

**Einfluss des Flavonoids Quercetin
auf die epitheliale Barrierefunktion
der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie Caco-2**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium" (Dr. rer. nat.)

eingereicht an
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

Wissenschaftsdisziplin: Ernährungswissenschaft

vorgelegt von
Susanne Schlichter

Potsdam 2007

This work is licensed under the Creative Commons Attribution-Noncommercial-No Derivative Works 2.0 Germany License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/de/> or send a letter to Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, California, 94105, USA.

Elektronisch veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
<http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2007/1526/>
urn:nbn:de:kobv:517-opus-15269
[<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-15269>]

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	1
1	Flavonoide	1
1.1	Quercetin und Quercetinglykoside.....	2
1.1.1	Vorkommen.....	2
1.1.2	Metabolismus.....	4
1.1.3	Biologische Effekte	6
2	Epithelien	8
2.1	Zellkontakte zwischen Epithelien und Endothelien	8
2.2	Tight Junction	10
2.2.1	Occludin	10
2.2.2	Tricellulin.....	12
2.2.3	Claudin-Familie.....	13
2.2.4	Junctional Adhesion Molecule.....	16
2.3	Humane intestinale Epithelzelllinie Caco-2 als <i>in vitro</i> -Modell	17
3	Zielstellung	18
B	Material und Methoden	19
1	Geräte	19
2	Verbrauchsmaterialien	20
3	Substanzen und Chemikalien	21
4	Gebrauchsfertige Kits	23
5	Enzyme	24
6	Antisera	24
7	Primer	25
8	Biologisches Material	25
9	Zellbiologische Methoden	26
9.1	Kultivierung von Zellen	26
9.2	Behandlung der Zellen mit Testsubstanzen.....	27
9.3	Beschichtung von Deckgläschen mit Poly-L-Lysin	27

10	Elektrophysiologische Methoden.....	28
10.1	Manuelle Messung des transepithelialen Widerstands.....	28
10.2	Widerstands- und Fluxmessungen mittels Ussing-Technik.....	29
10.2.1	Messung von Mannitol-Fluxen.....	30
10.2.2	Messung von Natriumchlorid-Fluxen.....	31
11	Biochemische Methoden	31
11.1	Untersuchung von Substanzen auf Zytotoxizität durch Bestimmung der Laktat-Dehydrogenase-Aktivität.....	31
11.2	Western Blot-Analysen.....	32
11.2.1	Membranprotein-Extraktion aus eukaryontischen Zellkulturen.....	32
11.2.2	Proteinextraktion von Gesamtlisat aus eukaryontischen Zellkulturen.....	33
11.2.3	Proteinbestimmung.....	33
11.2.4	Protein-Auftrennung durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.....	34
11.2.5	Proteintransfer auf PVDF-Membrane.....	36
11.2.6	Immundetektion von Proteinen.....	37
11.3	Immunfluoreszenz-Färbung von Tight Junction-Proteinen.....	38
11.4	Bestimmung der Apoptose-Rate mittels TUNEL-Färbung.....	39
12	Molekularbiologische Methoden	40
12.1	RNA-Isolierung aus eukaryontischen Zellkulturen.....	40
12.2	Polymerase-Kettenreaktion.....	41
12.3	Quantitative mRNA-Bestimmung.....	42
12.4	Klonierung des Claudin-4-Promotors.....	44
12.4.1	Synthese des Claudin-4-Promotors.....	44
12.4.2	DNA-Agarosegel-Elektrophorese.....	45
12.4.3	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	46
12.4.4	Aufreinigung über Säulensysteme.....	46
12.4.5	Ligation des Claudin-4-Promotors in Plasmidvektoren.....	47
12.4.6	Enzymatisches Schneiden von Plasmid-DNA.....	50
12.4.7	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Zellen.....	51
12.4.8	Plasmid-Minipräparation aus kompetenten Zellen.....	53
12.4.9	Sequenzierung von DNA-Abschnitten.....	54
12.4.10	Plasmid-Midipräparation (endotoxinfrei).....	55
12.4.11	Glycerolstocks.....	56
12.5	Bestimmung der Aktivität des Claudin-4-Promotors mittels Luciferase-Reporter-Gen-Assay.....	57
13	Statistische Auswertung.....	59

C	Ergebnisse	60
1	Effekt des Flavonoids Quercetin auf die Barrierefunktion der Caco-2-Zelllinie	60
1.1	Einfluss von Quercetin auf den transepithelialen Widerstand	60
1.2	Zytotoxizität von Quercetin an konfluenten Zellen	63
1.3	Effekt von Quercetin auf den transepithelialen Widerstand nach täglicher Supplementierung des Flavonoids	64
1.4	Einfluss von Quercetin auf den transepithelialen Widerstand in Abhängigkeit vom Zugabekompartiment	65
2	Einfluss von Quercetin auf das Expressionsmuster von Tight Junction-Proteinen	66
2.1	Proteinexpression von Caco-2-Zellen in Kulturschalen	66
2.2	Proteinexpression von Caco-2-Zellen auf permeablen Zellfiltern	68
3	Einfluss von Quercetin auf die Lokalisation der Tight Junction-Proteine	69
4	Einfluss von Quercetin auf die mRNA-Expression von Claudin-4	77
5	Klonierung des Claudin-4-Promotors	78
5.1	Zytotoxizität von Quercetin an subkonfluenten Zellen	78
5.2	Amplifizierung des Claudin-4-Promotors sowie Klonierung in den pCR2.1-TOPO-Vektor.....	79
5.3	Sequenzierung des Claudin-4-Promotors und Umklonierung in den pGL4.10-Vektor	80
5.4	Einfluss von Quercetin auf den Claudin-4-Promotor.....	83
6	Einfluss von Quercetin auf die parazelluläre Durchlässigkeit sowie auf die Permeabilität von Na- und Cl-Ionen.....	85
7	Blockierung des Quercetin-Effekts durch Inhibitoren.....	88
8	Einfluss von Quercetin auf die Apoptose-Rate.....	90
9	Einfluss der Zerfallsprodukte 3,4-Dihydroxy- und 2,4,6-Trihydroxybenzoesäure auf den transepithelialen Widerstand.....	92
10	Einfluss des Quercetin-Glykosids Quercitrin auf den transepithelialen Widerstand.....	94

D	Diskussion	95
1	Einfluss von Quercetin auf die intestinale Barrierefunktion am Epithel der Caco-2-Zelllinie.....	97
1.1	Transepithelialer Widerstand	97
1.2	Tight Junction-Proteine.....	99
1.2.1	Proteinexpression	99
1.2.2	mRNA-Expression von Claudin-4	101
1.2.3	Aktivierung des Claudin-4-Promotors	102
1.2.4	Zelluläre Verteilungsmuster	103
1.3	Permeabilität von Mannitol sowie von Na- und Cl-Ionen	104
1.4	Signaltransduktionsmechanismen von Quercetin.....	106
1.5	Charakterisierung des Wirkungsmechanismus des Quercetin-Effekts auf den transepithelialen Widerstand	109
2	Einfluss der Zerfallsprodukte 3,4-Dihydroxy- und 2,4,6-Trihydroxybenzoesäure auf die Barrierefunktion.....	111
3	Einfluss des Quercetin-Glykosids Quercitrin auf die Barrierefunktion.....	112
4	Einfluss von Quercetin auf die Apoptose.....	113
5	Schlussfolgerung	114
E	Zusammenfassung.....	115
F	Literatur.....	118
G	Anhang	131
1	Abkürzungen.....	131
2	Erklärung zur Dissertation.....	133
3	Lebenslauf.....	134
4	Danksagung	135

A Einleitung

1 Flavonoide

Flavonoide gehören zu der großen Gruppe der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe, die im Gegensatz zu den primären Bestandteilen (Kohlenhydrate, Proteine, Fette und Mineralstoffe) nur in geringen Mengen in Pflanzen vorkommen. Sie sind keine Nährstoffe und dienen daher nicht der Energiegewinnung. Allerdings bieten sie der Pflanzenzelle Schutz vor schädigenden Umwelteinflüssen. Von einigen dieser sekundären Pflanzenstoffe, die in erster Linie als Farb-, Duft- oder Aromastoffe wahrgenommen werden, weiß man, dass sie auch im menschlichen Organismus protektive Funktionen ausüben.

Zur Klasse der Flavonoide zählen mehr als 4000 verschiedene niedermolekulare, polyphenolische Verbindungen, deren Grundstruktur aus dem Flavan-Molekül gebildet wird (Abb. 1). Dieses Molekül besteht aus einem trizyklischen System mit zwei aromatischen und einem heterozyklischen Ring, wobei letzterer ein Sauerstoffatom beinhaltet.

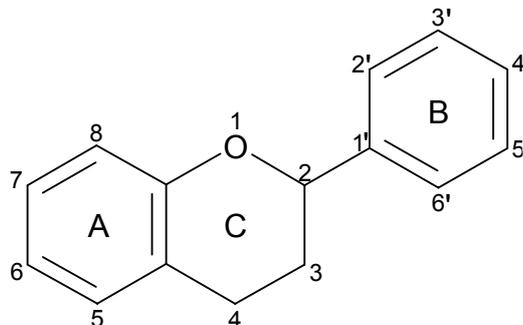
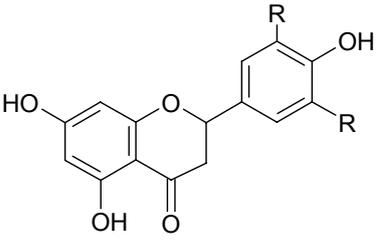
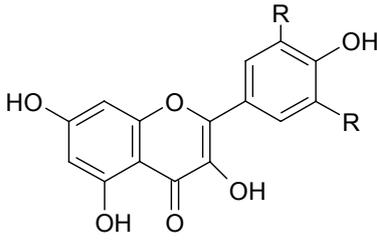
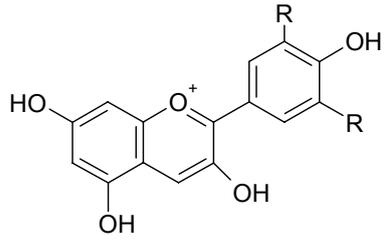
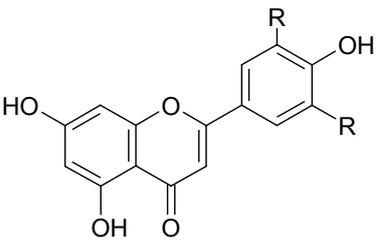
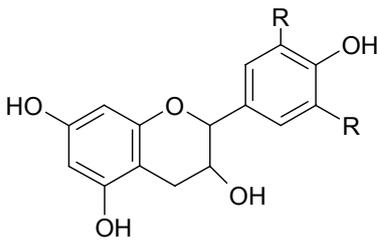
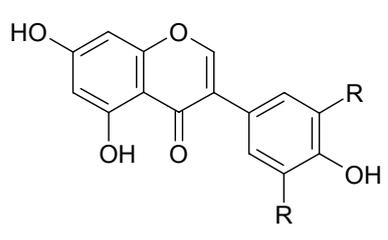


Abb. 1: Struktur des Flavan-Moleküls

Anhand von Unterschieden in der Struktur der Seitenketten und der Position von Doppelbindungen werden die Flavonoide in sechs Untergruppen eingeteilt (Tab. 1). Wichtige Vertreter der einzelnen Subgruppen gibt die Tabelle 1 wieder. Da in dieser Arbeit das Flavonol Quercetin und seine glykosidischen Formen untersucht wurden, soll in den nächsten Abschnitten näher auf diese Substanz eingegangen werden.

Tab. 1: Einteilung der Flavonoide in 6 Untergruppen (Moleküle dieser Subgruppe)

 <p style="text-align: center;">Flavanone (Hesperitin, Naringenin)</p>	 <p style="text-align: center;">Flavonole (<u>Quercetin</u>, Kämpferol)</p>	 <p style="text-align: center;">Anthocyanidine (Malvidin, Cyanidin)</p>
 <p style="text-align: center;">Flavone (Apigenin, Luteolin)</p>	 <p style="text-align: center;">Flavanole (Catechin, Epicatechin)</p>	 <p style="text-align: center;">Isoflavone (Genistein, Daidzein)</p>

1.1 Quercetin und Quercetinglykoside

1.1.1 Vorkommen

Das Flavonol Quercetin (3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavon, Struktur siehe Tab. 3) ist eines der am häufigsten in der Natur vorkommenden Flavonoide. Der durchschnittliche Quercetin-Gehalt von einigen in Mitteleuropa regelmäßig konsumierten Lebensmitteln und Getränken ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Die höchsten Gehalte von Quercetin wurden in Zwiebeln, Grünkohl und Äpfeln nachgewiesen. Aufgrund von individuell unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten und Nahrungspräferenzen kann die täglich aufgenommene Quercetin-Menge starken Schwankungen unterliegen. Frühere Überlegungen gingen von einer hohen Flavonoid-Aufnahme von 1 g pro Tag aus (Kuhnau 1976), was wahrscheinlich eine Überschätzung darstellt (Hollman and Katan 1999). Jones und Hughes (1982) schätzten in den USA eine durchschnittlich Quercetin-Aufnahme von 50 mg am Tag, wobei bei einer reichlichen Zufuhr von Obst und Gemüse sogar eine Zufuhr von 500 mg Quercetin pro Tag erreichbar sein dürfte.

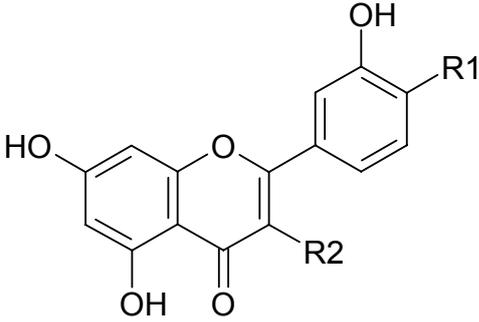
Eine aktuellere Studie setzte die tägliche Gesamtflavonoid-Aufnahme im Vergleich zu Kuhnau (1976) mit etwa 3 mg für Westfinnland und 68 mg für Japan deutlich niedriger an. Von dieser Flavonoidmenge nimmt das Flavonol Quercetin mit schätzungsweise 3 mg für Westfinnland und 35 mg für Japan den größten Anteil ein (Hertog et al., 1995).

Tab. 2: Gehalt von Quercetin in ausgewählten Lebensmitteln nach Hertog (1992; 1993)

Lebensmittel	Gehalt in mg/kg o. mg/l
Zwiebeln	284 - 486
Grünkohl	110
Broccoli	30
Bohnen	11 - 45
Äpfel	21 - 72
Kirschen	15 - 38
Trauben, rot	15
Rotwein	4 - 16
Teeaufgüsse	10 - 25

In der Natur kommen Flavonoide meist in glykosilierter Form vor. Das bedeutet, dass an den phenolischen Gruppen eine oder mehrere Zuckergruppen glykosidisch gebunden sind (Williams and Harborne 1994). Die Tabelle 3 gibt einige häufig vorkommende Formen von Quercetin-Glykosiden wieder.

Tab. 3: Struktur von Quercetin und Quercetin-Glykosiden

		
Quercetin / Glykosid	Struktur	Weitere Bezeichnung
Quercetin	R1 = OH, R2 = OH	
Quercetin-3-rhamnosid	R1 = OH, R2 = Rhamnose	Quercitrin
Quercetin-3-glucosid	R1 = OH, R2 = Glukose	Isoquercitrin
Quercetin-rutinosid	R1 = OH, R2 = Glucorhamnose (Rutinose)	Rutin
Quercetin-4'-glucosid	R1 = Glukose, R2 = OH	Spiraeosid
Quercetin-3,4'-diglucosid	R1 = Glukose, R2 = Glukose	

1.1.2 Metabolismus

Noch vor wenigen Jahren wurde angenommen, dass Flavonoid-Glykoside aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften nur in geringen Mengen im Dünndarm resorbiert werden, statt dessen den Dünndarm passieren und der Zuckerrest im Kolon durch Enterobakterien abgespalten wird (Bokkenheuser et al., 1987). Das Flavonoid-Aglykon kann dann durch Diffusionsprozesse rasch in die Epithelzellen des Dickdarms aufgenommen werden, da es durch seine lipophilen Eigenschaften die Phospholipidschicht der Zellmembran erleichtert durchqueren kann.

Neuere Untersuchungen zeigen allerdings, dass nicht nur das Quercetin-Aglykon, sondern auch die glykosilierten Formen im Dünndarm aufgenommen werden können. Abbildung 2 zeigt eine Übersicht über die Resorptionsprozesse des Flavonols. Verschiedene Studien weisen auf einen Quercetin-Glykosid-Transport mittels des natriumabhängigen Glukosetransporters-1 (SGLT1) hin (Day et al., 2003; Walgren et al., 2000b). Die resorbierten Quercetin-Glykoside können über den mukosal-lokalisierten MRP2-Transporter (Multidrug resistance-associated protein-2) aus der Epithelzelle ausgeschleust (Walgren et al., 2000a) oder aber durch zytosolisch-lokalisierte β -Glucosidasen hydrolysiert werden (Day

et al., 1998; Ioku et al., 1998). Weiterhin ist auch das Enzym Laktase-Phlorizin Hydrolase (LPH), welches in der Bürstensaummembran lokalisiert ist und normalerweise Laktose spaltet, in der Lage, Zuckerreste des Quercetins im Darmlumen zu hydrolysieren. Das so entstandene Aglykon kann nun durch Diffusionsprozesse in die Enterozyten aufgenommen werden (Day et al., 2000).

Intrazelluläres Quercetin-Aglykon durchläuft verschiedene Konjugierungsreaktionen, bevor es in die Blutbahn abgegeben wird. Studien konnten zeigen, dass das Flavonol glucuronidiert (UDP-Glucuronosyltransferasen), sulfatiert (Phenol-Sulfotransferasen) oder O-methyliert (Catechol-O-Methyltransferasen) werden kann (Crespy et al., 1999; Murota et al., 2000; van der Woude et al., 2004).

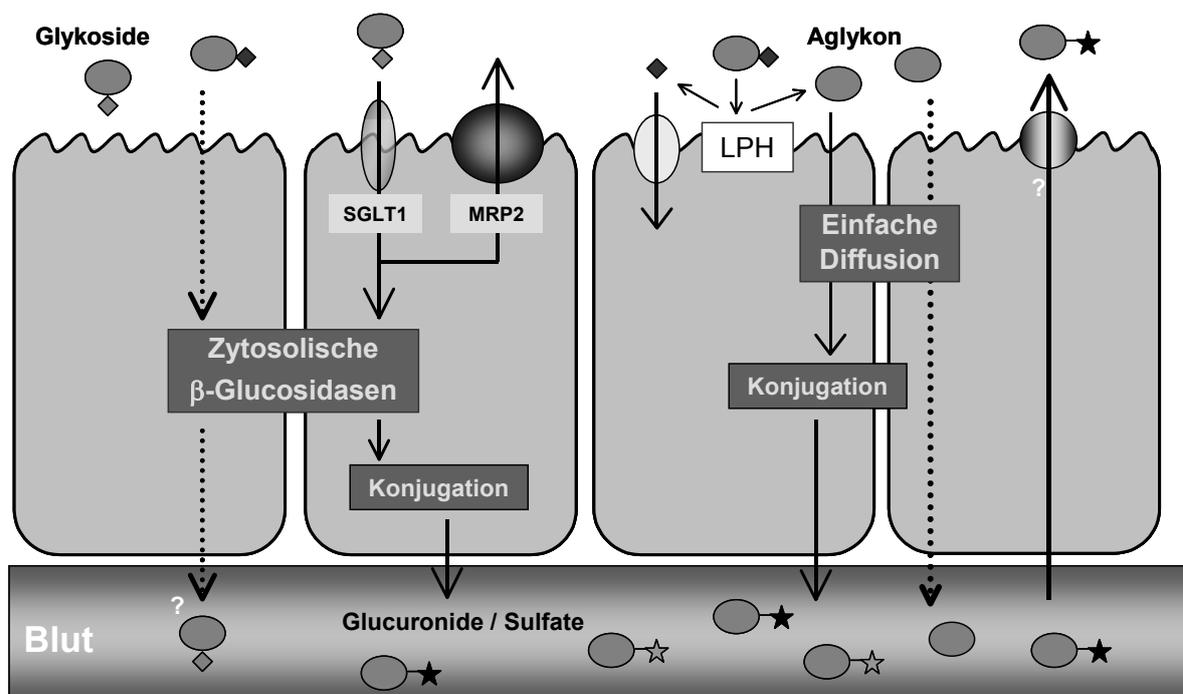


Abb. 2: Absorption und Metabolismus von Quercetin und Quercetin-Glykosiden im Dünndarm (modifiziert nach Murota und Terao (2003))

In zahlreichen Studien wurde die Bioverfügbarkeit von Quercetin untersucht, wobei teilweise recht widersprüchliche Ergebnisse erhoben wurden. So berichteten Gugler et al. (1975), dass nach der oralen Aufnahme von Quercetin-Aglykon im Menschen nicht einmal 1 % resorbiert wurde, wohingegen eine Studie

von Ueno et al. (1983) an Ratten eine Bioverfügbarkeit von Quercetin von 20 % ergab.

Auch zu der Aufnahme von Quercetin-Glykosiden existieren verschiedene Auffassungen. Einige Studien fanden im humanen Plasma Glykoside in unveränderter Form (Aziz et al., 1998; Paganga and Rice-Evans 1997), während andere eine Akkumulation der konjugierten Quercetin-Metaboliten postulierten (Manach et al., 1997; Moon et al., 2000). Nach Aufnahme von Quercetin-Glykosid-reicher Nahrung über eine Woche (260-360 g gekochte Zwiebeln pro Tag) wurden Metabolit-Konzentrationen (Glucuronide/Sulfate) von 0,1 bis 1 μM im Blut festgestellt (Moon et al., 2000). Einige Quercetin-Glykoside, die z.B. in der Zwiebel vorkommen wie Quercetin-4'-glucosid und Quercetin-3,4'-diglucosid (Ioku et al., 2001), scheinen vom Menschen besser resorbiert zu werden als das Aglykon (Hollman et al., 1995). Hollman et al. (1997) berichteten, dass die Halbwertszeit von Plasma-Quercetin nach der Aufnahme von Zwiebeln, Äpfeln oder reinem Rutin etwa 25 h beträgt, so dass durch eine tägliche Aufnahme von Obst und Gemüse eine Akkumulation dieses Flavonoids im Blut angenommen werden kann. In lokal begrenzten Bereichen wie zum Beispiel der Dünndarm-Mukosa sind hohe Quercetin-Konzentrationen von bis zu 100 μM wahrscheinlich (van der Woude et al., 2003).

1.1.3 Biologische Effekte

Quercetin konnten bisher zahlreiche biologische Effekte zugeschrieben werden. Das Flavonol besitzt antioxidative Eigenschaften, wobei glykosidisch gebundenes Quercetin weniger effizient ist als das Aglykon (Ioku et al., 1995). Es weist an T84-Zellen, einer humanen epithelialen Kolonkarzinom-Zelllinie, sowohl sekretorische (mukosale Applikation) als auch antisekretorische Eigenschaften (serosale Applikation) auf (Sanchez de Medina et al., 1997). Auch im Dün- und Dickdarm der Ratte konnte eine durch Quercetin induzierte Chlorid-Sekretion allerdings bei serosaler Zugabe nachgewiesen werden. Rutin übte jedoch keinen Effekt aus (Cermak et al., 1998). Weiterhin wirkt Quercetin antiinflammatorisch, wobei in Entzündungsprozessen nicht nur das Aglykon, sondern auch Isoquercitrin und Rutin in der Lage waren, die Freisetzung verschiedener inflammatorischer

Mediatoren wie Tumornekrosefaktor- α (TNF α), Prostaglandin E₂ (PGE₂) oder das Chemokin RANTES zu inhibieren (Morikawa et al., 2003). Das Flavonol besitzt außerdem antihypertensive (Aoi et al., 2004) sowie antiatherosklerotische Wirkungen, letztere wird unter anderem durch eine Blockierung der Low Density Lipoprotein-Oxidation und -Aggregation vermittelt (Hayek et al., 1997).

In zahlreichen Zelllinien wies Quercetin antiproliferative Eigenschaften auf, die unter anderem durch eine Apoptose-Induktion erklärbar waren (Csokay et al., 1997; Kuo 1996; van der Woude et al., 2003). Bei den Quercetin-Glykosiden Rutin und Quercitrin konnten hingegen keine proapoptotischen Eigenschaften nachgewiesen werden (Shen et al., 2003). In geringerer Konzentration wurde auch eine proliferative Wirkung des Flavonols beschrieben (van der Woude et al., 2003).

Neben diesen protektiven Quercetin-Wirkungen weisen einige Studien ebenfalls auf mutagene Effekte des Flavonols hin. So wurde die Mutagenität von Quercetin bereits 1977 im Ames-Test und etwas später auch in anderen *in vitro*-Experimenten nachgewiesen (Bjeldanes and Chang 1977; Carver et al., 1983; Maruta et al., 1979; Nakayasu et al., 1986). Mutagenität *in vivo* konnte allerdings nicht festgestellt werden (Aeschbacher et al., 1982; MacGregor et al., 1983). Dennoch wurden Bedenken über die Kanzerogenität des Flavonols geäußert, welche in einzelnen Studien auch bekräftigt werden konnten. So scheint Quercetin die Bildung von Darm- und Nierentumoren in Ratten zu fördern (Dunnick and Hailey 1992; Pereira et al., 1996). Demgegenüber konnten weitere Langzeit-Studien zur Kanzerogenität des Flavonols in Ratten, Mäusen und Hamstern diese bedenklichen Ergebnisse nicht bestätigen (Hirono et al., 1981; Ito et al., 1989; Morino et al., 1982; Saito et al., 1980). Einige Studien weisen sogar auf protektive Eigenschaften zur Reduzierung von Spontantumoren oder zur Verminderung der Inzidenz bei chemisch-ausgelösten Tumoren hin (Deschner et al., 1991; Gee et al., 2002; Matsukawa et al., 1997; Volate et al., 2005).

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Quercetin neben diesen zahlreichen biologischen Effekten auch die epitheliale Barrierefunktion des Darms beeinflusst. In den folgenden Abschnitten werden dazu eingehend die morphologischen und funktionellen Eigenschaften von Epithelien im Allgemeinen und des Darmepithels im Besonderen betrachtet.

2 Epithelien

Epithelien kleiden bei Eukaryonten alle inneren und äußeren Körperoberflächen aus und schaffen somit abgegrenzte Kompartimente im Körper. Sie bilden Barrieren zwischen den Flüssigkeitsräumen eines Organismus und gewährleisten so das „innere Milieu“. Neben diesen Barriereeigenschaften besitzen Epithelien Transportfunktionen. Zellen, Substanzen, Ionen und Wasser können entweder über den transzellulären Weg (Resorption oder Sekretion durch die Zelle) oder über den parazellulären Weg (zwischen den Zellen hindurch) das Epithel durchqueren. Der transzelluläre Transport erfolgt dabei über spezielle Kanäle (Poren) oder Transportproteine, wobei sich die mukosalen und basolateralen Transportprozesse unterscheiden. Die parazelluläre Permeabilität ist von der Molekülgröße und von der Ladung des Moleküls abhängig und wird primär durch die Tight Junction (TJ) bestimmt (Fanning et al., 1999).

2.1 Zellkontakte zwischen Epithelien und Endothelien

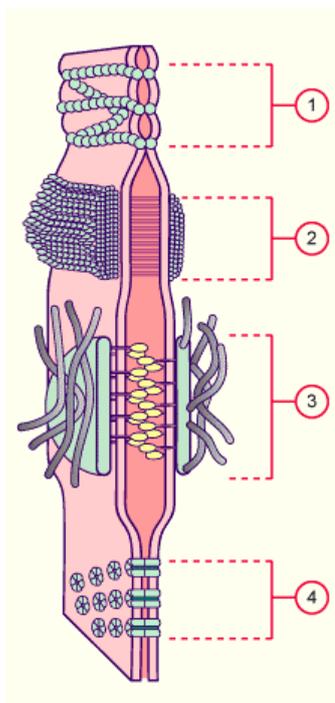
Epithelzellen sind über drei Kontaktzonen miteinander verbunden, die nach ihrer Funktion klassifiziert werden können (Abb. 3).

Die TJ oder Zonula occludens (Abb. 3.1), die in Epithelien und Endothelien vorkommt, befindet sich in der apikalen Region der lateralen Zellmembran und schließt den Interzellularraum gegenüber der Oberfläche ab. Diese Strukturen kontrollieren die freie Diffusion von Molekülen durch den parazellulären Spalt. Bei polar differenzierten Epithelzellen, zu denen auch das Darmepithel gehört, grenzt die TJ die beiden Membrandomänen, den mukosalen und den basolateralen Teil der Zellmembran, voneinander ab. Diese beiden Bereiche unterscheiden sich in ihrer Lipid- und Protein-Zusammensetzung und dadurch in ihrer Struktur und Funktion, wobei die TJ eine Vermischung dieser verschiedenen Membranbestandteile verhindert.

Basalwärts der TJ befindet sich die Adherens Junction. Hier werden die Zonula adherens (Belt desmosom), welche die Epithelzellen gürtelförmig umschließt (Abb. 3.2), und die Macula adherens mit ihren punktförmigen Zellkontakten (Spot desmosom) (Abb. 3.3) unterschieden. Die Adherens Junction dient der mechanischen Verstärkung eines Epithels. Sie besteht aus

Cadherinmolekülen, die die Zellmembran einmalig durchspannen. Durch die Bildung homophiler Verbindungen dieser Moleküle in benachbarten Zellen wird in Anwesenheit von Ca^{2+} der Zell-Zell-Kontakt gebildet. Weiterhin werden Epithelzellen durch sogenannte Hemidesmosomen, die aus Integrinmolekülen bestehen, an die basale extrazelluläre Matrix gebunden. Intrazellulär sind diese Verbindungen über weitere Proteine mit den Filamenten des Zytoskeletts verankert.

Einen weiteren Zell-Zell-Kontakt stellt die Gap Junction (Nexus) dar (Abb. 3.4). Hierbei verlaufen die Membranen benachbarter Zellen parallel zueinander, die nur durch einen kleinen parazellulären Spalt voneinander getrennt sind. Diese Zellverbindungen entstehen durch transmembranäre Komplexe, den sogenannten Konnexonen, die jeweils aus sechs Proteinuntereinheiten, den Konnexinen, gebildet werden. Zwei miteinander verbundene Konnexone benachbarter Zellen bilden Kanäle für anorganische Ionen und kleine wasserlösliche Moleküle. Somit sind die benachbarten Epithelzellen sowohl elektrisch als auch metabolisch miteinander verbunden (Larsson 2006; Strum et al., 2003; Uchōa and Junqueira 2005).



- (1) Tight Junction (Zonula occludens)
- (2) Belt desmosom (Zonula adherens)
- (3) Spot desmosom (Macula adherens)
- (4) Gap Junction (Nexus)

Abb. 3: Zell-Zell-Kontakte von Epithelien und Endothelien

(<http://www.unifr.ch/histologie/elearningfree/allemand/epithel/epithel05.html>)

2.2 Tight Junction

Die Strukturen der TJ, die durch oligomerisierte, transmembranäre Proteine entstehen, bilden kontinuierlich verzweigte, gürtelförmige Netzwerke von Strängen im apikalen Bereich zwischen benachbarten epithelialen Zellen (Abb. 4A). Sie gewährleisten die Aufrechterhaltung der polaren Strukturen von Epithelien, können aber bei Erkrankungen verändert sein (Fromm et al., 1994). Epithelien können in lecke, dichte und undurchlässige Gewebe unterschieden werden. Bei lecken Epithelien stellt der parazelluläre Transportweg den Haupttransportmechanismus von Molekülen dar, wobei insbesondere proximale Segmente von röhrenförmigen Epithelien Beispiele für lecke Gewebe sind (proximaler Nierentubulus oder Dünndarm). Bei dichten Epithelien ist die durch die TJ gebildete Barriere dichter, so dass der Haupttransport transzellulär stattfindet. Dichte Epithelien sind die distalen Segmente von röhrenförmigen Epithelien wie der distale Nierentubulus und das Sammelrohr sowie das Kolon und Rektum. Eine weitere Gruppe stellen die undurchlässigen Epithelien dar, welche weder parazelluläre noch transzelluläre Transporteigenschaften besitzen. Hierzu gehören Harnblase und Epidermis (Fromm 2004). Zu der Gruppe der TJ-Proteine gehören das Occludin, die Familie der Claudine, das erst vor kurzem entdeckte Tricellulin und das Junctional Adhesion Molecule (JAM).

2.2.1 Occludin

Occludin wurde als erstes TJ-Protein Anfang der 90er Jahre in der Hühnerleber nachgewiesen (Furuse et al., 1993). Zwischen Mensch, Maus und Hund besteht eine hohe Identität in der Aminosäuresequenz des Occludins von etwa 90 % (Ando-Akatsuka et al., 1996). Occludin ist ein etwa 65 kDa-großes, integrales Membranprotein. Es besitzt zwei extrazelluläre Loops, einen intrazellulären Loop und vier transmembrane Domänen (Abb. 4B). N- und C-Terminus befinden sich intrazellulär (Furuse et al., 1993). Es wird angenommen, dass sich jeweils zwei extrazelluläre Loops von Occludin und/oder Claudinen benachbarter Zellmembranen aneinander lagern (Anderson 2001; Citi and Cordenosi 1998).

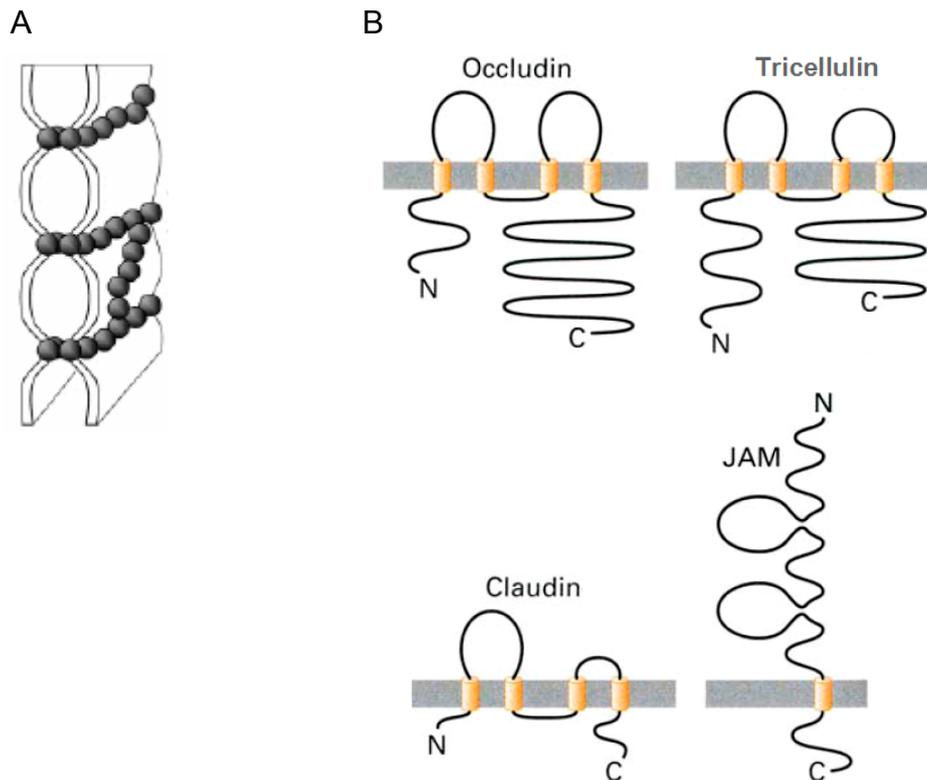


Abb. 4: Integrale Membranproteine der Tight Junction

- (A) Schematische Darstellung des verzweigten, kontinuierlichen Netzwerks der Zonula occludens (Anderson 2001)
- (B) Molekulare Strukturen der TJ-Proteine Occludin, Tricellulin, Claudin und JAM (modifiziert nach Tsukita (2001))

Die erste extrazelluläre Schleife des Occludins besteht zu 60 % aus den Aminosäuren Glycin und Tyrosin und scheint eine Rolle bei den Zell-Zell-Verbindungen zu spielen, während die zweite extrazelluläre Domäne an der parazellulären Barriere beteiligt ist (Balda et al., 1996; Chung et al., 2001; Medina et al., 2000; Van Itallie and Anderson 1997). Die intrazelluläre aminoterminal Region des Proteins besitzt etwa 60 und die carboxyterminale 250 Aminosäuren (Furuse et al., 1993). Der C-Terminus ist unter anderem notwendig für den Einbau von Occludin in die TJ sowie für die Bindung an die Strukturproteine ZO-1 und ZO-2 (Furuse et al., 1994). Im humanen Kolon und in humaner Plazenta konnten verschiedene Splice-Varianten des Occludins nachgewiesen werden, die mitunter gravierende Unterschiede in der Aminosäure-Sequenz sowie im Lokalisationsmuster in den Epithelien aufwiesen (Mankertz et al., 2002). Eine Überexpression von Occludin in MDCK-Zellen (Nieren-Zelllinie des Hundes) vermittelt eine Erhöhung des transepithelialen Widerstands (R^t), welches ein direktes Maß für die

Dichte eines Epithels darstellt, so dass Occludin offensichtlich einen wesentlichen Baustein der Epithel-Barriere darstellt (McCarthy et al., 1996). Occludin-defiziente Mäuse weisen jedoch keine Veränderungen in der Struktur der TJ oder in der Barrierfunktion des intestinalen Epithels auf. Diese Mäuse besitzen allerdings einen stark veränderten Phänotyp im Vergleich zu Wildtypmäusen. Ihr postnatales Wachstum ist retardiert. Weiterhin wurden zahlreiche Abnormitäten in verschiedenen Organen gefunden wie eine Kalzifizierung des Gehirns, Testisatrophie oder chronische Entzündungen und Hyperplasien des Magenepithels. Die Funktion des Occludins scheint somit eine höhere Komplexität zu besitzen als bisher vermutet (Saitou et al., 2000). Weitere Untersuchungen an diesem Maus-Modell ergaben, dass Occludin keinen essentiellen Einfluss auf die epitheliale Barrierfunktion besaß, allerdings dramatische Veränderungen in der gastrischen Morphologie hervorrief, die mit einem Verlust der Magensäure-Sekretion einherging. Occludin spielt somit offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Differenzierung des Magenepithels (Schulzke et al., 2005).

2.2.2 Tricellulin

Das erst vor kurzem entdeckte Tricellulin ist ein 66 bis 72 kDa-großes Protein und weist Sequenz-Homologien zu Occludin auf (Abb. 4B). Es ist insbesondere in den trizellulären Zell-Kontaktpunkten lokalisiert. Eine schwache Expression konnte auch zwischen jeweils zwei benachbarten Zellen vor allem im Dünndarm nachgewiesen werden. Eine Suppression von Tricellulin in epithelialen Zellen führt zu einer Beeinträchtigung der Barrierfunktion sowie zu einer Disorganisation der TJ-Struktur (Ikenouchi et al., 2005).

2.2.3 Claudin-Familie

Das Wort Claudin kommt aus dem Lateinischen von „claudere“ und bedeutet „schließen“. Die Genfamilie der Claudine umfasst in Säugetieren mindestens 24 Proteine (Tsukita et al., 2001). Ihr Molekulargewicht ist mit etwa 22 kDa deutlich kleiner als das von Occludin oder Tricellulin. Die Claudin-Moleküle bestehen ebenfalls aus vier transmembranären Domänen, wobei die zwei extrazellulären Loops und der N- und C-Terminus kürzer sind als beim Occludin (Abb. 4B). Die Identität der Aminosäure-Sequenzen der Claudine untereinander unterliegen starken Schwankungen von 12,5 bis 69,7 % (Mitic et al., 2000). Eine Transfektion von Claudin-1- und Claudin-2-cDNA in Fibroblasten führte zur Ausbildung faserartige Stränge zwischen zwei benachbarten Zellen. Im Gegensatz dazu verursachte die Transfektion von Occludin-cDNA nur eine Bildung kurzer Strang-Fragmente. Bei einer Kotransfektion von Claudin-1- und Occludin-cDNA wurde Occludin in die ausgebildeten TJ-Stränge des Claudin-1 integriert (Furuse et al., 1998).

Die Mitglieder der Claudin-Familie weisen eine ausgeprägte Spezies- und Gewebespezifität auf. Einige Claudin-Proteine besitzen eine ubiquitäre Gewebeverteilung (z.B. Claudin-1), wohingegen die Expression anderer Claudine auf wenige Organe begrenzt ist (z.B. Claudin-16 in der Niere) (Tab. 4). Anhand der Verteilungsmuster der TJ-Proteine lassen sich die verschiedenen parazellulären Permeabilitätseigenschaften, das Widerstandsverhalten und die Ionen-Durchlässigkeiten erklären, die in den verschiedenen Organen und Geweben existieren. Auch im Gastrointestinaltrakt (GIT) weisen die Claudine eine definierte Expressionsverteilung auf. So wird Claudin-2 im Dünn- und Dickdarm nur in den Krypten und kaum in der Villus-Region des Dünndarms und den Oberflächen-Epithelzellen des Kolons exprimiert. Die Expression von Claudin-4 hingegen ist auf den Villus-Bereich des Dünndarms und auf die Oberflächen-Epithelzellen des Kolons begrenzt (Rahner et al., 2001).

Tab. 4: Expressionsmuster ausgewählter Claudine (modifiziert nach Inai et al. (2005) und Tsukita et al. (2001))

Claudine	Expression							
	GIT	Herz	Gehirn	Lunge	Leber	Niere	Testis	Andere Gewebe
Claudin-1	+	+	+	+	+	+	+	
Claudin-2	+	-	-	-	+	+	-	
Claudin-3	+	+	-	+	+	+	+	
Claudin-4	+	+	-	+	-	+	+	
Claudin-5	+	+	+	+	+	+	+	Endothelzellen
Claudin-7	+	+	-	+	+	+	+	
Claudin-14	-	-	-	-	+	+	n.b.	Haarzellen im Corti Organ
Claudin-16	-	-	-	-	-	+	n.b.	Dicker aufsteigender Ast der Henle-Schleife

n.b. nicht bestimmt

Claudine besitzen bessere adhäsive Eigenschaften als das Occludin, so dass vermutlich insbesondere die Claudin-Proteine für die Abdichtung des lateralen interzellulären Spalts verantwortlich sind. Einige Claudine wie Claudin-1, -4 und -7 bewirken bei Überexpression in Zellkultur-Modellen eine Zunahme von R^t (Alexandre et al., 2005; Inai et al., 1999; Van Itallie et al., 2001). Eine R^t -Erhöhung geht oftmals mit einer Engstellung des lateralen interzellulären Spalts einher, was beispielsweise durch die Überexpression von Claudin-1 in MDCK Zellen vermittelt wird (Inai et al., 1999). Der entscheidende Barriereeffekt wird allerdings durch die abdichtenden oder porenbildenden TJ-Proteine vermittelt. So führt Claudin-4 zu einer reduzierten Na^+ -Leitfähigkeit und Claudin-7 zur verminderten Cl^- -Permeabilität (Alexandre et al., 2005; Van Itallie et al., 2001). Weiterhin gibt es Claudin-Proteine, die als Porenbildner bekannt sind. Claudin-2 stellt einen Kationen-Kanal dar und bewirkt bei verstärkter Expression in MDCK-Zellen eine Reduktion von R^t sowie eine erhöhte Na^+ -Permeabilität (Amasheh et al., 2002). Ein weiteres porenbildendes TJ-Protein ist das Claudin-16, welches eine erhöhte Permeabilität für zweiwertige Kationen (Mg^{2+} , Ca^{2+}) induziert und in der Niere eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Resorption dieser Ionen spielt (Blanchard et al., 2001; Simon et al., 1999).

Die Zell-Zell-Kontakte der TJ stellen dynamische Strukturen dar, die ihre permeablen Eigenschaften durch eine Vielzahl von Agonisten verändern können. So erhöhen die Bakterientoxine von *Clostridium difficile* und *Clostridium perfringens* die TJ- Permeabilität (Hecht et al., 1988; Hecht et al., 1992; Sonoda et al., 1999). Auch endogene und exogene Moleküle wie die zytosolischen GTPasen rab13 und Rho, Chemikalien (z.B. Phorbol-Myristat-Acetat – kurz PMA) und Zytokine können einen regulatorischen Einfluss auf die TJ ausüben (Bruewer et al., 2003; Madara and Stafford 1989; Nusrat et al., 1995; Poritz et al., 2004; Schmitz et al., 1999; Turner et al., 1999; Zahraoui et al., 1994). Außerdem können durch eine Aktivierung von Transportsystemen wie z.B. beim SGLT1 parazelluläre Barriereigenschaften beeinflusst werden. Die Stimulation dieses Transportproteins geht unter anderem mit einer Kontraktion des perijunctionalen Aktin-Myosin II-Rings einher, wodurch die Permeabilität des Epithels erhöht wird (Madara and Pappenheimer 1987; Turner and Madara 1995).

Spezielle Erkrankungen, die in Zusammenhang mit Mutationen in Claudin-Genen auftreten, weisen auf selektive Eigenschaften in der Permeabilität hin. So führen Mutationen im Gen von Claudin-16 (Paracellin-1), welches im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife exprimiert wird, zu einem renalen Mg^{2+} -Verlust. Diese Störung der Mg^{2+} -Resorption wird entweder durch eine intrazelluläre Akkumulation von Claudin-16, einem verstärkten Abbau des Proteins oder durch eine gestörte parazelluläre Mg^{2+} -Permeabilität innerhalb der TJ verursacht (Kausalya et al., 2006; Mitic et al., 2000; Simon et al., 1999). Claudin-14 wird im sensorischen Epithel im Corti-Organ des Ohrs exprimiert. Eine Mutation in diesem Gen bewirkt eine rezessiv vererbte Taubheit (Wilcox et al., 2001). Des Weiteren geben transgene Tiermodelle einen tieferen Einblick über die funktionellen Bedeutungen von Claudin-Proteinen wieder. So sterben beispielsweise Claudin-1-defiziente Mäuse innerhalb eines Tages nach der Geburt an Dehydrierung, so dass dieses Protein in der Epidermis eine essentielle Rolle im Erhalt des Wasserhaushalts zu spielen scheint (Furuse et al., 2002).

Für die Abdichtung des parazellulären Spalts benötigen TJ-Proteine weitere Moleküle, die als Gerüst- oder regulatorische Proteine dienen. Diese zytosolischen Strukturproteine sind unter anderem ZO-1, ZO-2, ZO-3, rab3B, rab13, Cingulin, 7H6, Symplekin und das Ras-gebundene-Protein AF-6 (Übersicht siehe Fanning et al. (1999) und Mitic et al. (2000)). ZO-1, ZO-2 und ZO-3 gehören zu der

Membran-assoziierten-Guanylat-Cyclase-Superfamilie. Der COOH-Terminus von Claudinen und Occludin interagiert mit den ZO-Proteinen, die Adaptermoleküle zwischen den Proteinen der TJ und dem Zytoskelett darstellen und zur Organisation der Plasmamembran beitragen (Furuse et al., 1994; Haskins et al., 1998; Itoh et al., 1999; Wittchen et al., 1999). TJ-Proteine interagieren weiterhin mit Signalproteinen wie den heterotrimeren G-Proteinen, GTPasen oder auch mit den Proteinkinasen A und C (PKA und PKC) (Überblick siehe Matter und Balda (2003) und Tsukita et al. (1999)). Des Weiteren befindet sich die TJ in räumlicher Nähe zum peripheren Ring von Aktin und Myosin II, welcher durch Kontraktion mechanisch die parazelluläre Permeabilität beeinflussen kann (Madara 1987; Madara et al., 1987; Madara and Pappenheimer 1987).

2.2.4 Junctional Adhesion Molecule

Ein weiteres TJ-Protein ist das 36 bis 41 kDa-große Junctional Adhesion Molecule - kurz JAM (Abb. 4B). Es besitzt nur eine transmembranäre Domäne und gehört zur Superfamilie der Immunoglobuline (Martin-Padura et al., 1998). JAM besitzt keine Barrierefunktion, sondern scheint eine Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion zu spielen sowie zur Ausbildung der TJ-Struktur von Epithelien und Endothelien beizutragen. Darüber hinaus ist es an der parazellulären Migration von Monozyten beteiligt (Bazzoni et al., 2000; Bazzoni 2003; Liu et al., 2000; Martin-Padura et al., 1998; Palmeri et al., 2000).

2.3 Humane intestinale Epithelzelllinie Caco-2 als *in vitro*-Modell

Die Caco-2-Zelllinie stellt eine permanent, adhärent wachsende Zellkultur dar, deren Ursprung ein Adenokarzinom des humanen Kolons ist. Nach dem Erreichen eines konfluenten Monolayers differenziert die Karzinom-Zelllinie spontan zu einer polarisierten Zellschicht, die in ihren morphologischen und funktionellen Eigenschaften den Enterozyten des Dünndarms ähnelt (Chantret et al., 1988; Delie and Rubas 1997; Ophir et al., 1995). Während des Differenzierungsprozesses wird die Bürstensaummembran ausgebildet und es entwickeln sich die TJ-Strukturen (Ophir et al., 1995). Caco-2-Zellen weisen, wie bei Kolonzellen üblich, nur begrenzte Ionen-Leitfähigkeiten auf. Die Zugabe von Sekretagoga wie z.B. Forskolin führt allerdings zur Chlorid-Sekretion (Grasset et al., 1985).

Caco-2-Zellen exprimieren Fremdstoff-metabolisierende Enzyme der Phase I und II (Boulenc et al., 1992; Lampen et al., 1998; Tamura et al., 2001). Darüber hinaus synthetisieren sie Bürstensaum-assoziierte Hydrolasen wie die Sucrase-Isomaltase, Laktase, Aminopeptidase N und die intestinale Alkalische Phosphatase, die für den Dünndarm oder das fötale Kolon charakteristisch sind (Übersicht siehe Hidalgo et al. (1989) und Rousset (1986)). Caco-2-Zellen weisen weiterhin eine Expression des für den Dünndarm-typischen Glukosetransporters SGLT1 auf (Mahraoui et al., 1994; Mesonero et al., 1994). Diese Zellen besitzen somit trotz ihres Ursprungs aus dem Kolon eine Art Zwischenstellung zwischen den morphologischen und funktionellen Eigenschaften des Dün- und Dickdarms.

3 Zielstellung

Die Zielstellung dieser Arbeit ist, den Einfluss des Flavonoids Quercetin auf die epitheliale Barrierefunktion des Darms am Beispiel eines Zellkultur-Modells zu untersuchen. Flavonoide besitzen vielfältige biologische Eigenschaften, die sich positiv auf die Prävention chronischer Erkrankungen auswirken können. Von besonderem Interesse ist der Einfluss von Flavonoiden auf die Funktion des Darmepithels, da hier die Digestion und Resorption von Nahrungsinhaltstoffen stattfinden und Effekte durch den direkten Kontakt des Wirkstoffs mit den zellulären Kompartimenten des Enterozyten ausgelöst werden könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Caco-2-Zelllinie als Modell für die humane Darmschleimhaut ausgewählt und mit Quercetin inkubiert. Transepitheliale Widerstandsänderungen als Maß für eine veränderte parazelluläre Barriere wurden dokumentiert. Es wurden apoptotische Effekte sowie die Modulation der Expression und die zelluläre Lokalisation von TJ-Proteinen untersucht. Durch Promotoranalysen von TJ-Proteinpromotoren erfolgte die Analyse eines direkten Einflusses des Flavonols auf die Regulation der Expression. Außerdem wurde die parazelluläre Durchlässigkeit mit Hilfe von radioaktiven Fluxmessungen eines Permeabilitätsmarkers charakterisiert und die Modulation der parazellulären Ionen-Durchlässigkeiten von Na^+ und Cl^- bestimmt. Weiterhin sollte der Signalweg, durch dessen Vermittlung Quercetin seine Wirkung ausübt, durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren aufgeklärt werden.

Um sicher zu stellen, dass die durch Quercetin hervorgerufenen Effekte direkt durch Quercetin und nicht durch Hydrolyseprodukte verursacht wurden, erfolgte die Analyse des Einflusses der Quercetin-Zerfallsprodukte 3,4-Dihydroxybenzoesäure und 2,4,6-Trihydroxybenzoesäure auf die intestinale Barrierefunktion. Flavonoide kommen in der Natur meist in glykosilierter Form vor, so dass weiterhin der Effekt des Quercetin-Glykosids Quercitrin (Quercetin-3-rhamnosid) auf das Caco-2-Epithel untersucht wurde.

B Material und Methoden

1 Geräte

Agarosegel-Elektrophorese-Kammer	Biorad, München
Begasungsbrutschrank, B5060 EC / CO ₂	Heraeus, Hanau
Brutschrank (Bakterien)	Heraeus, Hanau
Calculator GeneQuant II	Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, USA
β-Counter: Tri-Carb2100TR	Packard, Meridan, CT, USA
γ-Counter: 1480WizardTM3	Wallac (Perkin Elmer Las), Rodgau - Jügesheim
GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer, Weiterstadt
Heizblock	Grant, Berlin
Luminiszenzbild Analysator (LAS 1000)	Fuji, Japan
Magnetrührer: IKA-Combimag	Janke & Kunkel, IKA-Werk, Staufen
Mikroskope:	
• Laserscanning-Mikroskop: LSM 510 Meta	Zeiss, Jena
• Lichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen
• Fluoreszenz-Mikroskop BX 60	Olympus, Hamburg
Mini-Protean 3 Elektrophorese-System	Biorad, München
Platten-Luminometer: Centro LB 960	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Schüttelinkubator: Aerotron	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Sequenziergerät ABI310	Perkin Elmer, Langen
Speed Vac Univapo 100 H	Uniequip, Martinsried
Stromversorgungsgerät: Power pac 300	Biorad, München
Taqman: 7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Transilluminator (Quickstore)	Michael Schroeder Laborgeräte, Heidelberg
Ussing-Kammer	Institut für Klinische Physiologie, Charité-CBF, Berlin
Vortex-Gerät	Pharmacia Biotech, Freiburg
Widerstandsmessgerät	Institut für Klinische Physiologie, Charité-CBF, Berlin
Wippe WT12	Biometra, Göttingen

3 Substanzen und Chemikalien

Acrylamid-Bis (37,5:1 - 30 % (w/v))	Serva, Heidelberg
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Albumin Standard	Pierce Perbio Science, Bonn
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma, Taufkirchen
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm
Antibiotika: Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Cölbe
BAPTA-AM (Bis-(2-Aminophenoxy)-Ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure-Methylester)	Sigma, Taufkirchen
BCA Protein Assay Reagenz A+B	Pierce Perbio Science, Bonn
BigDye Terminator Sequencing Puffer	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Bromphenolblau	LKB-Produkte AB, Bromma, Schweden
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
BSA 100×	NEB, Frankfurt
Carbogen	Linde, Berlin
Chloroform	Merck, Darmstadt
³⁶ Cl (Salzsäure)	NENTM Life Science Products, Boston, USA (jetzt Perkin Elmer)
Complete Mini EDTA-free	Roche, Mannheim
3,4-Dihydroxybenzoesäure (DHBA)	Sigma, Taufkirchen
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen
DNA-Marker:	
• λ/HindIII	Invitrogen, Karlsruhe
• 100 bp	Invitrogen, Karlsruhe
• Low Mass DNA Marker (LMDM)	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs	Perkin Elmer, Weiterstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Fötales Rinderserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Flüssigstickstoff	Linde, Berlin
GF109203X (Bisindolyl-Maleimid I)	Calbiochem (Merck), Darmstadt
Glycerol	Merck, Darmstadt

Glycin	Serva, Heidelberg
H7 (1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-Methyl-Piperazin)	Research Biochemicals International, Natick, MA, USA
Isopropanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Isopropylthio- <i>beta</i> -Galactosid (IPTG)	Sigma, Taufkirchen
Kohlendioxid	Linde, Berlin
LB-Medium	Qbiogene / MP Biomedicals, Heidelberg
Mannitol	Merck, Darmstadt
[³ H]-Mannitol	American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, MO, USA
Methanol	Fluka, Buchs SG, Schweiz
Milchpulver: Sucotin	TSI, Zeven
ML-7 (1-(5-Iodonaphthalen-1-Sulphonyl)-1-Hexahydro-1,4-Diazepin Hydrochlorid)	Sigma, Taufkirchen
Modified Eagles Medium (MEM)	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
²² Natrium (Natriumchlorid in H ₂ O)	NEN TM Life Science Products, Boston, USA (jetzt Perkin Elmer)
Natriumazid	Sigma, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Taufkirchen
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
Oligo-dT	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphatgepufferte saline Lösung (PBS)	PAA Laboratories, Cölbe
PBS-Tabletten	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Poly-L-Lysin (0,1 %)	Sigma, Taufkirchen
Protein Molecular Weight Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
ProTex Mount Flour	Biocyc, Luckenwalde
Puffer P1-3	Qiagen, Hilden
Quercetin	Sigma, Taufkirchen
Quercitrin	Sigma, Taufkirchen
RNase Inhibitor	Roche, Mannheim
RNAzol B	Wak-Chemie, Bad Soden
Scintillationslösung Ultima Gold	Perkin Elmer, Weiterstadt
SOC	Invitrogen, Karlsruhe
Staurosporin	Sigma, Taufkirchen
TaqMan Universal Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

T4 DNA-Ligationspuffer	NEB, Frankfurt
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, Taufkirchen
TAE-Puffer 50×	Invitrogen, Karlsruhe
Template Supression Reagenz	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
2,4,6-Trihydroxybenzoesäure (THBA)	Sigma, Taufkirchen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck, Darmstadt
Tris-HCl Buffer pH 8,8 (1,5 M)	Biorad, München
Tris-HCl Buffer pH 6,8 (0,5 M)	Biorad, München
Triton X-100	Boehringer, Mannheim
Trypsin-EDTA (1×)	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Tween-20	Sigma, Taufkirchen
Vektoren:	Sigma, Taufkirchen
• pGL-4.10	Promega, Mannheim
• pGL-4.70	Promega, Mannheim
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl- <i>beta</i> -D-Galactopyranosid)	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Wasser, RNase-frei	Fluka, Seelze
Ziegen-Serum	Sigma, Taufkirchen

4 Gebrauchsfertige Kits

BigDye Terminator Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Madison, USA
Genome Walking Kit	Clontech, Palo Alto, CA, USA
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Mannheim
In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (TUNEL)	Roche, Mannheim
Lipofectamin Plus Transfektionskit	Invitrogen, Karlsruhe
Lumi-Light ^{Plus} Western Blotting Kit	Roche, Mannheim
PCR Clean-up Gelextraktionkits NucleoSpin Extract II	Machery-Nagel, Düren
Omniscrypt Reaction Kit (200)	Qiagen, Hilden
Performa DTR Gel Filtration	Edge Bio System, MOBITEC, Göttingen

Plasmid Midi Kit (E)	Qiagen, Hilden
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
TaqMan Gene Expression Assay	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

5 Enzyme

Polymerase: PfuTurbo	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Restriktionsendonukleasen	NEB, Frankfurt

Enzym	Erkennungssequenz
KpnI	5'G/GTAC C3' 3'C CATG/G5'
XhoI	5'C/TCGA G3' 3'G AGCT/C5'

T4 DNA Ligase	NEB, Frankfurt
---------------	----------------

6 Antisera

Alexa Fluor 488 / 594 <i>anti</i> -Kaninchen-IgG-Antikörper aus der Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 488 / 594 <i>anti</i> -Maus-IgG-Antikörper aus der Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Anti</i> -Claudin-1/-2/-3/-5/-7-Serum aus Kaninchen	Zymed, San Francisco, CA, USA
<i>Anti</i> -Claudin-4-IgG aus der Maus	Zymed, San Francisco, CA, USA
<i>Anti</i> -Occludin-IgG aus dem Kaninchen	Zymed, San Francisco, CA, USA
<i>Anti</i> - Poly-ADP-Ribose Polymerase (PARP) -IgG aus der Maus	Becton Dickinson, Heidelberg
<i>Anti</i> -Kaninchen-IgG-Peroxidase aus dem Schaf (Lumi-Light ^{Plus} Western Blotting Kit)	Roche, Mannheim
<i>Anti</i> -Maus-Ig-Peroxidase aus dem Schaf (Lumi-Light ^{Plus} Western Blotting Kit)	Roche, Mannheim

7 Primer

M13-Primer (TOPO TA Cloning Kit) Invitrogen, Karlsruhe
 pGL4.10-Primer Metabion, Martinsried
 human Cld4-Primer Metabion, Martinsried

Primer	Sequenz 5'-3'
M13 FOR	GTAAAACGACGGCCAG
M13 REV	CAGGAAACAGCTATGAC
pGL4.10 FOR	CTAGCAAATAGGCTGTCCC
pGL4.10 REV	CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCC
human Cld4 FOR1	GACCCTCCACCCTCCCTCTAT
human Cld4 REV1	AGCGCGATGCCATTACCTGT
human Cld4 FOR3	ATGAGCTGCATTTGTCCAGC
human Cld4 FOR4	TATGTCTCCACAGGGTAAAC
human Cld4 FOR5	CCCGGAGTCCTGGCCTCCCG
human Cld4 FOR6	GTGGGGACCCTGGTCTTCAG
human Cld4 FOR7	GTGACTCAGGGACCCGGGGC
human Cld4 FOR8	CTGGCAGCTGTCGGCTGGAA

8 Biologisches Material

Humane Kolonkarzinom-Zelllinie Caco-2 (Colorectales Adenocarcinom): ATCC HTB-37 LGC Promochem GmbH, Wesel a. Rhein

Kompetente Zellen / *Escherichia coli*: TOP10F' aus dem TOPO TA Cloning Kit Invitrogen, Karlsruhe

9 Zellbiologische Methoden

9.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der Caco-2-Zelllinie erfolgte in 25 cm²-großen Zellkulturflaschen in 6 ml Modified Eagle's Medium (MEM), supplementiert mit 15 % Fötalem Kälberserum (FKS) und Antibiotika (100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin). Die Zellkulturen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ im Begasungsbrutschrank inkubiert. Das Medium wurde dreimal wöchentlich erneuert. In den Versuchen wurden Zellpassagen zwischen der 12. und der 25. Passage verwendet.

Caco-2-Zellen wurden alle zwei Wochen mit Hilfe von 0,05 % Trypsin-EDTA-Lösung enzymatisch abgelöst. Dazu wurden die Zellen mit PBS ohne Mg²⁺/Ca²⁺ gewaschen und anschließend 3 ml Trypsin-Lösung zugesetzt. Nach 5 bis 10 min wurde die Lösung entfernt und 1 ml frisches Trypsin zugegeben. Um die Zellen von der Kulturflasche vollständig abzulösen, wurde die Kulturflasche für 45 bis 60 min im Begasungsbrutschrank bei 37°C inkubiert. Das vollständige Ablösen der Zellen wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Die Zellen wurden in 10 ml Komplett-Medium aufgenommen und mit einer Pipette sorgfältig resuspendiert. Für die Weiterkultivierung wurden 1,5 ml der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche überführt.

Für die Versuche wurde die Zellzahl der Suspension mit Hilfe eines Haemozytometers (Neubauer Kammer) unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Dabei wurden etwa 10 µl der Zellsuspension unter das Deckgläschen auf die Neubauer Kammer pipettiert und die Anzahl der Zellen der vier Eckquadranten ausgezählt. Die Zellzahl wurde anschließend mit folgender Formel berechnet:
Zellzahl / ml = gezählte Zellen × 2500

Der Umrechnungsfaktor 2500 bezieht sich auf das über den vier Eckquadranten befindliche Flüssigkeitsvolumen von 0,4 µl.

9.2 Behandlung der Zellen mit Testsubstanzen

Die zu testenden Substanzen wurden in 1000-facher Konzentration in DMSO gelöst und für die Finalkonzentration im Medium verdünnt, so dass die Lösemittel-Konzentration meist 0,1 % im Medium betrug, aber nicht 0,2 % überstieg. ML-7 wurde in 1000-facher Konzentration in Ethanol gelöst. Für die Mehrzahl der Versuche wurde das Zellkulturmedium entfernt und frisches zugegeben, welches die zu untersuchenden Substanzen in gewünschter Konzentration enthielt. Für die Inhibitorstudien wurde das Medium nach Vorbehandlung (1/2 h) der Zellen mit den Blockierungsstoffen vorsichtig abpipettiert, mit Quercetin extern gemischt und erneut zugegeben. Nur der intrazelluläre Ca^{2+} -Chelator BAPTA-AM wurde nach 1 h Inkubation von den Caco-2-Zellen entfernt, bevor Quercetin appliziert wurde. Wenn nicht anders erwähnt, wurden alle Experimente mit serumhaltigem Medium (15 % FKS) durchgeführt.

9.3 Beschichtung von Deckgläschen mit Poly-L-Lysin

Poly-L-Lysin (0,01 %): 1 Teil Poly-L-Lysin (0,1 %) + 9 Teile PBS, steril filtriert

Um eine bessere Haftung von Caco-2-Zellen an Deckgläschen (\varnothing 10 mm) zu gewährleisten, wurden diese mit Poly-L-Lysin beschichtet (Vargas-Cortes et al., 1983). Dafür wurden die Deckgläser zunächst in einem Becherglas mit 2 N NaOH für 2 h bei Raumtemperatur behandelt, anschließend intensiv mit doppeltdestilliertem Wasser gewaschen und in 80 % Ethanol über Nacht inkubiert. Die Deckgläschen wurden abgeflammt, jeweils in die Vertiefung einer 24-Loch-Platte gelegt und zweimal mit PBS gewaschen. Die Beschichtung der Deckgläschen erfolgte durch die Zugabe von 500 μl Poly-L-Lysin (0,01 %). Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit wurde die Substanz entfernt, die Deckgläschen erneut mit PBS gewaschen und die Mehrloch-Platten mit offenem Deckel unter der Sterilbank für etwa 30 min getrocknet. Anschließend erfolgte die Aussaat der Caco-2-Zellen für die Immunfluoreszenz-Färbung und Apoptose-Untersuchung (Abschnitte 11.3 und 11.4).

10 Elektrophysiologische Methoden

10.1 Manuelle Messung des transepithelialen Widerstands

Die epithelialen Barriereigenschaften wurden durch die Messung des transepithelialen Widerstands (R^t) mit Hilfe eines Ohmmeters bestimmt (Kreusel et al., 1991). Die Ermittlung von R^t erfolgte an Zellmonolayern, die auf permeablen Zellfiltern kultiviert wurden. Caco-2-Zellen ($4 \cdot 10^5$) wurden auf HA- oder PCF-Filtern (\varnothing 12 mm) ausgesät, wobei je drei bis vier Filter in einer Kulturschale (\varnothing 6 cm) platziert wurden. Nach einer Kultivierungsphase von 7 bis 14 Tagen wurden die Zellfilter für die elektrophysiologischen Untersuchungen verwendet. Das Widerstandsmessgerät wurde speziell für die R^t -Bestimmung an den Zellfiltern entwickelt. Die Messung wurde unter einer Plastikhaube, an der die Elektroden fixiert waren, durchgeführt. Die genaue Positionierung der eingetauchten Elektroden in den Filtern erfolgte automatisiert, wobei eine Elektrode direkt über dem Zellrasen und eine weitere in der serosalen Flüssigkeit platziert wurde. Vor jeder Messung erfolgte eine Desinfizierung der Elektroden mit 80 % Alkohol, wodurch die Widerstandsbestimmungen an den Zellfiltern beliebig oft über Tage und sogar Wochen durchgeführt werden konnten, ohne dass Infektionen auftraten. Die Temperatur wurde durch eine Heizplatte bei 37°C konstant gehalten. R^t wurde um den Eigenwiderstand des Mediums und des Leerfilters korrigiert und auf die exponierte Epithelfläche ($0,6 \text{ cm}^2$) bezogen, so dass er als $\Omega \cdot \text{cm}^2$ angegeben werden kann.

10.2 Widerstands- und Fluxmessungen mittels Ussing-Technik

Bad-Puffer: 113,6 mM NaCl, 2,4 mM Na₂HPO₄, 0,6 mM NaH₂PO₄, 21 mM NaHCO₃, 5,4 mM KCl, 1,2 mM CaCl₂, 1,2 mM MgCl₂, 10 mM D(+)-Glukose, 2,5 mM L-Glutamin, 10 mM D(+)-Mannose, 0,5 mM β-Hydroxybuttersäure

Ussing-Kammern sind elektrophysiologische Apparaturen zur Messung des Widerstands sowie von Barriere- und Transportfunktionen an lebenden Epithelien (Kreusel et al., 1991). Die Apparatur besteht aus zwei Reservoiren, die durch das Epithel im Zellfilter in eine mukosale und eine serosale Seite getrennt werden. In die Reservoir-Behälter wurden Bad-Puffer oder Zellkulturmedium (10 ml) eingefüllt, die durch ein Wasserbad auf 37°C erwärmt und mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast wurden. Luftblasen-getriebene Schächte (sogenannte „bubble lifts“) sorgten für eine intensive Umweltschichtung der Badlösung insbesondere auch in der unmittelbaren Nähe des Epithels (zur Vermeidung von „unstirred layers“). Mittels zweier metallischer Ag-AgCl Stromelektroden, die sich in mit KCl-gefüllten Gefäßen in Kontakt mit KCl-gefüllten Agar-Agar-Brücken befanden, wurde ein transepithelialer Strom appliziert. Dabei wurden die beiden Enden der Agar-Agar-Brücken jeweils Epithel-fern in jeder der beiden Hälften der Ussing-Kammer positioniert, um eine homogene Stromverteilung über dem Epithel sicher zu stellen. Spannungselektroden (Kalomelektroden), ebenfalls über KCl-Gefäße mit den KCl-gefüllten Agar-Agar-Brücken mit der Ussing-Kammer verbunden, dienten zur Messung der transepithelialen Spannung.

In dieser Arbeit wurde die Ussing-Technik für die Bestimmung der Durchlässigkeit von Mannitol (Charakterisierung der parazellulären Eigenschaft) sowie für die Ermittlung der Ionen-Permeabilität von Na⁺ und Cl⁻ verwendet.

Nach der Bestimmung der Leerwiderstände wurden die Zellfilter mit dem lebenden Epithel in die Ussing-Kammer eingesetzt. Auf jede Seite wurden gleichmäßig jeweils 10 ml Bad-Puffer oder Medium in die Reservoir-Behälter zugegeben. Nach einer Äquilibrationsphase für das Epithel von etwa 15 bis 20 min war das System für die Flux-Versuche bereit.

10.2.1 Messung von Mannitol-Fluxen

Mannitol ist ein parazellulärer Marker mit einer Größe von 182 Da. In Epithelien gibt es keine spezifischen aktiven Transportmechanismen für dieses Molekül, so dass es nur durch den parazellulären Spalt einen Zellmonolayer überqueren kann. Somit können mit der Messung von Mannitol-Fluxen die Größe des parazellulären Spalts charakterisiert werden.

Zunächst wurde dem Zellkulturmedium Mannitol auf beiden Seiten der Ussing-Kammer in einer Konzentration von 10 mM zugesetzt, um osmotische Effekte auszuschließen. Die Fluxmessungen erfolgten unidirektional vom mukosalen zum serosalen Kompartiment. Nach dem Einspannen der Zellfilter und der Einlaufzeit wurden für die Nullwerte jeweils 1 ml von der serosalen Seite in Glas-Vials abgenommen und die entsprechende Menge durch frisches Medium ersetzt, um hydrostatische Gradienten zu vermeiden. Anschließend erfolgte auf der mukosalen Seite die Zugabe von 100 µl [³H]-Mannitol (Finalkonzentration: 25 kBq/ml). Zur Bestimmung der Aktivität der heißen Seite der Ussing-Kammer wurden 100 µl vom mukosalen Kompartiment entnommen und für die Messung 1:10 mit Medium verdünnt (heiße Probe). Die serosale Probenabnahme von 1 ml (kalte Probe) erfolgte nach 15, 30, 45 und 60 min. Das Volumen wurde nach jeder Abnahme durch frisches Medium ersetzt. Die entnommenen Proben in den Glas-Vials wurden mit 4 ml Szintillationslösung versetzt und die Radioaktivität im β-Counter gemessen. Die Fluxrate von Mannitol wurde wie folgt berechnet:

$$J \left[\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2} \right] = \frac{C_{\text{Standard}} \cdot (V_K / V_{hP}) \cdot V_K \cdot (Z_{\text{kalt2}} - Z_{\text{leer}}) - (V_K - V_{kP}) \cdot (Z_{\text{kalt1}} - Z_{\text{leer}})}{Z_{\text{heiß}} \cdot \Delta t \cdot A_K}$$

C_{Standard}	Referenzkonzentration für Mannitol (10 mM)
V_K	Kammervolumen (10 ml)
V_{hP}	Volumen der heißen Probe (0,1 ml)
Z_{kalt1}	Zählrate der ersten kalten Probe (cpm)
Z_{kalt2}	Zählrate der zweiten kalten Probe (cpm)
Z_{leer}	Zählrate der Kalt-Probe vor der Heiß-Zugabe (cpm)
V_{kP}	Volumen der kalten Probe (1 ml)
$Z_{\text{heiß}}$	Zählrate der heißen Probe (cpm)
Δt	Zeit zwischen der ersten und der zweiten Abnahme der Kalt-Proben (min)
A_K	Kammerfläche / Zellfilterfläche (0,6 cm ²)

10.2.2 Messung von Natriumchlorid-Fluxen

Der Bad-Puffer enthielt bereits 140 mM unmarkiertes Na^+ und 123,8 mM Cl^- (Referenzkonzentrationen). Die Fluxe wurden unidirektional unter Kurzschlussstrom-Bedingungen durchgeführt, indem die radioaktiven Ionen im selben Zugabekompartiment zugegeben wurden. In verschiedenen Experimenten wurden entweder auf der serosalen oder mukosalen Seite 30 μl $^{22}\text{Na}^+$ (Finalkonzentration: 2,4 kBq/ml) und 25 μl $^{36}\text{Cl}^-$ (Finalkonzentration: 9,2 kBq/ml) zugegeben. Die Aktivität der heißen Kammerseite wurde analog wie bei der Messung der Mannitol-Fluxe bestimmt (Abschnitt 10.2.1). Die Abnahmen der Kalt-Proben (1 ml) erfolgten nach 0, 30, 60, 90, 120, 150 und 180 min in die Glas-Vials. Das entnommene Volumen wurde entsprechend substituiert. Die Messung der Radioaktivität von $^{22}\text{Na}^+$ erfolgte zunächst im γ -Counter und von $^{36}\text{Cl}^-$ nach Zugabe von 4 ml Szintillationslösung im β -Counter. Die Fluxraten für Na^+ und Cl^- ($J_{\text{Na}}/J_{\text{Cl}}$ in $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$) wurden wie die Mannitol-Fluxrate berechnet (Abschnitt 10.2.1).

11 Biochemische Methoden

11.1 Untersuchung von Substanzen auf Zytotoxizität durch Bestimmung der Laktat-Dehydrogenase-Aktivität

Zytotoxizität von Stoffen kann durch Bestimmung der Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Freisetzung aus Zellen analysiert werden. LDH (EC Nr. 1.1.1.27) ist eine stabile zytoplasmatische Oxidoreduktase, die in allen Zellen vorkommt und bei Schädigung der Plasmamembran freigesetzt wird, so dass im Medium erhöhte und im Zell-Lysat verminderte LDH-Konzentrationen vorkommen.

Zur LDH-Bestimmung wurden 400 μl mukosales und 1 ml serosales Medium von Kulturfiltern unbehandelter und behandelter Zellmonolayer in Eppendorf-Gefäße überführt. Von in 6-Loch-Platten kultivierten Zellen wurde 1 ml Medium abpipettiert. Nach der Entfernung des restlichen Mediums wurde für die Lyse der Zellen 400 μl Medium mit 2 % Triton X-100 in die Zellfilter oder in die Vertiefungen der 6-Loch-Platten gegeben und für etwa 30 min inkubiert. Nach gründlicher Lyse wurden die Zell-Lysate ebenfalls in Eppendorf-Gefäße überführt. Die Bestimmung der LDH-Aktivität erfolgte im Zentrallabor der Klinischen Chemie der Charité - Campus Benjamin Franklin (Berlin).

11.2 Western Blot-Analysen

11.2.1 Membranprotein-Extraktion aus eukaryontischen Zellkulturen

Membran-Lysepuffer: 20 mM Tris-Cl pH 7,4, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0,6 mM EGTA
1 Tablette Complete Mini ohne EDTA / 10 ml Lysepuffer

Membranproteine oder Proteine aus einer Gesamtlysate-Präparation wurden aus Zellkulturen gewonnen. Mit Hilfe der Western Blot-Technik wurde die Expression von Occludin, Claudine-1 bis -5, Claudin-7 und der Poly-ADP-Ribose Polymerase (PARP) untersucht.

Für die Isolierung der Membranproteine wurde das Zellkulturmedium von mindestens vier Zellfiltern pro Probe bzw. von einer Vertiefung der 6-Loch-Platten entfernt, die Zellen mit PBS plus Mg²⁺/Ca²⁺ gewaschen und 100 µl Membran-Lysepuffer pro Filter oder 500 µl pro Vertiefung der Zellkulturschalen zugegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst und in ein Eppendorf-Gefäß überführt, wobei die weiteren Arbeiten auf Eis durchgeführt wurden. Die Lyse der Zellen erfolgte durch ein mehrmaliges Pressen der Proben durch Injektionskanülen mit einem Durchmesser von 0,9 mm sowie anschließend mehrfachen Durchpressen durch Injektionskanülen mit einem Durchmesser von 0,45 mm. Die Zelltrümmer wurden in 5 min bei 200×g in der Eppendorf-Zentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein Safe Lock-Eppendorf-Gefäß überführt. Zur Gewinnung der Membranfraktion erfolgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 43000×g und 4°C in der Beckman-Ultrazentrifuge. Der Überstand, die zytosolische Proteinfraction, wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die sedimentierte Membranfraktion mit 60 µl Lysepuffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Proteingehalts. Die Proben wurden bei -80°C asserviert.

11.2.2 Proteinextraktion von Gesamtlisat aus eukaryontischen Zellkulturen

Lysepuffer A (pH 6,8): 10 mM Imidazol, 100 mM KCl, 300 mM Saccharose, 2 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 1 mM NaF, 1 mM NaVO₂, 1 mM Na₂MO₄

Lysepuffer A mit TritonX-100: 0,2 % Triton X-100 in Lysepuffer A
1 Tablette Complete Mini ohne EDTA / 10 ml Lysepuffer A

Zur Herstellung von Gesamtlisat wurde pro Probe mindestens zwei konfluente Zellfilter oder eine Vertiefung der 6-Loch-Platten aufgearbeitet. Die Zellen wurden mit PBS plus Mg²⁺/Ca²⁺ gewaschen und zu jedem Filter 60 µl bzw. in jede Vertiefung der 6-Loch-Platten 200 µl Lysepuffer A mit TritonX-100 zugegeben. Die Ablösung der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Zellschabers. Nach Überführung der Zellen in ein Safe Lock-Eppendorf-Gefäß wurden die Proben zur Zell-Lyse für etwa 20 min auf Eis inkubiert und mehrfach mit einem Vortex-Zellhomogenisator behandelt. Die Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation bei 20800×g für 10 min in der Ultrazentrifuge sedimentiert. Der Überstand, das Gesamtlisat, wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Der Proteingehalt wurde bestimmt und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

11.2.3 Proteinbestimmung

BCA-Protein-Assay-Reagenz:

Albumin Standard: 2,0 mg/ml BSA in 0,9 % NaCl-Lösung und 0,05 % Natriumazid

Lösung A: Na₂CO₃, NaHCO₃, Bicinchoninsäure (BCA), Natriumtartrat, 0,1 M NaOH

Lösung B: 4 % Kupfer(II)sulfat

Gebrauchslösung: 196 µl Lösung A + 4 µl Lösung B

Die Proteinbestimmung wurde mit der BCA-Methode im Mikrotitermaßstab von der Firma Pierce Perbio Science durchgeführt (Smith et al., 1985). Im alkalischen Milieu werden Cu²⁺-Ionen in Anwesenheit von Proteinen zu Cu¹⁺-Ionen reduziert. Diese bilden einen stabilen violetten Komplex mit der BCA-Reagenz (Bicinchoninsäure).

Anhand einer Eichgeraden von Proteinen des Rinderserumalbumins (Albumin Standards: 0,0 - 0,2 - 0,8 - 1,2 mg BSA/ml) wurde im Photometer in einer

Doppelbestimmung die Proteinmenge der Proben bestimmt. Pro Vertiefung einer 96-Loch-Platte wurden 10 µl der Eichlösung bzw. der gegebenenfalls verdünnten Probe pipettiert, je 190 µl der BCA-Gebrauchslösung hinzugefügt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 562 nm im Mikrotiterplattenreader (Spectra) gemessen. Aus den Mittelwerten der Probenwerte wurde mit Hilfe der Eichgeraden der Proteingehalt der Proben ermittelt.

11.2.4 Protein-Auftrennung durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Elektrophorese-Puffer: 190 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1 % SDS

5× Laemmli-Probenpuffer: 10 % SDS, 500 mM DTT, 300 mM Tris pH 6,8, 0,001 % Bromphenolblau, 50 % Glycerol

Zur Trennung und Bestimmung von Proteingemischen wurde die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch die SDS-PAGE, indem die Moleküle in einem elektrischen Feld durch eine Gelmatrix aus Acryl- und Bisacrylamid wandern. Acrylamid bildet in einer Kettenreaktion lange Polymere, die durch Bisacrylamid miteinander vernetzt werden. Diese Reaktion wird durch die Anwesenheit von freien Radikalen (Radikalbildner: Ammoniumperoxodisulfat - kurz APS) sowie durch einen Katalysator (*N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin - kurz TEMED) unterstützt. Natriumdodecylsulfat (SDS), das sich im Ladepuffer befindet, stellt dabei ein Detergenz dar, welche sich an die Proteine anlagert, sie denaturiert und gleichmäßig negativ auflädt. Dadurch ist die Wanderung der Proteine im Gel fast nur noch von der relativen Molekülmasse und nicht mehr von der Gesamtladung oder der Konformation der Proteine abhängig.

Zur Auftrennung der Proteine wurde das Mini-Protean 3 Elektrophorese-System verwendet. Eine große Glasplatte (10×8,2 cm) mit einem verdickten Glasrand von 1,5 mm und eine kleine Glasplatte (10×7,2 cm) wurden in der entsprechenden Halterung befestigt und in die Apparatur für den Gießstand überführt.

Die Zusammensetzung der Trenngele ist im Folgenden angegeben:

- 12,5 % Acrylamid-Bis für Claudine; 8,5 % für Occludin; 7,5 % für PARP
- 0,35 mM Tris-HCl Puffer pH 8,8
- 0,1 % SDS
- 0,1 % APS
- 0,05 % TEMED

Die Gellösung wurde zwischen die Glasplatten bis etwa 1,5 cm unterhalb der Kante der kleineren Glasplatte gegossen und mit 1 ml absolutem Alkohol überschichtet, damit eine glatte Oberfläche entstehen konnte.

Nach der Polymerisierung des Trenngels (Dauer etwa 30 min) wurde der Alkohol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Das Sammelgel hat größere Poren und einen anderen pH-Wert als das Trenngel. Aufgrund dieser Eigenschaften wandern die Proteine gleichmäßig durch das Sammelgel, wodurch eine bessere Bandenschärfe erreicht wird. Erst mit dem Erreichen des Trenngels wird die Geschwindigkeit der Proteine reduziert, und sie wandern größenabhängig durch das Trenngel. Das Sammelgel setzte sich wie folgt zusammen:

- 5 % Acrylamid-Bis
- 125 mM Tris-HCl Puffer pH 6,8
- 0,1 % SDS
- 0,1 % APS
- 0,1 % TEMED

Nach dem Gießen des Sammelgels wurde vorsichtig ein Kamm mit 10 Taschen für die Befüllung der Proben eingesetzt (maximales Probenvolumen 50 µl). Nach der Polymerisierung des Sammelgels (Dauer etwa 30 min) wurde der Kamm entfernt, die Gele aus dem Gießstand in die Halterung für die Elektrophorese-Kammer (Mini-Protean 3) überführt, Elektrophorese-Puffer in die Kammer gefüllt und die vorbereiteten Proben sowie 10 µl des Protein Molecular Weight Markers in die Geltaschen pipettiert.

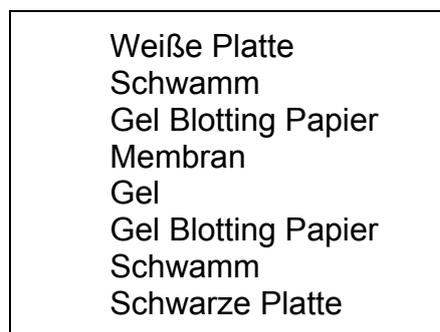
Von den Proben wurden 10 µg Protein der Membranfraktion für die Occludin- und Claudin-Detektion bzw. 50 µg Protein des Gesamtlisats für die PARP-Bestimmung aufgetragen. Das dazu benötigte Volumen wurde mit Lysepuffer auf 10-40 µl aufgefüllt und mit 5× Laemmli-Probenpuffer versetzt. Im Heizblock wurden die Proteine bei 95°C in etwa 5 min denaturiert. Nach dem Auftragen der Proben in die Geltaschen erfolgte die Elektrophorese bei 100 V am

Stromversorgungsgerät für etwa 90 min, bis der blaue Farbmarker das gesamte Gel durchlaufen hatte.

11.2.5 Proteintransfer auf PVDF-Membrane

Transferpuffer: 190 mM Glycin, 25 mM Tris, 10 % Methanol

Die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran fand im Tank-Blot-Verfahren statt. Die auf Gelgröße zugeschnittene PVDF-Membran wurde vor dem Blotvorgang mit absoluten Alkohol angefeuchtet und anschließend im Transferpuffer inkubiert. Das Gel, zwei Schwämme und zwei ebenfalls gelgroße Gel Blotting Papiere wurden in Transfer-Puffer equilibriert. Der Transferpuffer enthielt Methanol, da dadurch das SDS von den Proteinen wieder entfernt werden konnte, um die Bindung der Proteine an die Membran zu erhöhen. Das Sandwich wurde luftblasenfrei folgendermaßen zusammengebaut:



Das zusammengesetzte Sandwich wurde in die Blot-Halterung überführt (schwarze Platte zur Kathode) und in die Elektrodenkammer eingesetzt. Ein -80°C kalter Kühlakku verhinderte eine Überhitzung beim Transfer-Vorgang im Mini Protean 3 Elektrophorese-System. Die Kammer wurde mit Transferpuffer gefüllt. Ein Magnet-Rührer sorgte für eine gleichmäßige Kühlung. Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch aus dem Gel auf die PVDF-Membran übertragen. Der Blotvorgang erfolgte bei 100 V am Stromversorgungsgeräts für 60 min.

11.2.6 Immundetektion von Proteinen

PBS/T (1 l):	2 PBS-Tabletten, 0,1 % Tween-20
Milchpulver-Lösung:	5 % Milchpulver in PBS/T
BSA-Lösung:	5 % BSA, 0,02 % Natriumazid in PBS/T
TBS/T (1x):	100 ml 10× TBS/T + 900 ml H ₂ O
1. AK	1:2000 Verdünnung in BSA-Lösung

Lumi-Light^{Plus} Western Blotting Kit (Mouse/Rabbit):

Blockierungsreagenz: 1 % Blocking reagent in TBS/T

2. AK *anti*-Kaninchen-Ig-Peroxidase: 1/1000 Verdünnung in 15 ml Blockierungsreagenz

anti-Maus-Ig-Peroxidase: 1/400 Verdünnung in 15 ml Blockierungsreagenz

Lumi-Light^{Plus} Reagenz: 5 ml Lumi-Light^{Plus} Luminol / Enhancer Solution + 5 ml Lumi-Light^{Plus} Stable Peroxide Solution

Nach dem Protein-Transfer wurden die an der Membran fixierten Proteine durch spezifische Antikörper (AK) detektiert. Dazu wurde die Membran kurz in PBS/T gespült und für etwa 2 h in 50 ml Milchpulver-Lösung blockiert. Anschließend wurde die Membran nach einem erneuten Spülvorgang über Nacht in 50 ml BSA-Lösung bei 4°C geschwenkt. Die Blockierung der Membran mit Milchpulver- und BSA-Lösung diente zur Beseitigung von freien Protein-Bindungsstellen. Der 1. AK wurde nun für 2 h bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben und auf einer Wippe geschwenkt. Anschließend wurde die Membran zweimal mit PBS/T und einmal mit TBS/T für je 10 min gewaschen, um überschüssige AK zu entfernen und für etwa 1,5 h mit dem 2. AK bei Raumtemperatur ebenfalls schwenkend inkubiert. Außer für die Claudin-4- und PARP-Detektion wurde als 2. AK *anti*-Kaninchen-Ig-Peroxidase verwendet und für die anderen beiden Proteine *anti*-Maus-Ig-Peroxidase. Nach zweifachem Waschen in PBS/T und einmal in TBS/T wurde die Membran in einer Glasküvette für 5 min in Lumi-Light^{Plus} Reagenz abgedunkelt inkubiert und zwischen Plastik-Folie gelegt. Durch die Peroxidase, welche am 2. AK gekoppelt war, wurde eine Luminol-Reaktion katalysiert, die Chemolumineszenz verursachte und mit dem Luminiszenzbild Analysator (LAS 1000) detektiert wurde. In verschiedenen Zeitintervallen wurden durch das System mehrere Bilder aufgenommen.

11.3 Immunfluoreszenz-Färbung von Tight Junction-Proteinen

Ziegen-Serum:	2 % Ziegen-Serum in PBS plus Mg^{2+}/Ca^{2+}
TritonX-100-Lösung:	0,5 % TritonX-100 in PBS plus Mg^{2+}/Ca^{2+}
Claudin-AK:	1:50 Verdünnung in Ziegen-Serum
Occludin-AK:	1:100 Verdünnung in Ziegen-Serum
2. AK:	1:500 Verdünnung in Ziegen-Serum (2 μ g/ml)

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Färbung können zelluläre Protein-Verteilungsmuster durch spezielle AK-Komplexe, die sich an das nachzuweisende Molekül anlagern, untersucht und im Laserscanning-Mikroskop dargestellt werden. Dabei enthält der AK-Komplex einen Fluoreszenzfarbstoff, der nach Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge ein Lichtsignal anderer Wellenlänge emittiert. Zwei TJ-Proteine konnten mit verschiedenen fluoreszierenden AK markiert und auf ihre mögliche Kollokalisierung untersucht werden. In dieser Arbeit wurden die Proteine Claudin-1, Claudin-3, Claudin-4 und Claudin-7 analysiert, wobei als Zweitfärbung ein AK gegen Occludin verwendet wurde.

Für die Immunfluoreszenz-Analysen wurden Caco-2-Zellen zu einem Monolayer auf Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläschen kultiviert (Abschnitt 9.3). Diese wurden zweimal mit PBS plus Mg^{2+}/Ca^{2+} gewaschen, in eiskaltem Methanol innerhalb von 10 min bei $-20^{\circ}C$ fixiert und erneut gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte in einer 7-minütigen Inkubationszeit mit TritonX-100-Lösung bei Raumtemperatur. Nach einem erneuten Waschvorgang wurden die Monolayer zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit Ziegen-Serum für etwa 30 min inkubiert. Für die Doppelfärbung wurden die Zellen mit den beiden 1. AK jeweils für 60 min behandelt, wobei zwischendurch der Zellrasen mit Ziegen-Serum gewaschen wurde. Nach weiteren Spülschritten erfolgte die gemeinsame Inkubation der 2. AK abgedunkelt für weitere 60 min. Die Alexa fluor *anti*-Maus- oder *anti*-Kaninchen-IgG-AK fluoreszieren entweder bei einer Wellenlänge von 488 nm (grüne Färbung) oder bei 594 nm (rote Färbung). Nach einem letzten mehrfachen Waschvorgang mit Ziegen-Serum wurden die Deckgläschen kurz mit destilliertem Wasser und absolutem Ethanol gespült und die Zellen mit ProTaq Mount Fluor auf Objektträgern eingedeckt. Bei Raumtemperatur härteten die Deckgläschen im Dunkeln nach etwa 30 min aus.

Die Auswertung erfolgte am konfokalen Laserscanning-Mikroskop. Identische Intensitätseinstellungen am Mikroskop wurden für die Beurteilung der semiquantitativen Veränderungen der Proteine zwischen der Kontroll- und der behandelten Gruppe verwendet.

11.4 Bestimmung der Apoptose-Rate mittels TUNEL-Färbung

Blockierungslösung: 5 % BSA + 25 % FKS in PBS plus Mg^{2+}/Ca^{2+}

TUNEL-Lösung: 450 μ l Puffer + 50 μ l Reagenz (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein)

Das Testprinzip der TUNEL-Färbung beruht auf die enzymatische Markierung von DNA-Strangbrüchen mit Fluorescein-markierten Nukleotiden an das freie 3'-OH Ende der DNA durch die Terminale Desoxyribosyl-Transferase. Hierdurch werden apoptotische Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop quantifizierbar.

Für die Bestimmung der Apoptose-Rate mittels TUNEL-Färbung wurden Caco-2-Zellen auf Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläschen ausgesät (Abschnitt 9.3). Die Fixierung und Permeabilisierung des Zellmonolayers erfolgte wie im vorherigen Abschnitt beschrieben (Abschnitt 11.3). Nach einem zweimaligen Waschvorgang mit PBS plus Mg^{2+}/Ca^{2+} wurde zu den Zellen die Blockierungslösung zur Abdeckung unspezifischer Bindungen zugegeben, wobei die Deckgläschen abgedunkelt für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die Zellmonolayer jedes Deckgläschens wurden mit etwa 50 μ l TUNEL-Lösung bedeckt und in einer abgedunkelten Feuchtkammer bei 37°C für 1 h inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Deckgläschen kurz in Wasser und anschließend in absolutem Alkohol eingetaucht. Nach dem Verdunsten des Alkohols wurden die Zellen auf den Deckgläschen in ProTaq Mount Flour auf Objektträgern fixiert. Es wurden bis zu zehn Bilder pro Deckgläschen am Fluoreszenz-Mikroskop aufgenommen. Die prozentuale Anzahl apoptotischer Zellen wurde in Bezug zur Gesamtzellzahl bestimmt.

12 Molekularbiologische Methoden

12.1 RNA-Isolierung aus eukaryontischen Zellkulturen

Für die quantitative Analyse der Claudin-4-mRNA mittels Taqman-PCR wurde RNA von konfluenten Caco-2-Zellen aus mindestens drei Zellfiltern pro Probe oder von einer Vertiefung aus 6-Loch-Platten isoliert. Dazu wurde der Zellrasen mit PBS plus Mg^{2+}/Ca^{2+} gewaschen und je 0,5 ml RNAzol zugegeben. Das Phenol im RNAzol diente zur Lyse der Zellen, die mit der Pipette abgelöst und in ein Eppendorf-Gefäß überführt wurden. Nach der Zugabe von 75 μ l Chloroform erfolgte eine Inkubation von 5 min bei 4°C. Anschließend wurden die Proben mittels eines Vortex-Homogenisators behandelt und 20 min bei 12000 \times g und 4°C zentrifugiert, wobei die wässrige Phase mit der RNA von der organischen getrennt wurde. Die obere klare, wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und das gleiche Volumen an eiskaltem Isopropanol zugesetzt, womit die RNA gefällt wurde. Nach der Invertierung der Proben erfolgte eine Inkubation von 30 min bei 4°C. Anschließend wurden die Proben erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und bei 12000 \times g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die RNA wurde luftgetrocknet und in 30 μ l RNase-freien Wasser bei den Zellfilter-Proben bzw. in 60 μ l bei den 6-Loch-Proben resuspendiert. Die RNA-Konzentration wurde im Calculator GeneQuant II ermittelt, wobei die Proben 1:100 verdünnt wurden. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

12.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction - kurz PCR) besitzt zahlreiche Einsatzmöglichkeiten wie den Nachweis von Mutationen, die Quantifizierung kleinster mRNA-Mengen sowie die Amplifizierung von DNA-Abschnitten. Dieses Verfahren ermöglicht die exponentielle Vervielfältigung von DNA-Molekülen. Zur Amplifizierung wird meistens eine thermostabile Polymerase (z.B. Taq-Polymerase) von Archaeobakterien (*Thermophilus aquaticus*) verwendet, wobei sie Oligonukleotide als Startermoleküle (Primer) benötigt, die sich am 5'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts anlagern.

Die PCR besteht aus mehreren Phasen. Der erste Schritt, die Denaturierung, läuft bei 95°C ab, wobei die DNA-Doppelstränge getrennt werden. In der nächsten Phase, dem Annealing, wird die Temperatur optimal für die Anlagerung der Primer gesenkt. Im dritten Schritt, der Extension, beginnt die Polymerase am 3'-Ende des Startermoleküls in 5'-3'-Richtung mit der Synthese der neuen DNA-Stränge. Sie sind komplementär und antiparallel zum abgelesenen DNA-Abschnitt. Anschließend wird die Temperatur erneut auf 95°C erhöht und die neu synthetisierten DNA-Stränge trennen sich von ihrem Matrizenstrang. Es beginnt ein neuer Zyklus, wobei die drei Schritte etwa 25- bis 40-mal durchlaufen werden. Im ersten Zyklus endet die Synthese von neuen DNA-Strängen an einer beliebigen Stelle. Die in diesem Zyklus entstandenen neuen DNA-Moleküle werden in der nächsten Runde neben den ursprünglichen DNA-Strängen ebenfalls amplifiziert. Hierbei entstehen DNA-Abschnitte definierter Länge. Die Zahl der DNA-Moleküle wächst exponentiell. Nach den mehrfachen Durchläufen wird der Erfolg der PCR durch die DNA-Agarosegel-Elektrophorese überprüft (Abschnitt 12.4.2).

In dieser Arbeit wurde die PCR-Technik zur Quantifizierung der Claudin-4-mRNA durch den Taqman Gene Expression Assay, zur Amplifizierung des Claudin-4-Promotors sowie zur Sequenzierung von DNA-Abschnitten eingesetzt.

12.3 Quantitative mRNA-Bestimmung

Omniscript Reaction Kit (200):	Reverse Transkriptase, 10× RT-Puffer, 5 mM dNTPs, H ₂ O
TaqMan Universal PCR Master Mix (2×):	AmpliTaq Gold DNA-Polymerase, Puffer
Claudin-4-TaqMan Gene Expression Assay (20×):	2 unmarkierte Primer (Finalkonzentration: 900 nM), 1 VIC- oder FAM-markierte TaqMan MGB-Probe (Finalkonzentration: 250 nM)

Vor der Quantifizierung der Claudin-4-mRNA wurde die RNA in cDNA mittels Reverser Transkriptase umgeschrieben. In der Natur dient das Enzym dem Retrovirus zur Replikation seines Genoms. In der Molekularbiologie hingegen wird es zur Synthese von DNA-Kopien (cDNA) aus RNA-Strängen, welche dem Enzym als Matrize dienen, verwendet. Diese RNA-abhängige DNA-Polymerase verwendet Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs) als Substrate und Energielieferant. Außerdem benötigt sie für ihre volle Aktivität Mg²⁺ und Mn²⁺ sowie Primer-Moleküle, an denen die Synthese der DNA-Kette beginnt.

Die Herstellung der cDNA erfolgte zum Teil mit dem Omniscript Reaction Kit (200). Für einen 20 µl Ansatz wurden folgende Komponenten pipettiert:

- 1,5 µg RNA
- 2 µl 10× Puffer
- 2 µl dNTPs (Finalkonzentration: 0,5 mM)
- 1 µl Oligo-dT (Finalkonzentration: 25 ng/µl)
- 0,5 µl RNase-Inhibitor (Finalkonzentration: 1 U/µl)
- 1 µl Reverse Transkriptase (Finalkonzentration: 0,2 U/µl)
- Wasser (RNase-frei)

Die Proben wurden für 60 min bei 37°C im Heizblock inkubiert und anschließend bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Mit Hilfe des Taqman Gene Expression Assays können mRNA-Proben quantifiziert werden, indem die RNA zunächst durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben wird und anschließend das gewünschte Gen durch spezifische, fluoreszierende Sonden mittels PCR mengenmäßig bestimmt wird. Bei dieser PCR werden spezielle Oligonukleotid-Sonden verwendet, die sich spezifisch an das zu untersuchende Gen binden. Diese Sonden tragen einen fluoreszierenden Reporter-Farbstoff am 5'-Ende (VIC oder FAM) sowie einen

Quencher-Farbstoff am 3'-Ende (TAMRA). Wird die intakte Sonde mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt, wird das entstehende Fluoreszenzlicht sofort vom Quencher absorbiert. Dadurch kommt es aufgrund der räumlichen Nähe des Reporters zu dem Quencher zu einem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET). Erst in der Extensionsphase der PCR wird die Sonde beim Synthetisieren der DNA durch die 3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert, wodurch der Reporter vom Quencher räumlich getrennt wird. Bei Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge kann das vom Reporter emittierte Fluoreszenzlicht detektiert werden. Das Fluoreszenzsignal steigt mit Amplifikation der DNA an und wird mit dem Taqman 7900HT Fast Real-Time PCR System registriert und mit der SDS2.2.1 Software ausgewertet.

Die Claudin-4-Sonde ist mit dem fluoreszierenden Reporter, FAM markiert. Des Weiteren wurde als interne Kontrolle zur Sicherung der Auftragung gleicher cDNA-Mengen eine Sonde für Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mit VIC-Markierung eingesetzt.

Für die TaqMan-PCR wurden spezielle, optische 96-Loch-Platten verwendet. Die cDNA-Menge für Claudin-4 und GAPDH wurden in verschiedenen Ansätzen quantifiziert. Hierfür wurden folgende Komponenten in die Vertiefungen der 96-Loch-Platte pipettiert, wobei jede Probe als Dreifachwert bestimmt wurde (20 µl Ansatz):

- 0,01 µl cDNA
- 10 µl 2× Taqman Universal PCR Master Mix
- 1 µl 20× Taqman Gene Expression Assay Claudin-4-Sonde (FAM/TAMRA markiert) oder GAPDH-Sonde (VIC/TAMRA markiert)
- 8,99 µl Wasser (RNase-frei)

Die PCR wurde wie folgt im GeneAmp PCR System 2400 durchgeführt:

1. Schritt: 10 min, 95°C
2. Schritt: 15 s, 95°C
3. Schritt: 1 min, 60°C; Schleife zum 2. Schritt 40-mal

12.4 Klonierung des Claudin-4-Promotors

12.4.1 Synthese des Claudin-4-Promotors

Für die Synthese des Claudin-4-Promotors (C4P) wurde humane genomische DNA aus dem Genome Walking Kit verwendet, welche bereits mit den Restriktionsendonukleasen EcoRV, Dral oder Sspl geschnitten war. Dabei wurde darauf geachtet, dass diese Restriktionsenzyme nicht in der Promotorregion von Claudin-4 schneiden. Mittels NCBI-Datenbank wurde die bekannte Sequenz des Claudin-4-Gens (Accession-Nr.: AC093168) ausgewählt und die Lokalisation der vermutlichen Promotorregion etwa 1800 Basenpaaren (bp) in 5'-Richtung zum Transkriptionsstartpunkt bestimmt. Zur Amplifizierung dieses ausgewählten DNA-Abschnitts wurden entsprechende Primer ausgewählt, die eine DNA-Sequenz der Größe von 1627 bp synthetisierten, wobei in dieser Sequenz der Transkriptionsstartpunkt des Claudin-4-Gens enthalten war.

Zur Amplifizierung von C4P wurden die Primer FOR1 und REV1 verwendet und folgender PCR-Ansatz (50 µl) hergestellt:

- 1 µl genomische DNA (EcoRV, Dral oder Sspl geschnitten)
- 5 µl 10× Puffer mit MgSO₄
- 1 µl dNTPs (Finalkonzentration: 1mM)
- je 1 µl FOR1- und REV1-Primer (Finalkonzentration: 1 µM)
- 0,5 µl PfuTurbo Polymerase
- 40,5 µl Wasser (RNase-frei)

Für die PCR wurden folgende Einstellungen verwendet:

1. Schritt: 95°C, 15 min
2. Schritt: 95°C, 2 s
3. Schritt: 72°C, 3 min, Schleife zum 2. Schritt 7-mal (hohe Primerspezifität)
4. Schritt: 95°C, 2 s
5. Schritt: 67°C, 3 min, Schleife zum 4. Schritt 32-mal (hohe Primereffizienz)
6. Schritt: 67°C, 4 min
7. Schritt: 4°C

Zur Kontrolle des amplifizierten DNA-Abschnitts wurden 5 µl Reaktionsansatz und DNA-Marker auf einem Agarosegel (1 %) elektrophoretisch aufgetrennt. Weitere 20 µl des PCR-Ansatzes wurden ebenfalls im Agarosegel

aufgetrennt und aufgereinigt (Abschnitte 12.4.2 und 12.4.3). Der Ansatz wurde bei -20°C aufbewahrt.

12.4.2 DNA-Agarosegel-Elektrophorese

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat pH 8,3, 1 mM EDTA, 0,5 mg/l Ethidiumbromid
6× Probenpuffer: 40 % Saccharose, 0,25 % Bromphenolblau, 5 mM EDTA pH 8,0

Die Agarosegel-Elektrophorese ist ein Verfahren, mit dem DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden können. Die DNA-Moleküle wandern in einer Agarose-Matrix aufgrund ihrer negativ-geladenen Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat zur Anode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit von der Größe, Konformation, Polarisierung und von der Ladungsstärke des Moleküls abhängt.

Agarosegele (0,7 - 1,0 %) wurden hergestellt, wobei die Agarose durch Erhitzen in TAE-Puffer aufgelöst wurde. Die etwas abgekühlte, flüssige Agarose wurde luftblasenfrei in den Gelträger gegossen und ein Kamm für bis zu 15 Probestaschen eingesetzt. Nach dem Erstarren des Gels wurde der Kamm wieder entfernt und der Gelträger in die Agarosegel-Elektrophorese-Kammer überführt und mit TAE-Puffer überschichtet. Die DNA wurde mit 6× Probenpuffer gemischt und in die Probestaschen pipettiert. Darüber hinaus wurde 5 μl DNA-Marker ebenfalls in eine Tasche gefüllt. Die Auftrennung erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 60-75 V am Stromversorgungsgerät. Durch den Farbstoff Bromphenolblau im Probenpuffer konnte das Fortschreiten der Elektrophorese optisch kontrolliert werden. Die DNA-Moleküle wurden durch die Ethidiumbromid-Färbung im Transilluminator analysiert.

12.4.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des PCR Clean-up Gelextraktionkits NucleoSpin Extract II gewonnen. Hierbei wurde die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und das Gewicht des Gelstücks bestimmt. Nach der Zugabe von 200 µl NT-Puffer pro 100 mg Gelgewicht erfolgte eine Inkubation von 10 min bei 50°C, wodurch das Gelstück aufgelöst wurde. Die Proben wurden auf die Säulen des Kits pipettiert und 1 min bei 11000×g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Säulen wurden anschließend durch Zugabe von 600 µl NT3-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, die Säulen 2 min bei 11000×g zentrifugiert und in ein neues Eppendorf-Gefäß eingehängt. Zur Elution der DNA wurden 30 µl RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation für 2 min bei Raumtemperatur und 11000×g. 5 µl des Eluats mit der gereinigten DNA wurden auf einem Agarosegel (0,7 %) elektrophoretisch aufgetrennt, wobei 4 µl LMDM-Marker ebenfalls auf das Gel aufgetragen und dadurch der DNA-Gehalt der Proben ermittelt wurde.

12.4.4 Aufreinigung über Säulensysteme

Zur Reinigung des geschnittenen pGL4.10-Vektors wurde das High Pure PCR Product Purification Kit verwendet. Dazu wurde die DNA-Suspension auf 100 µl mit Wasser aufgefüllt und 500 µl Bindungspuffer zugesetzt. Dieser Ansatz wurde auf eine Hochreinigungssäule aufgetragen und bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde jeweils einmal mit 500 µl und 200 µl Waschpuffer gewaschen und wieder zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein neues Eppendorf-Gefäß eingesetzt und die DNA mit 50 µl H₂O eluiert, indem die Säule zunächst 1 min inkubiert und anschließend 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert wurde. Zur Kontrolle wurden 5 µl der eluierten DNA auf ein Agarosegel (0,7 %) aufgetragen und der DNA-Gehalt mit 4 µl LMDM-Marker bestimmt.

12.4.5 Ligation des Claudin-4-Promotors in Plasmidvektoren

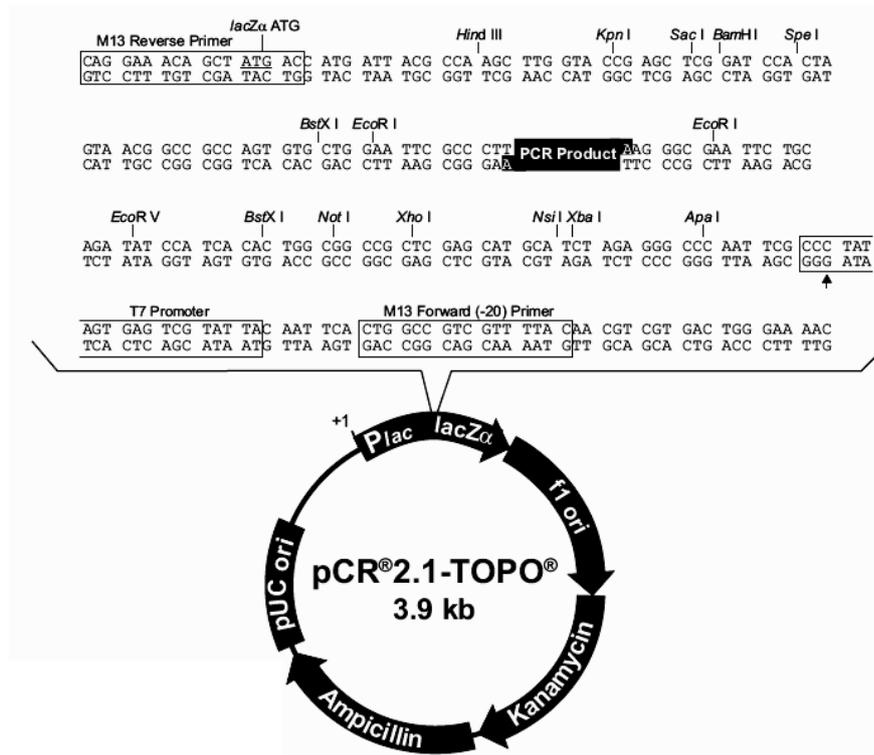
TOPO TA Cloning Kit:	pCR2.1-TOPO-Vektor, 10× PCR-Puffer, dNTPs, Salt Solution, M13-Primer
10× T4-DNA-Ligase-puffer:	Tris-Cl (pH 7,6), 50 mM MgCl ₂ , 50 mM Dithiothreitol, 500 µg/ml BSA, 5 mM ATP

Plasmidvektoren sind kleine, ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, die in Bakterienzellen vervielfältigt werden können. Zur Klonierung von C4P wurde der Vektor mit Restriktionsendonukleasen geschnitten (Abschnitt 12.4.6), so dass linearisierte Plasmid-DNA entstand und C4P enzymatisch in den Vektor ligiert. Die Selektion von transformierten Zellen erfolgte durch ein ebenfalls im Vektor enthaltenes Antibiotika-Resistenz-Gen. In dieser Arbeit wurden ampicillinhaltige Agarplatten verwendet, so dass sich nur plasmidhaltige Kolonien vermehren konnten. Es wurden die kommerziell erhältlichen Plasmidvektoren pCR2.1-TOPO, pGL-4.10 und pGL-4.70 verwendet (Abb. 5), wobei pCR2.1-TOPO bereits linearisiert erworben wurde und somit sofort für die Ligation einsatzfähig war.

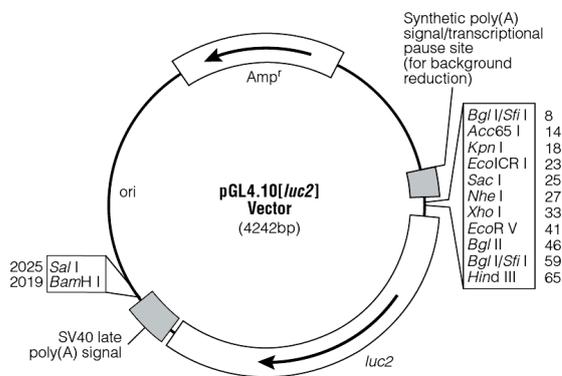
Zunächst erfolgte die Klonierung von C4P, welcher aus der PCR mit genomischer DNA gewonnen wurde (Abschnitt 12.4.1), in den pCR2.1-TOPO-Vektor. Nach der Überprüfung der erfolgreichen Klonierung durch die Agarosegel-Elektrophorese sowie nach Transformation und Vervielfältigung des Konstruktes in kompetente *Escherichia coli*-Bakterien (*E. coli*) wurde das Insert wieder aus dem Vektor ausgeschnitten und in den Zielvektor pGL-4.10 umklontiert.

Bei der Ligation von Fremd-DNA in den linearisierten Plasmidvektor findet die enzymatische Verknüpfung des DNA-Moleküls durch eine DNA-Ligase statt. In diesem Prozess werden Vektor und Fremd-DNA miteinander verknüpft, indem die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen benachbarten Nukleotiden katalysiert wird.

A



B



C

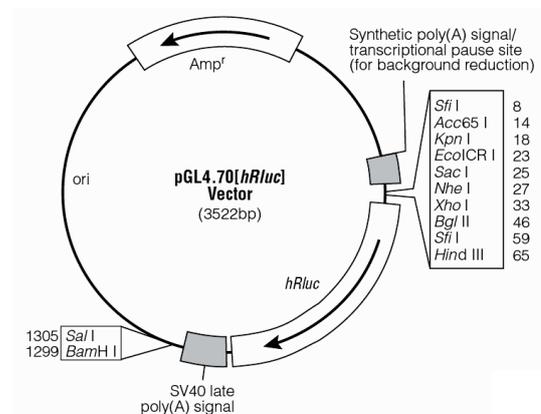


Abb. 5: Plasmidvektoren pCR2.1-TOPO (A), pGL4.10 (B) und pGL4.70 (C)

Alle drei Plasmide enthalten ein Gen für Ampicillin-Resistenz. Darüber hinaus beinhaltet der pCR2.1-TOPO-Vektor das lacZ-Gen für Blau-Weiß-Selektion, pGL4.10-Vektor das luc2-Gen für die Luciferase-Aktivität der *Photinus pyralis* (Promotoraktivität) und der pGL4.70-Vektor das hRluc-Gen für die Luciferase-Aktivität der *Renilla reniformis* (Koreporteraktivität). Weiterhin sind Schnittpunkte der Restriktionsenzyme in diesen Plasmiden dargestellt.

Der 6 µl Ansatz für die Ligation von C4P in den pCR2.1-TOPO-Vektor wurde wie folgt pipettiert. Dabei wurden Komponenten des TOPO TA Cloning Kits verwendet:

- 2 ng PCR-Produkt (C4P)
- 1 µl pCR2.1-TOPO-Vektor
- 1 µl Salt Solution
- Wasser (RNase-frei)

Der Ligationsansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Plasmid wurde nach Transformation und Blau-Weiß-Selektion durch Plasmid-Minipräparation isoliert und sequenziert. Nachdem die Korrektheit der Sequenz überprüft worden war, wurde der C4P aus dem pCR2.1-TOPO-Vektor ausgeschnitten, aufgereinigt und in den pGL4.10-Vektor ligiert. Der 15 µl Ansatz für die Ligation von C4P in den pGL4.10-Vektor wurde folgendermaßen hergestellt:

- 10 ng C4P
- 25 ng pGL4.10-Vektor
- 1,5 µl 10× Ligasepuffer
- 1 µl T4-Ligase
- Wasser (RNase-frei)

Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Das Plasmid wurde anschließend in kompetente *E. coli*-Bakterien transformiert, die Zellen auf Agarplatten selektiert und das Plasmid isoliert. Die Kontrolle der Ligation erfolgte im Agarosegel. Das pGL4.10-C4P-Konstrukt wurde im Luciferase-Reportergen-Assay eingesetzt (Abschnitt 12.5).

12.4.6 Enzymatisches Schneiden von Plasmid-DNA

10× BSA: 1 Teil 100× BSA + 9 Teile H₂O

Durch einen sogenannten Restriktionsverdau werden enzymatisch DNA-Moleküle in definierte Abschnitte zerlegt. Dafür sind Restriktionsendonukleasen wie z.B. KpnI und XhoI notwendig. Ursprünglich stammen diese Enzyme aus Bakterien, wo sie die Organismen vor dem Eindringen von Fremd-DNA schützen, während die eigene DNA aufgrund von Methylierungen nicht angegriffen werden kann. Restriktionsenzyme erkennen kurze, zumeist palindromische Nukleotid-Sequenzen, an denen sie den DNA-Strang schneiden. Eine Einheit Restriktionsendonuklease schneidet 1 µg DNA in 1 h bei optimaler Temperatur zu 100 %. Somit ist auf die Anzahl der Einheiten, die optimale Temperatur und den entsprechenden Puffer zu achten. Weiterhin sollte die Enzymkonzentration nicht mehr als 1/10 Volumen des Restriktionsansatzes betragen, da die Enzyme in 50 % Glycerol gelagert werden und eine Glycerol-Konzentration von über 5 % im Reaktionsansatz den Verdau hemmt.

Zur Umklonierung von C4P aus den pCR2.1-TOPO- in den pGL4.10-Vektor wurden beide Plasmide mit Hilfe der folgenden Restriktionsansätze geschnitten. Der 10 µl Ansatz für die Restriktion des pGL4.10-Vektors wurde wie folgt hergestellt:

- 500 ng pGL4.10-Vektor
- 1 µl 10× Reaktionspuffer 1
- 1 µl 10× BSA
- 1 µl XhoI
- 1 µl KpnI
- Wasser (RNase-frei)

Der 20 µl Ansatz für die Restriktion des pCR2.1-TOPO-C4P-Konstrukts wurde folgendermaßen pipettiert:

- 500 ng pCR2.1-TOPO-C4P
- 2 µl 10× Reaktionspuffer 1
- 2 µl 10× BSA
- 1 µl XhoI
- 1 µl KpnI
- Wasser (RNase-frei)

Die Ansätze wurden für 2 h bei 37°C inkubiert und 2 µl zur Erfolgskontrolle auf ein Agarosegel (1 %) elektrophoretisch aufgetrennt. Der restliche Ansatz wurde ebenfalls im Agarosegel aufgetrennt und die Bande von C4P und des verdauten pGL4.10-Vektors mittels Gelextraktion gewonnen. Anschließend erfolgte die Ligation von C4P in das pGL-4.10-Plasmid (Abschnitt 12.4.5).

12.4.7 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Zellen

LB-Medium, fest:	25 g/l LB-Medium (10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Yeast extract, 10 g/l NaCl), Agar, 100 µg/ml Ampicillin
	Das Medium wurde zunächst autoklaviert und das Ampicillin anschließend vor dem Gießen der Platten in die auf etwa 55°C abgekühlten Lösung zugegeben.
X-Gal:	100 mM 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl- <i>beta</i> -D-Galactopyranosid (40 mg/ml Dimethylformamid)
IPTG-Lösung:	100 mM Isopropylthio- <i>beta</i> -Galactosid (24 mg/ml H ₂ O)

Kompetente Zellen sind Bakterienstämme von *E. coli*, die durch chemische Behandlung Plasmid-DNA leicht aufnehmen können. Diese Zellen (50 µl) wurden auf Eis aufgetaut, 2 bis 3 µl Plasmid-DNA aus den Ligationsansätzen zugegeben und auf Eis für etwa 30 min inkubiert. Für eine bessere Transformationsrate wurde ein Hitzeschock für 45 s bei 42°C auf die kompetenten Zellen ausgeübt. Anschließend wurden die Bakterien für 2 min auf Eis abgekühlt, mit 250 µl SOC-Medium gemischt und für 1 h bei 225 U/min und 37°C im Schüttelinkubator inkubiert.

Für die Selektion der transformierten Bakterien, welche das pCR2.1-TOPO-C4P-Konstrukt aufgenommen hatten, wurde die Weiß-Blau-Selektion angewendet.

Das Prinzip beruht auf die Spaltung von Laktose zu Glukose und Galaktose durch das Enzym β -Galactosidase. Die *E. coli*-Bakterien benötigen dabei die Laktose für ihr Wachstum. Auf dem verwendeten pCR2.1-TOPO-Vektor befindet sich ein Gen für dieses Enzym, das *lacZ*-Gen. In transformierten Bakterien induziert IPTG die Aktivität der β -Galactosidase, indem es an den lac-Repressor des Plasmids bindet und somit die Repressoraktivität blockiert. Infolge dessen können die Strukturgene abgelesen werden. X-Gal ist ein Analogon zur Laktose und fungiert ebenfalls als Substrat für die β -Galactosidase. Durch die Spaltung von X-Gal werden die Bakterienkolonien blau gefärbt, da neben dem Hydrolyseprodukt Galaktose noch ein blauer, unlöslicher Farbstoff entsteht. Da sich die Klonierungsstelle für den Promotor innerhalb des *lacZ*-Gens befindet, bleiben die Kolonien bei erfolgreicher Klonierung weiß, da die β -Galactosidase-Aktivität beeinträchtigt ist. Nach einer Vorbehandlung der Agarplatten mit 40 μ l X-Gal und 4 μ l IPTG wurden 100 bis 200 μ l des Transformationsansatzes mit dem pCR2.1-TOPO-C4P-Konstrukt auf die Platten ausplattiert und im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert. Nach der Selektion wurden die resistenten, weißen Kolonien in LB-Flüssigmedium überimpft und die Plasmide durch Minipräparation isoliert.

Die Selektion der transformierten Bakterien, die das pGL4.10-C4P-Konstrukt aufgenommen hatten, erfolgte über die Antibiotika-Resistenz auf ampicillinhaltigen Agarplatten. Die Kolonien, welche auf diesen Platten über Nacht bei 37°C gewachsen waren, wurden ebenfalls angeimpft und die Plasmide durch Minipräparation gewonnen.

12.4.8 Plasmid-Minipräparation aus kompetenten Zellen

LB-Medium, flüssig:	25 g/l LB-Medium (10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Yeast Extract, 10 g/l NaCl), 100 µg/ml Ampicillin
	Das Medium wurde zunächst autoklaviert und das Ampicillin anschließend in die auf etwa 55°C abgekühlten Lösung zugegeben.
Puffer P1 (Resuspensionspuffer):	50 mM Tris·Cl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A
Puffer P2 (Lysepuffer):	200 mM NaOH, 1 % SDS
Puffer P3 (Neutralisationspuffer):	3 M NaAc pH 5,5

Zur Vermehrung des Plasmids wurde eine der auf Agarplatten gewachsenen Bakterien-Kolonie mit einem Holzstäbchen aufgenommen und in ein Grainer-Röhrchen mit 4 ml LB-Medium überführt. Über Nacht wurden die *E. coli*-Bakterien im Schüttelinkubator bei 37°C und 225 U/min angezüchtet.

Die Bakteriensuspension (1,5 ml) wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei Raumtemperatur und 5000×g für 2 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 300 µl P1-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 300 µl P2-Puffer zugegeben, durch Invertierung gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 300 µl P3-Puffer, wobei die Proben ebenfalls durch Invertierung gemischt und für 15 min bei 4°C aufbewahrt wurden. Die Proben wurden bei 25000×g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 400 µl Isopropanol gemischt. Nach der nun erfolgten Fällung des Plasmids wurden die Proben bei 25000×g und 4°C für weitere 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 250 µl 70 % Ethanol gewaschen und nochmals 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA in 50 µl Wasser (RNase-frei) resuspendiert und 2,5 µl auf einem Agarosegel (0,7 %) elektrophoretisch aufgetrennt, um den Einbau des Inserts in das Plasmid zu überprüfen. Das Plasmid mit dem Insert lief aufgrund seiner Größe im Agarosegel langsamer als der ebenfalls aufgetragene „leere“ Vektor. Die Plasmid-DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

12.4.9 Sequenzierung von DNA-Abschnitten

BigDye Terminator Sequencing Kit: Ready Reaction Mix (enthält dNTPs, ddNTPs, AmpliTaq Polymerase)

Zur Bestimmung der Nukleotidsequenz eines DNA-Moleküls wurde die Didesoxy- oder Kettenabbruch-Methode von F. Sanger verwendet (Sanger et al., 1977). Spezielle DNA-Primer binden an einer komplementären Sequenz und werden durch die DNA-Polymerase verlängert. Zu dem normalen Gemisch von Nukleosidtriphosphaten (dNTPs) werden Didesoxynukleotide (ddNTPs) zugegeben. Jedes der vier ddNTP-Varianten (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) ist mit einem unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoff markiert. Sie enthalten keine 3'OH-Gruppe, wodurch die DNA-Synthese der Polymerase gestoppt wird. Dies gewährleistet eine Unterbrechung der komplementären Stränge mit einer definierten statistischen Häufigkeit. Je nach Einbau der ddNTPs entsteht ein Gemisch unterschiedlich großer DNA-Fragmente, die anschließend in einer Kapillar-Gel-Elektrophorese voneinander getrennt werden. Die Detektion der mit unterschiedlichen Fluorophoren markierten Fragmente geschieht durch einen Laser, wobei das resultierende Elektropherogramm die Grundlage für die computergestützte Analyse der DNA-Sequenz darstellt.

Zur Registrierung, ob die korrekte C4P-Sequenz in die Plasmide kloniert wurde, wurde der Promotor nach jeder Transformation mit den spezifischen pCR2.1-TOPO- (M13-Primer) und pGL4.10-Primern ansequenziert. Weiterhin wurde der C4P vor dem Einsatz in den Luciferase-Reporter-Gen-Assay vollständig mit den human Cld4-Primern FOR3-8 durchsequenziert, um eventuell auftretende Mutationen zu lokalisieren.

Für die Sequenzierung wurde folgender Ansatz (10 µl) in PCR-Röhrchen pipettiert:

- 5 µl DNA
- 2 µl 5× BigDye Terminator Sequencing Puffer
- 2 µl Ready Reaction Mix
- 1 µl FOR- oder REV-Primer (Finalkonzentration: 1 µM)

Der gewünschte DNA-Abschnitt wurde nach folgendem PCR-Programm am GeneAmp PCR System 2400 amplifiziert:

1. Schritt: 96°C, 5 min
2. Schritt: 96°C, 10 s
3. Schritt: 55°C, 5 s
4. Schritt: 60°C, 4 min, Schleife zum 2. Schritt 25-mal
5. Schritt: 4°C

Der Ansatz wurde mit Hilfe einer Säule des Performa DTR Gel Filtration Cartridges Kits von überschüssigen Nukleotiden befreit. Dazu wurden die Säulen für 2 min bei 750×g zentrifugiert, in ein neues Auffang-Gefäß eingesetzt und die 10 µl des PCR-Ansatzes in die Mitte des Gelbetts der Säule pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation für 2 min bei 750×g. Das Eluat wurde in ein Sequenzer-Gefäß überführt und die Flüssigkeit in der Speed Vac in 15 min auf etwa 5 µl minimiert. Die Proben wurden mit 20 µl Template Supression Reagenz versetzt und das Gefäß mit einem Septum verschlossen. Die DNA wurde bei 96°C in 3 min denaturiert, auf Eis abgekühlt und im Sequenziergerät ABI310 sequenziert.

12.4.10 Plasmid-Midipräparation (endotoxinfrei)

QBT-Puffer (Equilibrierungspuffer):	750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15 % Isopropanol, 0,15 % TritonX-100
QC-Puffer (Waschpuffer):	1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15 % Isopropanol
QN-Puffer (Elutionspuffer):	1,6 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15 % Isopropanol
TE-Puffer:	10 mM Tris-Cl pH 8,0, 1 mM EDTA

Das LB-Medium (100 ml) wurden mit 330 µl einer Übernachtskultur aus der Minipräparation angeimpft (transformierte Bakterien mit dem pGL4.10-C4P-Konstrukt) und über Nacht bei 37°C und 225 U/min im Schüttelinkubator kultiviert. Diese Bakterienkultur wurde auf 3 Falcon-Röhrchen aufgeteilt und für 15 min bei 6000×g und 4°C in der Beckman-Zentrifuge sedimentiert. Das Pellet wurde in je 3,3 ml P1-Puffer des Plasmid Midi Kits (endotoxinfrei) resuspendiert und zusammengefügt. Nach der Zugabe von 10 ml P2-Puffer wurden die Proben vorsichtig invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu der

Suspension wurden 10 ml P3-Puffer pipettiert, der Ansatz invertiert und in Cartridges mit Filter-Einsatz umgefüllt und für 10 min inkubiert. Die Suspension (ca. 25 ml) wurde aus den Cartridges in ein neues Falcon-Röhrchen filtriert und das klare Lysat mit 2,5 ml ER-Puffer versetzt, invertiert und für 30 min bei 4°C inkubiert.

Die Plasmid-Isolierung erfolgte mit Säulen, die zunächst mit 10 ml QBT-Puffer equilibriert wurden. Anschließend wurde die Suspension auf die Säule gegeben und zweimal mit je 30 ml QC-Puffer gewaschen. Die DNA wurde mit 15 ml QN-Puffer in einem frischem Falcon-Röhrchen eluiert. Nach dem Zusatz von 10 ml Isopropanol zur Fällung der Plasmide wurden die Proben bei 15000×g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 5 ml endotoxinfreiem 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 10 min zentrifugiert. Das Sediment wurde luftgetrocknet und in 400 µl TE-Puffer resuspendiert. Nach der Bestimmung des DNA-Gehalts im Calculator GeneQuant II wurden zur Kontrolle 100 ng auf ein Agarosegel (1 %) aufgetragen. Die pGL4.10- und pGL4.70-Vektoren wurden ebenfalls auf diese Weise vervielfältigt. Die Proben wurden bis zum Einsatz im Luciferase-Reporter-Gen-Assay bei -20°C aufbewahrt.

12.4.11 Glycerolstocks

Glycerolstocks wurden angelegt, um die langfristige Aufbewahrung transformierter *E. coli*-Kulturen bei -80°C zu gewährleisten. Dazu wurde dem Medium Glycerol zugesetzt, um eine Beschädigung der Bakterienzellen durch Eiskristalle zu verhindern. Die Übernachtskulturen (850 µl) wurden mit 150 µl Glycerol im Kryo-Röhrchen gemischt, in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

12.5 Bestimmung der Aktivität des Claudin-4-Promotors mittels Luciferase-Reporter-Gen-Assay

Dual-Luciferase Reporter Assay System:	10 ml Luciferase Assay Puffer II, 1 Gefäß Luciferase Assay Substrat (lyophilisiert)
	10 ml Stop und Glo Puffer, 200 µl Stop und Glo Substrat (flüssig)
	30 ml 5× Passiv Lyse Puffer
1× Lysepuffer:	1 Teil 5× Passiv Lyse Puffer + 4 Teile H ₂ O

Die Übertragung von DNA in eine Zelle wird als Transfektion bezeichnet. Es gibt verschiedene Transfektionsmethoden (Mikroinjektion, Kalziumphosphat-Präzipitation, Elektroporation, Liposomen, DEAE-Dextran). In dieser Arbeit wurde bei der Transfektion Lipofectamin verwendet. Lipofectamin besteht aus Liposomen, mit denen die DNA in Komplexe verpackt und in die Zelle transportiert wird. In der Zelle finden die Transkription der Plasmid-DNA zur mRNA und die Translation zu den entsprechenden Proteinen statt.

Im Luciferase-Reporter-Gen-Assay wurden als Reporter-Gen-Konstrukte Vektoren eingesetzt, bei denen der zu untersuchende Claudin-4-Promotor vor ein Luciferase-Gen aus *Photinus pyralis* (pGL4.10) kloniert wurde. Zur Standardisierung der Versuche wurde ein weiteres Konstrukt (pGL4.70) als Koreporter mit einem Luciferase-Gen aus *Renilla reniformis* eingesetzt.

Es wurden von der Caco-2-Zelllinie in jede Vertiefung einer 6-Loch-Platte $1 \cdot 10^6$ Zellen eingesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Reporter-Gen- und Koreporter-Konstrukt transfiziert, wobei für die Transfektion MEM-Medium ohne FKS und Antibiotika verwendet wurde. Dazu wurden für jede Vertiefung der Zellkulturschale 1 µg DNA vom Reporter-Gen (pGL4.10-C4P) und 50 ng DNA des Koreporters (pGL4.70) mit 12 µl Plusreagenz und 200 µl Zellmedium gemischt. Weiterhin wurde ein zweiter Ansatz aus 8 µl Lipofectamin und 200 µl Zellmedium für jede Vertiefung einer 6-Loch-Platte hergestellt. Beide Ansätze wurden bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen in den 6-Loch-Platten einmal mit PBS ohne Mg^{2+}/Ca^{2+} gewaschen und 1,6 ml frisches Zellmedium ohne Antibiotika und FKS hinzugefügt. Nach der Inkubationszeit wurde der zweite Ansatz zum ersten zugegeben, gut gemischt und nach weiteren 15 min das entsprechende Volumen von etwa 422 µl pro Vertiefung tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Nach einer

Inkubation von 4 h im Brutschrank erfolgte die Zugabe von 4 ml Medium mit FKS und Antibiotika sowie den zu untersuchenden Substanzen.

Die Aufarbeitung für die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte nach 20 h. Die Zellen wurden zweimal mit PBS plus Mg^{2+}/Ca^{2+} gewaschen und in jede Vertiefung der 6-Loch-Platte 750 μ l 1 \times Lysepuffer zugegeben. Es erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf einer Wippe. In der Zeit wurden die Zellen lysiert, die anschließend möglichst vollständig in ein Eppendorf-Gefäß überführt wurden. Die Zellmembran wurde aufgebrochen, indem die Proben für 10 min in Flüssigstickstoff inkubiert und anschließend bei 37°C im Heizblock in 10 min wieder aufgetaut wurden. Die Vorgänge des Schockgefrierens und Wiederauftauens wurden zweimal durchgeführt. Die Proben wurden bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min zentrifugiert und 500 μ l des Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt.

Die Bestimmung der Luciferase-Aktivität der Proben erfolgte in einem Platten-Luminometer. Dazu wurden vor der Messung die Luciferase Assay Reagenz für die Aktivität von *Photinus pyralis* (Promotoraktivität) sowie die Stop und Glo Reagenz für die Aktivitätsbestimmung von *Renilla reniformis* (Koreporteraktivität) aus dem Dual-Luciferase Reporter Assay System nach der Vorschrift des Herstellers zubereitet. In eine weiße, undurchsichtige 96-Loch-Platte wurden 20 μ l des Zellextrakts pipettiert und die Luciferase-Aktivitäten im Platten-Luminometer gemessen, wobei die Zugabe von je 50 μ l Luciferase Assay Reagenz und Stop und Glo Reagenz automatisch erfolgten. Diese Messungen wurden an jeder Probe in einer Doppelbestimmung durchgeführt und die Werte gemittelt.

Innerhalb einer gleichbehandelten Versuchsgruppe diente der Koreporter zur Standardisierung der verschiedenen Proben. Dazu wurden aus den Werten der Koreporter-Luciferase der Mittelwert gebildet und ein Faktor durch Quotientenbildung aus Mittelwert und Einzelwert der Koreporter-Aktivität berechnet. Dieser Faktor wurde mit den Werten der Reporter-Luciferase multipliziert. Aus den standardisierten Werten der Promotor-Aktivität wurde ebenfalls der Mittelwert berechnet. Die Einflüsse des Flavonoids auf das pGL4.10-Plasmid ohne und mit C4P-Insert wurden analysiert, wobei der Effekt auf den Leervektor in die Ergebnisse der C4P-Aktivität einberechnet wurde.

13 Statistische Auswertung

Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. Zur statistischen Auswertung zweier Gruppen wurde der zweiseitige, ungepaarte t-Test und für Daten der quantitativen mRNA-Analyse der zweiseitige, gepaarte t-Test angewendet. Für multiple Gruppenvergleiche erfolgte die statistische Auswertung mittels der ANOVA-Datenanalyse mit Bonferroni-Korrektur. Als statistisch signifikant wurden p-Werte unter 0,05 betrachtet.

C Ergebnisse

1 Effekt des Flavonoids Quercetin auf die Barrierefunktion der Caco-2-Zelllinie

1.1 Einfluss von Quercetin auf den transepithelialen Widerstand

Caco-2-Zellen wurden auf permeablen Zellfiltern kultiviert und nach Ausbildung eines transepithelialen Widerstands (R^t) von etwa 200 bis 350 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ für die elektrophysiologischen Untersuchungen eingesetzt. Dazu wurden die entsprechenden Quercetin-Konzentrationen mukosal und serosal eingestellt und der konzentrations- und zeitabhängige Effekt des Flavonoids durch R^t -Messung ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 wiedergegeben.

Die Abbildung 6A zeigt den konzentrationsabhängigen Anstieg des Widerstands durch Quercetin nach einer Inkubationszeit von 24 h bei Kultivierung der Caco-2-Zellen in serumhaltigen Medium (15 % FKS). Bei einer Konzentration von 50 μM blieb R^t unverändert im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Ab 100 μM zeigte sich eine deutliche R^t -Erhöhung, wobei die maximal eingesetzte Konzentration von 200 μM den stärksten Effekt aufwies (Quercetin 140 ± 2 % versus Kontrolle 100 ± 1 % vom Ausgangswiderstand). Aus Löslichkeitsgründen wurden keine Flavonol-Konzentrationen von mehr als 200 μM untersucht (van der Woude et al., 2003).

Abbildung 6B zeigt den Zeitverlauf von R^t unter Einfluss von 200 μM Quercetin. Durch die Inkubation mit dem Flavonoid stieg der R^t bereits 4 h nach Zugabe auf 132 ± 3 % der Ausgangswerte an (Kontrolle 95 ± 2 % vom Ausgangswiderstand). Der maximale Effekt wurde nach einer Inkubationszeit von 48 h erreicht (Quercetin 163 ± 9 % versus Kontrolle 104 ± 4 % vom Ausgangswiderstand). Am Versuchsende am Tag 3 zeigte sich der eingetretene Effekt rückläufig (Quercetin 114 ± 8 % versus Kontrolle 91 ± 7 % vom Ausgangswiderstand), wobei dies mit dem Abbau und/oder dem Zerfall des Quercetins zusammenhängen könnte.

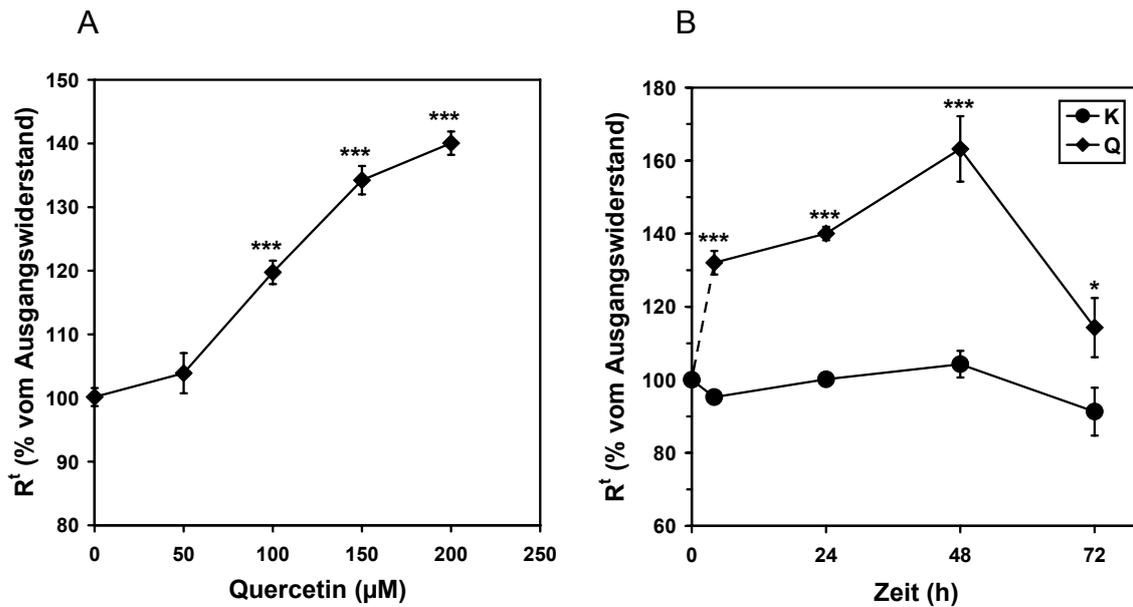


Abb. 6: Einfluss von Quercetin auf R^t in Caco-2-Zellen in serumhaltigem Medium

- (A) Konzentrationsabhängiger R^t -Anstieg durch Quercetin. Auf Zellfiltern kultivierte Caco-2-Zellen wurden mit verschiedenen Quercetin-Konzentrationen (50, 100, 150 und 200 μM) behandelt und R^t nach 24 h Inkubation bestimmt. Die Daten sind als Prozent des Ausgangswiderstands zum Zeitpunkt 0 h angegeben (MW \pm SEM, n = 11-12, ***p < 0,001).
- (B) Zeitabhängiger R^t -Anstieg durch Quercetin. Auf Zellfiltern kultivierte Caco-2-Zellen wurden mit 200 μM Quercetin (Q) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K) inkubiert und R^t nach 0, 4, 24, 48 und 72 h ermittelt. Die Daten sind als Prozent des Ausgangswiderstands zum Zeitpunkt 0 h angegeben (MW \pm SEM, n = 11-12, *p < 0,05, ***p < 0,001).

Um zu überprüfen, welchen Effekt der Serumgehalt im Zellkulturmedium auf die Quercetin-Wirkung ausübt, wurde der Einfluss von 50 μM Quercetin auf R^t unter serumfreien Kultivierungsbedingungen untersucht (Abb. 7). R^t stieg nach 24 h Inkubation auf etwa 150 % an bezogen auf den Kontrollwert (Quercetin $155,5 \pm 3,0$ % versus Kontrolle $105,0 \pm 3,8$ % vom Ausgangswiderstand). Diese deutlich niedrigere Flavonol-Konzentration zeigte eine vergleichbare Wirkung sowie einen ähnlichen Zeitverlauf wie 200 μM Quercetin in serumhaltigem Zellkulturmedium. Nachfolgende Quercetin-Experimente wurden in serumhaltigem Medium durchgeführt.

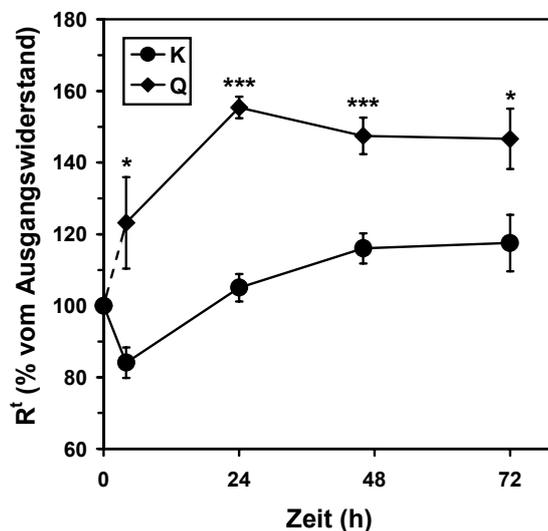


Abb. 7: Einfluss von Quercetin auf R^t in Caco-2-Zellen in serumfreiem Medium

Caco-2-Zellfilter wurden mit 50 μM Quercetin (Q) mukosal und serosal inkubiert und der zeitabhängige Einfluss des Flavonols auf R^t im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K) bestimmt (MW \pm SEM, n = 6, *p < 0,05, ***p < 0,001).

1.2 Zytotoxizität von Quercetin an konfluenten Zellen

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Quercetin zellschädigende Wirkungen hervorrufen kann (Agullo et al., 1996; Csokay et al., 1997). Um solche Effekte unter den hier verwendeten, serumhaltigen Kulturbedingungen auszuschließen, wurde die Freisetzung der Laktat-Dehydrogenase (LDH) als Maß für die Zytotoxizität an konfluenten Caco-2-Zellen bestimmt.

Zur Ermittlung der LDH-Aktivität wurden auf permeablen Zellfiltern kultivierte Caco-2-Monolayer für 24 h mit 100 oder 200 μM Quercetin inkubiert und die LDH-Aktivität im Überstand sowie in den lysierten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen. Aus diesen Daten wurde die prozentuale LDH-Aktivität im Überstand berechnet, die in Tabelle 5 dargestellt ist. Quercetin-Konzentrationen von 100 bzw. 200 μM besaßen keine zytotoxische Wirkung auf konfluente Caco-2-Zellen.

Tab. 5: Einfluss von Quercetin auf die LDH-Freisetzung an konfluenten Caco-2-Zellen

Caco-2-Zellen, kultiviert auf permeablen Zellfiltern, wurden für 24 h mit 100 und 200 μM Quercetin inkubiert und die LDH-Aktivität im mukosalen Überstand und im Zelllysat bestimmt. Die mukosale LDH-Freisetzung wurde prozentual zur Gesamt-Aktivität angegeben.

	LDH-Freisetzung (%)	n	p
Kontrolle	7 \pm 2	8	
100 μM Quercetin	11 \pm 3	5	n.s.
200 μM Quercetin	9 \pm 1	8	n.s.

n.s. nicht signifikant im Vergleich zum Kontrollwert

1.3 Effekt von Quercetin auf den transepithelialen Widerstand nach täglicher Supplementierung des Flavonoids

Durch eine Quercetin-Dosis von 200 μM stieg der R^t des Caco-2-Monolayers innerhalb weniger Stunden an, wobei der Effekt über 2 Tage erhalten blieb und sich dann am dritten Tag den Widerständen der unbehandelten Kontrollen annäherte (Abb. 6B). Um zu überprüfen, ob die Flavonol-Wirkung durch tägliche Gabe von Quercetin aufrechterhalten werden kann, wurden Caco-2-Monolayer entweder zum Zeitpunkt 0 h mit einer einmaligen Quercetin-Dosis von 200 μM in serumhaltigem Medium behandelt oder Quercetin über einen Zeitraum von 3 Tagen täglich neu in beide Zugabekompartimente eingesetzt (Zugabe zu den Zeitpunkten: 0, 24 und 48 h). Die Werte für R^t nach einer Inkubationsdauer von 3 Tagen sind in der Abbildung 8 dargestellt.

Wurden die Zellkulturfilter täglich mit Quercetin-supplementiertem Medium neu inkubiert, blieb R^t auch am Tag 3 nach Versuchsbeginn im Vergleich zu der einmalig mit Quercetin-behandelten Versuchsgruppe weiterhin stark erhöht (Quercetin $123 \pm 3 \%$ versus Quercetin-Wechsel $150 \pm 4 \%$ vom Ausgangswiderstand) (Abb. 8).

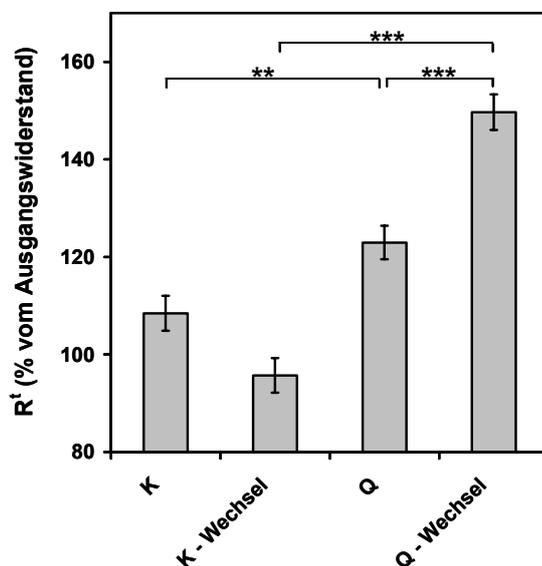


Abb. 8: Effekt von Quercetin auf R^t nach täglicher Flavonol-Supplementierung

Auf Zellfiltern kultivierte Caco-2-Zellen wurden mit 200 μM Quercetin (Q) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K) inkubiert. Die Flavonol-Zugabe erfolgte entweder einmalig zum Zeitpunkt 0 h (Säulen K und Q) oder durch täglichen Mediumwechsel mit Quercetin-Supplementierung (Zugaben: 0, 24 und 48 h; Säulen K-Wechsel und Q-Wechsel). R^t wurde nach einer Inkubationsdauer von 3 Tagen bestimmt. Die Daten sind als Prozent des Ausgangswiderstands zum Zeitpunkt 0 h angegeben (MW \pm SEM, n = 9-10, **p < 0,01, ***p < 0,001).

1.4 Einfluss von Quercetin auf den transepithelialen Widerstand in Abhängigkeit vom Zugabekompartiment

Da Quercetin je nach Zugabekompartiment (mukosale oder serosale Zugabe) unterschiedliche Effekte aufweisen kann (Sanchez de Medina et al., 1997), wurde den Caco-2-Zellen Quercetin (200 μ M) entweder mukosal, serosal oder beidseitig appliziert. Es zeigte sich, dass es bei diesen Experimenten keinen Unterschied im Widerstandsanstieg gab, unabhängig davon ob Quercetin nur einem der Zugabekompartimente oder beidseitig zugesetzt wurde (Abb. 9).

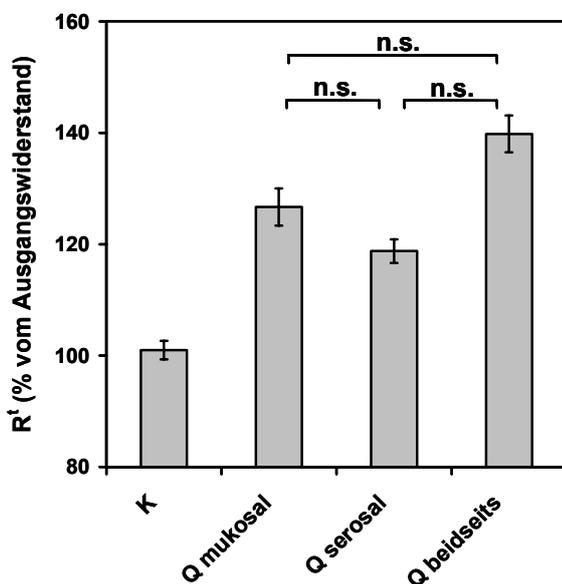


Abb. 9: Einfluss von Quercetin auf R^t in Abhängigkeit vom Zugabekompartiment

Auf Zellfiltern kultivierten Caco-2-Zellen wurde 200 μ M Quercetin entweder in die mukosale (Q mukosal) oder serosale Badlösung (Q serosal) zugegeben oder in beiden Kompartimenten (Q beidseits) appliziert und mit der unbehandelten Kontrollgruppe (K) verglichen. R^t wurde nach einer Inkubationszeit von 24 h ermittelt. Die Daten sind als Prozent des Ausgangswiderstands zum Zeitpunkt 0 h angegeben (MW \pm SEM, n = 9, n.s. nicht signifikant).

2 Einfluss von Quercetin auf das Expressionsmuster von Tight Junction-Proteinen

Der Einfluss von Quercetin auf das Expressionsmuster von TJ-Proteinen wurde unter zwei verschiedenen Kultivierungsbedingungen analysiert. Zunächst wurden Caco-2-Zellen in Zellkulturschalen (6-Loch-Platten) kultiviert und mit Quercetin inkubiert, wobei bei diesem Testsystem das Flavonol nur mukosal mit dem Epithel in Berührung kommen kann (Abschnitt 2.1). Des Weiteren wurde die Expression der TJ-Proteine unter Quercetin-Exposition in auf Zellfiltern kultivierten Caco-2-Zellen untersucht. Hierbei wurde die Testsubstanz beidseitig appliziert (Abschnitt 2.2).

2.1 Proteinexpression von Caco-2-Zellen in Kulturschalen

Konfluente, in 6-Loch-Platten kultivierte Caco-2-Zellen wurden für 24 h mit 200 μM Quercetin inkubiert. Anschließend erfolgten die Isolation der Membranfraktion sowie die Western Blot-Analysen der Expression der TJ-Proteine Occludin, Claudin-1, Claudin-3, Claudin-4 und Claudin-7 (Abb. 10).

Abbildung 10 zeigt, dass 200 μM Quercetin in Zellkulturschalen die Expression von Claudin-1 und Claudin-7 verminderte und die von Claudin-3 und Claudin-4 erhöhte, während das Expressionsniveau von Occludin durch das Flavonoid unbeeinflusst blieb. Am stärksten veränderte die Testsubstanz die Expression von Claudin-4, die um mehr als den Faktor 3 anstieg. Es zeigten sich keine Signale für Claudin-2 und Claudin-5 im Western Blot, so dass übereinstimmend mit der Literatur keine Expression dieser TJ-Proteine in Caco-2-Zellen zu konstatieren ist (Amasheh et al., 2005; Escaffit et al., 2005).

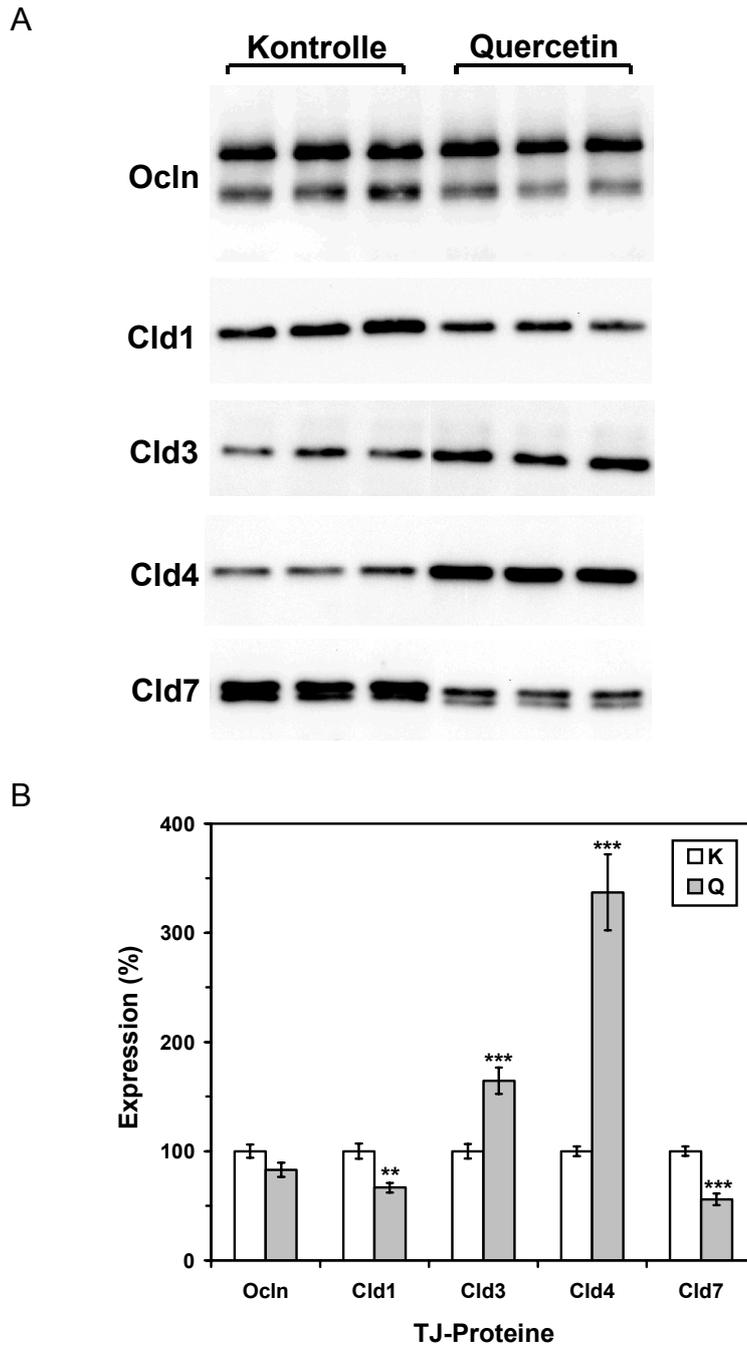


Abb. 10: Einfluss von Quercetin auf das Expressionsmuster von TJ-Proteinen an konfluenten, in Kulturschalen kultivierten Caco-2-Zellen

Konfluente Caco-2-Zellen, kultiviert in 6-Loch-Platten, wurden für 24 h mit 200 μ M Quercetin (Q) inkubiert und die Expression der TJ-Proteine Occludin (Ocln), Claudin-1 (Cld1), Claudin-3 (Cld3), Claudin-4 (Cld4) und Claudin-7 (Cld7) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K) bestimmt.

- (A) TJ-Proteinexpression. Jeweils 10 μ g Protein aus Membranfraktionen wurden für die Expressionsanalysen in den Western Blot-Experimenten eingesetzt.
- (B) Densitometrische Auswertung der Expressionsanalysen der TJ-Proteine (MW \pm SEM, n = 7-11, **p < 0,01, ***p < 0,001).

2.2 Proteinexpression von Caco-2-Zellen auf permeablen Zellfiltern

Um die Situation im GIT besser zu simulieren, wurden die Zellen in dieser Versuchsreihe auf permeablen Filtern kultiviert. Nach Konfluenz der Zellen entstand hierbei ein mukosal- und ein serosal-abgegrenztes Kompartiment. Auch die Monolayer dieser Kultivierungsform wurden hinsichtlich ihrer TJ-Proteinexpression untersucht. Dazu wurden die Caco-2-Zellen für 24 h beidseitig mit 200 μ M Quercetin inkubiert, anschließend die Membranfraktion isoliert und die Expression der TJ-Proteine Occludin, Claudin-1, Claudin-3, Claudin-4 und Claudin-7 durch Western Blot-Analysen untersucht (Abb. 11).

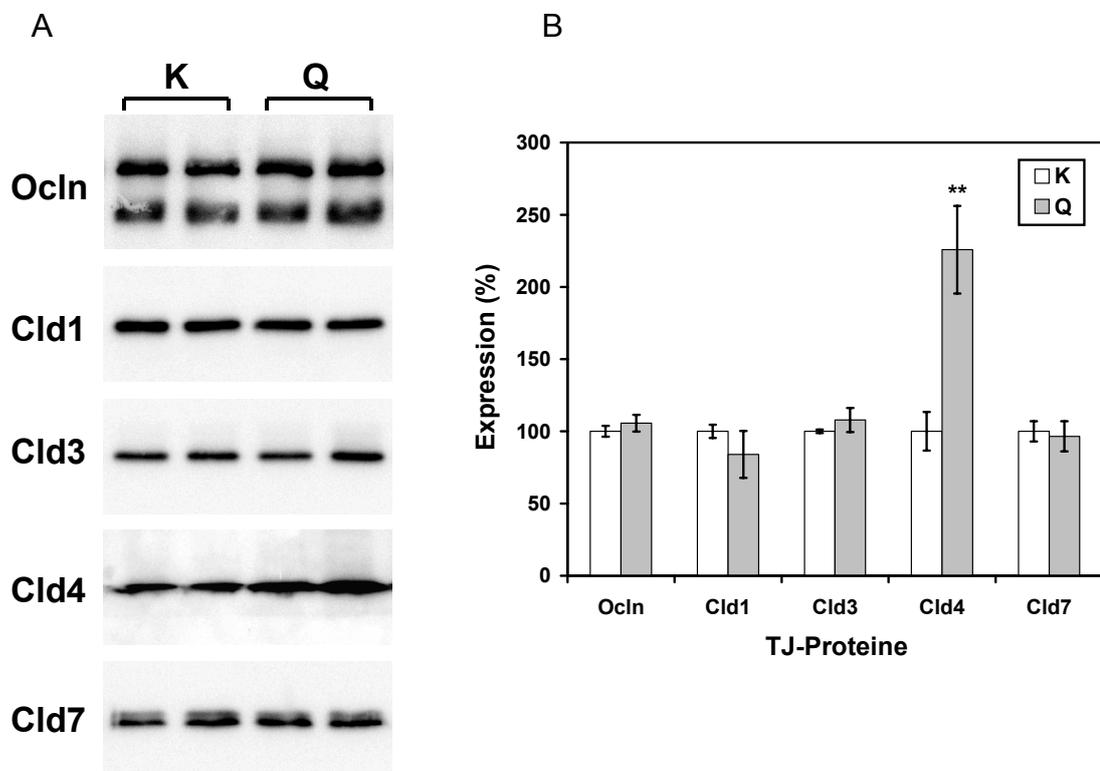


Abb. 11: Einfluss von Quercetin auf das Expressionsmuster von TJ-Proteinen an konfluenten, auf permeablen Zellfiltern kultivierten Caco-2-Zellen

Konfluente Caco-2-Zellen, kultiviert auf Zellfiltern, wurden für 24 h beidseitig mit 200 μ M Quercetin (Q) inkubiert und die Expression der TJ-Proteine Occludin (Ocln), Claudin-1 (Cld1), Claudin-3 (Cld3), Claudin-4 (Cld4) und Claudin-7 (Cld7) im Vergleich zur Kontrolle (K) bestimmt.

- (A) TJ-Proteinexpression. Jeweils 10 μ g Protein aus Membranfraktionen wurden für die Expressionsanalysen in den Western Blot-Experimenten eingesetzt.
- (B) Densitometrischen Auswertung der Expressionsanalyse der TJ-Proteine (MW \pm SEM, n = 4, ** p < 0,01).

Abbildung 11 zeigt, dass in konfluenten, auf permeablen Zellfiltern kultivierten Caco-2-Zellen die Expression von Claudin-4 nach Quercetin-Applikation auf mehr als das Zweifache anstieg - vergleichbar mit dem Ergebnis der auf dem Boden von Zellkulturschalen differenzierten Caco-2-Zellen. Das Expressionsniveau von Occludin sowie von Claudin-1, Claudin-3 und Claudin-7 blieb durch das Flavonoid unbeeinflusst.

3 Einfluss von Quercetin auf die Lokalisation der Tight Junction-Proteine

Nicht nur das Maß der Expression sondern auch eine Umverteilung der parazellulären Distribution von TJ-Proteinen in den Schlussleisten kann erhebliche Veränderungen der Barrierefunktion eines Epithels zur Folge haben. Daher wurden Occludin sowie die Claudine-1, -3, -4 und -7 mit spezifischen Antikörpern angefärbt und ihre Lokalisation im epithelialen Verband mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops untersucht.

Hierfür wurden Caco-2-Zellen auf Deckgläschen bis zum Erreichen eines konfluenten Monolayers kultiviert und für 24 h mit 200 µM Quercetin inkubiert. Anschließend erfolgten die Immunfluoreszenz-Färbungen analog dem unter Methoden beschriebenen Protokoll als Doppelfärbungen, wobei Occludin als Gegenfärbung zu den bereits erwähnten Claudinen verwendet wurde. Da Occludin in seiner Expression nicht durch Quercetin verändert wurde, diente es als Referenz. Bei den mikroskopischen Aufnahmen wurde darauf geachtet, dass gleiche Intensitätseinstellungen bei der Kontroll- und Quercetingruppe einer Färbung verwendet wurden, um eine semiquantitative Vergleichbarkeit der Signalstärken zu erhalten.

Abbildungen 12 bis 15 zeigen das sub- und parazelluläre Verteilungsmuster von Claudin-1, Claudin-3, Claudin-7 und Claudin-4 gegen Occludin. Alle TJ-Proteine wiesen interzellulär die typische Netzstruktur der TJ-Stränge auf, wobei Occludin überwiegend mit den untersuchten Claudinen kolokalisierte, was durch eine gelbe Färbung („merge“ = Überlagerung von grün und rot) angezeigt wurde. Analog zu den Ergebnissen der quantitativen Expressionsanalyse im Western Blot zeigte sich auch in der Immunfluoreszenz keine durch Quercetin induzierte

Veränderung im epithelialen Verteilungsmuster von Occludin. Ebenso wiesen auch die TJ-Proteine Claudin-1 (Abb. 12), Claudin-3 (Abb. 13) und Claudin-7 (Abb. 14) nach Quercetin-Inkubation keinen Unterschied in ihrer sub- und parazellulären Lokalisation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf.

Claudin-4 hingegen, welches bereits in den Western Blot-Analysen eine verstärkte Expression nach Inkubation mit dem Flavonol zeigte, wies auch in den Immunfluoreszenz-Färbungen durch die Wirkung von Quercetin eine stark veränderte Lokalisation auf (Abb. 15). Ein verstärktes Fluoreszenzsignal konnte sowohl innerhalb der TJ als auch subjunctional wahrgenommen werden. Außerdem stellten sich vermehrt intrazelluläre Signale für Claudin-4 dar (Abb. 17), was auf eine Protein-Lokalisation in subzellulären Strukturen wie dem endoplasmatischen Retikulum, Golgi-Apparat oder Endozytose-Vesikeln hindeutet.

Die Abbildungen 16 und 17 zeigen weiterhin die Änderung des Verteilungsmusters von Claudin-4 unter Quercetin-Einfluss im Epithelverband der Caco-2-Zellen. Zunächst wurde bei den Aufnahmen optisch eine größere Schichtdicke erfasst (Abb. 16). Es wurde in dieser semiquantitativen Analyse deutlich, dass das Claudin-4-Signal nach Exposition von 200 μ M Quercetin für 24 h im gesamten Epithelverband verstärkt erschien im Vergleich zur Kontrollgruppe. Für eine bessere Veranschaulichung wurde in Abbildung 17 eine Ausschnittsvergrößerung der Claudin-4- und Occludin-Färbung mit Scan durch die Z-Ebene dargestellt. Die Aufsicht zeigt die TJ-Ebene mit der typischen netzartigen Struktur. Die Z-Ebene verdeutlichte, dass Claudin-4 nicht nur in den TJ, sondern auch intrazellulär und subjunctional verstärkt nachzuweisen war.

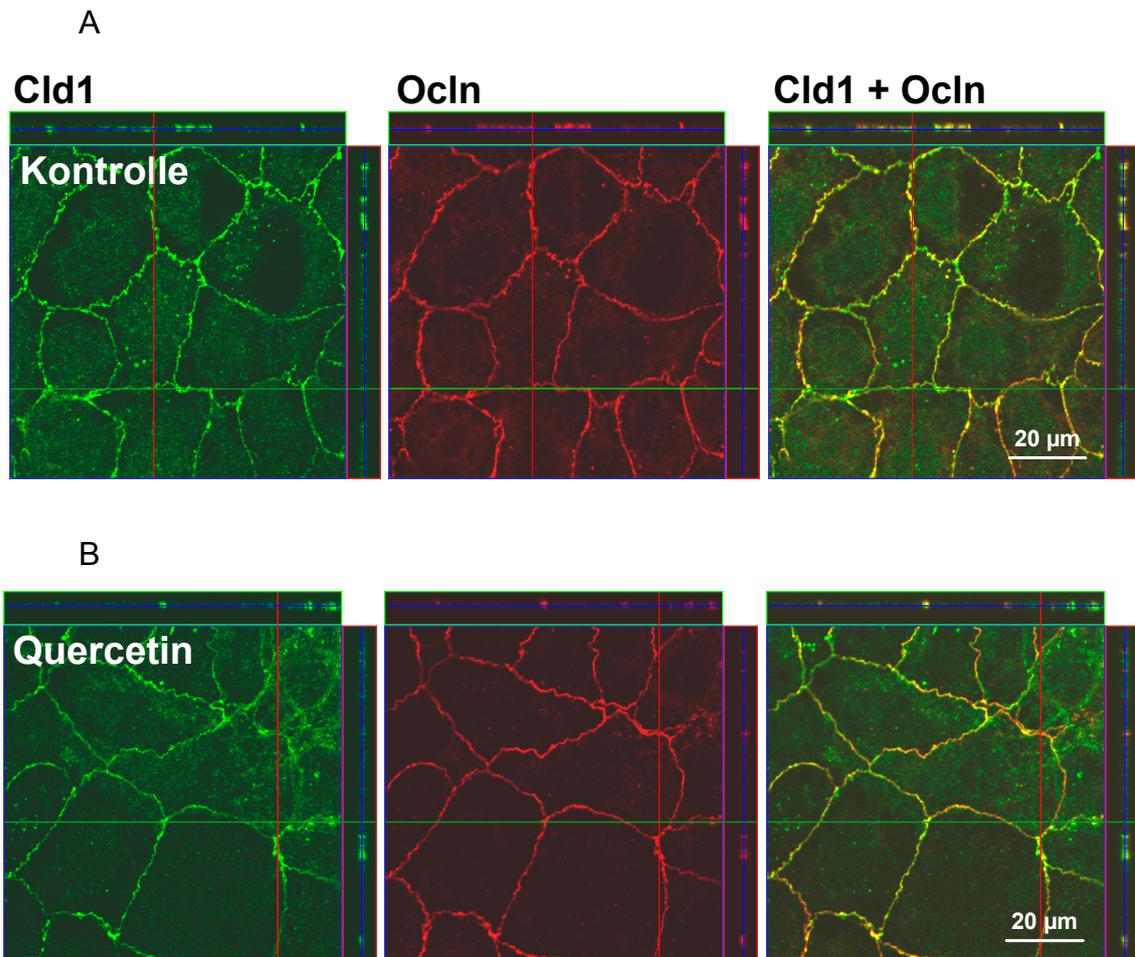


Abb. 12: Einfluss von Quercetin auf die Lokalisation der TJ-Proteine Claudin-1 und Occludin in Caco-2-Zellen

Auf Deckgläschen kultivierte Caco-2-Zellen wurden mit 200 μ M Quercetin für 24 h inkubiert (B) und mit der unbehandelten Kontrolle (A) verglichen. Dargestellt sind Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen mit spezifischen Antikörpern gegen Claudin-1 (Cld1: grün) und Occludin (Ocln: rot), deren Kolokalisationen durch eine gelbe Färbung angezeigt wird (rechtes Bild). Die Abbildungen wurden mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop aufgenommen und zeigen die Ebene der TJ-Lokalisation. Für die dreidimensionale Darstellung wurden Z-Scans in 390 nm Schritten durch die Z-Ebene angefertigt (Z-Ebene: 7,8 μ m), die rechts und oberhalb der Aufnahmen dargestellt sind. Während der Analysen der Präparate wurde dieselbe Intensitätseinstellung am Mikroskop verwendet, wodurch eine semiquantitative Vergleichbarkeit der Farbstärken gewährleistet war.

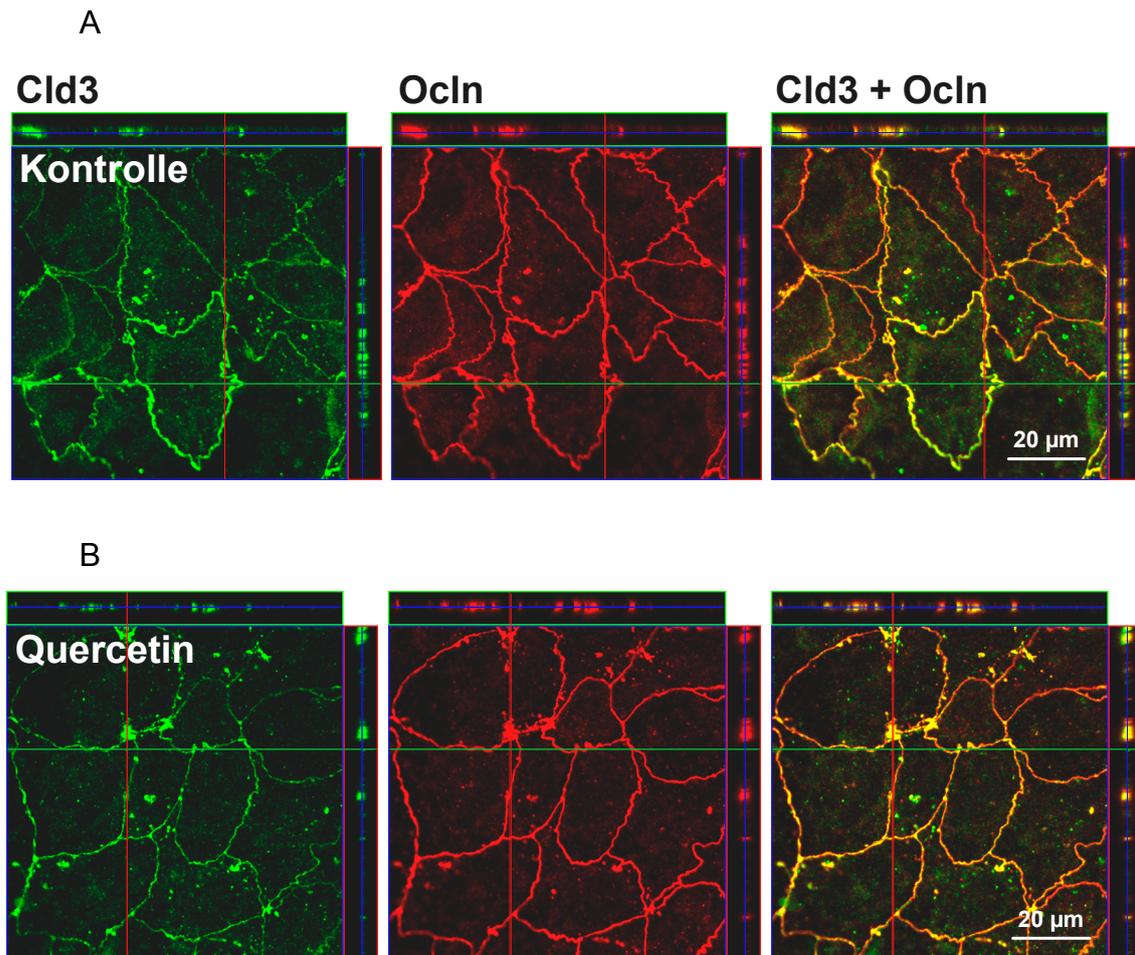


Abb. 13: Einfluss von Quercetin auf die Lokalisation der TJ-Proteine Claudin-3 und Occludin in Caco-2-Zellen

Auf Deckgläschen kultivierte Caco-2-Zellen wurden mit 200 µM Quercetin für 24 h inkubiert (B) und mit der unbehandelten Kontrolle (A) verglichen. Dargestellt sind Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen mit spezifischen Antikörpern gegen Claudin-3 (Cld3: grün) und Occludin (Ocln: rot) sowie deren Kolokalisation (rechtes Bild) und Z-Scans durch die Z-Ebene (Z-Ebene: 7,8 µm).

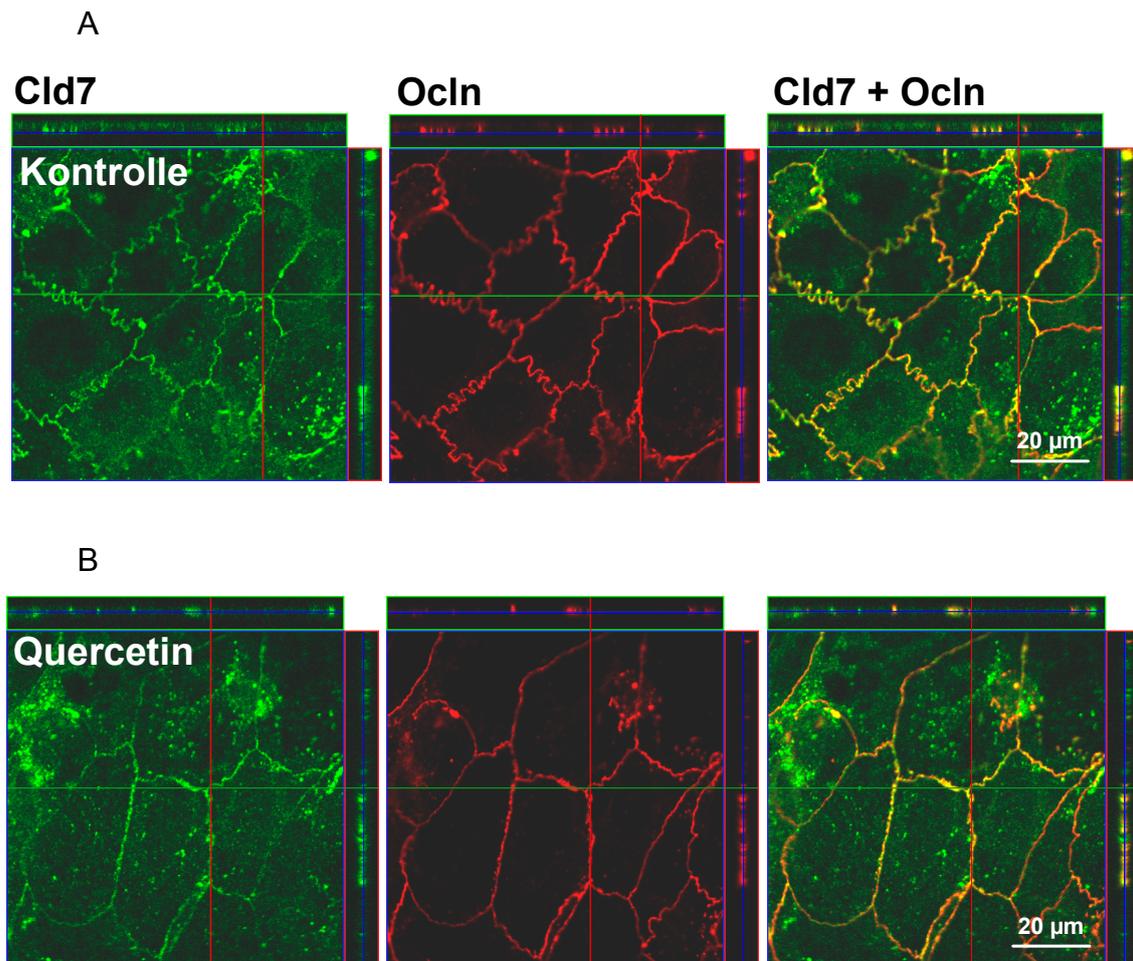


Abb. 14: Einfluss von Quercetin auf die Lokalisation der TJ-Proteine Claudin-7 und Occludin in Caco-2-Zellen

Auf Deckgläschen kultivierte Caco-2-Zellen wurden mit 200 µM Quercetin für 24 h inkubiert (B) und mit der unbehandelten Kontrolle (A) verglichen. Dargestellt sind Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen mit spezifischen Antikörpern gegen Claudin-7 (Cld7: grün) und Occludin (Ocln: rot) sowie deren Kolokalisation (rechtes Bild) und Z-Scans durch die Z-Ebene (Z-Ebene: 7,8 µm).

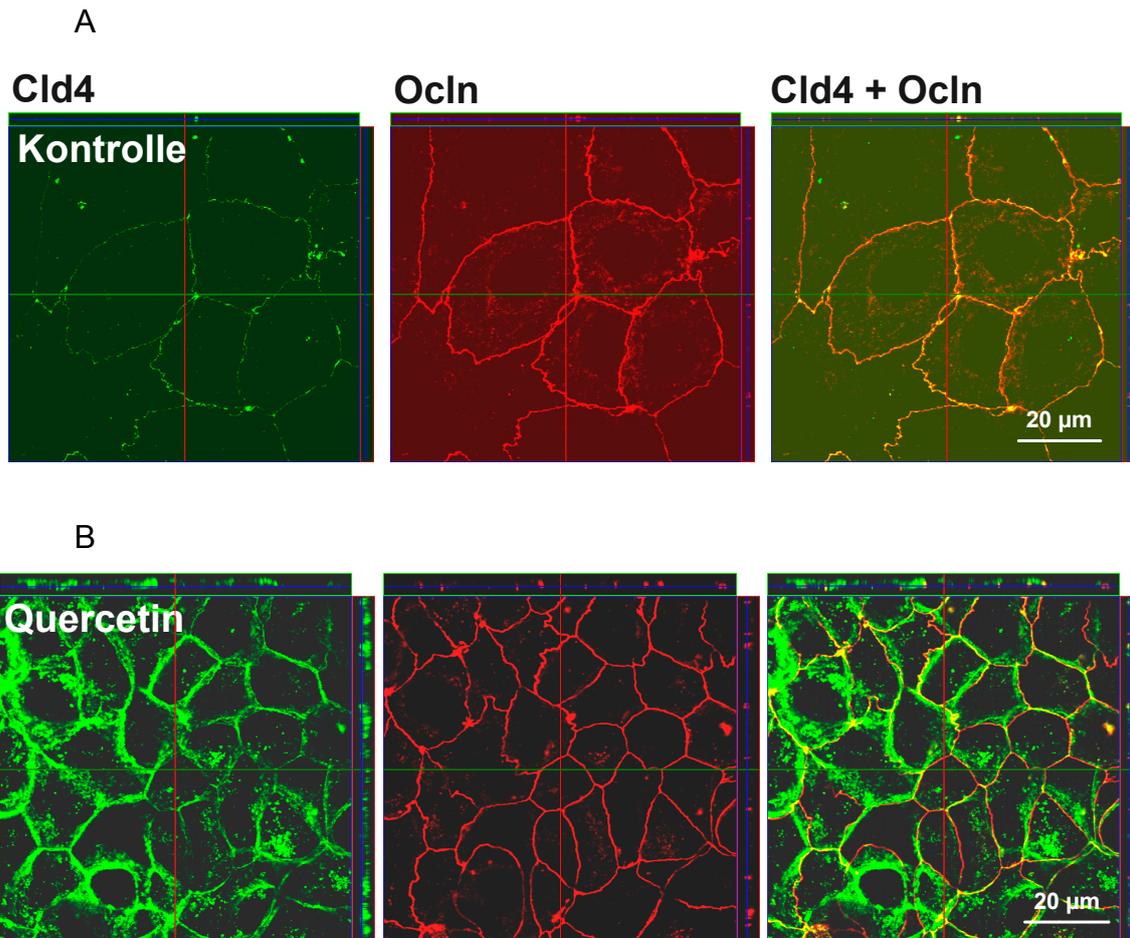


Abb. 15: Einfluss von Quercetin auf die Lokalisation der TJ-Proteine Claudin-4 und Occludin in Caco-2-Zellen

Auf Deckgläschen kultivierte Caco-2-Zellen wurden mit 200 μ M Quercetin für 24 h inkubiert (B) und mit der unbehandelten Kontrolle (A) verglichen. Dargestellt sind Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen mit spezifischen Antikörpern gegen Claudin-4 (Cld4: grün) und Occludin (Ocln: rot) sowie deren Kolokalisationen, die durch eine gelbe Färbung angezeigt wird (rechtes Bild). Für die dreidimensionale Darstellung wurden Z-Scans in 300 nm Schritten durch die Z-Ebene angefertigt (Z-Ebene: 2,7 μ m für die Kontrolle und 4,9 μ m für die Quercetin-Aufnahmen), welche rechts und oberhalb der Aufnahmen dargestellt sind.

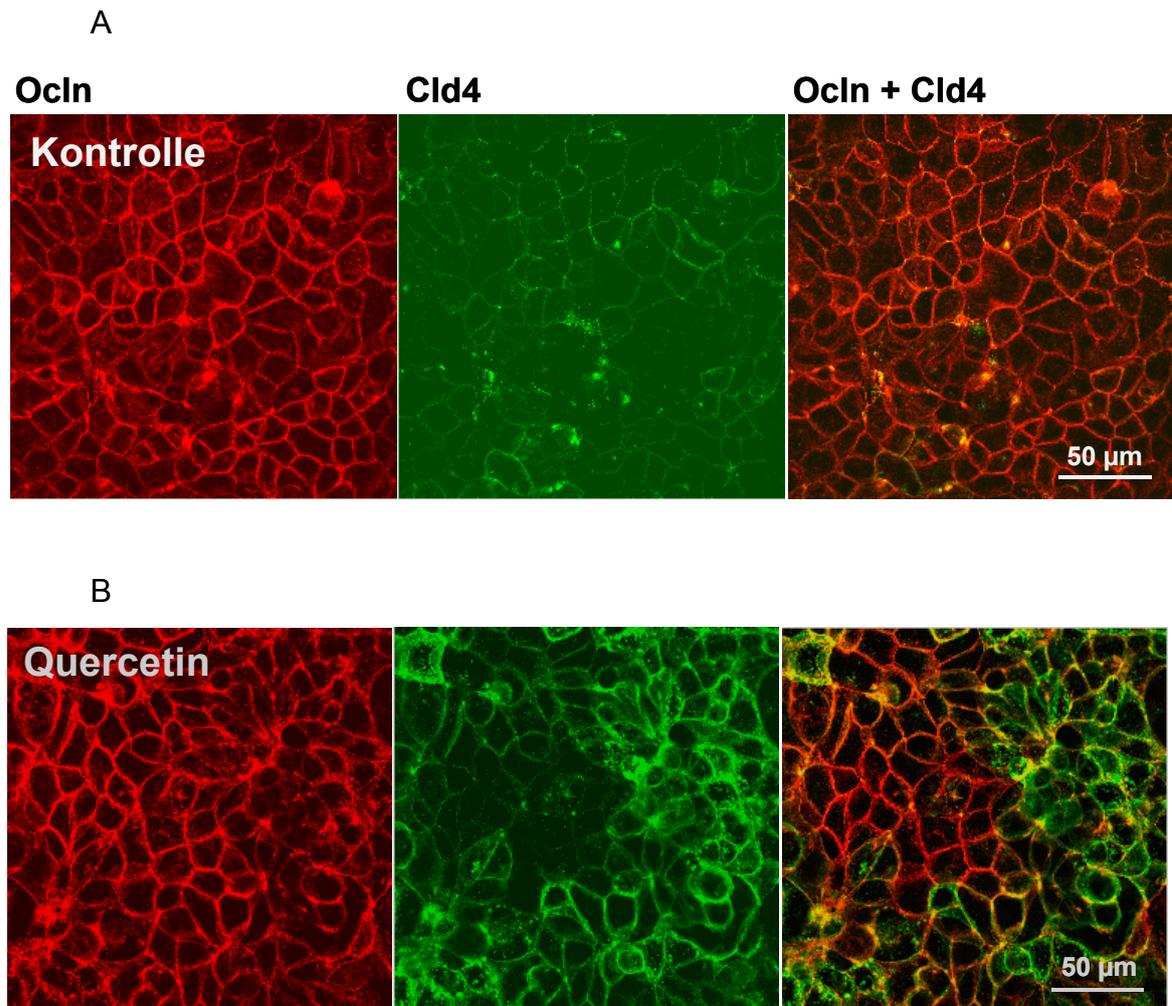


Abb. 16: Einfluss von Quercetin auf das Verteilungsmuster der TJ-Proteine Claudin-4 und Occludin im Epithelverband der Caco-2-Zellen

Auf Deckgläschen kultivierte Caco-2-Zellen wurden mit 200 μM Quercetin für 24 h inkubiert (B) und mit der unbehandelten Kontrolle (K) verglichen. Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen der TJ-Proteine Occludin (Ocln: rot) und Claudin-4 (Cld4: grün) wurden mit spezifischen Antikörpern hergestellt. Kolokalisationen dieser beiden Proteine sind in der rechten Abbildung durch eine gelbe Färbung erkennbar. Die Abbildungen wurden mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop aufgenommen, wobei eine Schichtdicke von 56,6 μm erfasst wurde. Dieselben Einstellungen der Intensität am Mikroskop wurden für eine semiquantitative Vergleichbarkeit beibehalten.

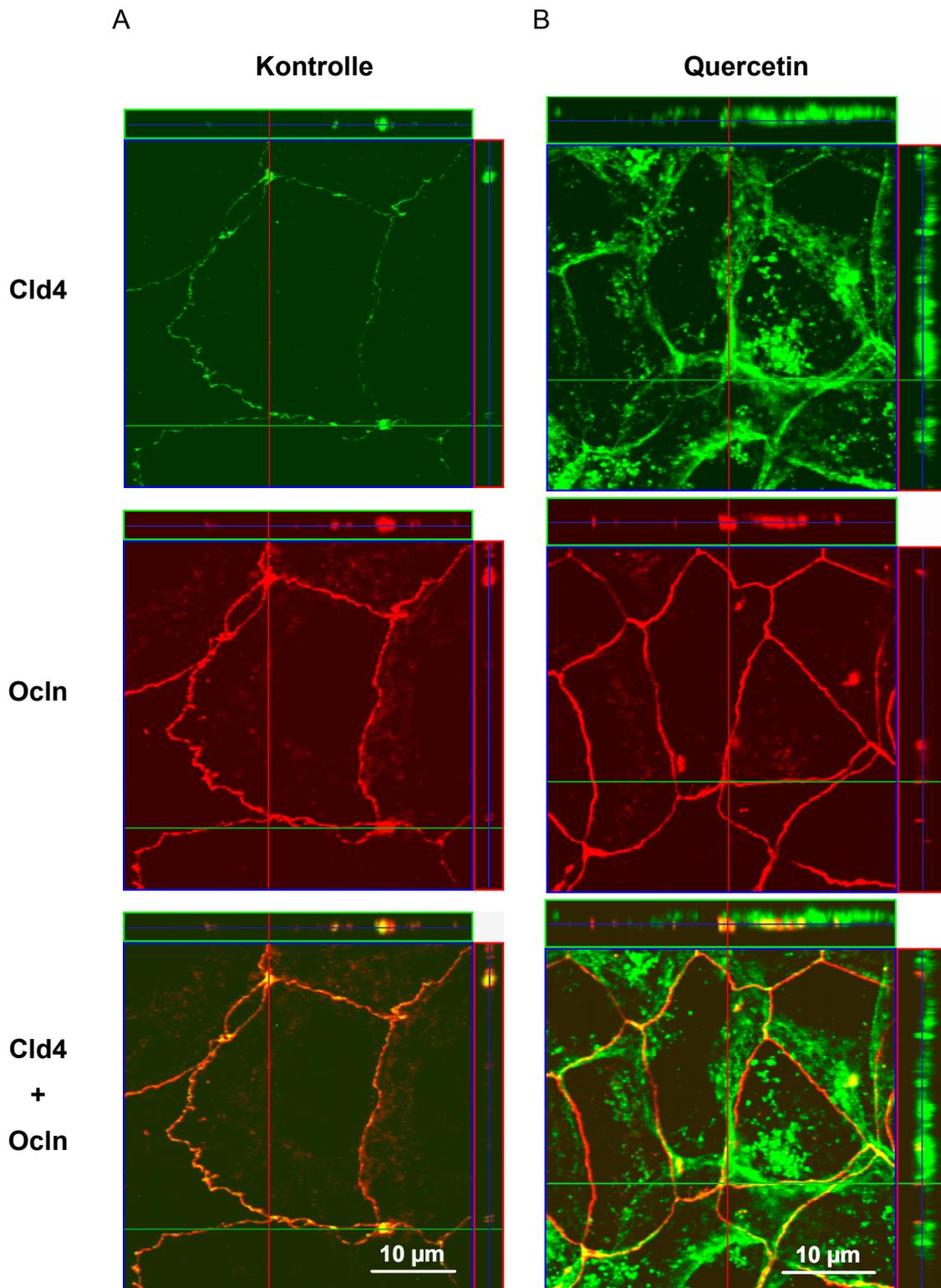


Abb. 17: Einfluss von Quercetin auf die Lokalisation von Claudin-4 und Occludin in Caco-2

Auf Deckgläschen kultivierte Caco-2-Zellen wurden mit 200 µM Quercetin für 24 h inkubiert (B) und mit der unbehandelten Kontrolle (A) verglichen. Doppelfärbungen der TJ-Proteine Claudin-4 (Cld4: grün) und Occludin (Ocln: rot) wurden mit spezifischen Antikörpern hergestellt. Kolokalisationen dieser beiden Proteine sind in der unteren Abbildung durch eine gelbe Färbung erkennbar. Für die dreidimensionale Darstellung wurden Z-Scans in 300 nm Schritten durch die Z-Ebene angefertigt, die rechts und oberhalb der Aufnahmen dargestellt sind (Z-Ebene: 2,7 µm für die Kontrolle und 4,9 µm für die Quercetin-Aufnahmen). Dargestellt ist ein vergrößerter Ausschnitt von Abbildung 15.

4 Einfluss von Quercetin auf die mRNA-Expression von Claudin-4

Um zu überprüfen, ob nicht nur die Expression von Claudin-4 auf der Proteinebene, sondern bereits die mRNA-Menge dieses TJ-Proteins verändert war, wurden quantitative mRNA-Untersuchungen mit Hilfe des TaqMan Gene Expression Assays durchgeführt. Dazu wurden konfluente Caco-2-Zellen entweder in 6-Loch-Platten (Kulturschalen) oder auf permeablen Zellfiltern kultiviert, für 24 h mit 200 μ M Quercetin inkubiert, die RNA isoliert und die mRNA von Claudin-4 quantifiziert (Abb. 18).

Unter beiden untersuchten Kultivierungsbedingungen nahm die mRNA-Expression von Claudin-4 - analog zur Proteinexpression - nach Quercetin-Inkubation zu. In den mit Quercetin behandelten Gruppen erfolgte eine Erhöhung der Claudin-4-mRNA um den Faktor $4,28 \pm 0,62$ in den Kulturschalen und um den Faktor $2,84 \pm 0,50$ in den Zellfilter-Proben.

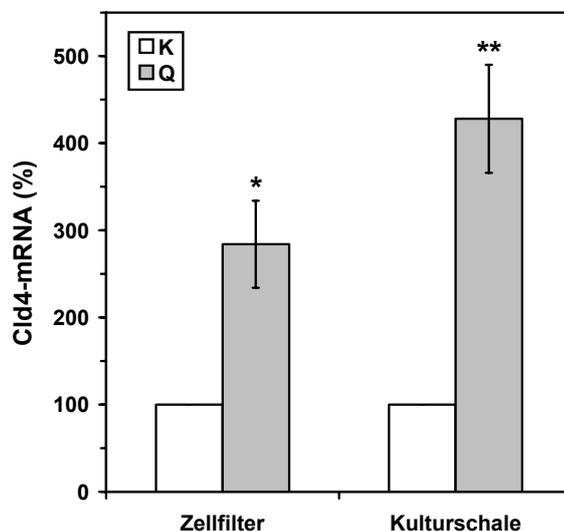


Abb. 18: Einfluss von Quercetin auf die mRNA-Expression von Claudin-4

Konfluente, auf Zellfiltern oder in Kulturschalen kultivierte Caco-2-Zellen wurden mit 200 μ M Quercetin (Q) für 24 h inkubiert, die RNA isoliert und die mRNA-Expression von Claudin-4 (Cld4) quantitativ bestimmt. Daten sind als % im Vergleich zur Kontrolle (K = 100 %) angegeben (MW \pm SEM, n = 6, *p < 0,5, **p < 0,01).

5 Klonierung des Claudin-4-Promotors

5.1 Zytotoxizität von Quercetin an subkonfluenten Zellen

Da die mRNA von Claudin-4 unter Quercetin-Exposition anstieg, stellte sich die Frage, ob die Testsubstanz die Promotoraktivität des TJ-Moleküls beeinflussen kann. Dieser Fragestellung wurde mit Hilfe von Luciferase-Reporter-Gen-Assays nachgegangen, wobei in diesem Test nur subkonfluente Zellkulturbedingungen untersucht werden konnten. Um dabei zu überprüfen, ob Quercetin eine zellschädigende Wirkung auf subkonfluente Zellen aufweist, wurde auch hierbei zunächst die LDH-Freisetzung analysiert.

Subkonfluente, in Kulturschalen kultivierte Caco-2-Zellen wurden mit 25, 50 und 100 μM Quercetin für 24 h inkubiert und die LDH-Aktivität im Überstand sowie in den lysierten Zellen bestimmt. Daraus wurde die prozentuale LDH-Freisetzung des Zell-Überstands berechnet (Tab. 6). Quercetin besaß keinen zytotoxischen Einfluss auf die Zellen bei Konzentrationen von 25 und 50 μM . Eine Flavonol-Konzentration von 100 μM verursachte hingegen bei subkonfluenten Caco-2-Zellen einen Anstieg der LDH-Aktivität im Überstand verglichen mit der Kontrollgruppe, so dass von einem zellschädigenden Effekt auf subkonfluente Zellen auszugehen ist.

Tab. 6: Einfluss von Quercetin auf die LDH-Freisetzung an subkonfluenten Caco-2-Zellen

Subkonfluente, in 6-Loch-Platten kultivierte Caco-2-Zellen wurden für 24 h mit Quercetin inkubiert und die LDH-Aktivität im mukosalen Überstand und im Zelllysat bestimmt. Die LDH-Freisetzung wurde prozentual zur Gesamt-Aktivität angegeben.

	LDH-Freisetzung %	n	p
Kontrolle	7 \pm 2	9	
25 μM Quercetin	14 \pm 6	8	n.s.
50 μM Quercetin	12 \pm 3	7	n.s.
100 μM Quercetin	41 \pm 7	4	< 0,001

n.s. nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe

5.2 Amplifizierung des Claudin-4-Promotors sowie Klonierung in den pCR2.1-TOPO-Vektor

Der Claudin-4-Promotor (C4P) wurde aus genomischer DNA mit Hilfe der spezifischen Primer human Cld4 FOR1 und REV1 durch eine PCR amplifiziert. Die genomische DNA war mit Restriktionsenzymen bereits geschnitten, so dass drei unterschiedlich verdaute DNA-Ansätze zur Verfügung standen. Diese Enzyme waren EcoRV, DraI und SspI, wobei darauf geachtet wurde, dass die Enzyme nicht in der Promotorregion des Claudin-4 schnitten. Zur Kontrolle der PCR wurden die Proben auf einem 1 % Agarosegel aufgetragen (Abb. 19 A). Es entstand je 1 PCR-Produkt mit der korrekten Größe von 1627 bp bei der genomischen DNA, die mit EcoRV oder DraI geschnitten wurde (Spur 2 und 3). Im Versuchsansatz der mit SspI-verdauten DNA konnte kein PCR-Produkt amplifiziert werden (Spur 4).

Eines der PCR-Produkte (PCR-Produkt 1) wurde mittels Gelextraktion aufgereinigt und die DNA-Konzentration im Agarosegel durch Auftragen eines Massenstandards (LMDM) ermittelt. Nach der Ligation des Claudin-4-Promotors in den pCR2.1-TOPO-Vektor wurde das Konstrukt in kompetente *E. coli*-Bakterien transformiert. Von zehn weißen Kolonien der Blau-Weiß-Selektion wurde die Plasmid-DNA isoliert und auf eine erfolgreiche Ligation sowie Transformation im Agarosegel untersucht (Abb. 19B). Acht der zehn Kolonien enthielten das pCR2.1-TOPO-C4P-Konstrukt (Spur 4, 5, 7-10, 12, 13). Die Proben 3 und 8 enthielten hingegen nur den Vektor ohne den Promotor (Spur 6 und 11).

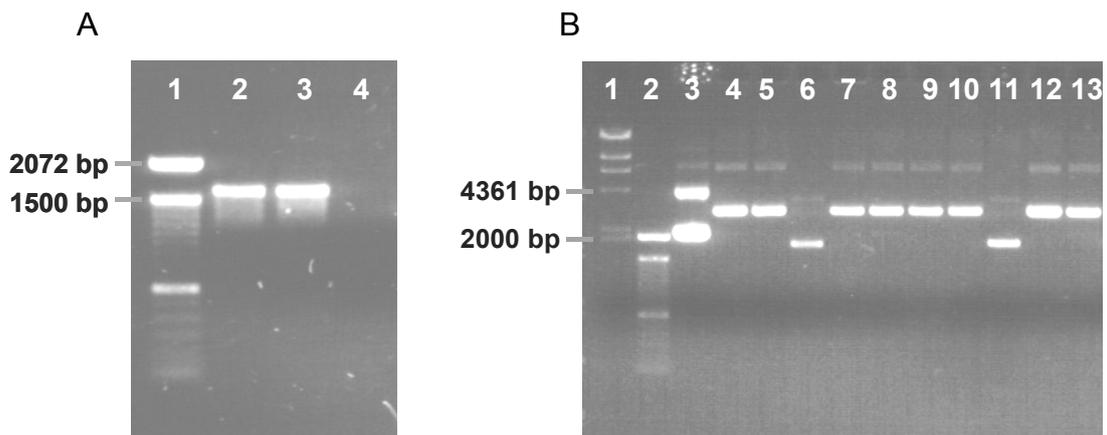


Abb. 19: Amplifizierung des Claudin-4-Promotors und Klonierung in den pCR2.1-TOPO-Vektor

(A) Amplifizierung von C4P aus genomischer DNA mittels PCR. 5 μ l des PCR-Produkts bzw. des DNA-Markers wurden auf einem Agarosegel (1 %) elektrophoretisch aufgetrennt.

Spurenbelegung: 1: 100 bp-Marker, 2: PCR-Produkt 1 (DNA-Verdau: EcoRV), 3: PCR-Produkt 2 (DNA-Verdau: DraI), 4: PCR-Produkt 3 (DNA-Verdau: SspI)

(B) Isolierung der Plasmid-DNA (Mini-Präparation) von 10 Kolonien der Blau-Weiß-Selektion nach Transformation mit dem pCR2.1-TOPO-C4P-Konstrukt. 2,5 μ l der Proben mit der Plasmid-DNA bzw. 5 μ l der DNA-Marker wurden auf einem Agarosegel (0,7 %) elektrophoretisch aufgetrennt.

Spurenbelegung: 1: λ /HindIII-Marker, 2: 100 bp-Marker, 3: ungeschnittener pCR2.1-TOPO-Vektor, 4-13: Plasmid-DNA von 10 Kolonien nach Transformation mit pCR2.1-TOPO-C4P

5.3 Sequenzierung des Claudin-4-Promotors und Umklonierung in den pGL4.10-Vektor

Das Plasmid Nr. 1 (Abb. 19B Spur 4) wurde sequenziert (Sequenz Abb. 20), wobei in der Nukleotid-Abfolge zwei Mutationen festgestellt wurden. Anschließend wurde dieses Plasmid für die Umklonierung von C4P in den pGL4.10-Vektor weiter verwendet. Dazu wurde das pCR2.1-TOPO-C4P-Konstrukt und der pGL4.10-Vektor zunächst mit den Restriktionsenzymen XhoI und KpnI geschnitten und der erfolgreiche Verdau im Agarosegel überprüft (Abb. 21A und B). Nach der Aufreinigung der Restriktionsprodukte erfolgte die Ligation von C4P in den pGL4.10-Vektor sowie die Transformation in die kompetenten *E. coli*-Bakterien. Einige der auf den Agarplatten gewachsenen Kolonien wurden nach Ampicillin-Selektion angeimpft und die Plasmid-DNA mittels Mini-Präparation isoliert. Die Klone wurden auf das pGL4.10-C4P-Konstrukt im Agarosegel untersucht (Abb. 21C). Lediglich der Klon 9 wies das Ligationsprodukt auf, während die restlichen 14 untersuchten transformierten Bakterienkolonien nur den Vektor aufgenommen

hatten. Das Insert von Klon 9 wurde nochmals sequenziert. Von diesem Klon 9 wurde die Plasmid-DNA für den Einsatz in den Luciferase-Reportergen-Assay durch Midi-Präparation isoliert.

```

gctcccagcatggttgggaagagatgca aatgaccacacggcgggtgaggaggagct      60
ccctcggcgcggtgggatgagccctagac actctcaatcacccccacgatgacccttc      120
ccagaggctcccctcagtcacatctgccctgaa ccaagctcttctgatcctagaccctccac      180
ctccctctatcttccagggcttggtgaca ttccaggcagaaatttctgaccctttact      240
ttggtccctccctccccagcccagtcctctg gtcaaactggattcctggctgttcccagaa      300
cgagctgccttccccaccttgccacctct gccctgttctctctgcctgaatgtctcc      360
ttactagcctcgctgccttgacacatctct cctgagggtgtcatcccagaatgagctgc      420
attgtccagcctggcccaccgtctaccag aacgtcctccttcagcctgtcccactgct      480
tgcaaaactttctgggggacctgttcacg atgccttctgtagcatactccaagaatccg      540
gcgccccctggagttgtccacacagcacc ccttgcagtcaagctccctcagcaccacc      600
acctccaccctggaagagttccccttccct ttgaaatctcatgggactttgcaccactc      660
tggctttattggaaggctttgtatgtctcc acagggtaaacccatttactggggtgat      720
gatgtctccaggatctagttcatgtttgtc gttggtgactggccccaccagttctgggc      780
aagcaggctggatcccgaggaacagagc ccaccagcctaaacttccatggagggtggag      840
aggggacaggcttctgtctcttttggctg aagggtcatcatgtccaaggcccctctct      900
agccaagcagagaagctgggtgataaggat gggtgagagtgggtgatgtacccggagtc      960
ctggcctcccggctcctcactcccctacac gtaactttatccggccaatgccgcaaagac      1020
tgctggtgaggccagatgatgatgatca tactcacaacagtcgtgaaactgccagtga      1080
tgaaactggtgaaggacaagaaatgacaata atcaagggtgggtttctctgtggacgtttcc      1140
aagacttcatttcaaattctctccctcag ggtccccaccctgtcctcccacctaagcct      1200
ggaatgagggggcactggcctgtggggacc ctggtcttcaggctcccaaacctggctgg      1260
tctggtgccccctggccttaacctgtga acatccagctgtccctgggctgtgattcagt      1320
gtctgtctcccgggtgacctcagcatgggc ttgaggaaggggagagagtagtttctct      1380
gagactggatagtactcagggaccgggg ctggggcctcaaagtgctttgttgccct      1440
gggctcaggaatccagagaaactggtcagg aggaggccccagtgacaaaaaccctccct      1500
ctgccccgcccctctgccagagccatata actgctcaacctgtccccgagagagagtg      1560
cctggcagctgtcggctggaaggaactggt ctgctcacactgtgcttgctgcgcatcagg      1620
actggctttatctctgactcacggtgcaa aggtgactctggaacgttaagtccgtcc      1680
ccagcgcttgaatcctacggccccacag ccgatcccctcagcctccaggctcctcaa      1740
ctcccgtagcgtgaacaatggcctccat ggggctacaggtaatggcatcgcgct--      1800

```

Abb. 20: Sequenz des Claudin-4-Promotors (C4P) (NCBI-Locus: AC093168, Position: 64500 – 66296)

Die unterstrichenen Sequenzen geben die Bindungsstellen für die bei der Sequenzierung verwendeten Primer in folgender Reihenfolge wieder - FOR1, FOR3-8, REV1. Die hervorgehobenen Nukleotide stellen mutierte Positionen dar (Punktmutationen: 442/510 – g zu a).

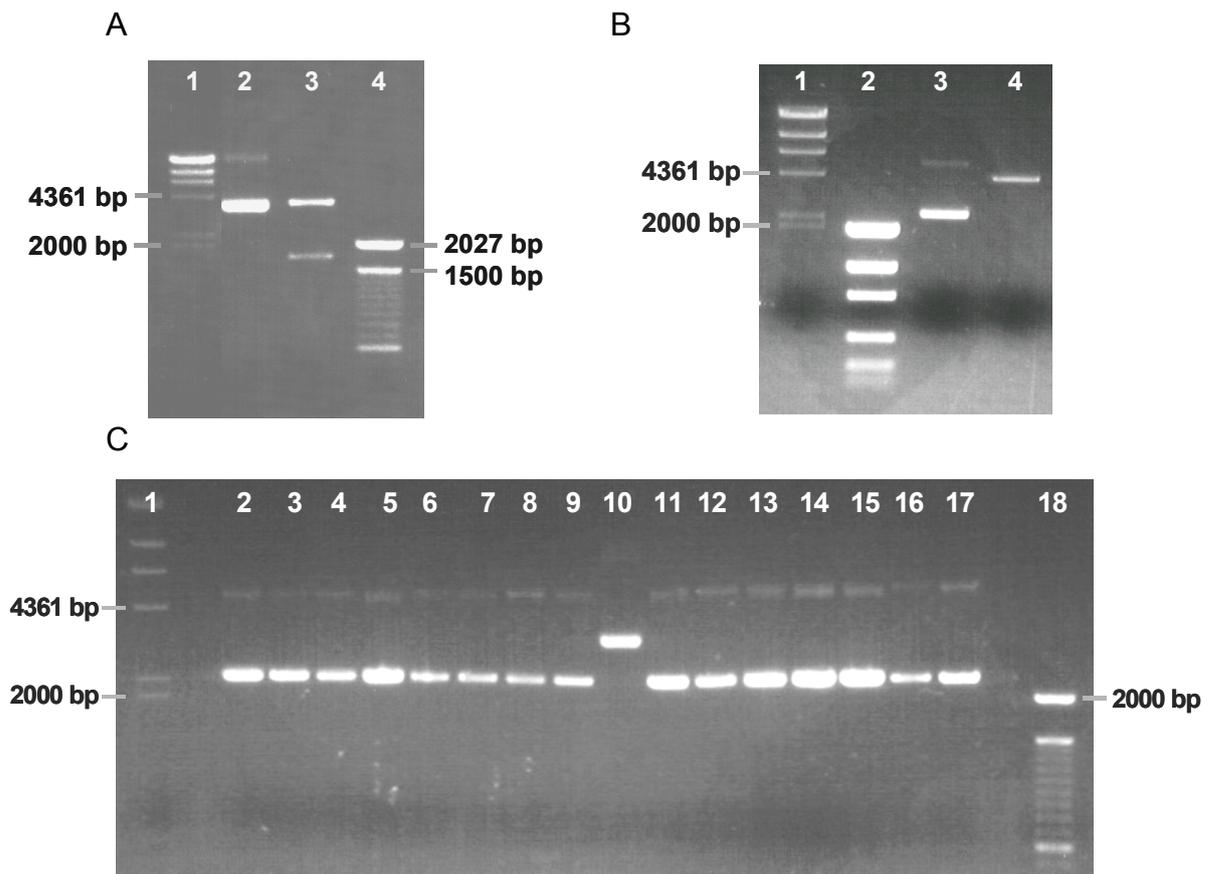


Abb. 21: Restriktion des pCR2.1-TOPO-C4P-Konstrukts (A) und des pGL4.10-Vektors (B) mit KpnI und XhoI, Plasmid-Isolierung von 15 auf ampicillinhaltigen Agarplatten gewachsenen Kolonien kompetenter *E. coli*-Bakterien nach Transformation mit dem pGL4.10-C4P-Konstrukt (C)

Die Volumina der aufgetragenen Proben sind im Folgenden bei den Spurenbelegungen in Klammern angegeben. Die Proben sowie 5 μ l der Größen-Marker wurden auf 1 %igen (A) bzw. 0,7 %igen (B, C) Agaraosegelen aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

- (A) *Spurenbelegung*: 1: λ /HindIII-Marker, 2: ungeschnittenes Plasmid 1 (2 μ l), 3: KpnI- und XhoI-verdautes Plasmid 1 (2 μ l), 4: 100 bp-Marker
- (B) *Spurenbelegung*: 1: λ /HindIII-Marker, 2: LMDM-Marker (4 μ l), 3: 100 ng ungeschnittener pGL4.10-Vektor (1 μ l), 4: KpnI- und XhoI-verdauter pGL4.10-Vektor (3 μ l)
- (C) *Spurenbelegung*: 1: λ /HindIII-Marker, 2-16: pGL4.10-C4P-transformierte *E. coli*-Kolonien (2,5 μ l), 17: pGL4.10-Vektor (ohne Insert) (2,5 μ l), 18: 100 bp-Marker

5.4 Einfluss von Quercetin auf den Claudin-4-Promotor

Da durch die Inkubation mit 200 μM Quercetin an konfluenten Caco-2-Monolayern die mRNA Expression von Claudin-4 hochreguliert wurde, wurde nun untersucht, ob das Flavonol die Promotoraktivität des Claudin-4-Gens beeinflussen kann. Zu diesem Zweck wurde der Claudin-4-Promotor aus genomischer DNA amplifiziert und in den pGL4.10-Vektor kloniert, welcher ein Gen für ein Luciferase-Enzym enthielt. Da sich das Luciferase-Gen downstream an die C4P-Sequenz anschloss, stellte die Aktivität dieses Enzyms ein direktes Maß für die Aktivität des Promotors dar.

In den bisherigen Untersuchungen wurden 200 μM Quercetin an konfluenten Caco-2-Monolayern eingesetzt. Der Luciferase-Reporter-Gen-Assay ist allerdings nur an subkonfluenten Zellen durchführbar, da nur vereinzelte Zellen außerhalb eines Zellverbands transfiziert werden können. In Zytotoxizitätsanalysen hatte sich gezeigt, dass eine Konzentration von 100 μM Quercetin einen zellschädigenden Einfluss auf subkonfluente Caco-2-Zellen zu haben schien. Aufgrund dieser Resultate wurden in diesem Test deutlich geringere Konzentrationen von 25 μM oder weniger verwendet, die keine zytotoxischen Effekte aufwiesen (Abschnitt 5.1).

Der Einfluss von Quercetin auf die C4P-Aktivität ist in der Abbildung 22 wiedergegeben. Eine Konzentration von 25 μM der Testsubstanz bewirkte nach 20 h Inkubation eine erhöhte Claudin-4-Promotoraktivität (Kontrolle $100 \pm 11 \%$ versus Quercetin $153 \pm 16 \%$). Eine geringere Flavonol-Konzentration von 10 μM wies hingegen keinen Unterschied zur Kontrollgruppe in der Promotoraktivität von Claudin-4 auf.

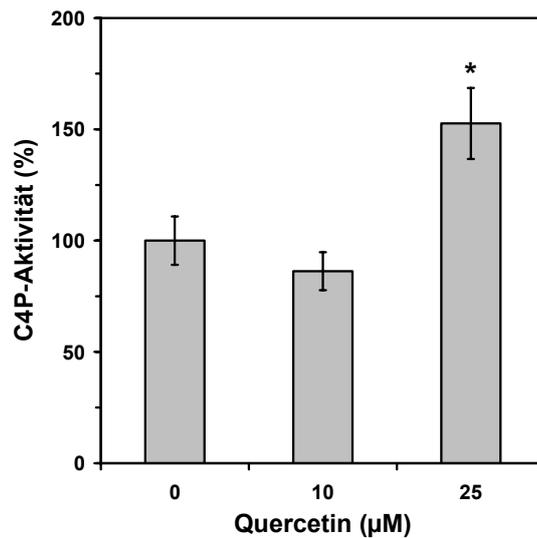


Abb. 22: Einfluss von Quercetin auf die Aktivität des Claudin-4-Promotors in Caco-2-Zellen

Subkonfluente Caco-2-Zellen wurden mit dem pGL4.10-C4P-Konstrukt bzw. mit dem Vektor pGL4.10 ohne Insert transfiziert und die Aktivität des downstream folgenden Luciferase-Gens unter Einfluss von 10 bzw. 25 µM Quercetin nach 20-stündiger Inkubation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ermittelt. Die Luciferase-Aktivität stellt ein direktes Maß für die Aktivität des Promotors dar. Der Einfluss des Flavonoids auf das Plasmid ohne Insert wurde in die Ergebnisse auf die C4P-Aktivität einberechnet. Die Daten sind als Prozent zur Kontrollgruppe angegeben (n = 6-9, *p < 0,05).

6 Einfluss von Quercetin auf die parazelluläre Durchlässigkeit sowie auf die Permeabilität von Na- und Cl-Ionen

Um zu untersuchen, ob der durch Quercetin-induzierte R^t -Anstieg mit einer verbesserten epithelialen Barrierefunktion und mit einer verminderten parazellulären Permeabilität einhergeht, wurden radioaktive Tracerfluxe mit Mannitol durchgeführt (Tab. 7). Mannitol ist ein 182 Da-großes, stoffwechselstabiles, hydrophiles Molekül, welches nicht aktiv mittels Membrantransportern in die Zellen aufgenommen wird, so dass allgemein davon ausgegangen wird, dass es lediglich durch den parazellulären Weg diffundiert (Anderberg et al., 1992).

An Caco-2-Filtern wurde mit Hilfe von [3 H]-Mannitol-Fluxmessungen der Einfluss von 200 μ M Quercetin nach 24 h Inkubation auf die epitheliale Permeabilität untersucht. Es zeigte sich, dass die Testsubstanz keinen Einfluss auf die parazelluläre Durchlässigkeit am Caco-2-Monolayer besaß, da keine Veränderung des Mannitolfluxes im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen wurde (Tab. 7). Die Mannitol-Fluxe waren somit unabhängig vom R^t (Abb. 23A). Der Kurzschlussstrom (I_{sc}) blieb ebenfalls durch Quercetin unbeeinflusst.

Tab. 7: Einfluss von Quercetin auf die Mannitol-, Na^+ - und Cl^- -Fluxe vom mukosalen zum serosalen Kompartiment (ms-Richtung) in Caco-2-Zellen

Die Charakterisierung der parazellulären Durchlässigkeit mittels Mannitol sowie die Ionenpermeabilitäten für Na^+ und Cl^- wurden durch radioaktive Tracerfluxe vom mukosalen zum serosalen Kompartiment (ms) an Caco-2-Zellfiltern bestimmt, die mit 200 μ M Quercetin für 24 h inkubiert wurden.

	R^t [$\Omega \cdot cm^2$]	I_{sc} [$\mu A \cdot cm^{-2}$]	$J_{Mannitol}^{ms}$ [$nmol \cdot h^{-1} \cdot cm^{-2}$]	J_{Na}^{ms} [$\mu mol \cdot h^{-1} \cdot cm^{-2}$]	J_{Cl}^{ms} [$\mu mol \cdot h^{-1} \cdot cm^{-2}$]
Kontrolle	224 \pm 5	-1,7 \pm 0,1	104 \pm 5	3,3 \pm 0,1	1,6 \pm 0,1
Quercetin	289 \pm 3	-2,2 \pm 0,2	107 \pm 3	2,5 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1
p	< 0,001	n.s.	n.s.	< 0,001	< 0,001

MW \pm SEM, n = 6, n.s. nicht signifikant

Da die parazelluläre Durchlässigkeit für Mannitol offensichtlich nicht durch Quercetin beeinflusst wurde, stellte sich die Frage, ob der durch Quercetin-induzierte R^t -Anstieg mit einer verminderten Ionen-Permeabilität einherging.

Deshalb wurden radioaktive Tracerfluxe mit $^{22}\text{Na}^+$ und $^{36}\text{Cl}^-$ durchgeführt. Tabellen 7 und 8 geben die Ergebnisse der Na^+ - und Cl^- -Fluxe nach Applikation im mukosalen (ms-Fuxrichtung) bzw. im serosalen Kompartiment (sm-Fluxrichtung) wieder. Die entsprechenden Netto-Fluxe zeigt die Tabelle 9, wobei positive Werte auf Resorptionsprozesse hinweisen.

Tab. 8: Einfluss von Quercetin auf die Na^+ - und Cl^- -Fluxe vom serosalen zum mukosalen Kompartiment (sm-Richtung) in Caco-2-Zellen

Unidirektionale Na^+ - und Cl^- -Fluxe wurden mit radioaktiven Tracerfluxen vom serosalen zum mukosalen Kompartiment (sm) an Caco-2-Zellfiltern gemessen, die mit 200 μM Quercetin für 24 h inkubiert wurden.

	R^t [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]	I_{sc} [$\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$]	$J_{\text{Na}}^{\text{sm}}$ [$\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$]	$J_{\text{Cl}}^{\text{sm}}$ [$\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$]
Kontrolle	235 \pm 4	-1,5 \pm 0,1	3,1 \pm 0,1	1,6 \pm 0,0
Quercetin	339 \pm 19	-2,1 \pm 0,2	1,9 \pm 0,1	1,0 \pm 0,0
p	< 0,001	n.s.	< 0,001	< 0,001

MW \pm SEM, n = 6, n.s. nicht signifikant

Tab. 9: Einfluss von Quercetin auf die Netto-Fluxe von Na^+ und Cl^- in Caco-2-Zellen

Die Netto-Fluxe für Na^+ und Cl^- wurden aus den unidirektionalen Fluxen der Ionen aus Tabelle 7 und 8 bestimmt. Caco-2-Zellfilter wurden mit 200 μM Quercetin für 24 h inkubiert. Positive Werte weisen auf Resorption hin.

	$J_{\text{Na}}^{\text{netto}}$ [$\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$]	$J_{\text{Cl}}^{\text{netto}}$ [$\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$]
Kontrolle	0,24 \pm 0,14	0,04 \pm 0,07
Quercetin	0,56 \pm 0,15	0,14 \pm 0,07
p	n.s.	n.s.

MW \pm SEM, n = 6, n.s. nicht signifikant

Quercetin bewirkte in beiden Flux-Richtungen eine Abnahme der Flux-Raten sowohl für Na^+ als auch für Cl^- (Tab. 7 und 8). Der Na^+ -Flux wurde durch 200 μM Quercetin in der sm-Richtung auf 63 % und in der ms-Richtung auf 75 % vermindert. Die Durchlässigkeit für Cl^- -Ionen wurde durch die Testsubstanz auf 64 % in der sm-Richtung und auf 71 % in der ms-Richtung reduziert. Die Na^+ - und Cl^- -Fluxe zeigten dabei eine inverse Korrelation zu R^t (Abb. 23B und C). Die Netto-Fluxe der Ionen blieben jedoch durch Quercetin unbeeinflusst (Tab. 9). Da die

Größenordnung der Ionen-Fluxe für beide Ionen in ms- und in sm-Richtung annähernd vergleichbar war (J_{Na} etwa $3 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ und J_{Cl} etwa $1,6 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$), ist ein Einfluss transzellulärer Transportmechanismen eher unwahrscheinlich.

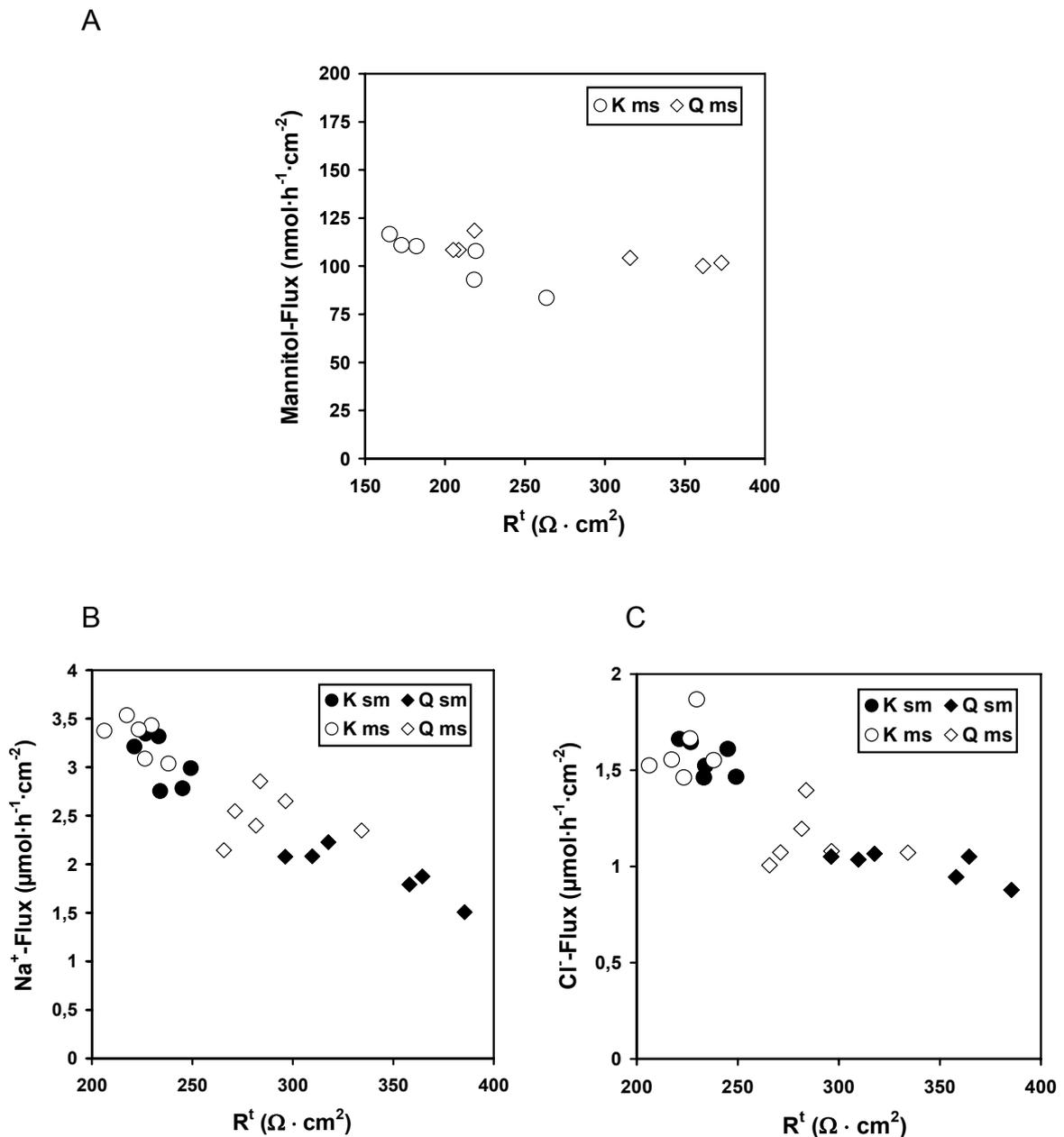


Abb. 23: Widerstandsabhängigkeit der Mannitol-, Na⁺- und Cl⁻-Fluxe an Caco-2-Zellen

An auf Zellfiltern kultivierten Caco-2-Monolayern wurden unidirektionale, radioaktive Tracerflux-Messungen von Mannitol- (A), Na- (B) und Cl-Ionen (C) durchgeführt. Die Applikation der Tracermoleküle erfolgten entweder mukosal (ms-Richtung) oder serosal (sm-Richtung). Ihre Abhängigkeit von R^t ist graphisch dargestellt.

7 Blockierung des Quercetin-Effekts durch Inhibitoren

Verschiedene Blocker wurden eingesetzt, um den zellulären Signalweg aufzuklären, über den Quercetin seine Wirkung vermittelt. Die Ergebnisse zeigt die Abbildung 24A. Zunächst wurden die eher unspezifischen Inhibitoren Staurosporin und H7 untersucht, die unter anderem die Kinasen PKC, PKA und die Myosin Light Chain Kinase (MLCK) blockieren können (Bradshaw et al., 1993; Condrescu et al., 1999; Droillard et al., 1997; Hidaka et al., 1984; Peet and Li 1999; Radloff and Gercken 1996; Sielecki et al., 2000; Tamaoki et al., 1986; Wisniewski et al., 1999; Zollner 1993). Es zeigte sich, dass beide Substanzen den durch Quercetin-induzierten R^t -Effekt aufhoben (Staurosporin: 82 ± 14 %, H7: 122 ± 42 % Inhibition des Quercetin-Effekts). Der PKC-Blocker GF109203X (Toullec et al., 1991), der MLCK-Blocker ML-7 (Krarup et al., 1998; Makishima et al., 1991; Saitoh et al., 1987) sowie der intrazelluläre Ca^{2+} -Chelator BAPTA-AM (Mima et al., 2005) wiesen keinen inhibitorischen Effekt auf die Quercetin-Wirkung auf (Abb. 24A).

Bis auf GF109203X zeigte keiner der Inhibitoren einen Einfluss auf R^t in der Kontrollgruppe. Der spezifische PKC-Inhibitor GF109203X hingegen verursachte auch ohne Quercetin eine R^t -Erhöhung nach 24 h Inkubation (GF109203X 117 ± 3 % versus Kontrolle 101 ± 2 % vom Ausgangswiderstand). Dieser Effekt war nach weiteren 24 h noch stärker ausgeprägt (GF109203X 142 ± 6 % versus Kontrolle 110 ± 3 % vom Ausgangswiderstand) und war am Versuchsende (Tag 3) rückläufig, so dass sich der R^t nicht mehr von den Kontrollwerten unterschied (Abb. 24B).

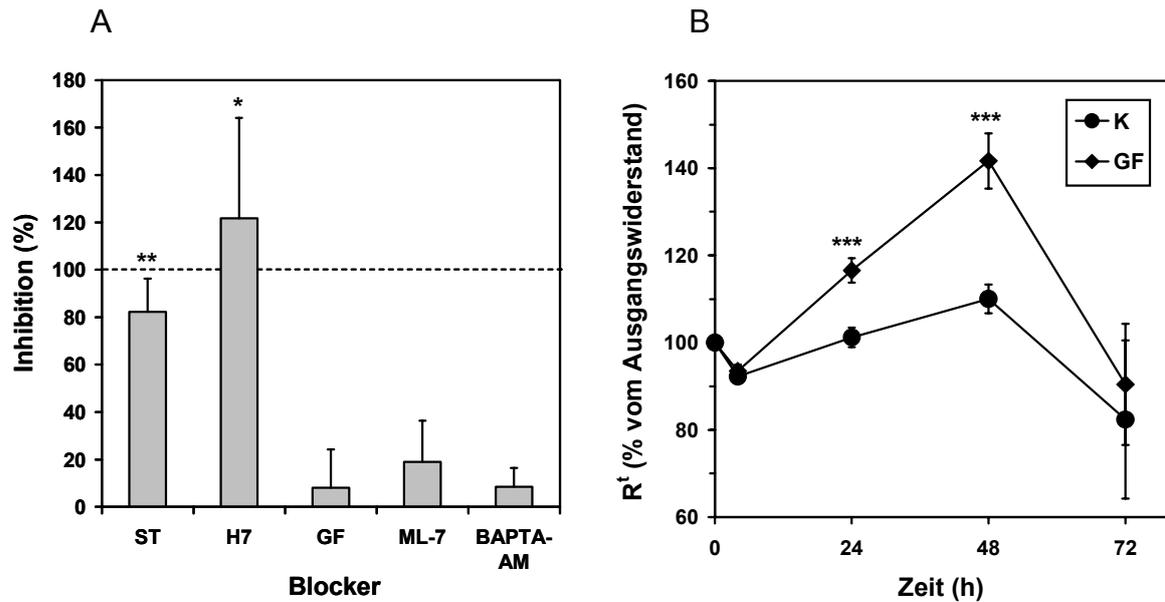


Abb. 24: Inhibition des Quercetin-induzierten R^t -Anstiegs und Effekt des PKC-Blockers GF109203X auf R^t in Caco-2-Zellen

- (A) Es wurde der R^t -Effekt von 200 μM Quercetin in Koinkubation mit Inhibitoren untersucht. Die Blocker wurden $\frac{1}{2}$ h vor Quercetin-Zugabe mit den Caco-2-Zellen inkubiert, wobei die Inhibitoren Staurosporin (20 nM ST, $n = 7-10$), H7 (50 μM , $n = 8$), der PKC-Inhibitor GF109203X (5 μM GF, $n = 7-8$) sowie der MLCK-Inhibitor ML-7 (1 μM , $n = 10-11$) analysiert wurden. Der intrazelluläre Ca^{2+} -Chelator BAPTA-AM (10 μM , $n = 3$) wurde 1 h mit den Caco-2-Zellen exponiert, wieder entfernt, bevor Quercetin zugegeben wurde. R^t wurde nach 24 h Exposition ermittelt und die Inhibition als Prozent zum Quercetin-induzierten R^t -Anstieg angegeben. Außer GF109203X (siehe B) besaßen die Blocker alleine keinen Einfluss auf R^t (MW \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).
- (B) Zeitverlauf des spezifischen PKC-Inhibitors GF109203X. Caco-2-Zellfilter wurden gegen 5 μM GF109203X (GF) exponiert und R^t im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K) ermittelt. Die Daten sind als Prozent des Ausgangswiderstands zum Zeitpunkt 0 h angegeben (MW \pm SEM, $n = 7-8$, *** $p < 0,001$).

8 Einfluss von Quercetin auf die Apoptose-Rate

Zahlreiche Studien belegen, dass Quercetin einen Einfluss auf die Apoptose-Rate in Zellkulturen besitzt (Csokay et al., 1997; Orzechowski et al., 2000; Zhang et al., 2005). Die Anzahl apoptotischer Zellen beeinflusst ebenfalls die Dichtheit einer epithelialen Barriere. Eine Zunahme apoptotischer Ereignisse im Epithelverband führt zu einer erhöhten Durchlässigkeit des Epithels und somit zu einer verminderten Barrierefunktion (Bojarski et al., 2000; Bojarski et al., 2001). Der Einfluss von Quercetin auf die epitheliale Apoptose-Rate wurde zum einen durch die Bestimmung der Anzahl apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Färbung (Abb. 25, Tab. 10) und zum anderen durch die Analyse der PARP-Expression bestimmt (Abb. 26).

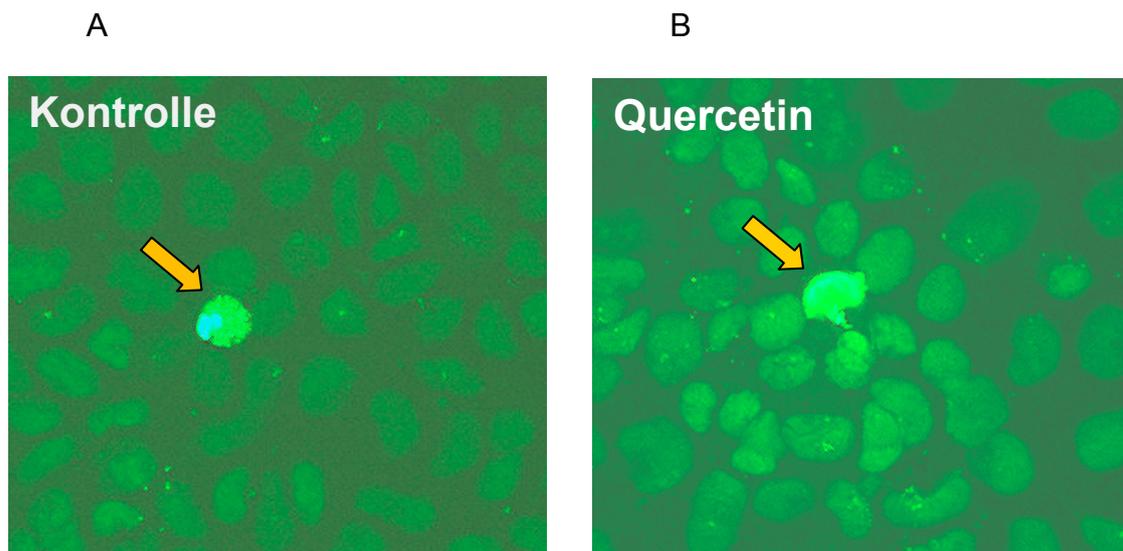


Abb. 25: TUNEL-Färbung

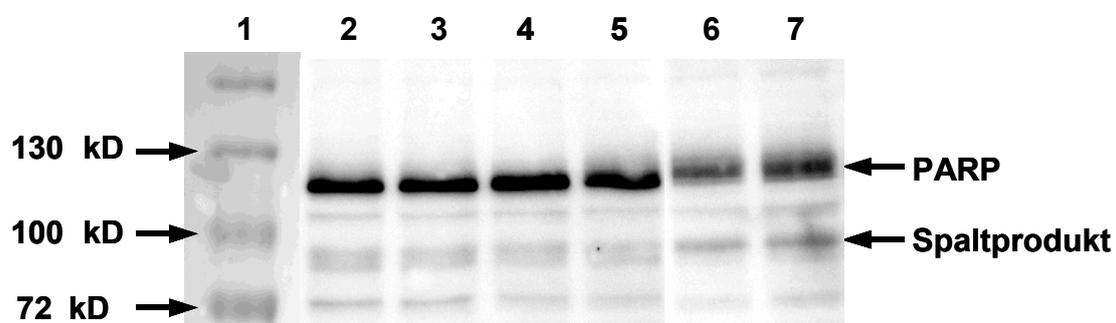
Die TUNEL-Färbung zur Bestimmung der Anzahl apoptotischer Zellen wurde an Caco-2-Zellen, die auf beschichteten Deckgläschen kultiviert wurden, durchgeführt. Die Zellen wurden mit 200 μ M Quercetin für 24 h (B) inkubiert und mit der unbehandelten Kontrolle (A) verglichen. Die Pfeile weisen auf eine apoptotische Zelle.

Tab. 10: Einfluss von Quercetin auf die Apoptose-Rate

Die Anzahl apoptotischer Zellen wurde an Caco-2-Zellen, die auf Deckgläschen kultiviert wurden, durch Immunfluoreszenz-Färbung mit TUNEL-Reagenz bestimmt. Die Zellen wurden mit 200 μ M Quercetin für 24 h inkubiert.

	Apoptosen (%)
Kontrolle	1,3 \pm 0,4
Quercetin	1,0 \pm 0,4
p	n.s.

MW \pm SEM, n = 7, n.s. nicht signifikant

**Abb. 26: Einfluss von Quercetin auf die Expression von PARP**

Konfluente, in Kulturschalen differenzierte Caco-2-Zellen wurden für 24 h mit 200 μ M Quercetin oder 1 μ M Staurosporin als Apoptose-Induktor inkubiert. 50 μ g Protein des Gesamtlysats wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die Expression von PARP im Western Blot bestimmt.

Spurenbelegung: 1: Marker: Protein Molecular Weight Marker, 2-3: Kontrolle, 4-5: Quercetin, 6-7: Staurosporin (Positivkontrolle)

Weder in der TUNEL-Färbung noch in der Bestimmung der PARP-Expression zeigte Quercetin einen Einfluss auf die Apoptose-Rate der Caco-2-Zellen. Die Anzahl apoptotischer Zellen betrug sowohl in der unbehandelten Kontrollgruppe als auch in den mit Quercetin-inkubierten Proben etwa 1 % (Tab. 10), wobei in Abbildung 25 repräsentative TUNEL-Aufnahmen dargestellt sind. In der Bestimmung der PARP-Expression diente 1 μ M Staurosporin als Positivkontrolle (Abb. 26: Spuren 6-7). In diesen Proben wurde das 116 kDa-große PARP-Molekül teilweise gespalten, so dass unter anderem ein Spaltprodukt mit einer Molekülmasse von 85 kDa entstand. In den Kontroll- (Abb. 26: Spuren 2-3) bzw. in den Quercetingruppen (Abb. 26: Spuren 4-5) waren keine Unterschiede in der Expression des PARP-Moleküls erkennbar bzw. es war kein Spaltprodukt nachweisbar. Die PARP-Expression wurde nicht nur an auf Mehrloch-Platten

kultivierten Caco-2-Zellen untersucht, sondern auch an Caco-2-Monolayern, die auf permeablen Zellfiltern kultiviert wurden. Dabei wurden ähnliche Resultate erzielt wie in den Kulturschalen. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass das Flavonol den Widerstand nicht durch eine Änderung der Apoptose-Rate beeinflusst.

9 Einfluss der Zerfallsprodukte 3,4-Dihydroxy- und 2,4,6-Trihydroxybenzoesäure auf den transepithelialen Widerstand

Zwei wesentliche Zerfallsprodukte des Quercetins in wässriger Lösung stellen die Moleküle 3,4-Dihydroxybenzoesäure (DHBA) sowie 2,4,6-Trihydroxybenzoesäure (THBA) dar (Abb. 28) (Makris and Rossiter 2001). Um sicher zu gehen, dass die Quercetin-Wirkung auf die epitheliale Barriere durch die Substanz selber und nicht durch ihre Zerfallsprodukte verursacht wurde, erfolgte die Inkubation der Caco-2-Zellen mit den beiden Hauptzerfallsprodukte sowie die Messung von R^t . Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt.

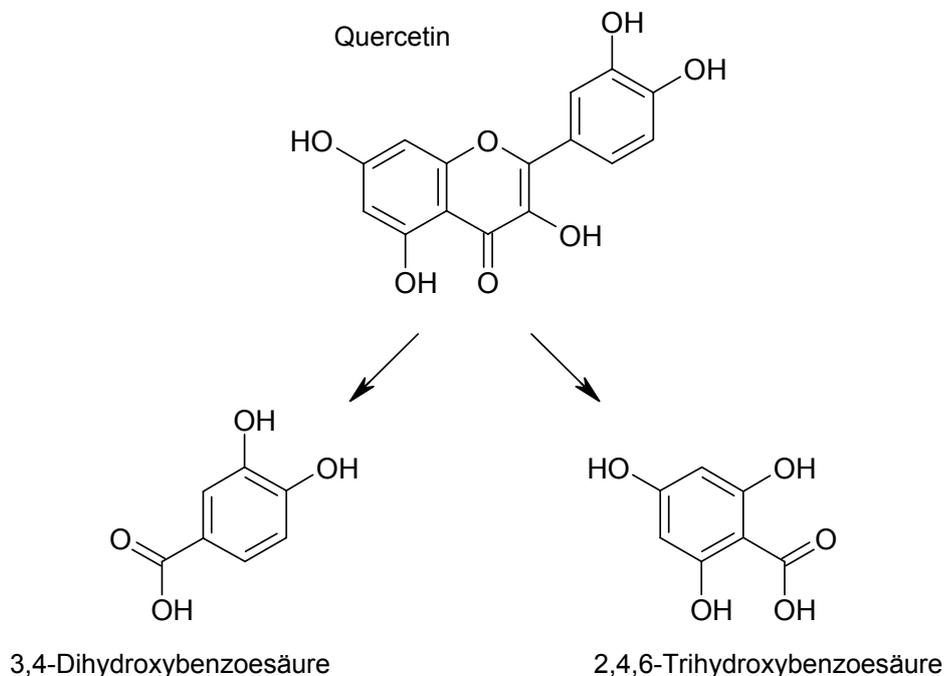


Abb. 28: Zerfallsprodukte des Quercetin-Aglykons

Quercetin stellt in wässriger Lösung ein instabiles Molekül dar. Die zwei Hauptkomponenten, die nach dem Zerfall von Quercetin entstehen, sind die 3,4-Dihydroxybenzoesäure (DHBA) sowie die 2,4,6-Trihydroxybenzoesäure (THBA) (modifiziert nach Makris und Rossiter (2001)).

Sowohl DHBA als auch THBA besaßen unter serumfreien Kultivierungsbedingungen einen Einfluss auf R^t . DHBA (200 μM) bewirkte eine R^t -Erhöhung nach einer Inkubationsdauer von 2 Tagen (Kontrolle 111 % \pm 2 % versus DHBA 132 % \pm 6 % vom Ausgangswiderstand). Dieser Effekt blieb auch am Tag 3 erhalten (Abb. 29A). THBA (200 μM) hingegen verursachten einen leichten Abfall des Widerstands bereits nach 4 h (Kontrolle 97 % \pm 1 % versus THBA 85 % \pm 1 % vom Ausgangswiderstand), der auch nach 24 h noch deutlich erkennbar war. Am 2. Tag nach Inkubationsbeginn war kein R^t -Unterschied mehr zwischen THBA (200 μM) und der Kontrollgruppe vorhanden (Abb. 29B).

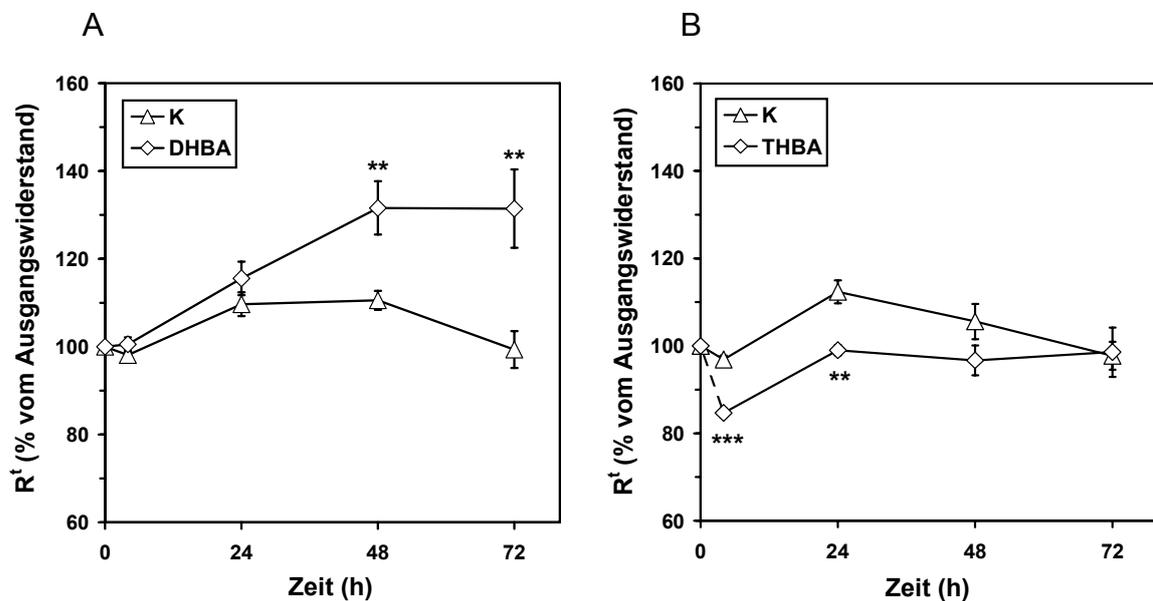


Abb. 29: Einfluss von DHBA und THBA auf R^t in Caco-2-Zellen unter serumfreien Kultivierungsbedingungen

Auf Zellfiltern kultivierte Caco-2-Zellen wurden mit 200 μM DHBA (A) bzw. 200 μM THBA (B) mukosal und serosal inkubiert und der zeitabhängige Einfluss dieser Substanzen auf R^t im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (K) bestimmt (n = 4-6, **p < 0,01, ***p < 0,001).

10 Einfluss des Quercetin-Glykosids Quercitrin auf den trans-epithelialen Widerstand

Um zu untersuchen, ob nicht nur das Quercetin-Aglykon, sondern auch seine Glykoside einen Effekt auf den R^t an Caco-2-Zellen verursachen, wurde ein in der Natur weit verbreitetes Quercetin-Glykosid - das Quercitrin - ebenfalls in seiner Wirkung auf Caco-2-Zellen analysiert. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 27 dargestellt.

Quercitrin (200 μ M) bewirkte einen ähnlichen Effekt auf den R^t von Caco-2-Zellen wie das Aglykon (Abb. 27). Nach einer Inkubation mit 200 μ M Quercitrin betrug R^t nach 24 h unter serumfreien Kultivierungsbedingungen etwa 16 % mehr als der Widerstand der Kontrollgruppe (Kontrolle 113 ± 1 % versus Quercitrin 130 ± 5 % vom Ausgangswiderstand). Am Ende des Versuchs (Tag 3) betragen die Widerstände der Kontrollgruppe 103 ± 3 % und die der Quercitrin-behandelten Caco-2-Zellen 131 ± 5 % (jeweils bezogen auf die Ausgangswerte zum Zeitpunkt 0 h).

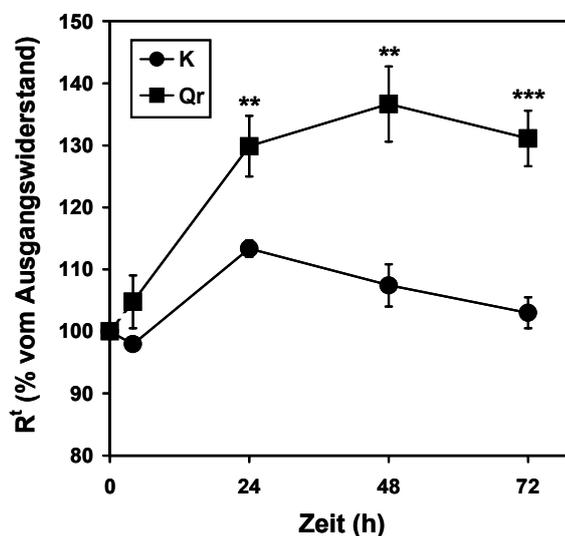


Abb. 27: Einfluss von Quercitrin auf R^t in Caco-2-Zellen unter serumfreien Kultivierungsbedingungen

Caco-2-Zellfilter wurden mit 200 μ M Quercitrin (Qr) mukosal und serosal inkubiert und der zeitabhängige Einfluss des Quercetin-Glykosids auf R^t im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K) bestimmt (MW \pm SEM, n = 4-6, **p < 0,01, ***p < 0,001).

D Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des Flavonoids Quercetin auf die intestinale epitheliale Barrierefunktion untersucht. Epithelien gewährleisten den Erhalt des „inneren Milieus“ von Organen und Geweben. Ihre Barrierefunktion wird durch verschiedene Mechanismen moduliert: Zum einen über die Dichte der epithelialen Zell-Zell-Kontakte, der Tight Junction (TJ), und zum anderen durch Modulation der Apoptose-Rate im Epithelverband. Die TJ umgibt netzförmig die apikale Zellmembran und schließt den interzellulären Spalt, wodurch die epitheliale Polarität gewährleistet wird. Sie dient als Barriere gegen das ungewollte Eindringen von Makromolekülen oder Antigenen in die Mukosa, lässt aber in definierter Weise kleinere Stoffe wie Ionen und Wasser passieren. Zu den gewebespezifisch exprimierten TJ-Proteinen zählen Occludin, die Mitglieder der Claudin-Familie, Tricellulin und JAM (Übersicht siehe Fanning et al. (1999), Ikenouchi et al. (2005)). Claudine tragen in unterschiedlichem Maß zur Barrierefunktion des Epithels bei. Sie verstärken die Barrierefunktion, indem sie entweder den parazellulären Spalt verschließen (Claudin-1) oder die Ionen-Permeabilität vermindern (Claudin-4, Claudin-7) (Alexandre et al., 2005; Inai et al., 1999; Van Itallie et al., 2001). Andere Mitglieder der Claudin-Familie bilden Poren (Claudin-2) und erhöhen die Durchlässigkeit für Ionen (Amasheh et al., 2002). Weitere Claudine scheinen die epitheliale Barriere kaum zu beeinflussen, sondern weisen eher andere Funktionen im Epithelverband auf (Claudin-3) (Sonoda et al., 1999). Nur das Zusammenspiel aller poren- und barrierebildenden Moleküle definiert die epithelialen Barriereigenschaften.

Ein weiterer Aspekt, der die Dichtheit eines Epithels beeinflusst, ist die Modulation der Apoptosen im Zellverband. Dieser Prozess hat eine wichtige regulatorische Funktion für die Entwicklung und den Erhalt eines Organismus. Durch die apoptotischen Vorgänge kann eine Zelle innerhalb weniger Stunden aus dem Zellverband eliminiert werden. Er beginnt zunächst mit dem Schrumpfen der Zelle sowie der Spaltung von DNA durch Endonukleasen in definierte Bruchstücke, die in Membranvesikel eingeschlossen und durch Phagozyten (z.B. Makrophagen) beseitigt werden. Im Gegensatz dazu geht die zweite Form des Zelltods, die Nekrose, mit einem Schwellen und Platzen der Zellen einher. Das so frei gewordene Zellplasma bewirkt im Gegensatz zur Apoptose entzündliche

Reaktionen. Nekrosen werden durch äußere Einflüsse wie Traumata oder Strahlung verursacht. Apoptose kann durch drei verschiedene Signalwege initiiert werden: Extern über eine Aktivierung von Todesrezeptoren, intern über Mitochondrien oder stressinduziert. Dabei wird die Caspase-Kaskade aktiviert, die unwiderruflich zum Zelltod führt (Jones and Gores 1997; McConkey 1998; Zhivotovsky 2004). Durch die Induktion von Apoptosen entstehen „Löcher“ (Leaks) im Epithelverband, wodurch die Barrierefunktion beträchtlich beeinflusst werden kann (Bojarski et al., 2000). In vielen pathologischen Zuständen wie z.B. bei Entzündungsprozessen werden sowohl die TJ als auch die Apoptose-Rate moduliert, so dass das Epithel durchlässiger wird (Gitter et al., 2000a; Gitter et al., 2000b; Poritz et al., 2004; Schmitz et al., 1999). Daher ist es von großem Interesse, die zellulären Mechanismen bei Barriere-Dysfunktion aufzuklären und Ansätze zu finden, diese zu inhibieren.

Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit das im Pflanzenreich weit verbreitete Flavonoid Quercetin untersucht, welches zahlreiche positive Effekte auf den menschlichen Körper besitzt wie den Schutz vor Atherosklerose und Tumorerkrankungen (Deschner et al., 1991; Hayek et al., 1997). In dieser Arbeit konnte anhand eines humanen intestinalen Zellkulturmodells zum ersten Mal gezeigt werden, dass Quercetin darüber hinaus Effekte auf die epitheliale Barrierefunktion aufweist, wobei insbesondere die Modulation der TJ sowie der Apoptose-Rate des Epithels analysiert wurde.

1 Einfluss von Quercetin auf die intestinale Barrierefunktion am Epithel der Caco-2-Zelllinie

1.1 Transepithelialer Widerstand

Als Modell für intestinale Epithelien wurde die humane Kolonkarzinom-Zelllinie Caco-2 verwendet. Diese Zellen differenzieren nach Erreichen eines konfluenten Monolayers spontan aus, wobei sie polare epitheliale Strukturen mit Schlussleisten ausbilden. Obwohl es sich hierbei um eine Zelllinie handelt, die ursprünglich von einem Karzinom des Kolons abstammt, besitzt diese Eigenschaften des Dünndarms und gilt als ein gutes Modell zur Untersuchung von intestinalen Epithelzell-Funktionen (Delie and Rubas 1997; Hidalgo et al., 1989). Durch die Kultivierung der Zellen auf permeablen Zellträgern lässt sich die natürliche Kompartimentierung, die im Darm durch die epitheliale Barriere der Enterozyten gebildet wird, simulieren. Die Zellen der Caco-2-Zelllinie bilden auf den porösen Zellkulturfiltern einen dichten, differenzierten Zellverband aus, und es entsteht ein Zweikompartimenten-System mit einer mukosalen und einer serosalen Seite. Die Barriereigenschaften dieser Zellmonolayer sind durch die Messung des transepithelialen Widerstands (R^t) bestimmbar. Die Caco-2-Zellen bildeten in dieser Versuchsreihe einen R^t von etwa 200 bis 350 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ aus.

Es wurden verschiedene Konzentrationen des Flavonols Quercetin zur Inkubation der Caco-2-Zellen verwendet und der R^t im Zeitverlauf gemessen. Es zeigte sich, dass der Widerstand nach Quercetin-Zugabe konzentrationsabhängig auf ca. das 1,5-fache der Kontrolle zunahm. Dieser Effekt war innerhalb weniger Stunden erkennbar und persistierte über 48 h. Die R^t -Erhöhung war ab einer Quercetin-Schwellenkonzentration von 100 μM auslösbar, wobei die stärksten Effekte mit 200 μM Quercetin nach 48 h Inkubation erreicht wurden. Aus Gründen der Löslichkeit erfolgte keine Testung höherer Konzentrationen (van der Woude et al., 2003). Kuo (1996) hingegen fand am Caco-2-Epithel keinen vergleichbaren Effekt von 100 μM Quercetin auf den Widerstand. Diese Diskrepanz zu den hier dargestellten Daten ist am ehesten durch verschiedene Kultivierungs- und Versuchsbedingungen erklärbar. So wurden in diesen Testreihen z.B. ein anderes Kulturmedium verwendet sowie größere Zellfilter mit porösen Membranen eingesetzt.

Da zytotoxische Einflüsse der Testsubstanz die Integrität des Epithelverbands beeinträchtigen könnten, wurde die LDH-Freisetzung als Maß für eine Zellschädigung analysiert. Die eingesetzten Quercetin-Konzentrationen (meist 200 μM) zeigten keine Zytotoxizität am Caco-2-Monolayer, da die LDH-Aktivität im mukosalen Überstand im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht verändert war. In einigen Studien wurden zytotoxische (antiproliferative) Einflüsse von Quercetin beschrieben, die sich allerdings meist auf subkonfluente Kultivierungszustände der Zelllinien bezogen, bei denen die Zellen noch stark proliferierten (Agullo et al., 1996; Csokay et al., 1997; Kuo 1996). Agullo et al. (1994) konnten zeigen, dass Quercetin zwar in geringer Dosis von 15 μM auf subkonfluente Caco-2-Zellen zytotoxisch wirkte, unter konfluenten Bedingungen hingegen auch höhere Flavonol-Konzentrationen ohne eine zellschädigende Wirkung blieb. So besaß sogar 120 μM Quercetin nach einer Inkubationszeit von 48 h in konfluenten Caco-2-Zellen keinen negativen Effekt auf die zelluläre Proteinmasse, wobei die Zellen in FKS-armen Medium kultiviert wurden.

Einen weiteren Parameter zur Beschreibung zytotoxischer Eigenschaften ist die Messung von R^t . Schädigende Substanzen führen zu einer Störung des epithelialen Zellverbands und somit zu einer erhöhten Permeabilität bzw. zu einem erniedrigten R^t . Da unsere Testsubstanz allerdings eine R^t -Erhöhung bewirkte, waren zytotoxische Effekte weitgehend auszuschließen.

Der Anstieg von R^t nach Quercetin-Inkubation hätte zwar prinzipiell durch eine Zellschwellung hervorgerufen sein können und zwar in Folge einer Verkleinerung des Interzellulärspalts (Chebabo et al., 1995). Da in dieser Arbeit allerdings kein Einfluss von Quercetin auf die Mannitol-Permeabilität beobachtet wurde, konnte Zellschwellung als Ursache für die Widerstandserhöhung eher ausgeschlossen werden. Des Weiteren gab es auch mikroskopisch keinen Anhalt für eine Zellschwellung.

1.2 Tight Junction-Proteine

1.2.1 Proteinexpression

Die Dichte des parazellulären Spalts und somit die epithelialen Barriereigenschaften werden insbesondere durch die TJ definiert. Eine R^t -Änderung, wie sie durch Quercetin hervorgerufen wurde, könnte durch eine Modulation der Expression von TJ-Proteinen bedingt sein. Bisher konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass Quercetin das Expressionsniveau von zahlreichen Proteinen verändern kann, welche für das Zellwachstum sowie für Differenzierungs- und proapoptotische Prozesse wichtige Funktionen besitzen (van Erk et al., 2005; Wenzel et al., 2004).

In dieser Arbeit wurde darüber hinaus nachgewiesen, dass Quercetin das Expressionsmuster von TJ-Moleküle modulieren kann. Es wurde die Expression der TJ-Proteine Occludin, Claudin-1, Claudin-3, Claudin-4 und Claudin-7 unter dem Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit 200 μ M Quercetin analysiert. Das Expressionsniveau von Claudin-2 und Claudin-5 wurde ebenfalls untersucht. Es konnte jedoch keine Expression dieser beiden TJ-Moleküle in Caco-2-Zellen nachgewiesen werden. Claudin-5 ist vor allem ein Bestandteil von TJ-Strängen endothelialer Gewebe (Kiuchi-Saishin et al., 2002; Morita et al., 1999; Morita et al., 2003), wobei es im Darm auch in Epithelien synthetisiert wird (Rahner et al., 2001). Interessanterweise wird eine Claudin-5-Expression auch in der Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29/B6 gefunden, aber nicht in Caco-2-Zellen (Amasheh et al., 2005). Claudin-2 konnte bislang nur in subkonfluenten, undifferenzierten Caco-2-Zellen nachgewiesen werden (Escaffit et al., 2005). Diese zitierten Arbeiten korrelieren somit gut mit dem Expressionsmuster der Caco-2-Zellen in den hier beschriebenen Versuchen.

Der Einfluss von Quercetin auf die Expression von TJ-Proteinen wurde unter zwei Kultivierungsbedingungen analysiert, zum einen in Zellkulturschalen (6-Loch-Platten) und zum anderen auf Zellkulturfiltern. Konfluente Zellen in Zellkulturschalen können allerdings nur mukosal mit dem Flavonoid inkubiert werden. Der Vorteil dieser Methode ist eine höhere Ausbeute an Membranprotein bei einer einfacheren Aufarbeitungsmethode im Vergleich zur Protein-Isolierung der Zellen von Zellkulturfiltern. Unter den Kultivierungsbedingungen in Zellkulturschalen wurde die Expression von Claudin-1 und Claudin-7 unter Quercetin-Einfluss herabreguliert (Claudin-1 auf 67 %, Claudin-7 auf 57 %, jeweils

bezogen auf die Kontrolle mit 100 %), während die von Claudin-3 und vor allem von Claudin-4 verstärkt wurden (Claudin-3 auf 165 %, Claudin-4 auf 337 %, jeweils bezogen auf die Kontrolle mit 100 %). Die Expression von Occludin blieb nach Quercetin-Inkubation unverändert. Diese Daten deuten auf einen Austausch von Claudin-1 und Claudin-7 zugunsten von Claudin-3 und Claudin-4 hin.

Die Expression von Claudin-4 war unter den Kultivierungsbedingungen auf Zellkulturfiltern nach beidseitiger Applikation von Quercetin ebenfalls deutlich erhöht (Quercetin 226 % gegenüber der Kontrolle mit 100 %). Im Gegensatz zu den Daten, die auf den Mehrloch-Platten erhoben wurden, wurde die Expression der anderen untersuchten TJ-Proteine (Occludin, Claudin-1, Claudin-3 und Claudin-7) nicht beeinflusst. Diese Daten sprechen eher gegen die Theorie eines Austausches, ohne dass allerdings ausgeschlossen werden kann, dass andere hier nicht untersuchte TJ-Proteine ebenfalls verändert sein könnten.

Die verstärkte Expression des abdichtenden TJ-Proteins Claudin-4 nach Quercetin-Exposition konnte in beiden Testsystemen nachgewiesen werden. Die Expression von Claudin-1, Claudin-3 und Claudin-7 war hingegen nur auf Mehrloch-Platten verändert und nicht auf den Zellkulturfiltern. Eventuell waren die Caco-2-Zellen in den Mehrloch-Platten noch nicht ausreichend differenziert, da kein serosales Kompartiment ausgebildet werden konnte. Allerdings berichtete Chantret (1988), dass Caco-2-Zellen, ob in Flaschen oder auf Schalen kultiviert, ebenfalls in der Lage waren, einen differenzierten Monolayer auszubilden. Beide Kultivierungsbedingungen weisen trotzdem erhebliche Unterschiede im TJ-Expressionsmuster von Claudin-1, Claudin-3 und Claudin-7 auf. Allerdings simulieren Zellkulturfilter die physiologische Situation des Darmepithels besser als die Zellkulturschalen, so dass der Haupteffekt von Quercetin die vermehrte Claudin-4-Expression darstellt. Dass Zelllinien je nach Art ihrer Kultivierung verschiedene Eigenschaften besitzen können, wurde von Lang et al. (1986) und speziell an der Caco-2-Zelllinie von Wagner et al. (1992) bestätigt.

1.2.2 mRNA-Expression von Claudin-4

Eine verstärkte Claudin-4-Expression kann auf einer erhöhten Stabilität des Proteins (verminderter Abbau oder erhöhte Recycling-Rate) oder auf einer erhöhten Transkription und Translation des Gens beruhen. Um diese Mechanismen weiter aufzuklären, wurde die mRNA-Expression von Claudin-4 unter Quercetin-Einfluss quantitativ bestimmt. Analog zu den Proteinanalysen wurde RNA aus unbehandelten oder aus Quercetin-behandelten, konfluenten Caco-2-Zellen, kultiviert in Zellkulturschalen oder auf permeablen Zellkulturfiltern, isoliert. Es zeigte sich, dass die Claudin-4-mRNA unter beiden Kultivierungsbedingungen nach 24-stündiger Inkubation mit 200 μ M Quercetin hoch reguliert wurde. Die Claudin-4-mRNA-Expression auf den Mehrloch-Platten betrug etwa das Vierfache und auf den Zellkulturfiltern das Dreifache im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse korrelieren mit denen der Proteinexpression, wo Claudin-4 unter dem Flavonoid-Einfluss ebenfalls stärker auf den 6-Loch-Platten als auf den Zellkulturfiltern überexprimiert wurde. Ob allerdings eine verstärkte Transkription oder eine Stabilisierung der mRNA ursächlich sind, konnte anhand dieser Methode nicht geklärt werden. Des Weiteren lässt sich nicht ausschließen, dass das Claudin-4-Protein zumindest teilweise auch durch ein verstärktes Recycling in die TJ eingebaut wurde. Eine durch Fremdstoffe hervorgerufene Überexpression von Claudin-4 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene konnten bereits Mima et al. (2005) zeigen. Dabei wurde die humane Magen-Karzinom Zelllinie AGS gegen verschiedene nichtsteroidale antiinflammatorische Arzneimittel - kurz NSAIDs (z.B. Indomethacin) - exponiert und dadurch die Expression des TJ-Proteins induziert.

1.2.3 Aktivierung des Claudin-4-Promotors

Die Erhöhung der mRNA-Expression von Claudin-4 nach Quercetin-Inkubation könnte unter anderem mit einer erhöhten Transkriptionsleistung zusammenhängen, so dass Analysen zur Promotoraktivität des TJ-Proteins durchgeführt wurden. Bisherige Studien konnten bereits bestätigen, dass Quercetin die Promotoren von Zielgenen beeinflussen kann (Abou-Agag et al., 2001; Mutoh et al., 2000; Myhrstad et al., 2002). In dieser Studie wurde zunächst der Claudin-4-Promotor (C4P) aus genomischer DNA durch Amplifizierung gewonnen und in den pGL4.10-Vektor kloniert. Das pGL4.10-C4P-Konstrukt wurde in die Caco-2-Zellen transient transfiziert und die Promotor-Aktivität unter Quercetin-Einfluss analysiert. Honda et al. (2006) klonierten vor kurzem ebenfalls den Claudin-4-Promotor und führten Luciferase-Reporter-Gen-Analysen zur Transkriptionsregulation durch.

Der Reporter-Gen-Assay wurde an subkonfluenten Zellen durchgeführt, da nur bei einer Konfluenz von höchstens 80 % eine gute Transfektionseffizienz, ein hohes Protein-Expressionslevel sowie eine minimierte Zytotoxizität der Transfektionssubstanzen gewährleistet werden kann. Wie bereits erwähnt, besitzt Quercetin unterschiedliche zytotoxische Effekte auf Zellen im subkonfluenten oder konfluenten Zustand (Agullo et al., 1994). Aufgrund dessen wurde die LDH-Freisetzung unter Flavonol-Einfluss ebenfalls an subkonfluenten Caco-2-Zellen untersucht, bevor bestimmte Quercetin-Konzentrationen in den Luciferase-Reporter-Gen-Assay eingesetzt wurden. Es zeigte sich, dass eine Konzentration von 100 μM zytotoxische Effekte verursachte, so dass in den Promotor-Analysen nur niedrigere Flavonoid-Konzentrationen von 10 und 25 μM untersucht wurden, die keine erhöhte LDH-Freisetzung im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwiesen. Einige Studien zeigten allerdings, dass auch die verwendeten niedrigen Flavonol-Konzentrationen zellschädigende Wirkungen haben können (Agullo et al., 1994; Agullo et al., 1996). Diese Effekte fallen jedoch von Zelllinie zu Zelllinie sehr unterschiedlich aus. Darüber hinaus können Diskrepanzen auch durch unterschiedliche Inkubationszeiten und andere Kultivierungsbedingungen (Art des Mediums, Serumgehalt etc.) entstehen.

In der Analyse der Promotor-Aktivität von Claudin-4 konnte gezeigt werden, dass 25 μM Quercetin nach 20 h Inkubation die C4P-Aktivität um 50 % erhöhte, wohingegen eine Konzentration von 10 μM keinen Einfluss auf den C4P hatte. Der

Effekt von 25 μM Quercetin ist allerdings verhältnismäßig geringer als das Maß der gefundenen Claudin-4-Expression. Da jedoch subkonfluente Zellkulturbedingungen und eine deutlich geringere Quercetin-Konzentration verwendet wurden, sind die verschiedenen Versuche nicht in direkte Beziehung zu stellen. Es konnte jedoch klar gezeigt werden, dass Quercetin eine verstärkte Transkriptionsrate von Claudin-4 über eine Beeinflussung des Promotors auslöste. Allerdings kann eine erhöhte Stabilität der Claudin-4-mRNA durch Quercetin nicht ausgeschlossen werden. Bei der Sequenzierung des Claudin-4-Promotors wurden im Vergleich mit der Sequenz der NCBI-Datenbank (Locus: AC093168, Position: 64500 - 66296) zwei Mutationen festgestellt. Welche funktionelle Relevanz diese Nukleotidaustausche besitzen, wurde in dieser Arbeit nicht geklärt.

1.2.4 Zelluläre Verteilungsmuster

Neben der Expression kann auch die sub- und parazelluläre Verteilung der TJ-Proteine verändert sein und dadurch die epitheliale Barriereeigenschaft modulieren. So bewirkte z.B. das Zytokin $\text{TNF}\alpha$ in MDCK-Zellen eine Zerstörung der zellulären Struktur von ZO-1, während die ZO-1-Expression nicht beeinflusst wurde (Poritz et al., 2004). Um dies zu klären, wurden die TJ-Proteine mit Hilfe einer Immunfluoreszenz-Färbung detektiert und ihre Struktur unter Einfluss von Quercetin mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop analysiert.

Alle fünf untersuchten TJ-Moleküle wiesen in den Caco-2-Zellen das typische netzartige Muster von TJ-Strängen auf und waren in den Zell-Zell-Kontakten der TJ lokalisiert. Da die Expression von Occludin in den Western Blot-Analysen nach Quercetin-Exposition unverändert war, wurde es für die Doppelfärbungen als Referenz-Protein eingesetzt, wodurch eine mögliche Modulation der Claudin-Moleküle besser vergleichbar war. Claudin-1, Claudin-3 und Claudin-7 wiesen unter Einfluss von 200 μM Quercetin nach 24 h Inkubation keine Veränderung ihres Verteilungsmusters auf und waren mit Occludin kolokalisiert. Nur das Claudin-4-Signal wurde, semiquantitativ betrachtet, unter dem Flavonol-Einfluss verstärkt, wobei die Signale dabei sowohl in den TJ-Strands selbst als auch subjunctional und intrazellulär lokalisiert waren. Dies bestätigte unsere Ergebnisse der Claudin-4-Expressionsanalysen auf Protein- und mRNA-

Ebene. Ob die intrazellulären Signale von Claudin-4 aus Vesikeln stammen, konnte allerdings nicht geklärt werden. So könnte beispielsweise vesikuläres rab13 oder rab3B an der Umverteilung von Claudin-4 durch einen vermehrten Transport zur Plasmamembran oder ein verstärktes Recycling beteiligt sein, so wie dies bereits bei TJ-Proteinen aufgedeckt werden konnte (Morimoto et al., 2005; Weber et al., 1994; Yamamoto et al., 2003).

1.3 Permeabilität von Mannitol sowie von Na- und Cl-Ionen

Parazelluläre Eigenschaften eines Epithels lassen sich durch radioaktive Tracerfluxe charakterisieren, wobei hier in der Arbeit [³H]-Mannitol, ²²Na⁺ und ³⁶Cl⁻ zur Bestimmung der Weite des parazellulären Spalts und zur Untersuchung von Ionen-Permeabilität verwendet wurden. Hierzu wurde in einer Arbeit von van Itallie et al. (2001) nach Überexpression des barrierebildenden TJ-Proteins Claudin-4 in MDCK-Zellen Untersuchungen durchgeführt. Es zeigte sich - analog zu unseren Ergebnissen an der Caco-2-Zelllinie unter Quercetin-Exposition - eine Erhöhung von R^t. Es wurde in dieser Arbeitsgruppe weiterhin gezeigt, dass nicht die Größe des parazellulären Spalts verändert war, da keine Änderung von Mannitol-Fluxen nachgewiesen werden konnte, sondern dass selektiv die Na⁺-Permeabilität herabgesetzt wurde.

Diese Arbeitshypothese der Veränderung der epithelialen Na⁺-Permeabilität durch Hochregulation von Claudin-4 wurde hier an diesem Quercetin-Projekt aufgegriffen. Es wurden radioaktive Tracerfluxe von Mannitol, Na⁺ und Cl⁻ durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die durch Quercetin induzierte Claudin-4-Expression mit einem unveränderten Mannitolflux einherging und somit auch hier die Weite des parazellulären Spalts nicht verändert war. Des Weiteren führte die R^t-Erhöhung, wie auch in der Arbeit von van Itallie et al. bereits beschrieben, zu einem reduzierten Na⁺-Flux. Die Na⁺-Permeabilität war sowohl bei mukosaler als auch bei serosaler Applikation des radioaktiven Tracer-Moleküls vermindert (Quercetin: J_{Na}^{ms} auf 75 % und J_{Na}sm auf 63 %, jeweils bezogen auf die Kontrolle mit 100 %), während die Nettofluxe sowie der Kurzschlussstrom I_{sc} unverändert blieben. Der Cl⁻-Flux war ebenfalls in der ms- und der sm-Richtungen herabgesetzt (Quercetin: J_{Cl}^{ms} auf 71 % und J_{Cl}sm auf 64 %, jeweils bezogen auf die Kontrolle mit 100 %) bei unveränderten Nettofluxen.

Einen Einfluss auf die Cl^- -Sekretion konnte für Quercetin in Abhängigkeit vom Zugabekompartiment bereits nachgewiesen werden. In einer Studie von Sanchez de Medina et al. (1997) wurden T84-Zellen, ein anderes Zellkulturmodell für das Kolonepithel, mit $100 \mu\text{M}$ Quercetin exponiert. Bei mukosaler Applikation bewirkte das Flavonol sekretorische Effekte, wohingegen es nach serosaler Zugabe sogar antisekretorische Wirkungen bei Koinkubation mit verschiedenen Sekretagoga aufwies. Auch Cermak (1998) fand eine Chloridsekretion nach Quercetin-Inkubation ($100 \mu\text{M}$) am Rattendarm. In dieser Studie war Quercetin allerdings im Gegensatz zur Arbeit von Sanchez de Medina et al. (1997) nur nach serosaler Applikation effektiv. Dieser Effekt erreichte bereits nach 25 min sein Maximum und nahm anschließend kontinuierlich wieder ab. Es ist daher zu vermuten, dass Quercetin aufgrund des Zeitverlaufs in diesem Experiment keine Wirkung mehr auf transzelluläre Transportmechanismen der Cl^- -Ionen nach 24 h Inkubation besessen haben dürfte, so dass dieses Phänomen bei den hier beschriebenen Cl^- -Fluxanalysen vernachlässigt werden kann. Die absoluten Werte für die Ionenfluxe betragen in dieser Arbeit für Na^+ etwa $3 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ und für Cl^- etwa $1,6 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Kontrollwerte). Diese Werte waren sowohl in ms- als auch in sm-Richtung ähnlich groß, was ebenfalls eher auf einen parazellulären Transport und gegen einen transzellulären Transportweg hindeutet.

Van Itallie et al. (2001) konnten keine Verminderung der Cl^- -Permeabilität aufgrund der Claudin-4-Überexpression feststellen. Es ist jedoch bekannt, dass ein veränderter Phosphorylierungsstatus von Claudin-4 die Cl^- -Permeabilität beeinflussen kann (Le Moellic et al., 2005), wobei die weitere Untersuchung dieses Effekts kein Bestandteil der vorliegenden Arbeit war. Auch Claudin-7 besitzt Effekte auf die Cl^- -Durchlässigkeit. Die Überexpression dieses Proteins führt zu einer verminderten Cl^- -Leitfähigkeit und einer erhöhten Na^+ -Leitfähigkeit (Alexandre et al., 2005). Eine reduzierte Claudin-7-Expression, wie es Quercetin nur an auf Kulturschalen-differenzierten Caco-2-Zellen verursachte, hätte demzufolge zu einer erhöhten Cl^- -Permeabilität führen müssen, was jedoch nicht den in dieser Arbeit vorgelegten Daten entspricht.

1.4 Signaltransduktionsmechanismen von Quercetin

Quercetin ist als potenter Inhibitor von vielen intrazellulären Enzymen bekannt. So blockiert es beispielsweise die PKC, die Mitogen-aktivierte Protein-kinase-Kaskade aber auch einige andere Signalwege (Cho et al., 2003; Ferriola et al., 1989). Über einen oder mehrere dieser Signalwege könnte das Flavonoid auf die TJ und damit auf die epitheliale Barriere Einfluss genommen haben (Balda et al., 1991; Dodane and Kachar 1996; Wang et al., 2004).

Zur Klärung der Quercetin-Signaltransduktionsmechanismen wurden Inhibitionsstudien mit Blockierungstoffen durchgeführt, ob sie in der Lage waren, den durch Quercetin induzierten R^t -Anstieg zu inhibieren. Zunächst wurden relativ unspezifische Blocker getestet. Als sehr potenter Inhibitor erwies sich dabei 20 nM Staurosporin, gefolgt von 50 μ M H7. Diese beiden Blocker inhibieren PKA, PKC, MLCK und einige andere Enzyme (Bradshaw et al., 1993; Condrescu et al., 1999; Droillard et al., 1997; Hidaka et al., 1984; Peet and Li 1999; Radloff and Gercken 1996; Sielecki et al., 2000; Tamaoki et al., 1986; Wisniewski et al., 1999; Zollner 1993). Andere untersuchte Blocker wiesen keinen inhibitorischen Effekt auf: Dies waren der PKC-Inhibitor GF109203X (Toullec et al., 1991), der MLCK-Inhibitor ML-7 (Krarup et al., 1998; Makishima et al., 1991; Saitoh et al., 1987) sowie der intrazelluläre Ca^{2+} -Chelator BAPTA-AM (Mima et al., 2005). Turner et al. zeigten, dass über den PKC-vermittelten Signalweg die MLCK beeinflusst werden kann, so dass die epitheliale Barriere durch Relaxation des perijunctionalen Aktinrings verändert wird (Turner et al., 1999). In dem hier verwendeten Testsystem scheint dieser Signalweg nicht involviert zu sein, da ML-7 keinen Effekt zeigte.

Mima et al. (2005) berichteten, dass die durch NSAIDs erhöhte Claudin-4-Expression durch den Ca^{2+} -Chelator BAPTA-AM blockiert werden konnte, so dass die Effekte auf das TJ-Protein auf einen erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel zurückzuführen waren. Diese Resultate konnten hier jedoch nicht bestätigt werden, da auch der Ca^{2+} -Chelator nicht den durch Quercetin-induzierten R^t -Anstieg blockierte.

Mit Ausnahme von GF109203X zeigte keiner der Inhibitoren einen Effekt auf R^t , wenn sie ohne Quercetin-Koinkubation an den Caco-2-Zellen getestet wurden. Interessanterweise bewirkte GF109203X nach einer Inkubationszeit von 24 bzw. 48 h ebenfalls einen R^t -Anstieg, so dass die PKC offensichtlich die basale TJ-Funktion regulatorisch beeinflusst. Dass eine PKC-Aktivierung zu einer R^t -

Veränderung führen kann, ist in früheren Studien gut belegt. Allerdings wurden konkret an der Caco-2-Zelllinie ganz unterschiedliche Daten erhoben. Eine Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)-induzierte PKC-Aktivierung resultierte in verschiedenen Arbeitsgruppen sowohl in einem R^t -Anstieg (Turner et al., 1999) als auch in einem R^t -Abfall (Stenson et al., 1993), was vermutlich mit verschiedenen Kultivierungsbedingungen und Differenzierungsstadien der Zelllinie zu erklären ist. Des Weiteren wurde an Zellkultumodellen in zahlreichen Studien eher auf eine Barriestörung nach PKC-Aktivierung hingewiesen (Angelow et al., 2005; Marano et al., 2001; Song et al., 2001).

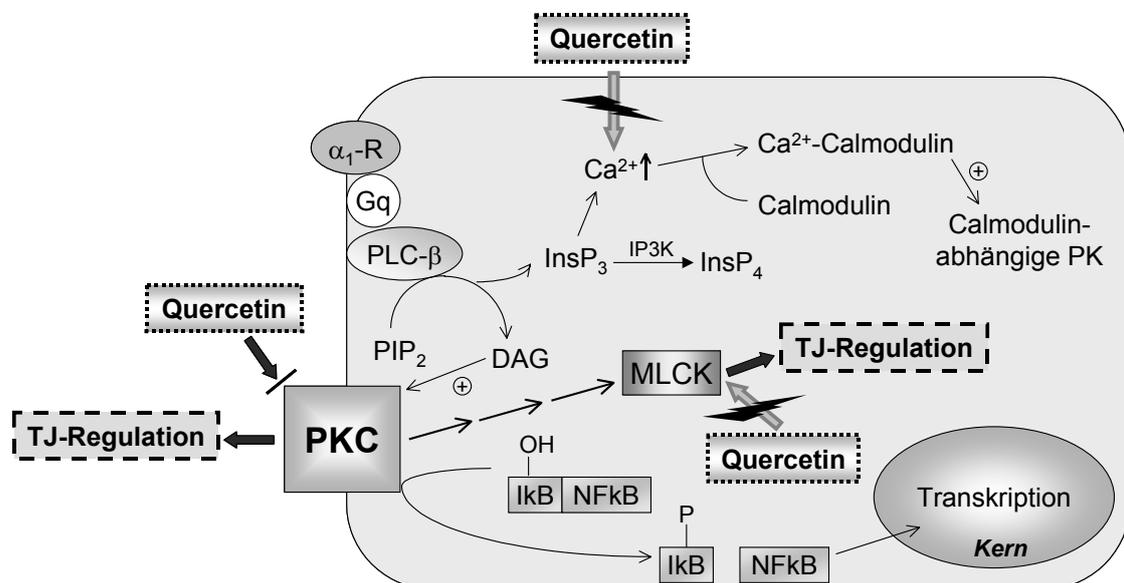


Abb. 30: InsP₃ - Phospholipase (PLC- β) Signalweg

Eine Möglichkeit zur Erklärung der TJ-Regulation stellt die Aktivierung der PKC dar. Diese Proteinkinase wird durch DAG stimuliert, welches durch die PLC- β aus PIP₂ abgespalten wird. Außer DAG entsteht InsP₃, welches zu einem Ca²⁺-Einstrom in die Zelle führt und damit weitere Signalkaskaden aktiviert. An der Aktivierung von PLC- β sind der α_1 -Rezeptor (α_1 -R) und das G_q-Protein involviert. Die Aktivierung von PKC kann zur Synthese von Proteinen beispielsweise über eine Aktivierung von NF- κ B führen. Auch die MLCK kann durch die PKC moduliert werden. Quercetin könnte dabei die TJ-Regulation durch die Blockierung der PKC verursachen, wobei das Flavonol keinen Effekt auf den intrazellulären Ca²⁺-Spiegel sowie auf die MLCK ausübte.

Abkürzungen: DAG (Diacylglycerol), I κ B (Inhibitor von NF- κ B), InsP₃ (Inositol-1,4,5-triphosphat), InsP₄ (Inositol-1,3,4,5-tetrakiphosphat), IP3K (Inositol-1,4,5-triphosphat-Kinase), MLCK (Myosin Light Chain Kinase), NF- κ B (Nuclear factor- κ B), PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-disphosphat), PK (Proteinkinase), PKC (Proteinkinase C), PLC- β (Phospholipase C-*beta*)

Da Quercetin als potenter PKC-Inhibitor bekannt ist, erscheint der hier gefundene Effekt am ehesten auf die Hemmung dieses zellulären Signalwegs zurückzuführen zu sein. Der MLCK-Signalweg oder ein Ca^{2+} -vermittelter Mechanismus waren vermutlich nicht an der TJ-Regulation nach Flavonoid-Exposition involviert. Eine genauere zusammenfassende Darstellung der Signalwege von Quercetin in Bezug auf die TJ-Regulation gibt die Abbildung 30 wieder.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung von R^t unter Quercetin-Einfluss durch eine verstärkte Expression von Claudin-4 auf mRNA- und Proteinebene vermittelt wurde, die unter anderem durch eine verstärkte Transkription des Claudin-4-Gens hervorgerufen wurde. Claudin-4 wurde vermehrt in die TJ-Strukturen integriert, war aber auch subjunctional und intrazellulär vermehrt nachweisbar. Die Claudin-4-Überexpression vermittelte eine reduzierte Ionenpermeabilität von Na^+ und Cl^- , ohne die Größe des parazellulären Spalts zu beeinflussen (Abb. 31). Die aus den Inhibitorstudien gewonnenen Resultate weisen dabei vor allem auf eine Beteiligung eines PKC-vermittelten Signaltransduktionswegs hin.

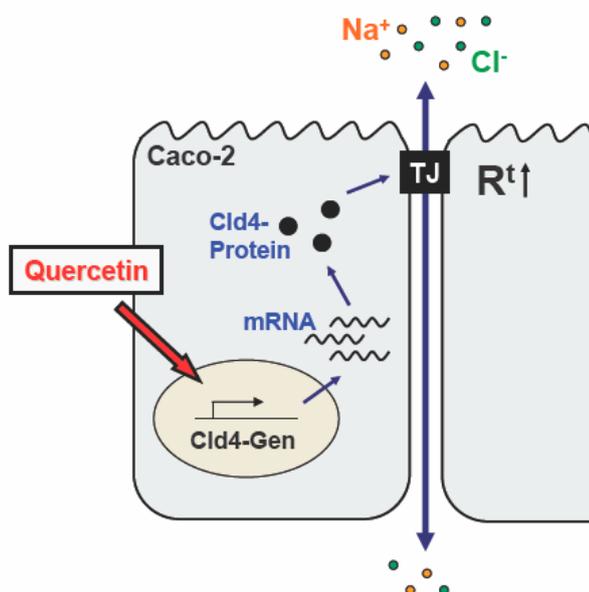


Abb. 31: Quercetin-Effekt auf die epitheliale Barrierefunktion an Caco-2-Zellen

Die Exposition von Caco-2-Monolayern mit Quercetin verursachte einen Anstieg des abdichtenden TJ-Proteins Claudin-4 auf mRNA- und Proteinebene, die unter anderem durch eine erhöhte Transkriptionsrate des Claudin-4-Gens bewirkt wurde. Das Protein wurde verstärkt in die TJ-Struktur eingebaut, wodurch die parazelluläre Ionenpermeabilität für Na^+ und Cl^- reduziert und der R^t erhöht wurde.

1.5 Charakterisierung des Wirkungsmechanismus des Quercetin-Effekts auf den transepithelialen Widerstand

Zur Charakterisierung des Wirkungsmechanismus von Quercetin am Caco-2-Epithel wurde zunächst analysiert, ob der Flavonoid-Effekt auf R^t abhängig war vom Zugabekompartiment. Eine einmalige Gabe von 200 μM Quercetin rief mukosal oder serosal appliziert eine ähnliche R^t -Wirkung hervor wie eine beidseitige Quercetin-Zugabe. Dieses Ergebnis kann mit der lipophilen Eigenschaft der Substanz erklärt werden, da das Molekül in der Lage ist, durch einfache Diffusion das Epithel zu durchdringen (Murota and Terao 2003). Sanchez de Medina (1997) zeigte allerdings, dass Quercetin je nach Applikation in eines der Zugabekompartimente auch unterschiedliche Effekte auf die Cl^- -Sekretion verursachen kann. Darüber hinaus gingen Walgren et al. (1998) der Frage nach, wie Quercetin über den Caco-2-Monolayer transportiert wird. Sie zeigten, dass das Flavonol in beiden Richtungen durch das Epithel geschleust werden kann, wobei sich der Transport in sm-Richtung als doppelt so effektiv erwies wie in Gegenrichtung. Diese Unterschiede wurden damit begründet, dass das intrazelluläre Flavonoid durch spezifische Transporter (z.B. über P-Glykoproteine, MRP oder Multispecific Organic Anion Transporter) wieder aus der Zelle befördert wird (Lautier et al., 1996; Taniguchi et al., 1996; Walgren et al., 2000a; Wang et al., 2005). Eine spätere Arbeit von Walgren und Walle (1999) belegte weiterhin, dass die erwähnten Efflux-Mechanismen drastisch reduziert werden, wenn im experimentellen System serosal Plasma zugesetzt wird, an dessen Proteine sich das Molekül anlagern kann. Die Resorption des Moleküls blieb dabei allerdings unverändert.

Ein weiterer Ansatzpunkt in dieser Arbeit war, ob die tägliche Zugabe von Quercetin den Wirkungsverlust, der bei einmaliger Zugabe am Tag 3 auftrat, verhindern kann. Bei einmaliger Flavonoid-Dosis sank der R^t nach 72 h deutlich ab, wohingegen bei täglicher Zugabe der erhöhte R^t -Effekt persistierte (Quercetin 1x Dosis $123 \pm 3 \%$ versus Quercetin-Wechsel $150 \pm 4 \%$ vom Ausgangswiderstand). Daher wurde vermutet, dass das aktive Flavonoid von der Zelllinie abgebaut wurde.

Die in dieser Arbeit untersuchte Quercetin-Konzentration von 200 μM ist in physiologischer Hinsicht als eher hoch einzuschätzen. Bisher konnten beim Menschen Plasma-Konzentrationen konjugierter Quercetin-Metabolite von 0,1 bis

1 μM nachgewiesen werden (Moon et al., 2000). Da der Darm allerdings den Ort der Resorption darstellt, werden hier Quercetin-Konzentrationen von bis zu 100 μM vermutet (van der Woude et al., 2003). Einen weiteren wichtigen Aspekt stellt die Akkumulationsfähigkeit von Quercetin durch einen regelmäßigen Flavonoid-Konsum dar. In einer humanen Studie betrug die Halbwertszeit der Quercetin-Plasmakonzentration 25 h, nachdem die Probanden frittierte Zwiebeln, Äpfel oder Rutin zu sich genommen hatten (Hollman et al., 1997). Manach et al. (1997) untersuchten die Bioverfügbarkeit von Quercetin an Ratten. Den Tieren wurde eine Dosis von 0,2 % Quercetin dem Futter beigemischt. Die Studie zeigte, dass die Plasmakonzentration von konjugierten Quercetin-Metaboliten nach einer einmaligen Dosis innerhalb von 8 Stunden auf bis zu 50 μM anstieg und auch nach 24 h nicht abfiel. Bei Tieren, denen zuvor über 10 Tage täglich diese Quercetin-Dosis zugeführt wurde, verursachte eine erneute Quercetin-Dosis hingegen keine zusätzliche Erhöhung der Plasmakonzentration mehr, die allerdings einen Wert von bis zu 100 μM erreichte. Vermutlich ersetzte die erneute Quercetin-Zufuhr lediglich die bereits verstoffwechselten Moleküle. Aufgrund dieser Literaturangaben ist im Darm von einer lokalen Akkumulation von Nahrungsquercetin auf zellulärer Ebene auszugehen und zwar in Konzentrationen, wie sie hier in dieser Arbeit eingesetzt wurden. Auch durch eine Supplementation von Quercetin, welches als Nahrungsergänzungsmittel in Kapsel- und Pulverform als Aglykon oder in glykosilierten Formen kommerziell erhältlich ist, erscheinen Konzentrationen von bis zu 200 μM im Darm realistisch.

Des Weiteren konnte hier gezeigt werden, dass unter serumfreien Kultivierungsbedingungen die wirksame Konzentration von Quercetin reduziert werden konnte. Eine Quercetin-Konzentration von 50 μM besaß einen ähnlichen Effekt auf R^t wie 200 μM in serumhaltigen Medium. Quercetin kann sich an Proteine anlagern, die sich im serumhaltigen Kulturmedium befinden, so dass hierdurch der Einfluss des Serumgehalts erklärbar wird (Kitson 2004; Walle et al., 2003).

2 Einfluss der Zerfallsprodukte 3,4-Dihydroxy- und 2,4,6-Trihydroxybenzoesäure auf die Barrierefunktion

Quercetin ist wie einige andere Flavonoide (Bsp. Rutin, Catechin) ein in wässriger Lösung instabiles Molekül (Kuo 1996). Einige Arbeitsgruppen haben ihren Versuchsansätzen zur Stabilisierung von Quercetin Ascorbinsäure zugesetzt (Dihal et al., 2006; van der Woude et al., 2003). Es ist aber nicht auszuschließen, dass die Zugabe dieses Vitamins einen unerwünschten Einfluss auf das Testsystem hat. So berichteten Kuo et al. (1997), dass die Aufnahme von Ascorbinsäure durch Quercetin und andere Flavonoide in Zelllinien (auch Caco-2) blockiert wird, so dass antiproliferative Effekte durch die Ascorbinsäure-Depletion zustande kommen könnten und nicht wie angenommen durch die Flavonoide. Da dieser Befund von anderen Autoren bekräftigt wurde (Park and Levine 2000; Song et al., 2002), wurde um sicher zu gehen, solche Effekte zu vermeiden, in dieser Arbeit keine Ascorbinsäure zugesetzt.

Murota et al. (2000) konnten speziell an Caco-2-Zellen zeigen, dass das Flavonol bereits innerhalb von nur 2 h zum großen Teil zu stabileren Metaboliten umgesetzt wird. Es war daher nicht klar, ob die hier gezeigten, durch Quercetin induzierten Effekte durch das Aglykon selbst oder eher durch seine Metabolite verursacht wurden.

Weiterhin könnten auch Zerfallsprodukte für die Quercetin-Wirkung auf den R^t verantwortlich sein. Zwei Hauptzerfallsprodukte des Flavonols - die 3,4-Dihydroxybenzoesäure (DHBA) und 2,4,6-Trihydroxybenzoesäure (THBA) - wurden auf ihren R^t -Effekt an Caco-2-Monolayern unter serumfreien Kultivierungsbedingungen untersucht (Makris and Rossiter 2001). Die Zellen wurden beidseitig mit 200 μ M DHBA bzw. THBA exponiert. THBA wies sogar einen (leichten) R^t -Abfall nach 4 bis 24 h Inkubation auf, wohingegen DHBA erst nach einer längeren Inkubationszeit von 48 h eine Erhöhung des Widerstands bewirkte. Diese Resultate schließen allerdings einen Beitrag von anderen Hydrolyseprodukten zum beobachteten Widerstandanstieg nicht völlig aus. Da es sich hierbei um die Hauptzerfallskomponenten des Quercetins handelt, erscheint ein solcher Effekt durch Quercetin-Abbauprodukte aber eher unwahrscheinlich zu sein.

3 Einfluss des Quercetin-Glykosids Quercitrin auf die Barrierefunktion

Das Quercetin-Glykosid Quercitrin (Quercetin-3-rhamnosid) kommt unter anderem in Äpfeln, Sauerkirschen, Kiwis und Salat vor (Dawes and Keene 1999; DuPont et al., 2000; Nemeth et al., 2003; Wang et al., 1999). Aufgrund seiner weiten Verbreitung in der Natur wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss auch dieses Quercetin-Glykosids auf die Barrierefunktion der Caco-2-Zellen untersucht. Bisher konnten antioxidative, antiinflammatorische und antidiarrhöische Eigenschaften des Quercetin-Glykosids nachgewiesen werden (Camuesco et al., 2004; Comalada et al., 2005; Galvez et al., 1993; Galvez et al., 1995; Sanchez de Medina et al., 1996; Sanchez de Medina et al., 2002; Wagner et al., 2006).

Auch die beidseitige Applikation von 200 μM Quercitrin bewirkte nach 24 h Inkubation einen R^t -Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach weiteren 24 h wurde dieser Effekt verstärkt und persistierte bis zum Versuchsende der dreitägigen Inkubation bei etwa 130 % des Ausgangswiderstands.

Der Transport und die Metabolisierung verschiedener Quercetin-Glykoside kann im Caco-2-Epithel sehr unterschiedlich ausfallen. Sie werden im Vergleich zum Aglykon eher schlecht resorbiert und metabolisiert (Murota et al., 2000; Walgren et al., 1998). Insbesondere der Zuckerrest von Quercitrin wird im Gegensatz zu anderen Glykosiden kaum oder nur schwer hydrolysiert, so dass nur geringe Mengen des Aglykons freigesetzt werden (Arts et al., 2004; Browning et al., 2005; Day et al., 1998; Nemeth et al., 2003). Quercitrin kann allerdings bakteriell hydrolysiert werden, was aber in unserem keimfreien Testsystem keine Rolle spielen dürfte (Bokkenheuser et al., 1987). Daher kommt als Wirkmechanismus des Quercitrins am ehesten eine langsame Deglykolisierung an oder in der Epithelzelle in Frage, in deren Folge das Aglykon als wirksame Substanz frei wird. Andererseits könnte auch das Quercitrin selbst den R^t -Anstieg verursachen, möglicherweise aufgrund einer geringen Resorption allerdings erst nach einer signifikanten zeitlichen Verzögerung.

4 Einfluss von Quercetin auf die Apoptose

Neben den Eigenschaften der TJ führt auch eine erhöhte Apoptose-Rate zur Steigerung der epithelialen Permeabilität. Eine Induktion apoptotischer Prozesses (z.B. durch Camptothecin) führt zu einem R^t -Abfall in der Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29/B6 und zu einem Anstieg der epithelialen Leitfähigkeit (Bojarski et al., 2000). Mit Hilfe der Conductance Scanning-Technik konnte gezeigt werden, dass die Leitfähigkeit im Bereich einer Apoptose-Rosette im Vergleich zu nicht-apoptotischen Bereichen im Epithel deutlich erhöht ist (Bojarski et al., 2001). Der Anteil apoptotischer Zellen in einem Epithel beeinflusst somit seine Dichtigkeit.

Quercetin besitzt proapoptotische Eigenschaften, wodurch unter anderem seine antikarzinogene Wirkung begründet wird (Csokay et al., 1997; Nguyen et al., 2004; Orzechowski et al., 2000; Shen et al., 2003; Zhang et al., 2005). In niedrigen Konzentrationen je nach Zelllinie von etwa 1 bis 40 μM wurden darüber hinaus ebenfalls proliferative Effekte des Flavonols beschrieben (van der Woude et al., 2003).

Für die Analyse des Quercetin-Effekts auf die Apoptose-Rate in Caco-2-Zellen wurde der Anteil apoptotischer Zellen zum einen fluoreszenzoptisch im Mikroskop mittels TUNEL-Färbung und zum anderen durch Expressionsanalysen des PARP-Moleküls bestimmt. Poly-ADP-Ribose Polymerase - kurz PARP - ist ein Enzym, welches eine Rolle bei der DNA-Reparatur spielt und im Apoptose-Prozess als Substrat für die Caspase-3 dient (Simbulan-Rosenthal et al., 1999). Eine Aktivierung der Caspase-3 leitet die Apoptose ein. Quercetin ist dabei in der Lage, dieses Enzym zu stimulieren (Wenzel et al., 2004).

In dem hier angewandten Testsystem besaßen 200 μM Quercetin nach einer Inkubationszeit von 24 h keinen Einfluss auf die Apoptose-Rate der Caco-2-Zellen. Die TUNEL-Färbungen ergaben Werte von etwa 1 % Apoptosen in der Kontroll- und Quercetin-Gruppe. In den Expressionsanalysen des PARP-Moleküls konnten apoptotische Ereignisse durch 1 μM Staurosporin induziert werden (Bojarski et al., 2001), wobei diese Proben als Positivkontrollen dienten. Die 116 kDa-großen PARP-Moleküle wurden im Gegensatz zur Kontrollgruppe partiell gespalten, so dass ein 85 kDa-großes Spaltprodukt entstand. Zwischen der PARP-Expression in der Kontroll- und Quercetin-Gruppe waren allerdings keine Unterschiede erkennbar.

Das Flavonoid besaß somit innerhalb des Untersuchungszeitraums von 24 h keinen Einfluss auf die Apoptose-Rate an Caco-2-Zellen. Die durch Quercetin-induzierte R^t -Erhöhung lässt sich daher nicht durch eine veränderte Apoptose-Rate erklären. Die Ergebnisse stehen dabei im Widerspruch zu bisher veröffentlichten Quercetin-Daten. Wenzel et al. (2004) zeigten, dass durch 150 μ M Quercetin an Caco-2-Zellen Apoptosen induziert werden können. Der Effekt des Flavonoids wurde allerdings an subkonfluenten Zellen untersucht, die sich noch in aktiver Zellproliferation befanden. Apoptose-Induktion würde auch zu einem R^t -Abfall führen und zwar infolge der dadurch entstehenden „Leaks“, die aus dem Herauslösen der Zellen aus dem Epithelverband resultieren (Bojarski et al., 2000). Da Quercetin hingegen zu einem R^t -Anstieg führt, scheint seine proapoptotische Wirkung hierbei lediglich eine untergeordnete Rolle zu spielen.

5 Schlussfolgerung

Flavonoide kommen in vielen Obst- und Gemüsesorten vor und besitzen vielfältige biologische Eigenschaften, die sich positiv auf die Prävention chronischer Erkrankungen auswirken können. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Flavonoiden auf die Funktion des Darmepithels untersucht und die Hypothese geprüft, ob Flavonoide im direkten Kontakt mit zellulären Kompartimenten des Enterozyten wirken können.

Es wurde hier erstmals gezeigt, dass Flavonoide die intestinale Barrierefunktion verstärken. Da diese Untersuchungen zum jetzigen Zeitpunkt erst an einem intestinalen Zellkultur-Modell durchgeführt wurden, sind weitere Untersuchungen erforderlich, um die Wirkprinzipien in anderen Testsystemen genauer zu charakterisieren. Ein naheliegender experimenteller Ansatz wäre es, den Effekt von Flavonoiden an *ex vivo* / *in vitro*-Darmabschnitten von Nagetieren mit der Ussing-Technik zu untersuchen. In dieser Anordnung können auch Entzündungsprozesse durch *in vitro*-Gabe von inflammatorischen Zytokinen ausgelöst werden.

Als Fernziel wäre ein direkter therapeutischer Einsatz durch Supplementierung von Flavonoiden denkbar, insbesondere bei Erkrankungen, die mit einer Störung der intestinalen Barrierefunktion einhergehen, wie z.B. die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa.

E Zusammenfassung

Flavonoide besitzen vielfältige biologische Eigenschaften, die sich positiv auf die Prävention chronischer Erkrankungen auswirken können. Von besonderem Interesse ist der Einfluss von Flavonoiden auf die Funktion des Darmepithels, da hier Digestion und Resorption von Nahrungsinhaltsstoffen stattfinden und Effekte durch den direkten Kontakt des Wirkstoffs mit den zellulären Kompartimenten des Enterozyten ausgelöst werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Flavonoids Quercetin auf die epitheliale Barrierefunktion des Darms am Beispiel der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie Caco-2 analysiert. Auf permeablen Zellträgern differenzieren sie zu einem dichten Epithel mit einem mukosalen und einem serosalen Kompartiment aus, dessen Barriere durch die Messung des transepithelialen Widerstands charakterisiert werden kann. Es zeigte sich hierbei, dass Quercetin eine konzentrationsabhängige Erhöhung des transepithelialen Widerstands verursacht, wobei mit einer Konzentration von 200 μM unter serumhaltigen Kultivierungsbedingungen der stärkste Effekt hervorgerufen wurde, der für mindestens 48 h persistierte. Die Wirkung des Flavonols war dabei unabhängig vom Zugabekompartiment. Der Wirkungsverlust, welcher nach nur einmaliger Quercetin-Zugabe nach 72 h zu verzeichnen war, konnte durch wiederholte Applikation der Testsubstanz nach jeweils 24 h verhindert werden und war somit am ehesten auf seine Metabolisierung zurückzuführen. Der Serumgehalt im Zellkulturmedium besaß einen Einfluss auf die wirksame Quercetin-Konzentration, so dass 50 μM des Flavonols in serumfreiem Medium einen ähnlichen Effekt auf den transepithelialen Widerstand hervorrief wie 200 μM unter serumhaltigen Kultivierungsbedingungen.

Eine Veränderung der Barriereigenschaften kann über Zell-Zell-Kontakte wie die epitheliale Tight Junction, welche den parazellulären Spalt abdichtet, sowie über Einflüsse auf die Rate apoptotischer Zellen im Epithel erfolgen. Untersuchungen der Apoptose-Rate durch TUNEL-Färbung und die Expressionsbestimmung der Poly-ADP-Ribose Polymerase ergaben, dass das Flavonoid keinen Einfluss auf den programmierten Zelltod der Caco-2-Zellen besaß. Western Blot-Analysen der Tight Junction-Proteine Occludin, Claudin-1, Claudin-3, Claudin-4 und Claudin-7 zeigten insbesondere eine erhöhte Expression

des abdichtenden Claudin-4 nach Quercetin-Exposition. Des Weiteren konnte eine erhöhte mRNA-Expression von Claudin-4 mit Hilfe quantitativer RT-PCR nachgewiesen werden. Eine verstärkte Transkription konnte durch eine Aktivierung des Claudin-4-Promotors in Luciferase-Reporter-Gen-Assays nach Quercetin-Exposition belegt werden.

Immunfluoreszenz-Analysen am konfokalen Laserscanning-Mikroskop zeigten in der semiquantitativen Beurteilung verstärkte Claudin-4-Signale im Vergleich zur Kontrolle. Diese waren sowohl vermehrt in den Tight Junction-Strands als auch subjunctional und intrazellulär lokalisiert. Die junctionale Lokalisation der TJ-Proteine Occludin, Claudin-1, Claudin-3 und Claudin-7 blieb dabei unverändert.

Prinzipiell kann der durch Quercetin induzierte Widerstandsanstieg entweder durch eine Abdichtung des parazellulären Wegs oder durch eine veränderte Ionen-Permeabilität der Tight Junction vermittelt sein. Radioaktive Tracerflux-Analysen zeigten, dass die Mannitol-Permeabilität als Marker für die Weite des Interzellularraums durch Quercetin nicht beeinflusst wurde. Die unidirektionalen Fluxes von Na^+ und Cl^- waren hingegen unter Quercetin-Einfluss reduziert. Das Flavonol erhöhte somit den transepithelialen Widerstand des Caco-2-Epithels durch eine Überexpression des abdichtenden Tight Junction-Proteins Claudin-4, welche mit einer veränderten Ionen-Permeabilität einherging.

Zelluläre Signalmechanismen wurden mit Hilfe von Inhibitoren analysiert. Der Effekt von Quercetin konnte durch die Blocker Staurosporin und H7 inhibiert werden. Dass ein spezifischer Proteinkinase C-Blocker (GF109203X) ebenfalls einen Widerstandsanstieg verursachte, deutet auf eine Proteinkinase C-abhängige TJ-Regulation hin. Eine durch Quercetin induzierte Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels oder die Aktivierung der Myosin Light Chain Kinase (MLCK) konnten durch Verwendung eines Ca^{2+} -Chelators bzw. eines spezifischen MLCK-Inhibitors eher ausgeschlossen werden.

Quercetin kommt in der Natur vorwiegend in glykosidisch-gebundener Form vor, so dass darüber hinaus der Effekt von Quercitrin (Quercetin-3-rhamnosid) als Modell für ein Quercetin-Glykosid untersucht wurde. Auch Quercitrin bewirkte unter serumfreien Kultivierungsbedingungen eine Erhöhung des transepithelialen Widerstands am Caco-2-Epithel. Dieser Effekt konnte jedoch erst mit einer Verzögerung von 20 h nachgewiesen werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt, in welcher Weise Flavonoide die intestinale Barrierefunktion positiv beeinflussen können. Da es sich hierbei um ein Zellkultur-Modell handelt, sind weitere experimentelle Untersuchungen notwendig, um die Wirkprinzipien in verschiedenen experimentellen Systemen noch genauer zu charakterisieren. Denkbar wäre ein direkter therapeutischer Einsatz von Flavonoiden insbesondere bei Erkrankungen mit einem Defekt der Darm-Barrierefunktion, wie z.B. bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa.

F Literatur

- Abou-Agag L.H., M.L. Aikens, E.M. Tabengwa, R.L. Benza, S.R. Shows, H.E. Grenett and F.M. Booyse (2001) Polyphenolics increase t-PA and u-PA gene transcription in cultured human endothelial cells. *Alcohol Clin Exp Res* 25: 155-62
- Aeschbacher H.U., H. Meier and E. Ruch (1982) Nonmutagenicity in vivo of the food flavonol quercetin. *Nutr Cancer* 4: 90-8
- Agullo G., L. Gamet, C. Besson, C. Demigne and C. Remesy (1994) Quercetin exerts a preferential cytotoxic effect on active dividing colon carcinoma HT29 and Caco-2 cells. *Cancer Lett* 87: 55-63
- Agullo G., L. Gamet-Payrastre, Y. Fernandez, N. Anciaux, C. Demigne and C. Remesy (1996) Comparative effects of flavonoids on the growth, viability and metabolism of a colonic adenocarcinoma cell line (HT29 cells). *Cancer Lett* 105: 61-70
- Alexandre M.D., Q. Lu and Y.H. Chen (2005) Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl⁻ conductance and increases the paracellular Na⁺ conductance in LLC-PK1 cells. *J Cell Sci* 118: 2683-93
- Amasheh S., N. Meiri, A.H. Gitter, T. Schoneberg, J. Mankertz, J.D. Schulzke and M. Fromm (2002) Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci* 115: 4969-76
- Amasheh S., T. Schmidt, M. Mahn, P. Florian, J. Mankertz, S. Tavalali, A.H. Gitter, J.D. Schulzke and M. Fromm (2005) Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell Tissue Res* 321: 89-96
- Anderberg E.K., C. Nystrom and P. Artursson (1992) Epithelial transport of drugs in cell culture. VII: Effects of pharmaceutical surfactant excipients and bile acids on transepithelial permeability in monolayers of human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J Pharm Sci* 81: 879-87
- Anderson J.M. (2001) Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol Sci* 16: 126-30
- Ando-Akatsuka Y., M. Saitou, T. Hirase, M. Kishi, A. Sakakibara, M. Itoh, S. Yonemura, M. Furuse and S. Tsukita (1996) Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. *J Cell Biol* 133: 43-7
- Angelow S., P. Zeni, B. Hohn and H.J. Galla (2005) Phorbol ester induced short- and long-term permeabilization of the blood-CSF barrier in vitro. *Brain Res* 1063: 168-79
- Aoi W., N. Niisato, H. Miyazaki and Y. Marunaka (2004) Flavonoid-induced reduction of ENaC expression in the kidney of Dahl salt-sensitive hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun* 315: 892-6
- Arts I.C., A.L. Sesink, M. Faassen-Peters and P.C. Hollman (2004) The type of sugar moiety is a major determinant of the small intestinal uptake and subsequent biliary excretion of dietary quercetin glycosides. *Br J Nutr* 91: 841-7
- Aziz A.A., C.A. Edwards, M.E. Lean and A. Crozier (1998) Absorption and excretion of conjugated flavonols, including quercetin-4'-O-beta-glucoside and isorhamnetin-4'-O-beta-glucoside by human volunteers after the consumption of onions. *Free Radic Res* 29: 257-69

- Balda M.S., L. Gonzalez-Mariscal, R.G. Contreras, M. Macias-Silva, M.E. Torres-Marquez, J.A. Garcia-Sainz and M. Cerejido (1991) Assembly and sealing of tight junctions: possible participation of G-proteins, phospholipase C, protein kinase C and calmodulin. *J Membr Biol* 122: 193-202
- Balda M.S., J.A. Whitney, C. Flores, S. Gonzalez, M. Cerejido and K. Matter (1996) Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol* 134: 1031-49
- Banan A., L.J. Zhang, M. Shaikh, J.Z. Fields, S. Choudhary, C.B. Forsyth, A. Farhadi and A. Keshavarzian (2005) *theta* Isoform of protein kinase C alters barrier function in intestinal epithelium through modulation of distinct claudin isotypes: a novel mechanism for regulation of permeability. *J Pharmacol Exp Ther* 313: 962-82
- Bazzoni G. (2003) The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 15: 525-30
- Bazzoni G., O.M. Martinez-Estrada, F. Mueller, P. Nelboeck, G. Schmid, T. Bartfai, E. Dejana and M. Brockhaus (2000) Homophilic interaction of junctional adhesion molecule. *J Biol Chem* 275: 30970-6
- Bjeldanes L.F. and G.W. Chang (1977) Mutagenic activity of quercetin and related compounds. *Science* 197: 577-8
- Blanchard A., X. Jeunemaitre, P. Coudol, M. Dechaux, M. Froissart, A. May, R. Demontis, A. Fournier, M. Paillard and P. Houillier (2001) Paracellin-1 is critical for magnesium and calcium reabsorption in the human thick ascending limb of Henle. *Kidney Int* 59: 2206-15
- Bojarski C., K. Bendfeldt, A.H. Gitter, J. Mankertz, M. Fromm, S. Wagner, E.O. Riecken and J.D. Schulzke (2000) Apoptosis and intestinal barrier function. *Ann N Y Acad Sci* 915: 270-4
- Bojarski C., A.H. Gitter, K. Bendfeldt, J. Mankertz, H. Schmitz, S. Wagner, M. Fromm and J.D. Schulzke (2001) Permeability of human HT-29/B6 colonic epithelium as a function of apoptosis. *J Physiol* 535: 541-52
- Bokkenheuser V.D., C.H. Shackleton and J. Winter (1987) Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal Bacteroides from humans. *Biochem J* 248: 953-6
- Boulenc X., M. Bourrie, I. Fabre, C. Roque, H. Joyeux, Y. Berger and G. Fabre (1992) Regulation of cytochrome P450IA1 gene expression in a human intestinal cell line, Caco-2. *J Pharmacol Exp Ther* 263: 1471-8
- Boulton D.W., U.K. Walle and T. Walle (1999) Fate of the flavonoid quercetin in human cell lines: chemical instability and metabolism. *J Pharm Pharmacol* 51: 353-9
- Bradshaw D., C.H. Hill, J.S. Nixon and S.E. Wilkinson (1993) Therapeutic potential of protein kinase C inhibitors. *Agents Actions* 38: 135-47
- Browning A.M., U.K. Walle and T. Walle (2005) Flavonoid glycosides inhibit oral cancer cell proliferation--role of cellular uptake and hydrolysis to the aglycones. *J Pharm Pharmacol* 57: 1037-42
- Bruewer M., A. Luegering, T. Kucharzik, C.A. Parkos, J.L. Madara, A.M. Hopkins and A. Nusrat (2003) Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol* 171: 6164-72
- Camuesco D., M. Comalada, M.E. Rodriguez-Cabezas, A. Nieto, M.D. Lorente, A. Concha, A. Zarzuelo and J. Galvez (2004) The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *Br J Pharmacol* 143: 908-18
- Carver J.H., A.V. Carrano and J.T. MacGregor (1983) Genetic effects of the flavonols quercetin, kaempferol, and galangin on Chinese hamster ovary cells in vitro. *Mutat Res* 113: 45-60

- Cermak R., U. Follmer and S. Wolfram (1998) Dietary flavonol quercetin induces chloride secretion in rat colon. *Am J Physiol* 275: G1166-72
- Chantret I., A. Barbat, E. Dussaulx, M.G. Brattain and A. Zweibaum (1988) Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res* 48: 1936-42
- Chebabo S.R., M.A. Hester, J. Jing, P.G. Aitken and G.G. Somjen (1995) Interstitial space, electrical resistance and ion concentrations during hypotonia of rat hippocampal slices. *J Physiol* 487: 685-97
- Cho S.Y., S.J. Park, M.J. Kwon, T.S. Jeong, S.H. Bok, W.Y. Choi, W.I. Jeong, S.Y. Ryu, S.H. Do, C.S. Lee, J.C. Song and K.S. Jeong (2003) Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF- κ B pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. *Mol Cell Biochem* 243: 153-60
- Chung N.P., D. Mruk, M.Y. Mo, W.M. Lee and C.Y. Cheng (2001) A 22-amino acid synthetic peptide corresponding to the second extracellular loop of rat occludin perturbs the blood-testis barrier and disrupts spermatogenesis reversibly in vivo. *Biol Reprod* 65: 1340-51
- Citi S. and M. Cordenonsi (1998) Tight junction proteins. *Biochim Biophys Acta* 1448: 1-11
- Comalada M., D. Camuesco, S. Sierra, I. Ballester, J. Xaus, J. Galvez and A. Zarzuelo (2005) In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF- κ B pathway. *Eur J Immunol* 35: 584-92
- Condrescu M., B.M. Hantash, Y. Fang and J.P. Reeves (1999) Mode-specific inhibition of sodium-calcium exchange during protein phosphatase blockade. *J Biol Chem* 274: 33279-86
- Crespy V., C. Morand, C. Manach, C. Besson, C. Demigne and C. Remesy (1999) Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am J Physiol* 277: G120-6
- Csokay B., N. Prajda, G. Weber and E. Olah (1997) Molecular mechanisms in the antiproliferative action of quercetin. *Life Sci* 60: 2157-63
- Dawes H.M. and J.B. Keene (1999) Phenolic composition of kiwifruit juice. *J Agric Food Chem* 47: 2398-403
- Day A.J., M.S. DuPont, S. Ridley, M. Rhodes, M.J. Rhodes, M.R. Morgan and G. Williamson (1998) Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. *FEBS Lett* 436: 71-5
- Day A.J., F.J. Canada, J.C. Diaz, P.A. Kroon, R. McLauchlan, C.B. Faulds, G.W. Plumb, M.R. Morgan and G. Williamson (2000) Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett* 468: 166-70
- Day A.J., J.M. Gee, M.S. DuPont, I.T. Johnson and G. Williamson (2003) Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochem Pharmacol* 65: 1199-206
- Delie F. and W. Rubas (1997) A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 14: 221-86
- Deschner E.E., J. Ruperto, G. Wong and H.L. Newmark (1991) Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis* 12: 1193-6
- Dihal A.A., R.A. Woutersen, B. van Ommen, I.M. Rietjens and R.H. Stierum (2006) Modulatory effects of quercetin on proliferation and differentiation of the human colorectal cell line Caco-2. *Cancer Lett* 238: 248-59

- Dodane V. and B. Kachar (1996) Identification of isoforms of G proteins and PKC that colocalize with tight junctions. *J Membr Biol* 149: 199-209
- Droillard M.J., J. Guclu, J.P. Le Caer, Y. Mathieu, J. Guern and C. Lauriere (1997) Identification of calreticulin-like protein as one of the phosphoproteins modulated in response to oligogalacturonides in tobacco cells. *Planta* 202: 341-8
- Dunnick J.K. and J.R. Hailey (1992) Toxicity and carcinogenicity studies of quercetin, a natural component of foods. *Fundam Appl Toxicol* 19: 423-31
- DuPont M.S., Z. Mondin, G. Williamson and K.R. Price (2000) Effect of variety, processing, and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. *J Agric Food Chem* 48: 3957-64
- Escaffit F., F. Boudreau and J.F. Beaulieu (2005) Differential expression of claudin-2 along the human intestine: Implication of GATA-4 in the maintenance of claudin-2 in differentiating cells. *J Cell Physiol* 203: 15-26
- Fanning A.S., L.L. Mitic and J.M. Anderson (1999) Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J Am Soc Nephrol* 10: 1337-45
- Ferriola P.C., V. Cody and E. Middleton, Jr. (1989) Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* 38: 1617-24
- Fromm M. (2004) Transport in Membranen und Epithelien. In *Physiologie des Menschen. R.F. Schmidt, F. Lang and G. Thews, Springer Berlin Heidelberg New York* 29. Auflage, Kapitel 3
- Fromm M., U. Hegel and Wiederholt (1994) Epithelien. In *Pathophysiologie des Menschen. K. Hierholzer and R.F. Schmidt, Weinheim, Verlag Chemie* 5.1-5.19
- Furuse M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura and S. Tsukita (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123: 1777-88
- Furuse M., M. Itoh, T. Hirase, A. Nagafuchi, S. Yonemura and S. Tsukita (1994) Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol* 127: 1617-26
- Furuse M., H. Sasaki, K. Fujimoto and S. Tsukita (1998) A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* 143: 391-401
- Furuse M., M. Hata, K. Furuse, Y. Yoshida, A. Haratake, Y. Sugitani, T. Noda, A. Kubo and S. Tsukita (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
- Galvez J., M.E. Crespo, J. Jimenez, A. Suarez and A. Zarzuelo (1993) Antidiarrhoeic activity of quercitrin in mice and rats. *J Pharm Pharmacol* 45: 157-9
- Galvez J., F. Sanchez de Medina, J. Jimenez, M.I. Torres, M.I. Fernandez, M.C. Nunez, A. Rios, A. Gil and A. Zarzuelo (1995) Effect of quercitrin on lactose-induced chronic diarrhoea in rats. *Planta Med* 61: 302-6
- Gee J.M., H. Hara and I.T. Johnson (2002) Suppression of intestinal crypt cell proliferation and aberrant crypt foci by dietary quercetin in rats. *Nutr Cancer* 43: 193-201
- Gitter A.H., K. Bendfeldt, H. Schmitz, J.D. Schulzke, C.J. Bentzel and M. Fromm (2000a) Epithelial barrier defects in HT-29/B6 colonic cell monolayers induced by tumor necrosis factor- α . *Ann N Y Acad Sci* 915: 193-203
- Gitter A.H., K. Bendfeldt, J.D. Schulzke and M. Fromm (2000b) Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF- α -induced single-cell apoptosis. *FASEB J* 14: 1749-53

- Grasset E., J. Bernabeu and M. Pinto (1985) Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: effect of secretagogues. *Am J Physiol* 248: C410-8
- Gugler R., M. Leschik and H.J. Dengler (1975) Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. *Eur J Clin Pharmacol* 9: 229-34
- Haskins J., L. Gu, E.S. Wittchen, J. Hibbard and B.R. Stevenson (1998) ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol* 141: 199-208
- Hayek T., B. Fuhrman, J. Vaya, M. Rosenblat, P. Belinky, R. Coleman, A. Elis and M. Aviram (1997) Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 2744-52
- Hecht G., C. Pothoulakis, J.T. LaMont and J.L. Madara (1988) Clostridium difficile toxin A perturbs cytoskeletal structure and tight junction permeability of cultured human intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 82: 1516-24
- Hecht G., A. Koutsouris, C. Pothoulakis, J.T. LaMont and J.L. Madara (1992) Clostridium difficile toxin B disrupts the barrier function of T84 monolayers. *Gastroenterology* 102: 416-23
- Hecht G., B. Robinson and A. Koutsouris (1994) Reversible disassembly of an intestinal epithelial monolayer by prolonged exposure to phorbol ester. *Am J Physiol* 266: G214-21
- Hertog M.G., Hollman and Katan (1992) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem* 40: 2379-83
- Hertog M.G., P.C. Hollman, M.B. Katan and D. Kromhout (1993) Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer* 20: 21-9
- Hertog M.G., D. Kromhout, C. Aravanis, H. Blackburn, R. Buzina, F. Fidanza, S. Giampaoli, A. Jansen, A. Menotti, S. Nedeljkovic and et al. (1995) Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 155: 381-6
- Hidaka H., M. Inagaki, S. Kawamoto and Y. Sasaki (1984) Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry* 23: 5036-41
- Hidalgo I.J., T.J. Raub and R.T. Borchardt (1989) Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96: 736-49
- Hirono I., I. Ueno, S. Hosaka, H. Takanashi, T. Matsushima, T. Sugimura and S. Natori (1981) Carcinogenicity examination of quercetin and rutin in ACI rats. *Cancer Lett* 13: 15-21
- Hollman P.C., J.H. de Vries, S.D. van Leeuwen, M.J. Mengelers and M.B. Katan (1995) Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr* 62: 1276-82
- Hollman P.C., J.M. van Trijp, M.J. Mengelers, J.H. de Vries and M.B. Katan (1997) Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. *Cancer Lett* 114: 139-40
- Hollman P.C. and M.B. Katan (1999) Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol* 37: 937-42
- Honda H., M.J. Pazin, H. Ji, R.P. Wernyj and P.J. Morin (2006) Crucial roles of Sp1 and epigenetic modifications in the regulation of the CLDN4 promoter in ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 281: 21433-44

- Ikenouchi J., M. Furuse, K. Furuse, H. Sasaki and S. Tsukita (2005) Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 171: 939-45
- Inai T., J. Kobayashi and Y. Shibata (1999) Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. *Eur J Cell Biol* 78: 849-55
- Inai T., A. Sengoku, X. Guan, E. Hirose, H. Iida and Y. Shibata (2005) Heterogeneity in expression and subcellular localization of tight junction proteins, claudin-10 and -15, examined by RT-PCR and immunofluorescence microscopy. *Arch Histol Cytol* 68: 349-60
- Ioku K., T. Tsushida, Y. Takei, N. Nakatani and J. Terao (1995) Antioxidative activity of quercetin and quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* 1234: 99-104
- Ioku K., Y. Pongpiriyadacha, Y. Konishi, Y. Takei, N. Nakatani and J. Terao (1998) *beta*-Glucosidase activity in the rat small intestine toward quercetin monoglucosides. *Biosci Biotechnol Biochem* 62: 1428-31
- Ioku K., Y. Aoyama, A. Tokuno, J. Terao, N. Nakatani and Y. Takei (2001) Various cooking methods and the flavonoid content in onion. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 47: 78-83
- Ito N., A. Hagiwara, S. Tamano, M. Kagawa, M. Shibata, Y. Kurata and S. Fukushima (1989) Lack of carcinogenicity of quercetin in F344/DuCrj rats. *Jpn J Cancer Res* 80: 317-25
- Itoh M., M. Furuse, K. Morita, K. Kubota, M. Saitou and S. Tsukita (1999) Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 147: 1351-63
- Jones B.A. and G.J. Gores (1997) Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas, and intestine. *Am J Physiol* 273: G1174-88
- Jones E. and R.E. Hughes (1982) Quercetin, flavonoids and the life-span of mice. *Exp Gerontol* 17: 213-7
- Kausalya P.J., S. Amasheh, D. Gunzel, H. Wurps, D. Muller, M. Fromm and W. Hunziker (2006) Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg²⁺ transport function of Claudin-16. *J Clin Invest* 116: 878-91
- Kitson T.M. (2004) Spectrophotometric and kinetic studies on the binding of the bioflavonoid quercetin to bovine serum albumin. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 2165-70
- Kiuchi-Saishin Y., S. Gotoh, M. Furuse, A. Takasuga, Y. Tano and S. Tsukita (2002) Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol* 13: 875-86
- Krärup T., L.D. Jakobsen, B.S. Jensen and E.K. Hoffmann (1998) Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport in Ehrlich cells: regulation by protein phosphatases and kinases. *Am J Physiol* 275: C239-50
- Kreusel K.M., M. Fromm, J.D. Schulzke and U. Hegel (1991) Cl⁻ secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6). *Am J Physiol* 261: C574-82
- Kuhnau J. (1976) The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 24: 117-91
- Kuo S.M. (1996) Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Lett* 110: 41-8
- Kuo S.M., H.F. Morehouse, Jr. and C.P. Lin (1997) Effect of antiproliferative flavonoids on ascorbic acid accumulation in human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Lett* 116: 131-7

- Lampen A., A. Bader, T. Bestmann, M. Winkler, L. Witte and J.T. Borlak (1998) Catalytic activities, protein- and mRNA-expression of cytochrome P450 isoenzymes in intestinal cell lines. *Xenobiotica* 28: 429-41
- Lang M.A., J. Muller, A.S. Preston and J.S. Handler (1986) Complete response to vasopressin requires epithelial organization in A6 cells in culture. *Am J Physiol* 250: C138-45
- Larsson L.-I. (2006) Cytology. In *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology*. B. L. Frappler, J. Eurell and H.-D. Dellmann. Blackwell Publishing chapter 1: 15-16
- Lautier D., Y. Canitrot, R.G. Deeley and S.P. Cole (1996) Multidrug resistance mediated by the multidrug resistance protein (MRP) gene. *Biochem Pharmacol* 52: 967-77
- Le Moellic C., S. Boulkroun, D. Gonzalez-Nunez, I. Dublineau, F. Cluzeaud, M. Fay, M. Blot-Chaubaud and N. Farman (2005) Aldosterone and tight junctions: modulation of claudin-4 phosphorylation in renal collecting duct cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C1513-21
- Liu Y., A. Nusrat, F.J. Schnell, T.A. Reaves, S. Walsh, M. Pochet and C.A. Parkos (2000) Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci* 113: 2363-74
- MacGregor J.T., C.M. Wehr, G.D. Manners, L. Jurd, J.L. Minkler and A.V. Carrano (1983) In vivo exposure to plant flavonols. Influence on frequencies of micronuclei in mouse erythrocytes and sister-chromatid exchange in rabbit lymphocytes. *Mutat Res* 124: 255-70
- Madara J.L. (1987) Intestinal absorptive cell tight junctions are linked to cytoskeleton. *Am J Physiol* 253: C171-5
- Madara J.L. and J.R. Pappenheimer (1987) Structural basis for physiological regulation of paracellular pathways in intestinal epithelia. *J Membr Biol* 100: 149-64
- Madara J.L. and J. Stafford (1989) Interferon-*gamma* directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 83: 724-7
- Madara J.L., R. Moore and S. Carlson (1987) Alteration of intestinal tight junction structure and permeability by cytoskeletal contraction. *Am J Physiol* 253: C854-61
- Mahraoui L., A. Rodolosse, A. Barbat, E. Dussaulx, A. Zweibaum, M. Rousset and E. Brot-Laroche (1994) Presence and differential expression of SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT3 and GLUT5 hexose-transporter mRNAs in Caco-2 cell clones in relation to cell growth and glucose consumption. *Biochem J* 298: 629-33
- Makishima M., Y. Honma, M. Hozumi, K. Sampi, M. Hattori and K. Motoyoshi (1991) Induction of differentiation of human leukemia cells by inhibitors of myosin light chain kinase. *FEBS Lett* 287: 175-7
- Makris D.P. and J.T. Rossiter (2001) Comparison of quercetin and a non-orthohydroxy flavonol as antioxidants by competing in vitro oxidation reactions. *J Agric Food Chem* 49: 3370-7
- Manach C., C. Morand, C. Demigne, O. Texier, F. Regeat and C. Remesy (1997) Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Lett* 409: 12-6
- Mankertz J., J.S. Waller, B. Hillenbrand, S. Tavalali, P. Florian, T. Schoneberg, M. Fromm and J.D. Schulzke (2002) Gene expression of the tight junction protein occludin includes differential splicing and alternative promoter usage. *Biochem Biophys Res Commun* 298: 657-66
- Marano C.W., L.A. Garulacan, N. Ginanni and J.M. Mullin (2001) Phorbol ester treatment increases paracellular permeability across IEC-18 gastrointestinal epithelium in vitro. *Dig Dis Sci* 46: 1490-9

- Martin-Padura I., S. Lostaglio, M. Schneemann, L. Williams, M. Romano, P. Fruscella, C. Panzeri, A. Stoppacciaro, L. Ruco, A. Villa, D. Simmons and E. Dejana (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
- Maruta A., K. Enaka and M. Umeda (1979) Mutagenicity of quercetin and kaempferol on cultured mammalian cells. *Gann* 70: 273-6
- Matsukawa Y., H. Nishino, Y. Okuyama, T. Matsui, T. Matsumoto, S. Matsumura, Y. Shimizu, Y. Sowa and T. Sakai (1997) Effects of quercetin and/or restraint stress on formation of aberrant crypt foci induced by azoxymethane in rat colons. *Oncology* 54: 118-21
- Matter K. and M.S. Balda (2003) Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 225-36
- McCarthy K.M., I.B. Skare, M.C. Stankewich, M. Furuse, S. Tsukita, R.A. Rogers, R.D. Lynch and E.E. Schneeberger (1996) Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci* 109: 2287-98
- McConkey D.J. (1998) Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett* 99: 157-68
- Medina R., C. Rahner, L.L. Mitic, J.M. Anderson and C.M. Van Itallie (2000) Occludin localization at the tight junction requires the second extracellular loop. *J Membr Biol* 178: 235-47
- Mesonero J., L. Mahraoui, M. Matosin, A. Rodolosse, M. Rousset and E. Brot-Laroche (1994) Expression of the hexose transporters GLUT1-GLUT5 and SGLT1 in clones of Caco-2 cells. *Biochem Soc Trans* 22: 681-4
- Mima S., S. Tsutsumi, H. Ushijima, M. Takeda, I. Fukuda, K. Yokomizo, K. Suzuki, K. Sano, T. Nakanishi, W. Tomisato, T. Tsuchiya and T. Mizushima (2005) Induction of claudin-4 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and its contribution to their chemopreventive effect. *Cancer Res* 65: 1868-76
- Mitic L.L., C.M. Van Itallie and J.M. Anderson (2000) Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G250-4
- Moon J.H., R. Nakata, S. Oshima, T. Inakuma and J. Terao (2000) Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after the short-term ingestion of onion by women. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R461-7
- Morikawa K., M. Nonaka, M. Narahara, I. Torii, K. Kawaguchi, T. Yoshikawa, Y. Kumazawa and S. Morikawa (2003) Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sci* 74: 709-21
- Morimoto S., N. Nishimura, T. Terai, S. Manabe, Y. Yamamoto, W. Shinahara, H. Miyake, S. Tashiro, M. Shimada and T. Sasaki (2005) Rab13 mediates the continuous endocytic recycling of occludin to the cell surface. *J Biol Chem* 280: 2220-8
- Morino K., N. Matsukara, T. Kawachi, H. Ohgaki, T. Sugimura and I. Hirono (1982) Carcinogenicity test of quercetin and rutin in golden hamsters by oral administration. *Carcinogenesis* 3: 93-7
- Morita K., H. Sasaki, M. Furuse and S. Tsukita (1999) Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol* 147: 185-94
- Morita K., H. Sasaki, K. Furuse, M. Furuse, S. Tsukita and Y. Miyachi (2003) Expression of claudin-5 in dermal vascular endothelia. *Exp Dermatol* 12: 289-95
- Murota K. and J. Terao (2003) Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch Biochem Biophys* 417: 12-7

- Murota K., S. Shimizu, H. Chujo, J.H. Moon and J. Terao (2000) Efficiency of absorption and metabolic conversion of quercetin and its glucosides in human intestinal cell line Caco-2. *Arch Biochem Biophys* 384: 391-7
- Mutoh M., M. Takahashi, K. Fukuda, H. Komatsu, T. Enya, Y. Matsushima-Hibiya, H. Mutoh, T. Sugimura and K. Wakabayashi (2000) Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationship. *Jpn J Cancer Res* 91: 686-91
- Myhrstad M.C., H. Carlsen, O. Nordstrom, R. Blomhoff and J.O. Moskaug (2002) Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the *gamma*-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic Biol Med* 32: 386-93
- Nakayasu M., H. Sakamoto, M. Terada, M. Nagao and T. Sugimura (1986) Mutagenicity of quercetin in Chinese hamster lung cells in culture. *Mutat Res* 174: 79-83
- Nemeth K., G.W. Plumb, J.G. Berrin, N. Juge, R. Jacob, H.Y. Naim, G. Williamson, D.M. Swallow and P.A. Kroon (2003) Deglycosylation by small intestinal epithelial cell *beta*-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr* 42: 29-42
- Nguyen T.T., E. Tran, T.H. Nguyen, P.T. Do, T.H. Huynh and H. Huynh (2004) The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. *Carcinogenesis* 25: 647-59
- Nusrat A., M. Giry, J.R. Turner, S.P. Colgan, C.A. Parkos, D. Carnes, E. Lemichez, P. Boquet and J.L. Madara (1995) Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10629-33
- Ophir I., E. Cohen and Y. Ben Shaul (1995) Apical polarity in human colon carcinoma cell lines. *Tissue Cell* 27: 659-66
- Orzechowski A., K. Grzelkowska, W. Zimowska, J. Skierski, T. Ploszaj, K. Bachanek, T. Motyl, W. Karlik and M. Filipecki (2000) Induction of apoptosis and NF-*kappa*B by quercetin in growing murine L1210 lymphocytic leukaemic cells potentiated by TNF-*alpha*. *Reprod Nutr Dev* 40: 441-65
- Paganga G. and C.A. Rice-Evans (1997) The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS Lett* 401: 78-82
- Palmeri D., A. van Zante, C.C. Huang, S. Hemmerich and S.D. Rosen (2000) Vascular endothelial junction-associated molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily, is localized to intercellular boundaries of endothelial cells. *J Biol Chem* 275: 19139-45
- Park J.B. and M. Levine (2000) Intracellular accumulation of ascorbic acid is inhibited by flavonoids via blocking of dehydroascorbic acid and ascorbic acid uptakes in HL-60, U937 and Jurkat cells. *J Nutr* 130: 1297-302
- Peet G.W. and J. Li (1999) *I*kappaB kinases *alpha* and *beta* show a random sequential kinetic mechanism and are inhibited by staurosporine and quercetin. *J Biol Chem* 274: 32655-61
- Pereira M.A., C.J. Grubbs, L.H. Barnes, H. Li, G.R. Olson, I. Eto, M. Juliana, L.M. Whitaker, G.J. Kelloff, V.E. Steele and R.A. Lubet (1996) Effects of the phytochemicals, curcumin and quercetin, upon azoxymethane-induced colon cancer and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary cancer in rats. *Carcinogenesis* 17: 1305-11
- Poritz L.S., K.I. Garver, A.F. Tilberg and W.A. Koltun (2004) Tumor necrosis factor *alpha* disrupts tight junction assembly. *J Surg Res* 116: 14-8
- Radloff M. and G. Gercken (1996) Protein kinase C activity and phosphoprotein pattern in stimulated alveolar macrophages. *Toxicol Lett* 88: 139-45

- Rahner C., L.L. Mitic and J.M. Anderson (2001) Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology* 120: 411-22
- Rousset M. (1986) The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 68: 1035-40
- Saito D., A. Shirai, T. Matsushima, T. Sugimura and I. Hirano (1980) Test of carcinogenicity of quercetin, a widely distributed mutagen in food. *Teratog Carcinog Mutagen* 1: 213-21
- Saitoh M., T. Ishikawa, S. Matsushima, M. Naka and H. Hidaka (1987) Selective inhibition of catalytic activity of smooth muscle myosin light chain kinase. *J Biol Chem* 262: 7796-801
- Saitou M., M. Furuse, H. Sasaki, J.D. Schulzke, M. Fromm, H. Takano, T. Noda and S. Tsukita (2000) Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 11: 4131-42
- Sanchez de Medina F., J. Galvez, J.A. Romero and A. Zarzuelo (1996) Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 278: 771-9
- Sanchez de Medina F., J. Galvez, M. Gonzalez, A. Zarzuelo and K.E. Barrett (1997) Effects of quercetin on epithelial chloride secretion. *Life Sci* 61: 2049-55
- Sanchez de Medina F., B. Vera, J. Galvez and A. Zarzuelo (2002) Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. *Life Sci* 70: 3097-108
- Sanger F., S. Nicklen and A.R. Coulson (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-7
- Schmitz H., M. Fromm, C.J. Bentzel, P. Scholz, K. Detjen, J. Mankertz, H. Bode, H.J. Epple, E.O. Riecken and J.D. Schulzke (1999) Tumor necrosis factor- α (TNF α) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci* 112: 137-46
- Schulzke J.D., A.H. Gitter, J. Mankertz, S. Spiegel, U. Seidler, S. Amasheh, M. Saitou, S. Tsukita and M. Fromm (2005) Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim Biophys Acta* 1669: 34-42
- Shen S.C., Y.C. Chen, F.L. Hsu and W.R. Lee (2003) Differential apoptosis-inducing effect of quercetin and its glycosides in human promyeloleukemic HL-60 cells by alternative activation of the caspase 3 cascade. *J Cell Biochem* 89: 1044-55
- Sielecki T.M., J.F. Boylan, P.A. Benfield and G.L. Trainor (2000) Cyclin-dependent kinase inhibitors: useful targets in cell cycle regulation. *J Med Chem* 43: 1-18
- Simbulan-Rosenthal C.M., D.S. Rosenthal, S. Iyer, H. Boulares and M.E. Smulson (1999) Involvement of PARP and poly(ADP-ribosyl)ation in the early stages of apoptosis and DNA replication. *Mol Cell Biochem* 193: 137-48
- Simon D.B., Y. Lu, K.A. Choate, H. Velazquez, E. Al-Sabban, M. Praga, G. Casari, A. Bettinelli, G. Colussi, J. Rodriguez-Soriano, D. McCredie, D. Milford, S. Sanjad and R.P. Lifton (1999) Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science* 285: 103-6
- Smith P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson and D.C. Klenk (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85
- Song J., O. Kwon, S. Chen, R. Daruwala, P. Eck, J.B. Park and M. Levine (2002) Flavonoid inhibition of sodium-dependent vitamin C transporter 1 (SVCT1) and glucose transporter isoform 2 (GLUT2), intestinal transporters for vitamin C and Glucose. *J Biol Chem* 277: 15252-60

- Song J.C., C.M. Hanson, V. Tsai, O.C. Farokhzad, M. Lotz and J.B. Matthews (2001) Regulation of epithelial transport and barrier function by distinct protein kinase C isoforms. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C649-61
- Sonoda N., M. Furuse, H. Sasaki, S. Yonemura, J. Katahira, Y. Horiguchi and S. Tsukita (1999) Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol* 147: 195-204
- Stenson W.F., R.A. Easom, T.E. Riehl and J. Turk (1993) Regulation of paracellular permeability in Caco-2 cell monolayers by protein kinase C. *Am J Physiol* 265: G955-62
- Strum J.M., L.P. Gartner and J.L. Hiatt (2003) Epithelia and Glands. In *Brs Cell Biology and Histology*. Lippincott Williams & Wilkins chapter 5: 64-66
- Tamaoki T., H. Nomoto, I. Takahashi, Y. Kato, M. Morimoto and F. Tomita (1986) Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺ dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 135: 397-402
- Tamura H.O., K. Taniguchi, E. Hayashi, Y. Hiyoshi and F. Nagai (2001) Expression profiling of sulfotransferases in human cell lines derived from extra-hepatic tissues. *Biol Pharm Bull* 24: 1258-62
- Taniguchi K., M. Wada, K. Kohno, T. Nakamura, T. Kawabe, M. Kawakami, K. Kagotani, K. Okumura, S. Akiyama and M. Kuwano (1996) A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res* 56: 4124-9
- Toullec D., P. Pianetti, H. Coste, P. Bellevergue, T. Grand-Perret, M. Ajakane, V. Baudet, P. Boissin, E. Boursier, F. Loriolle and et al. (1991) The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* 266: 15771-81
- Tsukita S., M. Furuse and M. Itoh (1999) Structural and signalling molecules come together at tight junctions. *Curr Opin Cell Biol* 11: 628-33
- Tsukita S., M. Furuse and M. Itoh (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 285-93
- Turner J.R. and J.L. Madara (1995) Physiological regulation of intestinal epithelial tight junctions as a consequence of Na⁽⁺⁾-coupled nutrient transport. *Gastroenterology* 109: 1391-6
- Turner J.R., J.M. Angle, E.D. Black, J.L. Joyal, D.B. Sacks and J.L. Madara (1999) PKC-dependent regulation of transepithelial resistance: roles of MLC and MLC kinase. *Am J Physiol* 277: C554-62
- Uchôa L.C. and J.C. Junqueira (2005) Epithelial Tissue. In *Basic Histology*. McGraw-Hill Professional chapter 4: 68-70
- Ueno I., N. Nakano and I. Hirono (1983) Metabolic fate of [14C] quercetin in the ACI rat. *Jpn J Exp Med* 53: 41-50
- van der Woude H., A. Gliszczynska-Swiglo, K. Struijs, A. Smeets, G.M. Alink and I.M. Rietjens (2003) Biphasic modulation of cell proliferation by quercetin at concentrations physiologically relevant in humans. *Cancer Lett* 200: 41-7
- van der Woude H., M.G. Boersma, J. Vervoort and I.M. Rietjens (2004) Identification of 14 quercetin phase II mono- and mixed conjugates and their formation by rat and human phase II in vitro model systems. *Chem Res Toxicol* 17: 1520-30

- van Erk M.J., P. Roepman, T.R. van der Lende, R.H. Stierum, J.M. Aarts, P.J. van Bladeren and B. van Ommen (2005) Integrated assessment by multiple gene expression analysis of quercetin bioactivity on anticancer-related mechanisms in colon cancer cells in vitro. *Eur J Nutr* 44: 143-56
- Van Itallie C., C. Rahner and J.M. Anderson (2001) Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest* 107: 1319-27
- Van Itallie C.M. and J.M. Anderson (1997) Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts. *J Cell Sci* 110: 1113-21
- Vargas-Cortes M., U. Hellstrom and P. Perlmann (1983) Surface markers of human natural killer cells as analyzed in a modified single cell cytotoxicity assay on poly-L-lysine coated cover slips. *J Immunol Methods* 62: 87-99
- Volate S.R., D.M. Davenport, S.J. Muga and M.J. Wargovich (2005) Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements (quercetin, curcumin, silymarin, ginseng and rutin). *Carcinogenesis* 26: 1450-6
- Wagner C., R. Fachinetto, C.L. Dalla Corte, V.B. Brito, D. Severo, G. de Oliveira Costa Dias, A.F. Morel, C.W. Nogueira and J.B. Rocha (2006) Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation in vitro. *Brain Res* 1107: 192-8
- Wagner R.D., E.S. Krul, J.B. Moberly, D.H. Alpers and G. Schonfeld (1992) Apolipoprotein expression and cellular differentiation in Caco-2 intestinal cells. *Am J Physiol* 263: E374-82
- Walgren R.A. and T. Walle (1999) The influence of plasma binding on absorption/exsorption in the Caco-2 model of human intestinal absorption. *J Pharm Pharmacol* 51: 1037-40
- Walgren R.A., U.K. Walle and T. Walle (1998) Transport of quercetin and its glucosides across human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biochem Pharmacol* 55: 1721-7
- Walgren R.A., K.J. Karnaky, Jr., G.E. Lindenmayer and T. Walle (2000a) Efflux of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside across human intestinal Caco-2 cell monolayers by apical multidrug resistance-associated protein-2. *J Pharmacol Exp Ther* 294: 830-6
- Walgren R.A., J.T. Lin, R.K. Kinne and T. Walle (2000b) Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *J Pharmacol Exp Ther* 294: 837-43
- Walle T., T.S. Vincent and U.K. Walle (2003) Evidence of covalent binding of the dietary flavonoid quercetin to DNA and protein in human intestinal and hepatic cells. *Biochem Pharmacol* 65: 1603-10
- Wang H., M.G. Nair, G.M. Strasburg, A.M. Booren and J.I. Gray (1999) Antioxidant polyphenols from tart cherries (*Prunus cerasus*). *J Agric Food Chem* 47: 840-4
- Wang Y., J. Zhang, X.J. Yi and F.S. Yu (2004) Activation of ERK1/2 MAP kinase pathway induces tight junction disruption in human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* 78: 125-36
- Wang Y., J. Cao and S. Zeng (2005) Involvement of P-glycoprotein in regulating cellular levels of Ginkgo flavonols: quercetin, kaempferol, and isorhamnetin. *J Pharm Pharmacol* 57: 751-8
- Weber E., G. Berta, A. Tousson, P. St John, M.W. Green, U. Gopalokrishnan, T. Jilling, E.J. Sorscher, T.S. Elton, D.R. Abrahamson and et al. (1994) Expression and polarized targeting of a rab3 isoform in epithelial cells. *J Cell Biol* 125: 583-94
- Wenzel U., A. Herzog, S. Kuntz and H. Daniel (2004) Protein expression profiling identifies molecular targets of quercetin as a major dietary flavonoid in human colon cancer cells. *Proteomics* 4: 2160-74

- Wilcox E.R., Q.L. Burton, S. Naz, S. Riazuddin, T.N. Smith, B. Ploplis, I. Belyantseva, T. Ben-Yosef, N.A. Liburd, R.J. Morell, B. Kachar, D.K. Wu, A.J. Griffith and T.B. Friedman (2001) Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell* 104: 165-72
- Williams and Harborne (1994) Flavone and flavonol glycosides. *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986 (ed by Harborne JB Chapman and Hall, London)* 337-85
- Wisniewski D., P. LoGrasso, J. Calaycay and A. Marcy (1999) Assay for $I\kappa$ B kinases using an in vivo biotinylated $I\kappa$ B protein substrate. *Anal Biochem* 274: 220-8
- Wittchen E.S., J. Haskins and B.R. Stevenson (1999) Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J Biol Chem* 274: 35179-85
- Yamamoto Y., N. Nishimura, S. Morimoto, H. Kitamura, S. Manabe, H.O. Kanayama, S. Kagawa and T. Sasaki (2003) Distinct roles of Rab3B and Rab13 in the polarized transport of apical, basolateral, and tight junctional membrane proteins to the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 308: 270-5
- Zahraoui A., G. Joberty, M. Arpin, J.J. Fontaine, R. Hellio, A. Tavitian and D. Louvard (1994) A small rab GTPase is distributed in cytoplasmic vesicles in non polarized cells but colocalizes with the tight junction marker ZO-1 in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 124: 101-15
- Zhang X.M., J. Chen, Y.G. Xia and Q. Xu (2005) Apoptosis of murine melanoma B16-BL6 cells induced by quercetin targeting mitochondria, inhibiting expression of PKC- α and translocating PKC- δ . *Cancer Chemother Pharmacol* 55: 251-62
- Zhivotovsky B. (2004) Apoptosis, necrosis and between. *Cell Cycle* 3: 64-6
- Zollner (1993) Handbook of enzyme inhibitors. *Wiley-VCH-Verlag*

G Anhang

1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BAPTA-AM	Bis-(2-Aminophenoxy)-Ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure-Methylester
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
Caco-2	Humane Kolonkarzinom-Zelllinie
Cld	Claudin
C4P	Claudin-4-Promotor
DHBA	3,4-Dihydroxybenzoesäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonuklein-Säure
dNTP	Desoxy-Ribonukleotid-Triphosphat
ddNTP	Didesoxy-Ribonukleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
FKS	Fötale Kälberserum
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> -Bakterien
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GF109203X	Bisindolyl-Maleimid I (PKC-Inhibitor)
GIT	Gastrointestinaltrakt
H7	1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-Methyl-Piperazin (unspezifischer Inhibitor)
HT-29/B6	Humane Kolonkarzinom-Zelllinie
IBD	Entzündliche Darmerkrankung (Inflammatory bowel disease)
IFN γ	Interferon <i>gamma</i>
IPTG	Isopropylthio- <i>beta</i> -Galactosid
JAM	Junctional Adhesion Molecule
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LMDM	Low Mass DNA Marker
LPH	Laktose-Phlorizin Hydrolase

MDCK	Madin-Darby canine kidney cells: Nieren-Zelllinie des Hundes
MEM	Medium für Caco-2-Zellen (MEM = Modifiziertes Eagle's Medium)
ML-7	1-(5-Iodonaphthalen-1-Sulphonyl)-1-Hexahydro-1,4-Diazepin Hydrochlorid (MLCK-Inhibitor)
MLCK	Myosin Light Chain Kinase
MRP	Multidrug resistance-associated protein
ms	transepitheliale Richtung: vom mukosalen zum serosalen Kompartiment
NF- κ B	Nuclear factor- <i>kappa</i> B
NSAIDS	Nichtsteroidale, antiinflammatorische Arzneimittel
Ocln	Occludin
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PARP	Poly-ADP-Ribose Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte saline Lösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGE ₂	Prostaglandin E2
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
Q	Quercetin
Qr	Quercitrin (Quercetin-3-rhamnosid)
RNA	Ribonuklein-Säure
R ^t	Transepithelialer Widerstand
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGLT1	Natriumabhängiger Glukosetransporter-1
sm	transepitheliale Richtung: vom serosalen zum mukosalen Kompartiment
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
THBA	2,4,6-Trihydroxybenzoesäure
TJ	Tight Junction
TNF α	Tumornekrosefaktor- <i>alpha</i>
TSR	Template supression reagent
TUNEL	Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling (Färbung von apoptotischen Zellen)
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl- <i>beta</i> -D-Galactopyranosid

2 Erklärung zur Dissertation

Diese Arbeit entstand in der Medizinischen Klinik I für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie an der Charité - Campus Benjamin Franklin in Berlin unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. J.-D. Schulzke. Freundlicherweise wurde ich weiterhin von Herrn Prof. Dr. H. R. Glatt, Leiter der Abteilung Ernährungstoxikologie am Deutschen Institut für Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke, betreut.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und mit den angegebenen Mitteln angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher an keiner Hochschule eingereicht.

3 Lebenslauf

Name: Susanne Schlichter

Geboren: am 28. Juni 1978 in Cottbus

Schulbesuch:

von 1985 bis 1991 28. Polytechnische Oberschule Cottbus

von 1991 bis 1998 Max Steenbeck Gymnasium mit erweiterter mathematisch-naturwissenschaftlich-technischer Ausbildung, Cottbus

Studium:

von Oktober 1998 bis März 2004 Diplom Ernährungswissenschaft an der Universität Potsdam

von Januar 2003 bis Januar 2004 Diplomarbeit in der Abteilung Ernährungstoxikologie des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke

Januar 2004 Diplom

Promotion:

ab Mai 2004 Promotionsarbeit in der Medizinischen Klinik I für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie an der Charité - Campus Benjamin Franklin (Berlin),
finanziert durch ein Promotionsstipendium der Sonnenfeld-Stiftung (Berlin)

4 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke von der Medizinischen Klinik I für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie der Charité - Campus Benjamin Franklin (Berlin) bedanken für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung meiner Arbeit. Mein Dank gilt weiterhin Prof. Dr. Hans-Rudolf Glatt, Leiter der Abteilung Ernährungstoxikologie des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung (Potsdam-Rehbrücke) für die externe Betreuung und den kritischen Diskussionen.

Ich möchte mich weiterhin bei der Sonnenfeld-Stiftung (Berlin) unter dem Vorsitz von Dr. Hansjürgen Freiherr von Villiez bedanken für die Finanzierung meiner Forschungsarbeit durch ein Promotionsstipendium. Darüber hinaus bedanke ich mich bei Prof. Dr. Michael Fromm, Leiter des Instituts für Klinische Physiologie, in dem meine experimentellen Arbeiten durchgeführt wurden. Mein besonderer Dank gilt weiterhin Dr. Maren Amasheh und Ihrem Mann Dr. Salah Amasheh, die mir bei allen Fragestellungen als Betreuer mit Rat und Tat zur Seite standen. Insbesondere Maren gebührt mein Dank für ihre positive Energie und ihr ständiges Engagement.

Ich danke dem gesamten Institut der Klinischen Physiologie für die Hilfsbereitschaft in der Arbeitsgruppe. Mein besonderer Dank gilt dabei Jan Richter, der mich bei den Fluoreszenz-Färbungen beriet und Friederike Hirsch für die Starthilfe in der Arbeitsgruppe. Ich bedanke mich bei Priv.-Doz. Dr. Joachim Mankertz und Dr. Shida Tavalali für die kompetente Zusammenarbeit bei den molekularbiologischen Untersuchungen. Mein Dank gilt weiterhin Susanna Schön, Anja Fromm, Priv.-Doz. Dr. Dorothee Günzel, Dr. Rita Rosenthal und Detlef Sorgenfrei (unserem technischen Herz des Instituts). Ein besonderes Anliegen ist es mir weiterhin Sonja Dullat und Brigitte Papanis zu danken für ihre Unterstützung und Herzlichkeit.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei all meinen Freunden bedanken, insbesondere Jens Andres und Claudia Wahl. Meinen Eltern Mathias und Rita Schlichter gebührt mein größter Dank für ihre Fürsorge und Unterstützung.