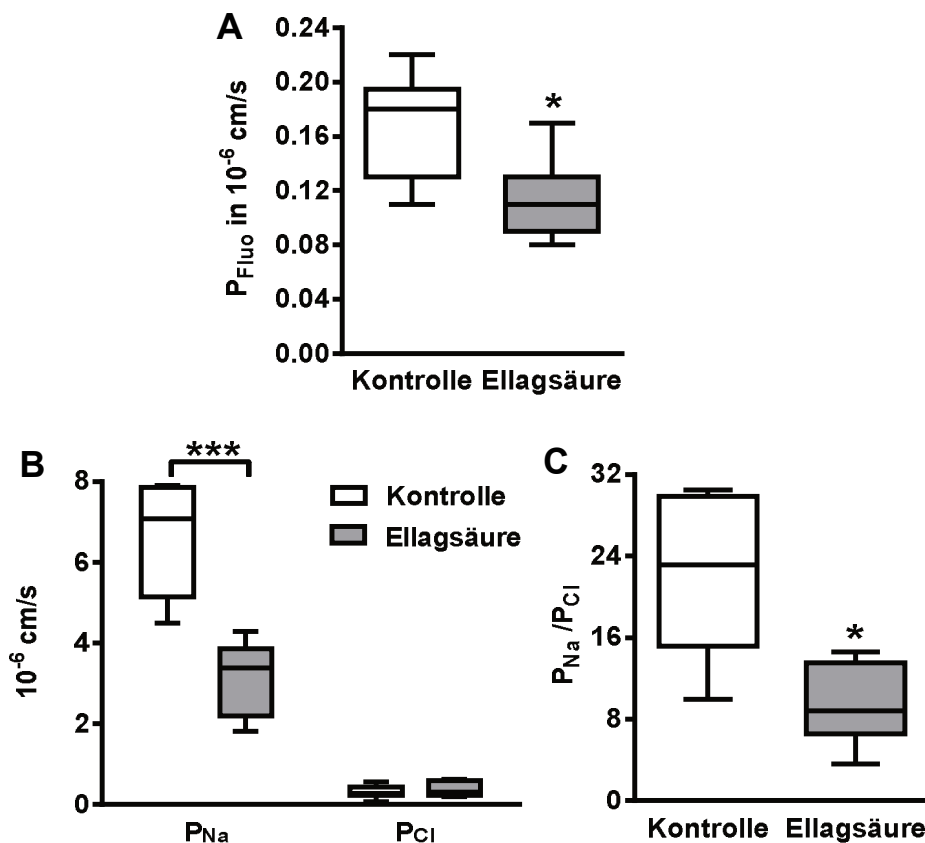
(A) Ellagsäure erhöhte den TER nach 24 h Inkubation mit steigender Konzentration (50 bis 300 µM) bei beidseitiger Gabe,  $n = 6-9$ .

(B) Dabei wirkte Ellagsäure (150 µM) von der basolateralen und nicht von der apikalen Applikationsseite,  $n = 7$ .

(A, B) Die Werte sind in Box-Whisker-Plots mit Median (mittlere horizontale Linie der Box), den mittleren 50 % der Werte (Begrenzungen der Box = IQR), und dem niedrigsten sowie höchsten Wert innerhalb des  $1,5 \times \text{IQR}$  (Antenne=Whisker) dargestellt. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  und \*\*\*  $p < 0,001$  signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

Die Wirkung von Ellagsäure auf die Permeabilitätseigenschaften der Caco-2-Monolayer wurde mit Fluoreszeinfluxen (332 Da) und Dilutionspotentialmessungen, mit der sich die Permeabilitäten für  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  berechnen ließen, untersucht (siehe **Abbildung 20**). Dabei verursachte Ellagsäure sowohl eine Reduktion der Permeabilität für Fluoreszein ( $0,11 \pm 0,012 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle  $0,16 \pm 0,013 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ,  $n=8$ ) als auch für  $\text{Na}^+$  ( $3,1 \pm 0,3 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ,  $p < 0,001$  vs. Kontrolle  $6,6 \pm 0,5 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ,  $n=8$ ). Wohingegen die Permeabilität für  $\text{Cl}^-$  unverändert blieb (Ellagsäure  $0,38 \pm 0,06 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ , n.s. vs. Kontrolle  $0,32 \pm 0,05 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ,  $n=8$ ). Das Verhältnis der Permeabilität für  $\text{Na}^+$  zu der von  $\text{Cl}^-$  nimmt so durch Ellagsäure ab ( $9,3 \pm 1,4 P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ ,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle  $27,9 \pm 7,3 P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ ,  $n=8$ ).

Ebenso wurde die Permeabilität für größere Moleküle wie FD4 (4 kDa) an den Caco-2-Monolayern untersucht. Dabei waren die Fluxe von FD4 schon in den Kontrollen so gering, dass eine Antwort auf die Frage nach einer möglichen Reduktion der Permeabilität für größere Moleküle durch Ellagsäure ausgeschlossen wurde.



**Abbildung 20: Einfluss von Ellagsäure auf die Permeabilitätseigenschaften der Caco-2-Zellen.**

(A) 150  $\mu$ M Ellagsäure ( $n = 7$ ) verringerten die Permeabilität des 332 Da großen Moleküls Fluoreszein im Vergleich zur Kontrolle ( $n = 9$ ).

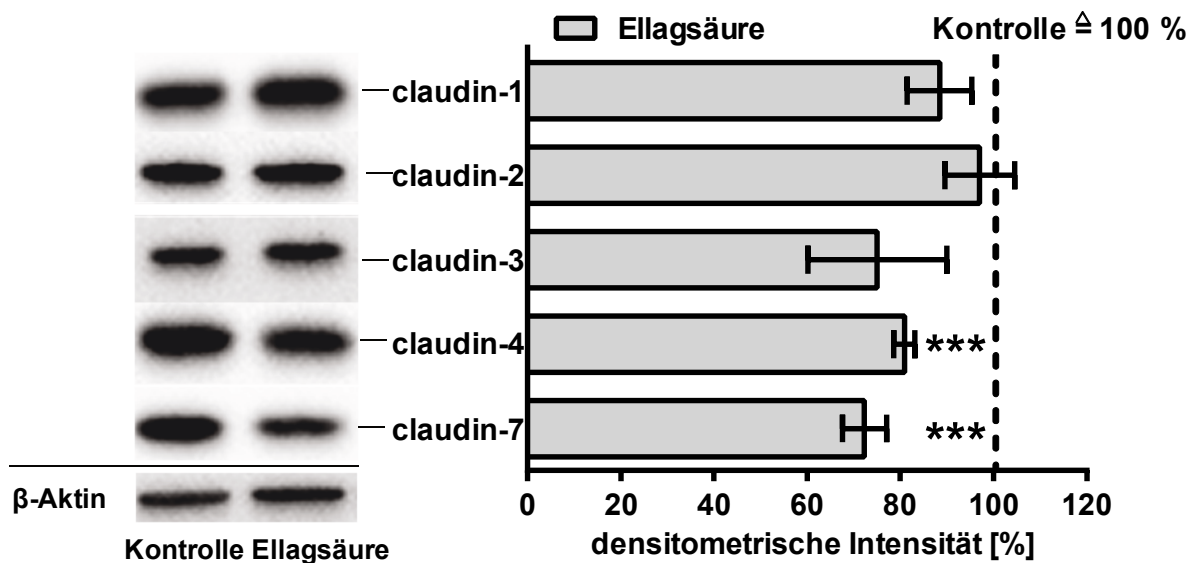
(B) Ellagsäure reduzierte die absolute  $P_{Na}$ , während  $P_{Cl}$  unverändert blieb,  $n = 8$ .

(C) Auch das Verhältnis der Permeabilität für Natrium-Ionen ( $P_{Na}$ ) zu der für Chlorid-Ionen ( $P_{Cl}$ ) wurde durch Ellagsäure insgesamt reduziert,  $n = 8$ .

(A-C) Die Werte sind in Box-Whisker-Plots mit Median (mittlere horizontale Linie der Box), den mittleren 50% der Werte (Begrenzungen der Box = IQR), und dem niedrigsten sowie höchsten Wert innerhalb des  $1,5 \times$ IQR (Antenne = Whisker) dargestellt. \* Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \* $p < 0,05$  und \*\*\* $p < 0,001$ . Fluo, Fluoreszein.

4.2.1.2 Einfluss auf die Proteinexpression Barriere-relevanter Tight Junction-Proteine

Der Einfluss von Ellagsäure auf die Proteinexpression der Barriere-relevanten Claudine in den Caco-2-Monolayern wurde mittels Western Blot überprüft (siehe **Abbildung 21**). Caco-2-Zellen weisen im Vergleich zu HT-29/B6-Zellen kein Claudin-5 und Claudin-8 auf, daher wurden Claudin-1, -2, -3, -4 und -7 untersucht. Dabei zeigte sich, dass Claudin-4 (Ellagsäure  $81 \pm 2 \%$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n=9$ ) und -7 (Ellagsäure  $73 \pm 5 \%$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n=9$ ) verglichen zur Kontrolle (auf 100 % gesetzt) reduziert waren. Dagegen blieben Claudin-1 (Ellagsäure  $88 \pm 8 \%$ , n. s.), Claudin-2 (Ellagsäure  $97 \pm 8 \%$ , n. s.) und Claudin-3 (Ellagsäure  $75 \pm 15 \%$ , n. s.) in ihrer Expression unverändert ( $n=10$ ). Es wurde auch das Claudin-15 als Kationenkanal für die Veränderungen im Dilutionspotential in Betracht gezogen. Jedoch konnte Claudin-15 im Western Blot nicht nachgewiesen werden, auf RNA Ebene dagegen schon. Jedoch gab es nach 24 h keinen Unterschied zwischen Ellagsäure und der Kontrolle in der Claudin-15-mRNA (Ellagsäure 0,97-fache der Kontrolle, n. s.,  $n=8$ ).

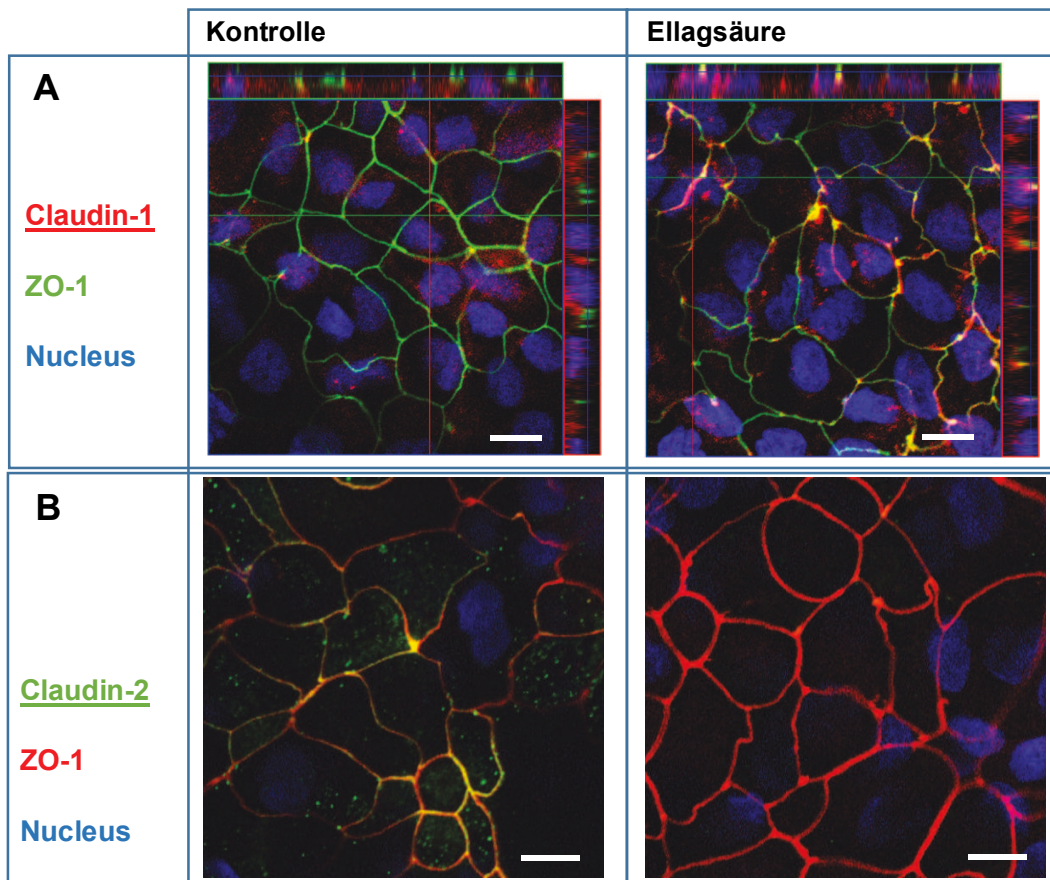


**Abbildung 21: Die Wirkung von Ellagsäure auf die Expression der Claudine in Caco-2-Zellen.**

Dargestellt sind repräsentative Western Blots von Claudin-1, -2, -3, -4 und -7 von unbehandelten und mit 150  $\mu\text{M}$  Ellagsäure-behandelten Caco-2-Monolayern und die Densitometrie von allen Western Blots. Alle Werte wurden mit der Ladungskontrolle  $\beta$ -Aktin normalisiert und sind in Prozent zu den Kontrollen (gestrichelte Linie, auf 100 % gesetzt) als  $\text{MW} \pm \text{SEM}$  dargestellt mit  $n = 9-10$ . \* Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \*\*\*  $p < 0,001$ . Bei Claudin-4 und -7 zeigte sich eine Verringerung durch Ellagsäure, während die anderen Claudine keinen Unterschied zur Kontrolle aufwiesen.

4.2.1.3 Wirkung auf Lokalisation von Barriere-relevanten Claudinen

Neben der Expression ist auch die Lokalisation der TJ-Proteine entscheidend für die Barrierefunktion. Dabei wurde in den mit Ellagsäure-behandelten Monolayern im Vergleich zur Kontrollgruppe ein stärkeres Signal von dem abdichtenden TJ-Protein Claudin-1 vor allem in den trizellulären TJ-Arealen beobachtet (**Abbildung 22A**). Claudin-2 als Kanal bildendes TJ-Protein lag nur sehr vereinzelt in der TJ vor und Aufnahmen zeigten teils eine Reduzierung durch Ellagsäure wie in **Abbildung 22B**, teils einen Anstieg des Claudin-2-Signals.



**Abbildung 22: Effekte von Ellagsäure auf die subzelluläre Verteilung der TJ-Proteine Claudin-1 (A) und Claudin-2 (B) in Caco-2-Zellen.**

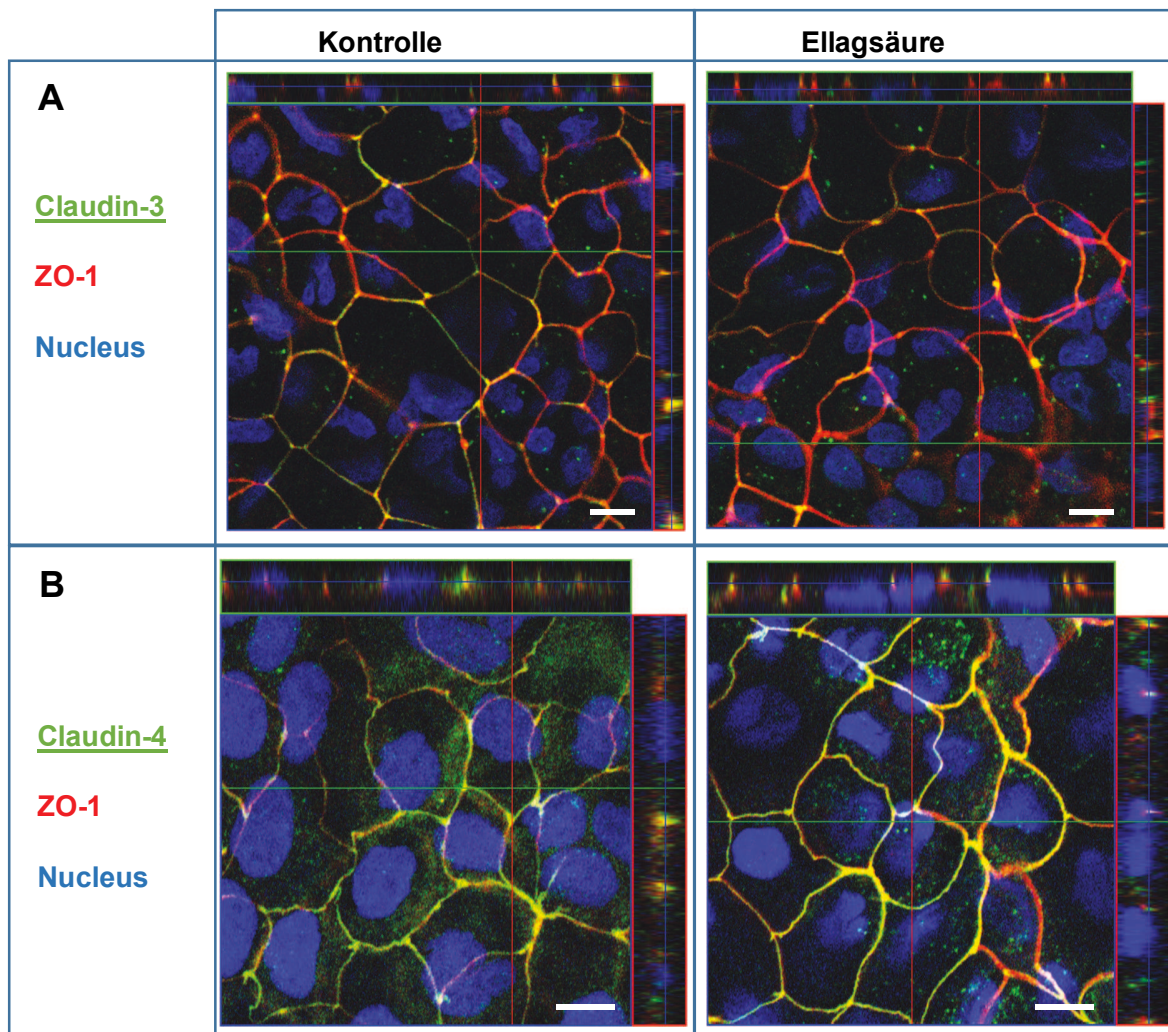
(A,B) Immunfluoreszenzaufnahmen als Z-stacks (mehrschichtige Aufnahmen), die die laterale Ansicht auf die TJ ermöglichen, und einfach einschichtige Aufnahmen der behandelten Zellmonolayer für Claudin-2: Kontrolle und 150  $\mu$ M Ellagsäure. Aufnahmen zeigen Claudine, den TJ-Marker ZO-1 und deren Kolokalisationen (gelb). Der Zellkern (Nucleus) wurde mit DAPI gefärbt (blau). Balken = 10  $\mu$ m.

(A) Ellagsäure erhöhte das Claudin-1-Signal (rot), vor allem in der trizellulären TJ.

(B) Diese Aufnahme zeigte eine Verringerung des Claudin-2-Signals (grün) durch Ellagsäure.

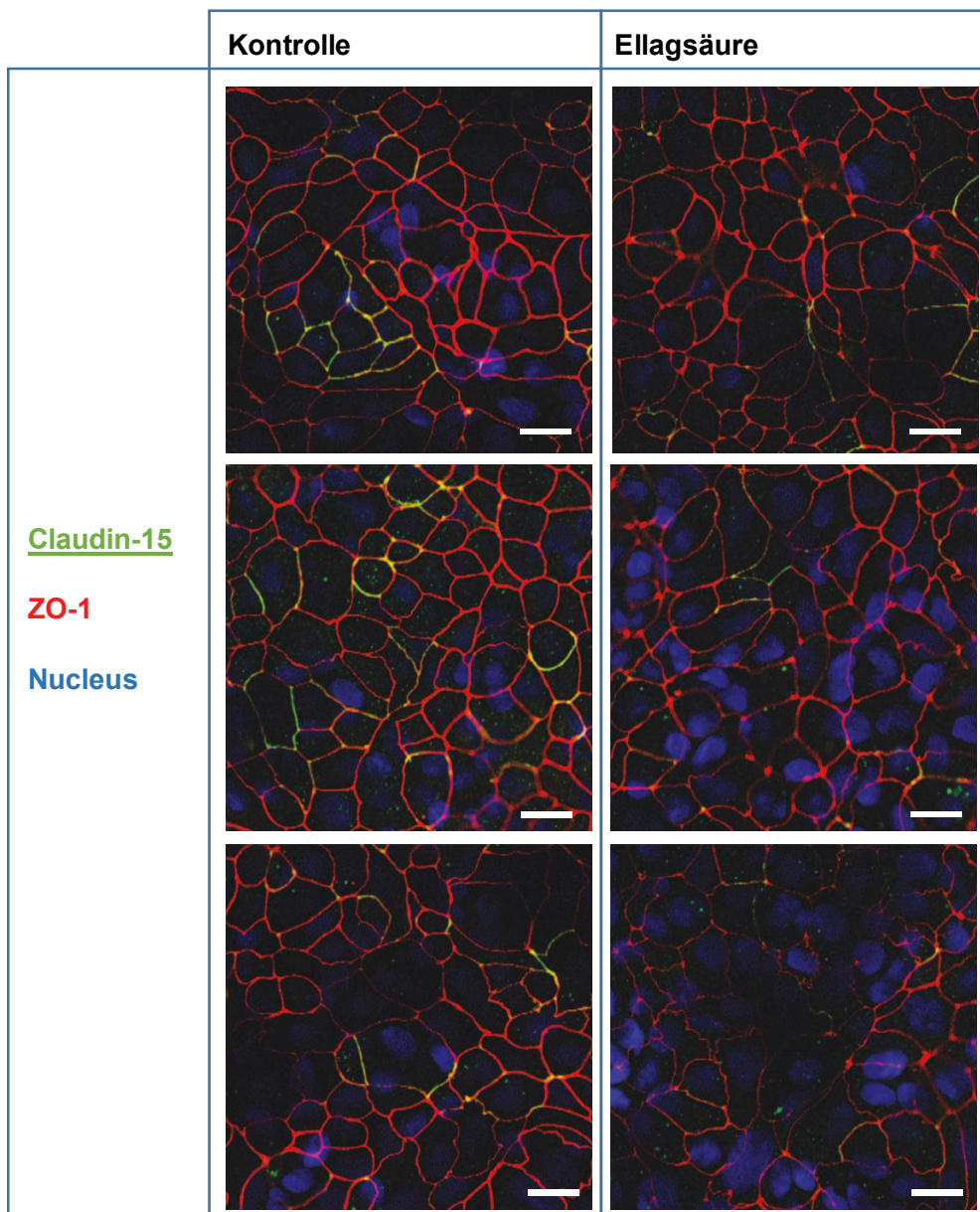


Färbungen von Claudin-3 und Claudin-4 zeigten keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Beispielaufnahmen in **Abbildung 23**). Der Claudin-7-Antikörper war für eine Färbung ungeeignet, während Färbungen von dem Claudin-15-Antikörper im Gegensatz zu den Western Blots Signale im konfokalen LSM zeigten. Die Claudin-15-Signale traten sporadisch verteilt und diskontinuierlich im TJ-Netzwerk auf. Die Aufnahmen deuten an, dass es unter Ellagsäure weniger Claudin-15 in der TJ gab, da weniger Claudin-15-gefärbte Stränge im Netzwerk verglichen zur Kontrolle erkennbar waren (siehe **Abbildung 24**).



**Abbildung 23: Effekte von Ellagsäure auf die subzelluläre Verteilung der TJ-Proteine Claudin-3 (A) und Claudin-4 (B) in Caco-2-Zellen.**

Immunofluoreszenzaufnahmen als Z-stacks (mehrschichtige Aufnahmen) und einfach einschichtige Aufnahmen der behandelten Zellmonolayer: Kontrolle und 150  $\mu\text{M}$  Ellagsäure. Aufnahmen zeigten Claudine (grün), den TJ-Marker ZO-1 (rot) und deren Kolokalisationen (gelb). Der Zellkern (Nucleus) wurde mit DAPI gefärbt (blau). Bei der Lokalisation von Claudin-3 (A) und -4 (B) zeigten sich keine Unterschiede in der Färbung. Balken = 10  $\mu\text{m}$ .

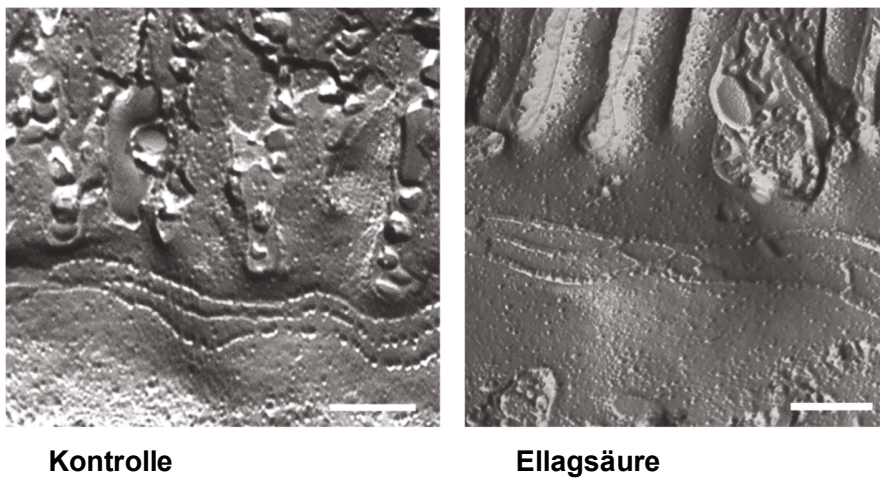


**Abbildung 24: Effekte von Ellagsäure auf die subzelluläre Verteilung des TJ-Proteins Claudin-15 in Caco-2-Zellen.**

Immunofluoreszenzaufnahmen der behandelten Zellmonolayer: Kontrolle und 150  $\mu\text{M}$  Ellagsäure. Aufnahmen zeigten Claudin-15 (grün), den TJ-Marker ZO-1 (rot) und deren Kolokalisationen (gelb). Der Zellkern (Nucleus) wurde mit DAPI gefärbt (blau). Alle Aufnahmen zeigten eine Verringerung des Claudin-15-Signals unter Ellagsäure. Balken = 20  $\mu\text{m}$ .

4.2.1.4 Wirkung auf die Ultrastruktur des Tight Junction-Netzwerkes

Da die Expression und Lokalisation der TJ-Proteine Einfluss auf die Ultrastruktur haben kann, wurde diese mithilfe des Gefrierbruchs und der Elektronenmikroskopie untersucht. Die morphometrische Analyse ergab zwischen unbehandelten und den mit Ellagsäure-behandelten Caco-2-Monolayern hinsichtlich der Strangzahl und Netzwerktiefe keine Unterschiede. Ebenso wenig gab es signifikante Unterschiede hinsichtlich der Strangbrüche, wenn auch tendenziell weniger Strangbrüche unter Ellagsäure gezählt wurden ( $p=0,097$ ) (siehe **Tabelle 5** und beispielhaft eine Aufnahme einer TJ pro Gruppe in **Abbildung 25**).



**Abbildung 25:** Darstellung der TJ-Ultrastruktur mit einer 51,000× Vergrößerung beispielhaft unter Kontrollbedingungen und 150  $\mu\text{M}$  Ellagsäure in Caco-2-Zellen.

Balken = 200 nm.

**Tabelle 5:** TJ-Morphometrie der Caco-2-Monolayer unter Ellagsäure.

	Stränge <sup>1</sup>	Tiefe (nm) <sup>2</sup>	Dichte <sup>3</sup>	Strangbrüche <sup>4</sup>	n
<b>Kontrolle</b>	3,2 ± 0,1	143 ± 9	22 ± 1,7	0,07 ± 0,02	69
<b>Ellagsäure</b>	3,4 ± 0,2	147 ± 17	23 ± 2,9	0,02 ± 0,01	38

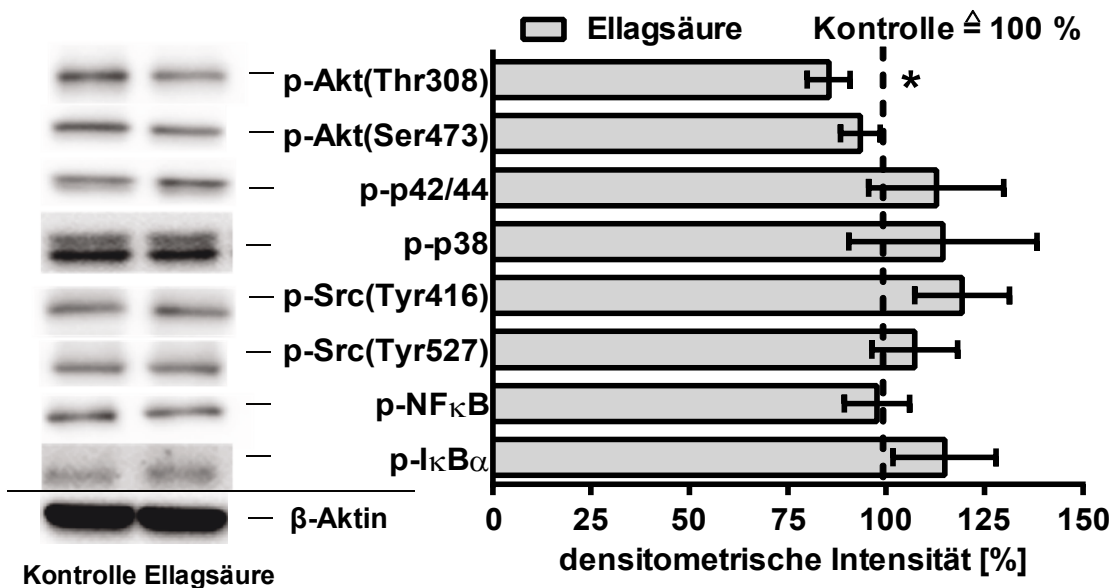
Die TJ-Morphometrie der Caco-2-Zellen ist hier nach 24 h Behandlung unter Kontrollbedingungen und unter 150  $\mu\text{M}$  Ellagsäure dargestellt. Die Werte sind als  $MW \pm SEM$  angegeben. <sup>1</sup> Die Anzahl der horizontal orientierten TJ-Stränge. <sup>2</sup> Die Tiefe des TJ-Netzwerkes. <sup>3</sup> Die TJ-Dichte gibt die Anzahl der TJ-Stränge pro  $\mu\text{m}$  wieder. <sup>4</sup> Die Anzahl der TJ-Strangbrüche  $\geq 20$  nm pro  $\mu\text{m}$  Stranglänge.



4.2.1.5 Einfluss auf intrazelluläre Signalwege

Um mögliche involvierte Signalwege des Barriere-stabilisierenden Effektes von Ellagsäure zu detektieren, wurden die phosphorylierten Formen der Akt, MAPK, Src, NFκB und IκBα nach 30 min Behandlung ohne und mit Ellagsäure in den Caco-2-Monolayern überprüft. Die phosphorylierte Form von Akt(Thr308) wurde durch Ellagsäure verringert ( $85 \pm 5 \%$ ,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle  $\pm 100 \%$ ,  $n=7$ ), die anderen Signalwege zeigten keine Veränderungen unter Ellagsäure (**Abbildung 26**). Ob diese Reduzierung des PI3K/Akt-Signalweges zu dem TER-Anstieg an den Caco-2-Monolayern führt, wurde mit dem PI3K-Inhibitor Ly294002 wie zuvor schon bei den HT-29/B6-Zellen für eine indirekte Beweisführung untersucht.

Ly294002 hatte nach 24 h Inkubation jedoch keinen Einfluss auf den TER im Vergleich zur Kontrolle (Ly294002  $100 \pm 4 \%$ , n. s. vs. Kontrolle  $95 \pm 5 \%$ ,  $n=7$ ). Der Einfluss des Inhibitors Ly294002 auf die Claudin-Expression befindet sich im Kapitel 4.3.1.4.

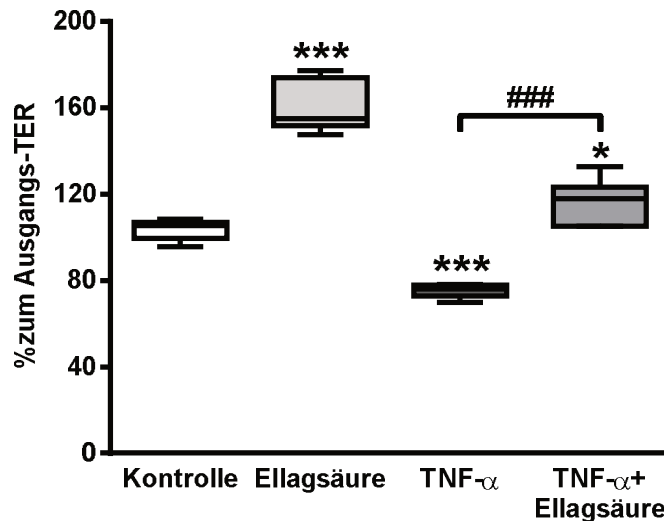


**Abbildung 26: Die Effekte von Ellagsäure auf die Signalwege in Caco-2-Zellen.**

Dargestellt sind repräsentative Western Blots der phosphorylierten Formen von Akt(Thr308 und Ser473), MAPK(p42/44, p38), Src(Tyr416 sowie Tyr527), IκBα und NFκB p65 Akt, MAPK, Src, NFκB und IκBα von unbehandelten und mit 150 μM Ellagsäure-behandelten Caco-2-Monolayern, sowie die densitometrische Analysen aller Western Blots. Die Werte wurden mit β-Aktin normalisiert und sind in Prozent zu den Kontrollen (gestrichelte Linie, auf 100 % gesetzt) als  $MW \pm SEM$  dargestellt mit  $n = 6-7$ . Es zeigte sich eine verringerte Phosphorylierung von Akt(Thr308) durch Ellagsäure,  $n = 7$ . \* Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \*  $p < 0,05$ .

#### 4.2.1.6 Wirkung von Ellagsäure auf die TNF- $\alpha$ -induzierte Barrierefunktion an Caco-2-Zellen

Anschließend wurde getestet, ob Ellagsäure an den Caco-2-Zellen einen antiinflammatorischen Effekt zeigt (siehe **Abbildung 27**). Ellagsäure verhinderte in Vorinkubation den TNF- $\alpha$ -induzierten TER-Abfall (TNF- $\alpha$ +Ellagsäure  $117 \pm 4 \%$ ,  $p < 0,001$  vs. TNF- $\alpha$   $75 \pm 1 \%$ ,  $n=7$ ), erreicht aber nicht den gleichen TER-Anstieg wie Ellagsäure allein (Ellagsäure  $161 \pm 4 \%$ ,  $p < 0,001$  vs. Kontrolle  $104 \pm 2 \%$ ,  $n=7$ ).

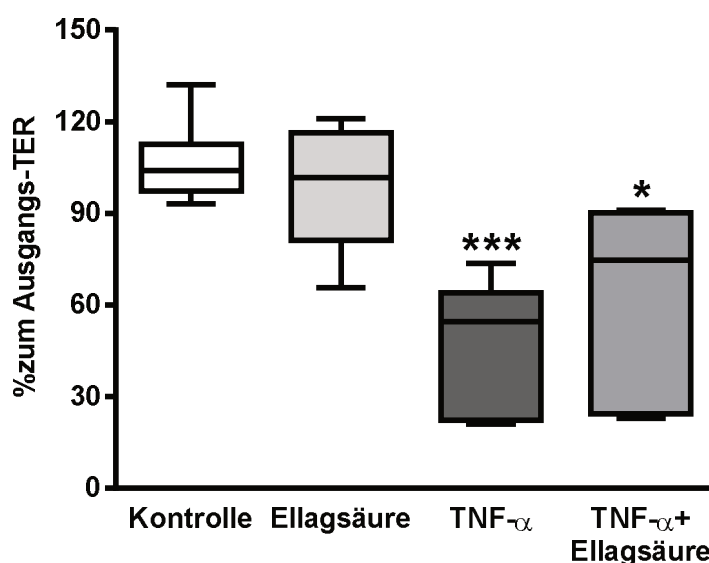


**Abbildung 27: Effekt von Ellagsäure gegen eine TNF- $\alpha$ -vermittelte Barrierefunktion in Caco-2-Zellen.**

Durch den Barriere-stabilisierenden Effekt von  $150 \mu\text{M}$  Ellagsäure allein schützte Ellagsäure präventiv vor TNF- $\alpha$ -induziertem TER-Abfall. Die Werte sind in Box-Whisker-Plots mit Median (mittlere horizontale Linie der Box), den mittleren 50 % der Werte (Begrenzungen der Box = IQR), und dem niedrigsten sowie höchsten Wert innerhalb des  $1,5 \times \text{IQR}$  (Antenne = Whisker) dargestellt,  $n = 7$ . \* Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \*  $p < 0,05$  und \*\*\*  $p < 0,001$ , und # signifikant unterschiedlich zu TNF- $\alpha$ , ###  $p < 0,001$ .

#### 4.2.2 Wirkung von Ellagsäure auf die TNF- $\alpha$ -induzierte Barrieredysfunktion an HT-29/B6-Kolonzellen

An den HT-29/B6-Zellen zeigte Ellagsäure weder allein einen Effekt noch einen protektiven Effekt in Kombination mit TNF- $\alpha$ . Der an den HT-29/B6-Monolayern nach 24 h durch TNF- $\alpha$  verursachte TER-Abfall um zirka 50 % (TNF- $\alpha$   $46 \pm 9$  %,  $p < 0,001$  vs. Kontrolle  $107 \pm 5$  %,  $n=7$ ) konnte nicht durch Ellagsäure (150  $\mu$ M) gehemmt werden (TNF- $\alpha$ +Ellagsäure  $60 \pm 12$  %, n. s. vs. TNF- $\alpha$ ,  $n=7$ ) (siehe **Abbildung 28**).



**Abbildung 28: Ellagsäure zeigt keine Wirkung gegen eine TNF- $\alpha$ -vermittelte Barrieredysfunktion in HT-29/B6-Zellen.**

Ellagsäure hatte keinen Einfluss auf die Barrierefunktion der HT-29/B6-Monolayer nach 24 h. Es zeigte sich kein Unterschied im TER zwischen Ellagsäure in Vorinkubation zu TNF- $\alpha$  und TNF- $\alpha$  allein. Die Werte sind in Box-Whisker-Plots mit Median (mittlere horizontale Linie der Box), den mittleren 50 % der Werte (Begrenzungen der Box = IQR), und dem niedrigsten sowie höchsten Wert innerhalb des  $1,5 \times$ IQR (Antenne=Whisker) dargestellt,  $n = 7$ . \* Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \*  $p < 0,05$  und \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 4.3 Steigerung der intestinalen Barrierefunktion und Inhibition des TNF- $\alpha$ -induzierten Barrieredefekts durch Myrrhe

Myrrhe wurde an den Caco-2- und HT-29/B6-Kolonzellen in seiner Barrierewirkung überprüft. Wie auch bei den beiden Einzelsubstanzen 6-SG und Ellagsäure wurde diese Wirkung mittels der TER-Messung zum „Barriere-monitoring“ kontrolliert (siehe 3.3.1). Bei signifikanten Veränderungen im TER wurde anschließend analysiert, ob parazelluläre Ursachen, wie Veränderungen in der TJ vorliegen und welche zellulären Signalwege involviert sind.

#### 4.3.1 Wirkung von Myrrhe auf die Barrierefunktion der Kolonkarzinom-Zelllinie Caco-2

In diesem Kapitel wird die Wirksamkeit von Myrrhe auf die Barriereintegrität an den Caco-2-Monolayern analysiert. Dazu wurden Widerstands- und Permeabilitätsmessungen (4.3.1.1), Western Blots zur Analyse am Barriereeffekt involvierter TJ-Proteine (4.3.1.2) und Signalwege (4.3.1.4) sowie weitere Untersuchungen der TJ-Proteine hinsichtlich ihrer Lokalisation in der Zelle (4.3.1.2) durchgeführt und die TJ-Ultrastruktur morphometrisch untersucht (4.3.1.3).

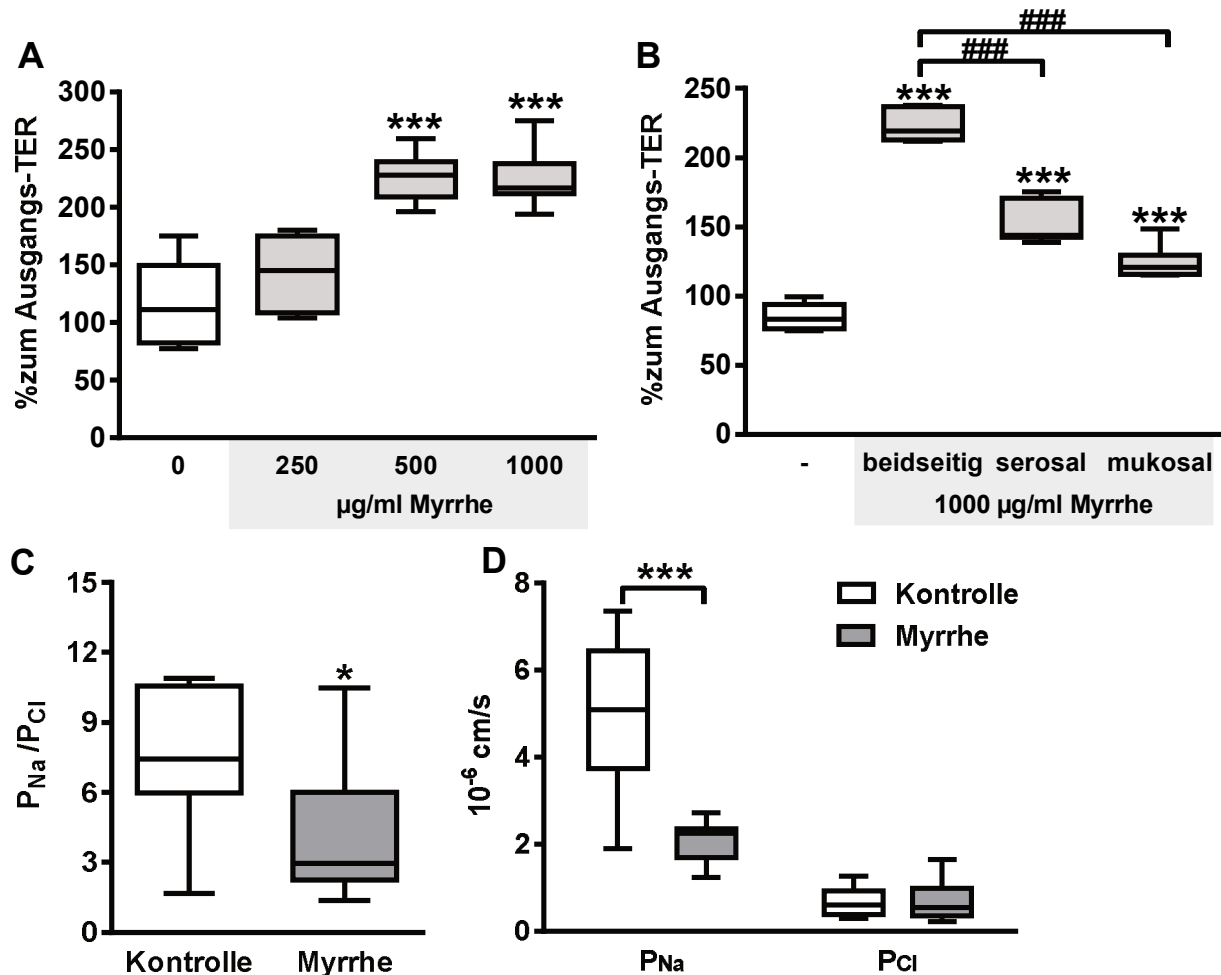
##### 4.3.1.1 Wirkung auf den epithelialen Widerstand und die Permeabilität

Bei der Messung einer Konzentrationsreihe (250, 500 und 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) zeigte sich, dass Myrrhe bereits nach 24 h den TER von den Caco-2-Monolayern erhöhte (250  $\mu\text{g/ml}$   $136 \pm 7\%$ ; 500  $\mu\text{g/ml}$   $155 \pm 7\%$ ; 1000  $\mu\text{g/ml}$   $199 \pm 7\%$  des Ausgangs-TER). Eine Inkubationszeit von 48 h vergrößerte den Effekt und im Vergleich zur Kontrolle ( $116 \pm 10\%$  des Ausgangs-TER,  $n=11$ ) konnten die beiden höheren Myrrhekonzentrationen 500  $\mu\text{g/ml}$  ( $226 \pm 7\%$  des Ausgangs-TER,  $n=7$ ) und 1000  $\mu\text{g/ml}$  ( $224 \pm 7\%$  des Ausgangs-TER,  $n=11$ ) den TER verdoppeln (siehe **Abbildung 29A**).

Für weitere Versuche wurde Myrrhe in der höchsten Dosis 1000  $\mu\text{g/ml}$  verwendet. Sowohl die mukosale Gabe ( $125 \pm 11\%$  des Ausgangs-TER,  $p < 0,001$  vs. Kontrolle,  $n=7$ ) als auch die basolaterale Gabe von Myrrhe ( $152 \pm 5\%$  des Ausgangs-TER,  $p < 0,001$  vs. Kontrolle,  $n=7$ ) verursachten einen TER-Anstieg (**Abbildung 29B**). Dabei zeigte sich, dass die Wirkung deutlicher bei einer beidseitigen Gabe auftritt ( $224 \pm 4\%$  zum Ausgangs-TER,  $p < 0,001$  vs. Kontrolle,  $n=7$ ) als bei einseitiger Applikation (apikale und basolaterale Gabe, je  $p < 0,001$  vs. beidseitige Gabe,  $n=7$ ).

Die parazelluläre Ionenpermeabilität mittels Dilutionspotential wurde anschließend gemessen, um zu überprüfen, ob der Barriereeffekt von Myrrhe parazellulär bedingt war. Das Verhältnis der Permeabilität für  $\text{Na}^+$  zu der von  $\text{Cl}^-$  nahm durch Myrrhe ab ( $4,2 \pm 1,0 P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ ,  $n=9$ ,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle  $8,8 \pm 1,3 P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ ,  $n=16$ , **Abbildung 29C**). Dabei reduzierte Myrrhe die parazelluläre Permeabilität für  $\text{Na}^+$  ( $2,1 \pm 0,16 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ,  $p < 0,001$  vs. Kontrolle  $5,0 \pm 0,4 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ,  $p < 0,001$ ),

während die parazelluläre Permeabilität für Cl<sup>-</sup> unverändert blieb ( $0,7 \pm 0,15 \cdot 10^{-6}$  cm/s, n. s. vs. Kontrolle  $0,8 \pm 0,13 \cdot 10^{-6}$  cm/s; **Abbildung 29D**).



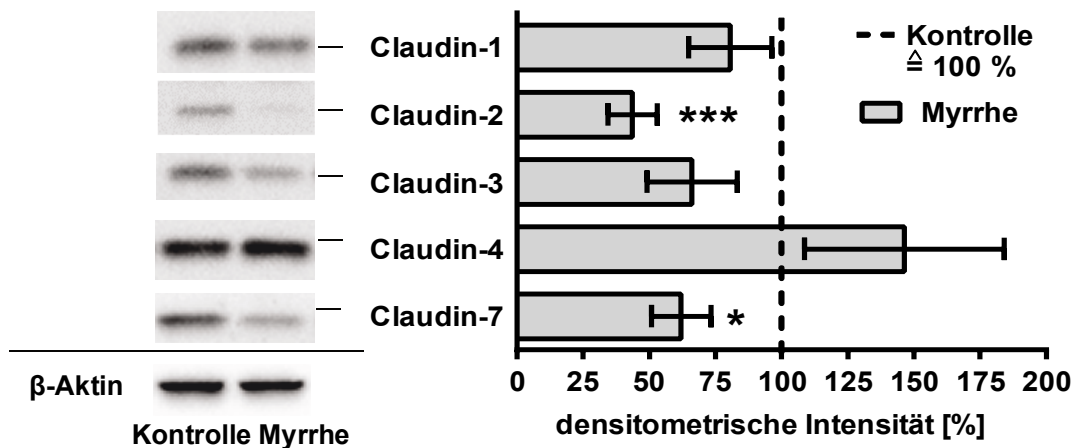
**Abbildung 29: Effekt von Myrrhe auf die Barriere von Caco-2-Monolayern.**

- (A) Nach 48 h hatte die Konzentration von 250 µg/ml Myrrhe keinen Einfluss auf den TER, während 500 und 1000 µg/ml Myrrhe den TER um mehr als Doppelte im Vergleich zum Ausgangs-TER erhöhten, n = 6-11.
- (B) 1000 µg/ml Myrrhe erhöhte den TER bei beidseitiger Gabe stärker als nur bei basolateraler oder bei apikaler Applikation, n = 7.
- (C) Myrrhe reduzierte das Verhältnis der Permeabilität von Natrium-Ionen (P<sub>Na</sub>) zu der von Chlorid-Ionen (P<sub>Cl</sub>), wobei
- (D) die absolute P<sub>Na</sub> durch Myrrhe verringert wurde, während P<sub>Cl</sub> unverändert blieb, n = 9-16.
- (A-D) Die Werte sind in Box-Whisker-Plots mit Median (mittlere horizontale Linie der Box), den mittleren 50 % der Werte (Begrenzungen der Box = IQR), und dem niedrigsten sowie höchsten Wert innerhalb des 1,5×IQR (Antenne=Whisker) dargestellt. \* Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, p < 0,05, \*\* p < 0,01 und \*\*\* p < 0,001.

4.3.1.2 Einfluss auf die Expression und Lokalisation relevanter Tight Junction-Proteine

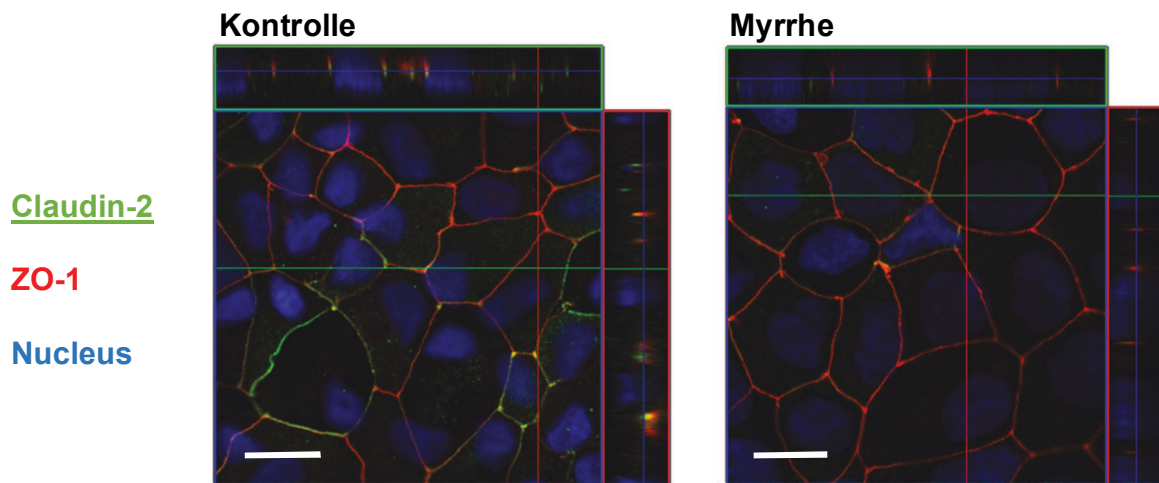
Die Dilutionspotentialmessung zeigte eine verringerte parazelluläre Na<sup>+</sup>-Permeabilität, die durch eine Änderung der Expression und/oder Lokalisation der TJ-Proteine bedingt sein könnte. Nach 48 h Inkubation mit Myrrhe zeigten Caco-2-Monolayer verglichen zur Kontrolle (auf 100 % gesetzt) eine verringerte Expression von Claudin-2 (Myrrhe 43 ± 9 %, p<0,001 vs. Kontrolle, n=8) und Claudin-7 (62 ± 11 %, p<0,05 versus Kontrolle, n=8) (siehe **Abbildung 30**). Dagegen gab es keine Expressionsveränderungen bei den TJ-Proteinen Claudin-1, -3 und -4 (siehe **Abbildung 30**).

Die Untersuchung der Lokalisation dieser Claudine mittels Färbungen der fixierten Zellmonolayer zeigte keine eindeutigen Veränderungen. Die Färbung von Claudin-2 bestätigte die reduzierte Expression durch Myrrhe in den Caco-2-Zellen (siehe **Abbildung 31**).



**Abbildung 30: Die Wirkung von Myrrhe auf die Expression der Claudine in Caco-2-Zellen.**

Links dargestellt sind repräsentative Western Blots von Claudin-1, -2, -3, -4 und -7 unter 1000 µg/ml Myrrhe verglichen mit Kontrolle nach 48 h Inkubationszeit an den Caco-2-Monolayern. Die densitometrischen Analysen der gesamten Western Blots dieser Claudine sind rechts daneben abgebildet. Alle Werte wurden mit der Ladungskontrolle β-Aktin normalisiert und sind in Prozent zu den Kontrollen (gestrichelte Linie, auf 100 % gesetzt) als MW ± SEM dargestellt mit n = 5-9. Es zeigte sich bei Claudin-2 und -7 eine reduzierte Expression durch Myrrhe (n = 8). \* Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \*p < 0,05 und \*\*\* p < 0,001.



**Abbildung 31: Effekt von Myrrhe auf die subzelluläre Verteilung von Claudin-2 in Caco-2-Zellen.** Immunofluoreszenzaufnahmen als Z-stacks (mehrschichtige Aufnahmen) von Claudin-2, die die laterale Ansicht auf die TJ ermöglichen, unter Kontrollbedingungen und mit 1000 µg/ml Myrrhe. Aufnahmen zeigen Claudin-2 (grün), den TJ-Marker ZO-1 (rot) und deren Kolokalisationen (gelb). Der Zellkern (Nucleus) wurde mit DAPI gefärbt (blau). Myrrhe reduzierte das Claudin-2-Signal. Balken = 10 µm.

#### 4.3.1.3 Wirkung auf die Ultrastruktur des Tight Junction-Netzwerkes

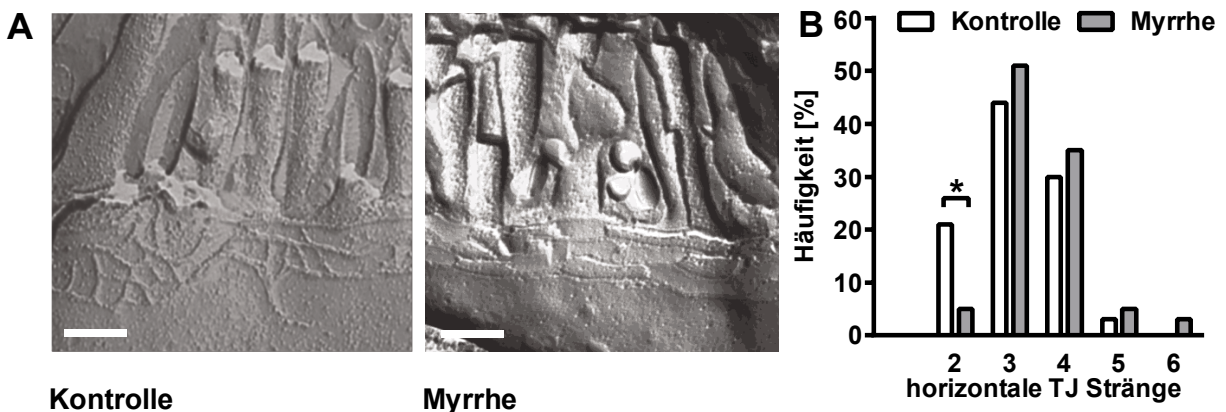
Die Untersuchungen der TJ-Ultrastruktur sollte Aufschluss über mögliche Änderungen im TJ-Netzwerk liefern. Nach 48 h Behandlung der Caco-2-Monolayer mit Myrrhe zeigte sich in der mittleren Anzahl der horizontal orientierten TJ-Stränge, TJ-Netzwerktiefe, der TJ-Dichte sowie in Anzahl der TJ-Strangbrüche zwischen Myrrhe und Kontrolle kein Unterschied (**Tabelle 6**, Beispielaufnahmen in **Abbildung 32A**).

**Tabelle 6: TJ-Morphometrie der Caco-2-Monolayer unter Myrrhe.**

	Stränge <sup>1</sup>	Tiefe (nm) <sup>2</sup>	Dichte <sup>3</sup>	Strangbrüche <sup>4</sup>	n
<b>Kontrolle</b>	3,2 ± 0,1	155 ± 10	20,7 ± 1,5	0,02 ± 0,017	61
<b>Myrrhe</b>	3,5 ± 0,1	156 ± 10	22,3 ± 1,6	0,04 ± 0,021	37

Die TJ-Morphometrie der Caco-2-Zellen wurde nach 48 h Behandlung unter Kontrollbedingungen und unter 1000 µg/ml Myrrhe ausgewertet. Die Werte sind als MW ± SEM angegeben. <sup>1</sup> Die Anzahl der horizontal orientierten TJ-Stränge. <sup>2</sup> Die Tiefe des TJ-Netzwerkes. <sup>3</sup> Die TJ-Dichte gibt die Anzahl der TJ-Stränge pro µm wieder. <sup>4</sup> Die Anzahl TJ-Strangbrüche ≥ 20 nm pro µm Stranglänge.

Die Häufigkeitsverteilung der Stranganzahl pro TJ wies hingegen weniger zweisträngige TJ unter Myrrhe (5 %) im Vergleich zur Kontrolle (20 %) auf (p<0,05 im zweiseitigen Z-Test; **Abbildung 32B**).



**Abbildung 32: Effekt von Myrrhe auf die TJ-Ultrastruktur in Caco-2-Zellen.**

(A) Dargestellt sind Beispielbilder der TJ-Ultrastruktur unter Kontrollbedingungen und unter 1000 µg/ml Myrrhe in Caco-2-Zellen nach 48 h. 51,000× Vergrößerung, Balken = 200 nm.

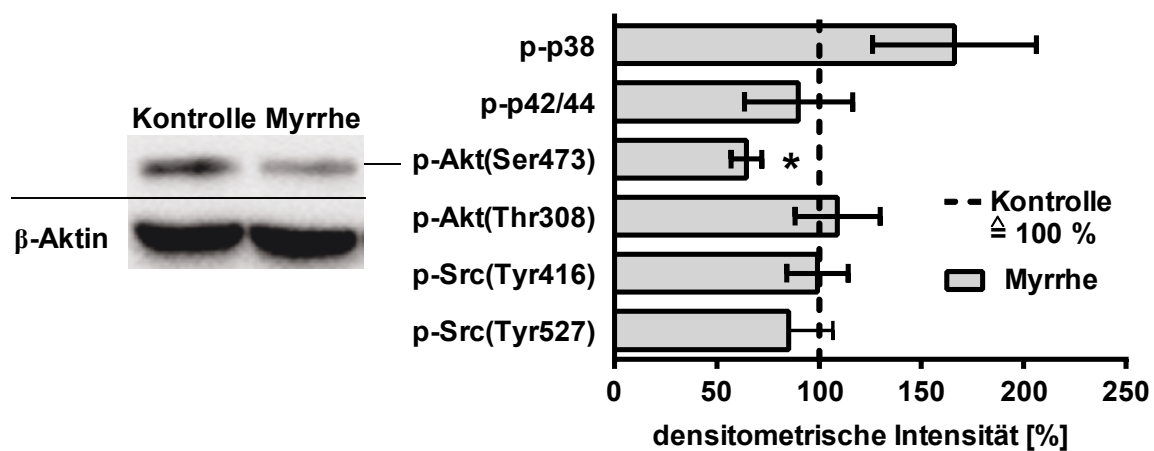
(B) Die graphische Darstellung der Häufigkeitsverteilung der horizontalen TJ-Strangzahl zeigten an Caco-2-Zellen eine Verringerung des Anteils der zweisträngigen TJs unter Myrrhe.



4.3.1.4 Einfluss auf intrazelluläre Signalwege

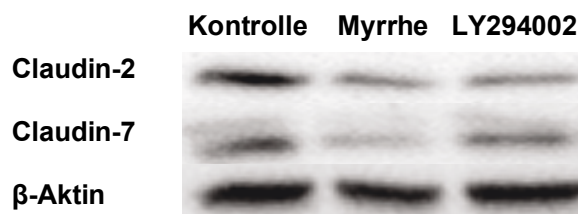
Bei der Untersuchung der involvierten Signalwege zeigte sich, dass nur der PI3K/Akt-Signalweg, genauer Akt(Ser473) durch Myrrhe gehemmt wird (**Abbildung 33**). Die Tyrosinproteinkinase Src und der MAPK-Signalweg blieben unbeeinflusst durch Myrrhe.

Die Rolle des PI3K/Akt-Weg an den Caco-2-Zellen wurde mit dem PI3K-Inhibitor Ly294002 überprüft. Nach 48 h Inkubation an den Caco-2-Monolayern wurde durch Ly294002 die Claudin-2-Expression genauso gehemmt wie durch Myrrhe. Claudin-7 wurde von Myrrhe herunterreguliert, nicht aber von LY294002 (**Abbildung 34**).



**Abbildung 33: Die Effekte von Myrrhe auf die Signalwege in Caco-2-Zellen.**

Dargestellt ist rechts ein repräsentativer Western Blot der phosphorylierten Form von Akt(Ser473) von unbehandelten und mit 1000 µg/ml Myrrhe-behandelten Caco-2-Monolayern. Rechts die densitometrische Analyse aller phosphorylierten Formen von Akt(Thr308 und Ser473), MAPK(p42/44, p38), Src(Tyr416 sowie Tyr527). Die Werte wurden mit β-Aktin normalisiert und sind in Prozent zu den Kontrollen (gestrichelte Linie, auf 100 % gesetzt) als MW±SEM dargestellt mit n=6-7. Die Phosphorylierung von Akt(Ser473) wurde durch Myrrhe verringert, n = 7. \* Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \* p < 0,05.



**Abbildung 34: Einfluss des PI3K/Akt-Inhibitors LY294002 auf die TJ-Proteinexpression.**

Repräsentative Western Blots von Claudin-2, -7 und β-Aktin aus Caco-2-Monolayern unter dem Einfluss von 1000 µg/ml Myrrhe und dem PI3K-Inhibitor LY294002 (10 µM). Der Inhibitor senkte wie Myrrhe die Claudin-2-Expression im Vergleich zur Kontrolle, aber nicht die von Claudin-7.

### 4.3.2 Wirkung der Myrrhe in HT-29/B6-Kolonzellen

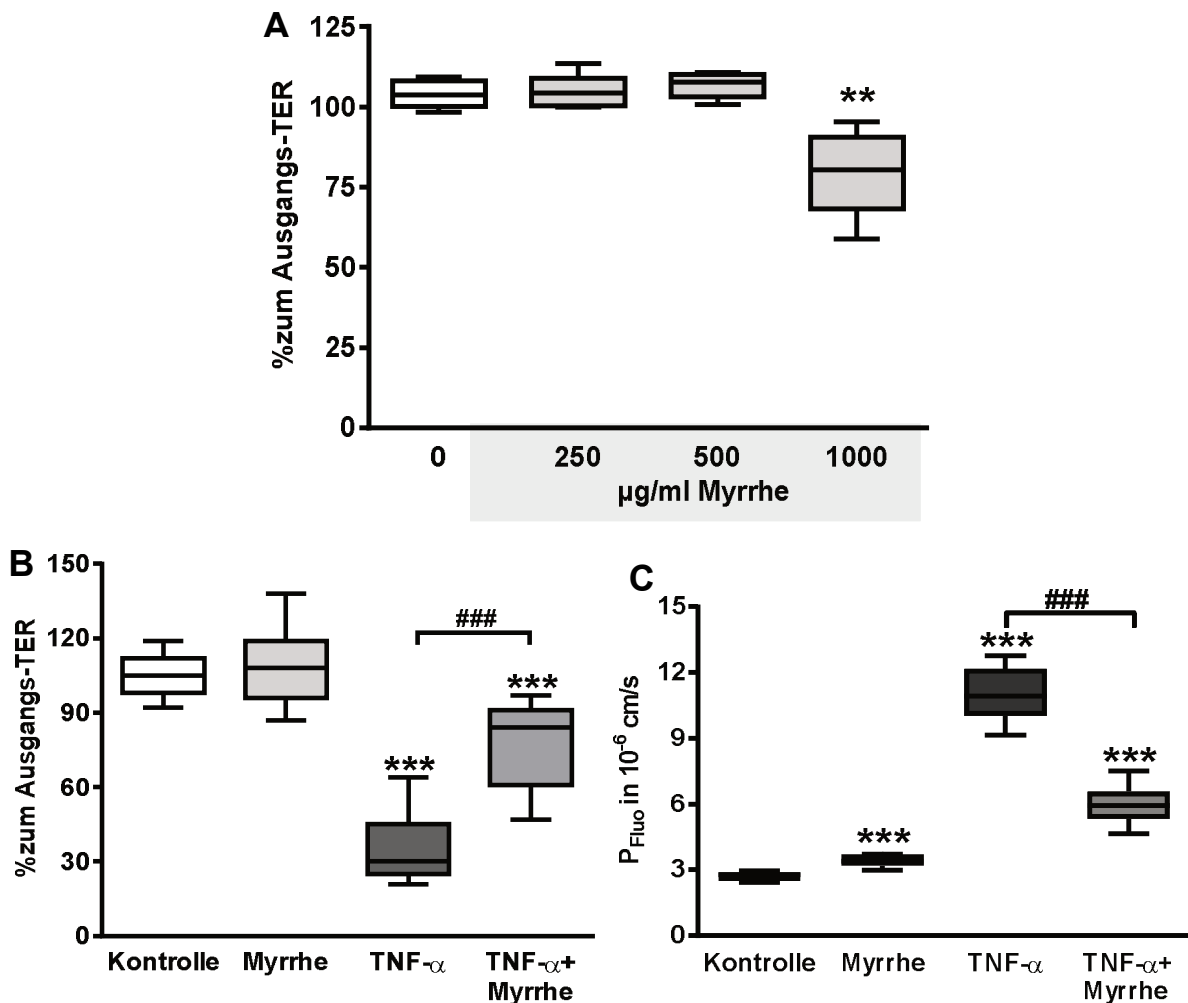
Zur Überprüfung einer möglichen antiinflammatorischen Wirkung bzw. eines präventiven Effektes bei einer entzündungsbedingten Barrierefunktion, wurde das HT-29/B6-Zellmodell herangezogen.

#### 4.3.2.1 Wirkung auf die TNF- $\alpha$ -induzierte Barrierefunktion

In einer Konzentrationsreihe an den HT-29/B6-Monolayern wurde nach 24 h überprüft, welche Konzentrationen verträglich sind. Die Konzentrationen 250  $\mu\text{g/ml}$  ( $105 \pm 2\%$  zum Ausgangs-TER,  $n=6$ ) und 500  $\mu\text{g/ml}$  Myrrhe ( $107 \pm 5\%$  zum Ausgangs-TER,  $n=6$ ) änderten nichts am TER im Vergleich zur Kontrolle ( $104 \pm 1\%$  zum Ausgangs-TER,  $n=8$ ). Erst eine Dosis von 1000  $\mu\text{g/ml}$  Myrrhe senkte den TER nach 24 h an den HT-29/B6-Zellen (1000  $\mu\text{g/ml}$  Myrrhe  $79 \pm 4\%$ , vs.  $p < 0,01$  Kontrolle,  $n=8$ ) (siehe **Abbildung 35A**).

In der Dosis von 500 U/ml verursachte TNF- $\alpha$  an den HT-29/B6-Monolayern einen deutlichen TER-Abfall auf  $36 \pm 4\%$  ( $p < 0,001$  vs. Kontrolle  $105 \pm 2\%$  des Ausgangs-TER,  $n=15$ ). Allein die Myrrhekonzentration von 500  $\mu\text{g/ml}$  konnte diesen Abfall deutlich abschwächen und stabilisierte den TER auf  $76 \pm 5\%$  (vs. TNF- $\alpha$ ,  $p < 0,001$ , **Abbildung 35B**). Die Zugabe von Myrrhe beidseitig war dabei effektiver als die einseitige Gabe (basolateral oder apikal), die aber ebenso inhibitorisch auf den TNF- $\alpha$ -Effekt wirkten (basolateral  $64 \pm 7\%$  des Ausgangs-TER,  $p < 0,05$  vs. TNF- $\alpha$ ; und apikal  $52 \pm 5\%$ ,  $p < 0,001$  vs. TNF- $\alpha$ ,  $n=6$ ).

Der durch TNF- $\alpha$  induzierte Permeabilitätsanstieg des parazellulären Markers Fluoreszein (Fluo, 332 Da) (TNF- $\alpha$   $11,0 \pm 0,47 P_{\text{Fluo}} \cdot 10^{-6}$ ,  $p < 0,001$  vs. Kontrolle  $2,7 \pm 0,09 P_{\text{Fluo}} \cdot 10^{-6}$ ,  $n=6$ ) konnte durch Myrrhe teilweise gehemmt werden (Myrrhe+TNF- $\alpha$   $6,0 \pm 0,35 P_{\text{Fluo}} \cdot 10^{-6}$ ,  $p < 0,001$  vs. TNF- $\alpha$ ,  $n=6$ , **Abbildung 35C**).



**Abbildung 35: Der Effekt von Myrrhe auf die Barrierefunktion der HT-29/B6-Zelllinie.**

Der TER wurde nach 24 h Inkubation zur Überprüfung der Barrierefunktion gemessen und ist in Prozent zum Ausgangs-TER dargestellt, **(A)** unter Kontrollbedingungen, 250 µg/ml, 500 µg/ml und 1000 µg/ml Myrrhe, sowie **(B)** unter Kontrollbedingungen, Myrrhe (500 µg/ml), TNF- $\alpha$  (500 U/ml) und Myrrhe+TNF- $\alpha$ . **(C)** Die Permeabilität für Fluoreszein (in 10<sup>-6</sup> cm/s) wurde ebenso nach 24 h Inkubation unter den gleichen Behandlungskonditionen der Zellen wie bei **(B)** gemessen.

**(A)** Im Vergleich zur Kontrolle ( $n = 8$ ) hatten die Konzentrationen 250 und 500 µg/ml Myrrhe (beide  $n = 6$ ) keinen Effekt auf den TER, wohingegen die höchste Konzentration von 1000 µg/ml ( $n = 8$ ) zu einem TER-Abfall führte.

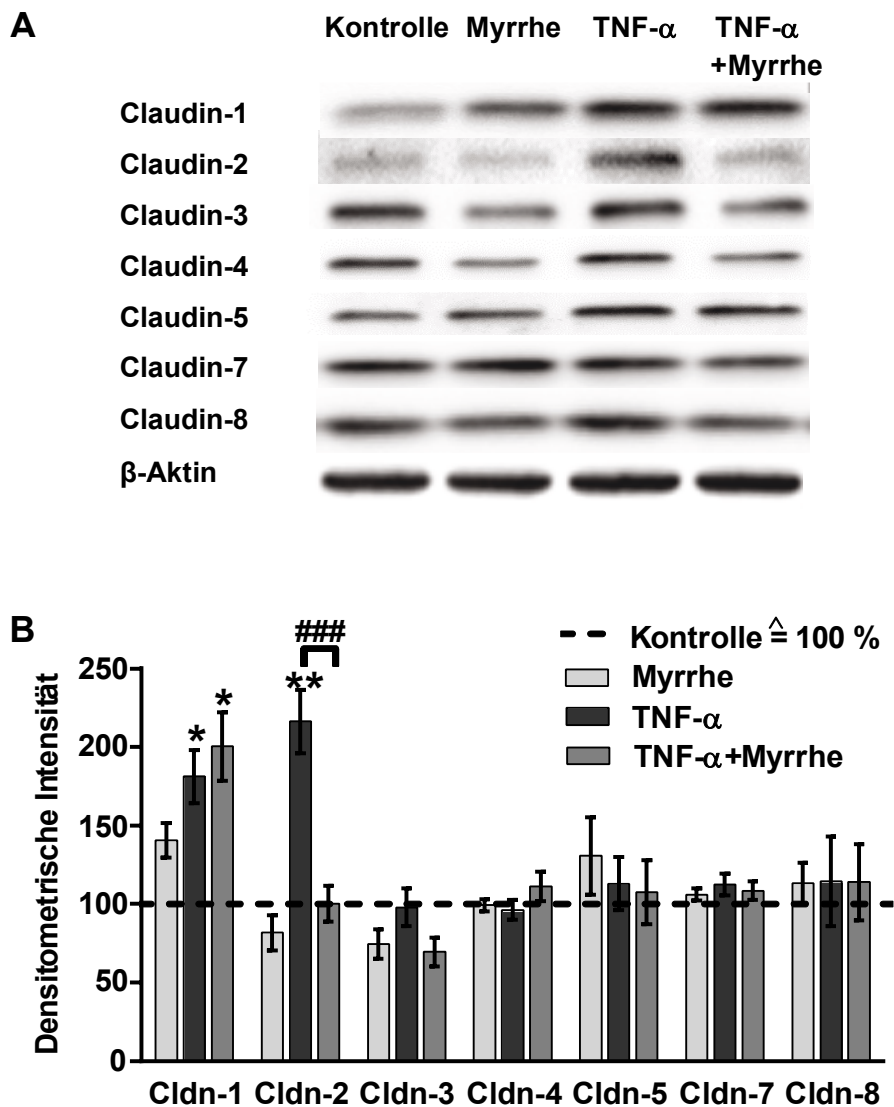
**(B)** Der TER-Abfall durch TNF- $\alpha$  wurde durch die Vorinkubation von Myrrhe deutlich inhibiert ( $n=15$ ), ebenso wie die

**(C)** Vorinkubation mit Myrrhe teils den TNF- $\alpha$ -induzierten  $P_{Fluo}$ -Anstieg hemmte.

**(A-C)** Die Werte sind in Box-Whisker-Plots mit Median (mittlere horizontale Linie der Box), den mittleren 50 % der Werte (Begrenzungen der Box = IQR), und dem niedrigsten sowie höchsten Wert innerhalb des 1,5×IQR (Antenne = Whisker) dargestellt. \* Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . # Signifikant unterschiedlich zu TNF- $\alpha$ , ###  $p < 0,001$ . Fluo, Fluoreszein.

#### 4.3.2.2 Einfluss auf die Proteinexpression Barriere-relevanter Claudine

Der im TER gemessene inhibitorische Effekt von Myrrhe und vor allem die Hemmung des Permeabilitätsanstiegs für Fluoreszein durch TNF- $\alpha$  deuten auf Veränderungen der parazellulären Barriere hin. Daher wurden die für die Barriere relevanten Claudine in der Zelllinie HT-29/B6 in ihrer Expression mittels Western Blot untersucht (siehe **Abbildung 36**). Die wichtigsten Claudine der HT-29/B6-Zellen sind Claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7 und -8. Sowohl die Expression von Claudin-1 (TNF- $\alpha$   $181 \pm 17$  %,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle  $\triangleq 100$  %,  $n=5$ ) als auch die von Claudin-2 waren durch TNF- $\alpha$  erhöht (TNF- $\alpha$   $216 \pm 20$  %,  $p < 0,01$  vs. Kontrolle  $\triangleq 100$  %,  $n=9$ ), während die anderen Claudine durch TNF- $\alpha$  unverändert blieben. Myrrhe allein änderte nichts an der Expression der untersuchten Claudine, konnte jedoch in Vorinkubation zu TNF- $\alpha$  den Claudin-2-Expressionsanstieg durch TNF- $\alpha$  hemmen (TNF- $\alpha$ +Myrrhe  $100 \pm 11$  %,  $p < 0,001$  vs. TNF- $\alpha$   $216 \pm 20$  %,  $n=9$ ).



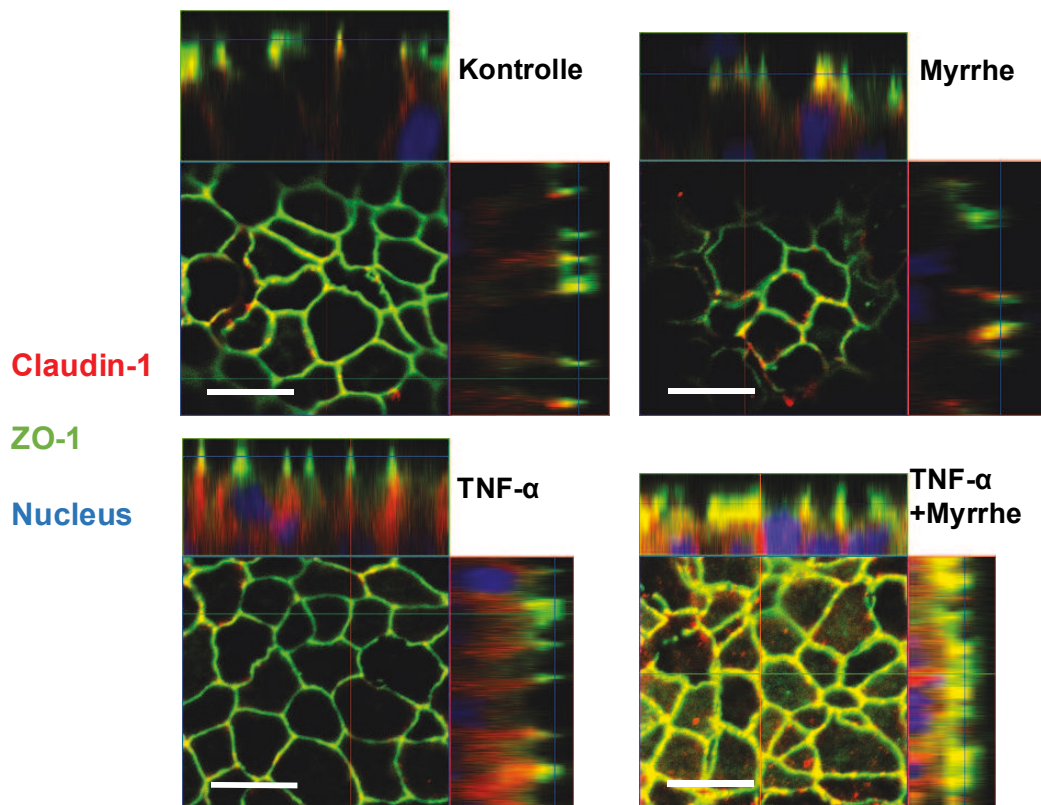
**Abbildung 36: Die Wirkung von Myrrhe und TNF- $\alpha$  auf die Expression von Claudinen in HT-29/B6-Zellen.**

(A) Dargestellt sind repräsentative Western Blots von Claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7 und -8 unter Kontrollbedingungen, Myrrhe (500  $\mu$ g/ml), TNF- $\alpha$  (500 U/ml) und TNF- $\alpha$ +Myrrhe in HT-29/B6-Monolayern.

(B) Alle Werte der densitometrischen Analysen der gesamten Western Blots von Claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7 und -8 wurden mit der Ladungskontrolle  $\beta$ -Aktin normalisiert und sind in Prozent zu den Kontrollen (gestrichelte Linie, auf 100 % gesetzt) als MW  $\pm$  SEM dargestellt mit n = 5-9. Dabei wurde die Expression von Cldn-1 durch TNF- $\alpha$  aktiviert und blieb in Vorinkubation mit Myrrhe unverändert, während die durch TNF- $\alpha$  induzierte Cldn-2-Expressionserhöhung durch Myrrhe inhibiert wurde. \* Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \* p < 0,05 und \*\* p < 0,01. # Signifikant unterschiedlich zu TNF- $\alpha$ , ### p < 0,001.

#### 4.3.2.3 Wirkung von Myrrhe die auf Lokalisation von Claudin-1

Die Lokalisation der Claudine wurde ebenfalls überprüft (siehe **Abbildung 37**). Jedoch war nur bei Claudin-1 eine Umverteilung deutlich durch TNF- $\alpha$  aus dem TJ-Areal in subapikale Bereiche erkennbar. Unter alleiniger Myrrhezugabe gab es keinen Unterschied zur Kontrolle. Dagegen konnte Myrrhe in Vorinkubation zu TNF- $\alpha$  die Umverteilung des TJ-Proteins Claudin-1 basalwärts verhindern und Claudin-1 in der TJ halten. Da Claudin-1 unter TNF- $\alpha$  und Myrrhe zudem verstärkt exprimiert wurde, zeigte sich eine vermehrte Kolokalisation mit dem TJ-Marker ZO-1.



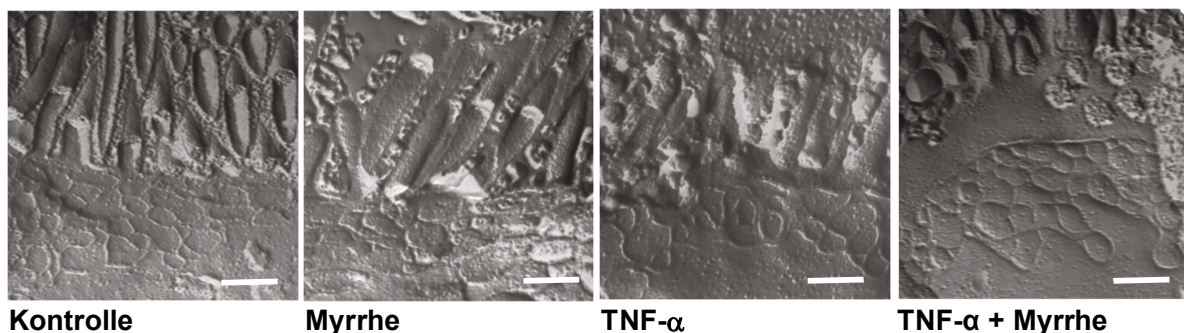
**Abbildung 37: Effekte von Myrrhe und TNF- $\alpha$  auf die subzelluläre Verteilung des TJ-Proteins Claudin-1 in HT-29/B6-Zellen.**

Immunofluoreszenzaufnahmen als Z-stacks (mehrschichtige Aufnahmen), die die laterale Ansicht auf die TJ ermöglichen, der behandelten Zellmonolayer unter verschiedenen Bedingungen: Kontrolle, Myrrhe (500  $\mu$ g/ml), TNF- $\alpha$  (500 U/ml) und TNF- $\alpha$ +Myrrhe. Gefärbt wurde Claudin-1 (rot), TJ-Marker ZO-1 (grün), die in der Kolokalisation gelb erscheinen, und die Zellkerne mit DAPI (blau). TNF- $\alpha$  induzierte eine Umverteilung von Claudin-1 aus dem TJ-Kompartiment hin zur basolateralen Membran ins zytosolische Kompartiment, so dass unter TNF- $\alpha$  kaum Claudin-1 mit ZO-1 kolokalisierte. Unter Vorinkubation mit Myrrhe wurde dies blockiert und Claudin-1 kolokalisiert vermehrt mit ZO-1. Balken = 10  $\mu$ m.



#### 4.3.2.4 Einfluss auf die Ultrastruktur der Tight Junction

Um den Einfluss von Myrrhe auf die durch TNF- $\alpha$  veränderte TJ-Ultrastruktur zu untersuchen, wurden Analysen zur Ultrastruktur mittels Gefrierbruch an den HT-29/B6-Monolayern durchgeführt. Die elektronenmikroskopischen Beispielaufnahmen von allen vier Inkubationsgruppen sind in **Abbildung 38** dargestellt. Die morphometrische Analyse der Aufnahmen zeigte, dass Myrrhe die Verringerung der durchschnittlichen horizontalen Strangzahl durch TNF- $\alpha$  (vs. Kontrolle,  $p < 0,05$ ) vollständig inhibierte (TNF- $\alpha$ +Myrrhe vs. TNF- $\alpha$ ,  $p < 0,01$ , siehe **Tabelle 7**). Dagegen gab es in der TJ-Strangtiefe, der TJ-Dichte und den TJ-Strangbrüchen zwischen allen Konditionen keinen Unterschied.



**Abbildung 38: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der TJ-Ultrastruktur.**

Dargestellt sind die HT-29/B6-Zellen unter Kontrollbedingungen, Myrrhe (500  $\mu\text{g/ml}$ ), TNF- $\alpha$  (500 U/ml) und der Kombination von TNF- $\alpha$  und Myrrhe. Unter TNF- $\alpha$  gab es eine Strangzahlreduktion im Vergleich zur Kontrolle. Myrrhe konnte diese Verringerung verhindern und zeigte die gleiche Anzahl an horizontal orientierten Stränge wie die Kontrolle. Balken=200 nm.

**Tabelle 7: TJ-Morphometrie der HT-29/B6-Monolayer unter Myrrhe und TNF- $\alpha$ .**

	Stränge <sup>1</sup>	Tiefe (nm) <sup>2</sup>	Dichte <sup>3</sup>	Strangbrüche <sup>4</sup>	n
<b>Kontrolle</b>	3,9 $\pm$ 0,3	261 $\pm$ 25	15,0 $\pm$ 1,8	0,07 $\pm$ 0,04	21
<b>Myrrhe</b>	3,6 $\pm$ 0,2	258 $\pm$ 33	14,1 $\pm$ 2,0	0,06 $\pm$ 0,04	23
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	3,1 $\pm$ 0,2*	225 $\pm$ 18	13,4 $\pm$ 1,3	0,12 $\pm$ 0,06	22
<b>TNF-<math>\alpha</math>+Myrrhe</b>	4,0 $\pm$ 0,3##	292 $\pm$ 27	13,7 $\pm$ 1,5	0,07 $\pm$ 0,03	22

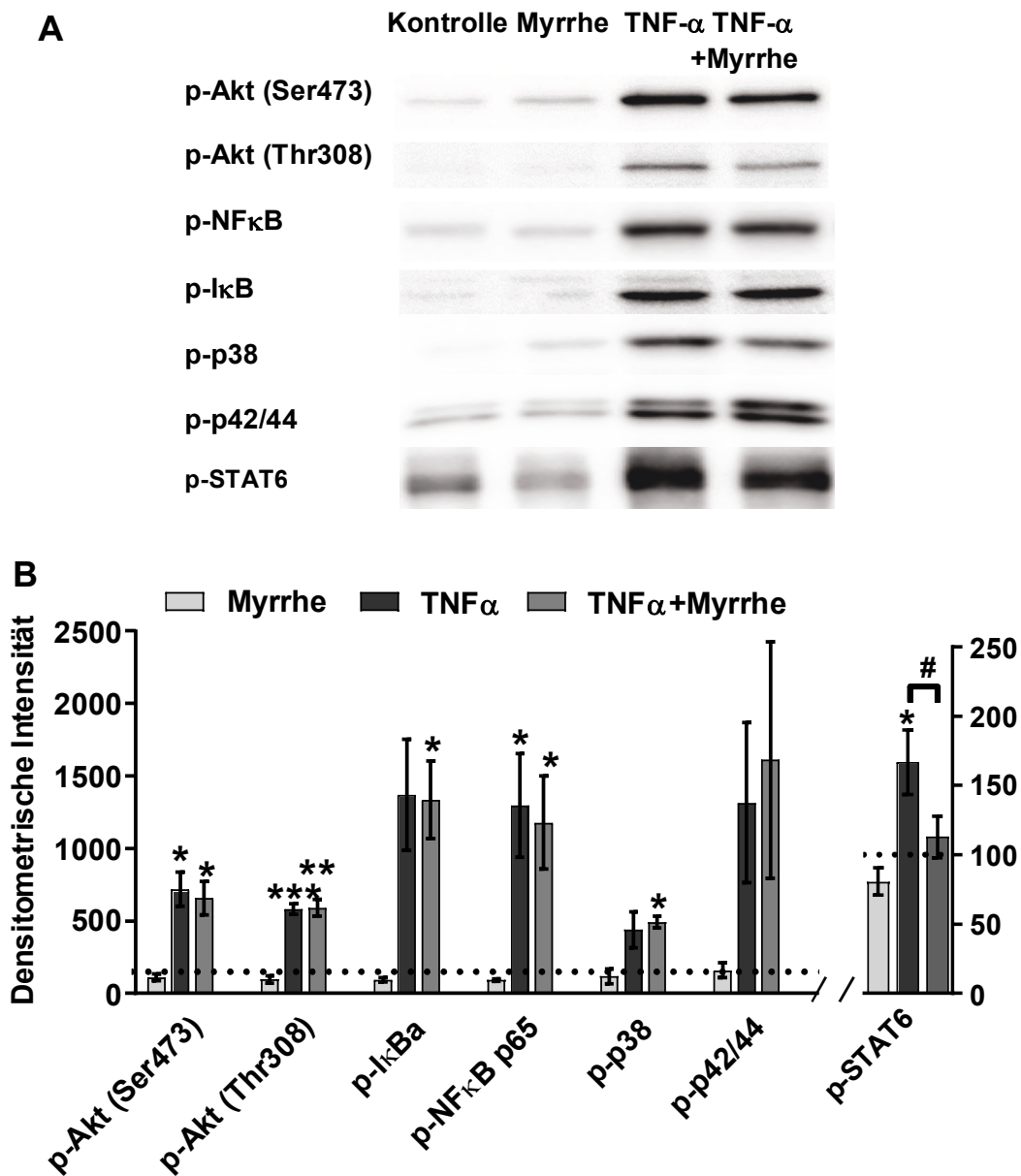
Die TJ-Morphometrie der HT-29/B6-Zellen ist nach 24 h Behandlung unter Kontrollbedingungen, 500  $\mu\text{g/ml}$  Myrrhe, 500 U/ml TNF- $\alpha$  und TNF- $\alpha$ +Myrrhe ausgewertet worden. Die Werte sind als MW  $\pm$  SEM angegeben. <sup>1</sup> Die Anzahl der horizontal orientierten TJ-Stränge. <sup>2</sup> Die Tiefe des TJ-Netzwerkes. <sup>3</sup> Die TJ-Dichte gibt die Anzahl der TJ-Stränge pro  $\mu\text{m}$  wieder. <sup>4</sup> Die Anzahl TJ-Strangbrüche  $\geq 20$  nm pro  $\mu\text{m}$  Stranglänge. \* Signifikant zur Kontrolle, \*  $p < 0,05$ . # Signifikant zu TNF- $\alpha$ , ##  $p < 0,01$ .

#### 4.3.2.5 Einfluss auf intrazelluläre Signalwege

In weiteren Untersuchungen erfolgte die Analyse der möglichen involvierten zellulären Signalwege, die bei dem Barriere-protectiven Effekt von Myrrhe an den HT-29/B6-Zellen eine Rolle spielen könnten. Von früheren Experimenten mit TNF- $\alpha$  und den Pflanzeninhaltsstoffen Berberin (Amasheh et al. 2010) und 6-SG ist bekannt, dass TNF- $\alpha$  mehrere Signalwege aktiviert, und dass vor allem die Aktivierung der NF $\kappa$ B- und der PI3K-Signalwege bei der Barrieredysfunktion durch TNF- $\alpha$  entscheidend ist. Myrrhe konnte die Phosphorylierung durch TNF- $\alpha$  weder von Akt (Akt Tyr<sup>308</sup> und Akt Ser<sup>473</sup>) noch von NF $\kappa$ B p65 und I $\kappa$ B $\alpha$  hemmen. Die MAPK p38 und p42/44 (Erk1/2) zeigten ebenfalls keine Unterschiede zwischen TNF- $\alpha$  und Myrrhe in Kombination mit TNF- $\alpha$  (siehe **Abbildung 39**). In anderen Studien wurde bisher gezeigt, dass in den HT-29/B6-Zellen die Claudin-2-Regulation durch TNF- $\alpha$  PI3K/Akt-vermittelt war (Luettig et al. 2016; Mankertz et al. 2009). Myrrhe konnte diesen Signalweg trotz Claudin-2-Regulation jedoch nicht beeinflussen. In anderen Studien an intestinalen Zellen (T84, HT-29) wurde eine Kausalität zwischen Claudin-2 und den Transkriptionsfaktoren STAT6 (Signal Transducers and Activators of Transcription 6) festgestellt (Rosen et al. 2013; Rosen et al. 2011). Daher wurde der STAT6-Signalweg untersucht. Es zeigte sich in den HT-29/B6-Zellen durch TNF- $\alpha$  eine Aktivierung (TNF- $\alpha$  210  $\pm$  30 %, p < 0,05 vs. Kontrolle, auf 100 % gesetzt, n = 9) sowie in Vorinkubation mit Myrrhe eine komplette Hemmung dieser Aktivierung (Myrrhe+TNF- $\alpha$  114  $\pm$  37 %, p < 0,05 vs. TNF- $\alpha$ , n = 8-9).

Zusätzlich zeigte sich in der Analyse der Claudin-2-Expression, dass der durch TNF- $\alpha$  bedingte Anstieg (TNF- $\alpha$  226  $\pm$  28 %, p < 0,001 vs. Kontrolle, auf 100 % gesetzt, n = 7) im gleichen Maße durch den STAT6-Inhibitor SAHA blockiert wurde (SAHA+TNF- $\alpha$  81  $\pm$  16 %, p < 0,01 vs. TNF- $\alpha$ , n = 7) wie durch Myrrhe (Myrrhe+TNF- $\alpha$  100  $\pm$  24 %, p < 0,05 vs. TNF- $\alpha$ , n = 7). Allein hatten SAHA (91  $\pm$  24 %, n. s vs. Kontrolle, n = 4) wie auch Myrrhe (n = 6; 83  $\pm$  15 % vs. Kontrolle, n. s.) keinen Effekt auf die Claudin-2-Expression (**Abbildung 40**).

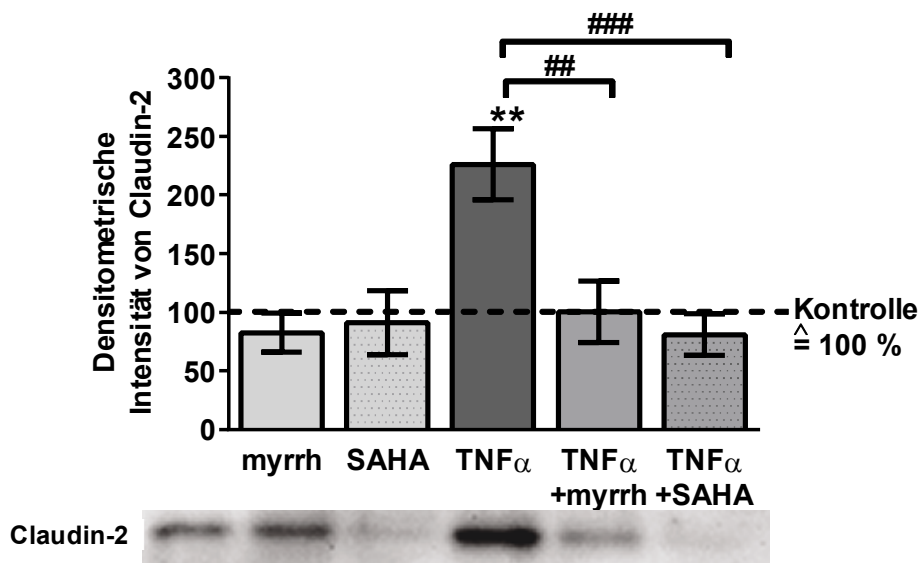




**Abbildung 39: Die Effekte von Myrrhe und TNF- $\alpha$  auf die Signalwege in HT-29/B6-Zellen.**

(A) Dargestellt sind repräsentative Western Blots der phosphorylierten Form von NF $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , Akt, MAPK und STAT6 in unbehandelten sowie mit 500  $\mu$ g/ml Myrrhe-, 500 U/ml TNF- $\alpha$ - oder Myrrhe mit TNF- $\alpha$ -behandelten HT-29/B6-Monolayern nach 20 min Inkubation.

(B) Die Werte der densitometrischen Analyse der phosphorylierten Formen von Akt(Ser473 sowie Thr308), I $\kappa$ B $\alpha$ , NF $\kappa$ B p65, MAPK(p42/44, p38) und STAT6 der in (A) erwähnten Konditionen sind mit  $\beta$ -Aktin normalisiert und in Prozent zu den Kontrollen (gestrichelte Linie, auf 100 % gesetzt) als MW  $\pm$  SEM dargestellt mit n = 4 - 9. Die Ergebnisse zeigten eine gesteigerte Phosphorylierung von Akt(Ser473), Akt(Thr308), NF $\kappa$ B p65 und STAT6. Die Vorinkubation mit Myrrhe hemmte die TNF- $\alpha$ -induzierte Phosphorylierung von STAT6, nicht aber die Aktivierung von Akt(Ser473 sowie Thr308) und NF $\kappa$ Bp65. \* Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001. # Signifikant unterschiedlich zu TNF- $\alpha$ , # p < 0,05.



**Abbildung 40: Einfluss des STAT6-Signalweges auf die Claudin-2-Expression in HT-29/B6-Zellen.**

Dargestellt (unten) ist ein repräsentativer Western Blot von Claudin-2 unter Kontrollbedingungen, STAT6-Inhibitor SAHA (10  $\mu$ M), TNF- $\alpha$  (500 U/ml), Myrrhe (500  $\mu$ g/ml)+TNF- $\alpha$  sowie SAHA+TNF- $\alpha$  nach 24 h Inkubation auf HT-29/B6-Monolayern. Die densitometrische Analyse der gesamten Western Blots zeigt die Claudin-2-Signale normalisiert mit  $\beta$ -Aktin in Prozent zu den Kontrollen (gestrichelte Linie, auf 100 % gesetzt) als  $MW \pm SEM$ ,  $n = 4-7$ . Die durch TNF- $\alpha$ -induzierte Claudin-2-Expression wurde durch Vorinkubation mit dem STAT6-Inhibitor SAHA verhindert, ebenso wie mit Myrrhe ( $n = 7$ ). \* Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, \*\*  $p < 0,01$ . # Signifikant unterschiedlich zu TNF- $\alpha$ , #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ .

## 5 DISKUSSION

Die intestinale epitheliale Barriere des Darmes grenzt das Darmlumen vom Körperinneren ab. Dabei ist insbesondere die epitheliale TJ für die Abdichtung des lateralen interzellulären Spalts und die Regulation der Barrierefunktion von entscheidender Bedeutung. Die Barriereintegrität kann auf verschiedenen Wegen, z.B. durch Bakterien, Zytokine oder Stoffwechselendprodukte beeinflusst werden. Auf dem Gebiet der Barrieredysfunktion durch proinflammatorische Zytokine, die vermehrt bei chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (CED) ausgeschüttet werden, konnten in den vergangenen Jahren neue Erkenntnisse gewonnen und die zugrundeliegenden Mechanismen entschlüsselt werden. Substanzen, die in diese Mechanismen eingreifen, könnten somit in die Therapie dieser Erkrankungen einbezogen werden. Diese Arbeit beschreibt die Wirkungsmechanismen von zwei sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und einem Pflanzenharz, die für eine therapeutische Intervention in Betracht gezogen werden könnten.

### 5.1 Relevanz bioaktiver Pflanzeninhaltsstoffe bei der Behandlung von entzündlichen Erkrankungen

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Pflanzeninhaltsstoffe, Ingwerkomponente 6-SG, das Polyphenol Ellagsäure und das Pflanzenharz Myrrhe wurden zuvor schon in anderen Systemen auf eine antiinflammatorische Wirkung hin untersucht. So senkte 6-SG u. a. die Produktion von Prostaglandin E2 (PGE2), proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , und die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) in Neuroinflammationen (Ha et al. 2012). Zudem wurde in LPS-stimulierten murinen Makrophagen die gesteigerte Genexpression der iNOS- und COX-2-Gene via PI3K/Akt, MAPK Erk1/2 und NF $\kappa$ B von 6-SG gehemmt (Pan et al. 2008). Auch Ellagsäure war in der Lage bei experimenteller Colitis bei Ratten die Aktivierung von MAPKs und NF $\kappa$ B sowie die erhöhte Expression von COX-2 und iNOS zu hemmen (Rosillo et al. 2012). Myrrhe bzw. einer seiner bioaktiven Inhaltsstoffe, das Steroid Guggulsteron [4,17(20)-Pregnadiene-3,16-dion], zeigte ebenso antiinflammatorische Wirkungen in Immunzellen über die Regulation von TNF- $\alpha$ , PGE2, Interleukinen, MAPKs und NF $\kappa$ B (Cheon et al. 2006; Manjula et al. 2006; Mencarelli et al. 2009).

Bei CED könnten diese bioaktiven Pflanzenstoffe die durch die Entzündung induzierte intestinale Barriestörung, die zur Diarrhoe führt, präventiv vermeiden oder therapeutisch lindern. Ein leckes Epithel führt überdies zum Verlust der Abwehr gegenüber im Lumen vorkommenden Antigenen und Pathogenen, die beim Eindringen zu einer inflammatorischen Immunantwort führen würden. Diese Arbeit an Zellkulturmodellen zeigt, dass alle drei Pflanzeninhaltsstoffe protektives Potential

aufweisen, wodurch neben Diarrhoe auch das Eindringen unerwünschter Antigene und somit entzündliche Immunantworten vermieden werden könnten.

In den letzten Jahrzehnten wuchs das Interesse und die Nachfrage nach pflanzlichen Arzneimitteln aus der traditionellen Pflanzenheilkunde (Kuipers 1997). Es wurden schon viele Pflanzenextrakte bzw. bioaktive Pflanzeninhaltsstoffe auf ihre antiinflammatorischen Eigenschaften zur Abschwächung oder Vermeidung von entzündlichen Erkrankungen hin analysiert. Ein Vorteil der Phytotherapie ist, dass es sich bei den häufig eingesetzten Pflanzenextrakten um Vielstoffgemische handelt. Dadurch bieten sie ein breites Wirkspektrum und zählen somit zu den Multi-Target-Therapeutika (Efferth and Koch 2011). Das Myrrhinil-Intest<sup>®</sup> Kombipräparat weist neben seiner antiinflammatorischen Wirkung auch antibakterielle, wundheilungsfördernde, pilzhemmende und krampflösende Eigenschaften auf (Repha). Phytopharmaka sind zudem oft besser verträglich und günstiger als chemisch synthetisch hergestellte Arzneimittel, welche zum Teil mit schwerwiegenden Nebenwirkungen einhergehen (Calixto 2000). Auch die Akzeptanz und Therapietreue der Patienten ist bei pflanzlichen Monopräparaten oder Kombipräparaten aus verschiedenen Pflanzen höher als bei chemisch-synthetischen Präparaten (Kopp 2015). Um auf den heutigen Markt als Phytopharmaka zugelassen zu werden wird die Wirkung in doppelblinden, randomisierten und kontrollierten klinischen Studien wissenschaftlich untersucht (Keller et al. 2003). In Kombination mit Kamille und Kaffeekohle ist das Kombipräparat Myrrhinil-Intest<sup>®</sup> seit über 50 Jahren im Einsatz (Repha). In den letzten Jahren wurden klinische Studien zum Nachweis der Wirkung durchgeführt (Langhorst et al. 2013; Albrecht et al. 2014). Neben den klinischen Belegen ist ebenso eine mechanistische Aufklärung der Pflanzenwirkung erforderlich.

## **5.2 Wirkung der pflanzlichen Substanzen 6-Shogaol, Ellagsäure und Myrrhe in Caco-2- und HT-29/B6-Zellen**

Um die Wirkung mechanistisch aufzuklären werden u.a. Zellkulturmodelle eingesetzt. In dieser Arbeit wurde der protektive Wirkmechanismus der Pflanzenstoffe auf die Barrierefunktion, vor allem der parazellulären Barriere, an etablierten intestinalen Epithelzellmodellen untersucht. Die aus dem humanen Kolonkarzinom stammende Caco-2-Zellen bilden als Monolayer ein funktionelles Modell für das Dünndarmepithel (Hidalgo et al. 1989). Die HT-29/B6-Zellen, ebenfalls eine humane Kolonkarzinomzelllinie, weisen in differenzierten und polarisierten Monolayern typische Eigenschaften des Kolonepithels auf (Kreusel et al. 1991).

6-SG schützte sowohl an den Caco-2- also auch an HT-29/B6-Monolayern partiell vor der TNF- $\alpha$ -induzierten Barrierefunktionsstörung. Auch Myrrhe konnte den TNF- $\alpha$ -induzierten TER-Abfall in den

HT-29/B6-Zellen deutlich abschwächen, wohingegen Ellagsäure keine Hemmung zeigte. In Caco-2-Zellen führten Ellagsäure und Myrrhe im Gegensatz zu 6-SG bei alleiniger Gabe zu einem TER-Anstieg, der möglicherweise vor einer TNF- $\alpha$ -bedingten Barrierestörung schützen könnte. Bei Ellagsäure zeigte sich, dass keine direkte Hemmung gegen die TNF- $\alpha$ -induzierte Barrierestörung besteht. Der TER-Wert war bei Ellagsäure in Kombination mit TNF- $\alpha$  zwar höher als der TER-Wert bei TNF- $\alpha$  alleine. Das ist jedoch darauf zurückzuführen, dass Ellagsäure auch ohne TNF- $\alpha$  einen TER-Anstieg induziert.

Die molekularen Veränderungen und Mechanismen, die zu den Barriereeffekten führten, unterscheiden sich zwischen den untersuchten Pflanzenstoffen 6-SG, Ellagsäure und Myrrhe. Der durch Myrrhe induzierte TER-Anstieg in den Caco-2-Zellen war charakterisiert durch eine verminderte Permeabilität für Na<sup>+</sup> aufgrund einer verringerten Expression des Kationenkanals Claudin-2. Zusätzlich wurde die Hemmung des PI3K/Akt-Signalweges mit der Expressionsminderung von Claudin-2 assoziiert. Denn auch der PI3K-Inhibitor Ly294002 führte zur Expressionsminderung von Claudin-2 in Caco-2-Zellen. Claudin-7 wurde ebenso durch Myrrhe herabreguliert und scheint PI3K-abhängig zu sein. Auch Ellagsäure reduzierte Claudin-7, und zusätzlich Claudin-4 sowie die Phosphorylierung an Akt Thr308. Ellagsäure reduzierte zudem die Permeabilität für Fluoreszein und Na<sup>+</sup>. Dennoch waren die parazellulären Kationenkanäle Claudin-2 und Claudin-15 unter Ellagsäure nicht in ihrer Expression verändert, wobei Claudin-15 nur auf RNA-Ebene überprüft werden konnte, da der Antikörper für Western Blot Analysen ungeeignet war. Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigten in den Ellagsäure-behandelten Caco-2-Zellen ein schwächeres Claudin-15-Signal. Es könnte durch Ellagsäure eine post-transkriptionelle oder post-translationale Regulation der Expression von Claudin-15 stattfinden. Immunfluoreszenzfärbungen zum abdichtenden TJ-Protein Claudin-1 zeigten unter Ellagsäure ein erhöhtes Signal in der trizellulären TJ, während die Proteinmenge im Western Blot Analysen gleich blieb. Als Barriere-abdichtendes TJ Protein kann die Claudin-1-Umverteilung zum Barriere-stärkenden Effekt der Ellagsäure an den Caco-2-Zellen beitragen.

Verglichen zu den Caco-2-Zellen konnte in den HT-29/B6-Zellen keine der untersuchten Pflanzenstoffe den TER unter basalen Bedingungen erhöhen. Die Hemmung der TNF- $\alpha$ -induzierten Barrierestörung gelang 6-SG über die Inhibition der PI3K-vermittelten Claudin-2-Hochregulation und der NF $\kappa$ B-vermittelten Claudin-1-Umverteilung. Auch Myrrhe hemmte die TNF- $\alpha$ -bedingten Claudin-1- und Claudin-2-Veränderungen, jedoch beeinflusste Myrrhe weder den PI3K/Akt- noch den NF $\kappa$ B-Signalweg. Stattdessen inhibierte Myrrhe die Claudin-2-Proteinexpression über den STAT6-Signalweg, der durch TNF- $\alpha$  aktiviert wurde. Das zeigte sich durch den STAT6-Inhibitor SAHA, der die TNF- $\alpha$ -induzierte Claudin-2-Expression ebenso wie

Myrrhe hemmte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die STAT6 downstream des TNF- $\alpha$  induzierten PI3K/Akt-Signalweges die Claudin-2-Hochregulation induziert.

### 5.2.1 Relevanz von TNF- $\alpha$ als proinflammatorisches Zytokin bei CED

Zur Verschärfung der Entzündung bei CED führen die übermäßige Ausschüttung mehrerer proinflammatorischer Zytokine wie IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und anderer Interleukine bzw. das Ungleichgewicht mit antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 zu einer anhaltenden Aktivierung des intestinalen Immunsystems (Sanchez-Munoz et al. 2008). TNF- $\alpha$  ist ein proinflammatorisches Schlüsselzytokin der CED, vor allem bei Morbus Crohn (Luettig et al. 2015). So sind die TNF- $\alpha$ -Level im intestinalen Gewebe und Stuhl bei Morbus Crohn-Patienten erhöht (Braegger et al. 1992; Murch et al. 1993). Die Entzündung wird durch TNF- $\alpha$  weiter stimuliert, u. a. durch die Anregung der IL-1 $\alpha$ - und IL-6-Produktion sowie die Aktivierung von Fibroblasten (Van Deventer 1997). Klinische Studien mit Anti-TNF- $\alpha$ -Antikörper-Therapien wie Infliximab oder der TNF- $\alpha$ -Expressionsinhibitor Thalidomid zeigten bei Morbus Crohn Erkrankten ein gutes Ansprechen (Ghosh 2004; Hanauer et al. 2002; Ehrenpreis et al. 1999). In verschiedenen Zelllinien wurde gezeigt, dass TNF- $\alpha$  eine Barrierestörung hervorruft (Cui et al. 2010; Gitter et al. 2000; McKay and Singh 1997). In HT-29/B6-Zellen wurde diese Störung einerseits durch eine erhöhte Apoptoserate und andererseits durch Veränderungen der TJ-Morphometrie, wie eine verringerte horizontale TJ-Strangzahl und TJ-Netzwerktiefe, verursacht (Gitter et al. 2000). Dass eine erhöhte intestinale TJ-Permeabilität mit dem TNF- $\alpha$ -Effekt zusammenhängt, zeigte sich auch bei Morbus Crohn Patienten, die in einer klinischen Studie nach einer Anti-TNF- $\alpha$ -Behandlung wieder eine verminderte intestinale Permeabilität für [<sup>51</sup>Cr]EDTA aufwiesen (Suenae et al. 2002). Die Apoptoserate spielt aufgrund der geringen TNF- $\alpha$ -Dosis von 250 bis 500 U/ml eine untergeordnete Rolle in der TNF- $\alpha$ -induzierten Barrierestörung im HT-29/B6-Zellmodell (Amasheh et al. 2010). Demzufolge sind die in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen der TJ-Proteinexpression und deren Verteilung in der Zelle unter TNF- $\alpha$  mit einer Veränderung der parazellulären Transport- bzw. Barrierewege assoziiert. In den HT-29/B6-Zellen erhöht TNF- $\alpha$  die Expression von Claudin-2 und über die NF $\kappa$ B-Aktivierung wird Claudin-1 aus der TJ ins Zytosol oder hin zur basolateralen Membran aussortiert (Amasheh et al. 2010). Die Claudin-2-Erhöhung durch TNF- $\alpha$  in HT-29/B6-Zellen wurde bislang nur mit der Aktivierung von PI3K/Akt in Zusammenhang gebracht (Amasheh et al. 2010; Mankertz et al. 2009). Diese Arbeit zeigte allerdings auch eine Aktivierung von STAT6 durch TNF- $\alpha$  und damit einhergehend einen Anstieg von Claudin-2. Während 6-SG den TNF- $\alpha$ -Effekt über die Hemmung der Phosphorylierung von Akt und NF $\kappa$ B erreichte, hemmte Myrrhe

keine dieser Phosphorylierungen. Myrrhe war jedoch in der Lage die Phosphorylierung von STAT6 downstream von Akt zu hemmen.

### 5.2.2 Relevanz und Regulation der intestinalen Claudine

Im physiologisch gesunden menschlichen Dickdarm wurde die Expression der für die parazelluläre Barriere bedeutenden TJ-Proteine Claudin-1, -3, -4, -5, -7 and -8 nachgewiesen (Bürgel et al. 2002; Zeissig et al. 2007). Die Kanal-bildenden TJ-Proteine Claudin-2- und Claudin-15 werden dagegen vorwiegend im proximalen Dünndarm und kaum bzw. gar nicht im Dickdarm exprimiert (Lameris et al. 2013). Veränderungen dieser Claudine sollen maßgeblich zur Barrieredysfunktion in CED Patienten beitragen. Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zeigten eine verminderte Expression und/oder Umverteilung der abdichtenden TJ-Proteine Claudin-1, -4, -5 und -8 (Heller et al. 2005; Zeissig et al. 2007). Zudem war bei diesen Patienten die Expression von Claudin-2, welches in nicht-entzündetem Dickdarmgewebe kaum exprimiert wird, erhöht. Claudin-2 trägt, als parazellulärer Kanal für Kationen und Wasser, bei vermehrter Expression, zur Leckflux-Diarrhoe bei (Prasad et al. 2005; Zeissig et al. 2007). Dies wurde bei den CED wie Morbus Crohn (Zeissig et al. 2007) und Colitis ulcerosa (Oshima et al. 2008), der Autoimmunerkrankung Zöliakie (Schumann et al. 2012) und infektiösen Erkrankungen wie der Humanen Immundefizienz (HIV-Infektion) (Epple et al. 2009) gezeigt.

In einer anderen Studie an Patienten mit aktiver CED war neben Claudin-2 auch die Expression des abdichtenden TJ-Proteins Claudin-1 erhöht (Weber et al. 2008). Im HT-29/B6-Modell dieser Arbeit hier verursachte TNF- $\alpha$  ebenfalls eine erhöhte Expression dieser beiden Claudine. Überdies wurde die Umverteilung von Claudin-1 aus der TJ durch TNF- $\alpha$  verursacht. Auch an anderen Zelllinien wird Claudin-1 aus der TJ heraus sortiert (Cao et al. 2013; Poritz et al. 2004; Shiozaki et al. 2012). Die Expression von Claudin-1 wird je nach Zelllinie unterschiedlich von TNF- $\alpha$  reguliert. So wird die Claudin-1-Expression in den Zelllinien MDCK der Niere (Poritz et al. 2004) und PAR-C10 der Ohrspeicheldrüse (Baker et al. 2008) gesenkt, erhöht in MCF-7-Zellen des Mammakarzinoms (Liu et al. 2012) und PANC-1-Zellen des Pankreas (Kondo et al. 2008) oder bleibt unverändert wie in Caco-2-Zellen (Cao et al. 2013). Die vermehrte Internalisierung von Claudin-1 durch TNF- $\alpha$  in HT-29/B6-Zellen konnte sowohl von 6-SG als auch von Myrrhe abgeschwächt werden.

Die Claudin-2-Hochregulation erfolgt bei Colitis ulcerosa durch IL-13 als Immunantwort der Typ2-T-Zellen, während bei Morbus Crohn die Ausschüttung des Zytokins TNF- $\alpha$  aus der Antwort der Typ1-T-Zellen für die verstärkte Claudin-2-Expression verantwortlich ist (Fuss et al. 2004; Heller et al. 2005; Zeissig et al. 2007). Auch in anderen intestinalen Zelllinien wurde durch



proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder IL-13 die Claudin-2-Expression hochreguliert (Fischer et al. 2014; Prasad et al. 2005). Bei CED führt vermehrt exprimiertes Claudin-2 zur erhöhten parazellulären Passage von Wasser und Ionen, die zu Leckflux-Diarrhoe beitragen (Prasad et al. 2005; Zeissig et al. 2007). Eine erhöhte Claudin-2-Expression in Patienten mit CED-assoziiertem Darmkrebs korreliert außerdem mit der Tumorprogression (Dhawan et al. 2005). Die Proliferationsrate von Kolonkarzinomzellen, die normalerweise kein Claudin-2 exprimieren, erhöht sich wenn sie zur Claudin-2-Expression gezwungen werden (Dhawan et al. 2005). Die Hemmung der Claudin-2-Expression ist in Bezug auf die Tumorprogression demnach ebenso wünschenswert. Die Claudin-2-Expression konnte sowohl durch 6-SG als auch durch Myrrhe gesenkt werden.

Es konnten weder durch TNF- $\alpha$  noch durch die Pflanzenstoffe Expressionsveränderungen der TJ-Proteine Claudin-3, -5 und -8 festgestellt werden.

Claudin-4 und -7 blockieren in MDCK II-Zellen die Na<sup>+</sup>-Permeabilität, während beide in LLC-PK1-Zellen als Cl-Kanäle fungieren (Hou et al. 2006). Beide Funktionen passen nicht zu den beobachteten Effekten an den Caco-2-Zellen. Unter Ellagsäure waren beide Claudine reduziert, jedoch war dadurch weder die Na<sup>+</sup>-Permeabilität erhöht noch die Cl-Permeabilität gesenkt. Im Gegenteil, die Na<sup>+</sup>-Permeabilität war reduziert und die Cl-Permeabilität blieb unbeeinflusst durch Ellagsäure. In einer anderen Studie in Caco-2-Zellen wurde der Omeprazol-induzierte TER-Anstieg mit einer Verminderung der Claudin-7- und -12-Expression assoziiert (Thongon and Krishnamra 2012). Die Claudin-7-Reduktion könnte in den Caco-2-Monolayern zum Barriere-stabilisierenden Effekt, also dem TER-Anstieg, von Myrrhe und Ellagsäure beitragen. Claudin-15 fungiert je nach Expressionshintergrund anderer Claudine als Na<sup>+</sup>-Kanal oder Cl-Barriere (Van Itallie et al. 2003). Die durch Ellagsäure beobachtete Verminderung des Claudin-15-Signals in den Färbungen könnte die verminderte Na<sup>+</sup>-Permeabilität erklären.

#### 5.2.2.1 *NF $\kappa$ B und Claudin-1-Regulation*

Der NF $\kappa$ B-Weg scheint an der Regulation der Claudin-1-Internalisierung bei CED beteiligt zu sein (Tang et al. 2010). Die subzelluläre Verteilung von Occludin, Claudin-1 und ZO-1 ist in Mäusen NF $\kappa$ B-abhängig (Tang et al. 2010). Der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B spielt in Entzündungen von Epithelzellen und CED eine wichtige Rolle (Andresen et al. 2005; Atreya et al. 2008; Ellis et al. 1998). Die Aktivierung von NF $\kappa$ B in den HT-29/B6-Zellen erfolgt ebenso durch TNF- $\alpha$  und konnte in dieser Arbeit teilweise durch 6-SG und dem NF $\kappa$ B-Inhibitor BAY 11-7082, nicht aber durch Myrrhe, gehemmt werden. TNF- $\alpha$  bindet an dessen Typ-1 Rezeptor (TNFR1), womit durch das Adapter-protein TRADD ein weiteres Adapter-protein TRAF2 rekrutiert wird, welches I $\kappa$ B Kinase



(IKK) aktiviert und über Receptor-Interacting Protein (RIP) auch NFκB. Dadurch wird NFκB, hauptsächlich der p65 NFκB Heterodimer nuclear translocation (Oeckinghaus et al. 2011; Wu and Zhou 2010), aktiviert. Die Promotorregion des Claudin-1-Gens weist Bindungsstellen für NFκB auf, was auf eine Induktion der Claudin-1-Expression durch TNF-α via NFκB hindeutet (Liu et al. 2012). Ergänzend zeigten Liu *et al.* an Brustkrebszellen MCF-7, dass Claudin-4 und -7 keine Bindungsstellen in ihrer Promotorregion aufweisen und die Expressionsraten auch nicht durch TNF-α verändert worden sind (Liu et al. 2012). Auch in den HT-29/B6-Zellen bleibt die Expression von Claudin-4 und Claudin-7 durch TNF-α unbeeinflusst.

Die Hemmung der NFκB-Aktivierung hemmt somit die Claudin-1-Internalisierung in den HT-29/B6, was durch 6-SG teilweise und durch den NFκB-Inhibitor BAY 11-7082 vollständig gelang. Somit scheint in den HT-29/B6-Enterozyten die subzelluläre Verteilung von Claudin-1 durch NFκB reguliert zu werden. Jedoch wurde die Claudin-1-Expression nicht durch 6-SG beeinflusst, während der NFκB-Inhibitor auch die Claudin-1-Expressionssteigerung durch TNF-α verhinderte. Möglicherweise ist für die Expression eine komplette Hemmung des NFκB-Signalwegs entscheidend. Die Hemmung des TNF-α-bedingten Barrieredefekts durch den NFκB-Inhibitor deutet darauf hin, dass die NFκB-Regulation sehr entscheidend für die intestinale Barrierefunktion der HT-29/B6-Monolayer ist.

6-SG wurde auch als PPARγ-Agonist, der durch die PPARγ-Aktivierung zu einer Hemmung der NFκB-Aktivität führt, in kanzerogenen Brust- und Kolonzellen beschrieben (Tan et al. 2013). In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob der hemmende 6-SG-Effekt auf die TNF-α-induzierte Barriestörung (den TER-Abfall) an den HT-29/B6 sich mit dem PPARγ-Antagonisten aufheben lässt. Jedoch hatte der PPARγ-Antagonist keinen Einfluss auf den Effekt von 6-SG an den TNF-α-behandelten Zellen und auch der PPARγ-Agonist konnte den 6-SG-Effekt nicht imitieren. Demzufolge scheint die protektive Barriewirkung von 6-SG in TNF-α-behandelten HT-29/B6-Zellen nicht PPARγ-vermittelt zu sein.

#### 5.2.2.2 PI3K/STAT6-abhängige Claudin-2-Regulation

6-SG und Myrrhe inhibierten beide die TNF-α-bedingte Expressionssteigerung des Kanalbildenden Claudin-2. Myrrhe reduzierte zudem unter physiologischen Bedingungen in Caco-2-Zellen die Claudin-2-Expression. Die Claudin-2-Expression wird in HT-29/B6-Zellen über den PI3K/Akt-Signalweg reguliert, denn der PI3K-Inhibitor LY294002 hemmt die TNF-α-induzierte Claudin-2-Expression (Amasheh et al. 2010; Mankertz et al. 2009). Auch 6-SG inhibierte die TNF-α-induzierte Phosphorylierung von Akt Thr308, während Myrrhe jedoch keine der beiden Akt-

Proteine (Thr308, Ser473) in HT-29/B6-Zellen beeinflusste. In Caco-2-Zellen dagegen reduzierte Myrrhe die Phosphorylierung von Akt (Ser473). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der PI3K-Inhibitor LY294002 in Caco-2 die Claudin-2-Expression verringerte. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Claudin-2 Herabregulation durch Myrrhe in den Caco-2 ebenfalls PI3K/Akt-vermittelt erfolgt. Die Ursache dafür, dass Myrrhe den PI3K/Akt-Signalweg in den Caco-2-Zellen und nicht in den HT-29/B6-Zellen hemmt, könnte an der unterschiedlichen basalen Aktivierung dieses Signalweges in den Zelllinien liegen. So ist der Signalweg in den HT-29/B6-kaum und in den Caco-2-Zellen deutlich aktiviert. Eine andere Möglichkeit könnte die in den Caco-2-Zellen zweifach höher eingesetzte Myrrhekonzentration sein.

Der Signalweg der PI3K mit nachgeschalteter Akt, auch bekannt als Proteinkinase B, übernimmt im menschlichen Organismus allgemein wichtige Schlüsselfunktionen, wie z. B. die Zellproliferation und das Überleben einer Zelle. Die Aktivierung erfolgt durch verschiedene Faktoren wie z. B. DNA-Schädigungen oder Wachstumshormonen (Bozulic and Hemmings 2009). Die Phosphorylierungsrate von Akt ist in der intestinalen Mukosa von Colitis ulcerosa Patienten erhöht (Huang et al. 2007). Der PI3K/Akt-Signalweg ist sehr komplex. Zusammengefasst generiert aktiviertes PI3K aus den Membranlipiden Phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) das Phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphat (PIP<sub>3</sub>), an das Akt binden kann (Alessi and Cohen 1998). Durch diese Bindung kommt es zu Konformationsänderungen von Akt, wodurch die Phosphorylierungsstellen Thr308 und Ser473 offengelegt werden. Die Phosphorylierung beider Stellen, PDK1 (Phosphoinositide-dependent kinase-1) phosphoryliert Thr308 und mTORC2 (mammalian Target of Rapamycin) Ser473, ist für die Aktivität von Akt notwendig (Bozulic and Hemmings 2009). Die Inhibition der Phosphorylierung einer dieser Stellen führt demnach zur Hemmung des gesamten PI3K/Akt-Signalweges.

TER-Messungen mit dem PI3K-Inhibitor zeigten bereits früher, dass die Regulation von Claudin-2 nicht an den TNF- $\alpha$ -bedingten TER-Veränderungen der HT-29/B6-Zellen beteiligt war (Mankertz et al. 2009). So veränderte die Inhibition der Claudin-2-Expression durch LY294002 nicht den TNF- $\alpha$ -induzierten TER-Abfall, sowie auch die leichte Expressionsminderung auf RNA- und Proteinebene durch 6-SG allein keinen TER-Anstieg im HT-29/B6-Zellmodell verursachte. Wenn der TER allerdings mittels Zwei-Wege-Impedanz in trans- und parazellulären Widerstand ( $R_{trans}$ ,  $R_{para}$ ) aufgeschlüsselt wurde, zeigten sich nach 24 h interessante Unterschiede zwischen TNF- $\alpha$ -behandelten und TNF- $\alpha$  mit PI3K-Inhibitor-behandelten HT-29/B6-Monolayern. Denn unter der PI3K-Hemmung war  $R_{para}$  höher als unter TNF- $\alpha$  allein, während der epitheliale Gesamtwiderstand zwischen diesen Gruppen nahezu gleich blieb (Amasheh et al. 2010; Mankertz et al. 2009). Die

Claudin-2-Regulation beeinflusst also den parazellulären Widerstand, dies wird jedoch im gesamten TER nicht erkennbar.

Die Inhibition von PI3K/Akt durch 6-SG verhinderte die Claudin-2-Hochregulation durch TNF- $\alpha$ . Myrrhe dagegen hemmte die TNF-induzierte Claudin-2-Hochregulation, nicht aber die PI3K/Akt-Aktivierung, sondern die STAT6-Aktivierung. STAT6 gehört zur Signal Transducer und Activator Transkriptionsfamilie von Proteinen mit sieben Mitgliedern, die durch Wachstumsfaktoren und Zytokine aktiviert werden. Im Kolonepithelgewebe aus Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zeigte sich vermehrt aktiviertes STAT6 im Vergleich zu den Kontrollen (Rosen et al. 2011). Die Intensität der Colitis war in STAT6-defizienten Mäusen geringer im Vergleich zum Wildtyp (Rosen et al. 2013). Die Claudin-2-Expression war ebenso in den STAT6-defizienten Mäusen verringert. Ein Zusammenhang zwischen der Claudin-2-Expression und dem STAT6-Signalweg wurde an den Kolonzellen T84 und HT-29 nachgewiesen. So verhinderte die Hemmung der STAT6 Phosphorylierung mittels SAHA sowie die Transfektion mit der STAT6 siRNA die IL-13-induzierte Claudin-2-Hochregulation (Rosen et al. 2011; Rosen et al. 2013). In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass STAT6 auch über das proinflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  aktiviert wird. Myrrhe hemmt die durch TNF- $\alpha$  über STAT6 induzierte Claudin-2-Expression und könnte auf diese Weise protektiv gegen Leckflux-Diarrhoe wirken.

### **5.2.3 Ultrastruktur und durchlässige Darmbarriere**

Die Permeabilität für größere Moleküle wurde durch Fluxmessungen mit dem parazellulären Marker Fluoreszein (332 Da) ermittelt. Hier zeigte sich, dass 6-SG und Myrrhe auch den TNF- $\alpha$ -induzierten Permeabilitätsanstieg von Fluoreszein an den HT-29/B6-Zellen hemmen. Dies kann nicht auf die veränderte Claudin-2-Expression zurückzuführen sein, da Claudin-2 allein nicht die Permeabilität für mittelgroße Moleküle beeinflusst (Amasheh et al. 2002). Daher wurde untersucht, ob es Veränderungen in der TJ-Ultrastruktur gibt, die die Änderungen der Permeabilität bedingen. 250 U/ml TNF- $\alpha$  und 6-SG änderten nichts an der TJ-Ultrastruktur, während die höhere TNF- $\alpha$  Dosis 500 U/ml die durchschnittliche TJ-Strangzahl verringerte, die unter Vorinkubation mit Myrrhe wieder Kontrollniveau erreichte. Auch CED-Patienten zeigen ähnliche Veränderungen in der TJ-Ultrastruktur, die zu einem undichteren bzw. sogar lecken Epithelium beitragen (Schmitz et al. 2000; Zeissig et al. 2007). In HT-29/B6-Zellen wurde mit einer TNF- $\alpha$  Dosis von 2000 U/ml zusätzlich zu den morphometrischen Veränderungen des TJ-Netzwerks eine erhöhte Apoptoserate beobachtet (Schmitz et al. 1999b). Auch Apoptosen beeinträchtigen die Barriereintegrität. TNF- $\alpha$  induzierte jedoch in der niedrigen Dosis von 250 U/ml

und 500 U/ml keine Apoptose (Luettig et al. 2016). Die Komposition der TJ kann durch 250 U/ml TNF- $\alpha$  so verändert sein, dass auch ohne Veränderung der TJ-Strangzahl die epitheliale Porosität beeinflusst sein kann (Gonzalez-Mariscal et al. 1989). So könnten der durch TNF- $\alpha$  verursachte Anstieg von Claudin-2 in der TJ und die Aussortierung von Claudin-1 aus der TJ zusammen die Permeabilität für mittelgroße Moleküle wie Fluoreszein erhöhen.

Solch veränderte Komposition der Claudine, wie sie bei der durch die Ellagsäure-induzierten Reduktion der TJ-Proteine Claudin-4, -7 und -15 in Caco-2-Zellen auftritt, könnten also ebenso Ursache für die reduzierte Permeabilität für Fluoreszein bzw. den erhöhten TER sein. Auch hier ist die TJ-Ultrastruktur nicht signifikant verändert. Während in HT-29/B6-Zellen Fluoreszein als parazellulärer Marker beschrieben wurde, wurde bei Caco-2-Zellen beobachtet, dass das Fluoreszein auch transzellulär transportiert wird (Krug et al. 2009). Da die Dilutionspotentiale eine Reduktion der parazellulären Na<sup>+</sup>-Permeabilität durch Ellagsäure zeigten, ist aber sicher davon auszugehen, dass an der Ellagsäure-induzierten Reduktion der Permeabilität für Fluoreszein parazelluläre Mechanismen beteiligt sind.

In den Caco-2-Zellen führte Myrrhe zu keiner Änderung der durchschnittlichen TJ-Strangzahl. Jedoch nahm unter Myrrhe der Anteil der zweisträngigen TJ-Areale, also die Häufigkeit der sehr durchlässigen TJ-Areale, ab und könnte somit zu dem Barriere-stabilisierenden Effekt von Myrrhe beitragen.

#### 5.2.4 Darreichungsform und Pharmakokinetik

In den klinischen Studien mit Myrrhinil-Intest<sup>®</sup> erhielten die Teilnehmer am Tag dreimal vier Kapseln mit je 100 mg Myrrhepulver. Das entspricht einer Dosis von 1200 mg am Tag. Das Präparat zeigte neben seiner antidiarrhoischen Wirkung auch eine gute Verträglichkeit (Langhorst et al. 2013; Albrecht et al. 2014). Myrrhe zeigte im Vergleich zu Ellagsäure und 6-SG an beiden Zelllinien Effekte. Da das Harz der Myrrhe im Gegensatz zu den beiden Einzelsubstanzen ein Substanzgemisch bildet, könnten mehrere bioaktive Pflanzeninhaltsstoffe, zu denen u. a. Triterpensäuren und Steroide zählen, für die Wirkung verantwortlich sein. Dabei könnten diese synergistisch oder unabhängig voneinander wirken. Damit ließe sich auch erklären, dass Myrrhe in beiden Zelllinien sowohl von der apikalen als auch von der basolateralen Zellmembran sowie bei beidseitiger Gabe additiv wirkt. Es könnten demzufolge unterschiedliche Substanzen an den jeweiligen Membranseiten wirken und in der Kombination würde sich ihre Wirkung addieren. Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass der für den Effekt verantwortliche Inhaltsstoff über die Membran in die Zelle gelangt. Auch durch diese Theorie ließe sich erklären, dass Myrrhe sowohl

einzelnen auf jeder Membranseite wirkt als auch bei beidseitiger Gabe durch die erhöhte Aufnahme in die Zelle einen größeren Effekt erzielen könnte.

6-SG hingegen muss erst auf die basolaterale Seite gelangen, um antiinflammatorisch zu wirken. Humane pharmakokinetische Studien zeigten nach Applikation von Ingwerextrakten eine schnelle Resorption von 6-SG, Metabolisierungen zu Glukuronid- und Sulfat-Konjugaten und eine sehr kurze Halbwertszeit von 1 bis 3 h im Blut (Yu et al. 2011; Zick et al. 2008). Bei einer Verabreichung von 2 g Ingwerextrakt mit 45 mg 6-SG wurde im Plasma nach 1 h die maximale Plasmakonzentration von 6-SG bei 14 ng/ml (das entspricht 0,05  $\mu$ M) gemessen (Yu et al. 2011). Bei einer oralen Einnahme von 2 g bis 4 g Ingwerextrakt zeigten die Probanden keine Unverträglichkeiten, wohingegen 6 g zu gastralen Irritationen führten (Desai et al. 1990). Bei 100  $\mu$ M 6-SG in der HT-29/B6-Zelllinie zeigte der Zytotoxizitätstest keinen Unterschied zu den Kontrollen. Die Wirkung von 6-SG auf die Barrierefunktion könnte durch ein Zusammenspiel mit anderen Scharfstoffen bzw. bioaktiven Inhaltsstoffen der Ingwerextrakte eine effektivere Wirkung in CED-Patienten erzielen. Auch wenn 6-SG schnell verstoffwechselt wird, könnten die Metabolite ebenso Barriere-protektiv wirken. Eine Studie über die antikanzerogene Wirkung von 6-SG *in vitro* zeigte, dass einige Metabolite die gleichen Effekte wie 6-SG erzielten (Zhu et al. 2013). Im Vergleich zum Zellmodell erfolgt die Verabreichung in Patienten repetitiv, wodurch sich die Wirkung ebenfalls optimieren könnte.

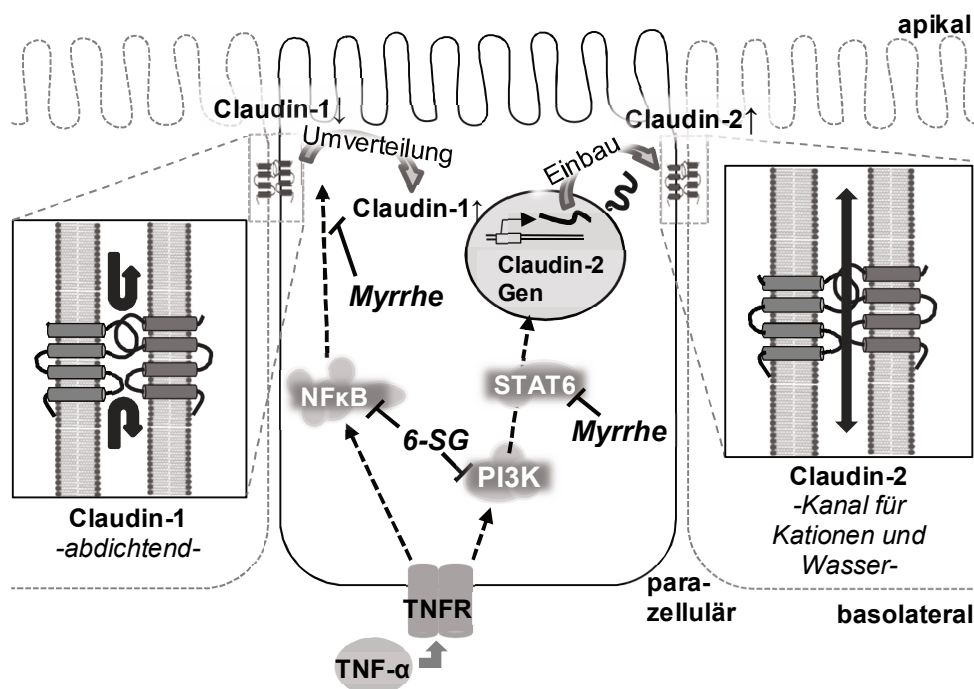
Das Gleiche gilt für Ellagsäure. Auch hier wird eine geringe Plasmakonzentration nach oraler Einnahme erreicht. Elf Probanden zeigten ein bis zwei Stunden nach der Einnahme von 45 g gefrorenen Himbeeren, die ungefähr 13,5 mg Ellagsäure enthielten, einen Plasmapeak von 3,65 ng/ml (das entspricht ungefähr 0,01  $\mu$ M) (Stoner et al. 2005). Die Ellagitanninmenge in den Himbeeren wurde in dieser Studie nicht berücksichtigt. In einer anderen Studie wiesen 18 Probanden nach dem Konsum von 180 ml Granatapfelsaft mit 25 mg Ellagsäure und 318 mg Ellagitannin nach 1 h einen Plasmapeak der Ellagsäure von 0,06  $\mu$ M auf. Im Plasma wurden auch Metabolite wie Dimethylellagsäure-Glucuronid, Urolithine A und B gemessen. Urolithin A zeigte nach 6 h eine Konzentration von 0,14  $\mu$ M im humanen Plasma (Seeram et al. 2008). Diese bioaktiven Metabolite der Ellagsäure könnten ebenso protektiv auf die Barriere wirken. Im Colitis ulcerosa Rattenmodell wurde gezeigt, dass die entzündungshemmende Wirkung von 15 mg/kg Urolithin A stärker war als die durch 250 mg/kg Granatapfelextrakt. Nur Urolithin A konnte die Kolonarchitektur bewahren (Larrosa et al. 2010).

Ellagsäure wirkte in den Caco-2-Zellen nur von der basolateralen Membranseite barrierestärkend. Die einseitige Wirksamkeit von 6-SG und Ellagsäure auf der basolateralen Membran könnte entweder auf einen Rezeptor-vermittelten Effekt oder auf eine höhere Resorptionskapazität der basolateralen Membran hindeuten. In einer entzündlich betroffenen Darmschleimhaut könnten 6-

SG, Ellagsäure und Myrrhe die Segmente mit einer gestörten Barrierefunktion natürlich viel leichter passieren als normalerweise. Epitheliale Apoptosen, wie sie in entzündeten Bereichen auftreten können, führen zu Leckstellen im Epithel (Gitter et al. 2000). Dadurch könnten die Substanzen leichter passieren und vermehrt von der basolateralen Membranseite aus wirken. Die Anreicherung von künstlichen Nährstofflösungen mit von der Blutseite wirksamen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen wie 6-SG oder Ellagsäure wäre auch eine weitere Anwendungsmöglichkeit. Wenn die orale Nahrungsaufnahme bei CED krankheitsbedingt nicht mehr möglich ist, kommt neben der enteralen die parenterale Ernährung zum Einsatz. Eine Anreicherung von Polyphenolen in diesen Speziallösungen wurde bereits für CED und akute Pankreatitis für einen besseren Behandlungserfolg empfohlen (Shapiro et al. 2007).

### 5.3 Fazit

Diese Arbeit zeigt, dass die untersuchten Pflanzenstoffe unterschiedliche Effekte an den Zellmodellen auslösen. 6-SG und Myrrhe inhibieren den TNF- $\alpha$ -induzierten intestinalen Barrieredefekt in HT-29/B6-Zellen ohne hier die basale Barrierefunktion zu beeinflussen. Ellagsäure inhibiert weder den Barrieredefekt noch beeinflusst sie die basale Barriere in HT-29/B6-Zellen. Die TNF- $\alpha$ -induzierte Barriere-dysfunktion kann dabei vor allem durch die Expressionsminderung des Kationenkanal-bildenden TJ-Proteins Claudin-2 über den PI3K/Akt- sowie den STAT6-Signalweg sowie der Inhibition der Umverteilung des abdichtenden TJ-Proteins Claudin-1 aus der TJ über den NF $\kappa$ B-Signalweg erfolgen (siehe **Abbildung 41**).



**Abbildung 41: Vereinfachte Darstellung der protektiven Wirkung von 6-SG und Myrrhe auf die TNF- $\alpha$ -induzierte Barriere-dysfunktion in der Kolonzelllinie HT-29/B6.**

Die TNFR-Aktivierung durch TNF- $\alpha$  induziert den NF $\kappa$ B-, den PI3K- sowie den STAT6-Signalweg. Die Aktivierung von PI3K und STAT6 führt zu einer erhöhten Expression des Kanal-bildenden TJ-Proteins Claudin-2 und wird durch 6-SG oder durch Myrrhe verhindert. Der TNFR-induzierte NF $\kappa$ B-Weg fördert die Umverteilung von Claudin-1 aus der TJ-Region ins Zytosol, der durch 6-SG inhibiert wird. Ebenso verhindert TNF- $\alpha$  die Umverteilung von Claudin-1, jedoch ohne die NF $\kappa$ B-Aktivierung zu beeinflussen.

Für 6-SG zeigt sich der TNF- $\alpha$ -inhibierende Effekt auch an den Caco-2-Zellen. Myrrhe und Ellagsäure, nicht aber 6-SG, steigern die intestinale Barrierefunktion in Caco-2-Zellen. Myrrhe senkt die Expression von Claudin-2 über PI3K/Akt in den Caco-2-Zellen, wodurch die Na<sup>+</sup>-Permeabilität gesenkt wird. Die Expressionsminderung von Claudin-2 durch Myrrhe und 6-SG könnte ein protektiver Mechanismus bei CED-assoziierte Leckflux-Diarrhoe sein.



Der durch Ellagsäure induzierte TER-Anstieg an Caco-2-Monolayern könnte mit der Reduzierung von Claudin-4 und Claudin-7, aber auch mit der vermehrten Lokalisation von Claudin-1 in der trizellulären TJ zusammenhängen. Die im LSM beobachtete Reduktion von Claudin-15 durch Ellagsäure könnte ebenso für die reduzierte Na<sup>+</sup>-Permeabilität und den erhöhten TER mitverantwortlich sein.

6-SG und Ellagsäure sind Einzelsubstanzen, während Myrrhe ein Gemisch aus mehreren Inhaltsstoffen bildet. Daher könnte die Wirkung von Myrrhe in beiden Zellmodellen auch auf unterschiedliche Inhaltsstoffe zurückzuführen sein. In weiteren Versuchen, könnte es daher hilfreich sein, die bekanntesten bioaktiven Inhaltsstoffe der Myrrhe, wie z.B. Guggulsteron, in den beiden intestinalen Zellmodellen einzeln oder auch in verschiedenen Kombinationen zu testen. Sollte es auf unterschiedliche Inhaltsstoffe oder deren Synergismen zurückzuführen sein, würde es zudem belegen, dass das Potential pflanzlicher Einzelsubstanzen in der Kombination mit anderen liegt. Denn auch die CED und die damit einhergehenden Barrieredysfunktionen unterliegen komplexen Pathomechanismen. Je mehr Signalwege darin beeinflusst werden, umso erfolgreicher ist am Ende die Prävention bzw. Therapie von CED.

6-SG, Ellagsäure und Myrrhe könnten für eine optimierte epitheliale Barriereintegrität in intestinalen Entzündungen Bestandteile von Multi-Target-Therapien bilden.



## 6 LITERATUR

- Albrecht U., Muller V., Schneider B., and Stange R. (2014):** Efficacy and safety of a herbal medicinal product containing myrrh, chamomile and coffee charcoal for the treatment of gastrointestinal disorders: a non-interventional study, *BMJ Open Gastroenterol*, 1: e000015.
- Alessi D. R., and Cohen P. (1998):** Mechanism of activation and function of protein kinase B, *Curr Opin Genet Dev*, 8: 55-62.
- Ali B. H., Blunden G., Tanira M. O., and Nemmar A. (2008):** Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): a review of recent research, *Food Chem Toxicol*, 46: 409-20.
- Althaus F. R. Et Al. (2009):** *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin : 131 Tabellen* (Enke Verlag: Stuttgart).
- Amasheh M., Fromm A., Krug S. M., Amasheh S., Andres S., Zeitz M., et al. (2010):** TNFalpha-induced and berberine-antagonized tight junction barrier impairment via tyrosine kinase, Akt and NFkappaB signaling, *J Cell Sci*, 123: 4145-55.
- Amasheh M., Luettig J., Amasheh S., Zeitz M., Fromm M., and Schulzke J. D. (2012):** Effects of quercetin studied in colonic HT-29/B6 cells and rat intestine in vitro, *Ann N Y Acad Sci*, 1258: 100-7.
- Amasheh M., Schlichter S., Amasheh S., Mankertz J., Zeitz M., Fromm M., and Schulzke J. D. (2008):** Quercetin enhances epithelial barrier function and increases claudin-4 expression in Caco-2 cells, *J Nutr*, 138: 1067-73.
- Amasheh S., Meiri N., Gitter A. H., Schöneberg T., Mankertz J., Schulzke J. D., and Fromm M. (2002):** Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells, *J Cell Sci*, 115: 4969-76.
- Amasheh S., Schmidt T., Mahn M., Florian P., Mankertz J., Tavalali S., et al. (2005):** Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells, *Cell Tissue Res*, 321: 89-96.
- Anderson J. M. (2001):** Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport, *News Physiol Sci*, 16: 126-30.
- Anderson J. M., and Van Itallie C. M. (2009):** Physiology and function of the tight junction, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1: a002584.
- Andresen L., Jorgensen V. L., Perner A., Hansen A., Eugen-Olsen J., and Rask-Madsen J. (2005):** Activation of nuclear factor kappaB in colonic mucosa from patients with collagenous and ulcerative colitis, *Gut*, 54: 503-9.
- Atreya I., Atreya R., and Neurath M. F. (2008):** NF-kappaB in inflammatory bowel disease, *J Intern Med*, 263: 591-6.
- Baker O. J., Camden J. M., Redman R. S., Jones J. E., Seye C. I., Erb L., and Weisman G. A. (2008):** Proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma alter

tight junction structure and function in the rat parotid gland Par-C10 cell line, *Am J Physiol Cell Physiol*, 295: C1191-201.

- Barmeyer C. (2002):** Diarrhoe und Malabsorption bei Colitis ulcerosa und zugrunde liegende Mechanismen in den Modellen der Interleukin-2-defizienten Maus und der Zytokin-exponierten Kolonmucosa der Ratte., Dissertation, Freie Universität Berlin
- Bhagwat S.; Haytowitz, D.B.; Holden, J.M. (Ret.). 2014.** USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods. In, edited by Agriculture U.S. Department Of, 176. Maryland.
- Blasig I. E., Winkler L., Lassowski B., Mueller S. L., Zuleger N., Krause E., et al. (2006):** On the self-association potential of transmembrane tight junction proteins, *Cell Mol Life Sci*, 63: 505-14.
- Bode A. M., and Dong Z. (2011):** The Amazing and Mighty Ginger. in Benzie I. F. F. and Wachtel-Galor S. (eds.), *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects* (Boca Raton (FL)).
- Bozulich L., and Hemmings B. A. (2009):** PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation, *Curr Opin Cell Biol*, 21: 256-61.
- Braegger C. P., Nicholls S., Murch S. H., Stephens S., and Macdonald T. T. (1992):** Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation, *Lancet*, 339: 89-91.
- Bürgel N., Bojarski C., Mankertz J., Zeitz M., Fromm M., and Schulzke J. D. (2002):** Mechanisms of diarrhea in collagenous colitis, *Gastroenterology*, 123: 433-43.
- Calixto J.B. (2000):** Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents), *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33: 179-89.
- Cao M., Wang P., Sun C., He W., and Wang F. (2013):** Amelioration of IFN-gamma and TNF-alpha-induced intestinal epithelial barrier dysfunction by berberine via suppression of MLCK-MLC phosphorylation signaling pathway, *PLoS One*, 8: e61944.
- Cerda B., Tomas-Barberan F. A., and Espin J. C. (2005):** Metabolism of antioxidant and chemopreventive ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts, and oak-aged wine in humans: identification of biomarkers and individual variability, *J Agric Food Chem*, 53: 227-35.
- Cheon J. H., Kim J. S., Kim J. M., Kim N., Jung H. C., and Song I. S. (2006):** Plant sterol guggulsterone inhibits nuclear factor-kappaB signaling in intestinal epithelial cells by blocking IkappaB kinase and ameliorates acute murine colitis, *Inflamm Bowel Dis*, 12: 1152-61.
- Chomczynski P., and Sacchi N. (1987):** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem*, 162: 156-9.
- Chrubasik S., Pittler M. H., and Roufogalis B. D. (2005):** Zingiberis rhizoma: a comprehensive review on the ginger effect and efficacy profiles, *Phytomedicine*, 12: 684-701.
- Claude P. (1978):** Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens, *J Membr Biol*, 39: 219-32.

- Claude P., and Goodenough D. A. (1973):** Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia, *J Cell Biol*, 58: 390-400.
- Cui W., Li L. X., Sun C. M., Wen Y., Zhou Y., Dong Y. L., and Liu P. (2010):** Tumor necrosis factor alpha increases epithelial barrier permeability by disrupting tight junctions in Caco-2 cells, *Braz J Med Biol Res*, 43: 330-7.
- D'andrea G. (2015):** Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications?, *Fitoterapia*, 106: 256-71.
- Desai H. G., Kalro R. H., and Choksi A. P. (1990):** Effect of ginger & garlic on DNA content of gastric aspirate, *Indian J Med Res*, 92: 139-41.
- Dhawan P., Singh A. B., Deane N. G., No Y., Shiou S. R., Schmidt C., et al. (2005):** Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer, *J Clin Invest*, 115: 1765-76.
- Dugasani S., Pichika M. R., Nadarajah V. D., Balijepalli M. K., Tandra S., and Korlakunta J. N. (2010):** Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol, *J Ethnopharmacol*, 127: 515-20.
- Efferth T., and Koch E. (2011):** Complex interactions between phytochemicals. The multi-target therapeutic concept of phytotherapy, *Curr Drug Targets*, 12: 122-32.
- Ehrenpreis E. D., Kane S. V., Cohen L. B., Cohen R. D., and Hanauer S. B. (1999):** Thalidomide therapy for patients with refractory Crohn's disease: an open-label trial, *Gastroenterology*, 117: 1271-7.
- El Ashry E. S., Rashed N., Salama O. M., and Saleh A. (2003):** Components, therapeutic value and uses of myrrh, *Pharmazie*, 58: 163-8.
- Ellis R. D., Goodlad J. R., Limb G. A., Powell J. J., Thompson R. P., and Punchard N. A. (1998):** Activation of nuclear factor kappa B in Crohn's disease, *Inflamm Res*, 47: 440-5.
- Ema/Hmpc/96911/2010. 2010.** Community herbal monograph on Commiphora molmol Engler, gummi-resina In, edited by (Hmpc) Committee on Herbal Medicinal Products. United Kingdom European Medicines Agency.
- Epple H. J., Schneider T., Troeger H., Kunkel D., Allers K., Moos V., et al. (2009):** Impairment of the intestinal barrier is evident in untreated but absent in suppressively treated HIV-infected patients, *Gut*, 58: 220-7.
- Espin J. C., Larrosa M., Garcia-Conesa M. T., and Tomas-Barberan F. (2013):** Biological Significance of Urolithins, the Gut Microbial Ellagic Acid-Derived Metabolites: The Evidence So Far, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Fischer A., Gluth M., Weege F., Pape U. F., Wiedenmann B., Baumgart D. C., and Theuring F. (2014):** Glucocorticoids regulate barrier function and claudin expression in intestinal epithelial cells via MKP-1, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 306: G218-28.
- Fromm M. (2010):** Transport in Membranen und Epithelien. in Schmidt Robert F.; Lang, Florian; Heckmann, Manfred (ed.), *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie* (Springer Medizin Verlag Heidelberg).

- Furuse M., Hata M., Furuse K., Yoshida Y., Haratake A., Sugitani Y., et al. (2002):** Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice, *J Cell Biol*, 156: 1099-111.
- Furuse M., Hirase T., Itoh M., Nagafuchi A., Yonemura S., Tsukita S., and Tsukita S. (1993):** Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions, *J Cell Biol*, 123: 1777-88.
- Fuss I. J., Heller F., Boirivant M., Leon F., Yoshida M., Fichtner-Feigl S., et al. (2004):** Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis, *J Clin Invest*, 113: 1490-7.
- Garrido-Urbani S., Bradfield P. F., and Imhof B. A. (2014):** Tight junction dynamics: the role of junctional adhesion molecules (JAMs), *Cell Tissue Res*, 355: 701-15.
- Ghosh S. (2004):** Anti-TNF therapy in Crohn's disease, *Novartis Found Symp*, 263: 193-205; discussion 05-18.
- Gitter A. H., Bendfeldt K., Schmitz H., Schulzke J. D., Bentzel C. J., and Fromm M. (2000):** Epithelial barrier defects in HT-29/B6 colonic cell monolayers induced by tumor necrosis factor-alpha, *Ann N Y Acad Sci*, 915: 193-203.
- Goldman D. E. (1943):** Potential, Impedance, and Rectification in Membranes, *J Gen Physiol*, 27: 37-60.
- Gonzalez-Mariscal L., Chavez De Ramirez B., Lazaro A., and Cereijido M. (1989):** Establishment of tight junctions between cells from different animal species and different sealing capacities, *J Membr Biol*, 107: 43-56.
- Günzel D., and Fromm M. (2012):** Claudins and other tight junction proteins, *Compr Physiol*, 2: 1819-52.
- Günzel D., Stuver M., Kausalya P. J., Haisch L., Krug S. M., Rosenthal R., et al. (2009):** Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function, *J Cell Sci*, 122: 1507-17.
- Ha S. K., Moon E., Ju M. S., Kim D. H., Ryu J. H., Oh M. S., and Kim S. Y. (2012):** 6-Shogaol, a ginger product, modulates neuroinflammation: a new approach to neuroprotection, *Neuropharmacology*, 63: 211-23.
- Hanauer S. B., Feagan B. G., Lichtenstein G. R., Mayer L. F., Schreiber S., Colombel J. F., et al. (2002):** Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial, *Lancet*, 359: 1541-9.
- Helander H. F., and Fandriks L. (2014):** Surface area of the digestive tract - revisited, *Scand J Gastroenterol*, 49: 681-9.
- Heller F., Florian P., Bojarski C., Richter J., Christ M., Hillenbrand B., et al. (2005):** Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution, *Gastroenterology*, 129: 550-64.
- Hering N. A., Fromm M., and Schulzke J. D. (2012):** Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics, *J Physiol*, 590: 1035-44.

- Hewitt K. J., Agarwal R., and Morin P. J. (2006):** The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues, *BMC Cancer*, 6: 186.
- Hidalgo I. J., Raub T. J., and Borchardt R. T. (1989):** Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability, *Gastroenterology*, 96: 736-49.
- Holm S. (1979):** A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure, *Scand J of Statist*, 6: 65-70.
- Hou J., Gomes A. S., Paul D. L., and Goodenough D. A. (2006):** Study of claudin function by RNA interference, *J Biol Chem*, 281: 36117-23.
- Huang X. L., Yi W. Q., Zhang M., Ouyang Q., and Gan H. T. (2007):** [Expression of phosphatidylinositol 3-kinase and effects of wortmannin on the expression of tumor necrosis factor-alpha in ulcerative colitis], *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 87: 379-82.
- Ikenouchi J., Furuse M., Furuse K., Sasaki H., Tsukita S., and Tsukita S. (2005):** Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells, *J Cell Biol*, 171: 939-45.
- Keller K., Knöss W., Reh K., and Schnädelbach D. (2003):** Phytopharmaka, *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 46: 1036-39.
- Kondo J., Sato F., Kusumi T., Liu Y., Motonari O., Sato T., and Kijima H. (2008):** Claudin-1 expression is induced by tumor necrosis factor-alpha in human pancreatic cancer cells, *Int J Mol Med*, 22: 645-9.
- Koop I. (2013):** Gastroenterologie compact: Alles für Klinik und Praxis. in Koop I. (ed.), *Darm* (Georg Thieme Verlag: Stuttgart).
- Kopp Brigitte (2015):** High acceptance of herbal medicinal products: What does the future hold?, *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 165: 215-16.
- Kreusel K. M., Fromm M., Schulzke J. D., and Hegel U. (1991):** Cl<sup>-</sup> secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6), *Am J Physiol*, 261: C574-82.
- Krug S. M., Fromm M., and Günzel D. (2009):** Two-path impedance spectroscopy for measuring paracellular and transcellular epithelial resistance, *Biophys J*, 97: 2202-11.
- Krug S. M., Günzel D., Conrad M. P., Rosenthal R., Fromm A., Amasheh S., et al. (2012):** Claudin-17 forms tight junction channels with distinct anion selectivity, *Cell Mol Life Sci*, 69: 2765-78.
- Kuipers S. E. (1997):** *Trade in Medicinal Plants*. (FAO: Rome, Italy).
- Kundu J. K., Na H. K., and Surh Y. J. (2009):** Ginger-derived phenolic substances with cancer preventive and therapeutic potential, *Forum Nutr*, 61: 182-92.
- Laemmli U. K. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680-5.
- Lameris A. L., Huybers S., Kaukinen K., Makela T. H., Bindels R. J., Hoenderop J. G., and Nevalainen P. I. (2013):** Expression profiling of claudins in the human gastrointestinal tract in health and during inflammatory bowel disease, *Scand J Gastroenterol*, 48: 58-69.

- Landete J. M. (2011):** Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health, *Food Research International*, 44: 1150-60.
- Langhorst J., Varnhagen I., Schneider S. B., Albrecht U., Rueffer A., Stange R., et al. (2013):** Randomised clinical trial: a herbal preparation of myrrh, chamomile and coffee charcoal compared with mesalazine in maintaining remission in ulcerative colitis—a double-blind, double-dummy study, *Aliment Pharmacol Ther*, 38: 490-500.
- Larrosa M., Gonzalez-Sarrias A., Yanez-Gascon M. J., Selma M. V., Azorin-Ortuno M., Toti S., et al. (2010):** Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism, *J Nutr Biochem*, 21: 717-25.
- Laukoetter M. G., Nava P., Lee W. Y., Severson E. A., Capaldo C. T., Babbin B. A., et al. (2007):** JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo, *J Exp Med*, 204: 3067-76.
- Li N., Gu L., Qu L., Gong J., Li Q., Zhu W., and Li J. (2010):** Berberine attenuates pro-inflammatory cytokine-induced tight junction disruption in an in vitro model of intestinal epithelial cells, *Eur J Pharm Sci*, 40: 1-8.
- Li Y., Yao J., Han C., Yang J., Chaudhry M. T., Wang S., et al. (2016):** Quercetin, Inflammation and Immunity, *Nutrients*, 8: 167.
- Li Z., Geng Y. N., Jiang J. D., and Kong W. J. (2014):** Antioxidant and anti-inflammatory activities of berberine in the treatment of diabetes mellitus, *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014: 289264.
- Ling H., Yang H., Tan S. H., Chui W. K., and Chew E. H. (2010):** 6-Shogaol, an active constituent of ginger, inhibits breast cancer cell invasion by reducing matrix metalloproteinase-9 expression via blockade of nuclear factor-kappaB activation, *Br J Pharmacol*, 161: 1763-77.
- Liu Y., Wang L., Lin X. Y., Wang J., Yu J. H., Miao Y., and Wang E. H. (2012):** Anti-apoptotic effect of claudin-1 on TNF-alpha-induced apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells, *Tumour Biol*, 33: 2307-15.
- Luettig J., Rosenthal R., Barmeyer C., and Schulzke J. D. (2015):** Claudin-2 as a mediator of leaky gut barrier during intestinal inflammation, *Tissue Barriers*, 3: e977176.
- Luettig J., Rosenthal R., Lee I. M., Krug S. M., and Schulzke J. D. (2016):** The ginger component 6-shogaol prevents TNF-alpha-induced barrier loss via inhibition of PI3K/Akt and NF-kappaB signaling, *Mol Nutr Food Res*.
- Manders E. M. M., Verbeek F. J., and Aten J. A. (1993):** Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images, *J Microsc*, 169: 375-82.
- Manjula N., Gayathri B., Vinaykumar K. S., Shankernarayanan N. P., Vishwakarma R. A., and Balakrishnan A. (2006):** Inhibition of MAP kinases by crude extract and pure compound isolated from *Commiphora mukul* leads to down regulation of TNF-alpha, IL-1beta and IL-2, *Int Immunopharmacol*, 6: 122-32.



- Mankertz J., Amasheh M., Krug S. M., Fromm A., Amasheh S., Hillenbrand B., et al. (2009):** TNF $\alpha$  up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling, *Cell Tissue Res*, 336: 67-77.
- Marin M., Maria Giner R., Rios J. L., and Recio M. C. (2013):** Intestinal anti-inflammatory activity of ellagic acid in the acute and chronic dextrane sulfate sodium models of mice colitis, *J Ethnopharmacol*, 150: 925-34.
- Martin-Padura I., Lostaglio S., Schneemann M., Williams L., Romano M., Fruscella P., et al. (1998):** Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration, *J Cell Biol*, 142: 117-27.
- Mckay D. M., and Singh P. K. (1997):** Superantigen activation of immune cells evokes epithelial (T84) transport and barrier abnormalities via IFN-gamma and TNF alpha: inhibition of increased permeability, but not diminished secretory responses by TGF-beta2, *J Immunol*, 159: 2382-90.
- Mencarelli A., Renga B., Palladino G., Distrutti E., and Fiorucci S. (2009):** The plant sterol guggulsterone attenuates inflammation and immune dysfunction in murine models of inflammatory bowel disease, *Biochem Pharmacol*, 78: 1214-23.
- Milatz S. (2010):** Funktionelle Charakterisierung des Tight Junction-Proteins Claudin-3 in Epithel- und Endothelzellen Dissertation, Humboldt-Universität Berlin
- Milatz S., Krug S. M., Rosenthal R., Günzel D., Muller D., Schulzke J. D., et al. (2010):** Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes, *Biochim Biophys Acta*, 1798: 2048-57.
- Mineta K., Yamamoto Y., Yamazaki Y., Tanaka H., Tada Y., Saito K., et al. (2011):** Predicted expansion of the claudin multigene family, *FEBS Lett*, 585: 606-12.
- Molodecky N. A., Soon I. S., Rabi D. M., Ghali W. A., Ferris M., Chernoff G., et al. (2012):** Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review, *Gastroenterology*, 142: 46-54 e42; quiz e30.
- Mowat C., Cole A., Windsor A., Ahmad T., Arnott I., Driscoll R., et al. (2011):** Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults, *Gut*, 60: 571-607.
- Murch S. H., Braegger C. P., Walker-Smith J. A., and Macdonald T. T. (1993):** Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease, *Gut*, 34: 1705-9.
- Neurath M. F. (2014):** Cytokines in inflammatory bowel disease, *Nat Rev Immunol*, 14: 329-42.
- Nietzki R. (1897):** *Chemie der organischen Farbstoffe* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg).
- Oeckinghaus A., Hayden M. S., and Ghosh S. (2011):** Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways, *Nat Immunol*, 12: 695-708.
- Ohm Georg Simon (1827):** *Die galvanische Kette* (Riemann: Berlin).
- Oshima T., Miwa H., and Joh T. (2008):** Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis, *J Gastroenterol Hepatol*, 23 Suppl 2: S146-50.

- Pan M. H., Hsieh M. C., Hsu P. C., Ho S. Y., Lai C. S., Wu H., et al. (2008):** 6-Shogaol suppressed lipopolysaccharide-induced up-expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages, *Mol Nutr Food Res*, 52: 1467-77.
- Piontek J., Winkler L., Wolburg H., Muller S. L., Zuleger N., Piehl C., et al. (2008):** Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins, *FASEB J*, 22: 146-58.
- Poritz L. S., Garver K. I., Tilberg A. F., and Koltun W. A. (2004):** Tumor necrosis factor alpha disrupts tight junction assembly, *J Surg Res*, 116: 14-8.
- Prasad S., Mingrino R., Kaukinen K., Hayes K. L., Powell R. M., Macdonald T. T., and Collins J. E. (2005):** Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells, *Lab Invest*, 85: 1139-62.
- Raleigh D. R., Marchiando A. M., Zhang Y., Shen L., Sasaki H., Wang Y., et al. (2010):** Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions, *Mol Biol Cell*, 21: 1200-13.
- Reimund J. M., Wittersheim C., Dumont S., Muller C. D., Kenney J. S., Baumann R., et al. (1996):** Increased production of tumour necrosis factor-alpha interleukin-1 beta, and interleukin-6 by morphologically normal intestinal biopsies from patients with Crohn's disease, *Gut*, 39: 684-9.
- Reinecker H. C., Steffen M., Witthoef T., Pflueger I., Schreiber S., Macdermott R. P., and Raedler A. (1993):** Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease, *Clin Exp Immunol*, 94: 174-81.
- Repha Myrrhinil-Intest, Repha, Accessed 27.07.2016.** <https://www.myrrhinil.de/>.
- Rosen M. J., Chaturvedi R., Washington M. K., Kuhnhein L. A., Moore P. D., Coggeshall S. S., et al. (2013):** STAT6 deficiency ameliorates severity of oxazolone colitis by decreasing expression of claudin-2 and Th2-inducing cytokines, *J Immunol*, 190: 1849-58.
- Rosen M. J., Frey M. R., Washington M. K., Chaturvedi R., Kuhnhein L. A., Matta P., et al. (2011):** STAT6 activation in ulcerative colitis: a new target for prevention of IL-13-induced colon epithelial cell dysfunction, *Inflamm Bowel Dis*, 17: 2224-34.
- Rosenthal R., Milatz S., Krug S. M., Oelrich B., Schulzke J. D., Amasheh S., et al. (2010):** Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel, *J Cell Sci*, 123: 1913-21.
- Rosillo M. A., Sanchez-Hidalgo M., Cardeno A., Aparicio-Soto M., Sanchez-Fidalgo S., Villegas I., and De La Lastra C. A. (2012):** Dietary supplementation of an ellagic acid-enriched pomegranate extract attenuates chronic colonic inflammation in rats, *Pharmacol Res*, 66: 235-42.
- Ross J. A., and Kasum C. M. (2002):** Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety, *Annu Rev Nutr*, 22: 19-34.
- Sanchez-Munoz F., Dominguez-Lopez A., and Yamamoto-Furusho J. K. (2008):** Role of cytokines in inflammatory bowel disease, *World J Gastroenterol*, 14: 4280-8.



- Schmitz H., Barmeyer C., Fromm M., Runkel N., Foss H. D., Bentzel C. J., et al. (1999a):** Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis, *Gastroenterology*, 116: 301-9.
- Schmitz H., Barmeyer C., Gitter A. H., Wullstein F., Bentzel C. J., Fromm M., et al. (2000):** Epithelial barrier and transport function of the colon in ulcerative colitis, *Ann N Y Acad Sci*, 915: 312-26.
- Schmitz H., Fromm M., Bentzel C. J., Scholz P., Detjen K., Mankertz J., et al. (1999b):** Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6, *J Cell Sci*, 112: 137-46.
- Schumann M., Günzel D., Buergel N., Richter J. F., Troeger H., May C., et al. (2012):** Cell polarity-determining proteins Par-3 and PP-1 are involved in epithelial tight junction defects in coeliac disease, *Gut*, 61: 220-8.
- Seeram N. P., Zhang Y., Mckeever R., Henning S. M., Lee R. P., Suchard M. A., et al. (2008):** Pomegranate juice and extracts provide similar levels of plasma and urinary ellagitannin metabolites in human subjects, *J Med Food*, 11: 390-4.
- Shapiro H., Singer P., Halpern Z., and Bruck R. (2007):** Polyphenols in the treatment of inflammatory bowel disease and acute pancreatitis, *Gut*, 56: 426-35.
- Shen L., Su L., and Turner J. R. (2009):** Mechanisms and functional implications of intestinal barrier defects, *Dig Dis*, 27: 443-9.
- Shen T., Li G. H., Wang X. N., and Lou H. X. (2012):** The genus *Commiphora*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology, *J Ethnopharmacol*, 142: 319-30.
- Shen T., and Lou H. X. (2008):** Bioactive constituents of myrrh and frankincense, two simultaneously prescribed gum resins in chinese traditional medicine, *Chem Biodivers*, 5: 540-53.
- Shin K., Fogg V. C., and Margolis B. (2006):** Tight junctions and cell polarity, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22: 207-35.
- Shiozaki A., Bai X. H., Shen-Tu G., Moodley S., Takeshita H., Fung S. Y., et al. (2012):** Claudin 1 mediates TNFalpha-induced gene expression and cell migration in human lung carcinoma cells, *PLoS One*, 7: e38049.
- Singh A. B., Sharma A., and Dhawan P. (2010):** Claudin family of proteins and cancer: an overview, *J Oncol*, 2010: 541957.
- Sohn Y., Han N. Y., Lee M. J., Cho H. J., and Jung H. S. (2013):** [6]-Shogaol inhibits the production of proinflammatory cytokines via regulation of NF-kappaB and phosphorylation of JNK in HMC-1 cells, *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 35: 462-70.
- Staehelin L. A. (1973):** Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions, *J Cell Sci*, 13: 763-86.
- Staehelin L. A., Mukherjee T. M., and Williams A. W. (1969):** Freeze-etch appearance of the tight junctions in the epithelium of small and large intestine of mice, *Protoplasma*, 67: 165-84.

- Steed E., Rodrigues N. T., Balda M. S., and Matter K. (2009):** Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family, *BMC Cell Biol*, 10: 95.
- Stoner G. D., Sardo C., Apseoff G., Mullet D., Wargo W., Pound V., et al. (2005):** Pharmacokinetics of anthocyanins and ellagic acid in healthy volunteers fed freeze-dried black raspberries daily for 7 days, *J Clin Pharmacol*, 45: 1153-64.
- Su S. L., Hua Y. Q., Wang Y. Y., Gu W., Zhou W., Duan J. A., et al. (2012):** Evaluation of the anti-inflammatory and analgesic properties of individual and combined extracts from *Commiphora myrrha*, and *Boswellia carterii*, *Journal of Ethnopharmacology*, 139: 649-56.
- Suenaert P., Bulteel V., Lemmens L., Noman M., Geypens B., Van Assche G., et al. (2002):** Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease, *Am J Gastroenterol*, 97: 2000-4.
- Suzuki T., and Hara H. (2009):** Quercetin enhances intestinal barrier function through the assembly of zonula [corrected] occludens-2, occludin, and claudin-1 and the expression of claudin-4 in Caco-2 cells, *J Nutr*, 139: 965-74.
- Tamura A., Hayashi H., Imasato M., Yamazaki Y., Hagiwara A., Wada M., et al. (2011):** Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na<sup>+</sup> deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine, *Gastroenterology*, 140: 913-23.
- Tan B. S., Kang O., Mai C. W., Tiong K. H., Khoo A. S., Pichika M. R., et al. (2013):** 6-Shogaol inhibits breast and colon cancer cell proliferation through activation of peroxisomal proliferator activated receptor gamma (PPARgamma), *Cancer Lett*, 336: 127-39.
- Tang Y., Clayburgh D. R., Mittal N., Goretsky T., Dirisina R., Zhang Z., et al. (2010):** Epithelial NF-kappaB enhances transmucosal fluid movement by altering tight junction protein composition after T cell activation, *Am J Pathol*, 176: 158-67.
- Taylor C. T., Winter D. C., Skelly M. M., O'donoghue D. P., O'sullivan G. C., Harvey B. J., and Baird A. W. (1999):** Berberine inhibits ion transport in human colonic epithelia, *Eur J Pharmacol*, 368: 111-8.
- Thongon N., and Krishnamra N. (2012):** Apical acidity decreases inhibitory effect of omeprazole on Mg(2+) absorption and claudin-7 and -12 expression in Caco-2 monolayers, *Experimental and Molecular Medicine*, 44: 684-93.
- Tillhon M., Guaman Ortiz L. M., Lombardi P., and Scovassi A. I. (2012):** Berberine: new perspectives for old remedies, *Biochem Pharmacol*, 84: 1260-7.
- Ussing H. H. (1949):** The active ion transport through the isolated frog skin in the light of tracer studies, *Acta Physiol Scand*, 17: 1-37.
- Valenzano M. C., Diguilio K., Mercado J., Teter M., To J., Ferraro B., et al. (2015):** Remodeling of Tight Junctions and Enhancement of Barrier Integrity of the CACO-2 Intestinal Epithelial Cell Layer by Micronutrients, *PLoS One*, 10: e0133926.
- Van Deventer S. J. (1997):** Tumour necrosis factor and Crohn's disease, *Gut*, 40: 443-8.
- Van Itallie C. M., and Anderson J. M. (2014):** Architecture of tight junctions and principles of molecular composition, *Semin Cell Dev Biol*, 36: 157-65.

- Van Itallie C. M., Fanning A. S., and Anderson J. M. (2003):** Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins, *Am J Physiol Renal Physiol*, 285: F1078-84.
- Van Itallie C. M., Rogan S., Yu A., Vidal L. S., Holmes J., and Anderson J. M. (2006):** Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities, *Am J Physiol Renal Physiol*, 291: 1288-99.
- Wang F., Graham W. V., Wang Y., Witkowski E. D., Schwarz B. T., and Turner J. R. (2005):** Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression, *Am J Pathol*, 166: 409-19.
- Wang N., Yu H., Ma J., Wu W., Zhao D., Shi X., et al. (2010):** Evidence for tight junction protein disruption in intestinal mucosa of malignant obstructive jaundice patients, *Scand J Gastroenterol*, 45: 191-9.
- Weber C. R., Nalle S. C., Tretiakova M., Rubin D. T., and Turner J. R. (2008):** Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation, *Lab Invest*, 88: 1110-20.
- Wu Y., and Zhou B. P. (2010):** TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion, *Br J Cancer*, 102: 639-44.
- Yan F., Wang L., Shi Y., Cao H., Liu L., Washington M. K., et al. (2012):** Berberine promotes recovery of colitis and inhibits inflammatory responses in colonic macrophages and epithelial cells in DSS-treated mice, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 302: G504-14.
- Yu Y., Zick S., Li X., Zou P., Wright B., and Sun D. (2011):** Examination of the pharmacokinetics of active ingredients of ginger in humans, *Aaps J*, 13: 417-26.
- Zeissig S., Bürgel N., Günzel D., Richter J., Mankertz J., Wahnschaffe U., et al. (2007):** Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease, *Gut*, 56: 61-72.
- Zhang H. M., Zhao L., Li H., Xu H., Chen W. W., and Tao L. (2014):** Research progress on the anticarcinogenic actions and mechanisms of ellagic acid, *Cancer Biol Med*, 11: 92-100.
- Zhu Y., Warin R. F., Soroka D. N., Chen H., and Sang S. (2013):** Metabolites of ginger component [6]-shogaol remain bioactive in cancer cells and have low toxicity in normal cells: chemical synthesis and biological evaluation, *PLoS One*, 8: e54677.
- Zick S. M., Djuric Z., Ruffin M. T., Litzinger A. J., Normolle D. P., Alrawi S., et al. (2008):** Pharmacokinetics of 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, and 6-shogaol and conjugate metabolites in healthy human subjects, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17: 1930-6.

## ANHANG

**Tabelle 8: Verbrauchslösungen für die Zellkultur.**

Zellkulturmedium und Zusätze	Hersteller
RPMI-1640 Medium Aqmedia™ (R2405)	
Minimum Essential Medium Eagle Aqmedia™ (M0446)	
Trypsin-EDTA solution (1×)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i>
Fetales Bovine Serum (FBS)	
Penicillin-Streptomycin (100×)	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	

**Tabelle 9: Testsubstanzen.**

Testsubstanzen	angesetzte Stammlösung*	Hersteller
6-Shogaol, ≥90 %	100 mM ad DMSO	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i>
Ellagic acid hydrate (Ellagsäure)	100 mM ad DMSO	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i>
Myrrhe (Harzfraktion)	500 g/l ad Ethanol	<i>Repha GmbH Biologische Arzneimittel</i>
BAY 11-7082, ≥98 %	50 mM ad DMSO	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i>
LY294002, >99 %	10 mM ad Ethanol	<i>Cell Signaling Technology,</i>
LY294002, >98 %	50 mM ad Ethanol	<i>Cayman Chemical</i>
GW9662, >98 %	50 mM ad DMSO	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i>
Rosiglitazon, ≥98 %	50 mM ad DMSO	<i>Cayman Chemical</i>
Recombinant Human TNF-α, ≥ 2 × 10 <sup>7</sup> U/mg	10 <sup>6</sup> U/ml ad PBS <sup>-</sup>	<i>PeptoTech GmbH</i>

\*Stammlösungen wurden aliquotiert und in -20 °C aufbewahrt.

**Tabelle 10: Chemikalien und Verbrauchskits.**

Laborchemikalien	Hersteller
Acrylamid-Bis Fertiglösung 30 % (37,5:1)	Merck KGaA
Agar Purified	Oxoid™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.)
Albumin Fraction V (Bovine Serum Albumin -BSA)	Biomol GmbH
Albumin Standard Ampules	Pierce™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Bromphenolblau	Amersham plc (GE Healthcare)
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck KGaA
Carbogen (95 % O <sub>2</sub> , 5 % CO <sub>2</sub> )	Linde AG
Chloroform	Merck KGaA
Complete miniEDTA-free	Roche Diagnostics GmbH
4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Roche Diagnostics GmbH
D(+)-Glukose	Carl Roth GmbH + Co. KG
D(+)-Mannose	FLUKA (Sigma-Aldrich)
Dinatriumphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck KGaA
Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) mit / ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> (PBS <sup>+/-</sup> )	Gibco® (Thermo Fisher Scientific, Inc.)
Essigsäurepentylester (Amylacetat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ethylenbis(oxyethylennitrilo)-tetraessigsäure (Ethylene glycol tetraacetic acid - EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA
Ethanol, 100 %, absolut	J.T. Baker
Ethanol, 80 %	Herbeta-Arzneimittel
Fötale Kälberserum (Fetal bovine serum - FBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Fluoreszein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
FITC-Dextran 4000	TdB Consultancy AB
Glutaraldehyd	SERVA Electrophoresis GmbH
β-Glycerophosphate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Glycerol	SERVA Electrophoresis GmbH
Glycin	SERVA Electrophoresis GmbH
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Isopropanol	J.T. Baker
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck KGaA
Kohlenstoffsioxid (CO <sub>2</sub> )	Linde AG
Leupeptin, microbial, ≥90 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

---

Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	<i>Merck KGaA</i>
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	<i>Merck KGaA</i>
Mannitol	<i>Merck KGaA</i>
Methanol	<i>Merck KGaA</i>
Natriumazid	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i>
Natriumchlorid (NaCl)	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG</i>
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	<i>Merck KGaA</i>
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	<i>Merck KGaA</i>
Natriumhypochlorit (NaClO)	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG</i>
PageRuler™ Prestained Protein Ladder/	
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	<i>Thermo Fisher Scientific, Inc.</i>
Paraformaldehyd (PFA), 16 %	<i>Science Services GmbH</i>
peqGOLD RNAPure™	<i>VWR Peqlab</i>
Phenylmethanesulfonylfluorid (PMSF)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i>
ProTaq Mount Fluor	<i>Biocyc GmbH &amp; Co. KG</i>
R 442D	<i>TEGA-Technische Gase und Gasetechnik GmbH</i>
Roti-Histofix 4 %	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG</i>
sab simplex® Suspension	<i>Pfizer Pharma GmbH</i>
Natriumdodecylsulfat (SDS, Natriumdodecylsulfat)	<i>SERVA Electrophoresis GmbH</i>
Sodium orthovanadate (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	<i>SERVA Electrophoresis GmbH</i>
Sodium pyrophosphate tetrabasic (Tetranatriumdiphosphat - Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> )	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i>
<i>TaqMan</i> ® Gene Expression Assay Human <i>CLDN15</i> (Hs00204982_m1) Human GAPD (GAPDH) Endogenous Control (NM_002046.3)	<i>Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.)</i>
<i>TaqMan</i> ® Universal PCR Master Mix	<i>Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.)</i>
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG</i>
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	<i>Merck KGaA</i>
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	<i>Bio-Rad Laboratories, Inc.</i>
1 M Tris Buffer, pH 7.5 / 8.8	<i>SERVA Electrophoresis GmbH</i>
Triton X-100	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i>
TWEEN®20	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i>
Wasser (RNase-frei)	<i>Biochrom GmbH</i>
Ziegenserum	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i>

Gebrauchsfertige Kits	Hersteller
CCK-8 (Cell Counting Kit-8)	<i>Dojindo Laboratories</i>
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	<i>Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.)</i>
Lumi-LightPLUS Western Blotting Kit	<i>Roche Diagnostics GmbH</i>
BCA Protein Assay	<i>Pierce™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.)</i>

**Tabelle 11: Primär- und Sekundärantikörper.**

Primärantikörper						
Herkunft/ Spezie	anti-	Bezeichnung	Verdünnung		Hersteller	
			IF*	WB*		
<i>Kaninchen</i>	anti-	Claudin-1/-2/-3/-7/-8/-15	1:250	1:1000	<i>Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.)</i>	
<i>Maus</i>	anti-	Claudin-4	1:250	1:2000		
<i>Kaninchen</i>	anti-	Claudin-5	1:250	-		
<i>Maus</i>	anti-	Claudin-5	-	1:1000		
<i>Maus</i>	anti-	Claudin-15	1:250	1:500		
<i>Maus</i>	anti-	Zonula occludens 1	-	1:1000	<i>Becton, Dickinson and Company</i>	
<i>Maus</i>	anti-	β-Aktin	-	1:10000	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</i>	
<i>Kaninchen</i>	anti-	<i>cleaved</i> Caspase-3	1:250	1:1000	<i>Cell Signaling Technology</i>	
<i>Kaninchen</i>	anti-	<i>phospho</i> -p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204, D13.14.4E)	-	1:2000		
		<i>phospho</i> -Akt (Thr308, C31E5E)/ -Akt (Ser473, D9E)/ -p38 MAPK (Thr180/Tyr182, D3F9)/				
<i>Kaninchen</i>	anti-	-NFκB p65 (Ser536, 93H1)/ -IκBα (Ser32, 14D4)/ -Src Family (Tyr416, D49G4)/ -Src (Tyr527)	-	1:1000		
Sekundärantikörper						
Herkunft/Spezie	anti-	Target Spezies	Target Klasse - Antikörperform (Konjugat)	Verdünnung		Hersteller
				IF*	WB**	
		<i>Kaninchen</i>	IgG - <i>gesamt</i> (AlexaFluor®594)	1:500	-	<i>Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.)</i>
		<i>Kaninchen</i>	IgG - <i>gesamt</i> (DyLight™488)	1:500	-	
<i>Ziege</i>	anti-	<i>Maus</i>	<i>AffiniPure</i> IgG - <i>F(ab)₂</i> Fragment (HRP)	-	1:500	<i>Jackson ImmunoResearch, Inc.</i>
		<i>Kaninchen</i>	IgG - <i>F(ab)₂</i> Fragment (HRP)	-	1:500	
		<i>Maus</i>	IgG - <i>Fcy</i> Fragment (Cyanine Cy™2)	1:500	-	

\*IF – Immunofluoreszenz, \*\*WB – Western Blot



**Tabelle 12: Rezepturen der angesetzten Lösungen.**

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung			
Blockierlösung (IF)	6	%	Ziegenserum	
	1	%	BSA	ad PBS <sup>+</sup>
Blockierlösung (WB)	5	%	BSA	
	0,04	%	Natriumazid	ad TBST
Elektrophoresen (EPHO)-Puffer	10	%	10x Puffer West	
	0,1	%	SDS	
Glut1-Puffer (Fixierung)	60	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	
	10	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	2,5	%	Glutaraldehyd	
Glut2-Puffer (zur Aufbewahrung)	60	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	
	10	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	0,25	%	Glutaraldehyd	
Gesamtlysepuffer	150	mM	NaCl	
	10	mM	Tris buffer pH 7.5	
	0,5	%	Triton X-100	
	1	%	SDS	
			1 Tablette Proteaseinhibitor pro 10 ml	
Laemmli-Probenpuffer (5×)	125	mM	Tris-HCl, pH 6.8	
	500	mM	DTT	
	50	%	Glycerol	
	10	%	SDS	
	0,001	%	Bromphenolblau	

Mannitol-Ringer <i>für monovalente Kationen</i>	238	mM	Mannitol	
	21	mM	NaHCO <sub>3</sub>	
	10	mM	Glucose	
	5,4	mM	KCl	
	3	mM	HEPES	
	1,2	mM	CaCl <sub>2</sub>	
	1	mM	MgSO <sub>4</sub>	pH 7,8
Natrium-Ringer <i>für monovalente Kationen</i>	119	mM	NaCl	
	21	mM	NaHCO <sub>3</sub>	
	10	mM	Glucose	
	5,4	mM	KCl	
	3	mM	HEPES	
	1,2	mM	CaCl <sub>2</sub>	
	1	mM	MgSO <sub>4</sub>	pH 7,8
PI3K-Puffer	150	mM	NaCl	
	20	mM	Tris Buffer pH 7.5	
	2.5	mM	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	
	1	mM	EDTA	
	1	mM	EGTA	
	1	%	Triton X-100	
	1	mM	β-Glycerophosphat	
	1	mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	
	1	mM	PSMF	
	1	µg/ml	Leupeptin	
Ringerlösung	113,6	mM	NaCl	
	21	mM	NaHCO <sub>3</sub>	
	10	mM	Glucose	
	5,4	mM	KCl	
	2,4	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
	1,2	mM	MgCl <sub>2</sub>	
	1,2	mM	CaCl <sub>2</sub>	
	0,6	mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	versetzt mit Carbogas

---

Sammelgel	5,1	%	Acrylamid-Bis Fertiglösung 30 %	
	0,125	M	Tris-HCl, pH 6,8	
	0,1	%	SDS	
	0,1	%	APS	
	0,1	%	TEMED	
<hr/>				
TBST	500	mM	NaCl	
	20	mM	TRIS	
	0,1	%	Tween	pH7.3
<hr/>				
Transferpuffer	10	%	10x West-Puffer	
	10	%	Methanol	
<hr/>				
Trenngel 12,5 %	12,5	%	Acrylamid	
	0,35	M	Tris Buffer pH 8,8	
	0,1	%	SDS	
	0,1	%	APS	
	0,1	%	TEMED	
<hr/>				
10x West-Puffer	1,9	M	Glycin	
	0,25	M	Tris	pH 8,1-8,4

**Tabelle 13: Übersicht der Verbrauchsmaterialien.**

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
CryoPure Röhren (1,6 ml)	Sarstedt AG & Co.
Dialysekammern Slide-A-Lyzer® (3 ml, 2K MWCO)	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Eppendorf-Gefäße (1,5 ml)	Eppendorf AG
Einmal-Spritzen (1 ml, 20 ml)	Becton, Dickinson and Company; B. Braun Melsungen AG
Falcon® serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Coming Life Sciences
Falcon®-Röhrchen (15, 50 ml)	Coming Life Sciences
Filterpapier, Whatman® 3MM papers	Whatman™ (GE Healthcare)
Kanülen: 20G 1½"/ 25G ×1"	Becton, Dickinson and Company
Kupfermetzgrids	Ted Pella, Inc.
Mehrlochplatten 6-, 12-, 24-Lochplatten (Cell-Culture Treated Multidishes) optische 96-Lochplatten	Nunc™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.) Eppendorf AG
Objektträger	Gerhard Menzel GmbH (Thermo Fisher Scientific, Inc.)
Parafilm M® All-Purpose Laboratory Film	Bemis Company, Inc.
Pasteurpipetten, Glas, 150 mm	Lab Logistic Group GmbH
Pipettenspitzen, gestopft und ungestopft (0,5 – 1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Eppendorf AG, Biozym Diagnostik GmbH
Polyvinylidendifluorid (PVDF) -Membran	PerkinElmer, Inc.
Schläuche (Weich-Polyethylen) PE-LD ø 2x3 mm PE-LD ø 1x2 mm	Semadeni AG
Skalpelle (No.11 und No.20)	FEATHER Safety Razor Co.
Sterilfilter, Puradisc FP 30 Syringe Filter	Whatman™ (GE Healthcare)
Transparentfolien (OHP)	Soennecken eG
Zellkultureinsatz Millicell, 12 mm, Polycarbonat, 3,0 / 0,4 µm (PCF-Filter)	Merck KGaA
Zellkulturflaschen, 75 cm², 25 cm²	Nunc™ (Thermo Fisher Scientific, Inc.), Becton, Dickinson and Company
Zellkulturschalen, unbeschichtet, Ø 6 cm	Nunc™ (Thermo Fisher Scientific, Inc)
Zellschaber	Sarstedt AG & Co.

**Tabelle 14: Übersicht der verwendeten Geräte.**

Geräte	Hersteller
Begasungsbrutschränke	<i>Heraeus; Binder GmbH</i>
Feinwaage	<i>Sartorius AG</i>
Fusion Fx7 - Chemilumineszenz- & Fluoreszenzi-Imaging	<i>Vilber Lourmat Deutschland GmbH</i>
Gefrierbruchgerät Denton Vacuum DV-502	<i>Denton Vacuum</i>
Heizblöcke	<i>Grant Instrument; Eppendorf AG</i>
HI 9017 microprocessor, pH-Meter mit RS232C	<i>Hanna Instruments Deutschland GmbH</i>
Ohmmeter	<i>Inst. f. Klinische Physiologie, Charité</i>
Magnetrührer/Heizplatte IKA® -Combimag Reo	<i>IKA-Werke GmbH &amp; CO. KG</i>
Magnetrührfische	<i>Merck KGaA</i>
Mikroskope	
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop 510 META	<i>Carl Zeiss AG</i>
Elektronenmikroskop Zeiss 902 A	<i>Carl Zeiss AG</i>
Lichtmikroskop	<i>Olympus Corporation</i>
Mikrotiterplatten-Lesegeräte	
Spectra Classic	<i>Lencore Inc.</i>
Infinite M200	<i>Tecan GmbH</i>
Mini-PROTEAN® Tetra Cell/ Blotting Module	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH</i>
Mr. Frosty™ Freezing Container	<i>Thermo Fisher Scientific, Inc.</i>
NanoDrop 2000	<i>Thermo Fisher Scientific, Inc.</i>
Netzgeräte Power Pac 200 / 300	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH</i>
Neubauer-Zählkammer	<i>BRAND GMBH + CO KG</i>
Pipettierhilfe, accu-jet®	<i>BRAND GMBH + CO KG</i>
Sterilwerkbänke	<i>Thermo Electron Corporation (Thermo Fisher Scientific, Inc.), Gelaire</i>
Thermocycler 7500 Fast Real-Time PCR Systems	<i>Life Technologies GmbH</i>
Trockenschrank	<i>Heraeus</i>
Ultraschallbad	<i>Branson Ultrasonics Corporation</i>
Ultraschallprozessor UP50H	<i>Hielscher Ultrasonics GmbH</i>
Ussing-Kammern	<i>Inst. f. Klinische Physiologie, Charité</i>
Vortex-Homogenisator-Geräte	<i>Pharmacia Biotech Europe GmbH, Bender &amp; Hobein AG</i>
Wasserbäder	<i>Köttermann GmbH &amp; Co KG; Haake</i>
Widerstandsmessgerät	<i>Inst. f. Klinische Physiologie, Charité</i>
Wiegeschüttler Wippe WT12	<i>Biometra GmbH</i>
Zentrifugen	
Centrifuge 5415C	<i>Eppendorf AG</i>
mini-Zentrifuge Sprout™	<i>Heathrow Scientific</i>
Hermle Z 233MK-2	<i>HERMLE Labortechnik GmbH</i>

**Tabelle 15: Programme zur Erhebung und Auswertung der Daten.**

Programm	Anwendungsbereich	Hersteller
AIDA Image Analyzer Version 3.21	Densitometrische Auswertung der Western Blots	<i>raytest Isotopenmessgeraete GmbH</i>
Analogon	Datenaufnahme der Ussing- Kammern	<i>Institut für Klinische Physiologie, Charité</i>
Easywin Fitting, Version V6.0a	Photometrische Auswertung	<i>Tecan Trading AG</i>
Excel - Microsoft Office	Datenauswertung	<i>Microsoft Corporation</i>
GraphPad Prism 6	Erstellung Diagramme, Statistische Auswertung	<i>GraphPad Software, Inc</i>
Image J	Bildbearbeitung	<i>Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, <a href="http://imagej.nih.gov/ij/">http://imagej.nih.gov/ij/</a>, 1997- 2016.</i>
ZEN	Bildbearbeitung für konfokales Mikroskop	<i>Carl Zeiss Microimaging, LLC.</i>

## DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke dafür bedanken, dass er es mir ermöglicht hat meine Experimente zu dieser Dissertation am Institut für Klinische Physiologie im Bereich Ernährungsmedizin der Charité Berlin durchzuführen. Ich danke ihm für seine fortwährende Unterstützung, konstruktiven Anregungen und freundliche Betreuung.

Ebenso dankbar bin ich Prof. Dr. Gerhard P. Püschel (Lehrstuhl für Biochemie der Ernährung der Universität Potsdam) für seine freundliche, konstruktive Betreuung und für die Ermöglichung der Promotion am Institut für Ernährungswissenschaften an der Universität Potsdam.

Mein besonderer Dank gilt auch meiner Mentorin PD. Dr. Rita Rosenthal für ihr großartiges persönliches Engagement und Förderung sowie für alle Anregungen, lehrreichen Korrekturen und den konstruktiven Gesprächen in den gemeinsamen Kaffeepausen.

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. Michael Fromm für die Unterstützung und meinen Kollegen des Instituts, die mich bei meinen Versuchen in jedweder Art unterstützt haben. Besonders danke ich In-Fah M. Lee für ihre Arbeit am Gefrierbruchgerät und Elektronenmikroskop sowie PD. Dr. Susanne Krug für die Hilfe bei der Auswertung der Tight Junction-Aufnahmen. Ich danke all meinen Kollegen für die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre während dieser vier Jahre.

Bei der Sonnenfeld-Stiftung Berlin möchte ich mich sehr für die mir gewährte Förderung meiner Promotion bedanken, denn ohne diese wäre eine Umsetzung meiner Dissertation nicht möglich gewesen.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und Faris danken. *Danke, dass ihr immer verständnisvoll, geduldig und aufmunternd wart, und mich während der gesamten Zeit so ausdauernd und tatkräftig unterstützt habt.*