

**Aus der Universitätsklinik für Anaesthesiologie und  
Intensivmedizin Tübingen  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. E. Unertl**

**Die Auswirkung von Hypoxie auf die intestinale  
Tight Junction: Rolle des Transkriptionsfaktors  
Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF-1)**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Christian Philipp Born  
aus Bad Homburg**

**2011**

**Aus der Universitätsklinik für Anaesthesiologie und  
Intensivmedizin Tübingen  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. E. Unertl**

**Die Auswirkung von Hypoxie auf die intestinale  
Tight Junction: Rolle des Transkriptionsfaktors  
Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF-1)**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Christian Philipp Born  
aus Bad Homburg**

**2011**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Rosenberger

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. A. Krüger

Für meine Eltern Ingrid und Wolfgang

# 1 Abkürzungen

A2AR	Adenosinrezeptor A2A
A2BAR	Adenosinrezeptor A2B
ADP	Adenosindiphosphat
AHRR	Aryl-hydrocarbon receptor repressor
AJ	Adherens junction
AMP	Adenosinmonophosphat
AP-1	Activator protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
CAD	C-terminal transactivation domain
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CAR	Coxsackie and Adenovirus Receptor
CD39 = E-NTPDase-1	Cluster of Differentiation 39 = Ektionukleosid Triphosphat
CD73	Diphosphohydrolase Cluster of Differentiation 73 = Ekto-5`-Nukleotidase
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element binding protein
DMOG	Dimethyloxaloylglyzin
Dsc	Desmocollin
Dsg	Desmoglein
E-Cadherin	epitheliales Cadherin
Egr-1	Early growth response 1
ESAM	Endothelial cell-selective adhesion molecule
ETS-1	Erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1
FIH-1	Factor inhibiting HIF-1
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GLUT	Glucose transporter
GUK	Guanylat kinase
HIF	Hypoxia inducible factor
HIV-1	Humanes Immundefizienz-Virus 1
HRE	Hypoxia responsive element
IDP	Inner dense plaque
IFN- $\alpha$ A	Interferon $\alpha$ A
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IgA	Immunglobulin A
IKK $\beta$	I $\kappa$ B kinase- $\beta$
ITF = TFF3	Intestinal trefoil factor

---

IκB	inhibitorischer Faktor κB
JAM	Junctional adhesion molecule
LAL	Limulus Amebocyte Lysate assay
LPS	Lipopolysaccharid
MAGUK	Membrane-associated guanylat kinase-like
MALT	Mucosa-associated lymphatic tissue
MDM2	Murine double minute 2 oncogene
MDR	multi drug resistance
MHC	Major histocompatibility complex
MLC	Myosin II regulatory light chain
MLCK	Myosin light chain kinase
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MUC	Mucine
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
ODP	Outer dense plaque
PAS	Per-Arnt-Sim
PCR	Polymerase chain reaction
P-gp	P-glycoprotein
PIK	Membrane permeant inhibitor of MLC kinase
PKA	Proteinkinase A
PMN	Polymorphonuclear leukocytes
PP1γ	Serine-threonine protein phosphatase 1
pVHL	von Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RNA	Ribonucleic acid
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SSA	Sulfasalazin
TER	Transepithelial resistance
TFF	Trefoil factor
TGF	Transforming growth factor
TGF-β	Transforming growth factor β
TJ	Tight Junction
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
TSP	Transkriptionsstartpunkt
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZO-1	Zonula occludens 1
ZO-2	Zonula occludens 2
ZO-3	Zonula occludens 3
ZONAB	ZO-1-associated nucleic acid-binding protein

---

## 2 Inhalt

<b>1</b>	<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>INHALT .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>5</b>
<b>3.1</b>	<b>Intestinales Epithel .....</b>	<b>6</b>
<b>3.2</b>	<b>Tight Junction .....</b>	<b>13</b>
3.2.1	Zonula occludens (ZO) 1, 2 und 3 .....	16
3.2.2	Cingulin .....	18
3.2.3	Occludin .....	18
3.2.4	Claudin .....	19
3.2.5	Junctional adhesion molecule (JAM) .....	20
<b>3.3</b>	<b>Schwächende und protektive Einflüsse auf die intestinale Barriere unter Hypoxie .</b>	<b>21</b>
3.3.1	Barrierschwächende Wirkung von Hypoxie .....	23
3.3.2	Barriereprotektive Einflüsse unter Hypoxie .....	25
3.3.3	Sonstige Einflüsse auf die Barriere .....	29
<b>4</b>	<b>FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Ziele .....</b>	<b>32</b>
4.1.1	Spezifisches Ziel 1 .....	32
4.1.2	Spezifisches Ziel 2 .....	33
<b>5</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>33</b>
<b>5.1</b>	<b>T-84 / CaCo-2 Zellkultur und Hypoxie.....</b>	<b>33</b>
<b>5.2</b>	<b>Proben aus dem murinen Ganzkörper-Hypoxiemodell .....</b>	<b>34</b>
<b>5.3</b>	<b>Freeze-Fracture Elektronenmikroskopie.....</b>	<b>36</b>
<b>5.4</b>	<b>RNA Isolation .....</b>	<b>37</b>
<b>5.5</b>	<b>Reverse Transkription.....</b>	<b>37</b>
<b>5.6</b>	<b>Real-time PCR.....</b>	<b>37</b>
<b>5.7</b>	<b>Western Blot.....</b>	<b>39</b>
<b>5.8</b>	<b>Immunhistochemie .....</b>	<b>40</b>
<b>5.9</b>	<b>Promoteranalyse.....</b>	<b>40</b>
<b>5.10</b>	<b>ZO-1 Promoterkonstrukt und Reporterassay .....</b>	<b>41</b>

5.11	HIF-1 überexprimierende CaCo-2 .....	46
5.12	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) .....	46
6	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>48</b>
7	<b>ERGEBNISDISKUSSION</b> .....	<b>60</b>
8	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>73</b>
9	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>75</b>
10	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>94</b>



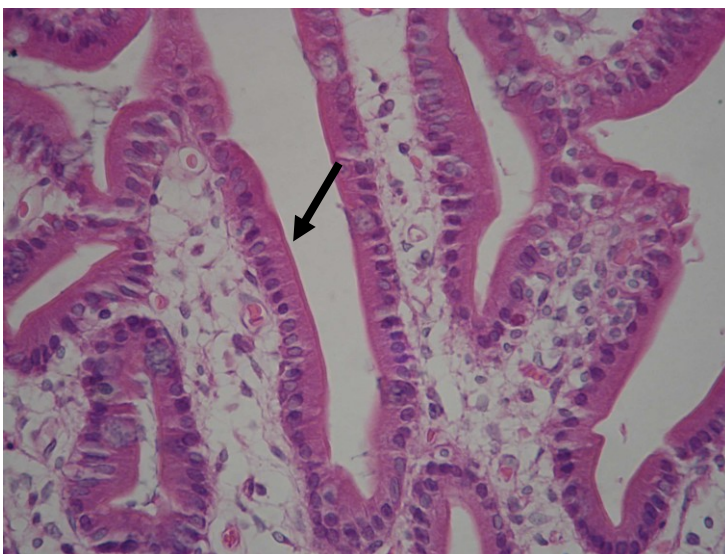
### 3 Einleitung

Der Darm ist das grösste Immunorgan des Körpers und bildet gleichzeitig eine der grössten Grenzflächen zur Aussenwelt mit seinen potentiell lebensbedrohlichen Einflüssen wie Toxinen und Krankheitserregern. So enthält das intestinale Lumen mehr als 400 verschiedene Bakterienspezies bei einer Gesamtzahl ca. von  $10^{13-14}$  [1]. Um einen unkontrollierten Übertritt dieser Antigene zu verhindern, verfügt der Darm über eine hocheffiziente Barriere, welche durch eine ganze Reihe von Mechanismen erzeugt wird. Störungen in der Kompartimentierung, sowie eine beeinträchtigte Regulation der Immunabwehr, können eine systemische Ausbreitung intestinaler Bakterien begünstigen [2, 3] und zu Autoimmunkrankheiten, wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) [4], führen. Ein zentraler Baustein der Barriere stellt das lediglich  $20\mu\text{m}$  breite einschichtige Darmepithel dar. Dessen physische Integrität und Differenzierung in apikale und basolaterale Membranabschnitte wird in entscheidendem Maße durch die Interzellularkontakte definiert. Hierbei steht vor allem die Tight Junction (TJ) im Vordergrund, welche neben dem geschlossenen Zellverband das hauptsächliche permeabilitätslimitierende Element der epithelialen Barriere darstellt [5]. Deren exponierte Rolle wird vor allem bei intestinaler Inflammation deutlich, wobei die TJ hier als Drehkreuz krankhaft gesteigerter Permeabilität identifiziert wurde (s. 3.3.3). Verschiedene physiologische und pathophysiologische Stimuli nehmen hierbei entscheidenden Einfluss auf die funktionelle Einheit dieser Barriere, wobei sich kontinuierlich die Erkenntnisse mehren, dass Hypoxie ebenfalls einen kritischen pathophysiologischen Faktor intestinaler Barrierschwächung darstellt (s. 3.1.1). Dabei kommt erschwerend hinzu, dass sich Darmepithel bereits unter physiologischen Bedingungen der Herausforderung niedriger Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt sieht [6-8]. Dies leitet sich einerseits von dessen Nähe zum anoxischen Lumen ab und ist andererseits Folge einer komplexen und störungsanfälligen Gefäßversorgung. Weitere komplizierende Faktoren führen somit unweigerlich zu einem Ungleichgewicht zwischen

Sauerstoffangebot und Bedarf mit der Konsequenz zellulärer epithelialer Hypoxie. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, den Einfluss von Sauerstoffmangel auf die intestinal-epitheliale Integrität besser zu charakterisieren und regulatorische Mechanismen zu identifizieren, welche diesen Veränderungen zugrunde liegen. Dies geschieht vor allem im Hinblick auf die Tight Junctions, als wichtigstes barrierebildendes Element. Ein besseres Verständnis solcher Vorgänge bietet die Grundlage zur Entwicklung therapeutischer Strategien, welche die Funktion der Barriere unterstützen sollen, um bei kritischer Erkrankung mögliche Sekundärschäden, wie systemische Aussaat von Krankheitserregern und unkontrollierte Immunaktivierung zu verhindern.

### 3.1 Intestinales Epithel

Intestinales Epithel besteht aus einschichtigem zylindrischen Epithel mit apikalem Bürstensaum (Abb. 3.1). Dieser setzt sich aus  $1\mu\text{m}$  langen Mikrovilli zusammen (ca. 3000 pro Zelle), welche eine etwa 20-fache Oberflächenvergrößerung bewirken. Deren Membran trägt hydrolytische Enzyme für Peptide und Oligosaccharide sowie zahlreiche Transportsysteme zur Resorption von Aminosäuren und Zucker.

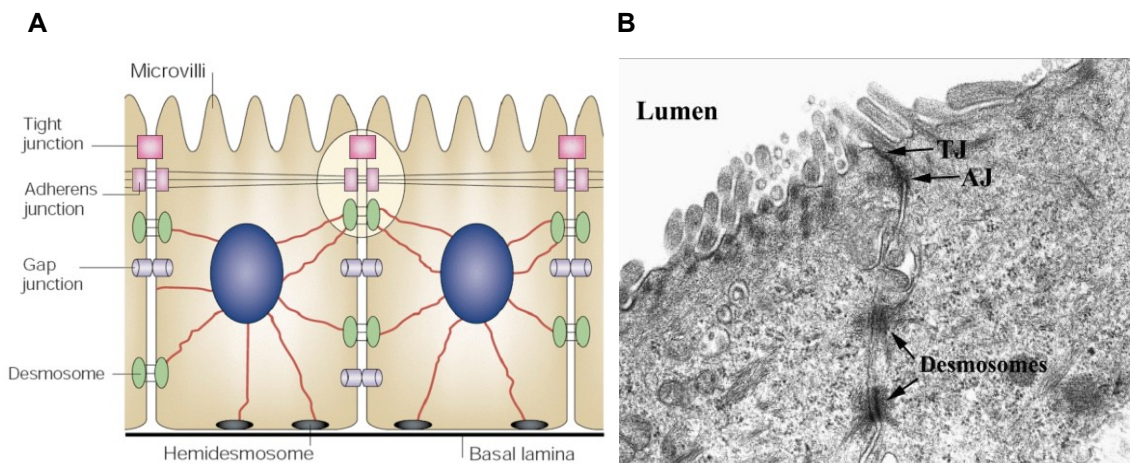


**Abb. 3.1:** Enterozyten des Duodenums in Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Einschichtiges hochprismatisches Epithel, darunterliegend Bindegewebe. Apikal gelegener Bürstensaum (Pfeil). (Abbildung aus Wikipedia)

Basal liegt der Zellverband der Basalmembran auf, welche das Epithel von darunterliegenden Schichten abgrenzt und für dessen Stabilisierung sorgt. Zwischen den Zellen befindet sich der Parazellulärraum, der nach apikal durch den apikalen junctionalen Komplex begrenzt wird und sowohl die interzellulären Adhäsionskontakte (Adherens Junction, Desmosomen) als auch die parazelluläre Diffusionsbarriere (TJ) beinhaltet. Durch letztere wird eine Polarisierung des Epithels in apikale und basolaterale Domäne erreicht. Des Weiteren befinden sich hier interzelluläre Kanäle (Gap Junctions), welche eine metabolische Kopplung des Zellverbandes ermöglichen. Sämtliche Interzellularkontakte werden später noch detaillierter beschrieben. Zu den Funktionen intestinalen Epithels gehören als grenzbildende Schicht die Bildung einer selektiv permeablen Barriere, die Prozessierung und Abwehr luminaler Antigene, sowie die Resorption von Wasser, Elektrolyten und Nährstoffen. Der Transport durch den Zellverband erfolgt hierbei einerseits aktiv transzellulär, d.h. Substanzen werden apikal über einen energieabhängigen Transport in die Zelle aufgenommen und basal ins Interstitium abgegeben. Andererseits steht der passive parazelluläre Weg zur Verfügung, wodurch Wasser oder in Wasser gelöste Substanzen durch den interzellulären Spalt resorbiert werden. Treibende Kraft für diesen Prozess ist die an der basalen Membran lokalisierte  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, welche für ein  $\text{Na}^+$ -Konzentrationsgefälle von luminal nach basal sorgt, sodass Wasser passiv parazellulär folgen kann. Ebenfalls werden durch diesen Gradienten Monosaccharide, Oligosaccharide und Aminosäuren über einen  $\text{Na}^+$ -Symport sekundär aktiv resorbiert. Voraussetzung für die Aufrechterhaltung des Gefälles ist ein selektiv permeabler Verschluss des Parazellulärraumes durch die TJ. Diese stellt neben dem geschlossenen Zellverband, die wichtigste Komponente der intestinalen Barriere dar [5]. Sie wird durch lokale bzw. immunogene Abwehrmechanismen ergänzt, welche in ihrer Gesamtheit eine hochdynamische funktionelle Einheit bilden. Dazu gehört zum einen der Mukus und die darin enthaltenen Muzine, welche neben mechanischer Protektion [9] Schutz vor bakterieller Invasion bieten [10, 11]. Zum anderen stellen die trefoil factors (TFF) einen wichtigen Bestandteil der

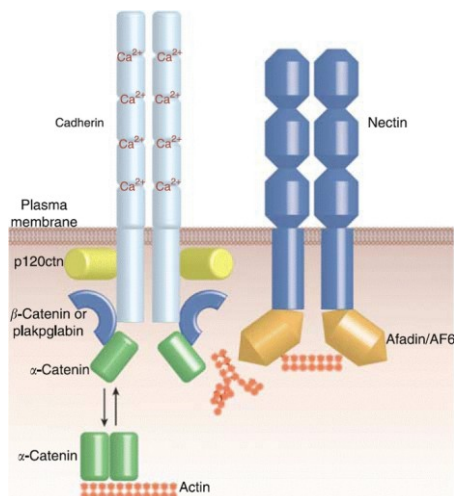
Barriere dar, welche zytoprotektiv und mit den Muzinen synergistisch schützend auf das darunter liegende Epithel wirken [12-14]. Des Weiteren sind im Mukus große Mengen an sekretorischem Immunglobulin A (IgA) enthalten, was eine epitheliale bakterielle Überbesiedelung verhindert [15]. Gebildet wird es von Effektorzellen (Plasmazellen) des mukosa-assoziierten lymphatische Gewebes (MALT), welche sich zusammen mit T-Gedächtniszellen in der Lamina Propria befinden [16]. Von dort aus wird das IgA von der basolateralen Fläche der Enterozyten nach apikal transportiert und in den Mukus sezerniert. Das MALT ist der zentrale immunologische Bestandteil der intestinalen Barriere und stellt gleichzeitig das grösste Immunorgan des Körpers dar. Es wird in einen afferenten und efferenten Schenkel unterteilt, wobei ersterer aus spezialisiertem Epithel, den M-Zellen, besteht. Diese liegen in der Lamina Propria mucosae und reichen Antigene mittels Transzytose an die submukös gelegenen Lymphfollikel (Peyer Plaques) weiter. Diese sind reich an dendritischen Zellen, welche die aufgenommenen Antigene prozessieren und membranständig präsentieren. Dadurch werden im efferenten Schenkel T-Zellen und IgA-produzierende Plasmazellen aktiviert. Ebenfalls tragen antimikrobielle Peptide, die Defensine, entscheidend zum Schutz des intestinalen Epithels bei. Sie sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems [17] und werden in die konstitutiv exprimierten  $\alpha$ -Defensine [17-19] und die inflammatorisch induzierbaren  $\beta$ -Defensine [20, 21] unterteilt. Deren Wirkung beruht auf einer Störung der bakteriellen Membranintegrität durch Porenbildung [22]. Letztlich ist die überwiegend Gram-positive kommensale Flora selbst an der Aufrechterhaltung der intestinalen Barriere beteiligt. Durch Absättigung potentieller Bindungsstellen wird die Interaktion möglicher Krankheitserreger mit dem Epithel verhindert, welche daraufhin im Mukusstrom abtreiben. Neben den eben diskutierten Elementen stellt der geschlossene Zellverband das entscheidende Kriterium für die Bildung einer Permeationsbarriere dar. Durch ihn wird eine Vermischung unterschiedlicher Milieus zwischen apikaler und basolateraler Domäne verhindert. Er entsteht durch Aggregation gegenüberliegender Plasmamembranen mittels vorübergehender oder dauerhafter

Interzellularkontakte (Abb. 3.2 A, B). Es handelt sich um komplexe Strukturen aus mehreren funktionellen Einheiten, die in ihrer Gesamtheit als epithelialer junctionaler Komplex bezeichnet werden. Dieser besteht zum einen aus Barrierekontakten (TJ), welche apikal liegen und anschliessend eigens behandelt werden (s. 3.2). Zum anderen befinden sich direkt darunter die Adhäsionskontakte, welche dem Gewebe mechanische Integrität verleihen (Abb. 3.2 B).



**Abb. 3.2:** **A)** Schematische Darstellung der epithelialen Interzellularkontakte. Eingekreister Bereich markiert apikalen junctionalen Komplex. (Abbildung aus [23]) **B)** Elektronenmikroskopische Aufnahme der Interzellularkontakte im Darmepithel. Elektronendichte Areale im Interzellularspalt stellen Tight Junctions (TJ), Adherens Junctions (AJ) sowie Desmosomen dar. (Abbildung aus [24])

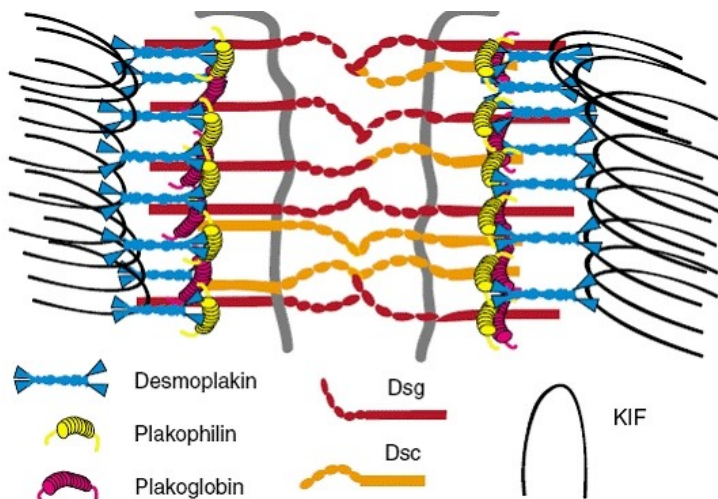
Dazu gehören die Adherens Junctions (AJ; Abb. 3.3), welche massgeblich an der Wahrung struktureller Integrität epithelialer Gewebe beteiligt sind. Dabei folgen sie einer allgemeinen Grundarchitektur, wobei Transmembranproteine mit dem Aktinzytoskelett über Bindeproteine kommunizieren. Sie kommen auch



**Abb. 3.3:** Schematische Darstellung der Adhärenz Junction. Links der Cadherin-Catenin Komplex, rechts der Nectin-Afadin Komplex und die jeweilige Interaktion mit Actin. (Abbildung aus [25])

ausserhalb des apikalen junctionalen Komplexes und in nicht-epithelialen Zellen vor. Neben der Adhäsion sind sie an Signalprozessen beteiligt, welche eine Rolle bei der Morphogenese verschiedener Gewebe spielen [26]. Im Wesentlichen bestehen AJs aus dem Cadherin-Catenin und dem Nectin-Afadin Komplex. Ersterer enthält die wesentlichen haftvermittelnden Strukturen, wobei die Cadherine den interzellulären Kontakt herstellen. Sie bilden eine große Familie homophil  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig bindender Adhäsionsmoleküle [27, 28]. Epitheliales Cadherin (E-cadherin) stellt den prominentesten Vertreter dar und ist entscheidend an der Bildung des epithelialen junctionalen Komplexes beteiligt [29]. Es bindet an die Catenine, welche die AJ mit dem Zytoskelett verankern. Zu den Cateninen gehören  $\alpha$ - und  $\beta$ - und p120 Catenin (p120ctn), wobei ersteres entweder direkt eine Verbindung mit dem Aktinzytoskelett herstellt [30] oder durch die Bindeproteine Vinculin [31],  $\alpha$ -Actinin [32], Zonula occludens 1 (ZO-1) [33] und Zonula occludens 2 (ZO-2) [34]. Der Nectin-Afadin Komplex erfüllt an der AJ überwiegend adhäsionsmodulatorische Funktionen. Er besteht aus den Nectinen (Nectin-1 bis -4), welche mittels ihres cytoplasmatischen Bindungspartners Afadin eine Interaktion mit dem E-Cadherin-Catenin Komplex eingehen und dadurch modulatorisch auf die Zelladhäsion wirken [35].

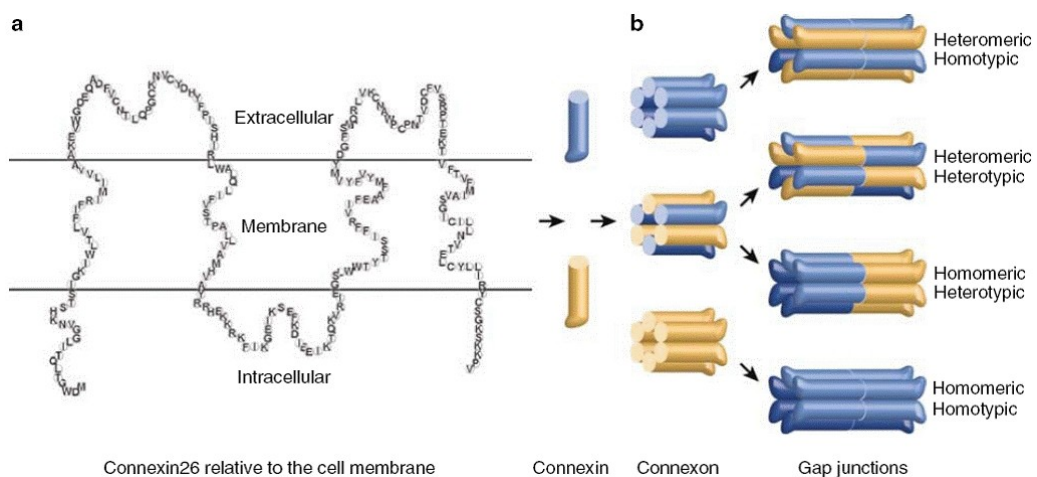
Basal der AJ befinden sich die Desmosomen (Abb. 3.4), deren zentrale Aufgabe darin besteht, den Zusammenhalt des Zellverbandes zu gewährleisten.



**Abb. 3.4:** Schematische Darstellung eines Desmosoms. Desmoglein (Dsg), Desmocollin (Dsc), Keratin-Intermediärfilamente (KIF). (Abbildung aus [36])

Dies erklärt ihr vermehrtes Vorkommen in Geweben erhöhter mechanischer Beanspruchung, wie dem Herzen und Epithelien. Vermutlich spielen sie ebenfalls eine Rolle bei der Stabilisierung der AJ, sowie bei der Differenzierung und Morphogenese verschiedener Gewebe. Elektronenmikroskopisch betrachtet, handelt es sich um punktförmige Haftkontakte mit einem Durchmesser von ungefähr  $0,5\mu\text{m}$ , wobei der Interzellularspalt (ca.  $30\text{nm}$  breit) die adhäsionsvermittelnden Strukturen enthält. Eine zytoplasmatische Plaque stellt die Verbindung zu den Intermediärfilamenten her. Diese besteht aus zwei Komponenten: der sehr dichten outer dense plaque (ODP) und der weniger dichten inner dense plaque (IDP). Erstere liegt näher an der Membran. Hier inserieren die zytoplasmatischen Enden der haftvermittelnden Proteine. Die IDP ist weiter von der Membran entfernt und stellt die Verbindung zu den Intermediärfilamenten her. Die molekularen Bausteine der Desmosomen entstammen im Wesentlichen aus drei Proteinfamilien: *Desmosomale Cadherine*: Vertreter sind Desmoglein und Desmocollin, welche die interzelluläre Adhäsion vermitteln. *Armadilloproteine*: Dazu gehört Plakophilin,

welches an der Anheftung der Plaque an die Intermediärfilamente beiteiligt ist. *Plakine*: Desmoplakin ist ein Mitglied dieser Familie, welches ebenfalls als Bindeprotein zwischen Intermediärfilamenten und Plaque fungiert. Neben den Haftkontakten, die dem Zellverband Stabilität verleihen und an dessen Ausdifferenzierung beteiligt sind, bilden die sogenannten Gap Junctions interzelluläre Kanäle, welche eine metabolische Kopplung des Zellverbandes ermöglichen und ihn zu einer funktionellen Einheit zusammenfügen (Abb. 3.5).



**Abb. 3.5:** Schematische Darstellung von Connexinen und Gap Junctions. **a)** Connexine bestehen aus vier Transmembrandomänen, zwei extrazellulären Loops, einem zytoplasmatischen Loop und zytoplasmatischen N- und C-Termini. **b)** Sechs Connexine bilden ein Connexon, welche den Interzellularkontakt bilden. Verschiedene Connexine können miteinander interagieren und bilden homomere, heteromere und heterotypische Kanäle. (Abbildung aus [37])

Sie erlauben den Austausch von Ionen, second messengern sowie kleinen Metaboliten [38, 39] und treten gesammelt basolateral in bestimmten Regionen der Plasmamembran auf [40, 41]. Gap junctions werden durch die Genfamilie der Connexine kodiert [42]. Es existieren mindestens 21 Isoformen, wobei deren Proteine untereinander Strukturähnlichkeiten aufweisen. Jedes besitzt

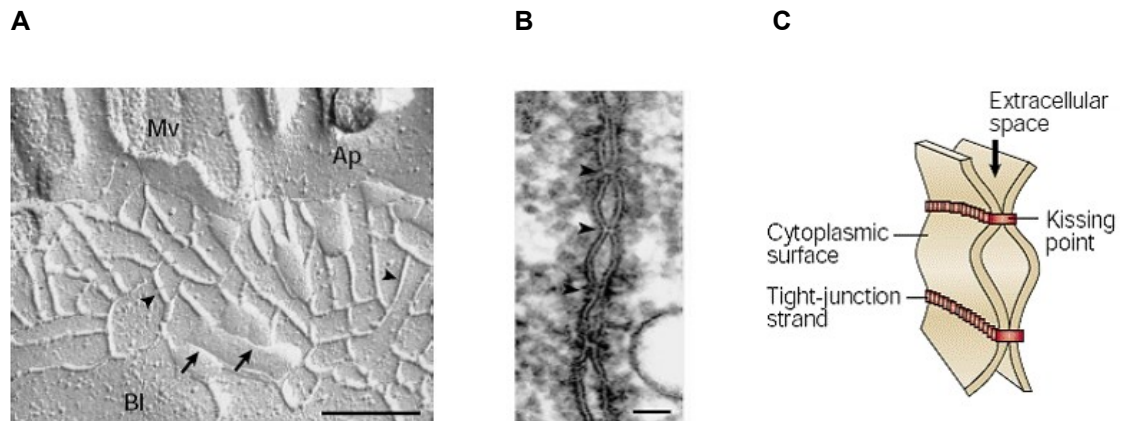


vier Transmembrandomänen, welche die Wand der Pore bilden. Zwei extrazelluläre Domänen sorgen für die interzelluläre Erkennung und die eigentliche Verbindung. Sechs Connexine bilden einen ringförmigen Halbkanal, das sogenannte Connexon. Zwei gegenüber anliegende Connexone bilden eine Gap Junction. Diese können aus einer oder unterschiedlichen Isoformen gebildet werden, sodass bezüglich deren Bildung ein großes Variationsspektrum besteht.

### **3.2 Tight Junction**

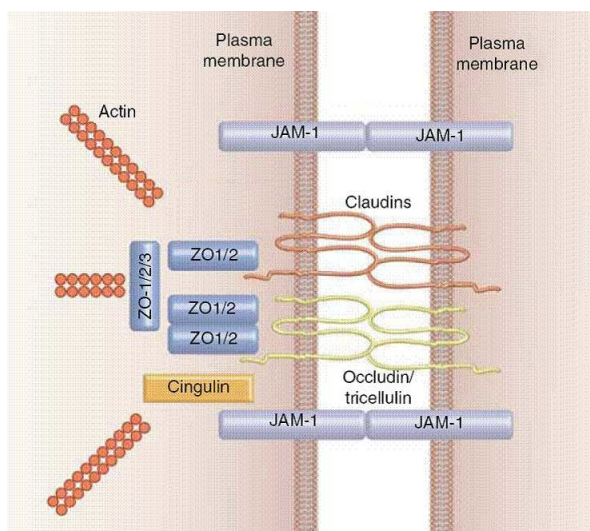
Die Tight Junction ist das wichtigste permeabilitätslimitierende Element der epithelialen Barriere. Sie bildet ein kontinuierliches Netzwerk interzellulärer Verbindungen, welche das apikale Ende der lateralen Membran umranden. Dadurch werden Kompartimente unterschiedlichen Milieus voneinander getrennt, was eine Polarisation des Epithels in apikale und basolaterale Domäne bewirkt [43]. Gleichzeitig wird eine unkontrollierte Lateraldiffusion integraler Membranproteine verhindert [44], was zu einer regulierten Verteilung membranständiger Ionenpumpen und Kanäle führt. Dies ermöglicht die Erzeugung eines osmotischen Gradienten, welcher als treibende Kraft für den passiven parazellulären Transport dient. Das Ausmaß der parazellulären Permeabilität unterliegt dabei einer starken gewebespezifischen Variation [45]. Zum Vergleich: die Durchlässigkeit, gemessen anhand des transepithelialen Widerstandes (TER,  $\Omega\text{cm}^2$ ) [46], beträgt im proximalen Tubulus der Niere  $10\Omega\text{cm}^2$  und in der Harnblase  $> 10000\Omega\text{cm}^2$  [47]. Des Weiteren ist die TJ in der Lage ihre Durchlässigkeit wechselnden örtlichen Anforderungen entsprechend anzupassen. Ein wesentlicher Mechanismus ergibt hierbei aus deren Verbindung zum Zytoskelett [48, 49], wobei eine Actinomyosinkontraktion sekundär zur Beeinflussung der parazellulären Permeabilität führt [50]. Aber auch die transkriptionelle Beeinflussung tight-junktionaler Komponenten [51, 52] und deren posttranslationale Modifikation, wie Phosphorylation [53, 54],

erlauben Veränderungen in der Permeabilität. Hier treten besonders die Claudine, welche hauptsächlich die Durchlässigkeit des Barrierekontaktes definieren, als Ansatzpunkt der Regulation in den Vordergrund (s. 3.2.4). Ausgelöst werden diese Veränderungen durch zahlreiche Faktoren wie pro – und antiinflammatorische Zytokine (z.B. TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) [55, 56], aber auch Bakterien und Viren [57, 58] sowie Umwelteinflüsse [59] können über die TJ Veränderungen der Permeabilität bewirken. Neben der Funktion als Diffusionsbarriere sind Teile der TJ, vor allem ZO-1 und ZO-2, an Signalprozessen beteiligt, welche die Zellproliferation und deren Ausdifferenzierung beeinflussen. Dies erfolgt zum einen über Signalproteine, welche zwischen der TJ und dem Nukleus kommunizieren [60, 61] oder durch direkte Interaktion mit dem Nukleus [62]. ZO-1 bindet mittels seiner SH3-Domäne den Y-Box Transkriptionsfaktor ZO-1-associated nucleic acid-binding protein (ZONAB), welcher im Nukleus aktivierend auf die Zellproliferation wirkt. Mit zunehmender Differenzierung und Polarisierung der Zelle steigt der ZO-1 Gehalt an der TJ, was zu einer Kompartimentalisierung von ZONAB an dieser führt, wodurch eine weitere Proliferation unterdrückt wird. Für ZO-2 konnte gezeigt werden, dass dessen zelluläre Verteilung vom Konfluenzgrad des epithelialen Zellverbandes abhängt. Bei hoher Zelldichte konzentriert sich ZO-2 an der TJ, bei wenig konfluenten hingegen im Nukleus [62], was eine regulatorische Funktion des Proteins nicht nur an der TJ vermuten lässt. Unterstützt wird diese These durch die Beobachtung, dass ZO-2 im Nukleus mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren interagiert (Jun, Fos, C/EBP), welche die Zellproliferation und deren Differenzierung beeinflussen können [63]. Elektronenmikroskopisch erscheint die TJ als starke Annäherung benachbarter Plasmamembranabschnitte, sog. „kissing points“ (Abb. 3.6B, C). Diese stellen sich im Gefrierbruch als anastomosierende intramembranöse Fibrillen am apikalen Anteil der lateralen Membran dar (Abb. 3.6A) [64, 65].



**Abb. 3.6:** **a)** Freeze Fracture intestinalen Epithels. TJs erscheinen als kontinuierliche, anastomosierende Fibrillen (Pfeilspitzen). Mv, Mikrovilli; Ap, apikale Membran; Bl, basolaterale Membran. Größenskala 200nm. **b)** Annäherung benachbarter Plasmamembranabschnitte an den TJs, sog. „kissing points“ (Pfeilspitzen). Größenskala 50nm. **c)** Schematische dreidimensionale Darstellung der Tight Junction. (Abbildung aus [23])

Die molekulare Struktur des Barrierekontaktes besteht aus Transmembranproteinen und einer subapikal gelegenen Plaque (Abb. 3.7).



**Abb. 3.7:** Schematische Darstellung der TJ. Die organisierende subapikale Plaque besteht aus ZO-1 bis -3 und Cingulin. Sie stellt die Verbindung zum Zytoskelett her. Die Transmembranproteine JAM-1, die Claudine und Occludin regulieren die Permeabilitätseigenschaften. (Abbildung aus [25])

Erstere bilden die parazelluläre und laterale Diffusionsbarriere, letztere die organisierende Struktur der TJ. Diese verbindet sie mit dem Zytoskelett, ist an deren Entstehung bzw. Degradation beteiligt und spielt, wie eben erwähnt, eine Rolle bei Signalprozessen. Die molekularen Komponenten sollen nun im Einzelnen besprochen werden.

### **3.2.1 Zonula occludens (ZO) 1, 2 und 3**

Die Zonula occludens Proteine 1-3 stellen die Hauptbestandteile der subapikalen organisierenden Plaques der TJ dar und dienen als Bindeglied zwischen den Transmembranproteinen und dem Actinzytoskelett. Zonula occludens 1 (ZO-1, 220 kDa) war das erste Protein überhaupt, welches als Bestandteil der TJ 1986 identifiziert und charakterisiert wurde [66]. Durch Co-Immunopräzipitation stieß man im Zusammenhang damit auf zwei weitere Moleküle, welche als Zonula occludens 2 (ZO-2, 160 kDa) und Zonula occludens 3 (ZO-3, 130 kDa) bezeichnet werden [61, 67]. ZO-1 und -2 kommen an endothelialen und epithelialen TJ vor, ZO-3 wird vermutlich epithelspezifisch exprimiert [68]. Die Proteine gehören zur membrane-associated guanylat kinase-like Familie (MAGUK). Charakteristisch für diese Moleküle sind drei N-terminale PDZ-Domänen, gefolgt von einer SH-3 und GUK-Domäne. Dieser Aufbau ermöglicht eine Interaktion mit fast allen Bestandteilen der TJ sowie mit wichtigen Proteinen des Zytoskeletts. So vermittelt PDZ2 die Bindung von wahlweise ZO-2 oder ZO-3 an ZO-1 [69]. Claudin kann ebenfalls an ZO-1 bis -3 binden, allerdings über die PDZ1-Domäne [70]. Darüberhinaus assoziiert ZO-1 mit JAM-A über PDZ2 und PDZ3 [71]. Occludin ist imstande mit allen ZO-Proteinen über die GUK-Domäne zu interagieren [34, 72, 73]. Cingulin kann ebenfalls an alle ZO-Proteine binden [74]. Funktionell stellen die Zonula occludens Proteine das Drehkreuz der TJ dar und spielen eine wichtige Rolle bei der Beeinflussung deren Permeabilität. So wurde gezeigt, dass ZO-1 und -2 unabhängig voneinander die Rekrutierung und Polymerisierung der Claudine an der TJ regulieren [75], welche das hauptsächlich permeabilitätsdefinierende

Element des Barrierekontaktes darstellen (s. 3.2.4). Des Weiteren wirken sich zahlreiche physiologische und pathophysiologische Stimuli durch Beeinflussung von ZO-1 auf die tight-junktionale Durchlässigkeit aus. Hierzu gehören die proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  [76] und IFN- $\gamma$  [77], welche jeweils eine Herunterregulation des Proteins mit konsekutiver Barrierschwächung verursachen. Aber auch Umwelteinflüsse, wie ionisierende Strahlung [59], können sich durch Repression von ZO-1 nachteilig auf die parazelluläre Permeabilität auswirken. Im Gegensatz dazu wurde bei einer Hochregulation des Proteins eine verminderte tight-junktionale Durchlässigkeit beschrieben [78-80]. Dies geschah im einzelnen durch Stimulation des enterischen Nervensystems, Aktivierung von TLR-2 und durch das Probiotikum *E. coli* Nissle 1917. Für ZO-2 könnte ebenfalls eine Korrelation zwischen Expressionslevel und Barriereichte vorliegen, zumal dessen Silencing eine Steigerung der parazellulären Durchlässigkeit sowie eine Störung der lateralen Diffusionsbarriere bewirkte [81]. Neben der Permeabilitätsbeeinflussung sind ZO-1 und -2 wichtig für die Entstehung der TJ. Dies zeigt sich durch ihre Fähigkeit die Claudine an die TJ zu rekrutieren und deren Polymerisation zu regulieren [75]. Darüberhinaus bilden ZO-1/ZO-2 defiziente Zellen gar keine TJ aus [75] und ZO-1 knock-out Zellen weisen eine deutlich verlangsamte TJ-Rekonstruktion nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Switch auf [82]. Die Rolle von ZO-3 bleibt zum derzeitigen Zeitpunkt noch weitestgehend ungeklärt, wobei weder ZO-3 defiziente Zelllinien noch entsprechende knock-out Mäuse phänotypische Auffälligkeiten erbrachten [83, 84]. Die parazelluläre Permeabilität blieb ebenfalls unbeeinträchtigt. Daraus ergibt sich vor allem für ZO-1 und -2 die Rolle zentraler Regulationsbausteine der TJ, welche nicht nur eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Barrierekontaktes spielen [75], sondern auch dessen Permeabilität entscheidend mitbeeinflussen [85]. Des Weiteren besitzen sie grossen Einfluss auf Schaltstellen innerhalb der Zelle, welche an der geordneten Proliferation und Differenzierung des Zellverbandes beteiligt sind [61, 62]. Dies lässt die ZO-Proteine als wichtige Funktionsträger sowohl innerhalb als auch ausserhalb der TJ mit Einfluss auf den gesamten

Zellverband erscheinen. Untersuchungen über die Regulation dieser zentralen Proteine erscheinen daher vor allem im Zusammenhang mit pathophysiologischen Stressoren sinnvoll, um das Verhalten der TJ in solchen Situationen besser verstehen zu können.

### **3.2.2 Cingulin**

Cingulin wurde erstmals 1988 als ein zytoplasmatischer Bestandteil der TJ identifiziert [86]. Hier gehört es zur subapikal gelegenen organisierenden Plaue der TJ und interagiert dort mit ZO-1, -2 und -3 [74], aber auch mit dem transmembranös gelegenen JAM-A [87]. Über eine Bindung mit Actin verbindet Cingulin die TJ mit dem Zytoskelett [88]. Funktionelle Untersuchungen in überexprimierenden Zellen erbrachten phänotypisch unauffällige TJs [89]. Cingulin-defiziente Zellen weisen morphologisch und funktionell intakte TJs im Vergleich zum Wildtyp auf, haben jedoch ein verändertes Expressionsmuster tight-junktionaler Proteine, was eine Rolle von Cingulin bei deren transkriptioneller Regulation suggeriert [90]. Des Weiteren existieren Hinweise auf dessen Beteiligung bei der epithelialen Differenzierung [90, 91], wobei das Silencing von Cingulin eine gesteigerte Rho-A Aktivität bewirkte, was zu vermehrter Zellproliferation und Erhöhung der Zelldichte führte. Unterstützt werden diese Daten durch die Beobachtung, dass Cingulin durch Bindung des Rho-A aktivierenden Faktors GEF-H1 in der Lage ist, den G1/S-Phasenübergang zu inhibieren [92]. Dies suggeriert, dass Cingulin über Rho-A abhängige Signaltransduktion an der Regulation der Zellproliferation beteiligt ist, wobei dessen Gehalt negativ mit der Teilungsaktivität zu korrelieren scheint.

### **3.2.3 Occludin**

Occludin (ca. 60kDa) war das erste Transmembranprotein, welches zunächst im Huhn [93], darauf im Säuger [94] mit der TJ in Verbindung gebracht wurde. Es wird durch Bindung an ZO-1 [72, 95], ZO-2 [34] und ZO-3 [73] mit der

subapikalen Plaque verankert, wodurch ein indirekter Kontakt mit dem Zytoskelett hergestellt wird. Funktionell scheint es die Permeabilität der TJ zu beeinflussen, zumal dessen Expressionslevel in vitro positiv mit der Dichte der TJ korrelieren [96-98]. Zusätzlich ist Occludin an der Etablierung selektiver parazellulärer Diffusion beteiligt, wobei eine Spezifität für gewisse Molekülgrößen nachgewiesen wurde [99], was dessen Beteiligung an der Bildung parazellulärer Kanäle suggeriert. Des Weiteren scheint es an der Aufrechterhaltung der lateralen Diffusionsbarriere zu partizipieren, wobei die experimentelle Expression einer Occludin-Mutante eine Vermischung apikaler und basolateraler Lipide bewirkte [99]. Trotzdem scheint es ein fakultativer Bestandteil der TJ zu sein, da es in vivo nicht in allen barrierebildenden Geweben exprimiert wird und Occludin-defiziente Mäuse morphologisch und funktionell intakte intestinale TJs im Vergleich zum Wildtyp aufweisen [100, 101]. Eine Funktion bei der Bildung der Barriere in manchen Geweben ist jedoch nicht vollständig auszuschließen [102]. Weiterhin existieren Hinweise auf dessen Mitwirken bei interzellulären Adhäsionsprozessen, wobei die extrazellulären Loops von Occludin mit einem unbekanntem Partner auf der gegenüberliegenden Zelloberfläche interagieren [103]. Letztlich scheint es an der Signaltransduktion sowohl extrazellulärer als auch intrazellulärer Impulse beteiligt zu sein [104]. Hierbei wurde gezeigt, dass Occludin sowohl an der Erkennung benachbarter apoptotischer Zellen partizipiert, als auch an einem Ausschluss dieser aus dem Zellverband, was vermutlich über eine Rho-vermittelte Reorganisation des Zytoskeletts geschieht.

### **3.2.4 Claudin**

Claudine wurden erstmals 1998 beschrieben [105]. Sie bilden eine große Familie integraler Transmembranproteine, wobei nach heutigem Kenntnisstand mindestens 24 verschiedene existieren. Ihre Hauptfunktion liegt in der Regulation der parazellulären Permeabilität. Hierbei zeigen zahlreiche funktionelle Untersuchungen, dass die gezielte Überexpression einzelner Claudine

(Claudin-1, -4, -7, -8, -15) zu einer Verstärkung der Barriere, gemessen an erhöhter TER oder vermindertem parazellulären Flux, führt [106-113]. Im Gegensatz dazu können Claudine auch eine Senkung der parazellulären Permeabilität bewirken, was im Fall von Claudin-2 gezeigt wurde [114, 115]. Der Mechanismus beruht auf der Bildung ladungs- [108, 111, 112, 116, 117] und größenspezifischer [118-120] parazellulärer Poren, wobei der letztendliche Permeabilitätsgrad vermutlich durch das Mischungsverhältnis der verschiedenen Claudine bestimmt wird. Deren Verteilungsmuster kann gewebespezifisch stark variieren. Hierbei exprimieren manche TJs nur eine Claudinform [121] andere hingegen mehrere [122], wobei für das intestinale Epithel bislang Claudin-1 [123, 124] und -4 [123, 125] nachgewiesen wurden. Reguliert werden sie durch zahlreiche Einflüsse wie Wachstumsfaktoren [126, 127] und proinflammatorische Zytokine [128], welche durch posttranslationale Phosphorylierung [53, 54, 129, 130] oder Regulation auf transkriptioneller Ebene [51, 52] Einfluß auf die tight-junktionale Permeabilität nehmen. Neben der Funktion als permeabilitätslimitierendes Element zeigten Furuse et al., dass Claudine vermutlich auch eine Rolle bei Entstehung der TJ spielen [131]: Nachdem Claudin-1 und -2 cDNA in Fibroblasten transfiziert wurde, welche selbst keine TJ besitzen, begannen diese spontan den Barrierekontakt auszubilden.

### **3.2.5 Junctional adhesion molecule (JAM)**

Die junctional adhesion molecules wurden erstmals 1998 beschrieben und gehören zu den integralen Transmembranproteinen der TJ [132]. Man unterscheidet insgesamt sechs Proteine, wobei sich deren Familie in zwei Untergruppen unterteilen lässt [133]: zum einen JAM-A, -B und -C und zum anderen der Coxsackie and Adenovirus Receptor (CAR), endothelial cell-selective adhesion molecule (ESAM) und JAM-4. Funktionell spielen sie eine Rolle bei der Bildung der TJ und Etablierung der apiko-basalen Zellpolarität [134]. Ebenfalls beeinflusst JAM-A die intestinale Permeabilität, was anhand

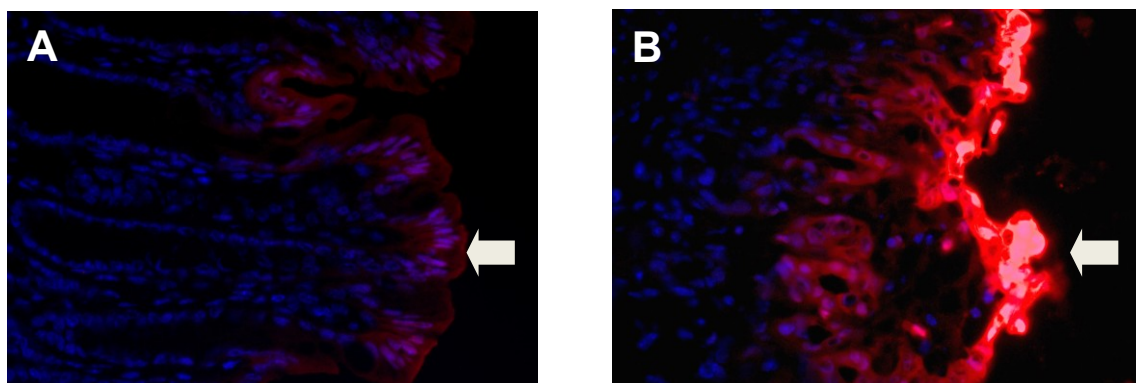


von knock-out Mäusen gezeigt wurde, welche einen gesteigerten parazellulären Flux aufweisen [135]. Des Weiteren zeigten mehrere Studien, dass JAM-A an der Regulation der Zellmigration beteiligt ist [136, 137]. Außerdem beeinflusst es sowohl das Recruitment als auch die Transmigration bestimmter Leukozyten (nach dem heutigen Kenntnisstand Monozyten und neutrophile Granulozyten) an Endo –und Epithelien [138]. Letztlich ist JAM-A für die physische und immunologische intestinale Barriere von zentraler Bedeutung, was durch Studien an JAM-A-defizienten Mäusen deutlich wurde, die eine erheblich gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber intestinalen entzündlichen Stimuli aufwiesen [135].

### **3.3 Schwächende und protektive Einflüsse auf die intestinale Barriere unter Hypoxie**

Bei zahlreichen schwerwiegenden Erkrankungen, wie systemischer Inflammation oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, steht die Kompromittierung der intestinalen epithelialen Integrität im Zentrum des pathophysiologischen Geschehens. Dabei begünstigt eine Störung der Barrierefunktion nicht nur die Krankheitsentstehung, sondern auch deren Aufrechterhaltung oder gar Dekompensation [2, 139, 140]. Damit im Zusammenhang stehend wurde von Meakins und Marshall 1980 der Begriff *“Darm als Motor des Multiorganversagens”* bei der Sepsis geprägt [141]. Dieser suggeriert ein Modell, in welchem intestinales Barriereversagen zum Austritt von Bakterien und bakteriellen Produkten aus dem Darmlumen führt, was in einer überschüssigen Aktivierung des Immunsystems, mit subsequenter Autointoxikation und Gewebeerstörung resultiert. Dieses Konzept unterstützend wird beim septischen Schock, mehr noch als bei anderen Schockformen (i.e. hypovolämischer Schock [142]), eine nachhaltige Störung der intestinalen Perfusion beobachtet [143, 144], was mit messbaren Störungen der intestinalen Funktion [145] und schlechtem Outcome assoziiert ist [146].

Parallel zur entzündlichen Komponente scheint Hypoxie eine wesentliche Rolle bei der Schwächung der intestinalen Barriere zu spielen [147-149]. Beide Zustände stehen im wechselseitigen Zusammenhang, wobei Inflammation bereits im frühen Erkrankungsstadium zur Beeinträchtigung der intestinalen Perfusion führt [144, 150] und dadurch die Entstehung einer epithelialen Sauerstoffschuld begünstigt. In diesem Kontext zeigten Karhausen et al. eindrücklich die Zunahme mukosaler Hypoxie bei akuter Hapten-induzierter Kolitis (Abb. 3.8B) [6], was mit deutlicher Störung der Vaskularisation einherging. Die Detektion des Sauerstoffmangels erfolgte hierbei mithilfe des Markers EF5, welcher in Abwesenheit adäquater  $O_2$ -Level vermehrt an zelluläre Makromoleküle bindet [151]. Bemerkenswert ist hierbei, dass bereits die gesunde Vergleichsgruppe eine latente auf das Epithel beschränkte Färbung aufwies (Abb. 3.8A), was eine relative Hypoxie des Darms auch unter physiologischen Bedingungen suggeriert. Letzere Beobachtung bestätigt sich durch Studien anderer Arbeitsgruppen [7, 8, 149, 152].

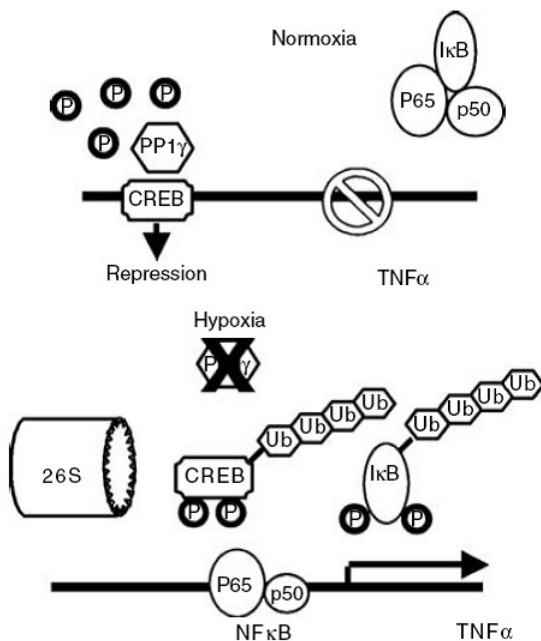


**Abb. 3.8:** Kolonschnitte von muriner TNBS-Kolitis. Immunolokalisation des Hypoxiemarkers EF5. (A) Kontrolle: Anreicherung von EF5 im Kolonepithel als Zeichen niedrigen  $pO_2$  (Pfeil). (B) TNBS-Kolitis: Intensive EF5-Immunofluoreszenz im Kolonepithel als Zeichen drastischer Hypoxie (Pfeil). (Abbildung aus [6])

Eine genauere Kenntnis über die Auswirkungen dieser physiologischen Hypoxie ist für die Identifikation adaptiv-protektiver Mechanismen auf die Barriere von grossem Interesse. Diese liefern eine mögliche Erklärung für die hohe Resistenz intestinalen Epithels gegenüber Hypoxie im Vergleich zu anderen barrierebildenden Geweben [147]. In diesem Zusammenhang wurden in den letzten Jahren zahlreiche Prozesse identifiziert, welche einen schützenden Effekt auf die Barriere haben (s. 3.3.2). Im folgenden sollen sowohl diese als auch barriereschwächende Einflüsse unter Hypoxie erläutert werden.

### **3.3.1 Barriereschwächende Wirkung von Hypoxie**

Bei Patienten mit CED, welche eine gesteigerte intestinale Permeabilität vor allem auf Ebene der TJ aufweisen [139, 153, 154], stellt das Bindeglied zwischen Inflammation und Hypoxie sehr wahrscheinlich ein entzündlich bedingtes Gefässremodelling dar. So finden sich bei Morbus Crohn bereits im frühen Stadium sowohl ein gesteigerter Gefässwiderstand [150] als auch Gefässstenosierungen [155], welche bei länger andauernder Erkrankung in eine signifikant reduzierte intestinale Perfusion münden [156] und somit die Entstehung einer Sauerstoffschuld entscheidend begünstigen. Darüber hinaus führen ein beeinträchtigt Ansprechen auf endogene Vasodilantien [157] und eine gesteigerte Expression endogener vasokonstriktiver Substanzen zu einer Verschärfung der Situation [158]. Dadurch kann der mukosale  $pO_2$  im akuten Stadium auf einen Wert unter 11mmHg abfallen [8]. Andererseits kann Hypoxie entzündliche Signalwege aktivieren bzw. inflammatorische Reaktionen verstärken und dadurch schädigend auf die Barriere wirken [159]. Hierbei scheint das cAMP response element binding protein (CREB) eine zentrale Rolle zu spielen, welches unter Hypoxie Gene proinflammatorischer Mediatoren (z.B. TNF- $\alpha$ ) induzieren kann [160]. Es bindet unter normoxischen Bedingungen in der Promotorregion entsprechender Gene an das cAMP response element (CRE) und dient als Genrepressor (Abb. 3.9) [160]. Unter Hypoxie kommt es zu dessen Abbau, wodurch dessen Funktion als Genrepressor entfällt und pro-

**Abb. 3.9:**

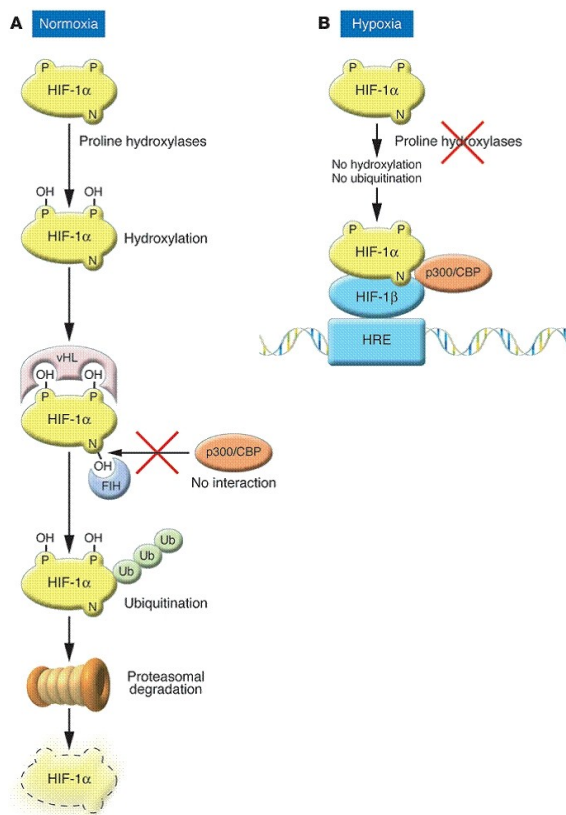
Hypoxischer phosphorylierungsabhängiger Abbau des cyclic adenosine monophosphate response element binding protein (CREB) und des Nuclear factor κB (NF-κB). In Normoxie befindet sich CREB in dessen nichtphosphoryliertem stabilen Zustand, was durch PP1γ aufrechterhalten wird. Hypoxie verursacht eine Aktivitätsminderung von PP1γ, wodurch CREB phosphoryliert, ubiquitiniert und abgebaut wird. Ebenfalls führt Hypoxie zur Degradation des inhibitorischen Faktors κB (IκB), was die Aktivierung von NF-κB bewirkt. (Abbildung aus [161])

inflammatorische Gene transkribiert werden [162]. Dieser Mechanismus spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der hypoxischen Induktion von membranständigem IL-8 auf intestinalem Epithel, was zur Aktivierung und Migration neutrophiler Granulozyten führt [163]. Dies setzt allerdings das gleichzeitige Vorhandensein des Proteoglykans Perlecan an der extrazellulären Matrix voraus, welches zur Verankerung dient und wahrscheinlich ebenfalls einer CREB-abhängigen Induktion unterliegt [163]. Die pathophysiologische Relevanz dieser Beobachtung liegt darin begründet, dass die Transmigration neutrophiler Granulozyten (PMN) durch das Epithel eine Schwächung der TJ bewirkt [164-167]. Sowohl die Transmigration als auch die Permeabilitätserhöhung wird durch Hypoxie signifikant verstärkt und schränkt die Fähigkeit zur Wiederherstellung der Barriere deutlich ein [168, 169]. Letztlich ist Hypoxie auch isoliert imstande, die parazelluläre Barriere zu schwächen [147-149]. Dies geschieht unter anderem durch die Bildung von Stressfasern, sowie Reorganisation des Zytoskeletts [170-172]. Ein weiterer Mechanismus stellt die HIF-1 vermittelte Herunterregulation von vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) dar [148]. Es spielt eine Rolle bei der

Bildung der TJ [85] und verbindet diese mit dem Zytoskelett durch Bindung an ZO-1 [173]. Hypoxie führt zu einer HIF-1 regulierten VASP-Repression mit begleitender Schwächung der parazellulären Barriere. Die Überexpression von VASP konnte diesen Effekt verhindern [148].

### **3.3.2 Barriereprotektive Einflüsse unter Hypoxie**

Ausgehend von der Beobachtung, dass intestinales Epithel eine signifikant höhere Widerstandsfähigkeit gegenüber Hypoxie als andere barrierebildende Epithelien besitzt [147], konnten in den letzten Jahren eine Reihe hypoxieregulierter Gene identifiziert werden, welche einen protektiven Effekt auf die Barriere haben. Zentraler Mediator dieses Adaptionsprozesses ist der hypoxia inducible factor 1 (HIF-1). Es handelt sich um einen heterodimeren Transkriptionsfaktor, bestehend aus einer sauerstoffregulierten  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$ ) und konstitutiv exprimierten  $\beta$  Untereinheit, welcher zur Per-Arnt-Sim (PAS) Familie der basic helix-loop-helix Proteine gehört [174]. HIF-1 $\alpha$  ist am besten charakterisiert und spielt eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion unter hypoxischen Bedingungen [175]. HIF-2 $\alpha$  wird nur in bestimmten Zelltypen exprimiert, unterliegt aber einer ähnlichen Regulation wie HIF-1 $\alpha$  [176, 177]. HIF-3 $\alpha$  dient vermutlich zur negativen Regulation der ansonsten HIF-induzierten Gene [178]. HIF-1 $\alpha$  wird hauptsächlich durch posttranslationale Modifikation reguliert (Abb 3.10). Hierbei kann unter normoxischen Bedingungen durch eisen –und sauerstoffabhängige Prolylhydroxylierung der oxygen-dependent degradation Domain das von Hippel-Lindau Tumorsupressorprotein (pVHL) an HIF-1 $\alpha$  binden. Dieses assoziiert wiederum mit dem E3 ubiquitin ligase Komplex, wodurch HIF-1 $\alpha$  proteosomalem Abbau zugeführt wird [179, 180]. Unter hypoxischen Bedingungen hingegen kommt es zur Stabilisierung der HIF-1 $\alpha$  Untereinheit mit Translokation in den Nukleus, wo sie den funktionellen Komplex mit HIF-1 $\beta$  bildet und weitere Kofaktoren bindet [181]. Dadurch kann der Transkriptionsfaktor an das hypoxia responsive element (HRE) des Zielgens



**Abb. 3.10:** Regulation von HIF-1.

**a) Normoxie.** O<sub>2</sub>-abhängige Prolinehydroxylasen hydroxylieren HIF-1α, wodurch pVHL binden kann. Dies bewirkt eine Ubiquitinierung mit anschließendem proteosomalem Abbau. Ebenfalls inhibiert FIH durch Asparaginhydroxylierung die Interaktion mit den Koaktivatoren p300/CBP.

**b) Hypoxie.** Prolinehydroxylasen sind inaktiv, Hydroxylierung und Ubiquitinierung bleiben aus, wodurch es zur HIF-1α Stabilisierung mit Translokation in den Nucleus kommt. Hier assoziiert es es mit HIF-1β und den Koaktivatoren p300/CBP, um über HREs die Transkription hypoxieinduzierter Gene zu beeinflussen. (Abbildung aus [182])

binden und dessen Expression beeinflussen. Ein weiterer Regulationsmechanismus besteht durch Asparaginhydroxylierung der C-terminal transactivation domain (CAD) von HIF-1α, mittels protein factor inhibiting HIF-1 (FIH-1) unter normoxischen Bedingungen [183]. Dadurch wird die Assoziation mit dem Kofaktor p300 verhindert, welches die Bindung des HIF-1 Komplexes and der HRE des Zielgens erschwert [184]. Auch diese Hydroxylierung findet unter Hypoxie nicht statt, wodurch die Bindungsaktivität von HIF-1α deutlich gesteigert wird. Untersuchungen bezüglich des Effekts von HIF-1 auf die intestinale Barriere zeigen, dass es am intestinalen Epithel für die Induktion eines hypoxieinduzierten barriereprotektiven Genclusters verantwortlich ist. Ein Bestandteil dessen stellt vermehrte Muzinproduktion dar. Muzine (MUC) sind glykosylierte Glykoproteine, welche entweder membranständig exprimiert oder luminal sezerniert werden [185]. Sie kommen an Epithelien vor und bieten neben mechanischer Protektion [9] auch Schutz

gegen bakterielle Invasion [10, 11]. MUC1 bis MUC4 werden kolorektal exprimiert [186, 187]. Unter Hypoxie konnte eine HIF-1 regulierte MUC3-Induktion gezeigt werden, was in Anbetracht dessen Funktion, für eine protektive Rolle dieses Proteins auf die intestinale Barriere unter Hypoxie spricht [188]. In derselben Studie wurde ebenfalls die Assoziation von MUC3 mit dem intestinal trefoil factor (ITF) beobachtet. Trefoil factors (TFF) sind muzinassozierte proteasefeste 7 bis 14kDa große Polypeptide, welche beim Menschen vorwiegend im Gastrointestinaltrakt vorkommen, wo sie regionenspezifisch gebildet werden: TFF1 findet sich hauptsächlich im Magen [189], TFF2 im Magen und in den Brunnerdrüsen des proximalen Duodenums [190] und TFF3 oder ITF im Darm [191]. Sie wirken cytoprotektiv und spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der mukosalen Homöostase [192, 193]. Außerdem weisen mehrere Studien darauf hin, dass MUC3 und ITF synergistisch protektiv auf das darunter liegende Epithel wirken [12-14]. Entsprechend zeigen ITF-knock-out Mäuse eine signifikant gesteigerte inflammatorische Reaktion auf intestinale entzündliche Stimuli im Vergleich zum Wildtyp [194]. Der Effekt konnte durch die Gabe von ITF deutlich gemildert werden. Diese Daten unterstützend zeigen Mäuse, welche den Faktor überexprimieren, eine ausgesprochen geringere Empfindlichkeit gegenüber mukosalen Noxen [195]. Darüberhinaus wird ITF über einen HIF-1 regulierten Mechanismus unter Hypoxie induziert, was sich protektiv auf die parazelluläre Barriere in vitro und in vivo auswirkte [147]. Vermehrte xenobiotische Clearance ist ein Phänomen bei chemotherapeutisch behandelten Tumoren, was auch als multi drug resistance (MDR) Phänotyp bezeichnet wird und zu Chemotherapieresistenz in einigen Tumoren führt [196]. Hierbei handelt es sich um die gesteigerte Expression des MDR1 Genproduktes P-glycoprotein (P-gp), ein ATP-abhängiges Transportprotein, welches xenobiotische Substanzen und somit auch Chemotherapeutika aus der Zelle heraus transportiert und deren Konzentrationen dadurch im subtoxischen Bereich hält [197]. Allerdings wird MDR1 P-gp auch in nicht-transformierten Geweben exprimiert, wie dem proximalen Tubulus, den kleinen Gallengängen, dem Pankreas und dem

intestinales Epithel [198]. Dieses Vorkommen an barrierebildenden Epithelien suggeriert eine bislang noch unbeachtete Rolle für MDR1 P-gp. Damit im Zusammenhang stehende Untersuchungen zeigten, dass es einer HIF-1 abhängigen hypoxischen Induktion unterliegt [199], was vermuten lässt, dass eine Sauerstoffschuld mit einem erhöhten Bedarf an Clearancemechanismen einhergeht und somit als adaptiver protektiver Prozess interpretiert werden kann. Hinweise darauf liefern Ergebnisse mit MDR1 knock-out Mäusen, welche eine spontane Kolitis entwickelten, die vermutlich auf einem Defekt der intestinalen Barriere mit gestörter Clearance ins Gewebe gelangter Antigene beruht [200]. Des Weiteren wurde in den letzten Jahren deutlich, dass gesteigerter Adenosinmetabolismus unter Hypoxie protektiv auf die parazelluläre Barriere wirken kann. Entscheidende Bestandteile dieses Mechanismus stellen die Ekto-Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase (CD39) und die Ekto-5'-Nukleotidase (CD73) dar. Es handelt sich um membrangebundene Enzyme, wobei ersteres ATP und ADP zu AMP phosphohydrolysiert [201] und letzteres AMP zu Adenosin [202]. Dies kann entweder membranständige Adenosinrezeptoren aktivieren [203] oder internalisiert werden [204]. Untersuchungen am intestinalen Epithel zeigten dabei einen schützenden Effekt von CD73 durch HIF-1 abhängige Induktion unter Hypoxie [149]. Hierbei wiesen Mäuse eine erhöhte parazelluläre Permeabilität bei gleichzeitiger CD73-Inhibition verglichen mit hypoxischen Tieren ohne Inhibition auf. Diese Daten unterstützend wurde an Endothelien gezeigt, dass gesteigerter Adenosinmetabolismus unter Beteiligung von CD39 und CD73 ebenfalls einen protektiven Effekt auf die parazelluläre Barriere besitzt [205]. Dabei führte in der posthypoxischen Phase aus PMN freigesetztes ATP (u.U. auch epitheliales ATP im Sinne von Parakrinie) zu einer vermehrten Bildung von Adenosin über HIF-1 induziertes CD39 und CD73. Dies bewirkt durch gesteigerte Signaltransduktion über den ebenfalls HIF-1 sensibel exprimierten Adenosinrezeptor A2BAR [205] einen Anstieg des intrazellulären cAMP und dadurch die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Diese spielt eine wichtige Rolle bei der Phosphorylierung von VASP, welches als Linkerprotein



zwischen dem Zytoskelett und der TJ durch Bindung an ZO-1 dient [85]. Dadurch beeinflusst die PKA sowohl die Organisation des Zytoskeletts als auch die TJ über die Phospho-VASP vermittelte Assoziation mit ZO-1 [206]. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass HIF-1, durch Induktion eines barriereprotektiven Genclusters, einen entscheidenden Beitrag zur hohen Resistenz intestinalen Epithels gegenüber Hypoxie leistet. Allerdings wurde dessen barriereschwächender Effekt durch VASP-Herunterregulation ebenfalls eindrücklich belegt [148]. Dies widerspricht der bisher als protektiv angesehenen Rolle von HIF-1 und suggeriert das Vorhandensein bislang noch unidentifizierter regulatorischer Faktoren.

### **3.3.3 Sonstige Einflüsse auf die Barriere**

Neben Hypoxie existieren diverse andere Einflüsse, welche sowohl protektiv als auch schädigend auf die intestinale Barriere wirken können. Zu letzteren zählen unter anderem entzündliche, infektiöse und immunogene Stimuli [207]. Klassisches Beispiel stellen die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen dar, welche als charakteristisches pathophysiologisches Merkmal eine gesteigerte intestinale Permeabilität aufweisen, was erstmals in vivo bei Morbus Crohn beschrieben wurde [139, 153]. Die Störung liegt auf Ebene der TJ [139, 154], wobei hier einerseits die direkte Beeinflussung tight-junktionaler Proteine und andererseits eine Actinomysionkontraktion als Pathomechanismus diskutiert werden. Letzteres wird durch Phosphorylierung der myosin II regulatory light chain (MLC) durch die myosin light chain kinase (MLCK) verursacht [208, 209]. Tatsächlich konnte eine erhöhte MLCK-Expression bei Patienten mit CED nachgewiesen werden [210]. Auslöser sind proinflammatorische Zytokine, welche im Verlauf der Entzündung vermehrt gebildet werden. So finden sich bei Patienten mit CED deutlich erhöhte IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  Spiegel in der Darmmukosa [211, 212]. Für beide wurde gezeigt, dass sie die Permeabilität der TJ erhöhen [55, 213-215], sowohl über Actinomyosinkontraktion [216], als auch durch direkte Beeinflussung tight-

junktionaler Proteine [123, 217]. Neben IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  werden ebenfalls die Interleukine IL-1 $\beta$ , IL-4 und IL-13 bei Patienten mit CED vermehrt exprimiert [218-221], wobei für alle ein barriereschwächender Effekt nachgewiesen wurde [128, 222, 223]. Diese Daten weisen auf ein komplexes Zusammenspiel diverser proinflammatorischer Zytokine hin, welche sowohl an der Induktion, als auch an der Aufrechterhaltung entzündlicher Antworten im Darm beteiligt sind und deren gemeinsame Endstrecke die Schwächung der intestinalen Barriere darstellt. Neben proinflammatorischen Zytokinen verfügen einige intestinale Pathogene über Mechanismen, die Funktion der Barriere zu stören. Dies kann durch Beeinflussung des Zytoskeletts oder durch direkten Angriff auf tight-junktionale Proteine geschehen, was letztlich in einer gesteigerten Permeabilität mündet. Ein Beispiel stellt *Clostridium difficile*, Verursacher der pseudomembranösen Kolitis, dar [57]. Dessen Wirkung beruht sowohl auf ZO-1 Dissoziation vom Zytoskelett [224], als auch auf direkter Störung des Zytoskeletts durch Beeinflussung von F-Aktin [225]. Ein weiteres Beispiel ist *E. coli*, welches eine Permeabilitätserhöhung ebenfalls durch Reorganisation des Zytoskeletts bewirkt [226-229]. *Clostridium perfringens* hingegen provoziert eine Barrierschwächung durch direkten Angriff auf die TJ, nämlich durch Entfernung von Claudin-3 und -4 [118]. Außerdem verfügen einige Viren über Mechanismen die intestinale Barriere zu schwächen, was anhand von Rotaviren gezeigt wurde [58]. Diese bewirken durch gestörte Verteilung von ZO-1, Claudin-3 und Occludin eine Schwächung der TJ. Diese Daten verdeutlichen, dass intestinale Pathogene und Inflammation einen großen Anteil des pathogenen Stresses ausmachen, welcher störend auf die Integrität der epithelialen TJ wirkt. Neben schädigenden Einflüssen, wurden zahlreiche protektive Stimuli auf die intestinale Barriere identifiziert. Es handelt sich dabei sowohl um endogene Mechanismen als auch um exogene Interventionen zur Unterbrechung der inflammatorischen Kaskade. So hat sich Infliximab, ein TNF- $\alpha$  Antikörper, als wichtiges Therapeutikum bei der Behandlung von Morbus Crohn [230] und Colitis ulcerosa [231] etabliert und ist nachweislich an der Wiederherstellung der Barriere beteiligt [232]. Ein weiteres

Standardtherapeutikum bei CED ist Sulfasalazin (SSA) [233]. Es inhibiert sowohl die Hochregulation der MLCK als auch die gesteigerte MLC-Phosphorylierung und verhindert dadurch die Barrierschwächung [234]. Zu den endogenen Mechanismen gehören unter anderem das antiinflammatorische Zytokin IL-10 [235, 236] und der Transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [56, 237], bei welchen jeweils ein schützender Effekt auf die Barriere gezeigt werden konnte. Dieser wird durch Minderung des permeabilitätserhöhenden Einflusses proinflammatorischer Zytokine (i.e. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) vermittelt. Letztlich wurde gezeigt, dass sich gesteigerter Adenosinmetabolismus, ähnlich wie unter Hypoxie, protektiv auf die epitheliale Barriere auswirken kann. So wirkt CD73 schützend auf das intestinale Epithel in einem Modell akuter Kolitis, wobei dessen Wirkung vermutlich IFN- $\alpha$ A abhängig vermittelt wird [238]. Mäuse, welche kein CD73 exprimieren, zeigten eine signifikante Herunterregulation von IFN- $\alpha$ A, begleitet von einem wesentlich schwerwiegenderen Krankheitsverlauf. Der Effekt konnte durch die Gabe rekombinanten IFN- $\alpha$ A teilweise umgekehrt werden. Diese Daten unterstützend, wurde die protektive Wirkung von CD73 ebenfalls am Endothel gezeigt, wobei von aktivierten neutrophilen Granulozyten freigesetztes AMP, durch CD73 zu Adenosin konvertiert wurde und der dadurch aktivierte Adenosinrezeptor A2B eine Senkung der parazellulären Permeabilität bewirkte [203]. Daran anknüpfend konnten die antiinflammatorischen Effekte diverser Adenosinrezeptoren mit deutlich vermindertem Gewebeschaden und geringerer Affektion der epithelialen Integrität gezeigt werden, was letztlich eine verminderte Beeinträchtigung der Barriere bedeutet [239-242].

## 4 Fragestellung

Der Darm und insbesondere dessen Mukosa sieht sich bereits unter physiologischen Bedingungen [6], aber vor allem in Situationen lokaler [8] oder systemischer Inflammation [145, 243] der Herausforderung niedriger Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt. Hierbei führen gestörte Perfusion und gesteigerter Metabolismus zur epithelialen Hypoxie [144, 156]. Dieser Zustand führt zur Kompromittierung der epithelialen Barriere, dessen zentrales permeabilitätslimitierendes Element die TJ darstellt [5]. Andererseits verfügt der Darm über adaptive Mechanismen, welche unter Hypoxie ein barrierschützendes Programm initiieren und dem intestinalen Epithel eine außergewöhnlich hohe Resistenz gegenüber Sauerstoffmangel verleihen (s. 3.3.2). Zentraler Mediator dieser Adaptionsprozesse ist der Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF-1) [175]. Obwohl bekannt ist, dass Hypoxie zu einer Schwächung der intestinalen Barriere führt und dagegen endogene protektive Mechanismen existieren, bleibt die direkte Auswirkung von Sauerstoffmangel auf die TJ noch zu weiten Teilen unverstanden. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es deshalb, ein besseres Verständnis sowohl über die architektonischen als auch funktionellen Veränderungen der TJ unter Hypoxie zu erlangen und die damit im Zusammenhang stehenden regulatorischen Mechanismen zu charakterisieren.

### 4.1 Ziele

#### 4.1.1 Spezifisches Ziel 1

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, funktionelle und strukturelle Veränderungen der Tight Junction unter Hypoxie zu charakterisieren. Dazu sollen **a)** funktionelle Untersuchungen Aufschluss über mögliche Veränderungen der Barrierefunktion unter Hypoxie geben und **b)** morphologische Studien Veränderungen in deren Architektur offenlegen.

### 4.1.2 Spezifisches Ziel 2

Zweites Ziel der Arbeit ist es, veränderte Expressionsmuster tight-junktionaler Proteine unter Hypoxie zu identifizieren und deren transkriptionelle Regulation im Hinblick auf HIF-1 zu evaluieren. Dazu sollen **a)** die Bestimmung veränderter Genexpression sowohl auf transkriptioneller als auch translationaler Ebene Aufschluss über hypoxieregulierte tight-junktionale Bestandteile geben und **b)** Promotorstudien Hinweise auf mögliche Regulationsprozesse liefern.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 T-84 / CaCo-2 Zellkultur und Hypoxie

#### Zellpassage und Medienwechsel

Die Zellen stammen von der American Type Culture Collection. Deren Passage erfolgte zweimal wöchentlich. Dazu wurde unter der sterilen Werkbank das alte Kulturmedium entfernt, die Zellen mit 10ml PBS<sup>-</sup> gewaschen und mit 4ml Accutase (10min bei 37°C) abgelöst. Nach Gabe neuen Kulturmediums wurden die Zellen auf drei oder vier neue Zellkulturflaschen (75cm<sup>2</sup>) verteilt und bei 37°C inkubiert. Der Medienwechsel erfolgte zweimal wöchentlich. *T84 Kulturmedium*: 500ml Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) + 25ml Fetal Calf Serum (FCS) + 5ml antibiotisch-antimykotische Lösung. *CaCo-2 Kulturmedium*: 500ml MEM + 100ml FCS + 5ml Natriumpyruvat + 5ml MEM-nicht-essenzielle Aminosäuren + 5ml antibiotisch-antimykotische Lösung. Vor Benutzung wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop auf Qualität und Konfluenzgrad überprüft. Beschädigte Kulturen wurden weder für Versuche noch zur weiteren Vermehrung benutzt. Vor experimenteller Verwendung

erfolgte die Ausplattierung auf 6cm oder 10cm Petrischalen mit einer Zelldichte von  $\sim 1 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>. Die Versuche wurden ausschließlich mit konfluenten Monolayern durchgeführt.

### **Einfrieren und Auftauen**

Die Zellen wurden nach Entfernung des Kulturmediums mit 10ml PBS<sup>-</sup> gewaschen und mit 4ml Accutase (10min bei 37°C) abgelöst. Darauf erfolgte die Suspension mit 20ml Kulturmedium und Zentrifugation bei 900rpm für 5–10min und einer Temperatur von 4°C. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellpellets wurden in Einfriermedium (5% DMSO + 95% Kulturmedium ohne Antibiotika) resuspendiert und in 3-5ml Aliquots in Kryotubes bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag erfolgte die Umsetzung der Behälter in flüssigen Stickstoff. Aufgetaute Zellen wurden vor Benutzung zweimal mit Kulturmedium gewaschen.

### **Hypoxie**

Konfluente Monolayer wurden entweder normobarer Hypoxie (1%O<sub>2</sub>, 99%N<sub>2</sub>; 24h, 48h; Invivo<sub>2</sub> 400 Hypoxia Workstation, Ruskinn) oder Raumluft ausgesetzt. Alternativ erfolgte die normoxische Aktivierung von HIF-1 in vitro mittels Inkubation in 1mM Dimethyloxaloylglyzin (DMOG; Enzo Life Sciences) für 24h.

## **5.2 Proben aus dem murinen Ganzkörper-Hypoxiemodell**

Hierfür standen Gewebe aus vorangegangenen Tierversuchen zur Verfügung. Dabei wurden sechs bis zehn Wochen alte Wildtypmäuse (BL/6/129, Taconic Germantown, New York USA) entweder normobarer Hypoxie für 4h (8%O<sub>2</sub>, 92%N<sub>2</sub>) oder Raumluft ausgesetzt. Dieser Versuchansatz war innerhalb der Arbeitsgruppe schon mehrfach erfolgreich zur Untersuchung sauerstoffsensibler Genexpression im Darm angewandt worden [6, 147, 149]. Veränderungen intestinaler Permeabilität wurden dabei mittels Fluoresceinisothiocyanat-

markiertem Dextran (FITC-Dextran), wie bereits zuvor beschrieben [147, 244], untersucht. Dazu wurde den Tieren per Sonde 60mg/100g Körpergewicht FITC-Dextran (4 kDa, Konzentration: 80mg/ml) gastral zugeführt und diese anschließend normobarer Hypoxie oder Raumluft ausgesetzt (vier bis sechs Tiere pro Gruppe). Nach Euthanasie erfolgte die Punktion des Herzens, wobei das Serum zur weiteren Analyse verwendet wurde (Lagerung bei -80°C). In diesem wurde die Fluoreszenz gemessen (Cytofluor 2300, Millipore Corp.) und entsprechende FITC-Dextran-Konzentrationen anhand einer Standardkurve ermittelt, welche zuvor aus einer Verdünnungsreihe hergestellt wurde. Den parazellulären Flux errechneten wir mittels linearer Regression aus der gemessenen Fluoreszenz (Microsoft Excel, [165]). Die intestinale bakterielle Translokation wurde ebenfalls unter Verwendung des oben genannten murinen Ganzkörperhypoxie-Modells mittels Limulus Amebocyte Lysate Assay (LAL; WCL-1000, Cambrex) ermittelt. Nach Euthanasie erfolgte die sterile Blutentnahme durch Punktion des Herzens und Abzentrifugation korpuskulärer Bestandteile (Lagerung des Serums in LPS-freien Behältern bei -80°C). Der anschließende Assay wurde gemäß beiliegender Anleitung durchgeführt, wobei es sich hier um einen quantitativen Endotoxinnachweis handelt. Dabei katalysiert das Endotoxin die Aktivierung eines Proenzymes, welches im LAL enthalten ist. Das aktivierte Enzym katalysiert die Freisetzung von p-Nitroanilin von einem synthetischen Substrat, woraus eine Gelbfärbung resultiert. Diese wurde, nach Stoppen der Reaktion, photometrisch bei 405nm - 410nm gemessen (Ultrospec 3000 pro, Biochrom LTD-Cambridge), wobei eine lineare Korrelation zwischen Absorption und Endotoxin-Konzentration besteht. Die Eichung erfolgte mittels Eichkurve eines im Kit enthaltenen LPS-Standards. Schliesslich stand für unsere Untersuchungen noch die epithelial angereicherte Fraktion von Mäusedärmen zur Verfügung, welche ebenfalls aus oben benanntem Modell entnommen wurde. Deren Gewinnung erfolgte durch mechanisches Abkratzen der mukosalen Oberfläche mit einem stumpfen Spatel. Anschliessend wurde die Zellmasse in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Isolierung von Protein und RNA erfolgte wie bei den

Zellkulturen (s. 5.4 und 5.7) mit dem Unterschied, dass bei der initialen Lyse besonderer Wert auf schnelle und vollständige Durchmischung der Probe durch kräftiges Pipettieren gelegt wurde. Ein Tierversuchsantrag zur hypoxischen Exposition von Mäusen und deren Euthanasie zur Probengewinnung war von der institutionellen Kontrollstelle und vom Regierungspräsidium für ein anderes Projekt der Arbeitsgruppe bereits genehmigt worden. Bei diesem Projekt griffen wir ausschliesslich auf gelagertes Material zurück, nachdem dessen experimentelle Aufarbeitung entsprechend dem ursprünglichen Tierversuchsantrag abgeschlossen war.

### **5.3 Freeze-Fracture Elektronenmikroskopie**

CaCo-2-Zellen wurden auf semipermeablen Membranen (3µm Porengrösse) zu einem konfluenten Monolayer angezüchtet und anschliessend normobarer Hypoxie (1%O<sub>2</sub>, 99%N<sub>2</sub>; 24h) oder Raumluft ausgesetzt. Daraufhin erfolgte die Fixierung durch zweistündige Inkubation in 2,5% Glutaraldehyd und Überführung in 0,1m Cacodylatpuffer (pH 7,4). Zusammen mit Herrn Prof. Dr. rer. nat. Hartwig Wolburg vom Institut für Pathologie der Universität Tübingen wurden diese Zellen dann per Freeze-Fracture-Elektronenmikroskopie weiter untersucht. Dazu wurden die Zellen nach Fixation in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Darauf wurde der gefrorene Zellblock aufgebrochen, wobei die Frakturlinie entlang natürlicher Schwachpunkte, wie der doppelschichtigen Plasmamembran, verlief. Dann wurde die Oberfläche durch Sublimation des Eises geätzt. Nun erfolgte die Bedampfung der Oberfläche mit Platin-Kohlenstoff, wodurch ein Oberflächenabdruck entstand. Anschliessend wurde sämtliches organisches Material durch Säureverdauung entfernt, sodass nur der Abdruck übrig blieb. Dieser wurde unter einem Transmissionselektronenmikroskop betrachtet.



## 5.4 RNA Isolation

Die RNA-Isolation aus Zellkulturen wurde mittels NucleoSpin RNA-II-Kit (Macherey-Nagel) entsprechend beiliegender Anleitung durchgeführt. Nach Eluierung der RNA erfolgte deren photometrische Konzentrationsbestimmung (260nm; Ultrospec 3000 pro, Biochrom LTD-Cambridge). Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

## 5.5 Reverse Transkription

Die reverse Transkription von RNA in DNA wurde mittels iScript-cDNA-Synthese-Kit (Bio-Rad) im Thermocycler (Cyclone 25, PeqLab Biotechnologie GmbH) entsprechend beiliegender Anleitung durchgeführt. Die transkribierte DNA wurde mit 60µl RNase-freiem Wasser auf eine Menge von 0,0125µg verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

## 5.6 Real-time PCR

Die real-time PCR wurde verwendet, um die mRNA-Expression entsprechender Zielgene zu bestimmen. Jede Kavität (96-Well-Platte) enthielt 4µl cDNA, 7,5µl nuclease-freies Wasser, 12,5µl SybrGreen (Biorad) und 1µl Sense/Antisense Primermix (Thermo Electron). Folgendes Temperaturprotokoll wurde programmiert (iCycler, Biorad): 1 x 95°C für drei Minuten (initiales Schmelzen), 95°C für 30 Sekunden (Schmelzen), Primerannealing für 30 Sekunden entsprechend der ermittelten Temperatur, 72°C für 30 Sekunden (Amplifikation), 1 x 95°C für eine Minute. Die optimale Annealingtemperatur wurde anhand eines Temperaturgradienten ermittelt. Die Spezifität jeder Reaktion wurde durch Schmelzkurvenanalyse überprüft. Jeder Primer wurde auf Spezifität mittels Gelelektrophorese in einem 2% Agarosegel durch Ethidiumbromidfärbung (5µg/ml) getestet.

Verwendete Primer:

Humanes  $\beta$ -Actin:

Sense : 5' - GGT GGC TTT TAG GAT GGC AAG - 3'

Antisense : 5' - ACT GGA ACG GTG AAG GTG ACA G - 3'

Humanes ZO-1

Sense : 5' - TGA GTA CGT TGT GCA TTT GG - 3'

Antisense : 5' - AGA ACA AAA GTG GTA TGC ACG - 3'

Humanes ZO-2

Sense : 5' - CTG TTG TCA ATA CAT GTG CTT TTG - 3'

Antisense : 5' - GCT TGA AGC CCA AGA AGT TG - 3'

Humanes ZO-3

Sense : 5' - CCG ACA TTG CTA TGC AGA AG - 3'

Antisense : 5' - ACA TAG TTG AGG CGC TCG AT - 3'

Maus  $\beta$ -Actin:

Sense : 5' - CCC AAC TTG ATG TAT GAA GG - 3'

Antisense : 5' - TTT GTG TAA GGT AAG GTG TGC - 3'

Maus ZO-1

Sense : 5' - TTA ACG GAG CTG AGC AGA CT - 3'

Antisense : 5' - AAC TCT GGA GGC TGT GTT GA - 3'

Maus ZO-2

Sense : 5' - CAC TCG AAG CGT GGT TAC TA - 3'

Antisense : 5' - GTA ACT CAT GCC GTC TGT TG - 3'

### Maus ZO-3

Sense : 5' - TAG GAC CAG TGG CAG ACA TT - 3'

Antisense : 5' - ATC CAG TGC GTG CTT AT - 3'

## **5.7 Western Blot**

Konfluente Monolayer wurden für 20min mit 500µl Lysepuffer (RIPA-Puffer Kit + Proteaseinhibitoren; Roche) auf Eis inkubiert und der Zelldebris anschließend bei 12000rpm für 20min abzentrifugiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Advanced Protein Assay (Cytoskeleton) entsprechend beiliegender Anleitung, an die sich die Normalisierung auf eine einheitliche Konzentration anschloss. Nach Zugabe des Sample Buffers (1x; Invitrogen), wurden die Proben für 10min bei 70°C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 1h 30min bei 110V. Dafür wurde die Kammer (Electrophoresis chamber x-Cell sure lock, Invitrogen) mit NuPAGE MES SDS Laufpuffer (Invitrogen) gefüllt und die Proben in ein 10 oder 12 Kavitäten NuPAGE Novex Bis-Tris Gel 4-12% (Invitrogen) überführt. Rainbow und Magic Marc (jew. Invitrogen) dienten als Laufstandard. Anschließend erfolgte der Transfer auf PVDF-Membranen (Biorad), welche zuvor in Methanol für drei Minuten inkubiert wurden, mittels einer mit NuPAGE Transferpuffer (Invitrogen) gefüllten Transferkammer (Blotting chamber Trans Blot Cell, Biorad) bei einer Spannung von 110V für 1h 30min. Die freien Bindungsstellen der PVDF-Membran wurden mit 5% Magermilch (TBST 0,1% + Magermilchpulver) durch einstündige Inkubation geblockt. Die Behandlung mit dem Primärantikörper (ZO-1 (Zymed): 2µg/ml, ZO-2 (US Biological): 3µg/ml, ZO-3 (Zymed): 2µg/ml) erfolgte gelöst in 5% Magermilch über Nacht bei 4°C. Überschüssiger Antikörper wurde am nächsten Tag durch dreimaliges Waschen der Membran mit TBST (0,1%) für jeweils zehn Minuten entfernt. Darauf folgte die Inkubation mit einem hrp-konjugierten Sekundärantikörper (goat-anti-rabbit/mouse-IgG: hrp 1:5000; Pierce) für 1h. Nach erneutem Waschen erfolgte

die Bandendetektion mittels Chemilumineszenz (Super Signal West Pico Chemiluminescence Substrate, Pierce; Camera Diana, Raytest). Zur Kontrolle gleicher Gelbeladung wurde die Membran anschließend von gebundenen Primär -und Sekundärantikörpern gestrippt (Strippingpuffer für 15 min; Pierce) und auf der gleichen Membran eine erneute immunhistochemische Darstellung der Aktinbande (Antikörper Abcam) durchgeführt.

## **5.8 Immunhistochemie**

Die verwendeten T-84-Zellkulturen wurden zunächst für 10min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in Methanol fixiert. Darauf erfolgte deren Permeabilisation mittels einminütiger Inkubation in Azeton bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Anschliessend wurden die Zellen dreimal mit  $\text{PBS}^-$  gewaschen. Dann wurden die Kulturen zehn Minuten mit  $100\mu\text{l}$  Blocking-Reagenz (5% Magermilch in TBST 0,1%) inkubiert. Nun erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (rabbit anti-ZO-1 (Zymed): 1:50 in  $100\mu\text{l}$  Blocking-Reagenz) für 30-60min bei Raumtemperatur. Anschliessend dreimaliges Abwaschen des überschüssigen Antikörpers mit  $100\mu\text{l}$   $\text{PBS}^-$ . Darauf erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (goat-anti-rabbit IgG (Pierce) 1:1000 in  $100\mu\text{l}$  Blocking-Reagenz) für 30-60min bei Raumtemperatur unter Verdunkelung. Anschliessend dreimaliges Abwaschen des überschüssigen Antikörpers mit  $100\mu\text{l}$   $\text{PBS}^-$ . Abschliessend eindeckeln mit Gold Antifade (Invitrogen), welches die nukleäre Gegenfärbung mit DAPI bereits enthielt. Die bildliche Darstellung erfolgte mittels Laser-Scanning-Mikroskop.

## **5.9 Promoteranalyse**

Die ZO-1 Promotersequenz wurde durch Gene2Promoter-Software (Genomatix) ermittelt. Eine Analyse potentieller Transkriptionsfaktor-bindungsstellen erfolgte mittels MatInspector-Software (Genomatix).

## 5.10 ZO-1 Promoterkonstrukt und Reporterassay

Zur Erstellung eines ZO-1-Promoterkonstruktes erfolgte die Promoteranalyse mit Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes (TSP) durch die EIDorado-Software (Genomatix) wie zuvor beschrieben [245]. Die proximale Promoterregion wurde dabei 500 Nukleotide upstream und 100 Nukleotide downstream des TSP definiert (siehe Abb 6.9). Der TSP wurde anhand einer in EIDorado integrierten 5'-cap-Struktur Lokalisationsdatenbank ermittelt. Der berechnete Promoter zeigte sich dabei aufgrund seines hohen GC-Gehaltes herkömmlichen Methoden der Klonierung gegenüber sehr resistent. Schliesslich gelang dessen Herstellung unter Verwendung des GC-Rich PCR-System (Roche), welches für solche Regionen eine geeignete Enzym -und optimierte Puffermischung enthält (Taq-DNA-Polymerase und Tgo-DNA-Polymerase mit Proofreading-Aktivität (3'-5' Exonuklease)). Zunächst wurde über eine PCR-basierte Methode ein Wildtyp ZO-1 Promoterkonstrukt hergestellt. Dazu verwendeten wir folgende Primer:

Sense: 5' - **GCG CGC TAG C**TT GGA GGG ACA GCA TTG GAA - 3'

(bp 538-558 des ZO-1 Genes; Genebank Accession Number: DQ015919.1)

Antisense: 5' - **CGC GAG ATC T**GG ACA TCT TGT CTC TCT CCA GCG C - 3'

(bp 1747-1770 des ZO-1 Genes; Genebank Accession Number: DQ015919.1)

Diese Primer enthalten neben der zum Forward- bzw. Reverse-Strang komplementären Sequenz, jeweils am 5'-Ende eine nicht komplementäre Sequenz, an welche ein Restriktionsenzym binden kann (Sense: NheI, Antisense: Bgl II; in der Primersequenz jeweils gelb markiert), sowie einen aus 5'-GCGC-3' bestehenden Schwanz (in der Primersequenz rot markiert). Die somit eingeführte Restriktionsenzymstelle wurde für das Klonieren in die Multiple Cloning Site des pGL4.17 Plasmids genutzt. Die Auswahl der Enzyme erfolgte aufgrund ihrer Stellung im Plasmid, der Tatsache, dass der Verdau in

einem Ansatz durchgeführt werden konnte, sowie der Nicht-Kompatibilität der „sticky-ends“. Letzteres verhinderte eine unerwünschte Ringbildung des PCR-Produktes nach Verdauung. Die 5'-GCGC-3' Sequenz diente lediglich als „Spacer“, um eine bessere Effizienz der Restriktionsenzyme zu gewährleisten, welche bei endständigen Erkennungssequenzen häufig schlecht schneiden. Mit diesen Primern wurde, unter Verwendung von CaCo-2-DNA als Template, eine PCR durchgeführt, wozu sich eine Annealingtemperatur von 68°C als optimal erwies. Das Produkt dieser Reaktion wurde anschliessend über eine Gelelektrophorese aufgetrennt und somit von freier DNA und nicht aufgebrauchtem Primer bereinigt. Zur Isolierung aus dem Agarosegel, verwendeten wir das Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Diese DNA wurde anschliessend mit den Enzymen NheI und Bgl-II im NEB-Puffer-2 (jew. New England Biolabs) verdaut und erneut über ein Agarosegel aufgereinigt. Parallel wurde das naive Plasmid pGL4.17 unter Verwendung oben genannter Enzyme ebenfalls verdaut und über ein Agarosegel aufgereinigt. Nach erneuter Isolierung der jeweiligen DNA wurden die Fragmente nun ligiert. Hierbei verwendeten wir ein molares Verhältnis von 1:1 zwischen Plasmid- und PCR-DNA-Fragment, welches wir wie folgt berechneten:

$$\text{ng DNA fragment} = (1243 \text{ bp DNA fragment}) \times (50\text{ng cloning vector}) / (5599 \text{ bp cloning vector}).$$

Die Ligation wurde mit T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) unter Verwendung des dazugehörigen Puffers (enthält für die Reaktion notwendiges ATP), sowie zusätzlich drei Anteilen PEG 8000 (Sigma-Aldrich) zur erleichterten Interaktion der Reaktionsträger durchgeführt. Die Reaktion wurde über Nacht bei 14°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Transformation in XL-10 Gold kompetenten Zellen (Stratagen) nach Anweisungen des Herstellers. Transformierte Bakterien wurden über Nacht auf Ampicillin-haltigen Agarplatten bebrütet und einzelne Kolonien am Folgetag in 5ml Ampicillin-haltigen

Flüssigagar eingebracht. Nach erneuter Inkubation bei 37°C über Nacht auf dem Schüttler, wurde dann ein Miniprep mittels QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gewonnen. Zur Identifizierung einer erfolgreich eingebrachten ZO-1-Promotersequenz, wurde ein Teil des Minipreps wieder einer enzymatischen Verdauung unterzogen. Das dabei verwendete Enzym Kpn-I (New England Biolabs) ist auf der Vektorsequenz einmalig und dient somit zur Linearisierung der DNA und damit eindeutiger Grössenbestimmung. Letztere erfolgte im Agarosegel im Vergleich zu naivem, Kpn-I-verdautem Vektor, sowie einer DNA-Leiter (1kb plus DNA-Ladder; Invitrogen). Nach dieser Kontrolle erfolgte eine weitere Überprüfung der Sequenzierung des eingeführten DNA-Fragments. Erst nach diesen Kontrollen wurde das nunmehr verifizierte ZO1-PGL4.17-Plasmid erneut mittels Transformation in oben genannte kompetente Zellen eingebracht und auf Ampicillin-haltigen Agarplatten angezüchtet. Eine davon erhaltene Kolonie wurde dann in 500ml Ampicillin-haltigen Flüssigagar bebrütet. Mittels Maxiprep (Qiagen) wurde dann aus diesem Ansatz das für die Experimente verwendete Plasmid aufgereinigt. Zum Ausschluss von LPS, welches häufig eine Verunreinigung in Plasmidpräparationen verursacht, wurden alle unsere Maxipreps nach Abschluss des vom Hersteller empfohlenen Vorgehens noch einmal einer Phenol/Chloroform-Aufreinigung unterzogen. Dazu wurde zu der Plasmidlösung jeweils ein Volumen Phenol gegeben und durchmischt. Nach Zentrifugation wurde die obere Phase vorsichtig abpipettiert und mit einem Volumen Chloroform-Isopropyl-Lösung (24:1) versetzt, gemischt und 10min auf Eis gelagert. Nach erneuter Zentrifugation wurde wieder die obere Phase vorsichtig abpipettiert und mit 1/10 Volumen 3M-Natrium-Azetat und zwei Volumen 100% Ethanol gemischt und über Nacht bei -80°C gelagert. Nach Zentrifugation wurde das Präzipitat zweimalig mit 75% Ethanol gewaschen und in TE-Puffer (pH 8.0) gelöst. Die Plasmidkonzentration wurde spektrophotometrisch (DU700 Spectrophotometer, Beckman Coulter) bestimmt. Dazu wurde in einer Küvette 1µl des Plasmidgemisches mit 99µl H<sub>2</sub>O gemischt und die Absorption bei 260nm und 280nm bestimmt. Das Verhältnis dieser

Absorptionen gibt dabei Auskunft über die Reinheit der DNA-Lösung. Für reine DNA wird dabei ein Absorptionverhältnis von 1.8 - 2.0 verlangt, während bei einem niedrigeren Verhältnis eine signifikante Kontamination durch Phenol oder Proteine anzunehmen ist. Die Absorption bei 260nm ermöglicht die Berechnung der DNA-Konzentration basierend auf der Tatsache, dass bei einer  $OD_{260}$  von 1.0 die Doppelstrang-DNA-Konzentration 50 $\mu$ g/l beträgt. Die Berechnung der Konzentration in ng/ $\mu$ l erfolgt also gemäss folgender Gleichung:

$$OD_{260} * 50 \text{ ng/ul} * 100 \text{ (Dilutionsfaktor)}$$

Für die Punktmutation der postulierten HIF-1 $\alpha$ -Bindungsstelle verwendeten wir ebenfalls das ZO-1-pGL4.17-Konstrukt als Wildtyp-Grundlage. Diese wurde mittels Quickchange Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach Angaben des Herstellers eingeführt, wobei sich erneut der hohe GC-Gehalt des Konstrukts als problematisch erwies. Nach ausgiebigen Optimierungsversuchen, konnten wir schliesslich unter erneuter Zuhilfenahme des GC-Rich-PCR-Systems (Roche), eine erfolgreiche Mutation der Zielsequenz durchführen. Aus letzterem benutzten wir ebenfalls den Puffer bei der Anwendung des Mutagenese-Kits, welcher unter anderem eine höhere Magnesium-Konzentration enthält. Bei dem Quickchange Kit werden über eine PCR Punktmutationen in die replizierten Kopien des Vektors eingebracht und der Originalvektor dann enzymatisch abgebaut, da er aufgrund seiner Methylierungen von einem eingebrachten Enzym spezifisch erkannt wird. Es wurden folgende Primer verwendet:

Sense: 5' - GGC CGC CGG TTC CCG GGA AGT TAC ATA GCG AAG CCG  
GCT TCC GAG GA - 3'

Antisense: 5' - TCC TCG GAA GCC GGC TTC GCT ATG TAA CTT CCC GGG  
AAC CGG CGG CC - 3'



Dadurch wurde die Originalsequenz der HIF-1-Bindungsstelle ( +113 bis +116 ausgehend vom TSP (Abb. 6.9)) wie folgt verändert:



Diese Veränderung bewirkte in der Promoteranalyse mittels Matinspektor (Genomatix) einen Verlust der HIF-1 Bindungsstelle, ohne ersichtliche Generierung einer Interaktionssequenz für einen anderen Transkriptionsfaktor. Die PCR wurde nach Angaben des Herstellers wie folgt durchgeführt: 30sec bei 95°C, gefolgt von 16 Zyklen bestehend aus 30sec bei 95°C, 1min bei 55°C und 6min bei 68°C. Nach Abschluss der Reaktion wurden 10U/µl des Restriktionsenzym Dpn-1 zugegeben und eine Stunde inkubiert. Dpn-1 behandelte DNA der Mutation sowie der empfohlenen Kontrollen wurden dann zur Transformation in XL1-Blue supercompetent cells (Stratagen) eingesetzt. Transformierte Bakterien wurden auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden dann in 10ml Ampicillin-haltigem Flüssigagar angezüchtet und zur Herstellung von Minipreps verwendet. Diese wurden anhand des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gewonnen. Nach Verifikation einer DNA-Bande im erwarteten Zielbereich von 6842bp (5599bp pGL17.4, sowie 1243bp ZO-1 Promotersequenz) in der Agarose-Gelelektrophorese wurde das Vorhandensein des klonierten Abschnitts und die tatsächliche Sequenz im Mutationszielbereich durch Sequenzierung bestätigt [148]. Als Positivkontrolle für Hypoxie transfizierten wir ein pGL4-basierendes HRE-Plasmid, welches seine Promotersequenz aus der 3'-Region des EPO-Genes herleitet und vier repetitive HIF-1 responsive elements enthält [246]. Zur Negativkontrolle verwendeten wir ein pGL4.17-Leerplasmid ohne ZO-1 Promoter, um dessen unspezifische Aktivierung durch die Versuchsbedingungen auszuschliessen. Alle Plasmide für Zellversuche wurden mittels Maxiprep (Qiagen) gewonnen, über Phenol/Chloroform-Extraktion wie oben beschrieben aufgereinigt und nach Konzentrationsbestimmung auf 0.5µg/µl verdünnt. Bei allen Versuchen

wurde als interne Kontrolle neben dem Luciferase-Plasmid ein Renilla-Plasmid (pRL-CMV) transfiziert. Diese Kontrolle ermöglicht eine Normalisierung der Luciferaseaktivität bezogen auf die konstitutiv exprimierte Renilla-Aktivität und macht die Messungen daher unabhängig von der Transfektionseffizienz (sollte jeweils für Renilla- und Luciferase-Konstrukte gleich sein) und Zellzahl im Versuch. Die Transfektion erfolgte mittels Lipofectamine 2000 (Invitrogen) entsprechend beiliegender Anleitung. Zur Messung der Luciferase-Aktivität wurde das Dual-Glo<sup>®</sup> Luciferase Assay Kit (Promega) entsprechend beiliegender Anleitung verwendet. Dieser Assay misst zunächst die Luciferase-Aktivität. In einem zweiten Puffer ist sowohl ein Quencher für das Luciferasesignal enthalten, als auch das Substrat für Renilla, sodass beide Aktivitäten spezifisch in einem Ansatz gemessen werden können.

### **5.11 HIF-1 überexprimierende CaCo-2**

Der Einfluss von HIF-1 wurde anhand von stabil HIF-1 überexprimierenden CaCo-2 Zellen untersucht. Zu deren Herstellung wurde ein lentiviraler Vektor (HIV-1) verwendet [247]. Dabei wurde eine sauerstoffstabile  $\Delta$ ODD Variante von HIF-1 (enthält Alanin statt Prolin an Position 564) [247] in den Vektor geklont und in T-Zellen zur Virusreplikation transfiziert. Darauf wurden CaCo-2 Zellen in den viralen Überstand überführt und so infiziert. Anschliessend erfolgte die Kultivierung der CaCo-2 Zellen in Standardmedium wie unter 5.1 beschrieben.

### **5.12 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)**

Die Chromatin-Immunopräzipitation erfolgte mit konfluenten Wildtyp T-84-Monolayern mittels Imprint Chromatin Immunoprecipitation Kit (Sigma-Aldrich) entsprechend beiliegender Anleitung. Die Zellen wurden normobarer Hypoxie

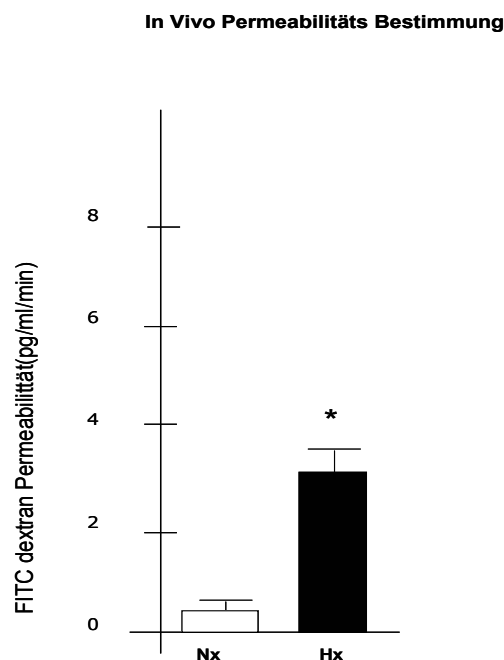
(1%O<sub>2</sub>, 99%N<sub>2</sub>; 24h) oder Raumluft ausgesetzt. Nach anschliessender Fixation erfolgte die Lyse und Abzentrifugation des Zelldebris. Die im Überstand enthaltene DNA wurde durch Ultraschall auf eine Länge von 200-1000 bp geschnitten. Darauf erfolgte die Überführung der Proben in ein zuvor mit 5µg HIF-1alpha Antikörper (Novus Biologicals) beschichtetes Reaktionsgefäß. Nach Inkubation erfolgte das Auswaschen des nicht-antikörpergebundenen nukleären Lysates. In der zurückbleibenden Probe wurde anschließend die Protein-DNA-Bindung gelöst. Die somit über ihre HIF-1-Interaktion immunopräzipitierte DNA konnte nunmehr isoliert und mittels spezifischer Primer gegen Sequenzen des ZO-1 Promoters amplifiziert werden. Dabei wurden die Primer so gewählt, daß der 215bp lange Abschnitt des ZO-1 Promoters eingeschlossen wurde, der nach Computeranalyse der Promotersequenz (MatInspector, Genomatix) zwei potentielle HIF-1 Bindungsstellen beinhaltet.

Primer:       Sense: 5' - CCG CCT CGC CTC GCC TC - 3'  
              Antisense: 5' - CGC CCG TCA GCA GCA CCC - 3'

Zur Positivkontrolle wurden verwendet: PCR mit gesamter T-84 genomischer DNA. Negativkontrolle: Immunopräzipitation mit einem nicht spezifischen Antikörper (IgG) und Immunopräzipitation mit Protein G Sepharose Beads allein.

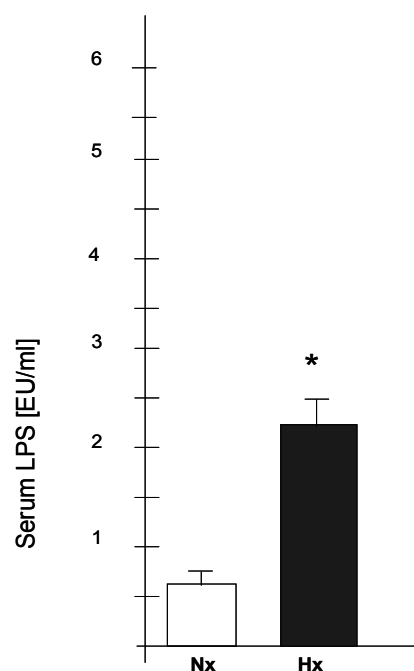
## 6 Ergebnisse

Hypoxie ist ein kritischer pathophysiologischer Faktor, welcher sowohl isoliert als auch im Zusammenhang mit Inflammation in der Lage ist, die intestinale epitheliale Integrität zu kompromittieren (s. 3.1.1). Dabei sind die Konsequenzen entzündlicher Reaktionen auf die Barriere bereits gut charakterisiert, die hypoxischen Veränderungen hingegen bleiben noch zu grossen Teilen unverstanden. Daher untersuchten wir zunächst die funktionellen Auswirkungen von Hypoxie auf die intestinale Barriere anhand eines murinen Ganzkörperhypoxie-Modells mittels 4kDa FITC-Dextran Assay. Dieser spiegelt Veränderungen der intestinalen parazellulären Permeabilität wider.



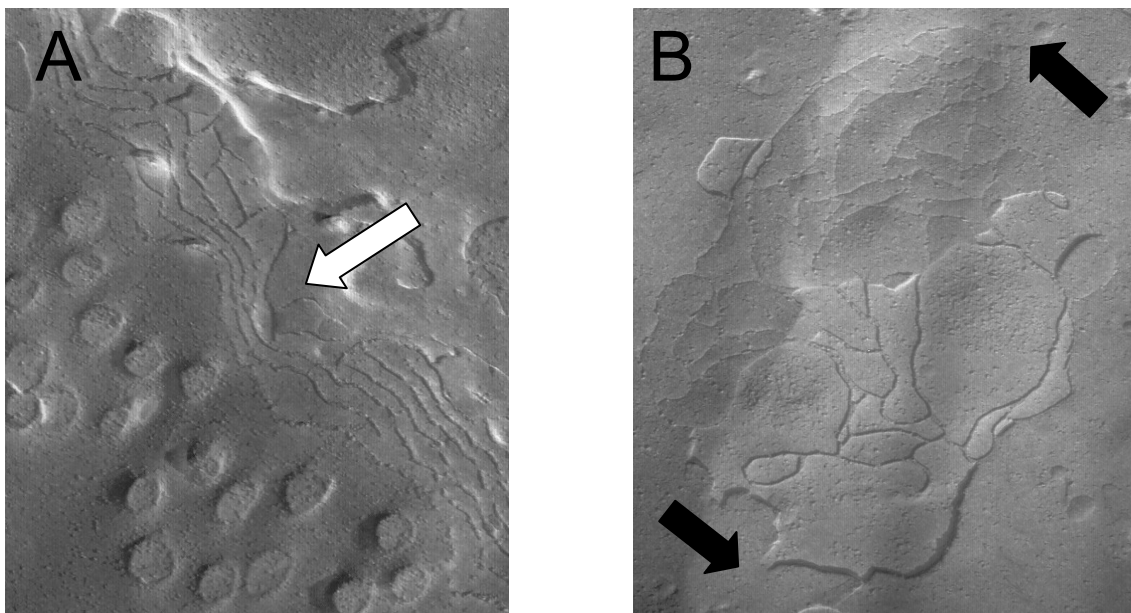
**Abb. 6.1:** Erhöhter transepithelialer Flux von 4 kDa FITC-Dextran ( $3,8 \pm 0,5$  pg/ml/min vs.  $0,6 \pm 0,2$  pg/ml/min; \*  $p \leq 0,05$  vs. Normoxie) unter normobarer Hypoxie (8%  $O_2$ , 92%  $N_2$ ; 4h) vs. Normoxie im murinen Wildtyp Ganzkörper-Hypoxiemodell. Diagramm repräsentiert drei voneinander unabhängige Experimente.

Hierbei zeigte sich in eine signifikante Erhöhung des parazellulären Fluxes unter Hypoxie im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe ( $3,8 \pm 0,5 \text{ pg/ml/min}$ ;  $p \leq 0,05$  vs. Normoxie; Abb. 6.1). Um die pathophysiologische Relevanz dieser Permeabilitätserhöhung einschätzen zu können, untersuchten wir deren Auswirkung auf die bakterielle Translokation in vivo mittels Limulus Amebocyte Lysate assay (LAL). Dieser misst die Konzentration von LPS im Serum und kann somit als Hinweis auf den Übertritt Gram-negativer bakterieller Bestandteile aus dem Darm in die systemische Zirkulation genommen werden. Dazu verwendeten wir erneut das murine Wildtyp Ganzkörperhypoxie-Modell. Die Messungen zeigten einen deutlichen Anstieg des Serum-LPS Gehalts unter Hypoxie im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe ( $2,3 \pm 0,4 \text{ U/ml}$  vs.  $0,6 \pm 0,2 \text{ U/ml}$ ;  $p \leq 0,05$  vs. Normoxie; Abb. 6.2).



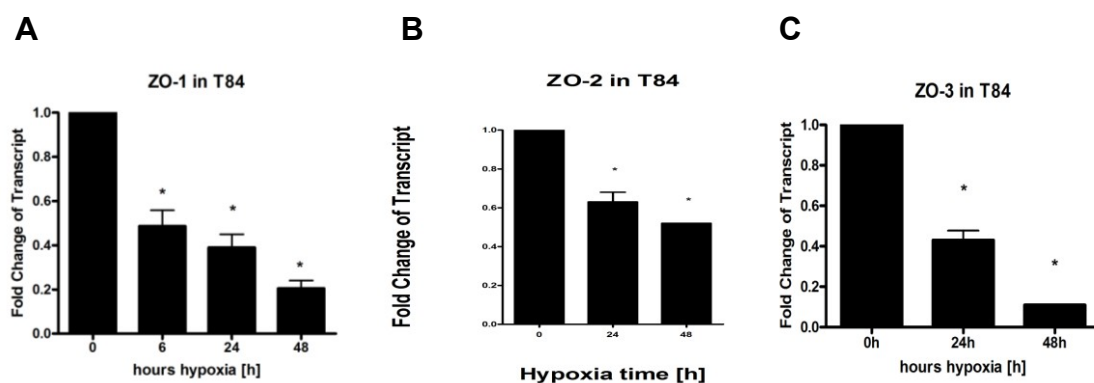
**Abb. 6.2:** Anstieg der Serum-LPS Konzentration ( $2,3 \pm 0,4 \text{ U/ml}$  vs.  $0,6 \pm 0,2 \text{ U/ml}$ ; \*  $p \leq 0,05$  vs. Normoxie) unter normobarer Hypoxie ( $8\% \text{ O}_2$ ,  $92\% \text{ N}_2$ ; 4h) vs. Normoxie im murinen Wildtyp Ganzkörper-Hypoxiemodell. Diagramm repräsentiert drei voneinander unabhängige Experimente.

Diese Ergebnisse liessen uns vermuten, dass eine derartige funktionelle Beeinträchtigung der intestinalen Barriere mit morphologischen Veränderungen der permeabilitätslimitierenden Strukturen einhergehen müsste. Dabei galt unser besonderes Interesse den Veränderungen der TJ, als zentrales Element der epithelialen Barriere. Zu deren Darstellung fertigten wir Gefrierbruch-Elektronenmikroskopien konfluenter Monolayer einer intestinalen Zelllinie (CaCo-2 Wildtyp) an, welche entweder normobarer Hypoxie (1%O<sub>2</sub>, 99%N<sub>2</sub>; 24h) oder Raumluft ausgesetzt wurden. Hierbei offenbarte sich eine dramatische Desorganisation der tight-junktionalen Architektur: In Normoxie zeigten die TJs einen kontinuierlichen netzartigen Komplex interzellulärer Verbindungen (Abb. 6.3 A). Nach hypoxischer Exposition nahm dieses Netzwerk eine insuläre, diskontinuierliche Morphologie geminderter Komplexität an (Abb. 6.3 B).



**Abb. 6.3:** Freeze-fracture Elektronenmikroskopie konfluenter Wildtyp CaCo-2 Monolayer. (A) Normoxie. Kontinuierlicher Komplex interzellulärer Verbindungen (weißer Pfeil). (B) Normobare Hypoxie (1%O<sub>2</sub>, 99%N<sub>2</sub>; 24h). Insuläre Morphologie der TJ mit Unterbrechung der Kontinuität (schwarze Pfeile).

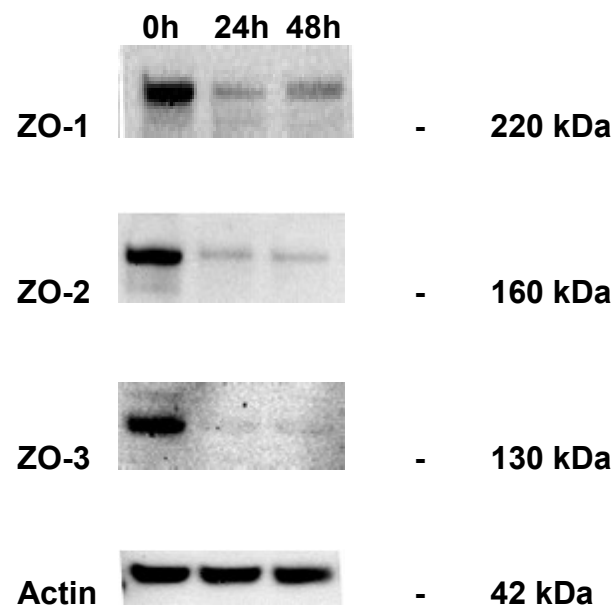
Ausgehend von der Beobachtung, dass Hypoxie eine Desorganisation der tight-junktionalen Architektur und eine Schwächung der parazellulären Barriere bewirkte, überprüften wir im nächsten Schritt deren Bestandteile auf veränderte Expressionsmuster. Dazu screeneten wir vor allem die als Verbindungs- und Signalproteine agierenden ZO-Gene auf transkriptioneller Ebene in vitro mittels real-time PCR. Hierzu wurden konfluente Monolayer einer intestinalen Zelllinie (T-84 Wildtyp) normobarer Hypoxie (1%O<sub>2</sub>, 99%N<sub>2</sub>; 6h, 24h, 48h) oder Raumluft ausgesetzt. Die Analyse ergab nach 48h Hypoxie eine Herunterregulation der Gene ZO-1 (0,26±0,08-fach; p≤0,05 vs. Normoxie; Abb. 6.4 A), ZO-2 (0,58±0,02-fach; p≤0,05 vs. Normoxie; Abb. 6.4 B) und ZO-3 (0,16±0,01-fach; p≤0,05 vs. Normoxie; Abb. 6.4 C) und zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der Hypoxie-Expositionsdauer.



**Abb. 6.4:** Herunterregulation von ZO-1, -2 und -3 auf transkriptioneller Ebene unter normobarer Hypoxie (1%O<sub>2</sub>, 99%N<sub>2</sub>; 6h, 24h, 48h) vs. Normoxie in Wildtyp T84-Zellen: 0,26±0,08-fach (A; ZO-1), 0,58±0,02-fach (B; ZO-2), 0,16±0,01-fach (C; ZO-3); \* p≤0,05 vs. Normoxie). Diagramme sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente.

Daran anknüpfend untersuchten wir in vitro, ob die Herunterregulation auch Auswirkungen auf die Expressionslevel der entsprechenden Proteine hat. Dazu wurden erneut konfluente Wildtyp T-84-Monolayer normobarer Hypoxie (1%O<sub>2</sub>,

99%N<sub>2</sub>; 24h, 48h) oder Raumluft ausgesetzt und eine Western Blot Analyse von ZO-1, -2 und -3 durchgeführt. Hierbei offenbarte sich ebenfalls eine Herunterregulation der Proteine (Abb. 6.5) korrelierend mit den Daten auf transkriptioneller Ebene.

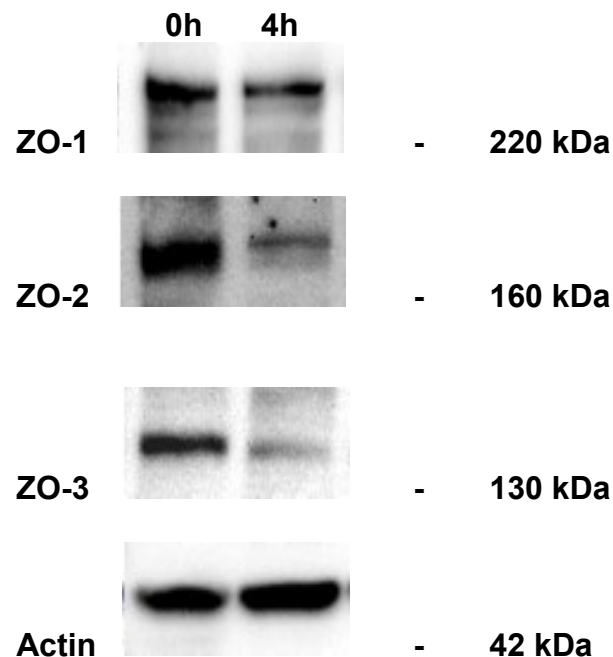


**Abb. 6.5:** Herunterregulation von ZO-1, -2 und -3 *in vitro* auf translationaler Ebene (Western Blot) unter normobarer Hypoxie (1%O<sub>2</sub>, 99%N<sub>2</sub>; 24h, 48h) vs. Normoxie in Wildtyp T-84-Zellen. Western Blot sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente. Actin als Kontrolle gleichmäßiger Gelbeladung.

Da es sich bei den verwendeten Zellen jedoch um Tumorzelllinien handelte, muss deren Verhalten nicht zwingend physiologischen Prozessen entsprechen. Aus diesem Grund und um die Relevanz der *in vitro* erhobenen Daten einschätzen zu können, wurde das Expressionsverhalten von ZO-1, -2 und -3 auch *in vivo* im Western Blot untersucht. Hierzu verwendeten wir die epithelial angereicherte Fraktion aus dem Kolon des oben erwähnten murinen Wildtyp

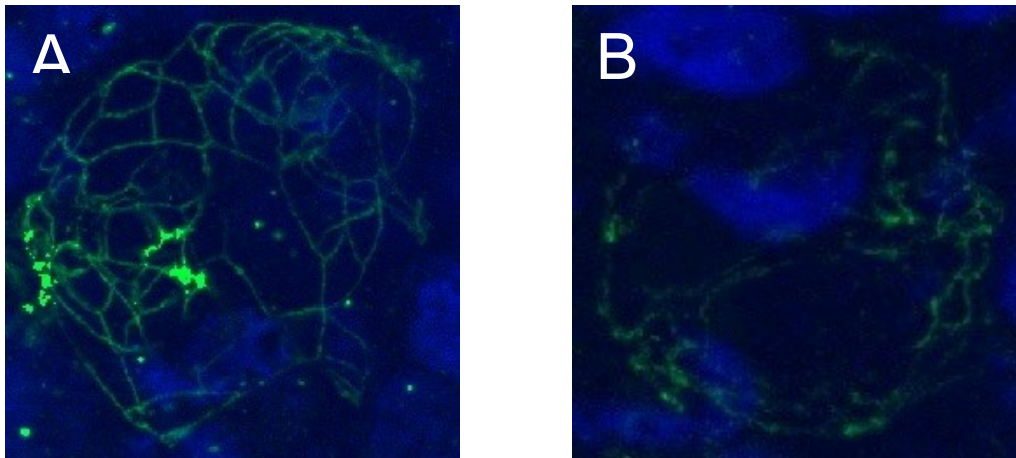


Ganzkörperhypoxie-Modells. Die Analyse zeigte eine Herunterregulation von ZO-1, -2 und -3 (Abb. 6.6), was die in vitro erhobenen Daten bestätigte.



**Abb. 6.6:** Herunterregulation von ZO-1, -2 und -3 in vivo auf translationaler Ebene (Western Blot). Normobare Hypoxie (8%O<sub>2</sub>, 92%N<sub>2</sub>; 4h) vs. Normoxie im murinen Wildtyp Ganzkörper-Hypoxiemodell aus epithelial angereicherter Fraktion von Kolonmukosa. Actin als Kontrolle gleichmäßiger Gelbeladung. Western Blot sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente mit drei Tieren pro Versuchsgruppe.

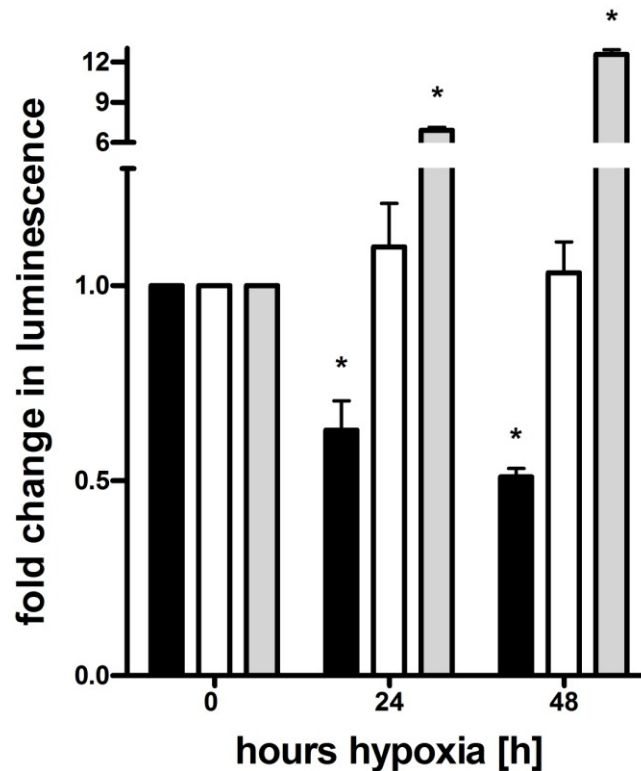
Um zu ermitteln, ob die Suppression eine spezifische Entfernung der Proteine von der TJ bewirkt, führten wir eine immunhistochemische Färbung unter Hypoxie durch und verglichen diese mit normoxischen Bedingungen. In der Folge konzentrierten wir uns dabei auf ZO-1, weil dieses Protein in der Literatur am besten charakterisiert ist. Wildtyp T-84-Zellen wurden zunächst normobarer Hypoxie (1%O<sub>2</sub>, 99%N<sub>2</sub>; 24h) oder Raumluft ausgesetzt. Anschliessend erfolgte die immunhistochemische Aufarbeitung mit ZO-1 spezifischem Antikörper.



**Abb. 6.7:** Immunhistochemie mit ZO-1 Antikörper (grüne Färbung) in Wildtyp T-84-Zellen. Betrachtung en face. (A) Normoxie: Charakteristisches „chicken-wire“ Verteilungsmuster des am apikalen Zellrand lokalisierten ZO-1. (B) Hypoxie: Deutlich Reduktion der Farbintensität als Ausdruck gesunkenen ZO-1 Gehaltes an der TJ. Nukleäre Gegenfärbung mit DAPI (blau).

Dabei zeigte sich unter Hypoxie eine Auflösung des unter Normoxie charakteristischen „chicken-wire“ Verteilungsmusters von ZO-1 an der apikalen Region der lateralen Zellmembran (Abb. 6.7). Dies entspricht einem deutlich reduzierten ZO-1 Gehalt an der TJ. Um Einblick in die transkriptionellen Mechanismen der Herunterregulation zu erhalten, untersuchten wir die ZO-1 Promoteraktivität unter Hypoxie mittels Luciferase-Assay. Dazu wurde in Wildtyp T-84-Zellen ein Plasmid aus ZO-1 Promoterkonstrukt mit nachgeschaltetem Luciferasegen transfiziert und anschliessend normobarer Hypoxie (1%O<sub>2</sub>, 99%N<sub>2</sub>; 24h, 48h) oder Raumluft ausgesetzt. Die folgende Messung der Luciferase-Aktivität zeigte eine signifikante Reduktion in Abhängigkeit der Hypoxie-Expositionsdauer (0,51±0,03-fach bei 48h; p≤0,05 vs. Normoxie; Abb. 6.8), was zusammen mit den PCR Daten für eine hypoxieabhängige transkriptionelle Suppression des ZO-1 Gens spricht.

## Luciferase in Hypoxie mit Wildtyp ZO-1 Promoter; T-84 WT



**Abb. 6.8:** Luciferaseassay unter normobarer Hypoxie (1%O<sub>2</sub>, 99%N<sub>2</sub>; 24h, 48h) vs. Normoxie in konfluenten Wildtyp T-84-Monolayern. Schwarze Säule: Suppression der Luciferaseaktivität durch den ZO-1 Promoter unter normobarer Hypoxie (0,51±0.03-fach bei 48h; \* p≤0,05 vs. Normoxie). Weisse Säule: Negativkontrolle mit Leerplasmid (1.03±0.14-fach bei 48h; nicht signifikant vs. Normoxie). Graue Säule: Positivkontrolle mit HRE (12.56±0.6-fach bei 48h; \* p≤0,05;). Diagramme repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente.

Ausgehend von dieser Beobachtung, untersuchten wir im nächsten Schritt die damit im Zusammenhang stehenden Mechanismen. Eine Analyse des ZO-1 Promoters durch MatInspector (Genomatix) ergab folgende mögliche Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen, für die eine sauerstoffsensible Regulation bekannt ist (Abb. 6.9) [248]: AP-1, p53, NF-κB, CREB, Egr-1, ETS-1, HIF-1. Im Bezug auf letzteren offenbarte die Promoteranalyse ebenfalls drei Sequenzen für den aryl-hydrocarbon receptor repressor (AHRR).

-500 TGAACGAGAGCAACGCTTCTGACCCTGCCGGAGCTCCTCGGAGAT**GAAAG**

-450 **CCATGACGCGCCTTGCAGAAAATGC**ATTCCGCCTTCCGTGGGAACAACGC

-400 CGAGGCACGCGGTGACAGCCGTGACCATGCTGTTTGCCAGTGAAGGAAA

-350 CAACTGTCGGGTATCGGCTCT**GCCGGCCTTTCCA**GCCGCACTCATGCATG

-300 GGGCTCACCCCATGATGTGCGTGGCTTGTCGAGGAGCAAGTGGACAAGTC

-250 TCTTAAGGAAAGCTTTGGTGCACAGGCGCTTTCTCCTTGGGGGCGAATTC

-200 TGCCAGACCTTGATAAAAACAAACAGGAAGACTCGCACGGCAGCGGAAA

-150 CTGTCTTCCAAGTTACTTGGGTTA**CCCGGCTTTTCCT**TCCGCGCTTGGGG

-100 TCGGGACCCCGGCCGCTCGTCCCGCCCCCTCCCCGCGCGGCCCCCGCCC

-50 CCTCCCCGCTCGCTCGCTCGCTCGCTCGTCCAGCCCCGCCCCGCGGGC

+1 CGGGCATGCTCAGTGGGCCGGGCCGGCAGGTTTGCCTGGCCGCTGAGTTG

+50 CCGGC**GCCGGCTGAGCCAGCGGACGC**CGCGTTCCTTGCGGCCGCGCCGGTT

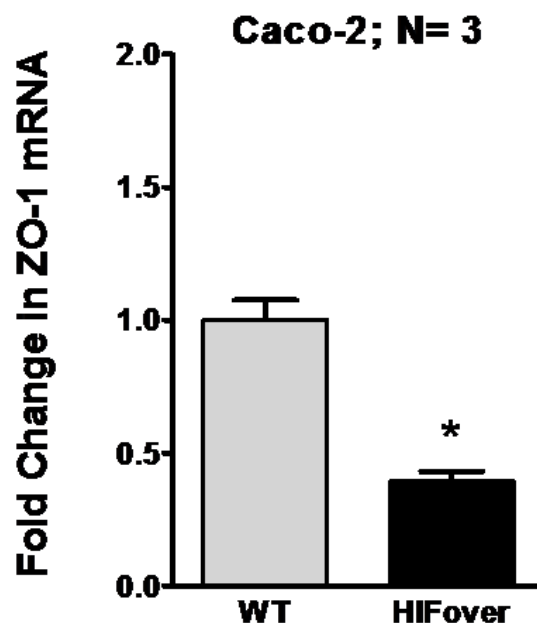
+100 CCCGGGAAGTTACGTGGCGAA**GCCGGCTTCCGAGGAGACGCCGG**...

...

+150 ...CGCCCGTCAGCAGCACCC...

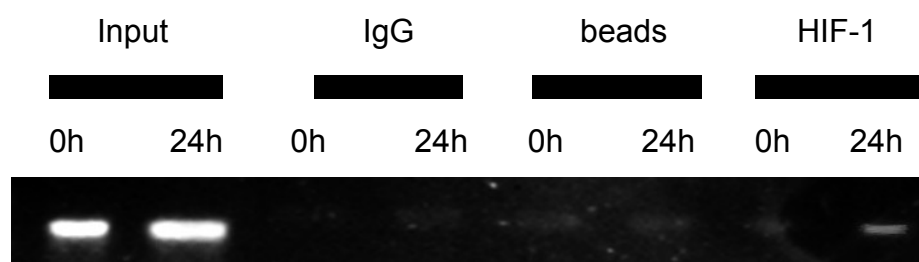
**Abb. 6.9:** Durch Gene2Promoter ermittelte ZO-1 Promotersequenz (Accession: GXP\_269052). Markiert sind TSP (doppelt unterstrichen, Fett) und mögliche Transkriptionsfaktorbindungsstellen: HIF-1 (Rahmen mit Kursivschrift), AHRR (Rahmen), HRE Kernsequenz (geschweifte Klammer), CREB (Fettschrift), NF- $\kappa$ B (dunkelgrauer Rahmen), AP-1 (hellgrauer Rahmen) p53 (unterstrichen), Egr-1 (gestrichelt), ETS-1 (fett unterstrichen), CHIP-Primer (runde Klammer).

Sowohl dieser als auch HIF-1 gehören zur Per-Arnt-Sim (PAS) Familie der basic helix-loop-helix Proteine [174], wobei HIF-1 ebenfalls regulatorische Wirkung über AHRR-Bindungsstellen entfalten kann [249]. Diese enthalten ebenfalls die HRE-Kernsequenz (5'-CGTG-3'), welche für eine Bindung von HIF-1 benötigt wird [249]. Basierend auf dieser Beobachtung, sowie aufgrund dessen Rolle als zentraler Mediator des hypoxischen Phänotyps [250] und Vorerfahrungen unserer Forschungsgruppe, untersuchten wir eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors HIF-1 an der Herunterregulation von ZO-1. Zu diesem Zweck ermittelten wir als nächstes die ZO-1 Expression unter Bedingungen isolierter HIF-1 Aktivierung auf transkriptioneller Ebene. Hierzu verwendeten wir Zellkulturen (CaCo-2), in denen nach lentiviralem Gentransfer eine konstitutiv aktive HIF-1 Form exprimiert wurde und verglichen die ZO-1 Expressionslevel mit Wildtypbedingungen.



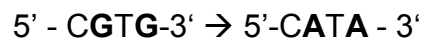
**Abb. 6.10:** Herunterregulation von ZO-1-mRNA in vitro bei HIF-1 überexprimierenden CaCo-2 Zellen ( $0,47 \pm 0,04$ -fach; \*  $p \leq 0,05$  vs. Wildtyp). Diagramm repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente (N=3).

Es zeigte sich eine signifikante Herunterregulation der ZO-1-mRNA im Vergleich zum Wildtyp ( $0,47 \pm 0,04$ -fach;  $p \leq 0,05$  vs. Wildtyp; Abb. 6.10), was eine Regulation durch diesen Transkriptionsfaktor sehr wahrscheinlich macht. Um nachzuweisen, dass die hypoxische Repression von ZO-1 durch HIF-1 vermittelt wird, sollte die direkte Bindung des Transkriptionsfaktors an den Promoter dargestellt werden. Eine Möglichkeit ist die Chromatin-Immunopräzipitation, bei der promotergebundene Transkriptionsfaktoren mittels spezifischer Antikörper isoliert werden und die damit assoziierte Chromatinsequenz über eine PCR mit spezifischen Primern identifiziert werden kann. Dies bestätigt die physische Interaktion und gibt einen Hinweis auf die Nukleotidsequenz, welche für die Bindung verantwortlich ist. Die hierbei verwendeten Primer umfassten den Abschnitt von -45 bis +170 (Abb. 6.9), welche die potentielle HIF-1 Bindungsstelle (+105 bis +127; Abb. 6.9) sowie eine AHRR-Sequenz (+24 bis +48; Abb. 6.9) beinhaltet. Dabei zeigte sich eine differentielle Bindung von HIF-1 an den ZO-1 Promoter unter Hypoxie (Abb. 6.11), was im Zusammenhang mit den Ergebnissen der HIF-1 überexprimierenden Zellen, starke Hinweise auf dessen repressiven Einfluss auf ZO-1 liefert.



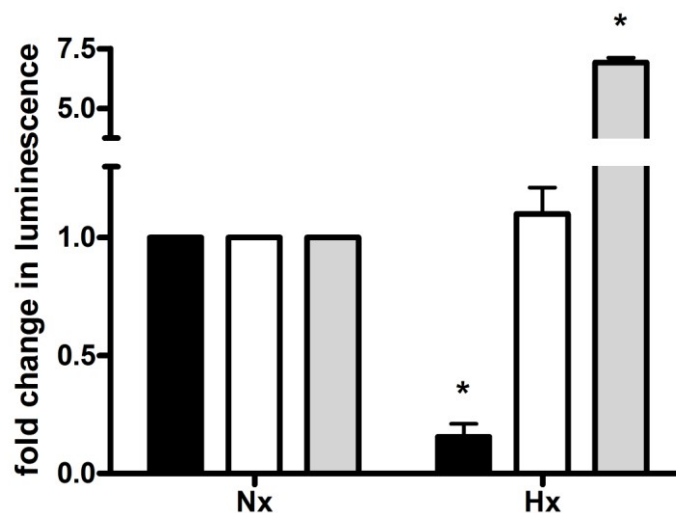
**Abb. 6.11:** Die ChIP-Analyse zeigt eine Bindung von HIF-1 an den Promoter von ZO-1 in konfluenten Wildtyp T-84-Monolayern nach Inkubation in normobarer Hypoxie (1%O<sub>2</sub>, 99%N<sub>2</sub>; 24h) vs. Normoxie. Positivkontrolle: PCR mit gesamter T-84 genomischer DNA (Input). Negativkontrolle: Immunopräzipitation mit einem nicht spezifischen Antikörper (IgG), Immunopräzipitation mit Protein G Sepharose Beads allein (beads). Darstellung repräsentiert drei voneinander unabhängige Experimente.

Um diesen regulativen Effekt zu bestätigen und den exakten Bindungsort von HIF-1 zu bestimmen, setzten wir eine Punktmutation in der Kernsequenz der potentiellen HIF-1-Bindungsstelle (+113 bis +116; Abb. 6.9). Hierzu wurden zwei Nukleotide ausgetauscht:



Darauf analysierten wir erneut die Promoteraktivität unter Hypoxie mittels Luciferase-Assay. Die Messung ergab eine verminderte Luciferaseaktivität unter Hypoxie ( $0,16 \pm 0,08$ -fach;  $p \leq 0,05$  vs. Normoxie; Abb. 6.12), sodass die mutierte Bindungsstelle keinen HIF-1 vermittelten Effekt auf ZO-1 besitzt.

**Luciferase in Hypoxie mit Punktmutation HIF-1 Bindungsstelle; T-84**



**Abb. 6.12:** Luciferaseassay unter normobarer Hypoxie (1%O<sub>2</sub>, 99%N<sub>2</sub>; 24h) vs. Normoxie in konfluenten T-84-Monolayern mit Punktmutation der HIF-1 Bindungsstelle. Schwarze Säule: Punktmutation der HIF-1 Bindungsstelle ( $0,16 \pm 0,08$ -fach; \*  $p \leq 0,05$  vs. Normoxie). Weisse Säule: Negativkontrolle mit Leerplasmid ( $1,03 \pm 0,14$ -fach; nicht signifikant vs. Normoxie). Graue Säule: Positivkontrolle mit HRE ( $12,56 \pm 0,6$ -fach; \*  $p \leq 0,05$  vs. Normoxie). Diagramme repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente.

## 7 Ergebnisdiskussion

Entzündliche Reaktionen des Darmes begünstigen, durch Störung der Perfusion und gesteigertem metabolischen Umsatz, die Entstehung einer intestinalen Hypoxie. Dabei steht das Epithel im Mittelpunkt pathophysiologischer Prozesse, was sich durch dessen unmittelbaren Kontakt zum anoxischen Darmlumen mit seinen potentiell schädigenden Einflüssen wie Bakterien und Toxinen erklärt. Im Zusammenhang damit wurde, sowohl bei akuter als auch chronischer Inflammation, die Kompromittierung der epithelialen Barriere beobachtet. Dies ermöglicht den unkontrollierten Übertritt von Antigenen und Bakterien aus dem Darmlumen in die Zirkulation und ist bei kritisch Kranken mit kompliziertem Verlauf und Verschlechterung der Prognose assoziiert [251-253]. Darauf aufbauend konnten Studien unserer eigenen Arbeitsgruppe sowohl in einem Sepsismodell (noch nicht publiziert) als auch bei akuter Kolitis [6] die signifikante Zunahme der mukosalen Sauerstoffschuld darstellen und Hinweise auf eine Korrelation von Hypoxie und epithelialer Barrierefunktion geben. Ein besseres Verständnis der hierbei zugrundeliegenden Pathophysiologie stellt die Basis zur Entwicklung therapeutischer Strategien dar, um die intestinale Mukosa gegen hypoxische Barrierschäden resistenter zu machen, wodurch systemischen Folgen einer intestinalen Malperfusion minimiert werden könnten. Jedoch bleiben die Mechanismen, welche letztendlich die Barriestörung vermitteln, noch zu weiten Teilen unverstanden, weshalb wir in der vorliegenden Arbeit hypoxiebedingte Veränderungen der intestinalen epithelialen Barriere untersuchten. Dabei konzentrierten wir uns auf die TJ, welche neben dem geschlossenen Zellverband, das hauptsächliche permeabilitätslimitierende Element der Barriere darstellt [5]. Ausgangspunkt waren funktionelle Untersuchungen in vivo, die zeigen konnten, dass die parazelluläre Permeabilität unter Hypoxie deutlich zunimmt (Abb. 6.1). Dieses Ergebnis geht mit Daten anderer Studien einher, welche ebenfalls einen Anstieg der tight-junktionalen Durchlässigkeit unter Hypoxie beobachteten [147-149]. Um die



klinische Relevanz dieser Beobachtung einordnen zu können, untersuchten wir die Auswirkung von Hypoxie auf die bakterielle Translokation in vivo. Ausgangspunkt unserer Überlegung war, dass die Toleranz gegenüber der eigenen Darmflora und die Abwehr pathogener Bakterien eine intakte Barriere zwingend erforderlich macht. Störungen dieser könnten einen gesteigerten Antigenübertritt begünstigen und eine unkontrollierte entzündliche Reaktion mit resultierendem Gewebeschaden provozieren. Ein solcher Zusammenhang wird als entscheidendes pathogenetisches Element bei CED diskutiert [4], soll aber auch eine Ursache der Sepsis darstellen [2, 3]. Somit ist eine vermehrte bakterielle Translokation imstande, entzündliche Reaktionen zu verstärken. Dies trifft ebenfalls auf die akute Pankreatitis zu, wobei hier die Inflammation zu einer erhöhten intestinalen Permeabilität [254, 255] mit sekundärer bakterieller Translokation führt [253]. Dies kann letztlich in eine prognoseentscheidende Infektion des nekrotischen Pankreasgewebes münden [252, 256]. Dabei könnte Hypoxie den vermehrten Antigenübertritt begünstigen, zumal bei der akuten Pankreatitis eine verminderte intestinale Durchblutung [243] sowie eine signifikante Störung der intestinalen Mikrozirkulation [145, 257] beobachtet wurde. Ähnlich könnte intestinale Hypoxie zur Entstehung des septischen Schocks beitragen. Hierbei wird, mehr noch als bei anderen Schockformen (i.e. hypovolämischer Schock [142]), eine intestinale Hypoperfusion beobachtet [143, 144], welche mit einer signifikanten Barrierestörung [145] und Komplikationen wie septischer Kardiomyopathie bis hin zum Multiorganversagen assoziiert ist [146]. Im Einklang mit den zitierten Studien zeigten unsere Messungen einen deutlichen Anstieg des Serum-LPS Gehaltes unter Hypoxie in vivo im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe (Abb. 6.2), was auf einen vermehrten Übertritt Gram-negativer bakterieller Bestandteile aus dem Darm in die systemische Zirkulation hinweist. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unsere Ergebnisse bereits publizierte Daten bestätigen, welche Hypoxie als einen begünstigenden Faktor für intestinale Barrierestörung und vermehrte bakterielle Translokation identifizieren. Im nächsten Schritt versuchten wir die hypoxische Barrierschwächung mit einem morphologischen Korrelat in

Verbindung zu bringen. Hierbei erschien uns die TJ als aussichtsreicher Kandidat, weil diese, neben dem geschlossenen Zellverband, das wichtigste permeabilitätslimitierende Element der epithelialen Barriere darstellt [5]. Zu diesem Zweck fertigten wir elektronenmikroskopische Bilder intestinalen Epithels in Gefrierbruchtechnik an (Abb. 6.3). Wir entschieden uns für diese Methodik, weil hierbei durch schnelle Fixierung die Zellmorphologie unter den entsprechenden Versuchsbedingungen festgehalten wird und das Aufbrechen des Lipid-Doppellayers der Zellmembran eine Betrachtung der TJ „*en face*“ als architektonisches Ganzes ermöglicht [258]. Diese hätte sich bei konventioneller Elektronenmikroskopie lediglich als fokaler Interzellularkontakt dargestellt (Abb. 3.6, [23]). Lichtmikroskopische Untersuchungen wären aufgrund der zu geringen Auflösung ebenfalls ungeeignet. Die anschliessende Auswertung des Bildmaterials offenbarte unter Hypoxie eine dramatische Desorganisation der tight-junktionalen Architektur, charakterisiert durch einen diskontinuierlichen, insulären Verlauf (Abb. 6.3 B). Bei konventioneller Elektronenmikroskopie hingegen liessen sich keine Unterschiede, vor allem nicht auf Ebene der zellulären und tight-junktionalen Integrität, ausmachen. LDH-Messungen waren nach hypoxischer Exposition ebenfalls unauffällig (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass in unserem Modell Hypoxie nicht zu einer messbaren Zellschädigung führte und die beobachtete Barrierestörung nicht über einen Zelluntergang erklärbar wäre. Jedoch beobachteten Little et al. bei konventioneller Elektronenmikroskopie unter Ischämie eine deutliche Aufweitung der TJ mit Dilatation des Parazellulärraumes [259], was im Gegensatz zu unseren Daten steht. Eine Erklärung dieser divergierenden Ergebnisse mag neben technischen Unterschieden (in vitro vs. in vivo Untersuchung) auch darin begründet liegen, dass bei Ischämie eine Vielzahl von Faktoren zum Tragen kommen (z.B. Reperfusionsschaden und entzündliche Reaktion), welche unter Hypoxie nur von begrenzter Bedeutung sind. Betrachtungen hypoxischer Zellverbände mittels Gefrierbruch sind anderweitig noch nicht publiziert. Auch unter entzündlichen Bedingungen konnten elektronenmikroskopisch morphologische Veränderungen der

intestinalen TJ dargestellt werden, wobei hier die Transmigration neutrophiler Granulozyten zu einer Erweiterung des parazellulären Raumes und der TJ mit deutlicher Steigerung deren Permeabilität führte [164, 260]. Des Weiteren offenbarten Gefrierbruchstudien bei Morbus Crohn eine dramatische Desorganisation der TJ mit diskontinuierlichem und irregulärem Verlauf sowie eine reduzierte Anzahl der Barrierekontakte [261, 262], welche im Charakter mit denen von uns angefertigten Bildern vergleichbar waren. Diese Beobachtung ist insofern von Bedeutung, als der TJ bei CED eine wichtige pathogenetische Rolle zugesprochen wird [139, 153, 154]. Zusätzlich herrscht bei dieser Erkrankung ein deutlich reduziertes Sauerstoffangebot [150, 155, 156], sodass Hypoxie möglicherweise ein gemeinsames zugrundeliegendes Prinzip der Barrierschwächung nicht nur in unserer Studie, sondern auch bei der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen darstellen könnte. Dies könnte sowohl durch direkten Einfluss von Hypoxie auf die TJ vermittelt werden als auch durch die hypoxische Aktivierung inflammatorischer Signalwege [159, 160]. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl hypoxische als auch entzündliche Stressoren eine deutliche Störung der tight-junktionalen Architektur bewirken, was diese als eine wichtige Zielstruktur pathophysiologischer Veränderungen hervorhebt und sie als zentralen Faktor krankhaft gesteigerter intestinaler Permeabilität erscheinen lässt. Ausgehend von dieser Beobachtung versuchten wir im nächsten Schritt die morphologisch-funktionellen Veränderungen der Barriere mit einem molekularen Korrelat in Verbindung zu bringen. Dazu untersuchten wir das Expressionsverhalten der Gene ZO-1 bis -3, welche ein zentrales organisierendes Element der TJ darstellen und unter anderem als Linkerprotein zwischen dem Zytoskelett und den Claudinen wirken [70]. Diese wiederum definieren hauptsächlich die Permeabilitätseigenschaften der Barriere (s. 3.2.4). Ausserdem sind ZO-1 und -2 an der Rekrutierung und Polymerisierung tight-junktionaler Komponenten (u.a. Claudine) beteiligt, was die kritische Funktion der ZO-Proteine innerhalb der Barriere verdeutlicht [75]. Darüberhinaus spielen sie eine Rolle bei intrazellulären Signalprozessen, welche die Zellproliferation und deren

Differenzierung beeinflussen [60-62]. Dies macht die ZO-Proteine zu einem interessanten Ziel genauerer Betrachtungen als Schlüsselprotein bei der Entstehung der TJ, der Regulation parazellulärer Permeabilität und der Ausdifferenzierung des Zellverbandes. Anschliessende Experimente ergaben, dass es unter Hypoxie in vitro zu einer konsensuellen Herunterregulation der Proteine ZO-1, -2 und -3 sowohl auf transkriptioneller als auch translationaler Ebene kommt (Abb. 6.4, 6.5). Da es sich bei den benutzten Zelllinien um Tumorzelllinien handelte, deren Verhalten nicht zwingend den physiologischen Prozessen entsprechen muss, verifizierten wir diese Daten in einem gut etablierten murinen in vivo Modell und konnten erneut eine Herunterregulation aller drei ZO-Proteine nachweisen (Abb. 6.6). Vergleicht man unsere Ergebnisse mit der Literatur, ergeben sich hieraus zahlreiche Hinweise, welche eine veränderte Expression, insbesondere von ZO-1 und -2, mit einer veränderten Permeabilität der TJ in Verbindung bringen. Für ZO-1 wurde dies vor allem im Zusammenhang mit inflammatorischen Reaktionen beobachtet. So wurde gezeigt, dass IFN- $\gamma$  eine Schwächung der parazellulären Barriere bewirkt, was vermutlich durch eine Herunterregulation von ZO-1 verursacht wird [77]. Vergleichbare Resultate erbrachte eine Studie, welche die Auswirkungen von TNF- $\alpha$  auf die TJ untersuchte, wobei es hier zu einer NF- $\kappa$ B-abhängigen Herunterregulation von ZO-1 kam, was ebenfalls mit einem Anstieg der parazellulären Permeabilität einherging [76]. Diese Daten stehen in engem Zusammenhang mit CED und systemischer Inflammation, zumal eben benannte Zytokine eine entscheidende Rolle bei der entzündungsvermittelten Gewebeschädigung dieser Erkrankungen spielen [211, 212], was jeweils mit gesteigerter intestinaler Permeabilität einhergeht [2, 139, 153, 254]. Allerdings muss der funktionelle Zusammenhang zwischen entzündlicher Barrierschwächung und ZO-1 Herunterregulation bei diesen Krankheitsbildern noch geklärt werden. Es existieren jedoch bereits Studien, welche im Zusammenhang mit anderen darm-assoziierten Erkrankungen eine Störung der TJ durch ZO-1 Repression zeigten, was dessen pivotale Rolle bei der Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase nahelegt. Beispiele stellen das

Reizdarmsyndrom und die Zöliakie dar [263, 264]. Neben Inflammation wurden weitere pathologische Konstellationen wie hämorrhagischer Schock [265] oder ionisierende Strahlung identifiziert [59], welche eine Schwächung der TJ bewirken und mit einer gestörten Verteilung oder Herunterregulation von ZO-1 einhergehen. Interessanterweise konnte bei einer Verminderung der tight-junktionalen Durchlässigkeit eine Hochregulation des Proteins gezeigt werden, was dessen Rolle als permeabilitätsbeeinflussendes Element weiter festigt. Dies geschah unter anderem durch Stimulation des enterischen Nervensystems [78], Aktivierung von TLR-2 [79] und durch das Probiotikum *E. coli* Nissle 1917 [80]. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ZO-1 sehr wahrscheinlich eine zentrale Rolle bei der Regulation der tight-junktionalen Permeabilität einnimmt, wobei dessen Expressionslevel positiv mit der Barrierehöhe korrelieren. Dabei nehmen diverse physiologische und pathophysiologische Stimuli Einfluss auf dessen Regulation, was eine Wirkung von ZO-1 auf die tight-junktionale Funktion als Ganzes nahelegt. Ähnliches könnte auf ZO-2 zutreffen, allerdings ist hier die Datenlage, verglichen mit ZO-1, wesentlich eingeschränkter. Bislang stärkster Hinweis auf eine permeabilitätsbeeinflussende Rolle ist die Phänotypisierung ZO-2 defizienter Zellen, welche einen erhöhten parazellulären Flux und eine verminderte TER aufweisen [81]. Des Weiteren wurde in vivo in einem Stressmodell eine Erhöhung der parazellulären Permeabilität beschrieben, was mit einer Herunterregulation von ZO-2 einherging [266]. Allerdings kam es hierbei auch zu einer verminderten Expression von Occludin, welches ebenfalls die parazelluläre Permeabilität beeinflussen kann (s. 3.2.3). Folglich ist eine Aussage über den direkten Einfluss von ZO-2 auf die Durchlässigkeit schwierig. Denkbar wäre allerdings eine indirekte Beeinflussung der Permeabilität über Occludin, da es unter anderem via ZO-2 mit der subapikalen Plaque verankert ist [34]. Einen weiteren Hinweis auf eine indirekte Beteiligung an der Permeabilitätsregulation liefert eine Studie von Umeda et al. [75]: Hierbei zeigte sich, dass ZO-2 und ZO-1 unabhängig voneinander die Rekrutierung und Polymerisierung der Claudine an der TJ beeinflussen, welche wiederum

hauptsächlich die Durchlässigkeit des Barrierekontaktes definieren (s. 3.2.4). Somit scheint eine indirekte Beeinflussung der tight-junktionalen Permeabilität durch ZO-2 möglich. Eindeutige Hinweise bezüglich einer direkten Beeinflussung fehlen jedoch. Ebenfalls existieren kaum Untersuchungen, welche physiologische oder pathophysiologische Einflüsse auf ZO-2 bzw. deren funktionelle Relevanz charakterisieren, sodass eine Aussage über die Konsequenz der von uns beobachteten hypoxischen Herunterregulation schwierig erscheint. Noch unklarer ist die Funktion von ZO-3. Weder ZO-3 defiziente Zellen noch entsprechende knock-out Mäuse erbrachten phänotypische Auffälligkeiten [83, 84]. Die parazelluläre Permeabilität blieb ebenfalls unbeeinträchtigt. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass zahlreiche endogene und exogene Stressoren Auswirkungen auf die intestinale tight-junktionale Durchlässigkeit haben. Dabei scheint insbesondere ZO-1 und eventuell auch ZO-2 bei der Regulation der Permeabilität eine wichtige Rolle zu spielen. Die Rolle von ZO-3 bleibt dabei noch unklar. Für die folgenden Experimente konzentrierten wir uns deshalb auf ZO-1, weil über dieses Protein die meisten Erkenntnisse vorliegen und daher eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet ist. Ausserdem stellt es wegen seiner Bindung zu VASP den interessantesten Kandidaten bezüglich hypoxischer Permeabilitätsbeeinflussung dar. VASP verbindet das Zytoskelett mit der TJ durch Bindung an ZO-1 und wurde an Endo –und Epithelien mit barriremodulatorischen Effekten in Verbindung gebracht [206]. Speziell am intestinalen Epithel konnten Rosenberger et al. eine hypoxieinduzierte Herunterregulation von VASP zeigen, was mit Schwächung der parazellulären Barriere einherging [148]. Aufgrund der Identifikation von VASP als permeabilitätsbeeinflussenden Faktor unter Hypoxie und seiner Interaktion mit ZO-1, untersuchten wir die Möglichkeit einer hypoxischen Repression von VASP und ZO-1 durch den gleichen Mechanismus, im Sinne einer koordinierten Herunterregulation dieser funktionellen Einheit. Im Zuge dessen ermittelten wir zunächst anhand immunhistochemischer Färbung (Abb. 6.7), ob die Repression von ZO-1, ähnlich wie bei VASP [148], zu einer Entfernung des Proteins vom

Zytoskelett bzw. der TJ führt. Ein identisches Verhalten beider Proteine, würde die These einer regulierten funktionellen Einheit weiter erhärten. Die Färbung zeigte dabei unter Hypoxie eine Auflösung des für ZO-1 charakteristischen „chicken-wire“ Verteilungsmusters am apikalen Anteil der lateralen Zellmembran (Abb. 6.7 B), was die spezifische Entfernung des Proteins von der TJ unter Hypoxie bestätigt. Daraufhin untersuchten wir die transkriptionellen Einflüsse auf ZO-1, welche mit der Herunterregulation im Zusammenhang stehen könnten. Hierzu führten wir einen Luciferaseassay durch (Abb. 6.8), wobei der an die Expression des Leuchtkäfers Luciferase gekoppelte ZO-1 Promoter unter Hypoxie eine deutliche Suppression zeigte (Abb. 6.8 A) und eindeutig die bisherigen Hinweise auf eine transkriptionelle Regulation des Gens unterstützt. Die anschließende Sequenzanalyse des ZO-1 Promoters ergab dabei eine Reihe möglicher Transkriptionsfaktorbindungsstellen (Abb. 6.9), wobei für AP-1, p53, NF- $\kappa$ B, CREB, Egr-1, ETS-1 und HIF-1 eine O<sub>2</sub>-sensible Regulation bekannt ist [248]. Darüber hinaus scheinen sie an einem weiten Spektrum regulativer Funktionen beteiligt zu sein: AP-1 war einer der ersten im Säuger identifizierten Transkriptionsfaktoren [267]. Er spielt eine wichtige Rolle bei der zellulären Proliferation, Differenzierung und Apoptose [268, 269]. Unter Hypoxie kommt es, aufgrund noch unvollständig gekläarter Mechanismen, zu dessen Aktivierung. Hier kann er die Transkription hypoxie-sensibler Gene induzieren (z.B. eNOS, Thyrosinhydroxylase) [270, 271]. Dies geschieht auch in Zusammenarbeit mit anderen Faktoren wie HIF-1 und NF- $\kappa$ B, was unter anderem zur Aktivierung von VEGF und IL-8 führt [272, 273]. Im Falle von IL-8 kann dies durch Aktivierung und Migration neutrophiler Granulozyten eine Schwächung der TJ bewirken (s. 3.1.1). Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit war jedoch eine Studie von Chen et al., welche nach Überexpression von AP-1 eine Suppression von ZO-1 sowohl auf transkriptioneller als auch translationaler Ebene beobachtete [274]. Dies ging mit einer Erhöhung der parazellulären Permeabilität einher und wurde durch Bindung von AP-1 an eine CREB-Sequenz auf dem ZO-1 Promoter vermittelt. Dies identifiziert AP-1 als einen weiteren O<sub>2</sub>-sensiblen Faktor, welcher via ZO-1

Einfluss auf die parazelluläre Permeabilität nehmen kann. Die Funktion des Transkriptionsfaktors p53 scheint hauptsächlich in der Aktivierung proapoptotischer Gene zu liegen, weshalb ihm eine wichtige Rolle bei der Tumorsuppression zukommt [275]. Entsprechend häufig ist es in entarteten Zellen mutiert. Unter Hypoxie kommt es zu dessen Stabilisierung durch HIF-1 [276, 277]. Letzterer verhindert die Ubiquitinierung von p53 durch MDM2 (eine Ubiquitin-Ligase) und somit dessen proteasomalen Abbau. Andererseits ist p53 imstande über MDM2-Aktivierung den Abbau von HIF-1 zu bewirken [278], was eine komplexe Interaktion zwischen beiden Transkriptionsfaktoren suggeriert. Die Auswertung der Literatur ergab jedoch keine Hinweise bezüglich einer direkten oder indirekten Interaktion zwischen p53 und ZO-1 mit resultierender Beeinflussung der parazellulären Permeabilität. Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Egr-1 wurde mit einer Vielzahl von Funktionen in Verbindung gebracht, welche unter anderem die Regulation von synaptischer Plastizität, Zellwachstum, Überleben und Transformation beinhalten [279]. Dabei reagiert er auf zahlreiche Stimuli wie Hormone, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter und Hypoxie. Letztere bewirkt eine rasche Induktion und Translokation von Egr-1 in den Nukleus abhängig vom Ausmass des Sauerstoffmangels [280]. Dies geschieht über HIF-1 unabhängige Mechanismen. Hypoxisch induziertes Egr-1 wurde unter anderem mit der Pathogenese pulmonaler Thrombenbildung sowie mit vaskulärem Remodelling durch Fibrinablagerungen in Verbindung gebracht [281, 282]. Eine Durchsicht der aktuellen Literatur erbrachte keine Hinweise auf eine direkte oder indirekte Interaktion zwischen Egr-1 und ZO-1 mit resultierender Beeinflussung der parazellulären Permeabilität. Der Transkriptionsfaktor ETS-1 wurde anhand funktioneller Untersuchungen mit Vorgängen wie Angiogenese [283, 284] und Tumorinvasion [285, 286] in Verbindung gebracht, wobei Hypoxie jeweils eine wichtige Rolle bei diesen Phänomenen spielt. Im Zusammenhang damit konnte eine HIF-1 abhängige Induktion von ETS-1 gezeigt werden [287]. Eine Auswertung der Literatur lieferte jedoch keine Hinweise auf eine direkte oder indirekte Interaktion zwischen ETS-1 und ZO-1 mit resultierender Beeinflussung



der parazellulären Permeabilität. Die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und CREB sind beides Regulatoren, welche bei entzündlichen Reaktionen eine wichtige Rolle spielen (s. 3.3.1). Unter Hypoxie kommt es zur Degradation von I $\kappa$ B, was die Aktivierung von NF- $\kappa$ B bewirkt. Ebenfalls induziert Sauerstoffmangel den Abbau von CREB, wodurch dessen Funktion als Genrepressor entfällt [161]. Durch diese beiden Mechanismen können jeweils proinflammatorische Gene (z.B. TNF- $\alpha$ ) transkribiert werden [160], was eine Schwächung der parazellulären Barriere bewirken kann [159] und beispielhaft für die Erkenntnis steht, dass Hypoxie entzündliche Signalkaskaden zu aktivieren vermag. In der Literatur finden sich insbesondere für NF- $\kappa$ B zahlreiche Studien [76, 288-291], welche eine Korrelation zwischen dessen Aktivierung und der Herunterregulation von ZO-1 beobachteten, was jeweils mit einer Steigerung der parazellulären Permeabilität einherging. Die Inhibition von NF- $\kappa$ B konnte den Effekt umkehren. Jedoch wurde in diesen Arbeiten neben ZO-1 auch eine Herunterregulation weiterer tight-junktionaler Komponenten beschrieben (Occludin, Claudin-1), welche ebenfalls Einfluss auf die Durchlässigkeit nehmen können [97, 107]. Dies macht eine Aussage über den Effekt von NF- $\kappa$ B auf ZO-1 schwierig. Für CREB ergab die Literaturrecherche keine Hinweise auf eine direkte Interaktion mit ZO-1 und resultierender Veränderung der parazellulären Permeabilität. Lediglich indirekt bot sich eine Möglichkeit, wobei der Abbau von CREB zur Aktivierung von TNF- $\alpha$  führte, was mit einer NF- $\kappa$ B-abhängigen Herunterregulation von ZO-1 einherging [76]. Für die vorliegende Arbeit stellte sich letztendlich HIF-1 als interessantester Vertreter heraus, zumal er unter anderem die hypoxische Repression von VASP reguliert [148] und ausserdem Hauptmediator bei der Adaption des hypoxischen Phänotyps ist [175]. Letzteres beinhaltet unter anderem vermehrte Glykolyse (GLUT-1 und GLUT-3) zur anaeroben ATP-Gewinnung, Angiogenese (VEGF) und vermehrte Blutoxygenation (EPO) [292]. Andererseits spielt er eine wichtige Rolle bei Tumorprogression und Metastasierung. So ist seit längerem bekannt, dass Hypoxie eine Eigenschaft, vor allem der zentralen Bereiche, vieler solider Tumoren darstellt, wobei hier eine HIF-1 Überexpression beobachtet wurde

[293]. Dabei ist das HIF-1 Expressionsmuster mit wichtigen Tumoreigenschaften, wie Zellimmortalisation durch Hochregulation der Telomerase [294], invasivem Wachstum bzw. Metastasierung durch Verlust von E-Cadherin [295] und Tumolvaskularisation durch Hochregulation von VEGF [296], assoziiert. Darüber hinaus geht in chemotherapeutisch behandelten Tumoren die Überexpression von HIF-1 mit der Entwicklung von Chemotherapeutikaresistenzen einher. Dies geschieht durch die Hochregulation des Transporterproteins MDR-1, welches Xenobiotika und somit auch Chemotherapeutika aus der Zelle heraustransportiert und deren Konzentration dadurch im subtoxischen Bereich hält [197]. Allerdings wird dieses Gen auch in nicht-transformierten Geweben, wie dem intestinalen Epithel HIF-1 sensibel exprimiert [198, 199], wobei im Zusammenhang damit ein protektiver Effekt auf dessen Barriere nachgewiesen wurde [200]. Während somit die HIF-1 Überexpression neoplastischen Geweben einen klaren Überlebensvorteil verschafft, erscheint dessen Rolle unter physiologischen Bedingungen noch nicht eindeutig geklärt, zumal neben protektiven Effekten (s. 3.3.2) in der Arbeit von Rosenberger et al. eine barriereschwächende Wirkung gezeigt wurde [148]. Dieser vermeintliche Widerspruch lässt vermuten, dass noch weitere Faktoren existieren, welche Einfluss auf HIF-1 vermittelte Antworten haben. Physiologisch wird der Transkriptionsfaktor durch Stabilisierung unter Hypoxie reguliert (s. 3.3.2). Darauf kann er im Nukleus an die hypoxia responsive elements (HRE) in der Promoterregion der Zielgene binden und deren Transkription beeinflussen. Die entsprechende Kernsequenz der HRE (5'-CGTG-3') wurde identifiziert [249]. Eine Analyse der Transkriptionsfaktorbindungsstellen auf dem ZO-1 Promoter ergab eine Sequenz für HIF-1, sowie drei für den aryl-hydrocarbon receptor repressor (AHRR) (Abb. 6.8). AHRR und HIF-1 gehören beide zur Per-Arnt-Sim Familie der basic helix-loop-helix Proteine [174]. Dabei wurde gezeigt, dass HIF-1 ebenfalls an AHRR-Stellen binden kann, um dort regulatorische Wirkung zu entfalten [249]. Beide Transkriptionsfaktorbindungsstellen enthalten jeweils die für eine HIF-1 Bindung notwendige Kernsequenz 5'-CGTG-3' (s. Abb. 6.8). Dies

veranlasste uns den Einfluss von HIF-1 auf die hypoxische Herunterregulation von ZO-1 zu analysieren. Durch Untersuchungen in HIF-1 überexprimierenden Zellen (i.e. ohne möglicherweise interferierende entzündliche Signale bei Hypoxie), boten sich erste Hinweise auf eine HIF-1 abhängige ZO-1 Repression (Abb. 6.10). Die folgende Chromatin-Immunopräzipitation zeigte eine differentielle Bindung des Transkriptionsfaktors an den Promoter unter hypoxischen Bedingungen in einer Region zwischen -45 bis +170 ausgehend vom TSP (s. Abb. 6.11), was sowohl die potentielle HIF-1 Bindungsstelle als auch eine AHRR-Sequenz einschloss (Abb. 6.9). Eine vermehrte Bindung von HIF-1 an negativ regulierte Gene unter hypoxischen Bedingungen ist vorbeschrieben [148, 249] und deutet darauf hin, dass HIF-1 auch als transkriptioneller Repressor wirken kann. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass durch diese Untersuchung zwar die Bindung des Transkriptionsfaktors an den Promoter gezeigt wurde, jedoch keine Aussage über dessen exakte Bindungsstelle bzw. tatsächlichen regulativen Einfluss getroffen werden kann. Dies kann nur durch Mutationsstudien der vermuteten Bindungsstelle mit folglich ausbleibendem Effekt der Regulation nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck führten wir eine Punktmutation der Kernsequenz der vermuteten HIF-1-Bindungsstelle durch. Der anschliessend durchgeführte Luciferase-Assay zeigte erneut eine deutliche Repression des Luciferasegens durch den ZO-1 Promoter (Abb. 6.12), sodass die mutierte Stelle keinen HIF-1 vermittelten Einfluss auf die ZO-1 Expression besitzt. Daraus lässt sich ableiten: HIF-1 bindet innerhalb des von uns untersuchten Abschnitts an den Promoter, jedoch bleibt der Effekt dieser Interaktion weiterhin unklar. So könnte HIF-1 ohne jeglichen regulativen Einfluss an den Promoter binden, zumal sich in dem untersuchten Abschnitt weitere Transkriptionsfaktorbindungsstellen befinden, welche ebenfalls für die ZO-1 Herunterregulation verantwortlich sein könnten. Vor allem auch solche mit O<sub>2</sub>-sensibler Regulation: Dazu gehört ETS-1, welches unter anderem eine Rolle bei der Tumordinvasion spielt [285, 286]. Es wird durch HIF-1 induziert [287], sodass Hypoxie eine Repression von ZO-1 durch hochreguliertes ETS-1 bewirken könnte, was letztlich zur

Permeabilitätssteigerung führt. Dieser Zusammenhang gewinnt vor dem Hintergrund Bedeutung, dass Hypoxie eine Eigenschaft vieler solider Tumoren darstellt, was mit einer HIF-1 Überexpression assoziiert ist [293]. Somit liesse sich spekulieren, dass die ZO-1 Herunterregulation einen begünstigenden Schritt in Richtung Tumorinvasion darstellen könnte. Des Weiteren befindet sich in dem betrachteten Abschnitt eine potentielle Bindungsstelle für CREB, welcher sowohl als Genrepressor als auch Aktivator wirken kann [297, 298]. Unter Hypoxie wird der Transkriptionsfaktor proteasomalem Abbau zugeführt [162]. Dadurch könnte dessen regulativer Einfluss auf ZO-1 entfallen, was die Expression des Gens drosselt. Dies wäre ein interessanter alternativer Weg HIF-1-unabhängiger Regulation unter Hypoxie, was bereits ähnlich für die Aktivierung von TNF- $\alpha$  bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck demonstriert wurde [160]. Ebenfalls könnte AP-1 bei der Repression von ZO-1 eine Rolle spielen. Diesbezüglich zeigten Chen et al., dass AP-1 eine Herunterregulation von ZO-1 bewirkt, was mit einem Anstieg parazellulärer Permeabilität einhergeht [274]. Daran anknüpfend ist AP-1 ein wichtiger Ko-Faktor für die Transkription HIF-1 regulierter Gene (z.B. VEGF, ET-1) [271, 272]. Hieraus ergäbe sich in unserem Fall die Möglichkeit eines interessanten Mechanismus, bei dem AP-1 die hypoxische Repression von ZO-1 in Zusammenarbeit mit HIF-1 vermittelt. Letzterer würde dann an die im betrachteten Abschnitt vorhandene AHRR-Sequenz binden und dort regulativen Einfluss ausüben. Dass HIF-1 über AHRR die Transkription beeinflussen kann wurde bereits gezeigt [249]. Dies im Zusammenhang mit den Ergebnissen der HIF-1 überexprimierenden Zellen sowie dem CHIP-Assay, liefert starke Hinweise auf den repressiven Einfluss von HIF-1 auf ZO-1 über die AHRR-Bindungsstelle. Dies unterstützend bieten sich im Kontext mit der Untersuchung von Rosenberger et al. [148] bereits deutliche Hinweise auf einen physiologisch relevanten Mechanismus: Dabei würden mit ZO-1 und VASP gezielt zwei Proteine durch HIF-1 reguliert, welche die Zytoskelett-TJ Interaktion bzw. die parazelluläre Permeabilität entscheidend beeinflussen. Abschliessend stellt sich noch die Frage, welche Rolle HIF-1 bei der intestinalen Homöostase einnimmt. In dieser Arbeit und der von

Rosenberger et al. [148] zeigte sich das Bild eines schwächenden Effekts auf TJ. Ähnliches trifft auf Inflammation zu, wobei HIF-1 durch Aktivierung proinflammatorischer Faktoren (z.B. NF- $\kappa$ B) [299] entzündliche Reaktionen auslösen bzw. unterhalten kann, welche einen permeabilitätserhöhenden Einfluss auf die TJ haben [76]. Andererseits wurde der protektive Effekt von HIF-1 auf die Barriere sowohl unter Hypoxie (s. 3.2.2) als auch bei akuter Inflammation eindrücklich belegt [6]. Somit muss dessen Auswirkung auf die intestinale Barrierefunktion in weiteren Studien noch abschliessend geklärt werden.

## **8 Zusammenfassung**

Die vorliegende Arbeit hat morphologische und funktionelle Veränderungen der intestinalen Tight Junction unter Hypoxie mit einem möglichen molekularen Korrelat in Verbindung gebracht und erste Hinweise auf zugrundeliegende regulative Mechanismen geliefert. Unsere Ergebnisse zeigten dabei erstmals eine dramatische Desorganisation der tight-junktionalen Architektur unter Hypoxie, was einen unter diesen Bedingungen gesteigerten parazellulären Flux bzw. gesteigerten Übertritt luminaler Xenobiotika erklären könnte. Expressionsstudien tight-junktionaler Proteine ergaben eine begleitende Herunterregulation von ZO-1, -2 und -3 in vitro und in vivo, welche im Falle von ZO-1 sehr wahrscheinlich durch HIF-1 vermittelt wurde. Diese Daten, im Kontext mit der ausgewerteten Literatur betrachtet, ergeben das Gesamtbild einer konzertierten Repression verschiedener permeabilitätsbeeinflussender Proteine der TJ (i.e. ZO-1, -2 und VASP) unter Hypoxie, was auf einen physiologisch wichtigen Mechanismus schliessen lässt. Entgegen der bisher als protektiv angenommenen Rolle, könnte HIF-1 dabei eine barrierschwächende Funktion einnehmen. Die Weiterverfolgung unserer Daten sowie die Identifizierung weiterer störender und unterstützender Faktoren auf die

intestinale Barriere erscheinen hierbei vielversprechend, da sie die Grundlage zum besseren Verständnis von Krankheitsbildern wie CED und systemisch inflammatorischen Reaktionen bieten. Diesen Erkrankungen liegt als entscheidendes pathogenetisches Element eine intestinale Hypoxie und parazelluläre Permeabilitätserhöhung zugrunde, sodass die gewonnenen Erkenntnisse in Zukunft die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze ermöglichen könnten. Zwar existieren bereits immunmodulatorische Substanzen, um die intestinale Barriere vor entzündlichen Reaktionen zu schützen, jedoch fehlen derzeit noch Möglichkeiten die epitheliale Funktion direkt zu beeinflussen. Zur Entwicklung solcher Ansätze leisten unsere Daten einen wichtigen Beitrag.

---

## 9 Literaturverzeichnis

1. Hao, W.L. and Y.K. Lee, *Microflora of the gastrointestinal tract: a review*. Methods Mol Biol, 2004. **268**: p. 491-502.
2. MacFie, J., et al., *Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity*. Gut, 1999. **45**(2): p. 223-8.
3. O'Boyle, C.J., et al., *Microbiology of bacterial translocation in humans*. Gut, 1998. **42**(1): p. 29-35.
4. Bouma, G. and W. Strober, *The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(7): p. 521-33.
5. Turner, J.R., *Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application*. Am J Pathol, 2006. **169**(6): p. 1901-9.
6. Karhausen, J., et al., *Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis*. J. Clin. Invest., 2004. **114**(8): p. 1098-1106.
7. Germann, R., et al., *Dopamine and intestinal mucosal tissue oxygenation in a porcine model of haemorrhage*. Br J Anaesth, 1997. **79**(3): p. 357-62.
8. Hauser, C.J., et al., *Visceral surface oxygen tension in experimental colitis in the rabbit*. J Lab Clin Med, 1988. **112**(1): p. 68-71.
9. Gum, J.R., Jr., *Human mucin glycoproteins: varied structures predict diverse properties and specific functions*. Biochem Soc Trans, 1995. **23**(4): p. 795-9.
10. Mack, D.R., et al., *Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression*. Am J Physiol, 1999. **276**(4 Pt 1): p. G941-50.
11. Mack, D.R., et al., *Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of Lactobacillus strains to intestinal epithelial cells in vitro*. Gut, 2003. **52**(6): p. 827-33.
12. Wiede, A., et al., *Localization of TFF3, a New Mucus-associated Peptide of the Human Respiratory Tract*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1999. **159**(4): p. 1330-1335.
13. Wright, N.A., *Interaction of trefoil family factors with mucins: clues to their mechanism of action?* Gut, 2001. **48**(3): p. 293-4.
14. Thim, L., F. Madsen, and S.S. Poulsen, *Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels*. Eur J Clin Invest, 2002. **32**(7): p. 519-27.
15. Fagarasan, S. and T. Honjo, *Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 63-72.
16. Farstad, I.N., et al., *Immunoglobulin A cell distribution in the human small intestine: phenotypic and functional characteristics*. Immunology, 2000. **101**(3): p. 354-63.
17. Mallow, E.B., et al., *Human enteric defensins. Gene structure and developmental expression*. J Biol Chem, 1996. **271**(8): p. 4038-45.
18. Porter, E.M., et al., *The multifaceted Paneth cell*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(1): p. 156-70.

19. Putsep, K., et al., *Germ-free and colonized mice generate the same products from enteric prodefensins*. J Biol Chem, 2000. **275**(51): p. 40478-82.
20. Menendez, A. and B. Brett Finlay, *Defensins in the immunology of bacterial infections*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(4): p. 385-91.
21. Cunliffe, R.N. and Y.R. Mahida, *Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(1): p. 49-58.
22. Zasloff, M., *Antimicrobial peptides of multicellular organisms*. Nature, 2002. **415**(6870): p. 389-95.
23. Tsukita, S., M. Furuse, and M. Itoh, *Multifunctional strands in tight junctions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(4): p. 285-93.
24. Ivanov, A.I., A. Nusrat, and C.A. Parkos, *Endocytosis of the apical junctional complex: mechanisms and possible roles in regulation of epithelial barriers*. Bioessays, 2005. **27**(4): p. 356-65.
25. Niessen, C.M., *Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(11): p. 2525-32.
26. Jamora, C. and E. Fuchs, *Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(4): p. E101-8.
27. Yagi, T. and M. Takeichi, *Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity*. Genes Dev, 2000. **14**(10): p. 1169-80.
28. Nollet, F., P. Kools, and F. van Roy, *Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members*. J Mol Biol, 2000. **299**(3): p. 551-72.
29. Gumbiner, B., B. Stevenson, and A. Grimaldi, *The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex*. J Cell Biol, 1988. **107**(4): p. 1575-87.
30. Rimm, D.L., et al., *Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(19): p. 8813-7.
31. Watabe-Uchida, M., et al., *alpha-Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells*. J Cell Biol, 1998. **142**(3): p. 847-57.
32. Knudsen, K.A., et al., *Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin*. J Cell Biol, 1995. **130**(1): p. 67-77.
33. Itoh, M., et al., *Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments*. J Cell Biol, 1997. **138**(1): p. 181-92.
34. Itoh, M., K. Morita, and S. Tsukita, *Characterization of ZO-2 as a MAGUK Family Member Associated with Tight as well as Adherens Junctions with a Binding Affinity to Occludin and alpha Catenin*. J. Biol. Chem., 1999. **274**(9): p. 5981-5986.



35. Tanaka, Y., et al., *Role of nectin in formation of E-cadherin-based adherens junctions in keratinocytes: analysis with the N-cadherin dominant negative mutant*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(4): p. 1597-609.
36. Kottke, M.D., E. Delva, and A.P. Kowalczyk, *The desmosome: cell science lessons from human diseases*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 5): p. 797-806.
37. Mese, G., G. Richard, and T.W. White, *Gap junctions: basic structure and function*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(11): p. 2516-24.
38. Kanno, Y. and W.R. Loewenstein, *Low-Resistance Coupling between Gland Cells. Some Observations on Intercellular Contact Membranes and Intercellular Space*. Nature, 1964. **201**: p. 194-5.
39. Lawrence, T.S., W.H. Beers, and N.B. Gilula, *Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication*. Nature, 1978. **272**(5653): p. 501-6.
40. Robertson, J.D., *The Occurrence of a Subunit Pattern in the Unit Membranes of Club Endings in Mauthner Cell Synapses in Goldfish Brains*. J Cell Biol, 1963. **19**: p. 201-21.
41. Revel, J.P. and M.J. Karnovsky, *Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver*. J Cell Biol, 1967. **33**(3): p. C7-C12.
42. Goodenough, D.A., *Bulk isolation of mouse hepatocyte gap junctions. Characterization of the principal protein, connexin*. J Cell Biol, 1974. **61**(2): p. 557-63.
43. Cereijido, M., et al., *Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity*. Annu Rev Physiol, 1998. **60**: p. 161-77.
44. Gumbiner, B.M., *Breaking through the tight junction barrier*. J. Cell Biol., 1993. **123**(6): p. 1631-1633.
45. Schneeberger, E.E. and R.D. Lynch, *The tight junction: a multifunctional complex*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **286**(6): p. C1213-28.
46. Diamond, J.M., *Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence*. Physiologist, 1977. **20**(1): p. 10-8.
47. Cereijido, M., L. Shoshani, and R.G. Contreras, *Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. **279**(3): p. G477-82.
48. Hull, B.E. and L.A. Staehelin, *The terminal web. A reevaluation of its structure and function*. J Cell Biol, 1979. **81**(1): p. 67-82.
49. Madara, J.L., *Intestinal absorptive cell tight junctions are linked to cytoskeleton*. Am J Physiol, 1987. **253**(1 Pt 1): p. C171-5.
50. Turner, J.R., et al., *Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation*. Am J Physiol, 1997. **273**(4 Pt 1): p. C1378-85.
51. Ikenouchi, J., et al., *Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 10): p. 1959-67.

52. Carrozzino, F., et al., *Inducible expression of Snail selectively increases paracellular ion permeability and differentially modulates tight junction proteins*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **289**(4): p. C1002-14.
53. Le Moellic, C., et al., *Aldosterone and tight junctions: modulation of claudin-4 phosphorylation in renal collecting duct cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **289**(6): p. C1513-21.
54. Fujibe, M., et al., *Thr203 of claudin-1, a putative phosphorylation site for MAP kinase, is required to promote the barrier function of tight junctions*. Exp Cell Res, 2004. **295**(1): p. 36-47.
55. Marano, C.W., et al., *Tumor necrosis factor-alpha increases sodium and chloride conductance across the tight junction of CACO-2 BBE, a human intestinal epithelial cell line*. J Membr Biol, 1998. **161**(3): p. 263-74.
56. Planchon, S.M., et al., *Regulation of intestinal epithelial barrier function by TGF-beta 1. Evidence for its role in abrogating the effect of a T cell cytokine*. J Immunol, 1994. **153**(12): p. 5730-5739.
57. Kelly, C.P., C. Pothoulakis, and J.T. LaMont, *Clostridium difficile colitis*. N Engl J Med, 1994. **330**(4): p. 257-62.
58. Nava, P., et al., *The rotavirus surface protein VP8 modulates the gate and fence function of tight junctions in epithelial cells*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 23): p. 5509-19.
59. Dublineau, I., et al., *Functional and structural alterations of epithelial barrier properties of rat ileum following X-irradiation*. Can J Physiol Pharmacol, 2004. **82**(2): p. 84-93.
60. Balda, M.S. and K. Matter, *The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression*. Embo J, 2000. **19**(9): p. 2024-33.
61. Balda, M.S., M.D. Garrett, and K. Matter, *The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density*. J Cell Biol, 2003. **160**(3): p. 423-32.
62. Islas, S., et al., *Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells*. Exp Cell Res, 2002. **274**(1): p. 138-48.
63. Betanzos, A., et al., *The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells*. Exp Cell Res, 2004. **292**(1): p. 51-66.
64. Staehelin, L.A., *Further Observations on the Fine Structure of Freeze-Cleaved Tight Junctions*. J Cell Sci, 1973. **13**(3): p. 763-786.
65. Farquhar, M.G. and G.E. Palade, *Junctional complexes in various epithelia*. J Cell Biol, 1963. **17**: p. 375-412.
66. Stevenson, B.R., et al., *Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia*. J Cell Biol, 1986. **103**(3): p. 755-66.
67. Wong, V. and B.M. Gumbiner, *A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier*. J Cell Biol, 1997. **136**(2): p. 399-409.
68. Inoko, A., et al., *Expression and distribution of ZO-3, a tight junction MAGUK protein, in mouse tissues*. Genes Cells, 2003. **8**(11): p. 837-45.

69. Gonzalez-Mariscal, L., A. Betanzos, and A. Avila-Flores, *MAGUK proteins: structure and role in the tight junction*. Semin Cell Dev Biol, 2000. **11**(4): p. 315-24.
70. Itoh, M., et al., *Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins*. J Cell Biol, 1999. **147**(6): p. 1351-63.
71. Itoh, M., et al., *Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions*. J Cell Biol, 2001. **154**(3): p. 491-7.
72. Furuse, M., et al., *Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions*. J Cell Biol, 1994. **127**(6 Pt 1): p. 1617-26.
73. Haskins, J., et al., *ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin*. J Cell Biol, 1998. **141**(1): p. 199-208.
74. Cordenonsi, M., et al., *Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin*. J Cell Biol, 1999. **147**(7): p. 1569-82.
75. Umeda, K., et al., *ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation*. Cell, 2006. **126**(4): p. 741-54.
76. Ma, T.Y., et al., *TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **286**(3): p. G367-76.
77. Youakim, A. and M. Ahdieh, *Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin*. Am J Physiol, 1999. **276**(5 Pt 1): p. G1279-88.
78. Neunlist, M., et al., *Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **285**(5): p. G1028-36.
79. Cario, E., G. Gerken, and D.K. Podolsky, *Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C*. Gastroenterology, 2004. **127**(1): p. 224-38.
80. Ukena, S.N., et al., *Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity*. PLoS ONE, 2007. **2**(12): p. e1308.
81. Hernandez, S., B. Chavez Munguia, and L. Gonzalez-Mariscal, *ZO-2 silencing in epithelial cells perturbs the gate and fence function of tight junctions and leads to an atypical monolayer architecture*. Exp Cell Res, 2007. **313**(8): p. 1533-47.
82. Umeda, K., et al., *Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1*. J Biol Chem, 2004. **279**(43): p. 44785-94.
83. Adachi, M., et al., *Normal establishment of epithelial tight junctions in mice and cultured cells lacking expression of ZO-3, a tight-junction MAGUK protein*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(23): p. 9003-15.

84. Xu, J., et al., *Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but Not ZO-3, reveals critical and nonredundant roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development.* Mol Cell Biol, 2008. **28**(5): p. 1669-78.
85. Lawrence, D.W., K.M. Comerford, and S.P. Colgan, *Role of VASP in reestablishment of epithelial tight junction assembly after Ca<sup>2+</sup> switch.* Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **282**(6): p. C1235-1245.
86. Citi, S., et al., *Cingulin, a new peripheral component of tight junctions.* Nature, 1988. **333**(6170): p. 272-6.
87. Bazzoni, G., et al., *Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin.* J Biol Chem, 2000. **275**(27): p. 20520-6.
88. D'Atri, F. and S. Citi, *Cingulin interacts with F-actin in vitro.* FEBS Lett, 2001. **507**(1): p. 21-4.
89. Paschoud, S. and S. Citi, *Inducible overexpression of cingulin in stably transfected MDCK cells does not affect tight junction organization and gene expression.* Mol Membr Biol, 2008. **25**(1): p. 1-13.
90. Guillemot, L., et al., *Disruption of the cingulin gene does not prevent tight junction formation but alters gene expression.* J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 22): p. 5245-56.
91. Guillemot, L. and S. Citi, *Cingulin regulates claudin-2 expression and cell proliferation through the small GTPase RhoA.* Mol Biol Cell, 2006. **17**(8): p. 3569-77.
92. Aijaz, S., et al., *Binding of GEF-H1 to the tight junction-associated adaptor cingulin results in inhibition of Rho signaling and G1/S phase transition.* Dev Cell, 2005. **8**(5): p. 777-86.
93. Furuse, M., et al., *Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions.* J. Cell Biol., 1993. **123**(6): p. 1777-1788.
94. Ando-Akatsuka, Y., et al., *Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues.* J Cell Biol, 1996. **133**(1): p. 43-7.
95. Fanning, A.S., et al., *The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton.* J Biol Chem, 1998. **273**(45): p. 29745-53.
96. Kevil, C.G., et al., *Expression of zonula occludens and adherens junctional proteins in human venous and arterial endothelial cells: role of occludin in endothelial solute barriers.* Microcirculation, 1998. **5**(2-3): p. 197-210.
97. Hirase, T., et al., *Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells.* J Cell Sci, 1997. **110**(14): p. 1603-1613.
98. McCarthy, K.M., et al., *Occludin is a functional component of the tight junction.* J Cell Sci, 1996. **109**(9): p. 2287-2298.
99. Balda, M.S., et al., *Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein.* J Cell Biol, 1996. **134**(4): p. 1031-49.

100. Saitou, M., et al., *Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(12): p. 4131-42.
101. Schulzke, J.D., et al., *Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1669**(1): p. 34-42.
102. Furuse, M., et al., *Overexpression of occludin, a tight junction-associated integral membrane protein, induces the formation of intracellular multilamellar bodies bearing tight junction-like structures*. J Cell Sci, 1996. **109**(2): p. 429-435.
103. Van Itallie, C.M. and J.M. Anderson, *Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts*. J Cell Sci, 1997. **110 ( Pt 9)**: p. 1113-21.
104. Yu, A.S., et al., *Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **288**(6): p. C1231-41.
105. Furuse, M., et al., *Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin*. J Cell Biol, 1998. **141**(7): p. 1539-50.
106. McCarthy, K.M., et al., *Inducible expression of claudin-1-myc but not occludin-VSV-G results in aberrant tight junction strand formation in MDCK cells*. J Cell Sci, 2000. **113 Pt 19**: p. 3387-98.
107. Inai, T., J. Kobayashi, and Y. Shibata, *Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells*. Eur J Cell Biol, 1999. **78**(12): p. 849-55.
108. Van Itallie, C., C. Rahner, and J.M. Anderson, *Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability*. J Clin Invest, 2001. **107**(10): p. 1319-27.
109. Alexandre, M.D., Q. Lu, and Y.H. Chen, *Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl<sup>-</sup> conductance and increases the paracellular Na<sup>+</sup> conductance in LLC-PK1 cells*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 12): p. 2683-93.
110. Jeansonne, B., et al., *Claudin-8 interacts with multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) and reduces paracellular conductance in epithelial cells*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2003. **49**(1): p. 13-21.
111. Yu, A.S., et al., *Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation*. J Biol Chem, 2003. **278**(19): p. 17350-9.
112. Ben-Yosef, T., et al., *Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(16): p. 2049-61.
113. Colegio, O.R., et al., *Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **283**(1): p. C142-7.
114. Furuse, M., et al., *Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells*. J Cell Biol, 2001. **153**(2): p. 263-72.

115. Amasheh, S., et al., *Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 24): p. 4969-76.
116. Muller, D., et al., *A novel claudin 16 mutation associated with childhood hypercalciuria abolishes binding to ZO-1 and results in lysosomal mistargeting*. Am J Hum Genet, 2003. **73**(6): p. 1293-301.
117. Simon, D.B., et al., *Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg<sup>2+</sup> resorption*. Science, 1999. **285**(5424): p. 103-6.
118. Sonoda, N., et al., *Clostridium perfringens Enterotoxin Fragment Removes Specific Claudins from Tight Junction Strands: Evidence for Direct Involvement of Claudins in Tight Junction Barrier*. J. Cell Biol., 1999. **147**(1): p. 195-204.
119. McLaughlin, J., et al., *Ochratoxin A increases permeability through tight junctions by removal of specific claudin isoforms*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **287**(5): p. C1412-7.
120. Nitta, T., et al., *Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice*. J Cell Biol, 2003. **161**(3): p. 653-60.
121. Gow, A., et al., *CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/claudin-11 null mice*. Cell, 1999. **99**(6): p. 649-59.
122. Rahner, C., L.L. Mitic, and J.M. Anderson, *Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut*. Gastroenterology, 2001. **120**(2): p. 411-22.
123. Bruewer, M., et al., *Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 6164-72.
124. Dorkoosh, F.A., et al., *Transport of octreotide and evaluation of mechanism of opening the paracellular tight junctions using superporous hydrogel polymers in Caco-2 cell monolayers*. J Pharm Sci, 2004. **93**(3): p. 743-52.
125. Nichols, L.S., R. Ashfaq, and C.A. Iacobuzio-Donahue, *Claudin 4 protein expression in primary and metastatic pancreatic cancer: support for use as a therapeutic target*. Am J Clin Pathol, 2004. **121**(2): p. 226-30.
126. Singh, A.B. and R.C. Harris, *Epidermal growth factor receptor activation differentially regulates claudin expression and enhances transepithelial resistance in Madin-Darby canine kidney cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(5): p. 3543-52.
127. Howe, K.L., et al., *Transforming growth factor-beta regulation of epithelial tight junction proteins enhances barrier function and blocks enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7-induced increased permeability*. Am J Pathol, 2005. **167**(6): p. 1587-97.
128. Prasad, S., et al., *Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells*. Lab Invest, 2005. **85**(9): p. 1139-62.
129. D'Souza, T., R. Agarwal, and P.J. Morin, *Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction*

- barrier function in ovarian cancer cells.* J Biol Chem, 2005. **280**(28): p. 26233-40.
130. Ishizaki, T., et al., *Cyclic AMP induces phosphorylation of claudin-5 immunoprecipitates and expression of claudin-5 gene in blood-brain-barrier endothelial cells via protein kinase A-dependent and -independent pathways.* Exp Cell Res, 2003. **290**(2): p. 275-88.
131. Furuse, M., et al., *A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts.* J Cell Biol, 1998. **143**(2): p. 391-401.
132. Martin-Padura, I., et al., *Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration.* J Cell Biol, 1998. **142**(1): p. 117-27.
133. Ebnet, K., et al., *Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions?* J Cell Sci, 2004. **117**(1): p. 19-29.
134. Rehder, D., et al., *Junctional adhesion molecule-a participates in the formation of apico-basal polarity through different domains.* Exp Cell Res, 2006. **312**(17): p. 3389-403.
135. Laukoetter, M.G., et al., *JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo.* J Exp Med, 2007. **204**(13): p. 3067-76.
136. Huang, H., F. Cruz, and G. Bazzoni, *Junctional adhesion molecule-A regulates cell migration and resistance to shear stress.* J Cell Physiol, 2006. **209**(1): p. 122-30.
137. Bazzoni, G., et al., *Expression of junctional adhesion molecule-A prevents spontaneous and random motility.* J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 3): p. 623-32.
138. Weber, C., L. Fraemohs, and E. Dejana, *The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation.* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(6): p. 467-77.
139. Hollander, D., *Crohn's disease--a permeability disorder of the tight junction?* Gut, 1988. **29**(12): p. 1621-4.
140. Doig, C.J., et al., *Increased intestinal permeability is associated with the development of multiple organ dysfunction syndrome in critically ill ICU patients.* Am J Respir Crit Care Med, 1998. **158**(2): p. 444-51.
141. Carrico, C.J., et al., *Multiple-organ-failure syndrome.* Arch Surg, 1986. **121**(2): p. 196-208.
142. Nakajima, Y., et al., *Microcirculation in intestinal villi: a comparison between hemorrhagic and endotoxin shock.* Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(8 Pt 1): p. 1526-30.
143. Fink, M.P., *Adequacy of gut oxygenation in endotoxemia and sepsis.* Crit Care Med, 1993. **21**(2 Suppl): p. S4-8.
144. Tenhunen, J.J., et al., *Apparent heterogeneity of regional blood flow and metabolic changes within splanchnic tissues during experimental endotoxin shock.* Anesth Analg, 2003. **97**(2): p. 555-63, table of contents.

145. Rahman, S.H., et al., *Intestinal hypoperfusion contributes to gut barrier failure in severe acute pancreatitis*. J Gastrointest Surg, 2003. **7**(1): p. 26-35; discussion 35-6.
146. Fiddian-Green, R.G., *Associations between intramucosal acidosis in the gut and organ failure*. Crit Care Med, 1993. **21**(2 Suppl): p. S103-7.
147. Furuta, G.T., et al., *Hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of intestinal trefoil factor protects barrier function during hypoxia*. J Exp Med, 2001. **193**(9): p. 1027-34.
148. Rosenberger, P., et al., *Identification of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) as an HIF-regulated tissue permeability factor during hypoxia*. Faseb J, 2007. **21**(10): p. 2613-21.
149. Synnestvedt, K., et al., *Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia*. J Clin Invest, 2002. **110**(7): p. 993-1002.
150. Funayama, Y., et al., *Remodeling of vascular wall in Crohn's disease*. Dig Dis Sci, 1999. **44**(11): p. 2319-23.
151. Evans, S.M., et al., *Detection of hypoxia in human squamous cell carcinoma by EF5 binding*. Cancer Res, 2000. **60**(7): p. 2018-24.
152. Taylor, C.T. and S.P. Colgan, *Therapeutic targets for hypoxia-elicited pathways*. Pharm Res, 1999. **16**(10): p. 1498-505.
153. Ukabam, S.O., J.R. Clamp, and B.T. Cooper, *Abnormal small intestinal permeability to sugars in patients with Crohn's disease of the terminal ileum and colon*. Digestion, 1983. **27**(2): p. 70-4.
154. Zeissig, S., et al., *Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease*. Gut, 2007. **56**(1): p. 61-72.
155. Wakefield, A.J., et al., *Granulomatous vasculitis in Crohn's disease*. Gastroenterology, 1991. **100**(5 Pt 1): p. 1279-87.
156. Angerson, W.J., et al., *Neoterminal ileal blood flow after ileocolonic resection for Crohn's disease*. Gut, 1993. **34**(11): p. 1531-4.
157. Hatoum, O.A., et al., *Acquired microvascular dysfunction in inflammatory bowel disease: Loss of nitric oxide-mediated vasodilation*. Gastroenterology, 2003. **125**(1): p. 58-69.
158. Murch, S.H., et al., *High endothelin-1 immunoreactivity in Crohn's disease and ulcerative colitis*. Lancet, 1992. **339**(8790): p. 381-5.
159. Taylor, C.T., A.L. Dzus, and S.P. Colgan, *Autocrine regulation of epithelial permeability by hypoxia: role for polarized release of tumor necrosis factor alpha*. Gastroenterology, 1998. **114**(4): p. 657-68.
160. Taylor, C.T., et al., *Critical role of cAMP response element binding protein expression in hypoxia-elicited induction of epithelial tumor necrosis factor-alpha*. J Biol Chem, 1999. **274**(27): p. 19447-54.
161. Taylor, C.T., *Regulation of intestinal epithelial gene expression in hypoxia*. Kidney Int, 2004. **66**(2): p. 528-31.
162. Taylor, C.T., et al., *Phosphorylation-dependent targeting of cAMP response element binding protein to the ubiquitin/proteasome pathway in hypoxia*. PNAS, 2000. **97**(22): p. 12091-12096.



163. Furuta, G.T., et al., *Parallel induction of epithelial surface-associated chemokine and proteoglycan by cellular hypoxia: implications for neutrophil activation*. J Leukoc Biol, 2000. **68**(2): p. 251-259.
164. Nash, S., J. Stafford, and J.L. Madara, *Effects of polymorphonuclear leukocyte transmigration on the barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers*. J Clin Invest, 1987. **80**(4): p. 1104-13.
165. Sanders, S.E., et al., *Assessment of inflammatory events in epithelial permeability: a rapid screening method using fluorescein dextrans*. Epithelial Cell Biol, 1995. **4**(1): p. 25-34.
166. Milks, L.C., G.P. Conyers, and E.B. Cramer, *The effect of neutrophil migration on epithelial permeability*. J Cell Biol, 1986. **103**(6 Pt 2): p. 2729-38.
167. Parkos, C.A., S.P. Colgan, and J.L. Madara, *Interactions of neutrophils with epithelial cells: lessons from the intestine*. J Am Soc Nephrol, 1994. **5**(2): p. 138-52.
168. Colgan, S.P., A.L. Dzus, and C.A. Parkos, *Epithelial exposure to hypoxia modulates neutrophil transepithelial migration*. J Exp Med, 1996. **184**(3): p. 1003-15.
169. Friedman, G.B., et al., *Epithelial permeability induced by neutrophil transmigration is potentiated by hypoxia: role of intracellular cAMP*. J Cell Physiol, 1998. **176**(1): p. 76-84.
170. Wojciak-Stothard, B., L.Y. Tsang, and S.G. Haworth, *Rac and Rho play opposing roles in the regulation of hypoxia/reoxygenation-induced permeability changes in pulmonary artery endothelial cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **288**(4): p. L749-60.
171. Wojciak-Stothard, B., et al., *Rac1 and RhoA as regulators of endothelial phenotype and barrier function in hypoxia-induced neonatal pulmonary hypertension*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **290**(6): p. L1173-82.
172. Kayyali, U.S., et al., *Cytoskeletal changes in hypoxic pulmonary endothelial cells are dependent on MAPK-activated protein kinase MK2*. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 42596-602.
173. Comerford, K.M., et al., *Role of vasodilator-stimulated phosphoprotein in protein kinase A-induced changes in endothelial junctional permeability*. FASEB J., 2002: p. 01-0739fje.
174. Wang, G., et al., *Hypoxia-Inducible Factor 1 is a Basic-Helix-Loop-Helix-PAS Heterodimer Regulated by Cellular O<sub>2</sub> Tension*. PNAS, 1995. **92**(12): p. 5510-5514.
175. Semenza, G.L., *Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level*. Physiology (Bethesda), 2004. **19**: p. 176-82.
176. Ema, M., et al., *A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(9): p. 4273-8.

177. Tian, H., S.L. McKnight, and D.W. Russell, *Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells*. *Genes Dev*, 1997. **11**(1): p. 72-82.
178. Makino, Y., et al., *Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression*. *Nature*, 2001. **414**(6863): p. 550-4.
179. Maxwell, P.H., et al., *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis*. *Nature*, 1999. **399**(6733): p. 271-5.
180. Tanimoto, K., et al., *Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein*. *Embo J*, 2000. **19**(16): p. 4298-309.
181. Semenza, G.L., *Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2000. **35**(2): p. 71-103.
182. Zarembek, K.A. and H.L. Malech, *HIF-1alpha: a master regulator of innate host defenses?* *J Clin Invest*, 2005. **115**(7): p. 1702-4.
183. Lando, D., et al., *FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor*. *Genes Dev*, 2002. **16**(12): p. 1466-71.
184. Lando, D., et al., *Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch*. *Science*, 2002. **295**(5556): p. 858-61.
185. Carlstedt, I., et al., *'Soluble' and 'insoluble' mucins--identification of distinct populations*. *Biochem Soc Trans*, 1995. **23**(4): p. 845-51.
186. Ogata, S., et al., *Mucin gene expression in colonic tissues and cell lines*. *Cancer Res*, 1992. **52**(21): p. 5971-8.
187. Audie, J.P., et al., *Expression of human mucin genes in respiratory, digestive, and reproductive tracts ascertained by in situ hybridization*. *J Histochem Cytochem*, 1993. **41**(10): p. 1479-85.
188. Louis, N.A., et al., *Selective induction of mucin-3 by hypoxia in intestinal epithelia*. *J Cell Biochem*, 2006. **99**(6): p. 1616-27.
189. Tomasetto, C., et al., *hSP, the domain-duplicated homolog of pS2 protein, is co-expressed with pS2 in stomach but not in breast carcinoma*. *Embo J*, 1990. **9**(2): p. 407-14.
190. Rio, M.C., et al., *Breast cancer-associated pS2 protein: synthesis and secretion by normal stomach mucosa*. *Science*, 1988. **241**(4866): p. 705-8.
191. Podolsky, D.K., et al., *Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(16): p. 12230.
192. Babyatsky, M.W., et al., *Oral trefoil peptides protect against ethanol- and indomethacin-induced gastric injury in rats*. *Gastroenterology*, 1996. **110**(2): p. 489-97.
193. Dignass, A., et al., *Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway*. *J Clin Invest*, 1994. **94**(1): p. 376-83.
194. Mashimo, H., et al., *Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor*. *Science*, 1996. **274**(5285): p. 262-5.

195. Marchbank, T., et al., *Effect of ectopic expression of rat trefoil factor family 3 (intestinal trefoil factor) in the jejunum of transgenic mice*. J Biol Chem, 2001. **276**(26): p. 24088-96.
196. Kuwano, M., et al., *Multidrug resistance-associated protein subfamily transporters and drug resistance*. Anticancer Drug Des, 1999. **14**(2): p. 123-31.
197. Fardel, O., V. Lecureur, and A. Guillouzo, *The P-glycoprotein multidrug transporter*. Gen Pharmacol, 1996. **27**(8): p. 1283-91.
198. Thiebaut, F., et al., *Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(21): p. 7735-8.
199. Comerford, K.M., et al., *Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene*. Cancer Res, 2002. **62**(12): p. 3387-94.
200. Panwala, C.M., J.C. Jones, and J.L. Viney, *A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, mdr1a, spontaneously develop colitis*. J Immunol, 1998. **161**(10): p. 5733-44.
201. Zimmermann, H., *Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2000. **362**(4-5): p. 299-309.
202. Strohmeier, G.R., et al., *Surface Expression, Polarization, and Functional Significance of CD73 in Human Intestinal Epithelia*. J. Clin. Invest., 1997. **99**(11): p. 2588-2601.
203. Lennon, P.F., et al., *Neutrophil-derived 5'-Adenosine Monophosphate Promotes Endothelial Barrier Function via CD73-mediated Conversion to Adenosine and Endothelial A2B Receptor Activation*. J. Exp. Med., 1998. **188**(8): p. 1433-1443.
204. Stiles, G.L., *Adenosine receptors*. J Biol Chem, 1992. **267**(10): p. 6451-4.
205. Eltzschig, H.K., et al., *Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors*. J Exp Med, 2003. **198**(5): p. 783-96.
206. Comerford, K.M., et al., *Role of vasodilator-stimulated phosphoprotein in protein kinase A-induced changes in endothelial junctional permeability*. Faseb J, 2002.
207. Clayburgh, D.R., L. Shen, and J.R. Turner, *A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease*. Lab Invest, 2004. **84**(3): p. 282-91.
208. Turner, J.R., et al., *Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation*. Am J Physiol Cell Physiol, 1997. **273**(4): p. C1378-1385.
209. Berglund, J.J., et al., *Regulation of human jejunal transmucosal resistance and MLC phosphorylation by Na<sup>+</sup>-glucose cotransport*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **281**(6): p. G1487-1493.
210. Blair, S.A., et al., *Epithelial myosin light chain kinase expression and activity are upregulated in inflammatory bowel disease*. Lab Invest, 2006. **86**(2): p. 191-201.

- 
211. MacDonald, T.T., et al., *Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine*. Clin Exp Immunol, 1990. **81**(2): p. 301-5.
  212. Fais, S., et al., *Interferon expression in Crohn's disease patients: increased interferon-gamma and -alpha mRNA in the intestinal lamina propria mononuclear cells*. J Interferon Res, 1994. **14**(5): p. 235-8.
  213. Mullin, J.M., et al., *Modulation of tumor necrosis factor-induced increase in renal (LLC-PK1) transepithelial permeability*. Am J Physiol, 1992. **263**(5 Pt 2): p. F915-24.
  214. Madara, J.L. and J. Stafford, *Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers*. J Clin Invest, 1989. **83**(2): p. 724-7.
  215. Adams, R.B., S.M. Planchon, and J.K. Roche, *IFN-gamma modulation of epithelial barrier function. Time course, reversibility, and site of cytokine binding*. J Immunol, 1993. **150**(6): p. 2356-63.
  216. Zolotarevsky, Y., et al., *A membrane-permeant peptide that inhibits MLC kinase restores barrier function in in vitro models of intestinal disease*. Gastroenterology, 2002. **123**(1): p. 163-72.
  217. Clayburgh, D.R., et al., *Epithelial myosin light chain kinase-dependent barrier dysfunction mediates T cell activation-induced diarrhea in vivo*. J Clin Invest, 2005. **115**(10): p. 2702-15.
  218. Ligumsky, M., et al., *Role of interleukin 1 in inflammatory bowel disease--enhanced production during active disease*. Gut, 1990. **31**(6): p. 686-9.
  219. Heller, F., et al., *Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution*. Gastroenterology, 2005. **129**(2): p. 550-64.
  220. Desreumaux, P., et al., *Distinct cytokine patterns in early and chronic ileal lesions of Crohn's disease*. Gastroenterology, 1997. **113**(1): p. 118-26.
  221. Inoue, S., et al., *Characterization of cytokine expression in the rectal mucosa of ulcerative colitis: correlation with disease activity*. Am J Gastroenterol, 1999. **94**(9): p. 2441-6.
  222. Al-Sadi, R.M. and T.Y. Ma, *IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability*. J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4641-9.
  223. Ceponis, P.J., et al., *Interleukins 4 and 13 increase intestinal epithelial permeability by a phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Lack of evidence for STAT 6 involvement*. J Biol Chem, 2000. **275**(37): p. 29132-7.
  224. Nusrat, A., et al., *Clostridium difficile toxins disrupt epithelial barrier function by altering membrane microdomain localization of tight junction proteins*. Infect Immun, 2001. **69**(3): p. 1329-36.
  225. Hecht, G., et al., *Clostridium difficile toxin A perturbs cytoskeletal structure and tight junction permeability of cultured human intestinal epithelial monolayers*. J Clin Invest, 1988. **82**(5): p. 1516-24.

- 
226. Gerhard, R., et al., *Activation of Rho GTPases by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1 increases intestinal permeability in Caco-2 cells*. Infect Immun, 1998. **66**(11): p. 5125-31.
227. Yuhan, R., et al., *Enteropathogenic Escherichia coli-induced myosin light chain phosphorylation alters intestinal epithelial permeability*. Gastroenterology, 1997. **113**(6): p. 1873-82.
228. Puthenedam, M., et al., *Modulation of tight junction barrier function by outer membrane proteins of enteropathogenic Escherichia coli: role of F-actin and junctional adhesion molecule-1*. Cell Biol Int, 2007. **31**(8): p. 836-44.
229. McNamara, B.P., et al., *Translocated EspF protein from enteropathogenic Escherichia coli disrupts host intestinal barrier function*. J Clin Invest, 2001. **107**(5): p. 621-9.
230. Hanauer, S.B., et al., *Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial*. Lancet, 2002. **359**(9317): p. 1541-9.
231. Rutgeerts, P., et al., *Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis*. N Engl J Med, 2005. **353**(23): p. 2462-76.
232. Suenart, P., et al., *Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease*. Am J Gastroenterol, 2002. **97**(8): p. 2000-4.
233. Gisbert, J.P., et al., *Role of 5-aminosalicylic acid (5-ASA) in treatment of inflammatory bowel disease: a systematic review*. Dig Dis Sci, 2002. **47**(3): p. 471-88.
234. Wang, F., et al., *Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression*. Am J Pathol, 2005. **166**(2): p. 409-19.
235. Madsen, K.L., et al., *Interleukin 10 prevents cytokine-induced disruption of T84 monolayer barrier integrity and limits chloride secretion*. Gastroenterology, 1997. **113**(1): p. 151-9.
236. Madsen, K.L., et al., *Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora*. Inflamm Bowel Dis, 1999. **5**(4): p. 262-70.
237. McKay, D.M. and P.K. Singh, *Superantigen activation of immune cells evokes epithelial (T84) transport and barrier abnormalities via IFN-gamma and TNF alpha: inhibition of increased permeability, but not diminished secretory responses by TGF-beta2*. J Immunol, 1997. **159**(5): p. 2382-90.
238. Louis, N.A., et al., *Control of IFN-alphaA by CD73: implications for mucosal inflammation*. J Immunol, 2008. **180**(6): p. 4246-55.
239. Cavalcante, I.C., et al., *Effect of novel A2A adenosine receptor agonist ATL 313 on Clostridium difficile toxin A-induced murine ileal enteritis*. Infect Immun, 2006. **74**(5): p. 2606-12.
240. Odashima, M., et al., *Activation of A2A adenosine receptor attenuates intestinal inflammation in animal models of inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 2005. **129**(1): p. 26-33.

241. Guzman, J., et al., *ADOA3R as a therapeutic target in experimental colitis: proof by validated high-density oligonucleotide microarray analysis*. *Inflamm Bowel Dis*, 2006. **12**(8): p. 766-89.
242. Mabley, J., et al., *The adenosine A3 receptor agonist, N6-(3-iodobenzyl)-adenosine-5'-N-methyluronamide, is protective in two murine models of colitis*. *Eur J Pharmacol*, 2003. **466**(3): p. 323-9.
243. Juvonen, P.O., et al., *Splanchnic tissue perfusion in acute experimental pancreatitis*. *Scand J Gastroenterol*, 1999. **34**(3): p. 308-14.
244. Napolitano, L.M., et al., *The impact of femur fracture with associated soft tissue injury on immune function and intestinal permeability*. *Shock*, 1996. **5**(3): p. 202-7.
245. Cohen, C.D., et al., *Comparative promoter analysis allows de novo identification of specialized cell junction-associated proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(15): p. 5682-7.
246. Sheta, E.A., et al., *Cell density mediated pericellular hypoxia leads to induction of HIF-1alpha via nitric oxide and Ras/MAP kinase mediated signaling pathways*. *Oncogene*, 2001. **20**(52): p. 7624-34.
247. Eltzschig, H.K., et al., *HIF-1-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia*. *J. Exp. Med.*, 2005. **202**(11): p. 1493-1505.
248. Cummins, E.P. and C.T. Taylor, *Hypoxia-responsive transcription factors*. *Pflugers Arch*, 2005.
249. Karhausen, J., et al., *Induction of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene by late hypoxia limits HIF-1 expression*. *J Cell Biochem*, 2005. **95**(6): p. 1264-75.
250. Semenza, G.L., *HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia*. *J Appl Physiol*, 2000. **88**(4): p. 1474-1480.
251. Faries, P.L., et al., *Intestinal permeability correlates with severity of injury in trauma patients*. *J Trauma*, 1998. **44**(6): p. 1031-5; discussion 1035-6.
252. Beger, H.G., et al., *Bacterial contamination of pancreatic necrosis. A prospective clinical study*. *Gastroenterology*, 1986. **91**(2): p. 433-8.
253. Cicalese, L., et al., *Acute pancreatitis and bacterial translocation*. *Dig Dis Sci*, 2001. **46**(5): p. 1127-32.
254. Penalva, J.C., et al., *A study of intestinal permeability in relation to the inflammatory response and plasma endocab IgM levels in patients with acute pancreatitis*. *J Clin Gastroenterol*, 2004. **38**(6): p. 512-7.
255. Wang, X.D., et al., *Alterations in intestinal function in acute pancreatitis in an experimental model*. *Br J Surg*, 1996. **83**(11): p. 1537-43.
256. Baron, T.H. and D.E. Morgan, *Acute necrotizing pancreatitis*. *N Engl J Med*, 1999. **340**(18): p. 1412-7.
257. Foitzik, T., et al., *Persistent multiple organ microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: experimental findings and clinical implications*. *Dig Dis Sci*, 2002. **47**(1): p. 130-8.
258. Severs, N.J., *Freeze-fracture electron microscopy*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(3): p. 547-76.

259. Little, D., et al., *PI3K signaling is required for prostaglandin-induced mucosal recovery in ischemia-injured porcine ileum*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **284**(1): p. G46-56.
260. Gayle, J., et al., *Neutrophils increase paracellular permeability of restituted ischemic-injured porcine ileum*. Surgery, 2002. **132**(3): p. 461-70.
261. Marin, M.L., et al., *A freeze fracture study of Crohn's disease of the terminal ileum: changes in epithelial tight junction organization*. Am J Gastroenterol, 1983. **78**(9): p. 537-47.
262. Marin, M.L., et al., *Ultrastructural pathology of Crohn's disease: correlated transmission electron microscopy, scanning electron microscopy, and freeze fracture studies*. Am J Gastroenterol, 1983. **78**(6): p. 355-64.
263. Piche, T., et al., *Impaired intestinal barrier integrity in the colon of irritable bowel syndrome patients: involvement of soluble mediators*. Gut, 2008.
264. Pizzuti, D., et al., *Transcriptional downregulation of tight junction protein ZO-1 in active coeliac disease is reversed after a gluten-free diet*. Dig Liver Dis, 2004. **36**(5): p. 337-41.
265. Yang, R., et al., *IL-6 is essential for development of gut barrier dysfunction after hemorrhagic shock and resuscitation in mice*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **285**(3): p. G621-9.
266. Demaude, J., et al., *Phenotypic changes in colonocytes following acute stress or activation of mast cells in mice: implications for delayed epithelial barrier dysfunction*. Gut, 2006. **55**(5): p. 655-61.
267. Angel, P. and M. Karin, *The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1072**(2-3): p. 129-57.
268. Shaulian, E. and M. Karin, *AP-1 in cell proliferation and survival*. Oncogene, 2001. **20**(19): p. 2390-400.
269. Shaulian, E. and M. Karin, *AP-1 as a regulator of cell life and death*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(5): p. E131-6.
270. Hoffmann, A., T. Gloe, and U. Pohl, *Hypoxia-induced upregulation of eNOS gene expression is redox-sensitive: a comparison between hypoxia and inhibitors of cell metabolism*. J Cell Physiol, 2001. **188**(1): p. 33-44.
271. Millhorn, D.E., et al., *Regulation of gene expression for tyrosine hydroxylase in oxygen sensitive cells by hypoxia*. Kidney Int, 1997. **51**(2): p. 527-35.
272. Salnikow, K., et al., *The regulation of hypoxic genes by calcium involves c-Jun/AP-1, which cooperates with hypoxia-inducible factor 1 in response to hypoxia*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(6): p. 1734-41.
273. Shi, Q., et al., *Cooperation between transcription factor AP-1 and NF-kappaB in the induction of interleukin-8 in human pancreatic adenocarcinoma cells by hypoxia*. J Interferon Cytokine Res, 1999. **19**(12): p. 1363-71.

- 
274. Chen, J., et al., *JunD represses transcription and translation of the tight junction protein zona occludens-1 modulating intestinal epithelial barrier function*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(9): p. 3701-12.
275. Slee, E.A., D.J. O'Connor, and X. Lu, *To die or not to die: how does p53 decide?* Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2809-18.
276. Chen, D., et al., *Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 13595-8.
277. Alarcon, R., et al., *Hypoxia induces p53 accumulation through MDM2 down-regulation and inhibition of E6-mediated degradation*. Cancer Res, 1999. **59**(24): p. 6046-51.
278. Ravi, R., et al., *Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha*. Genes Dev, 2000. **14**(1): p. 34-44.
279. Thiel, G. and G. Cibelli, *Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1*. J Cell Physiol, 2002. **193**(3): p. 287-92.
280. Yan, S.F., et al., *Tissue factor transcription driven by Egr-1 is a critical mechanism of murine pulmonary fibrin deposition in hypoxia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 8298-303.
281. Semenza, G.L., *Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease*. Respir Res, 2000. **1**(3): p. 159-62.
282. Yan, S.F., et al., *Hypoxia/Hypoxemia-Induced activation of the procoagulant pathways and the pathogenesis of ischemia-associated thrombosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(9): p. 2029-35.
283. Iwasaka, C., et al., *Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells*. J Cell Physiol, 1996. **169**(3): p. 522-31.
284. Oda, N., M. Abe, and Y. Sato, *ETS-1 converts endothelial cells to the angiogenic phenotype by inducing the expression of matrix metalloproteinases and integrin beta3*. J Cell Physiol, 1999. **178**(2): p. 121-32.
285. Delannoy-Courdent, A., et al., *The expression of an Ets1 transcription factor lacking its activation domain decreases uPA proteolytic activity and cell motility, and impairs normal tubulogenesis and cancerous scattering in mammary epithelial cells*. J Cell Sci, 1998. **111** ( Pt 11): p. 1521-34.
286. Kitange, G., et al., *Ets-1 transcription factor-mediated urokinase-type plasminogen activator expression and invasion in glioma cells stimulated by serum and basic fibroblast growth factors*. Lab Invest, 1999. **79**(4): p. 407-16.
287. Oikawa, M., et al., *Hypoxia induces transcription factor ETS-1 via the activity of hypoxia-inducible factor-1*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **289**(1): p. 39-43.
288. Jamaluddin, M.S., et al., *Eotaxin Increases Monolayer Permeability of Human Coronary Artery Endothelial Cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009.



- 
289. Zhou, W., et al., *FoxO4 inhibits NF-kappaB and protects mice against colonic injury and inflammation*. *Gastroenterology*, 2009. **137**(4): p. 1403-14.
290. Kimura, K., S. Teranishi, and T. Nishida, *Interleukin-1beta-induced disruption of barrier function in cultured human corneal epithelial cells*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009. **50**(2): p. 597-603.
291. Hoffman, W.H., S.M. Stamatovic, and A.V. Andjelkovic, *Inflammatory mediators and blood brain barrier disruption in fatal brain edema of diabetic ketoacidosis*. *Brain Res*, 2009. **1254**: p. 138-48.
292. Schofield, C.J. and P.J. Ratcliffe, *Oxygen sensing by HIF hydroxylases*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. **5**(5): p. 343-54.
293. Talks, K.L., et al., *The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages*. *Am J Pathol*, 2000. **157**(2): p. 411-21.
294. Yatabe, N., et al., *HIF-1-mediated activation of telomerase in cervical cancer cells*. *Oncogene*, 2004. **23**(20): p. 3708-15.
295. Sullivan, R. and C.H. Graham, *Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype*. *Cancer Metastasis Rev*, 2007. **26**(2): p. 319-31.
296. Liao, D. and R.S. Johnson, *Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 2007. **26**(2): p. 281-90.
297. Euskirchen, G., et al., *CREB binds to multiple loci on human chromosome 22*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(9): p. 3804-14.
298. Mayr, B. and M. Montminy, *Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(8): p. 599-609.
299. Walmsley, S.R., et al., *Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity*. *J Exp Med*, 2005. **201**(1): p. 105-15.

## 10 Danksagung

Bei der Entstehung dieser Arbeit habe ich erkannt, dass diese ohne die großartige Unterstützung vieler kompetenter und freundlicher Kollegen sowie Freunden nicht möglich gewesen wäre. Ich danke meinem Doktorvater Professor Dr. Rosenberger, Oberarzt in der Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin der Universität Tübingen, für sein Vertrauen und die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe die vorliegende Dissertation zu schreiben, sowie für seine hilfreichen Anregungen und motivierenden Worte. Weiterhin danke ich Prof. Dr. Klaus Unertl, ärztlicher Direktor der Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin der Universität Tübingen, für die sehr guten Bedingungen, um meine Arbeit voranzubringen. Ganz besonders gilt mein Dank gegenüber dem Initiator und Betreuer dieser Dissertation Dr. Jörn Karhausen, der mit seinen Ideen, sowie fachlicher und methodischer Kompetenz, diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht hat. Ebenfalls vielen herzlichen Dank für seine Geduld mit ungedulden Doktoranden. Für die technische Unterstützung und das Anlernen danke ich Marion Faigle, die immer ein offenes Ohr für uns Doktoranden hatte. Stephanie Zug, für ihre großartige Unterstützung bei den Experimenten, sowie Alice Mager, Michaela Hoch-Gutbrodt, Irene Vollmer und Edgar Hoffmann, von denen ich viel über die Methodik des experimentellen Arbeitens gelernt habe. Ebenfalls geht mein Dank an Prof Dr. Hartwig Wolburg, Institut für Pathologie der Universität Tübingen, für die elektronenmikroskopischen Studien, welche diese Arbeit entscheidend vorangebracht haben. Des Weiteren gilt mein Dank allen Kodoktoranden der Arbeitsgruppe, für ihre Unterstützung und Ermutigung, vor allem in schwierigen Zeiten, die sich unausweichlich in der laborexperimentellen Forschung ergeben. Letztlich möchte ich meine tiefe Dankbarkeit gegenüber meinen lieben Eltern aussprechen, deren Hilfe, Unterstützung und Zuspruch mein gesamtes Studium und im letztlich diese Arbeit möglich gemacht haben.