## INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Naturwissenschaftlichen-Mathemathischen Gesamtfakultät der Ruprecht – Karls – Universität Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologe Holger Schlüter aus Emmerich

Tag der mündlichen Prüfung:

# Schlussleisten (*Zonulae occludentes*) und biochemisch verwandte Strukturen:

Tight Junction-Proteine und -Funktionen in mehrschichtigen Epithelien, mit besonderer Berücksichtigung der Plattenepithelmetaplasie

> Gutachter Prof. Dr. Werner W. Franke Prof. Dr. Bernhard Dobberstein

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Zellbiologie am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg unter der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Werner W. Franke und bei der Beiersdorf AG in Hamburg in der Forschungsabteilung Mikroskopie unter der wissenschaftlichen Leitung von Dr. Roger Wepf, jetzt Direktor des Zentrums für Elektronenmikroskopie (EMEZ) der Eidgenössischen Technischen Hochschule (ETH) Zürich, angefertigt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bzw. werden veröffentlicht:

H. Schlüter, R. Wepf, I. Moll, W.W. Franke 2004. Sealing the live part of the skin: The integrated meshwork of desmosomes, tight junctions and curvilinear ridge structures in the cells of the uppermost granular layer of the human epidermis. Eur. J. Cell. Biol. 83: 655-665

H. Schlüter, I. Moll, H. Wolburg, W.W. Franke 2006. The structures containing tight junction proteins in the epidermis and related stratified epithelia. Eur. J. Cell. Biol. in press

R. Wepf, T. Richter, S.S. Biel, H. Schlüter, F. Fischer, K.P. Wittern, H. Hohenberg 2006. Multimodal imaging of skin structures: Imagining imaging of the skin. In: Bioengineering of the Skin: Skin Imaging and Analysis. (K.P. Wilhelm, P. Elsner, E. Berardesca, H.I. Maibach, Hrsg.), Marcel Dekker, Inc., New York, USA, in press

H. Schlüter, C. Grund, N. Gassler, H. Wolburg, W.W. Franke The organization of plaquebearing Multicellular junctions in squamous metaplasias of the respiratory tract and in stratified cell culture models of bronchial epithelial cell lines. In preparation.

meinen Eltern

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	5
2.1 STRUKTURELLE KLASSIFIZIERUNG DER EPITHELIEN	5
2.2 PATHOGENESEN VON EPITHELIEN	6
2.3 FUNKTIONEN EPITHELIALER ZELLVERBÄNDE	6
2.4 GEWEBE-AUFBAU UND ZELLARCHITEKTUR-ELEMENTE	7
2.4.1 Cytoskelett-Filamente	7
2.4.1.1 Die Intermediärfilamente als molekulare Differenzierungscharakteristika	7
2.4.2 Interzelluläre Verbindungen	8
2.4.2.1 Adhärenz-Verbindungen	
2.4.2.2 Desmosomen	
2.4.2.3 "Tight Junctions"	
2.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	
3. MATERIAL	23
3.1 Geräte	23
3.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN	24
3.3 Kits	25
3.4 Chemikalien	25
3.5 SYNTHETISCHE OLIGODESOXYRIBONUKLEOTIDE	25
3.6 BIOLOGISCHE MATERIALIEN	27
3.6.1 Kulturzellen	27
3.6.2 Gewebe	
3.7 ZELLKULTUR-MEDIEN UND -ZUSÄTZE	
3.8 Antikörper	29
3.8.1 Erst-Antikörper	
3.8.2 Zweit-Antikörper	
3.9 Häufig verwendete Puffer und Medien	
4. METHODEN	
4.1 Zellbiologische Methoden	
4.1.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen	
4.1.1.1 Kultivierung von 16HBE140 <sup>-</sup> Zellen	
4.1.1.2 Kultivierung von CaLu-3-Zellen	
4.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	
4.1.3 Zellzahlbestimmung	
4.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	
4.2.1 RNA-Präparation aus Kulturzellen	
4.2.2 cDNA-Synthese	
4.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	
4.2.4 Analytische Agarosegel-Elektrophorese	

4.2.5 DNA-Sequenzierung	37
4.3 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	38
4.3.1 Herstellung von Zellextrakten	38
4.3.1.1 SDS-Extrakte	38
4.3.1.2 Proben-Bereitung nach dem Laemmli-Verfahren	38
4.3.1.3 Anreicherung löslicher Proteine aus Zellkulturen durch Ultrazentrifugation	39
4.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry	40
4.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
4.3.5 "Western Blot"-Analyse	44
4.3.5.1 Transfer der Polypeptide auf eine Membran	44
4.3.5.2 Unspezifisches Anfärben von Proteinen auf PVDF-Membranen mit Coomassie Brillant Blue	45
4.3.5.3 Spezifische Antigen-Erkennung durch Antikörper auf PVDF-Membranen ("Western Blot")	45
4.3.6 Fraktionierung von Proteingemischen durch Dichtegradientenzentrifugation	46
4.3.7 Immunpräzipitation von Proteinkomplexen aus Zellextrakten	47
4.3.8 Färbung von Proteinen in Gelen	48
4.3.8.1 Unspezifisches Anfärben von Proteinen in SDS-Gelen mit Coomassie-Brillant-Blau Färbung	48
4.3.8.2 Kolloidale Coomassie-Brillant-Blau Färbung	48
4.3.9 Massenspektrometrie	49
4.3.9.1 Trypsin-Spaltung im Gel	49
4.3.9.2 MALDI-Analyse	49
4.4 FLUORESZENZMIKROSKOPIE	50
4.4.1 Herstellung von Präparaten	50
4.4.1.1 Kryostatschnitte	50
4.4.1.2 Paraffinschnitte	50
4.4.1.3 Kulturzellen	50
4.4.2 Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie	51
4.4.2.1 Immunfluoreszenz an Kryostatschnitten	51
4.4.2.2 Antigen-Freilegung (Antigen-Retrieval) und Immunmarkierung von Paraffin-Schnitten durch	
Mikrowellenbehandlung	51
4.4.2.3 Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit auf Glasplättchen gewachsenen Kulturzellen	52
4.4.2.4 Doppellokalisierung	52
4.4.3 Dokumentation der indirekten Immunfluoreszenz-Mikroskopie	53
4.4.3.1 Dokumentation der indirekten Immunfluoreszenzen mit einem Zeiss Axiophot	53
4.4.3.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	53
4.5 LICHTMIKROSKOPIE	54
4.5.1 HE-Färbung (Haematoxylin-Eosin Färbung)	54
4.6 ELEKTRONENMIKROSKOPIE	54
4.6.1 Herstellung elektronenmikroskopischer Präparate für das Transmissions-	
Elektronenmikroskop (TEM)	54
4.6.1.1 "Konventionelle" Ultradünnschnitt-Elektronenmikroskopie	55
4.6.1.2 Lösungen	56
4.6.1.3 Immun-Elektronenmikroskopie	57
4.6.2 Gefrierbruch Technik (Freeze-Fracture)	58
4.6.2.1 Probenpräparation	58
	11

4.6.2.2 Gefrierbruch	60
4.6.2.3 Krvo-Rasterelektronenmikroskopie	
4.7 Physiologische Methoden	
4.7.1 Bestimmung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER)	
4.7.2 Messung der Barrierefunktion von Epithelien anhand des Transports von EITC-mark	kierten
Dextranen	63
473 Tracer"-Technik (Lanthanchlorid-Ionen-Diffusion in Enithelien)	
5. ERGEBNISSE	65
5.1 BILDUNG, ANORDNUNG UND MÖGLICHE FUNKTIONEN VON "TIGHT JUNCTIONS" UND TIGHT JUNC	TION-
PROTEINEN IN SÄUGETIER-PLATTENEPITHELIEN	65
5.1.1 Mikroskopische Darstellung eines komplexen Plattenepithels am Beispiel der Epide	r <b>mis</b> 65
5.1.2 Schichtenspezifische Synthesen und Anordnungen von Zellverbindungsproteinen in	1
Plattenepithelien: Desmosomale Proteine in der Epidermis als Beispiel	68
5.1.3 Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Tight Junction-Proteine in Säu	getier-
Plattenepithelien	- 
5.1.4 Elektronenmikroskopische Untersuchungen von TJ bzw. anderen TJ-Protein-haltige	n
Strukturen in verschiedenen Plattenepithelien	75
5.1.4.1 Darstellung von klassischen Tight Junction-Strukturen in der fötalen, menschlichen Epide	rmis 75
5.1.5 Ultrastrukturelle Untersuchungen von Zell-Zell-Kontakten in der Epidermis mit Hilfe	der
Gefrierbruch-Technik	77
5.1.6 Ultrastrukturelle Untersuchungen in TJ-Protein-haltigen subapikalen Zellschichten	
verschiedener Plattenepithelien: Definition des Punctum occludens	
5.1.7 Biochemischer Nachweis von Tight Junction-Proteinen in mehrschichtigen Plattener	oithelien
5.1.8 Darstellung der Barriere-Funktion von Tight Junction-Strukturen in Plattenepithelien	mit Hilfe
eines elektronendichten "Tracers" (LaCl <sub>2</sub> ) am Beispiel der Mäuse-Epidermis	
5.2 BII DUNG. ANORDNUNG UND MÖGLICHE EUNKTIONEN VON TIGHT JUNCTIONS UND TIGHT JUNCT	ON-
	88
521 Charakterisierung von Tight Junctions in Zellkulturen, die von Zellen des Darmenith	els
	88
5.2.1.1 Genevoressionsanalyse von Tight Junction-Proteinen in polaren Enithelzellen	
5.2.1.2 Biochemischer Nachweis von TJ-Proteinen in Kulturen polarer Epithelzellen	
5.2.1.3 Immunlokalisierung von Tight Junction-Proteinen in CaCo-2-Zellen	
5.2.1.4 Ultrastrukturelle Untersuchung der Tight Junctions der CaCo-2-Zellen	
5.2.1.5 Physiologische Untersuchungen zur Tight Junction-Barriere der CaCo-2-Zellkulturen	
5.2.2 Charakterisierung von Tight Junction-Strukturen in Kulturen polarer, bronchialepithe	lialer
Zellen	97
5.2.2.1 mRNA-Analyse von Tight Junction-Proteinen in den bronchialepithelialen Linien 16HBE-	und
CaLu-3	97
5.2.2.2 Biochemischer Nachweis und Lokalisierung von Tight Junction-Proteinen in den Zellen de	ər Linien
16HBE und CaLu-3	

5.2.2.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Anordnung von Tight Junctions in den
bronchialepithelialen Zellkulturlinien 16HBE und CaLu-3
5.2.2.4 Untersuchung der physiologischen Barriere-Eigenschaften der einschichtig gewachsenen Kulturen
von bronchialepithelialen Zellen der Linien 16HBE und CaLu-3104
5.3 BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER TIGHT JUNCTION-PROTEINKOMPLEXE VERSCHIEDENER
ZELLKULTURSYSTEME
5.3.1 Dichtegradientenzentrifugation von TJ-Molekülkomplexen in Lysaten verschiedener
Zellkultursysteme108
5.3.2 Nachweis heterotypischer Claudin-Komplexe in polaren Epithelzellen unterschiedlicher
Herkunft
5.4 CHARAKTERISIERUNG VERSCHIEDENER TIGHT JUNCTION-PROTEINE IN MENSCHLICHEM
BRONCHIALEPITHEL IN SITU
5.4.1 Immunlokalisierung von Tight Junction-Proteinen in menschlichem Bronchialepithel in situ 115
5.4.2 Ultrastrukturelle Untersuchung von Tight Junctions in menschlichem Bronchialepithel in situ
5.4.2.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Ultradünnschnitten
5.4.3 Charakterisierung der verschiedenen Zelltyp-Differenzierungs-"Marker" in menschlichem
Bronchialepithel in situ
, 5.4.3.1 Immunlokalisierung der Cytokeratine im Bronchialepithel
5.4.3.2 Verteilung desmosomaler Proteine im menschlichen Bronchialepithel
5.5 VERTEILUNG VERSCHIEDENER CYTOSKELETT- UND ZELL-ZELL-VERBINDUNGSPROTEINE IN
PLATTENEPITHELMETAPLASIEN DER MENSCHLICHEN LUNGE IN SITU
5.5.1 Reaktionen von Differenzierungs-Markern in der Plattenepithelmetaplasie der Lunge
5.5.1.1 Immunlokalisierung der Cytokeratine in Plattenepithelmetaplasien
5.5.1.2 Desmosomale Proteine in menschlichen Plattenepithelmetaplasien in situ
5.5.2 Lokalisierung von Tight Junction-Proteinen in Plattenepithelmetaplasien der Lunge in situ. 127
5.6 UNTERSUCHUNG DES 16HBE AIC-ZELLKULTURMODELLS DER PLATTENEPITHELMETAPLASIE DES
BRONCHIALTRAKTS
5.6.1 Charakterisierung der Differenzierungs-Marker im 16HBE AIC-Zellkulturmodell
5.6.1.1 Immunlokalisierung der Cytokeratine in mehrschichtig gewachsenen 16HBE-Zellkulturen
5.6.1.2 Anordnung desmosomaler Proteine in Kulturmodellen bronchialepithelialer Zellen
5.6.2 Charakterisierung von Tight Junction-Proteinen in mehrschichtigen bronchialepithelialen
Zellkulturmodellen
5.6.2.1 Biochemischer Nachweis von Tight Junction-Proteinen in mehrschichtig erscheinenden 16HBE-
Zellen
5.6.2.2 Immunlokalisierungen von Tight Junction-Proteinen in mehrschichtigen bronchialepithelialen
Zellkulturmodellen
5.6.2.3 Ultrastrukturelle Untersuchung der Tight Junction-Strukturen in den AIC-Zellkulturen der
bronchialepithelialen Linien 16HBE und CaLu-3142
5.6.2.4 Untersuchungen zu den Barriere-Eigenschaften von AIC-Kulturen der Epithelzellen der Linien
16HBE und CaLu-3
5.8 IMMUNLOKALISIERUNG VON TIGHT JUNCTION-PROTEINEN IN UNTERSCHIEDLICH DIFFERENZIERTEN
PLATTENEPITHELKARZINOMEN DER MENSCHLICHEN LUNGE IN SITU

	5.8.1 Immunlokalisierung von Tight Junction-Proteinen in basaloiden Plattenepithelkarzinomen.	155
	5.8.3 Immunlokalisierung von Tight Junction-Proteinen in verhornten Plattenepithelkarzinomen	der
	Lunge	158
	5.9 IDENTIFIZIERUNG UND LOKALISIERUNG DES TIGHT JUNCTION-TRANSMEMBRANPROTEINS TRICELLULIN	IN
	VERSCHIEDENEN MENSCHLICHEN EPITHELIEN IN SITU UND IN ZELLKULTUREN	. 160
	5.9.1 Immunlokalisierung von Tricellulin in menschlichem Bronchialepithel in situ	160
	5.9.2 Immunlokalisierung von Tricellulin in Zellkulturen einschichtiger polarer Epithelzellen	162
	5.9.3 Immunlokalisierung von Tricellulin in Zellen der menschlichen bronchialepithelialen	
	Zellkulturlinien 16HBE und CaLu-3	. 164
	5.9.4 Immunlokalisierung von Tricellulin in Kulturen von stratifiziert wachsenden Zellen der	
	menschlichen Keratinocyten-Linie HaCaT	166
6.	DISKUSSION	. 173
	6.1 TIGHT JUNCTIONS ALS WIRKLICHE "SCHLUSSLEISTEN" (ZONULAE OCCLUDENTES) AUCH IN	
	MEHRSCHICHTIGEN EPITHELIEN	.173
	6.2 PUNCTA OCCLUDENTIA IN PLATTENEPITHELIEN: IDENTIFIZIERUNG UND DEFINITION ALS KLEINSTES TIG	НТ
	JUNCTION-ELEMENT UND BAUSTEIN FÜR GRÖßERE TJ-VERWANDTE STRUKTUREN	. 176
	6.3 MOLEKULARE KOMPONENTEN DER TJ-STRUKTUREN IN EPIDERMALEN KERATINOCYTEN IN SITU UND IN	I
	ZELLKULTUR	. 178
	6.4 DIE TJ-PROTEINE UND – STRUKTUREN DER BRONCHIALEPITHELIEN, VON BRONCHIAL-ZELLKULTUR-LIN	NIEN
	UND DER BRONCHIAL-PLATTENEPITHELMETAPLASIE	. 178
	6.5 EVALUIERUNG DER MEHRSCHICHTIG GEWACHSENEN BRONCHIALEN ZELLKULTUREN ALS IN VITRO-	
	Modelle für Plattenepithelmetaplasien	. 181
	6.6 DIE TRICELLULINE, EIN LÜCKEN-VERSCHLUSS-PROTEIN IN EPITHELGEWEBEN, UND SEINE MÖGLICHE	
	BEDEUTUNG IN PATHOLOGISCH VERÄNDERTEN EPITHELIEN	. 181
	6.6 FOLGERUNGEN UND FORDERUNGEN	. 182
7.	LITERATUR	. 183
	Abbildungsverzeichnis	100
	710011001190701201011110	177

# Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere						
Abb.	Abbildung						
AIC	"Air Interface Culture"						
AJ	Adhaerence Junction						
APS	Ammoniumperoxiddisulfat						
ATCC	American Type Culture Collection						
bar	Maßeinheit des Drucks						
bp	Basenpaare						
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)						
bzw.	beziehungsweise						
ca.	circa						
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure						
СК	Cytokeratine						
CMV	Cytomegalovirus						
D	Desmosom						
DAPI	4',6-Diamidino-2'-phenylindol						
d.h.	das heißt						
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium						
DMSO	Dimethylsulfoxid						
DNA	Desoxyribonukleinsäure						
DNase	Desoxyribonuklease						
dNTP	Gemisch aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP						
DTT	Dithiothreitol						
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen						
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure (als Dinatriumsalz verwendet)						
FITC	Fluoresceinisothiocyanat						
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)						
g	Gramm / Maßeinheit der Erdbeschleunigung						
GJ	"Gap Junction"						
gp	"guinea pig"; Meerschwein						
gp	Guinea Pig						
H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	Demineralisiertes Wasser						
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung						
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)						
lgG	Immunglobulin G						
IF	Intermediärfilament						
IP	Immunpräzipitation						
JAM	"Junctional Adhesion Molecule"						
кра	KIIO-Dalton						

М	molar
mA	Milliampere
mAK	monoklonaler Antikörper
MALDI-MS	"Matrix.assisted Laser Desorption Ionization-Mass Spectrometry"
MEM	"minimum essential medium"
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mRNA	"messenger" RNA
m	Mouse
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mM	millimolar
Min	Minute(n)
nanoESI-MS	Nanoelectrospray ionization mass spectrometry
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	nanomolar
OBG	n-Octyl-β-D-glucopyranoside
рА	polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS-T	Phosphate Buffered Saline mit 0,1 % Tween <sup>®</sup> 20
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PEM	Plattenepithelmetaplasie
PKP	Plakophilin
PVDF	Polyvinylidene-Difluorid
rb	"Rabbit"; Kaninchen
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	PCR mit vorangehender reversen Transkription
S	Sedimentationskoeffizient (Svedberg-Einheit)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek	Sekunde
sog.	Sogenannte(n)
Std.	Stunde (n)
Tab.	Tabelle
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	(N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)
TJ	Tight Junction
Triton-X 100	Ethylenglycol(x)p-y-octylprenol
Tris	(2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol)
Tween-20	Polyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit (s)

u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge TL-100, Beckman
V	Stromspannung gemessen in Volt
vgl.	vergleiche
Vol	Volumen
(w/v)	Gewicht pro Gesamtvolumen
WHO	"World Health Organisation"
z.B.	zum Beispiel
ZO	Zonula occludens
ZO-1	Protein Zonula occludens 1
ZO-2	Protein Zonula occludens 2
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μΜ	mikromolar
Ω	elektrischer Widerstand gemessen in Ohm
°C	Grad Celsius

# 1. Zusammenfassung

In vielzelligen Organismen bilden Epithelien an der Körperoberfläche und als Auskleidung der inneren Lumina funktionelle Grenzschichten, die sowohl das Körperinnere von der äußeren Umwelt und die Fortsetzung der Körperoberfläche, d.h. die Lumina der Organe trennen als auch das Körperinnere in verschiedene Kompartimente unterteilen. Dabei sind die Epithelzellen jeweils in charakteristischer Weise durch verschiedene Zell-Zell-Verbindungen zu einem bestimmten Epithelgewebe gekoppelt.

Die "Tight Junctions" (TJ) sind dabei für die Herstellung und Aufrechterhaltung der unterschiedlichen molekularen Zusammensetzungen der einzelnen Kompartimente, vor allem als Haupt-Barriere für die parazelluläre Ausbreitung von Zellen, Partikeln und vielen Molekülarten, besonders wichtig. Während die Zell-Zell-Verbindungen der TJ seit den 1960er Jahren in einschichtigen polaren Epithelien sowohl strukturell als auch funktionell eingehend untersucht worden sind, galt bis zur Jahrtausendwende noch die überwiegende Ansicht in der Fachliteratur – auch als Lehrbuchdogma -, dass TJ oder äquivalente Strukturen in mehrschichtigen Epithelien nicht vorkommen und hier andere Strukturen, nämlich interzelluläre Lipid-Akkumulationen, für die Bildung und Aufrechterhaltung der Barriere-Funktion verantwortlich sind. Nachdem in den letzten Jahren jedoch TJ-Proteine sowie TJartige Strukturen und Funktionen in einigen mehrschichtigen Epithelien und davon abgeleiteten Geweben (Hassall-korpuskel und Tumoren) nachgewiesen worden sind, sollte in der vorliegenden Dissertation geklärt werden, welche TJ-Proteine in bestimmten TJ-Strukturen oder in sog. "TJ-verwandten" Anordnungen in mehrschichtigen Epithelien von Säugetieren vorkommen. Außerdem sollte geklärt werden, ob und wie pathologische mehrschichtige Epithel-Bildungen wie sog. Plattenepithel-Metaplasien oder bestimmte Strukturen in Plattenepithel-karzinomen typische TJ-Proteine enthalten können.

Bei diesen Untersuchungen konnten zunächst kleine, punkt- oder zapfenförmig erscheinende TJ-artige Membran-Kontaktstellen als häufige interdesmosomale Strukturen nachgewiesen werden: Mit Hilfe der Gefrierbruchtechnik ließen sich elektronenmikroskopisch in der Membranspaltebene zwischen den Desmosomen diese kleinen Strukturelemente als säulenstumpfartige Erhebungen von bis zu ca. 12 nm Durchmesser darstellen, die an manchen Stellen auch zu linearen, z.T. gewundenen und verzweigten Reliefbändern fusioniert erschienen. Zumindest in bestimmten Plattenepithelien entsprachen die Positionen dieser interdesmosomalen Membran-Kontakte in licht- wie in elektronenmikroskopischen Immunlokalisierungsexperimenten Stellen, an denen typische TJ-Proteine wie z.B. Occludin oder bestimmte Claudine andereichert waren. Diese neuartigen TJ-Protein-Strukturen wurden daher als "Stud Junctions" (Puncta occludentia) bezeichnet und mit anderen TJ-verwandten, Claudin- bzw. Occludin-haltigen interdesmosomalen Strukturen wie den "Lamellated Junctions" oder den "Sandwich Junctions" einiger Plattenepithelien verglichen. Zur möglichen molekularen Struktur und zur Bedeutung dieser "Stud Junctions" werden Hypothesen vorgestellt.

Weiterhin konnten TJ-Proteine und sowohl typische TJ- als auch TJ-verwandte Strukturen in metaplastisch verändertem Bronchialepithel *in situ* und in vermeintlich mehrschichtigen Zellkultur-Modellen der Plattenepithelmetaplasie nachgewiesen werden, wobei z.T. auch die jeweilige Fähigkeit, eine Barriere-Funktion in der Kulturschale auszuüben, untersucht wurde. Durch biochemische und immunologische Analysen ließen sich dabei TJ-Proteine wie Claudin-1, Claudin-4 und Claudin-7 nachweisen, vielfach zusammen mit Occludin bzw. Protein ZO-1. Elektrophysiologische Messungen ergaben aber, dass in sog. "Monolayer"-Kulturen von aus Bronchialepithelien abgeleiteten Zellen diese TJ-artigen Gebilde für die Barriere-Funktion allenfalls nur eine sehr geringe Bedeutung haben können. Denn im Vergleich mit der von einem Kolonkarzinom abgeleiteten, polaren Epithelzell-Linie CaCo-2 wiesen die polaren bronchialepithelialen Zellen der Linien 16HBE und CaLu-3 recht niedrige und die an einer Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht induzierten Metaplasie-Modelle ("Multilayer"-Kulturen) sogar nur äußerst geringe - Widerstandswerte auf, deren Signifikanz überdies noch zweifelhaft blieb. Biochemische Befunde, vor allem bei Immunpräzipitationsexperimenten, legten außerdem den Schluss nahe, dass bei diesen bronchialepithelialen Zellkulturen Claudin-1 mit Claudin-7 und dem ebenfalls vorkommenden Claudin-4 Komplexe bilden kann. Dagegen wurden bei CaCo-2 Zellen ausschließlich Interaktionen von Claudin-1 mit Claudin-7 nachgewiesen.

Zusätzlich konnten TJ-Proteine (z.B. Occludin, Claudin-1, Claudin-4, Claudin-7, Protein ZO-1, Cingulin) und zum Teil auch TJ-artige Strukturen in bestimmten Bereichen unterschiedlich differenzierter Plattenepithelkarzinome - auch der Lunge - und in Plattenepithelmetaplasien *in situ* sowie in den entsprechenden Zellkulturmodellen erkannt werden.

Auch das erst jüngst entdeckte TJ-Transmembranprotein Tricellulin konnte an den jeweiligen Kontaktstellen von drei Zellen nicht nur in einschichtigen Epithelien und davon abgeleiteten Zellkulturlinien lokalisiert werden, sondern auch an den entsprechenden Stellen in der obersten Schicht von Kulturen mehrschichtiger Keratinocyten der menschlichen HaCaT-Linie. Ein Nachweis von Tricellulin-haltigen Kontakten in mehrschichtigen Epithelien *in situ* scheiterte allerdings bisher daran, dass im Menschen – mindstens - zwei Spleißformen des Tricellulin-Gens vorkommen, aber für die hier wohl relevante zweite Spleißvariante bisher noch kein spezifischer Antikörper zur Verfügung stand.

Die Barriere- bzw. Selektions-Funktion der TJ-Strukturen in mehrschichtigen Epithelien und entsprechenden Zellkultur-Modellen konnte auch mit Hilfe wasserlöslicher Nachweismittel (*Tracer*) wie z.B. LaCl<sub>3</sub> oder mit Dextran-Partikeln verschiedener Größe elektronenmikroskopisch bzw. in physiologischen Translokationsexperimenten bestätigt werden. Die Befunde werden auch im Zusammenhang mit der Hypothese einer extrazellulären "Lipid-Barriere" diskutiert bzw. als Bestätigung der Vorstellung, dass es in vielen, vielleicht allen Plattenepithelien zwei verschiedene Barriere-Systeme für parazelluläre Molekülverteilungen gibt, die beide essentiell, aber auch komplementär sind, d.h. dass es sowohl ein TJ-System als auch eine Absperrung durch interzelluläre lipidreiche Dichtungen gibt.

Die Ergebnisse dieser Dissertation belegen also, dass es in mehrschichtigen Epithelien generell TJ-Proteine in verschiedenen TJ-artigen Struktursystemen, aber auch in weiteren, bisher noch nicht hinreichend erforschten "Junction"-Strukturen gibt, wobei in jedem Fall mindestens ein komplettes "Abschluss-System" in den obersten lebenden Zellschichten vorkommt und wohl essentiell ist. Von den zusätzlichen TJ-Protein-haltigen Strukturen ist das in dieser Arbeit definierte interdesmosomale *Punctum occludens* das räumlich kleinste, durch seine Häufigkeit aber sicherlich auch bemerkenswerteste Strukturelement, das es nun in zukünftigen Experimenten in seiner Funktion und möglichen Beteiligung beim Aufbau größerer TJ-Strukturen aufzuklären gilt. Während die Bronchial-Plattenepithel-Metaplasie *in situ* einem ähnlichen geordneten Aufbau wie andere Plattenepithelien aufweist, stellen die mehrschichtig erscheinenden Zellkultur-Systeme bronchialepithelialer Herkunft kein Kultur-Modell einer Metaplasie, sondern eine Zellkultur-Struktur *sui generis* dar, bei der TJ-artige Molekülanordnungen in praktisch allen Zellschichten vorkommen. Die Bedeutung dieser Befunde für einige Funktionen solcher Epithelien, bestimmter krankhafter Entartungen (Plattenepithelmetaplasien) und in der zukunftigen Tumordiagnostik wird diskutiert.

# "Schlussleisten" (*Zonulae occludentes*) and Biochemically Related Structures:

# Tight Junction-Proteins and Functions in Stratified Epithelia, With Special Reference to Squamous Epithelial Metaplasia

# 1. Summary

In the multicellular organisms of the animal kingdom, the epithelia provide a structural continuum covering the body surface and certain luminal spaces of inner organs, thus separating the environment and the lumina from the body interior and establishing several internal compartments and organs. Characteristically, the specific epithelial cells are interconnencted by diverse kinds of cell-cell junctions to form and maintain a certain epithelial tissue.

In this epithelial system, the "tight junctions" (TJ) are of crucial importance for the assembly and stable interaction of the molecular components of the individual compartments. in particular as they represent the main barrier to the paracellular translocation of cells, particles and molecules. While TJ have been extensively studied since the 1960s with structural and physiological methods in simple, polar epithelia, it has been a long-standing, general dogma in the literature, textbooks included, that TJ structures do not occur in stratified epithelia and that in certain squamous stratified epithelia such as the epidermis, for example, a totally different kind of structure, i.e. intercellular lipid accumulations, are responsible for the formation and maintenance of the barrier and its functions. As, however, in recent years TJproteins and compositionally TJ-related structures have been identified in some squamous stratified epithelia and epithelial tumors, it should be clarified in this thesis which of these proteins occur in specific TJ-structures or in other assemblies of mammalian stratified epithelia or of cultured cells derived therefrom. Specifically, it should also be elucidated whether and in which way pathological formations of stratified epithelial cells such as squamous epithelial metaplasias or certain special structures within squamous cell carcinomas can form TJ-related or are based on structures.

In the course of these experiments, it has been noted that additional small, interdesmosomal, TJ-related cell-cell-contact structures occur in several of these tissues. Using freeze-fracture electron microscopy, small (diameter  $\leq$ 12 nm) columnar projections have been noticed in the intramembranous fracture plane, which sometimes appear to line up and form limited curvilinear rows and ridges, corresponding in certain cell layers of stratified epithelia to interdesmosomal membrane-membrane contact sites of enrichment of occludin and/or some members of the claudin families of proteins. These novel small structural elements, termed "stud junctions" (*Puncta occludentia*), have therefore been compared with – and differentiated from – other interdemosomal, TJ-protein-rich structures recently defined in stratified epithelia such as the "lamellated junctions" and the "sandwich junctions". Hypotheses of the possible molecular structure and of functional roles of stud junction assemblies are presented.

TJ-proteins as well as typical TJ and TJ-related structures have been detected in airway epithelia, including tracheal and bronchial epithelium as well as squamous cell metaplasias, and also putative cell culture metaplasia models, and such cell layers have also been examined in physiological experiments for their transepithelial resistance and possible barrier functions with respect to paracellular diffusion and translocation processes. Using biochemical and immunological methods, several transmembrane TJ-proteins (e.g. occludin, claudins -1, -4 and -7) as well as TJ-plaque-proteins such as protein ZO-1 and cingulin have been detected in such junctions. Electrophysiological measurements, on the other hand, have made it clear that possible barrier functions can only be at a very low level, if at all significant, in layers of cultured bronchial cells, in particular in comparison with certain other polar epithelial cell monolayers such as those formed by the intestinal cell line CaCo-2. Such minimal transepithelial resistance and barrier effects have been observed in electrophysiological measurements as well as in experiments in which paracellular diffusions of dextran beads of certain size classes and of lanthanum ions have been examined. Correspondingly, only very little restriction of paracellular translocations have been noted when air-liquid-interface-grown, - stratified looking bronchioepithelial cell layer cultures of the lines 16HBE and CaLu-3 have been examined. Moreover, using detergent-lysed cells, biochemical analyses of coimmunprecipitation experiments, have revealed that in these bronchioepithelial cell culture lines, protein complexes of claudin-1 with claudin-4 or claudin-7 were present.

In general, a number of TJ-proteins (e.g. claudins -1, -4, -7, occludin, protein ZO-1, cingulin) as well as some of the TJ-related structures have also been detected - in various combinations – in some of the squamous epithelial metaplasias and certain differentiated subforms of squamous cell carcinomas of the lung. Moreover, using immunocytochemistry, the very recently discovered TJ-protein, tricellulin, has not only been localized in polar epithelial cells of airways *in situ* and in culture precisely and only to sites at which three cells form angular contacts but also in the uppermost layer of cells of cell culture systems forming squamous multilayer epithelia such as keratinocytes of the line HaCaT. The fact that tricellulin has not been detected in some stratified tissues *in situ* and in certain cell culture monolayers may be explained by the finding of the existence of more than one mRNA-splice-form of tricellulin and the lack of immunological cross-reactivity between these isoforms with two specific antibodies used.

The results show that in squamous epithelia TJ-proteins generally occur in different TJrelated structures but also in other, yet largely unknown cell-cell-interaction structures, and that in these stratified epithelial structures an assembly of TJ-proteins and some apical barrier system has been found. Of all these various TJ-protein-containing structures the *punctum occludens* is certainly the smallest subunit known. While the bronchial squamous epithelial metaplasia *in situ* shows a vertically differentiated layer organisation, the apparently multilayered cell culture systems derived from bronchial cells and grown at an air-liquidinterface do not display significant differentiation of this kind and an apical barrier system but represent an artificial cell growth system *sui generis*.

The observations are discussed with respect to diverse functions of such epithelia, including pathological derivatives, and also with respect to the potential value of such findings and reagents in diagnostic pathology.

## 2. Einleitung

In vielzelligen Organismen, ist es, um das Funktionieren des komplexen Systems zu gewährleisten unerlässlich, dass das Körperinnere von der äußeren Umwelt isoliert wird, wobei sich diese äußere Umwelt über eine Gasphasen-Kontinuität in die Lumina innerer Organe fortsetzen kann. Zum anderen muss das Körperinnere in verschiedene Kompartimente, die verschiedene Gase bzw. Flüssigkeiten unterschiedlicher molekularer Zusammensetzung unterteilt werden. Epitheliale und endotheliale (Blut- und Lymphgefäße) Zellschichten sind für die Aufrechterhaltung derartiger Barrieren verantwortlich.

#### 2.1 Strukturelle Klassifizierung der Epithelien

Epithelien sind funktionelle Grenzschichten an äußeren (z.B. Haut) und inneren (z.B. Verdauungstrakt, diverse Drüsen, Atemwege) Körperoberflächen. Die Epithelzellen bilden um ein Lumen herum flächig oder röhrenförmig organisierte Zellanordnungen, die aus einer oder mehreren übereinander liegenden Zellschichten bestehen (deutschsprachige Übersichten z.B. bei (Drenckhahn 1994; Kartenbeck 2003).

Die einschichtigen Epithelien werden weiter nach der Form ihrer Zellen unterteilt. In hochprismatischen bzw. zylindrischen Epithelien sind die Zellen höher als breit. Häufig besitzen die Zellen dieses Epitheltyps auf der apikalen Seite typische Fortsätze wie z.B. Mikrovilli, oder Stereocilien oder bewegliche Fortsätze wie Kinocilien.

Im Zylinderepithel, das zum großen Teil die Atemwege auskleidet, sitzen alle Zellen der Basallamina auf, jedoch erreichen einige die Oberfläche. Infolgedessen sind die ovalen Zellkerne oft nicht mehr in einer Reihe, sondern in zwei oder mehreren Reihen angeordnet (zwei- oder mehrreihiges Epithel). Als Oberflächendifferenzierung besitzen diese Zellen diese Villi oder Kinocilien, die den gewebetypischen Schleim oder diverse Partikel auf der Oberfläche bewegen können.

In mehrschichtigen Epithelien ist nur die unterste Zelllage mit der Basallamina verbunden. Darüber befinden sich mehrere Lagen von Zellen, die sich zur Oberfläche oft hin immer mehr abflachen. Als mehrschichtiges, unverhorntes Plattenepithel bildet es die Oberflächen der feuchten Schleimhäute von Mund, Anorektalkanal, Ösophagus, Vagina, Gingiva, Mundhöhlen-Mucosa, Zunge und Penis-Mucosa) Ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel bildet z.B. die Epidermis der Haut.

### 2.2 Pathogenesen von Epithelien

Die dauerhafte Einwirkung von hauptsächlich exogenen Noxen z.B. - von ätzenden Flüssigkeiten bis zum Zigarettenrauch - kann in gesunden epithelialen Zellverbänden zu reversiblen (Metaplasien) und irreversiblen (Anaplasien) Veränderungen führen. Die Metaplasie wird in den gängigen Lehrbüchern als die Transformation eines bestimmten differenzierten Gewebetyps in einen anders differenzierten, allerdings verwandten Gewebetyp definiert. Das daraus resultierende zeitliche und räumliche inadäquate Auftreten bestimmter Gewebeskomponenten kann als Folge tiefgreifender Veränderungen der Genregulation verstanden werden, wobei chronische Reize als induktive Modulatoren wirken (Askanazy 1919; Black und Ackerman 1952; Auerbach et al. 1957; Auerbach et al. 1961; Richter 1970; Gould et al. 1971; Bonikos et al. 1976; Mithal und Emery 1976; Trump et al. 1978; Mathe et al. 1986; Bejui-Thivolet et al. 1990; Leube und Rustad 1991; Coggins 1998; Serikov et al. 2006). Metaplasien können als adaptative Strukturen in einer Vielzahl von Geweben auftreten und werden in vielen Fällen als Vorläufer von bösartigen Tumoren angesehen (Beresford 1981; Lugo und Putong 1984; Slack 1986; Damjanov 1996). Die metaplastischen Vorgänge wie z.B. der lokal begrenzte Übergang eines im Prinzip einschichtigen (z.B. mehrreihiges Flimmerepithel der Atemwege) in ein mehrschichtiges, unverhorntes Plattenepithel können mit dem Wegfall der toxischen Einflüsse reversibel sein. Bei fortlaufenden Reizen kann es jedoch weiteren pathologischen Veränderungen (Karzinogenese) kommen. Die dabei zu entstehenden Tumoren der Epithelien werden als Karzinome oder Karzinoide bezeichnet.

#### 2.3 Funktionen epithelialer Zellverbände

Die Entwicklung der geordneten Struktur normaler Epithelgewebe mit der Ausbildung einer apikal-basolateralen Polaritätsachse in Epithelzellen, die auf komplexen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen sowie der mechanischen Kopplung epithelialer Zellen über das intrazelluläre Cytoskelett basiert (Gumbiner 1996), ist für die Funktion von Epithelien als selektive Permeabilitätsbarriere für verschiedene Moleküle zwischen innen und außen (z.B. Epidermis oder Mundhöhle) und zwischen physiologisch unterschiedlichen Kompartimenten (z.B. Schleimsekretion in den Atemwegen, Absorption von Nährstoffen im Darm, oder Filtration in der Niere) von besonderer Wichtigkeit. Durch die laterale Zelladhäsion kommt es in diesen Bereichen auch zu einer Restrukturierung des Cytoskeletts und oft auch zur Ausrichtung von Zellorganellen (z.B. Zellkern, Mitochondrien, Golgi-Apparat, Zell-Zell-Verbindungen), was u.a. auch Voraussetzung für gerichtete physiologische Transportvorgänge wie z.B. Transcytose, über epitheliale Zellschichten ist (Balcarova-Stander et al. 1984; Nelson und Veshnock 1986; Vega-Salas et al. 1987; Ojakian und Schwimmer 1988; Cereijido et al. 1998). Durch laterale Zell-Zell- und basolaterale Zell-Matrix-Kontakte

wird die apikal-basolaterale Polaritätsachse und die laterale Geschlossenheit epithelialer Zellen aufrechterhalten.

Komplexe von mehreren Transmembranproteinen, die über verschiedene Plaque-Proteine mit dem Cytoskelett verbunden sind, bilden derartige Zell-Zell-Verbindungen. Verschiedene andere cytoplasmatische Proteine sind mit diesen Plaques assoziiert und können z.T. auch an der Regulation unterschiedlicher Prozesse wie z.B. der Transkription oder der Proliferation beteiligt sein. Dabei liegen die verschiedenen Zellverbindungstypen meist nicht unabhängig voneinander vor, sondern treten oft zeitlich und räumlich gekoppelt auf. In den verschiedenen Geweben bzw. sogar in verschiedenen Zelltypen desselben Gewebes können Zell-Zell-Verbindungen unterschiedliche molekulare Zusammensetzung aufweisen.

#### 2.4 Gewebe-Aufbau und Zellarchitektur-Elemente

Cytoskelett-Filamente und interzelluläre Kontakte sind an der Formgebung der Zelle beteiligt und sind wesentlich verantwortlich für Aufbau und Aufrechterhaltung der Zell- und Gewebearchitektur. Zudem sind sie an Prozessen, bei denen die Zelle ihre Form oder Gestalt ändert, wie z.B. an Zellteilungen, Bewegungen, Formveränderungen, Endo- und Exocytose, beteiligt.

#### 2.4.1 Cytoskelett-Filamente

Cytoskelett-Filamente können nach ihrem Durchmesser in drei verschiedene Systeme eingeteilt werden: die Mikrotubuli, die Intermediärfilamente und die Mikrofilamente (Fuchs und Weber 1994; Herrmann 1998; Coulombe et al. 2001; Herrmann und Aebi 2004). Die zelltypischen Cytoskelett-Filamente der Epithelzellen sind die Intermediärfilamente (IF) von Cytokeratin-Typus, die an den Desmosomen sowohl an der Plasmamembran inserieren und somit an der Stabilisierung und Formgebung der einzelnen Zellen als auch Gesamtepithel-Zusammenhang beteiligt sind.

#### 2.4.1.1 Die Intermediärfilamente als molekulare Differenzierungscharakteristika

Als molekularen "Marker" werden Moleküle bezeichnet, die in einem typischen Muster in nur einem bestimmten Zelltyp – oder nur in bestimmten wenigen Zellen vorkommen und diesen Zelltyp oder diese Zellkategorie charakterisieren. Der Einsatz von Reagenzien, die spezifisch für bestimmte Marker sind, stellt somit eine Hauptmethode der Zelltyp-Ansprache in der Tumordiagnostik dar (Moll 1990).

Die typischen IF der Epithelien sind die Cytokeratin-Filamente (CK; Tab. 2.1), die als Fibrillen gebündelt an den Zellmembranen der Desmosomen verankert sind. Demzufolge gelten desmosomale Proteine, insbesondere die transmembranen, desmosomalen Cadherine (siehe 2.4.2.2), wenn sie zusammen mit Cytokeratinen (CK; äquivalent auch kurz als "Keratine" bezeichnet) nachgewiesen werden, als molekulare Marker für Epithelien bzw. die davon abgeleiteten malignen Tumore, die Karzinome.

Bei der Gruppierung der Epithelien in einschichtige, mehrschichtige und Übergangsformen sind gruppen-spezifische CK-Muster (Kartenbeck 2003) zu erkennen.

	Mehrschichtiges Epithel							Einschichtiges Epithel											
			Туј	рП			Тур І							Тур II Тур I				I	
Keratin (K) Nr.	1	2e	3	4	5	6	9	10	12	13	14	15	16	17	7	8	18	19	20
A. Einschichtiges Epithel																			
Leber (Hepatozyten)																			
Pankreas (duktal)				• •											48	•	•	-	
Niere (proximaler Tubulus)																•	•	85	
Magen															e.	•	•	۲	
Kolon																٠	۲	۲	•
Endometrium															۲	•	•	۲	
Alveolarepithel															¢¢.	٠	•	٠	
B. Epithel mit Übergangsformen																			
Mamma (luminal)										4	•		*		۲	٠	٠	-	
Bronchus				•	•						•			*	۰	٠	٠	۲	
Harnblase				•	٠									ŵ		٠	•	豢	
C. Mehrschichtiges Epithel																			
Ösophagus					•	微					٠		۲						
Exocervix					•	-					٠	4	8						
Epidermis	۲				۲						۲	*							
Epidermis der Fußsohle	-	*			۲	s		۲			۲		48	54					
Molekulargewicht (x10 <sup>-3</sup> )	68	65,5	63	59	58	56	64	56	55	54	50	50	48	46	54	52,5	45	40	46

**Tab. 2.1:** Beispiele für das Vorkommen von Cytokeratin-Polypeptiden in verschiedenenEpithelgeweben des Menschen, aus (Leube 1996).

Die Größe der Punkte entspricht der relativen Häufigkeit; große Punkte, starke Expression; kleine Punkte, schwache Expression. Sehr geringe, sporadische oder nur begrenzt fokale Expressionen sind nicht berücksichtigt worden (nach Moll et al. 1982, Quinlan et al. 1985, Moll und Franke 1986, Moll 1993). Blaue Punkte = "Grund-CKs"; rote Punkte = CKs, die in Kombination mit wenigen anderen CKPs spezifisch für einen Zelltyp oder ein Gewebe sind; graue Punkte = zusätzlich exprimierte CKs.

#### 2.4.2 Interzelluläre Verbindungen

An der Entstehung, Morphogenese und Aufrechterhaltung von Geweben und komplexen Organismen haben Zell-Zell-Verbindungsstrukturen entsprechenden Anteil. Schon während der frühen Embryogenese sind sie für den Aufbau des Organismus und der Gewebe verantwortlich (zu Mechanismen und Prinzipien vgl. u.a. (Holtfreter 1939; Steinberg 1962, 1962, 1963, 1970; Takeichi 1977; Steinberg und Takeichi 1994; Steinberg 1996, Trinkaus, 1955 #330; Duguay et al. 2003). Weiterhin sind einige der Zell-Zell-Verbindungsproteine auch an der Vermittlung von Signalen von der Plasmamembran ins Zellinnere beteiligt (Hasegawa et al. 1996; Behrens 1999; Hirase et al. 2001; Huelsken und Birchmeier 2001; Jamora und Fuchs 2002; Balda und Matter 2003; Getsios et al. 2004).

In der heutigen "Lehrbuch-Klassifikation" (Bloom 1975; Drenckhahn 1994; Kühnel 2002) interzellulärer Kontakte werden die folgenden Kategorien aufgeführt:

a. Kommunikationskontakte ("Gap Junctions", GJ; Nexus, Maculae communicantes), die in der interzellulären Kommunikation und dem direkten cytoplasmatischen Stoffaustausch kleiner bis mittelgroßer Moleküle eine Rolle spielen (Simon und Goodenough 1998; Goodenough und Paul 2003).

b. Adhärenz-Verbindung ("Adherens Junctions", AJ; Zonula, Fascia, Punctum adhaerens)
c. Fleckdesmosomen (Desmosomen, DES; Macula adhaerens).

"Adherens Junction" und Desmosomen werden auch unter dem Begriff Adhärenz-Verbindungen ("**Adherens Junctions**") zusammengefasst und sind für spezifische Filament-Verankerungen und die mechanische Stabilität von Geweben verantwortlich (Farquhar und Palade 1963; Staehelin 1974; Geiger et al. 1983; Edelman 1985; Franke et al. 1987; Franke et al. 1994; Godsel 2004; Perez 2004).

d. Schlussleisten ("Tight Junctions", TJ; z.B. Zonula occludens; zum ersten mal benannt durch Stöhr, P. (Stöhr 1906), die als Hauptbarriere die parazelluläre Ausbreitung von Zellen, Partikeln und vielen Molekülen bilden (Stevenson und Keon 1998; Tsukita et al. 2001; Langbein et al. 2002; Langbein et al. 2003; Matter und Balda 2003; Schneeberger und Lynch 2004; Van Itallie und Anderson 2005; Aijaz et al. 2006; Furuse und Tsukita 2006).

Im vergangenen Jahrzehnt wurden zusätzlich zu diesen "klassischen" Kategorien weitere Typen hinzugefügt. Hierzu zählen die Sonderformen der *Area composita* des Herzens (Borrmann et al. 2000; Grossmann et al. 2004; Borrmann et al. 2006), die gewissermaßen eine Mischform aus *Fascia adhaerens* und Desmosom darstellt und der *Complexus adhaerens* ein desmoplakin-haltiger, komplexer Verbindungs-Typ der Rethothelzellen der Lymphknotensinus (Schmelz und Franke 1993; Schmelz et al. 1994; Zhou et al. 2004; Hammerling et al. 2006) ferner der *Contactus adhaerens* in den Körnerzellen der Glomeruli des Cerebellums (Rose et al. 1995; Bahjaoui-Bouhaddi et al. 1997; Hollnagel et al. 2002), die heterotypischen Zell-Zell-Verbindungen in der *Zona limitans externa* der Retina (Paffenholz et al. 1999) und die *Cortex adhaerens* der Augenlinse (Straub et al. 2003).

Einleitung

Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren TJ-verwandte Strukturen, weitgehend molekularen unbekannte, doch Occludin-haltige Zell-Zell-Verbindungen in verschiedenen mehrschichtigen Epithelien, selbst in Gebilden ohne Lumen wie den Hassallschen Körperchen des Thymus und den "Hornperlen" verschiedener Plattenepithelkarzinome, beschrieben (Langbein et al. 2002; Langbein et al. 2003), so z.B., die "Lamellated Junctions" und die "Sandwich Junctions" in Plattenepithelien vom Mensch und vom Rind (Langbein et al. 2002).

Im Folgenden werden die molekularen Komponenten der Plaque-bildenden Zellverbindungstypen der "Adherens Junction", Desmosomen und "Tight Junction" deshalb kurz beschrieben. Eine Übersicht über die Anordnung dieser drei Verbindungen ist in der Abb. 2.1 am besonders übersichtlichen Fall des subapikalen Zell-Zell-Kontaktbereiches im Dünndarmepithel vorgestellt.



**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung (**A**) der klassischen Einteilung der subapikalen "Junctions" (Perez-Moreno et al. 2003) in polaren Epithelien und elektronenmikroskopische Aufnahme (**B**) dieser Region ("Absorptive Cells" des menschlichen Duodenums).

#### 2.4.2.1 Adhärenz-Verbindungen

Die Familie der Calcium (Ca<sup>2+</sup>)-abhängigen Zell-Adhäsions Transmembran-Glykoproteine ("Cadherine", Takeichi, 1977) bildet eine der größten, wichtigsten und nahezu ubiquitären Typen von Adhärenz-Verbindungen. Zu der Familie der Cadherine zählen neben den klassischen Cadherinen auch die desmosomalen Cadherine. Die Cadherin-Familie wird aufgrund der strukturellen und funktionellen Unterschiede ihrer Mitglieder in zwei Typen (Typ-I & II) unterteilt. Typ-I Cadherine wie z.B. das epitheliale E-Cadherin oder das neurale N-Cadherin können sowohl an homotypischen, als auch an heterotypischen Zell-Zell-Interaktionen beteiligt sein. Zu den nahe verwandten atypischen oder Typ-II Cadherinen zählen z.B. VE-Cadherin und Cadherin-11 (Angst et al. 2001). Die vereinfachte Darstellung des molekularen Aufbaus von Adhärenz-Verbindungen ist in Abb. 2.2 abgebildet.



**Abb. 2.2:** Schematischer Aufbau von Adhärenz-Verbindungen (nur eine Hälfte der symmetrischen Struktur ist gezeigt). Dargestellt sind das Cadherin-, Catenin- und das NAP (Nectin-Afadin-Ponsin)-System, die alle mit dem Aktin-Cytoskelett in Verbindung stehen (modifiziert nach Perez-Moreno et al., 2003). Abkürzungen: pg, Plakoglobin; p120, Protein p120<sup>ctn</sup>;  $\alpha$ -cat,  $\alpha$ -Catenin;  $\beta$ -cat,  $\beta$ -Catenin.

Über eine stark konservierte Sequenz in der cytoplasmatischen Domäne können Cadherine an bestimmte Proteine im cytoplasmatischen Plaque der AJ (Cowin et al. 1986; Nagafuchi und Takeichi 1989) und über diesen an das Aktin-Cytoskelett binden. Das gemeinsame Strukturmerkmal der Multigen-Familie der *Arm*-repeat Proteine bildet ein nach dem Segment-Polaritätsgen *Armadillo* aus *Drosophila melanogaster* (Franke et al. 1989; Peifer und Wieschaus 1990) benanntes Motiv mit einer Bindungsstelle für Cadherine. (Troyanovsky et al. 1989; Behrens et al. 1996; Pai et al. 1996; Paffenholz und Franke 1997). Zu dieser Proteinfamilie gehören u.a. β-Catenin, Plakoglobin, die Proteine p120<sup>ctn</sup>, ARVCF und p0071 sowie Neurojungin und die Plakophiline 1-3.

Zusätzlich zum Cadherin-Catenin-System wird auch der Nectin-Afadin-Ponsin-(NAP)-Komplex zu den konstitutiven Komponenten von "Adherens Junctions" gezählt. Dieser Komplex kann sowohl in polaren als auch in nicht-epithelialen Zellen nachgewiesen werden. Die Proteine dieses Komplexes interagieren in mehrfacher Weise mit den Cadherin-Catenin-Molekülen (Mandai et al. 1997). Nectin ist ein Ca<sup>2+</sup>-unabhängiges Protein und kann in unterschiedlichen Isoformen vorkommen (Takahashi et al. 1999; Kikyo et al. 2000; Hoshino et al. 2004). Afadin hat offenbar eine wichtige Funktion als Verbindungselement zwischen den NAP- und den Cadherin-Catenin-Komplexen (Mandai et al. 1997; Ikeda et al. 1999; Takahashi et al. 1999; Miyahara et al. 2000). Neben ihrer Funktion in Adhärenz-Verbindungen sind Nectin und Afadin am Aufbau von Tight Junctions beteiligt (Yamamoto et al. 1997; Fukuhara et al. 2002; Fukuhara et al. 2002; Takai und Nakanishi 2003). Darüber hinaus kann die Bindung von Afadin an das Protein ZO-1 offenbar Moleküle des NAP-Komplexes sowohl an AJ als auch an TJ binden (Yokoyama et al. 2001).

#### 2.4.2.2 Desmosomen

Desmosomen (Maculae adhaerentes) sind wesentliche Elemente der Gewebestabilität bei mechanischer Belastung (Bierkamp et al. 1996; Ruiz et al. 1996; Gallicano et al. 2001; Protonotarios et al. 2001; Eshkind et al. 2002; Grossmann et al. 2004). Sie bilden "semistabile" Strukturen, die einem dynamisch reguliertem Auf- und Abbau unterliegen und dadurch den Aufbau und die Bewahrung der Gewebeorganisation sichern (Staehelin 1974; Franke et al. 1981; Franke et al. 1982; Schwarz et al. 1990; Schmidt et al. 1994; Green und Gaudry 2000; Getsios et al. 2004). Desmosomen kommen in allen Epithelien und in einigen nicht - epithelialen Geweben wie z.B. dem Myokard, den dendritischen Retikulum-Zellen von Lymphknoten-Follikeln und Meningen vor (Franke et al. 1982; Kartenbeck et al. 1984; Schwarz et al. 1990; Schmidt et al. 1994; Schmidt et al. 1999; Akat et al. 2003). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigt sich typischerweise ihr elektronendichter, cytoplasmatischer Plaque mit den Intermediärfilamenten (IF, Abb. 2.3, a) unterhalb der Plasmamembran und im Interzellularspalt eine von Cadherinen (siehe nachstehend) gebildete, elektronendichte "Mittellinie" (Abb. 2.3, MI), die sog. Desmoglea (Mueller und Franke 1983; Cowin et al. 1984; Cowin 1985; Buxton et al. 1993; Garrod 1993; Koch und Franke 1994; Schafer et al. 1994; North et al. 1999). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Gefrierbrüchen erscheinen Desmosomen als rundliche, dicht mit desmosomalen Transmembranproteinen (Abb. 2.3; TP) gepackte Plaques (Breathnach 1971; Elias und Friend 1976; Kelly und Shienvold 1976; Shimono und Clementi 1976; Leloup 1979).



Abb. 2.3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Desmosomen. a Ultradünnschnitt; b Gefrierbruch-Präparat

Wie bereits für den Plaque der AJ beschrieben, besteht auch dieser Plaque-tragende Zellverbindungstyp aus verschiedenen Transmembranproteinen, zu denen die desmosomalen Cadherine und einige andere Plaque-Proteine gehören. Zu den desmosomalen Cadherinen beim Menschen zählen die Desmogleine (Dsg) 1-4 und die Desmocolline (Dsc) 1-3 (Koch et al. 1990; Collins et al. 1991; Mechanic et al. 1991; Nilles et al. 1991; Parker et al. 1991; Koch et al. 1992; Buxton et al. 1993; Koch und Franke 1994; Angst et al. 2001; Whittock und Bower 2003). In ihrer molekularen Struktur ähneln die desmosomalen Cadherine den klassischen Cadherinen, haben jedoch eine deutlich größere und komplexere cytoplasmatische Domäne (Schwarz et al. 1990; Koch und Franke 1994; Serikov et al. 2006). Bestimmte Isoformen der

Desmocolline (Dsc 1-3) und der Desmogleine (Dsg 1-4) sind einzeln oder in Kombinationen für bestimmte Epitheltypen bzw. für bestimmte Differenzierungszustände charakteristisch (Koch et al. 1992; Buxton et al. 1993; Schafer et al. 1994; Nuber et al. 1995; Nuber et al. 1996; Hanakawa et al. 2004).

Desmoplakine (DP I und II), Plakophiline (PKP 1-3) und Plakoglobin stellen die Plaque-Proteine der Desmosomen dar (Franke et al. 1981; Franke et al. 1982; Cowin 1985; Cowin et al. 1986; Kapprell et al. 1988; Franke et al. 1989; Garrod 1993; Heid et al. 1994; Schmidt et al. 1994; Green und Jones 1996; Mertens et al. 1996; Ruiz et al. 1996; North et al. 1999). Desmoplakin gehört zur Plakin-Familie und kommt in zwei Spleißvarianten vor (Mueller und Franke 1983; Cowin et al. 1985; Kapprell 1990; Green und Gaudry 2000; Ebata et al. 2001; Godsel 2004). Die Plakophiline PKP 1-3 bilden eine Unterfamilie der "arm-repeat"-Proteine. PKP 1 kommt in den suprabasalen Zellschichten mehrschichtiger Epithelien vor (Franke et al. 1983; Kapprell et al. 1988; Schafer et al. 1993; Hatzfeld et al. 1994; Heid et al. 1994; Schmidt et al. 1994). PKP 2 hingegen ist nahezu ubiguitär und generell in Proliferationsfähigen Zellen verbreitet und kommt so u.a. im desmosomalen Plaque einschichtiger Epithelien bzw. in den Basalzellen mehrschichtiger Epithelien vor, aber auch im Myokard vor (Mertens et al. 1996; Grossmann et al. 2004, Mertens, 1999 #522). In den suprabasalen Zellschichten der mehrschichtigen Epithelien wird PKP 3 exprimiert. In Kardiomyocyten und Hepatocyten konnte dieses Plakophilin bislang allerdings nicht nachgewiesen werden (Bonne et al. 1999; Schmidt et al. 1999). Tab. 2.2 zeigt eine Übersicht der molekularen Komponenten der desmosomalen Strukturen.

Transmembranproteine	Plaque-Proteine	assoziierte Filamente	Zelltyp und Gewebe
Desmosomale Cadherine:	Plakoglobin	Mikrofilamente	Epithelien
Desmogleine (Dsg 1-4)	Desmoplakin I und II		Myocardium
Desmocolline (Dsc 1-3)	Plakophiline (PKP 1-3)		

Tab. 2.2: Molekulare	Bestandteile	der Desmosomen
----------------------	--------------	----------------

#### 2.4.2.3 "Tight Junctions"

Tight Junctions (TJ) sind seit ihrer ausführlichen Beschreibung durch Farquhar und Palade (Farquhar und Palade, 1963) als charakteristische Strukturen der einschichtigen Epithelien und der Endothelien bekannt. Ihre biologischen Funktionen bestehen zum einen in der Bildung von Barrieren für parazelluläre Translokationen zwischen Lumina (z.B. Lunge, Darm, Blutgefäße) und dem mesenchymalen Raum ("Barrier Function") und zum anderen in der Bildung einer intramembranösen Sperre zwischen apikaler und basolateraler Membranregion ("Fence Function") (siehe Abb. 2.4).



**Abb. 2.4:** Schematische Darstellung der unterschiedlichen Transportvorgänge an epithelialen Zellen. Nach Tsukita et al., 2001.

Ursprünglich wurden TJ über ihre morphologischen Eigenschaften definiert. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Ultradünnschnitt-Präparaten erscheinen sie typischerweise als maximal enge Membran-Membran-Kontakt-Regionen ("Kissing Points"), in denen die äußeren Membranteile der beiden gegenüberliegenden Zellen zu einer Membrankontaktstelle zu verschmelzen scheinen (Abb: 2.5a, Pfeilspitzen). Auch die TJ weisen meist einen schmalen elektronendichten Plaque im Cytoplasma auf. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Gefrierbruchpräparaten erscheinen die Membran-Membran-Kontakt-Regionen als ein komplexes, membran-assoziiertes Netzwerk von untereinander verbundenen strangartigen Strukturen (Abb. 2.5b), das auf der apikolateralen Membran um die Zellen herum läuft und die *Zonula occludens* bildet (Farquhar und Palade 1963; Friend und Gilula 1972; Claude und Goodenough 1973; Staehelin 1974; Montesano et al. 1975).



**Abb. 2.5:** Klassische Strukturen der TJ in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Ultradünnschnitten (a; Pfeilspitzen markieren die "Kissing Points") und Gefrierbrüchen (b); man erkennt die Relief-artigen Stränge, "ridges" in einem einschichtigen Epithel; aus Tsukita und Furuse (2000)

Untersuchungen haben gezeigt, dass die Anzahl der z.T. parallel verlaufenden strangartigen TJ-Strukturen und ihre Komplexität, insbesondere die Anzahl der Querverbindungen, in einem Zusammenhang mit dem messbaren transepithelialen Widerstand (TEER) und damit auch mit ihrer Barriere-Wirkung steht (Claude und Goodenough 1973; Claude 1978; Noske et al. 1994). Die strangartigen Strukturen bzw. die engen Membran-Membran-Kontakte in der *Zonula occludens* und damit der weitestgehend undurchlässige Verschluss, der den parazellulären Transport verhindert bzw. begrenzt, entsteht durch TJ-Membran-Protein-Komplexe.

Als Transmembranproteine wurden bisher Occludin, Mitglieder der Claudin-Familie (Tsukita et al. 2001; Furuse und Tsukita 2006) und die Proteine JAM 1-4 (Aurrand-Lions et al. 2001) identifiziert.

Weitere TJ-Proteine sind die cytoplasmatischen Plaque-Proteine Protein ZO-1 (Stevenson et al. 1986; Anderson et al. 1988), ZO-2 (Jesaitis und Goodenough 1994) und ZO-3 (Haskins et al. 1998). Diese gehören zu den PDZ-Proteinen, die mit der PDZ-Domäne ein aus 80-90 Aminosäuren bestehendes Protein-bindendes Motiv besitzen. Weitere PDZ-Proteine sind Par 3 (Itoh et al. 2001), Par 6 (Johansson et al. 2000) sowie Plas 1 (Kamberov et al. 2000; Roh et al. 2002). Die Proteine ZO-1, -2 und -3 gehören ebenso wie die Proteine MAGI 1-3 (Ide et al. 1999; Wu et al. 2000; Wu et al. 2000) genannten Proteine zur MAGUK (Membran-assoziierte Guanylatkinasen)-Familie.
Protein ZO-1 wurde aber nicht nur in TJ sondern auch in GJ (Giepmans und Moolenaar 1998; Toyofuku et al. 1998; Nielsen et al. 2001) und AJ (Balda und Matter 2003) wie auch in den *Complexus adhaerentes* des Lymph-Endothels sowie der *Area composita*, der Glanzstreifen ("Intercalated Disks") des Herzmuskels (Borrmann et al. 2006; Hammerling et al. 2006) nachgewiesen. Als weitere TJ-Plaque-Proteine sind das Cingulin und das Symplekin beschrieben worden, wovon das letztgenannte auch im Zellkern nachgewiesen werden kann (Citi et al. 1988; Gumbiner et al. 1991; Keon et al. 1996; Stevenson und Keon 1998; D'Atri und Citi 2002; Hofmann et al. 2002). Abb. 2.6 zeigt ein schematisches Modell der derzeitigen Vorstellung zu Interaktionen der an TJ beteiligten Proteine.



Abb. 2.6: Schematisches Modell der Interaktionen der TJ-Proteine (Mitic et al. 2000)

Occludin, das als erstes entdeckte Transmembranprotein der TJ (Furuse et al. 1993), ist ein etwa 60 kDa großes Transmembranprotein ("Tetra Spanin"), wobei das carboxyterminale (C-Terminus) und das aminoterminale (N-Terminus) Ende auf der cytoplasmatischen Seite lokalisiert sind.

Der Claudin-Genfamilie gehören beim Menschen 24-Mitglieder an, die ein unterschiedliches, gewebe-abhängiges Genexpressionsmuster aufweisen können (Furuse et al. 1998; Morita et al. 1999; Mitic et al. 2000; Rahner et al. 2001; Tsukita et al. 2001; Wilcox et al. 2001) und Größen von etwa 20-27 kDa haben.

JAM-Proteine ("Junctional Adhesion Molecule") sind glykosylierte, ca. 43 kDa große TJ-Transmembranproteine mit nur einer Transmembran-Region, die einen kurzen cytoplasmatischen C-Terminus und einen längeren extrazellulären N-Terminus besitzen. Über ein klassisches PDZ-Bindemotiv im C-Terminus interagieren die JAM-Proteine mit diversen cytoplasmatischen Proteinen wie z.B. Protein ZO-1, Cingulin, AF6 oder Par-3/ASIP (Bazzoni et al. 2000; Ebnet et al. 2000; Ebnet et al. 2001; Itoh et al. 2001). In Gefrierbruchanalysen zeigte sich, dass JAM-Proteine allein jedoch im Gegensatz zu den Occludinen und Claudinen nicht in der Lage sind, TJ-Strukturen zu bilden. Dennoch sind sie in enger räumlicher Nähe zu solchen Strukturen zu finden (Itoh et al. 2001). JAM-1 wird sowohl in epithelialen, als auch in endothelialen Zellen, JAM-2 hingegen anscheinend nur in endothelialen Zellen exprimiert. JAM-3 ist ausschließlich in der Plasmamembran von T-Zellen zu finden sind. JAM-4 wurde in Nierenglomeruli und in Epithelzellen des Darms nachgewiesen (Aurrand-Lions et al. 2000; Palmeri et al. 2000; Arrate et al. 2001; Hirabayashi et al. 2003). Tab. 2.3 zeigt eine Übersicht über die molekularen Bestandteile der Tight Junctions.

Transmembranproteine	Plaque-Proteine	assoziierte Filamente	Zelltyp und Gewebe
Occludin	ZO-1-3	Mikrofilamente	Epithelien
Claudine	Cingulin		Endothelien
JAM 1-4	Symplekin		
	PAR3-6		
	PALS1		
	MAGI1-3		

Tab. 2.3: Molekulare Bestandteile der Tight Junctions

Die Funktionen der verschiedenen TJ-Transmembranproteine sind anschienend sehr unterschiedlich. Während die JAM-Moleküle den Monocyten und Lymphocyten das Durchdringen der epithelialen bzw. endothelialen Barrieren ermöglichen (Cunningham et al. 2000; Arrate et al. 2001; Kostrewa et al. 2001), ist Occludin wahrscheinlich an der Übertragung von Signalen von der Plasmamembran in das Zellinnere beteiligt (Tsukita et al. 1999; Barrios-Rodiles et al. 2005). Dagegen scheinen die Claudine vorrangig für gewebeabhängige Unterschiede der epithelialen bzw. endothelialen Barriereeigenschaften verantwortlich zu sein (Kiuchi-Saishin et al. 2002; Gonzalez-Mariscal et al. 2003; Schneeberger und Lynch 2004; Van Itallie und Anderson 2005; Furuse und Tsukita 2006).

Unterschiedliche Barriere-Eigenschaften der TJ verschiedener Gewebe bzw. Gewebe-Abschnitte scheinen oft mit einem bestimmten Muster der Claudine zu korrelieren (Stevenson et al. 1988; Goodenough 1999; Morita et al. 1999; Furuse et al. 2001; Van Itallie et al. 2001; Amasheh et al. 2002; Colegio et al. 2002; Yu et al. 2003; Alexandre et al. 2005).

Verschiedene Mutationen in Claudin-Genen bei menschlichen Krankheiten und die Ergebnisse von Gen-Ausschaltungs-Experimenten ("gene knock-out") an Mäusen zeigen die Funktionen der Claudine in situ auf. Beispielsweise führt eine Mutation im Claudin-16-Gen (Synonym: Paracellulin-1) dazu, dass zu wenig Mg<sup>2+</sup>-Ionen reabsorbiert werden (Hypomagnesämie), was letztlich zu einer renalen Dysplasie führt (Simon et al. 1999; Hirano et al. 2000; Ohba et al. 2000; Weber et al. 2001). Claudin-16 wird normalerweise im aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife in der Niere exprimiert, wo hohe Konzentrationen von Mg<sup>2+</sup>-Ionen parazellulär reabsorbiert werden (Simon et al. 1999). Verschiedene Mutationen des Claudin-16 Gens führen nun zu Defekten in der Mg<sup>2+</sup>-Ionen Reabsorption und damit zum Ausscheiden der Mg<sup>2+</sup>-Ionen über den Harn (Simon et al. 1999; Weber et al. 2001). Somit sind bei diesen Mutationen primär im Harntrakt Veränderungen im Elektrolythaushalt der Niere und sekundär Gewebeveränderungen zu beobachten. Mutationen in den Genen von Claudin-11 und Claudin-14 führen zu Taubheit, da aufgrund dieser Mutationen die empfindliche Ionen-Konzentrationen im Innenohr gestört wird (Konishi et al. 1978; Ferrary und Sterkers 1998; Wilcox et al. 2001; Ben-Yosef et al. 2003; Gow et al. 2004; Kitajiri et al. 2004). Mäuse, bei denen das Claudin-5-Gen ausgeschaltet wurde, sterben kurz nach der Geburt, da Claudin-5 in der Blut-Hirn-Schranke wichtige Funktionen übernimmt (Pardridge 1998; Morita et al. 1999; Nitta et al. 2003). Das Ausschalten des Claudin-11-Gens führt bei männlichen Mäusen zu Sterilität, da Claudin-11 an der parazellulären Barriere zwischen Blut und Hoden beteiligt ist (Griswold 1995; Gow et al. 1999; Morita et al. 1999). Es beeinflusst aber auch den Ionen-Haushalt der lokalen Kompartimente, die für die Reifung der Spermatocyten entscheidend sind. Auch in Zellen der Myelinscheiden von Oligodendrocyten im zentralen peripheren Nervensystem und in Schwannschen Zellen wurden Strukturen beschrieben, die TJ-artig erscheinen. Claudin-11 und Claudin-19 gehören zu den Hauptbestandteilen der TJartigen Strukturen dieser Zellen. Bei Mäusen, in denen diese Gene ausgeschaltet wurden, verschwanden diese TJ-artigen Strukturen von den Myelinscheiden, und die Reizweiterleitung war beeinträchtigt (Gow et al. 1999; Morita et al. 1999; Miyamoto et al. 2005).

Die Frage, ob TJ-Proteine oder TJ-artige Strukturen nicht nur in einschichtigen Epithelien, sondern auch in mehrschichtigen Plattenepithelien wie z.B. der Epidermis, vorkommen und ob diese auch dort an einer funktionelle Barriere-Funktion beteiligt sind, wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Es ist weitestgehend akzeptiert, dass in den letzten (d.h. obersten, lebenden Zellschichten – etwa des *Stratum granulosum* der Epidermis Strukturen existieren, die eine Barriere für den parazellulären Transport von Wasser und anderen Molekülen sowohl von innen nach außen als auch in umgekehrter Richtung bilden können. Die molekulare Zusammensetzung sowie der spezifische Aufbau dieser Barriere-bildenden Strukturen sind jedoch umstritten.

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Ultradünnschnitten und Gefrierbruch-Präparaten der Epidermis wurde in den letzten Jahren bereits typische TJ- "Kissing Points" und kurze strangartige Strukturen beschrieben. Dennoch hält sich weiter die übernommene Lehrbuch-Ansicht, dass großflächige und damit funktionelle TJ-Barriere-Strukturen weder in der menschlichen Epidermis noch in anderen Plattenepithelien existieren (Schroeder und Theilade 1966; Thilander und Bloom 1968; Breathnach 1971; Fejerskov 1973; Squier 1973; Elias und Friend 1975; Palekar und Sirsat 1975; Shimono und Clementi 1976; Caputo und Peluchetti 1977; Elias et al. 1977; Andersen 1980; Kitajima und Mori 1980; Caputo 1981; Holland et al. 1989; Simon et al. 1993; Fawcett 1994; Elias 1996; Morita et al. 1998; Madison 2003; Segre 2003; Fluhr et al. 2006; Segre 2006).

In jüngster Zeit wurden jedoch TJ-Proteine und TJ-artige Strukturen nicht nur in der obersten lebenden Schicht mehrschichtiger Epithelien nachgewiesen (Brandner et al. 2002; Furuse et al. 2002; Langbein et al. 2002), sondern es wurden auch weitgehend unbekannte, teilweise Occludin-haltige, molekular verwandte Zell-Zell-Verbindungen (z.B. *Coniunctio laminosa, Lunctura structa*) in verschiedenen mehrschichtigen Epithelien beschrieben. Sogar um Gebilde ohne Lumen, wie den Hassallschen Körperchen des Thymus und den "Hornperlen" verschiedener Plattenepithelkarzinome wurden derartige Zell-Zell-Verbindungen nachgewiesen (Langbein et al. 2002; Langbein et al. 2003; Morita et al. 2004). Die lebenswichtige Bedeutung der TJ-Strukturen in mehrschichtigen Epithelien wurde mit Hilfe von Claudin-1 Knock-out-Mäusen nachgewiesen. Diese Mäuse starben wenige Tage nach ihrer Geburt mit runzeliger Haut, aufgrund von starkem Wasserverlust über die Haut (Furuse et al. 2002). Ergänzend wurde bei Patienten, die an Ichthyosis (einer Hautkrankheit mit gestörter Barrierefunktion der Haut und dadurch erhöhtem Wasserverlust) leiden, Mutationen im Claudin-1-Gen nachgewiesen (Hadj-Rabia et al. 2004).

# 2.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Zell-Zell-Verbindungen der Tight Junctions (TJ)-Kategorie einschichtiger, vor allem polarer Epithelien sind lange Zeit nach ihrer Definition (Farguhar und Palade 1963; Friend und Gilula 1972; Staehelin 1974) vorwiegend nur morphologisch und z.T. auch physiologisch behandelt worden und es hat erstaunlich lange gedauert, bis mit den ersten Identifizierungen von TJ-Transmembranproteinen - und Antikörper gegen diese - eine Basis für gezielte biochemische und genetische Untersuchungen gegeben war (Furuse et al. 1993; Furuse et al. 1998; Fanning et al. 1999; Tsukita et al. 2001; Turksen und Troy 2004). Dagegen wurde die Frage, ob TJ-Strukturen oder TJ-Moleküle auch in mehrschichtigen Epithelien wie z.B. der Epidermis existieren und ob dort auch eine Barriere-Funktion ausüben, lange Zeit kontrovers und überwiegend eigentlich ablehnend diskutiert (Squier 1973; Elias und Friend 1975; Elias et al. 1977; Andersen 1980; Fawcett 1994; Matter und Balda 1999; Madison 2003; Norlen 2003; Segre 2003; Schluter et al. 2004; Fluhr et al. 2006; Segre 2006). So galt etwa bis zur Jahrtausendgrenze die Lehrbuchmeinung, dass TJ-Strukturen oder äquivalente Strukturen in mehrschichtigen Epithelien nicht existieren und die Barrierefunktion in diesen Epithelien von lipidösem Material übernommen wird, das über die "Lamellar Bodies" von Zellen des Stratum granulosum in den Interzellularraum abgegeben wird. In jüngster Zeit wurden jedoch TJ-Proteine und TJ-artige Strukturen in den letzten lebenden apikalen Zellschichten mehrschichtiger Epithelien wie z.B. der Epidermis (Morita et al. 1998; Brandner et al. 2001; Pummi et al. 2001; Brandner et al. 2002; Furuse et al. 2002; Tebbe et al. 2002; Morita et al. 2004) und in entsprechenden subapikalen Zellschichten aller bisher untersuchten Plattenepithelien, von der Gingiva und der Zungen-Mucosa bis zur Vagina (Langbein et al. 2002), aber auch in bestimmten mehrschichtigen Zellverbänden ohne Lumen wie z.B. den Hassallschen-Körperchen im Thymus und den "Hornperlen" von Plattenepithelkarzinomen (Langbein et al. 2003; Morita et al. 2004; Tobioka et al. 2004) nachgewiesen. Die Frage nach dem molekularen Aufbau und der Kontinuität der TJ in mehrschichtigen Epithelien blieb dabei aber ungeklärt. Ebenso unklar ist bis heute die Frage geblieben, in wieweit die beschriebenen TJ auch in Plattenepithelien eine Barrierefunktion haben.

Durch die dauerhafte Einwirkung von hauptsächlich exogenen Noxen kann es auch in einschichtigen Epithelien zu krankhaften Veränderungen im Sinne einer pathologischen Plattenepithel-Bildung wie vor allem der Metaplasie oder sogar zu Plattenepithelkarzinomen kommen. Dabei ist vor allem die Frage ungeklärt, wie diese pathogenen Strukturen aufgebaut sind und wie sich z.B. aus einem einschichtigen Epithel wie dem Bronchus ein metaplastisches Epithel entwickelt (Beresford 1981; Lugo und Putong 1984; Slack 1986; Leube und Rustad 1991) und sich daraus ein Plattenepithelkarzinomen entwickelt. Die Untersuchung möglicher Barrieren in Plattenepithelmetaplasien bzw. in bestimmten Tumor-Regionen durch TJ-artige Strukturen wäre natürlich auch für die Diagnose und Therapie der entsprechenden Tumore bzw. ihrer Vorläuferläsionen wie z.B. der Plattenepithelmetaplasien von Bedeutung.

Das besondere Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, aus einschichtigen, polaren Epithelien, vor allem der Lunge, entstandene mehrschichtige Vorläuferläsionen (Plattenepithelmetaplasien) *in situ* und in äquivalenten Zellkulturmodellen (Elias und Friend 1976; Ehrhardt et al. 2002) in ihrem molekularen Aufbau, ihrer Ultrastruktur und ihrer physiologischen Leistung aufzuklären. Dazu war es natürlich zunächst erforderlich, bestimmte Methoden und Grundbefunde in bekannten Plattenepithelien zu entwickeln bzw. zu prüfen.

# 3. Material

# 3.1 Geräte

Tab. 3.3: In dieser Arbeit verwendet	e Geräte
--------------------------------------	----------

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Brutschränke	Nabco	Labotect, Göttingen
	Forma Scientific	Labotect
Elektronenmikroskope	EM 910	Zeiss, Oberkochen
	Gemini 1530	Zeiss
Fluoreszenzmikroskope	Axiola	Zeiss
	Axiophot	Zeiss
	Konfokales Laserscanning	
	Mikroskop (LSM510)	Zeiss
Fotografie	Digitalkamera Axio Cam HRc	Zeiss
	Digitalkamera Axio Cam MRc	Zeiss
	Fotopapier: Brovira-Speed	
	BH310 RC Körnung 4	Agfa, Köln
	Kamera	Zeiss
	Schwarzweißfilm: T-Max 400	Kodak, Wangen
	Software Axio Vision Version 4.3	Zeiss
Gefrierätzanlage	BAF 060	Bal-Tec, Balzers,
		Liechtenstein
Gelektrophorese Apparatur		cti, Idstein/Taunus
Heizblock	Тур 5302	Eppendorf, Hamburg
Hochdruckgefrierer	HPM 010	Bal-Tec
Kryotom	Jung CM 3000	Leica, Bensheim
Kryotransfer System	VCT 010	Bal-Tec
Leuchtplatte	Rex	Herolab, Wiesloch
Magnetrührer	Ika Combimag	Ika Labortechnik, Staufen
Mikrotom		Microm, Walldorf
Mikrowelle	RHS "Rapid Microwave Histoprocessor"	Milestone; Sorisole, Italien
Netzgeräte	Consort E865	Pharmacia, Freiburg i. Br.
	Phero-stab 500	Biotec Fischer, Reiskirchen
PCR Maschine	MJR Research	Biozyme, Oldendorf
pH-Meter	Calimatic 765	Knick
Plunge-Freezer		Bal-Tec, Liechtenstein

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Propan-Jet-Freezer	JFD 030	Bal-Tec
Röntgenbedarf	Entwickler für Röntgenfilme: Classic E.O.S.	Agfa
	Röntgenfilm: Medical Film	Konica Minolta, Tokio, Japan
	Röntgenkassetten	Goos, Heidelberg
Rotationsmikrotom	HM 3555	Microm
Scanner	4870 Photo	Epson, Düsseldorf
	Dimage Scan Elite 5400	Minolta, München
Schüttler	"Silent Rocker"	Cti
		Sartorius, Göttingen
Spectralphotometer	Ultrosec Plus	Pharmacia
Sterile Werkbank	SterilGard Hood Class II Type A/B3	The Baker Company Inc., Stanford, CA, USA
Waagen		Sartorius, Göttingen
Wärmeschrank		Memmert, Schwabach
Wasserbad		Braun, Melsungen
Zählkammer	Neubauer Zählkammer	Hecht Assistent, Sondheim
Zentrifugen	Biofuge AC	Heraeus-Christ, Hanau
	Tischzentrifuge "Centrifuge 5415"	Eppendorf

# 3.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 3.4: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichung		Hersteller	
Deckgläschen		R. Langenbrinck, Emmendingen	
Eppendorf Reaktions	gefäße	Eppendorf, Hamburg	
Filter Pipettenspitzen		TipOne Starlab, Ahrensburg	
Kryo-Röhrchen		Nalgene, Rochester, NY, USA	
Objektträger		Superfrost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig	
Petrischalen	10 cm 6 cm 12 Well	Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA	
Zellkulturplatten	Transwell 6 Well Transwell 12 Well	Corning/Costar, Bodenheim	
Pipettenspitzen		Diamond Gilson, Fa. Omnilab, Mettmenstetten, Schweiz	
Plastikküvetten		Greiner, Frickenhausen	

Bezeichung		Hersteller
Plastikröhrchen	15 mL	
	50 mL	Greiner
Skalpelle		Bayha, Tuttlingen
Sterilfilter (0,2 µm Porengröße)		Millipore, Eschborn
Whatman Filterpapier		Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturschaber		Corning/Costar, Bodenheim

# 3.3 Kits

Tab. 3.5: In dieser Arbeit verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
Western Lightning™ chemiluminescence Reagent (ECL)	NEN, Dreieich
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
D <sub>C</sub> Protein Assay	Bio-Rad, München

# 3.4 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien in den Qualitätsstufen "*p.a.*" oder "Molecular Biology Grade" von den Firmen Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma–Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

# 3.5 Synthetische Oligodesoxyribonukleotide

Oligodesoxyribonukleotide als "Primer" für verschiedene auf der PCR-Methode basierende Experimente wurden von Wolfgang Weinig (Service-Gruppe DNA-Sequenzierungen / Oligodesoxyribonukleotidsynthesen, DKFZ) hergestellt.

Gen		Primer-Sequenz	Produktgröße
Claudin-1	vorwärts	5'-CGAGCGAGTCATGGCCAACGC-3'	647 bp
	rückwärts	5'-TCACACGTAGTCTTTCCCGCT-3'	
Claudin-2	vorwärts	5'-AGTGCAATCTCCTCCCTGG-3'	184 bp
	rückwärts	5'-AGTAGAAGTCCCGTAGGATCCC-3'	

Tab.	3.6:	In	dieser	Arbeit	verwer	ndete	primer
Tub.	0.0.		alcoci	7 10011	101110	lacic	princi

Gen		Primer-Sequenz	Produktgröße
Claudin-3	vorwärts	5'-ATCACGTCGCAGAACATCTG-3'	326 bp
	rückwärts	5'-TTGTAGAAGTCCCGGATAATGG-3'	
Claudin-4	vorwärts	5'-GTTCTGCTCACACTTGCTGG-3'	250 bp
	rückwärts	5'-CGCGCAGCACAGCATGACGG-3'	
Claudin-5	vorwärts	5'-TGCTCTCACCTGTTTTGCGG-3'	282 bp
	rückwärts	5'-AGTTCTTCTTGTCGTAGTCGCC-3'	
Claudin-6	vorwärts	5'-CCTTTTGTTGCTGGGTGG-3'	192 bp
	rückwärts	5'-TCTGGATGGCTCTAGCGC-3'	
Claudin-7	vorwärts	5'-GTATCCTCACTCCCTGTGCCG-3'	241 bp
	rückwärts	5'-GGCCCGAATTGGCCATTTCC-3'	
Claudin-8	vorwärts	5'-ATGGCAACCCATGCCTTAGAA-3'	687 bp
	rückwärts	5'-CTACACATAATGACTTCTGG-3'	
Claudin-9	vorwärts	5'-GACTCACTGCTGGCTCTGC-3'	452 bp
	rückwärts	5'-CACACGTAGTCCCTCTTGTCC-3'	
Claudin-10	vorwärts	5'-CGGAGATCATCGCCTTCATG-3'	220 bp
	rückwärts	5'-CATGCCTGTATATAACCGTC-3'	
Claudin-11	vorwärts	5'-GGTGGTGGGCTTCGTCACGA-3'	340 bp
	rückwärts	5'-GGCCCGCCTGTACTTAGCCA-3'	
Claudin-12	vorwärts	5'-ATGGGCTGTCGGGATGTCCAC-3'	460 bp
	rückwärts	5'-CCCAGATAGATGGGGAGAGGC-3'	
Claudin-15	vorwärts	5'-ATCCCACCATGTCGATGG-3'	199 bp
	rückwärts	5'-TCCCAGCAGTTGTAGACGC-3'	
Claudin-16	vorwärts	5'-GGGATCTTCTTCAATACATCGC-3'	344 bp
	rückwärts	5'-TTAATGTACGGCTCATCAGGG-3'	
Claudin-17	vorwärts	5'-ATGGCATTTTATCCCTTGCAA-3'	675 bp
	rückwärts	5'-TTAGACATAACTGGTGGAGGT-3'	
Claudin-18	vorwärts	5'-AAAGCCAACATGACACTGACC-3'	279 bp
	rückwärts	5'-GTAGTTGGTTTCTTCTGGTGCC-3'	
Claudin-19	vorwärts	5'-AGGTCCTACCCTCTGTCTAGGG-3'	781 bp
	rückwärts	5'-AGCCTGATACGCAGTGGC-3'	

# 3.6 Biologische Materialien

## 3.6.1 Kulturzellen

In der vorliegenden Arbeit wurden die jeweiligen Zelllinien von "American Type Culture Collection" (ATCC, Manassas, VA, USA), der "European Collection of Cell Cultures" (ECACC, Porton Down, Salisbury, UK) oder der "Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" (DSMZ, Braunschweig) erworben, von anderen Laboratorien zur Verfügung gestellt oder im Labor der Abteilung für Zellbiologie des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ), Heidelberg, kultiviert und definiert. Für die einzelnen Zelllinien ist die Quelle aus den Literaturzitaten zu entnehmen.

Bezeichnung	Herkunft	Quelle
16HBE140 <sup>-</sup>	Mit SV40 large T-Antigen	(Cozens et al. 1994)
	immortalisierte bronchiale Primärkulturzelllinie	freundlicher Weise von Dr. C. Ehrhardt; Universität Saarbrücken zur Verfügung gestellt
CaLu-3	Zellen aus einem Lungen- Adenokarzinom eines 25-jährigen Kaukasiers (ATCC HTB-55)	(Fogh et al. 1977)
Caco-2	Zellen aus einem Colon- Adenokarcinom (ATCC HTB-37)	(Fogh et al. 1977)
HaCaT	Permanente Kulturzelllinie aus spontan transformierten Keratinocyten	(Boukamp et al. 1988)
PLC	Zellen eines Primärkarzinoms der Leber (ATCC CRL-8024)	(Alexander et al. 1976)
MCF-7	Zellen eines Mamma- Adenokarzinoms (ATCC HTB-22)	(Soule et al. 1973)
SV80	SV40-transformierte Fibroblasten	(Todaro und Green 1966; Franke et al. 1979)
Bon	Humanes Karzinom aus dem Ileum; Neuroendokrine Tumorzelllinie	(Evers et al. 1991)
Glioma	Astromyocytenzellen	(Osborn et al. 1981; Achstatter et al. 1986)
MDCK Klon 20	Mardin-Darby Karzinomzellen des Nierenepithels eines Hundes (ATCC CCL-34)	(Gaush et al. 1966)

Tab. 3.7: In dieser Arbeit verwendete humane Zelllinien

### 3.6.2 Gewebe

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene menschliche Gewebe, die im Rahmen von chirurgischen Eingriffen entnommen wurden, verwendet. Hierbei handelte es sich sowohl um in Paraffin eingebettetes Material als auch um frisches Material bzw. eingefrorene Proben. Präparate von Plattenepithelkarzinomen der Lunge, des gesunden Bronchialepithels und Metaplasien des Bronchialepithels wurden freundlicherweise von Herrn Dr. N. Gassler (Institut für Pathologie, Universität Heidelberg) und der NCT (Nationales Centrum für Tumorerkrankungen) Gewebebank Heidelberg zur Verfügung gestellt. Die verwendete humane Haut wurde von der Firma Beiersdorf zur Verfügung gestellt und stammte ebenfalls aus chirurgischen Eingriffen. Rindergewebe stammten von frisch geschlachteten Tieren aus dem Mannheimer Schlachthof und die Mäusegewebe stammten von Mäusen aus dem Tierstall des DKFZ.

# 3.7 Zellkultur-Medien und -Zusätze

Bezeichnung	Hersteller
Modified Eagle's Medium (MEM)	Biochrome AG, Berlin
Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) mit Glutamin	GIBCO BRL, Eggenstein
HAM's F12 (1:1 gemischt mit DMEM für Bon-Zellen)	Biochrome AG
fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Cölbe
L-Glutamin 200 mM (100x)	GIBCO BRL
Nicht-Essentielle Aminosäuren (100x)	Biochrome AG

Tab.3.8: In dieser Arbeit verwendete Medien und Zusätze

# 3.8 Antikörper

# 3.8.1 Erst-Antikörper

Tab.	3.9:	In	dieser	Arbeit	verwendet	e Erst	tantikör	ner
Tub.	0.0.		alcoci	7 1001	verwendet		uninter	per

Antigen	Antikörper (Klon)	Quelle und Referenzen			
transmembrane TJ-Protein	transmembrane TJ-Proteine				
Occludin	a) mAK, m				
	b) pA, rb				
Claudin-1	pA, rb				
Claudin-2	pA, rb				
Claudin-3	pA, rb	Zymed, Berlin,			
Claudin-4	a) mAK, m	NeoMarkers, Fremont, CA, USA			
	b) pA, rb				
Claudin-5	pA, rb				
Claudin-7	a) mAK, m				
	b) pA rb				
Claudin-7	pA, gp (gp7.2)	diese Arbeitsgruppe (Lutz Langbein)			
Tricellulin	a) mAK, Ratte	Freundliche Gabe von Prof. Dr. Sa.			
	b) pA, rb	al. 2006)			
ZO- (Zonula occludens) Proteine mit PDZ-Domäne					
ZO-1	mAK, m	Zymed			
ZO-2	pA, rb				
ZO-Proteine ohne PDZ-Dor	näne				
Symplekin	mAK, m (E150)	Progen Biotechnik, Heidelberg			
Cingulin	pA, gp Tier2	diese Arbeitsgruppe (Ilse Hofmann)			
Cadherine					
E-Cadherin	mAK, m	Transduction Laboratories,			
N-Cadherin	mAK, m	Lexington, KY, USA			
VE-Cadherin	pA, rb	Alexis Biochemicals, Grünberg			
Cadherin 8	pA, gp	Santa Cruz Biotechnology, Santa			
		Cruz, CA, USA			
Cadherin 11	mAK, m	Zymed			
P-Cadherin	mAK, m	Transduktion Laboratories			
T-Cadherin	pA, rb	Santa Cruz Biotechnology			
Desmoglein (Dsg 1-2)	mAK, m (DG3.10)	Progen			

Antigen	Antikörper (Klon)	Quelle und Referenzen	
desmosomale Cadherine	I		
Desmoglein 1 (Dsg 1)	mAK, m (P124)	Progen	
Desmoglein 2 (Dsg 2)	pA, rb (rb8)		
Desmoglein 3 (Dsg 3)	mAK, m (G194)		
Desmocollin (Dsc 1-3)	pA, rb	Natutec, Frankfurt/M	
Desmocollin 1 (Dsc 1)	mAK, m (U100)	Progen	
Desmocollin 2 (Dsc 2)	pA, rb	Natutec	
Desmocollin 3 (Dsc 3)	mAK, m (U114)	Progen	
Plaque-Proteine			
Desmoplakin	a) mAK, m	Progen	
	b) pA, rb	Natutec	
Plakoglobin	mAK, m (PG 5.1)	Progen	
α-Catenin	mAK, m		
β-Catenin	mAK, m	BD Transduction Laboratories,	
Protein p120	mAK, m	Heidelberg	
Plakophilin 1 (PKP 1)	mAK, m (5C2)	Progen	
Plakophilin 2 (PKP 2)	mAK, m (CM150)		
Plakophilin 3 (PKP 3)	mAK, m (270.6.2)		
Vinculin	mAK, m (vin 11-5)	Sigma–Aldrich, Taufkirchen	
Intermediärfilamente	I		
Vimentin	mAK, m (3B4)	Progen	
Pan-Cytokeratin	mAK, m (Lu-5)	Dianova, Hamburg	
Cytokeratin 1	mAK, m (NCL-CK1)	Novocastra, Newcastle, UK	
Cytokeratin 2e	pA, gp (gp2e.2)	Progen	
Cytokeratin 4	mAK, m (6B10)		
Cytokeratin 5	pA, gp (gp5.2)	Progen	
Cytokeratin 6	mAK, m (KA12)	Progen	
Cytokeratin 8/18	pA, gp (gp8/18)	Progen	
Cytokeratin 9	pA, gp (TY1)	Progen	
Cytokeratin 10	mAK, m (RSKE60)		
Cytokeratin 13	mAK, m (KS13.1)	Progen	
Cytokeratin 14	pA, gp (gp14.2)		
Cytokeratin 15	pA, gp		
Cytokeratin 16	mAK, m (k16,	Natutec	
	LL025)		

Antigen	Antikörper (Klon)	Quelle und Referenzen
Intermediärfilamente		
Cytokeratin 17	mAK, m (KS17.E3)	Progen
Cytokeratin 19	mAK, m (Z105.6)	
Cytokeratin 20	mAK, m (IT-Ks20.8)	
Cytokeratin 1/10/11	pA, gp (8.60)	
Aktin	mAK, m (2G2)	Sigma–Aldrich
Sonstige		
Ezrin	mAK, m (3C12)	Sigma–Aldrich
Desmoyokin	pA, rb	Freundliche Gabe von
		Prof. Dr. T. Hashimoto, Kurume
		Universität, Fukuoka, Japan;
		Hashimoto <i>et al.</i> , 1993
Moesin	mAK, m	BD Transduction Lab
	(Hybridom 38)	
p63	mAK, m (4A4)	Neo Markers
Ki67	mAK, m (Ab-2)	Dianova
L-Afadin	pA, rb	Sigma–Aldrich
GAPDH	mAK, m	Stressgen, Victoria, Canada

### 3.8.2 Zweit-Antikörper

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden Cy3-konjugierte (BioTrend, Köln), Alexa Fluor488-konjugierte (MoBiTec, Göttingen) und Alexa Fluor568-konjugierte (MoBiTec, Göttingen) Antikörper (aus Ziege) verwendet, die gegen die Immunglobuline von Maus, Meerschweinchen oder Kaninchen gerichtet waren. Zu den Zweitantikörpern wurde zusätzlich zur Anfärbung des Chromatins 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, Serva, Heidelberg) 1:10000 verdünnt hinzugegeben. Es wurden die Verdünnungen verwendet, die im Datenblatt der jeweiligen Antikörper angegeben sind.

Für "Western Blot"-Analysen (siehe 4.3.5) wurden kovalent mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Antikörper (aus Ziege) der Firma Dianova (Hamburg) gegen Immunglobuline aus Maus, Meerschweinchen oder Kaninchen verwendet.

# 3.9 Häufig verwendete Puffer und Medien

Soweit nicht anders angegeben, handelt es sich bei allen Lösungen um wässrige Lösungen. Die im Folgenden aufgelisteten Lösungen wurden im Zuge verschiedener Methoden benutzt. Weitere Lösungen, die ausschließlich im Rahmen einzelner Methoden verwendet wurden, sind bei den einzelnen Methoden aufgeführt.

10-fach PBS: 1,4 M NaCl 27 mM KCl 17 mM  $KH_2PO_4$ 81 mM  $Na_2HPO_4$ auf pH 7,4 eingestellt

10-fach PBS-T siehe 10-fach PBS unter Zugabe von 1% Tween<sup>®</sup>20 [w/v]

10-fach TBS: 0,1 mM Tris-HCI 1,5 M NaCI auf pH 8,0 eingestellt

10-fach TBS-T siehe 10-fach TBS unter Zugabe von 1% Tween 20 [w/v]

SDS

Elektrophoresepuffer	92 mM	Tris-HCI	
	760 mM	Glycin	
	0,2 % (w/v)	SDS	
	auf pH 8,8 ei	ngestellt	
"Stripping"-Puffer:	6,25 mM	Tris-HCI	
	20.00 mM	DTT	

2 % (w/v)

auf pH 6,7 eingestellt

# 4. Methoden

### 4.1 Zellbiologische Methoden

#### 4.1.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Bei den verwendeten Zellen handelte es sich um Zelllinien, die in Adhäsionskultur wachsen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C in einer zu 5 % gesättigten CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Um ein gleichbleibendes Wachstum und das Überleben adhärenter Zellen zu gewährleisten, mussten die Zellen bei Erreichen der Konfluenz trypsiniert und in größerer Verdünnung auf neue Zellkulturschalen verteilt werden.

#### 4.1.1.1 Kultivierung von 16HBE140<sup>-</sup> Zellen

Zur Untersuchung, ob 16HBE14o<sup>-</sup> Zellen (Cozens et al. 1994) als Näherungs-*in vitro*-Modell für eine Plattenepithelmetaplasie dienen können, wurden diese wie folgt kultiviert: Für die Experimente wurden diese Zellen in Modified Eagle's Medium (MEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) mit Glutamin (1%) und nicht essentiellen Aminosäuren (1%) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert. Für die weitere Kultivierung wurden subkonfluente 16HBE Zellen zweimal pro Woche kurz mit 0,05 % EDTA in PBS gewaschen, bevor 1 mL Trypsin/EDTA zugegeben und anschließend wieder abgesaugt wurde. Nach ca. 10 Min Inkubation im Brutschrank mit dem auf den Platten zurückgebliebenen Trypsin/EDTA lösten sich die Zellen ab. Durch Auf- und Ab-Pipettieren mit einer Pasteur-Pipette wurden die Zellen vereinzelt und im Verhältnis von 1:10 bis 1:20 auf neue, im Durchmesser 10 cm große Schalen verteilt.

Die 16HBE Zellen wachsen unter bestimmten Kulturbedingungen als mehrschichtiger Zellrasen. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsiniert und anschließend mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. 500.000 Zellen pro Well wurden auf Transwell Membrane Filter (Corning Costar, Bodenheim) ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium auf der apikalen Seite der Zellen abgesaugt und damit die Phase des "*Air-liquid-Interphase"-Wachstums* (AIC) gestartet. Dabei werden die Zellen durch kleine Poren (0,4 µm) in den Filtern, auf denen sie wuchsen, mit Medium (700-1000 µL) aus dem unteren Teil der Zellkulturschale versorgt, während die Oberseite des Zellrasens der Luft ausgesetzt war. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt und die Zellen so über einen Zeitraum von bis zu 7 Wochen kultiviert.

#### 4.1.1.2 Kultivierung von CaLu-3-Zellen

Die CaLu-3 Zelllinie (Fogh et al. 1977) wurde so wie für die 16HBE Zellen beschrieben kultiviert. Da sie als bronchialepitheliale Kontrolle im Vergleich zur Zell-Linie 16HBE diente, wurde auch sie 7 Wochen nach der AIC-Methode kultiviert.

Alle weiteren verwendeten Zellkultur-Linien wurden gehalten und passagiert, wie vom Hersteller bzw. in der Referenzliteratur angegeben. Dabei wurden die Medien und Zusätze der Firmen Biochrome (Berlin), Gibco (Eggenstein) und Serva (Heidelberg) verwendet. Sofern nicht anders angegeben wurden die Zellen alle 3-4 Tage passagiert. Dabei wurden die Zellen 10 Sek mit EDTA (0,5 % in PBS) gespült, 2-3 Min mit Trypsin (0,25 % in PBS/EDTA) behandelt und anschließend in frischem Medium auf neue Zellkulturschalen verteilt.

#### 4.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen einer subkonfluenten im Durchmesser 10 cm Schale wurden trypsiniert wie unter 4.1.1.1 bzw. 4.1.1.2 beschrieben und 5 Min bei 1200 Upm in der Zellkultur-Zentrifuge zentrifugiert. Das Zellsediment ("Pellet") wurde in 2 mL kaltem FCS mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und in ein Kryo-Röhrchen (1 mL) überführt. Damit die Zellen langsam einfroren, wurden die Röhrchen mit Papiertüchern umwickelt, einige Stunden bei -20 °C und über Nacht bei -80 °C gelagert, bevor sie endgültig in flüssigen Stickstoff eingefroren wurden. Zum schnellen Auftauen der Zellen wurden diese direkt nach der Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und mit 10 mL warmem Kulturmedium in Schalen (Ø 10 cm) ausgesät. Sobald sich alle Zellen am Schalenboden angeheftet hatten, wurde das Medium gewechselt, um das DMSO zu entfernen.

### 4.1.3 Zellzahlbestimmung

Um bei der AIC – Methode (siehe 4.1.1.1) eine definierte Anzahl an Zellen aussäen zu können, wurde die Zellzahl vorher bestimmt. Hierfür wurden die trypsinierten und vereinzelten Zellen mit DMEM bzw. MEM verdünnt und mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt. Jeweils zwei durch Schliffe markierte Großquadrate wurden ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel bestimmt:

Zellzahl / mL = Anzahl der gezählten Zellen pro Großquadrat × 10.000

### 4.2 Molekularbiologische Methoden

#### 4.2.1 RNA-Präparation aus Kulturzellen

Die RNA-Präparation wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) durchgeführt. Kulturzellen, die in 10 cm großen Kulturschalen konfluent gewachsen waren, wurden mit 600 μL RLT-Puffer und Zusatz von β-Mercaptoethanol (10 μL auf 1 mL RLT-Puffer) mit Hilfe eines Zellkulturschabers (Corning Costar, Bodenheim) vollständig aufgeschlossen. Anschließend wurde das Lysat in ein 2 mL "QIAshredder"-Säulchen überführt und 2 Min bei Raumtemperatur mit 13.700 Upm zentrifugiert. Dabei wurden die DNA und die RNA mit einer Größe von 200 Nukleotiden und darüber von den kleineren RNAs getrennt. Die kleinen RNAs befanden sich nach diesem Zentrifugations-Schritt im Eluat. Dieses Eluat wurde dann mit 600 µL 70 % Ethanol gemischt und durch vorsichtiges Auf- und Ab-Pipettieren homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenisat auf eine "RNeasy mini" Säule überführt und weitere 2 Min mit 13.700 Upm zentrifugiert. Dabei binden die RNAs an die Matrix in der Säule. Der Durchfluss wurde verworfen. Die in der Säule gebundenen RNAs wurden mit 700 µL RW1-Puffer gewaschen und dann durch Zugabe des Puffers und Zentrifugation für 15 Sec bei 13.700 Upm gewaschen. Anschließend wurde die Säule mit 500 µL RPE-Puffer gewaschen. Der Waschschritt mit dem RPE-Puffer wurde ein weiteres Mal wiederholt, wobei 2 Min mit 13.700 Upm zentrifugiert wurde, um die RNeasy silika-gel Membran vollständig zu trocknen. Im Anschluss an diese Wasch-Schritte wurden die RNAs aus der Säule in ein neues Reaktionsgefäß hinein eluiert. Dazu wurden 30-50 µL RNase freies H<sub>2</sub>O auf die Membran der Säule gegeben und diese 1 Min mit 13700 Upm zentrifugiert. Die so gereinigte RNA wurde direkt für eine cDNA-Synthese (siehe 4.2.2) verwendet, oder bei -20°C gelagert.

#### 4.2.2 cDNA-Synthese

Gemäß der Methode von Frohmann *et al.* (1988) wurde aus der Gesamt-RNA eine cDNA synthetisiert, die als "Template" für die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) (siehe 4.2.3) von spezifischen Nukleinsäure-Sequenzen bestimmter Proteine dient. Zunächst wurde die in der aufgereinigten Gesamt-RNA noch vorhandene genomische DNA durch eine Endonuclease, welche DNA an Pyrimidinen in kleine Fragmente schneidet, verdaut. Anschließend wurden 10 µg Gesamt-RNA in 12 µL H<sub>2</sub>O bei 65°C für 3 Min denaturiert und dann auf Eis gekühlt. Zu diesem Ansatz wurden 2 µL 10x konzentrierte "reverse Transkriptase" RT-Puffer, 0,74 µg "Random Primer" (Pharmacia, Freiburg), 10 U AMV-Transkriptase und 15-20 U RNase-Inhibitor (Roché-Diagnostics) zugegeben. Dieser Ansatz wurde 1 h bei 42°C und 30 Min bei 52°C inkubiert.

10x RT-Puffer	0,4 M	Tris-HCI	pH 8,0
	0,4 M	KCI	
	60 mM	MgCl <sub>2</sub>	
	10 mM	DTT	
	10 mM	dNTP (4x)	

#### 4.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten verwendet, die zwischen bekannten doppelsträngigen Sequenzbereichen liegen (Saiki et al. 1988). Mittels der bekannten Sequenzinformation konnten zwei Oligodesoxyribonukleotide (Primer; siehe 3.5) synthetisiert werden, von denen das eine komplementär zum kodierenden Strang, das andere komplementär zum nicht-kodierenden Strang war. Nach Denaturierung der Matrizen-DNA und Anlagerung der Oligodesoxyribonukleotide an die DNA synthetisiert die Taq-Polymerase die komplementären Gegenstränge ausgehend von den 3'-Enden der Oligodesoxynukleotide. Um eine Anlagerung der Oligodesoxyribonukleotide an weitere DNA-Fragmente zu ermöglichen wurde der synthetisierte DNA-Doppelstrang erneut denaturiert. Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte exponentiell.

Das Standard-Volumen eines PCR-Ansatzes betrug 50  $\mu$ L und bestand aus:

2,0 µL	cDNA
35,0 µL	H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>
5,0 µL	dNTPs (10 mM)
5,0 µL	10 x PCR-Puffer
0,5 µL	Vorwärts-Oligodesoxyribonukleotide (10 pmol/µL)
0,5 µL	Rückwärts-Oligodesoxyribonukleotide (10 pmol/µL)
2,0 µL	Taq-Polymerase (5 U/µL) (Roché, Mannheim)

Die Standard-PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler (MJR Research, Biozyme, Oldendorf) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

95 °C	2 Min	
95 °C	30 sec	)
58 °C	30 sec	30 Zyklen
72 °C	45 sec	J
72 °C	10 Min	

Je nach Größe des zu amplifizierenden Fragments und der Homologie der Oligodesoxyribonukleotide, wurden die Polymerisationszeit sowie die Anlagerungs-Temperatur variiert. Das erhaltene PCR-Fragment wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 4.2.4).

#### 4.2.4 Analytische Agarosegel-Elektrophorese

Zur Analyse oder Präparation von DNA-Fragmenten wurden diese in Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung von linearen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten in einem elektrischen Feld beruht auf der Tatsache, dass die elektrophoretische Beweglichkeit der DNA umgekehrt proportional zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare ist (Meyers et al. 1976). Nach der Zugabe von Ethidiumbromid, welches in GC-Paare der DNA interkaliert, konnten DNA-Fragmente unter ultraviolettem (UV)-Licht aufgrund der Abgabe von Fluoreszenzlicht sichtbar gemacht werden.

Der verwendete Agarosegehalt der Gele richtete sich nach der Größe der zu trennenden Fragmente und variierte zwischen 0,8 % (w/v) und 1,5 % (w/v). Die entsprechende Agarosemenge wurde in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris/Essigsäure; 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)) bis zur Homogenität aufgekocht, nach dem Abkühlen auf 50-60 °C mit 0,75 µg/mL Ethidiumbromid versetzt und in eine Gelkammer mit Gelkamm gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen Probenpuffer (0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylencyanol; 40 % Saccharose) versetzt und zur Elektrophorese in die durch den Gelkamm geformten Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard wurde ein "1 kb"-Marker (GIBCO BRL, Eggenstein) eingesetzt. Die angelegte Spannung während der Elektrophorese betrug je nach Größe des Gels 80-120 V. Die Banden wurden anschließend zur Dokumentation im UV-Durchlicht (E-Box 1000/20M, Peglab, Erlangen) bei einer Wellenlänge von 312 nm fotografiert.

#### 4.2.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA bzw. PCR-Produkten erfolgte nach dem Prinzip von (Sanger et al. 1977) mit Hilfe des Sequenzierautomaten ABI 373 A (Applied Biosystems, Darmstadt). Im Gegensatz zur Sanger-Methode wurden dabei fluorochrom-markierte Desoxyribonukleotide statt radioaktiv markierter Nukleotide verwendet. Die DNA-Sequenzierung wurde freundlicher Weise von Dr. Andreas Hunzicker (Servicegruppe DNA-Sequenzierungen / Oligodesoxynukleotid-synthesen, DKFZ) durchgeführt.

# 4.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 4.3.1 Herstellung von Zellextrakten

Um spezifische Proteine nicht nur anhand von indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie (siehe 4.4.1) in Geweben und Zellen nachzuweisen, wurden von den unterschiedlichen Geweben bzw. Zellen Zellextrakte hergestellt, die durch SDS-PAGE (siehe 4.3.3) nach ihrer Größe aufgetrennt und mit Hilfe spezifischer Antikörper immunologisch nachgewiesen (siehe 4.3.5.3) wurden.

#### 4.3.1.1 SDS-Extrakte

Für "Western Blot"-Analysen eignen sich SDS-Proteinextrakte sehr gut, da sie u.a. auch relativ unempfindlich gegenüber mehrmaligem Einfrieren und Auftauen sind.

Die konfluenten Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gespült. Eine entsprechende Menge an 97°C heißem 1 %-igem SDS wurde auf die Zellen gegeben und diese mit einem Zell-Schaber (Corning/Costar, Bodenheim) abgekratzt (für Schalen mit 10 cm Durchmesser wurden 500  $\mu$ L 1 % SDS, für 12er Probenkammern wurden 50  $\mu$ L 1 % SDS verwendet) und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Zur Hydrolyse der Nukleinsäuren der Zellen wurde 1  $\mu$ L Benzonase (Reinheitsgrad II, >250 U/ $\mu$ L, Merck, Darmstadt) zu den Lysaten gegeben und dieses Gemisch 5 Min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 5 Min auf 97°C erhitzt, um die Proteine vollständig zu denaturieren. Um die gelösten Proteine vom unlöslichen Protein-Aggregaten zu trennen, wurde das Lysat 1 Min mit 13.700 Upm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die Proteinkonzentrationsbestimmung (siehe 4.3.2) wurden 10  $\mu$ L des Lysats entnommen und der Rest bei -20 °C eingefroren.

#### 4.3.1.2 Proben-Bereitung nach dem Laemmli-Verfahren

In Kulturschalen (Ø 10 cm) konfluent gewachsene Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit Hilfe eines Zell-Schabers (Corning/Costar, Bodenheim) in 1 mL 3x konzentriertem "Laemmli-Probenpuffer" aufgenommen. Zu dieser Lösung wurde 1 μL Benzonase (Reinheitsgrad II, >250 U/μL, Merck, Darmstadt) gegeben, um die vorhandene DNA abzubauen. Nach einer Inkubation von etwa 5 Min auf Eis wurde die Probe 5 Min auf 97°C erhitzt, um die Benzonase und alle anderen Proteine zu denaturieren. Um dann die gelösten von den ungelösten Proteinen zu trennen, wurde die Probe 5 Min bei 13.700 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und sofort verwendet oder bei -20°C gelagert.

Um Proteinextrakte von Geweben zu erhalten, wurde von den Geweben 10 µm dicke Schnitte mit Hilfe eines Kryotoms (Leica, Bensheim) hergestellt (siehe 4.4.1.1). Die Schnitte wurden in vorgekühlten Eppendorf Reaktionsgefäßen in 100-500 µL 3x konzentriertem "Laemmli-Probenpuffer" aufgenommen und mit einem Homogenisator nach Dounce (Eppendorf, Hamburg) durch Scherkräfte zerkleinert. Die weitere Verfahrensweise folgte dem oben beschriebenen Protokoll für Ganzzell-Lysate.

3x "Laemmli-Probenpuffer":

 6,25 mL 1 M
 Tris/HCl, pH 6,8

 30,00 mL
 Glyzerin

 15,00 mL 20%
 SDS

 0,255 g
 Bromphenolblau

 ad 85 mL H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub>

150  $\mu$ L 1 M DTT wurden zu je 850  $\mu$ L 3x konzentriertem Laemmli-Probenpuffer kurz vor Gebrauch frisch zugeben.

#### 4.3.1.3 Anreicherung löslicher Proteine aus Zellkulturen durch Ultrazentrifugation

Die Kulturzellen wurden nach dem Abgießen des Nährmediums zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit Hilfe eines Zell-Schabers (Corning/Costar, Bodenheim) in 1 mL PBS abgeschabt und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden durch einen kurzen Zentrifugationsschritt mit 13.700 Upm sedimentiert und der Überstand wurde anschließend abgesaugt. Das Zell-Pellet wurde dagegen in 700 µL (Kulturschalen im Durchmesser 10 cm) bzw. 400 µL (Transwell 6 Well) Lysis-Puffer aufgenommen, wobei die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Ab-Pipettieren aufgeschlossen wurden. Die Lyse erfolgte anschließend durch Inkubation von 10 Min auf Eis. Um die löslichen von den unlöslichen Teilen zu trennen, wurde das gesamte Lysat 1 Std. bei 4°C mit 100.000 g in einer Ultrazentrifuge (Rotor: TLA120.2; Beckmann Coulter, Krefeld) zentrifugiert. Von den Überständen wurden 60 µL als spätere Ladekontrolle abgenommen und mit 30 µL 3x konzentriertem Laemmli-Probenpuffer versetzt. Das Pellet dagegen wurde in 100 µL 3x konzentriertem Laemmli-Probenpuffer resuspendiert. Um die Proteine der Proben vollständig zu denaturieren, wurden sie 5 Min auf 97°C erhitzt. Zur Auftrennung der Proteine wurden die Proben auf SDS-Polyacrylamid-Gele (siehe 4.3.3), oder einen linearen Zuckergradienten für Dichtegradienten-Zentrifugationen (siehe 4.3.6) aufgetragen. Oder die Proteine wurden für eine Immunpräzipitation (siehe 4.3.7) verwendet.

Lysispuffer:	150,0 mM	NaCl
	2,5 mM	EDTA
	10,0 mM	Tris-HCI
	1 %	Detergenz (Triton-X 100 (Serva, Heidelberg) bzw. n-Octyl-β-D-
		glycosid (Merck, Darmstadt)
	1 x	Complete mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim)

#### 4.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Extrakten erfolgte mit dem DC Protein Assay (BioRad, München). Diese Methode beruht auf einer Folin-Reaktion nach Lowry (Lowry et al. 1951). Dabei reagieren die Proteine hauptsächlich über ihre Tyrosin- und Tryptophan-Reste im alkalischen Medium mit Kupfertartrat. Das Folin-Reagenz wird von dem Protein-Kupfer-Komplex reduziert, wobei charakteristische blaue Produkte mit einem Absorptionsmaximum bei 750 nm entstehen.

Es wurden jeweils 10  $\mu$ L der Proteinextrakte mit H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> in einem Reagenzglas auf 100  $\mu$ L aufgefüllt und mit 490  $\mu$ L Reagenz A sowie 10  $\mu$ L Reagenz S versetzt. Die Farbreaktion wurde durch die Zugabe von 4 mL Reagenz B und Mischen auf dem Vortex-Gerät gestartet. Nach 20 Min Inkubation bei RT konnte die Farbentwicklung am Spektralphotometer bei 750 nm gemessen werden. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte anhand einer Eichkurve mit Rinder gamma-IgG als Protein-Standard.

#### 4.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine durch Gelelektrophorese erfolgte nach einer Modifikation der Methode von Laemmli (1970). Bei dieser denaturierenden Gelelektrophorese-Methode wurden die aufgetragenen Proteine annähernd nach ihrer Größe aufgetrennt. Um die Sekundär- und Tertiär-Strukturen zu entfalten, mussten die Proteine vor dem Auftragen reduziert und mit SDS in der Hitze denaturiert werden. Die amphipatischen SDS-Moleküle lagerten sich mit ihren hydrophoben Anteilen an die Proteine an und führten diese in die durch die SDS-Reaktion in negativ geladene Polypeptide über. Dadurch wiesen die SDS-beladenen Proteine im Verhältnis zu ihrer Masse fast identische Ladungen auf, lagen in entfalteter Konformation vor und wanderten vorwiegend nur noch in Abhängigkeit ihrer Molekülgröße durch die Gelmatrix.

Eine bestimmte Protein-Auftrennung nach dem Molekulargewicht wurde durch die Verwendung von Sammel- und Trenngel noch unterstützt, wobei es zu einer Konzentrierung der Proteine in einer schmalen Bande im Sammelgel vor deren Eintritt ins Trenngel kam. Durch den niedrigen pH-Wert (pH6,8) im 4,5 %-igen Sammelgel wurde aufgrund der dort elektrophoretisch kaum mobilen Glycinat-Zwitterionen und der voranlaufenden mobilen

Chloridionen eine Konzentrierung der Proteine in Höhe der Chlorid-Ionen erreicht. Im Trenngel lag ein pH-Wert von pH8,8 vor, der eine elektrophoretische Auftrennung der Proteine nach dem Molekulargewicht ermöglichte. Um die optimale Auftrennung der unterschiedlichen Proteine zu ermöglichen, wurden für das Trenngel verschiedene Konzentrationen von Acrylamid/Bisacrylamid gewählt. Bei großen Proteinen (>150 kDa) wurde ein 8 % Trenngel (große Porenweite), bei kleineren Proteinen (<50 kDa) ein 15 % Trenngel verwendet. Bei Proteinen der Größe 40-120 kDa wurden oft 10 % Trenngele verwendet.

Die Trenngellösung wurde gemischt und nach der Induktion der Polymerisation mit Ammoniumperoxiddisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) in einen Gelgießstand (cti GmbH, Idstein) für 4 bzw. 10 SDS-Gele gegossen. Die noch flüssigen Trenngele wurde mit absolutem Ethanol überschichtet, um Luftblasen zu entfernen. Nach der Aushärtung der Trenngele wurde das Ethanol entfernt, die Sammelgellösung auf die Trenngele gegossen und die Probenkämme in die Sammelgele eingeführt. Nach dem Aushärten der Sammelgele wurden die Kämme gezogen. Anschließend wurden die Gele entweder direkt für eine SDS-PAGE verwendet, oder in feuchte Tücher und in Frischhaltefolie verpackt bei 4°C für maximal 14 Tage gelagert.

Für Proteingemische mit sehr unterschiedlichen Molekulargewichten und für eine besonders genaue Auftrennung von sehr kleinen Proteinen wie etwa den Claudinen wurden Gradientengele (Novex, San Diego, CA, USA) mit einem Acrylamidgradienten von 4-20 % verwendet.

Die SDS-Extrakte wurden nach der Proteinkonzentrationsbestimmung (siehe 4.3.2) mit 3x konzentriertem Probenpuffer vermischt und vor dem Auftragen auf das Sammelgel für 5 Min zur Denaturierung bei 97° C aufgekocht. Die in Probenpuffer gelösten Proben wurden ebenfalls für 5 Min aufgekocht, konnten aber direkt auf das Gel aufgetragen werden. Die Auftrennung erfolgte je nach Proteingröße 1-3 h bei 25-40 mA in Elektrophoresepuffer. Zur Größenabschätzung der aufgetrennten Proteine wurden 10 µL Proteinmarker (New England BioLabs, Frankfurt, siehe Tab. 10) aufgetragen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele entweder mit Hilfe eines "Western Blots" (siehe 4.3.5) weiterverarbeitet, oder direkt mit Coomassie Brilliantblau (siehe 4.3.8) gefärbt.

"Broad Range"		Molekulargewicht [kDa]	Protein	Herkunft
hoga	Da - 212,000	212,000	Myosin	Kaninchenmuskel
kessi kessi	- 158,194	158,194	MBP-β-Galactosidase	E. coli
-	- 116,351 - 97,184	116,351	β-Galactosidase	E. coli
	- 66,409	97,184	Phosphorylase B	Kaninchenmuskel
in and	- 55 561	66,409	Serumalbumin	Rind
	- 33,301	55,561	Glutaminsäuredehydrogenase	Rinderleber
terest .	- 42,710	42,710	MBP-2	E. coli
	- 36,487	36,487	Lactatdehydrogenase M	Schweinemuskel
1	— 26,625	26,625	Triosephosphatisomerase	Kaninchenmuskel
1	- (20,040-	20,040-20,167	Trypsininhibitor	Sojabohne
	20,167) — 14,313	14,313	Lysozym	Hühnereiweiß
-	- 6,517	6,517	Aprotinin	Rinderlunge
<b>EEE</b>	(2,340- 3,400)	2,340-3,400	Insulin A, β-Kette	Rinderpankreas

Tab.	4.1: Mole	kulargewichtsr	marker (Ne	w England	BioLabs.	Frankfurt)
Tub.	<b></b>	Rulargementer	nance (ne	w England		i rankiurt)

Lösungen:

Lösung A (= Acrylamid)	30%	Acrylamid (Rotiphorese Gel 30, Roth, Karlsruhe)
Lösung B (= lower gel stock)	1,5 M 0,4 %	Tris-HCI, pH 8,8 SDS
Lösung C (= upper gel stock)	0,5 M 0,4 %	Tris-HCI, pH 6,8 SDS
APS	10 %	Ammoniumperoxodisulfat in H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>
TEMED		N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamid (Serva, Heidelberg)
Elektrophoresepuffer	25,0 mM	Tris-HCI
	192,0 mM	Glycin
	0,1 % w/v	SDS
	auf pH 8,3 ein	gestellt

Die Polyacrylamidgele (jeweils 10 Stück, ca. 6,5x10 cm) wurden nach folgendem Schema hergestellt:

Trenngele:
------------

Polyacrylamidkonzentration	8%	10%	15%
Lösung A	25,00 mL	31,25 mL	46,88 mL
Lösung B	23,44 mL	23,44 mL	23,44 mL
$H_2O_{demin}$	45,94 mL	38,44 mL	24,06 mL
APS	500 µL	500 µL	500 µL
TEMED	50 µL	50 µL	50 µL

### Sammelgele:

Lösung A	6,5 mL
Lösung C	12,5 mL
$H_2O_{demin}$	31,0 mL
APS	600 μL
TEMED	50 µL

# 4.3.5 "Western Blot"-Analyse

#### 4.3.5.1 Transfer der Polypeptide auf eine Membran

Zur immunologischen Analyse wurden die in einer SDS-PAGE (siehe 4.3.3) aufgetrennten Polypeptide vom Polyacrylamid-Gel auf eine Polyvinyliden-Fluoride (PVDF) - Membran übertragen ("geblottet"). Hierbei wurde das Halbtrockenblot-Verfahren nach Kyhse-Andersen (1984) angewandt.

Für den Transfer wurde die PVDF-Membran (0,45 µm, Immobilon<sup>™</sup>-P, Millipore, Eschborn) auf die Größe des Gels zugeschnitten, in Isopropanol rehydriert und dann in Transfer-Puffer 2 getränkt. Das zugeschnittene Whatman<sup>®</sup> 3 MM-Papier wurde je nach Schicht in Transfer-Puffer 1, 2 oder 3 getränkt. Das Gel selbst wurde ebenfalls in Transfer-Puffer 2 inkubiert.

Lösungen:

Transfer-Puffer 1	300 mM	Tris
	mit HCI pH-\	Nert auf 10,4 eingestellt
Transfer-Puffer 2	25 mM	Tris
	mit HCI pH-\	Wert auf 10,4 eingestellt
Transfer-Puffer 3	40 mM	Norleucin
	25 mM	Tris
	mit HCI pH-Wert auf 9,4 eingestellt	

Die Komponenten des Blots wurden auf der Anode des "Semi-Dry-Electroblotters" (cti GmbH, Idstein) wie folgt aufgebaut:

Kathode
6 FILTERPAPIERE IN TRANSFERPUFFER 3
GEL IN TRANSFERPUFFER 2
PVDF-MEMBRAN IN TRANSFERPUFFER 2
3 FILTERPAPIERE IN TRANSFERPUFFER 2
6 FILTERPAPIERE IN TRANSFERPUFFER 1
Anode

Tab. 4.2: Versuchsaufbau beim "Semidry-Electroblotting"-Verfahren

Die Transferdauer richtete sich nach der Größe des jeweiligen Proteins. Bei großen Proteinen, wie z.B. ZO-1 (220 kDa) wurden bis zu 90 Min gewählt, bei kleineren Proteinen wie Claudin-1 (22 kDa) nur 30 Min. Die angelegte Stromstärke betrug dabei 200 mA.

### 4.3.5.2 Unspezifisches Anfärben von Proteinen auf PVDF-Membranen mit Coomassie Brillant Blue

Um die Proteinbanden auf den mit Proteinen beladenen PVDF-Membranen sichtbar zu machen und um so den Blot sowie die Elektrophorese zu überprüfen, wurden die Membranen auf dem Schüttler für etwa 1 Min mit der Färbelösung inkubiert. Nach dem Abschütten der Färbelösung erfolgte die Entfärbung der Membranen, wobei die Entfärbelösung sooft erneuert, bis die Hintergrundfärbung komplett verschwunden und die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Die Membranen wurden getrocknet, eingescannt und anschließend im Western Blot (siehe 4.3.5.3) weiter verwendet.

Lösungen:
-----------

Färbelösung:	40,0 %	Isopropanol
	5,0 %	Essigsäure
	0,2 %	Coomassie-Brilliantblau R-250
Entfärbelösung	40 %	Isopropanol
	5 %	Essigsäure

# 4.3.5.3 Spezifische Antigen-Erkennung durch Antikörper auf PVDF-Membranen ("Western Blot")

Der Nachweis der an die Membran gebundenen Polypeptide erfolgte immunochemisch als indirekter Enzym-Immuntest. Um unspezifische Hintergrundreaktionen zu minimieren, wurde die Membran nach erfolgtem Transfer der Proteine auf die Membran (siehe 4.3.5.1) und ihrer Anfärbung mit Coomassie (siehe 4.3.5.2), zur Absättigung freier Bindungskapazitäten für mindestens 1 Std. in 5 % Magermilchpulver/PBS-T (0,1 % Tween<sup>®</sup>20) bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht bei 4 °C blockiert. Für den immunologischen Nachweis von Proteinen wurde ein spezifischer Erstantikörper für mindestens 1 Std. bei RT oder über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert. Dabei wurde der Antikörper nach den Herstellerangaben in 5 % Magermilchpulver/PBS-T verdünnt und zur Konservierung mit 0,02 % NaN<sub>3</sub> versetzt. Um die Membran von nicht gebundenem Erst-Antikörper zu befreien, wurde der Blot 3x 10 Min mit PBS-T gewaschen. Es folgte die Inkubation mit einem in

5 % Magermilchpulver/PBS-T verdünnten Meerrettich-Peroxidase (HRP) -gekoppelten Zweit-Antikörper (je nach Herkunft des Erst-Antikörpers entweder anti-Kaninchen, anti-Meerschweinchen oder anti-Maus; Dianova, Hamburg) für 1 Std. bei RT. Durch dreimaliges Waschen in PBS-T für je 10 Min wurde ungebundener bzw. unspezifisch gebundener Zweit-Antikörper entfernt.

Durch eine Chemilumineszenz Reaktion (Western Lightning<sup>™</sup> Chemiluminescence Reagent (ECL, NEN, Dreieich) ließen sich die membrangebundenen Proteine über ihre Erstund Zweit-Antikörper nachweisen.

Die Darstellung der spezifischen Banden erfolgte dabei durch eine Oxidation von Luminogen PS-3 Acridan durch HRP in Acridiniumester Intermediate, wobei die Intermediate mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unter alkalischen Bedingungen reagieren und dabei Licht der Wellenlänge 430 nm emittieren. Dieses Licht kann nun von einem geeigneten Autoradiographie-Film (X-Ray medical Film, Konica Minolta, Tokio, Japan) aufgefangen werden.

# 4.3.6 Fraktionierung von Proteingemischen durch Dichtegradientenzentrifugation

Zur Fraktionierung von Zellextrakten durch Dichtegradientenzentrifugation wurden die Zellbestandteile, wie in 4.3.1.3, beschrieben in Lösung gebracht. Die Extrakte wurden auf lineare 5-30 % (w/v)-Saccharose-Gradienten aufgetragen und 18 Std. bei 35.000 Upm und 4°C in einem SW40-Rotor zentrifugiert. Die Herstellung von linearen Saccharosegradienten erfolgte mit Hilfe eines Gradientenmischers, welcher in der Technischen Werkstatt des DKFZ angefertigt worden war. Als Kontrolle diente ein Saccharose-Gradient, der zuvor mit einem Gemisch aus Referenzproteinen, bestehend aus 100 µg BSA (Sedimentationskoeffizient S = 4,3 S) und jeweils 500 µg Katalase (S = 11,3 S) und Thyroglobulin (S = 16,5 S) überschichtet worden war. Im Anschluss an die Zentrifugation wurden die Gradienten mit Hilfe einer Pipette fraktioniert, wobei ca. 14-16 Fraktionen von je 750 µL gewonnen wurden. Zur weiteren Analyse wurden je Fraktion 60 µL mit 30 µL 3x konzentriertem Probenpuffer versetzt, 5 Min bei 97°C erhitzt und anschließend für eine SDS-PAGE (siehe 4.3.3) verwendet oder bei -20°C gelagert.

30 %ige-Sucrose-Lösung in H<sub>2</sub>O

30,0 %	Succrose	
150,0 mM	NaCl	
10,0 mM	Tris-HCI	
2,5,0 mM	EDTA	
auf pH 7,5 eingestellt		

5 % ige-Sucrose-Lösung in H<sub>2</sub>O

5,0 %	Succrose
150,0 mM	NaCl
10,0 mM	Tris-HCI
2,5 mM	EDTA
auf pH 7,5 eir	ngestellt

### 4.3.7 Immunpräzipitation von Proteinkomplexen aus Zellextrakten

Um Antigene und deren Bindungspartner unter wenig stringenten Bedingungen aus einem Proteingemisch zu isolieren, wurden Antikörper verwendet, die an kleine magnetische Kügelchen (Beads) gekoppelt waren. Die Immunpräzipitationen (IPs) wurden mit Magnet-Kügelchen ("Dynabeads"; Dynal, Hamburg), an die Protein A (bakterielle Oberflächenrezeptoren aus Staphylococcus aureus), Maus-IgG oder Kaninchen-IgG gekoppelt war, durchgeführt. Je 25-50 µL Magnet-Beads wurden viermal in IP-Puffer gewaschen und mit dem entsprechenden Antikörper beladen (2-3 Std. unter Rotation bei 4°C). Für die Vorreinigung der Zellextrakte ("Preclearing") wurden die Magnet-Beads im IP-Puffer viermal gewaschen und mit dem Proteinextrakt löslicher Proteine aus Zellkulturen durch Ultrazentrifugation (siehe 4.3.1.3) für 2-3 Std. auf dem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Nach der Bindung des Antikörpers an die Magnet-Beads, wurden diese viermal mit IP-Puffer gewaschen. Der vorgereinigte Überstand wurde anschließend über Nacht mit den Antikörper-beladenen Magnet-Beads auf dem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Um ungebundene Proteine und Antikörper von den Magnet-Beads zu trennen, wurden diese erneut viermal mit IP-Puffer gewaschen, danach in 3x konzentriertem Laemmli-Probenpuffer aufgenommen, unter Schütteln gelöst und 5 Min bei 97°C denaturiert. Die Analyse der präzipitierten Proteine erfolgte mit Hilfe von SDS-PAGE (siehe 4.3.3) und dem "Western Blot"-Verfahren (siehe 4.3.5), oder anschließender Massenspektrometrischer-Analyse (siehe 4.3.9).

Zur Kontrolle der Antikörper-spezifischen Proteinbestandteile, wie z.B. schwere und leichte Ketten, wurden mit Antikörper-beladene Magnet-Kügelchen, die ausschließlich mit IP-Puffer inkubiert worden waren, verwendet.

IP-Puffer (TNE-Puffer)

150,0 mMNaCl10,0 mMEDTA2,5 mMTris-HCl pH 7,5auf pH 7,5 eingestellt

## 4.3.8 Färbung von Proteinen in Gelen

# 4.3.8.1 Unspezifisches Anfärben von Proteinen in SDS-Gelen mit Coomassie-Brillant-Blau Färbung

Zur Anfärbung der Polypeptid-Banden mit Coomassie-Brillant-Blau wurde das Gel mindestens 1 Std. auf einem Gelschüttler in Färbelösung inkubiert. Die anschließende differentielle Entfärbung erfolgte – unter mehrfachem Wechsel der Entfärbelösung – so lange, bis die Banden deutlich zu erkennen waren. Das Gel wurde zur Dokumentation fotografiert bzw. eingescannt und getrocknet.

Färbelösung:	0,4 % (w/v)	Coomassie-Brillant-Blau (R-250)
	40,0 % (w/v)	Isopropanol
	7,0 % (w/v)	Essigsäure
	in $H_2O_{demin}$ ad	100 %
Entfärbelösung:	10 % (w/v)	Essigsäure

in H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> ad 100 %

20 % (w/v)

### 4.3.8.2 Kolloidale Coomassie-Brillant-Blau Färbung

Zur Fixierung der Polypeptid-Banden wurden die Gele 6-16 Std. auf einem Gelschüttler in Fixierungslösung inkubiert, dreimal je 30 Min gewässert und 1 Std. in die Inkubationslösung gelegt. Die Gele wurden anschließend in der Färbelösung für mindestens 3-5 Std. angefärbt, danach mit destilliertem Wasser ca. 3 Std. entfärbt, zur Dokumentation fotografiert, oder gescannt. Häufig wurden die Gele auch für die Massenspektrometrische-Analyse weiterverwendet.

Isopropanol

Fixierungslösung:	50 % (w/v)	Methanol
	2 % (w/v)	Phosphorsäure
Inkubationslösung:	34 % (w/v)	Methanol
	2 % (w/v)	Phosphorsäure
	17 % (w/v)	Ammoniumsulfat
Färbelösung:	0,066 % (w/v	/) Coomassie G-250 in Inkubationslösung

#### 4.3.9 Massenspektrometrie

Anhand des charakteristischen Massenspektrums und durch den Vergleich mit den "theoretischen Massen" können Molmassen von Proteinfragmenten (gewonnen durch Trypsin-Verdau) identifiziert werden. Diese Analysen wurden dankenswerterweise von Dr. Martina Schnölzer (Servicegruppe Zentrale Proteinanalytik, DKFZ), oder von der Firma "Proteome Factory" (Berlin) wie von Kuhn *et al.* (2001) beschrieben, durchgeführt.

#### 4.3.9.1 Trypsin-Spaltung im Gel

SDS-PAGE-Gele wurden mit "Kolloidaler Coomassie-Lösung" gefärbt, die zu untersuchenden Polypeptid-Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in 0,2 mL-Reaktionsgefäße überführt. Es folgten mehrere Waschschritte in 100  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> für 30 Min. Nachdem die Gelstücke zweimal 15 Min in 100  $\mu$ L 50 % (w/v) Acetonitril-Lösung gewaschen wurden, wurden sie 15 Min in 100  $\mu$ L 100 % Acetonitril entwässert und 5 Min luftgetrocknet. Vor der Analyse wurden 0,8  $\mu$ L Trypsin-Lösung und 20  $\mu$ L frisch angesetzte NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung zu den Gelstückchen pipettiert. Nach 15 Min Inkubation bei 37°C hatten die Gelstücke die Trypsin-Lösung aufgenommen. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C, wobei zu beachten war, dass die Gelstücke immer mit Puffer bedeckt blieben.

Trypsin-Lösung: 20 μL Trypsin ("Sequencing Grade modified Trypsin", Promega, Mannheim) in 40 μL 1 mM HCI (pH 7,5-7,9)

NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung: 40 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 8,4

#### 4.3.9.2 MALDI-Analyse

MALDI ("Matrix-assistierte Laser-Desorption/Ionisations")-Massenspektren wurden mit dem "Reflex II Time-of-Flight" Instrument (Bruker-Daltonik, Bremen) aufgezeichnet und aus 50-200 individuellen "Laser-Schüssen" ermittelt. Als Matrix wurden 0,3 µL einer nitrozellulosehaltigen, gesättigten α-Zimtsäure-Lösung in Aceton in individuellen Punkten auf den Probenträger aufgetragen. Anschließend wurden 0,4 µL der verdauten Probe sowie 0,8 µL 10 % Ameisensäure aufgetragen und langsam luftgetrocknet. Zur Entfernung von Salzen aus dem Trypsin-Verdau wurden mehrere Waschschritte mit 10 % Ameisensäure und mit H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> durchgeführt. Die bei der MALDI-Analyse erhaltenen Molekülmassen wurden in einer Datenbanksuche mit den Programmen MS-Fit (University of San Francisco, CA, USA), Profound (Rockefeller University, New York, USA) und Peptide Search (EMBL, Heidelberg) ausgewertet.

## 4.4 Fluoreszenzmikroskopie

#### 4.4.1 Herstellung von Präparaten

#### 4.4.1.1 Kryostatschnitte

Gefrorene Gewebeproben wurden mit einem Kryotom (Leica, Nussloch) in 3 bis 5 µm dicke Schnitte geschnitten und auf speziell beschichtete Objektträger (SuperFrost<sup>®</sup>Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgebracht. Nach Lufttrocknung über Nacht folgte die Fixierung mit Aceton bei –20°C für 10 Min. Im Anschluss an die Fixierung wurden die Gewebeschnitte sofort für die Immunhistochemie weiterverwendet.

#### 4.4.1.2 Paraffinschnitte

Mehrschichtig gewachsene Zellkulturen und frisch entnommene Gewebeproben wurden über Nacht bei 4°C in neutral gepuffertem 4 %igem Formaldehyd fixiert und am nächsten Tag in Paraffin eingebettet. Die Einbettung der Zellkulturen erfolgte freundlicher Weise durch Frau Moll (Abteilung für zelluläre und molekulare Pathologie, Prof. H.J. Gröne, DKFZ). Die Lungenproben wurden von Herrn Dr. N. Gassler (Universität Heidelberg, Institut für Pathologie) zur Verfügung gestellt. Für die Einbettung in Paraffin wurden Tissue-Tek III Vakuum-Infiltrationsprozessoren (Vogel, Gießen) verwendet. Während des Standardprogramms wurden die in das Gerät eingebrachten Proben zunächst bei 40°C in einer aufsteigenden Ethanolreihe (jeder Schritt 2x 45 Min in 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 %) entwässert. Anschließend wurden die Proben zweimalig für 30 Min in Xylol und viermal für 30 Min bei 60°C in Paraffin (Histocomp, Vogel, Gießen) eingetaucht. Nach Beendigung des Standardprogramms wurden die paraffinisierten Gewebe und Zellkulturen in entsprechende Paraffinblöcke eingegossen. Von den eingebetteten Präparaten wurden mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (HM355S mit Cool Cut (gekühlte Probeneinspanneinrichtung) und Schnitt-Transfersystem STS, Microm, Walldorf) 3-5 µm dicke Schnitte hergestellt, auf speziell beschichtete Objektträger (SuperFrost<sup>®</sup>Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgebracht und bei 37°C in einem Wärmeschrank (Memmert, Schwabach) über Nacht angetrocknet (Kuruc und Franke, 1988; Mertens et al., 1996; Borrmann et al., 2006 und Literatur darin).

#### 4.4.1.3 Kulturzellen

Um die Lokalisierung der Antigene in Kulturzellen im Fluoreszenzmikroskop darstellen zu können, wurden diese, nachdem sie entweder auf unbeschichteten oder mit Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) beschichteten Deckplättchen angewachsen waren, für 5 Min in Methanol bei -20°C fixiert, anschließend kurz in –20°C kaltes Aceton getaucht und

luftgetrocknet. Nach dem Lufttrocknen wurden sie entweder gleich in einer Immunfluoreszenz eingesetzt oder bei –20°C eingefroren.

Die auf den Deckgläschen fixierten Zellen wurden vor der spezifischen Antigenmarkierung mit dem Erst-Antikörper kurz mit PBS benetzt. Die anschließende Immunmarkierung und mikroskopische Aufarbeitung wurde, wie für die Paraffinschnitte (siehe 4.4.1.3) beschrieben ausgeführt.

#### 4.4.2 Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie

#### 4.4.2.1 Immunfluoreszenz an Kryostatschnitten

Die fixierten Kryostatschnitte (siehe 4.4.1.1) wurden kurz in PBS gespült und in einer feuchten Kammer für 20 Min mit 5 % BSA und 5 % Ziegenserum in PBS präabsorbiert. Die Inkubation mit dem Erst-Antikörper erfolgte für 1 Std. bei RT. Um unspezifisch bzw. nicht gebundene Antikörper auszuwaschen, wurden die Schnitte 3x in PBS gewaschen. Als Zweitantikörper (siehe 3.8.2) wurden mit den Fluorochromen (z.B.: Cy-3 und Alexa 4.88) konjugierte Immunglobuline verwendet. Zur Anfärbung des Chromatins und damit zur Darstellung des Zellkerns, wurde der Zweit-Antikörperlösung DAPI (siehe 3.8.2; Serva, Heidelberg) in einer Verdünnung von 1:10.000 zugefügt. Die Zweit-Antikörper wurden 45 Min bei RT inkubiert und danach, wie oben beschrieben, nicht gebundene Immunglobuline mit PBS ausgespült. Um die im PBS enthaltenen Salzkristalle abzuwaschen, wurden die Schnitte kurz in  $H_2O_{demin}$  gewaschen. Nach kurzem Eintauchen in absoluten Ethanol wurden die Schnitte luftgetrocknet und anschließend mit Fluoromount G (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL, USA) eingedeckt. Nach dem Antrocknen der Deckgläschen über Nacht, oder aber mindestens für 1 Std., wurden die Präparate dokumentiert (siehe 4.4.3).

## 4.4.2.2 Antigen-Freilegung (Antigen-Retrieval) und Immunmarkierung von Paraffin-Schnitten durch Mikrowellenbehandlung

Frisches menschliches Tumor- oder Gewebematerial zur Kryokonservierung ist häufig nicht verfügbar. Deshalb ist es wichtig fixiertes Gewebematerial aus Paraffinblöcken untersuchen zu können. Die Verwendung von Paraffin in Geweben und Zellkulturen hat gegenüber Gefrierschnitten zwei Vorteile: zum einen sind die Gewebe und Schnitte dauerhaft bei Raumtemperatur lagerbar und zum anderen ist eine bessere Gewebeerhaltung bei Paraffinschnitten gewährleistet. Der entscheidende Nachteil von Paraffinschnitten ist jedoch die schlechtere Zugänglichkeit vieler Antigene durch die Fixierung mit Formaldehyd. Um die Antigene für die Antiköper besser zugänglich zu machen gibt es die Möglichkeit der Antigen-Demaskierung ("Antigen-Retrieval").

Methoden

Nach dem Antrocknen wurden dazu die Schnitte mit Xylol (3x 3 Min) entparaffiniert und mit einer absteigenden Alkoholreihe (2x in absolutem Ethanol für je 3 Min und je 1x für 3 Min in 95 %, 80 %, 70 % und 50 %igem Ethanol) rehydriert. Danach wurden die Schnitte in ein spezielles Mikrowellen-Überdruckgefäß (GRP-120 Histomodul, Microm, Walldorf), das mit Pufferlösung gefüllt war, transferiert. Die Pufferlösung bestand aus 0,1 M Tris-HCI pH9,5 zu dem 5 % (w/v) Harnstoff frisch hinzugegeben wurde. Der erzeugte Überdruck im Gefäß erlaubte eine Erhitzung des Puffers auf über 100°C. Das Histomodul wurde in einer speziell für diese Zwecke entwickelten Mikrowelle (MicroMed T/T MEGA, Microm, Walldorf) laut einem vorprogrammierten Standardprotokoll für 10 Min auf 120°C erhitzt und danach 15 Min unter fließendem Wasser abgekühlt.

Im Anschluss daran wurden die Schnitte vor der spezifischen Antigenmarkierung mit dem Erst-Antikörper kurz mit PBS benetzt. Die anschließende Immunmarkierung wurde, wie für die Kryostatschnitte (siehe 4.4.2.1) beschrieben ausgeführt und dokumentiert (Kuruc und Franke 1988; Mertens et al. 1996; Borrmann et al. 2006).

# 4.4.2.3 Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit auf Glasplättchen gewachsenen Kulturzellen

Die fixierten Zellen wurden vor der spezifischen Antigenmarkierung mit dem Erst-Antikörper kurz mit PBS benetzt. Die anschließende Immunmarkierung wurde, wie für die Kryostatschnitte (siehe 4.4.2.1) beschrieben ausgeführt und dokumentiert (siehe 4.4.3).

#### 4.4.2.4 Doppellokalisierung

Um eine Ko-Lokalisierung verschiedener Proteine in Geweben oder Zellen sichtbar zu machen, wurden diese mit den entsprechenden Erstantikörpern inkubiert, wobei auf die richtige, finale Verdünnung der jeweiligen Antikörper geachtet werden musste. Auf die Inkubation der zwei Erstantikörper, die aus verschiedenen Spezies stammen mussten, folgte nach dem Auswaschen mit PBS (3x) die Inkubation mit den spezifischen Zweitäntikörpern, welche an verschiedene Fluorochrome (z.B.: Cy-3 und Alexa 5.68) gekoppelt waren. Auch hierbei mussten die finalen Konzentrationen der Antikörper beachtet werden. Der Arbeitsablauf der Doppelmarkierung der Antigene mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern war identisch mit der Einfachmarkierung. Die Auswertung der Doppellokalisierungen erfolgte entweder mit einem Zeiss Axiophot oder mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (siehe 4.4.3).
## 4.4.3 Dokumentation der indirekten Immunfluoreszenz-Mikroskopie

### 4.4.3.1 Dokumentation der indirekten Immunfluoreszenzen mit einem Zeiss Axiophot

Die durchgeführten indirekten Immunfluoreszenzen an Zellen auf Glasplättchen oder Schnitten (Kryostat und Paraffin) wurden mit einem Axiophot Zeiss Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen) ausgewertet. Die Photodokumentation erfolgte entweder mit Kodak Tmax400pro Negativ-Filmen oder mit Hilfe der Zeiss Digitalkamera HRc. Die Bilder der Digitalkamera wurden mit Hilfe der AxioVision Software (Version 4.3, Carl Zeiss, Oberkochen) und Adobe Photoshop 7.0 ausgewertet.

#### 4.4.3.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die konfokale Fluoreszenz-Laser-Scanning-Mikroskopie ermöglicht die Betrachtung von Zellen und Geweben in definierten optischen Schnittebenen und erlaubt damit eine genauere Lokalisierung der Antigene. Die Untersuchungen wurden mit einem Zeiss LSM 510 UV Mikroskop (Oberkochen) durchgeführt, welches mit einem Argon-Laser (488 nm) und einem Helium-Neon-Laser (534 nm) ausgestattet war. Um bei Doppelfluoreszenz-Markierungen ein "Durchscheinen" der verschiedenen Fluoreszenzfarben zu vermeiden, wurde der "Double Track Mode" angewandt, d.h. jede durchzumusternde Zeile wurde alternierend mit nur einer der beiden jeweiligen Wellenlängen angeregt. Konfokale Serienschnitte durch die Präparate wurden in Abständen von 250 bis 350 nm zwischen den einzelnen Schnittebenen angefertigt. Um die Auflösung der optischen Schnitte zu erhöhen, wurde für einige Präparate das Dekonvolutionsverfahren (KS400-Software, Zeiss Vision GmbH, Oberkochen) mit einem so "Least-Square"-Algorithmus und mit Computer-assistierten genannten Alterationen angewandt.

## 4.5 Lichtmikroskopie

Für die Beurteilung der Morphologie von pathologisch relevanten Geweben eignet sich am besten die lichtmikroskopische Betrachtung von Schnitten der jeweiligen Gewebe in Hellfeld. Mit Hilfe der Hellfeldmikroskopie konnten HE-gefärbte Schnitte von pathologisch relevanten Geweben besser beurteilt werden.

## 4.5.1 HE-Färbung (Haematoxylin-Eosin Färbung)

Die Haematoxylin-Eosin Färbung ermöglicht die histologische Betrachtung von Gewebeschnitten, da hier DNA und Bindegewebe unspezifisch angefärbt werden. Bei dieser Methode wird das Hämalaun bzw. Hämatoxylin an das Chromatin in den Zellkernen und das Eosin an das Bindegewebe absorbiert. Nach der Entparaffinierung (siehe 4.4.1.3) wurden dazu die Gewebeschnitte 5 Min in Haematoxylin-Färbelösung (Zellkernfärbung; Microm, Walldorf) inkubiert. Nach kurzem Waschen mit H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> wurden die Schnitte in 10% Essigsäure getaucht und erneut mit H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> gewaschen. Darauf folgte eine Inkubation mit Eosin (Bindegewebsfärbung; Microm, Walldorf) für 3 Min, bevor die Schnitte nach jeweils kurzer Behandlung mit 95%, 100% Ethanol, sowie Xylol in Eukitt (O. Kindler GmbH, Freiburg) eingebettet wurden.

## 4.6 Elektronenmikroskopie

Um die aus den Lichtmikroskopischen Untersuchungen und aus den Immunfluoreszenzmikroskopisch gewonnenen Informationen der Lokalisierung der einzelnen Proteine ultrastrukturell zu untersuchen und Unterschiede der verschiedenen Zell-Zell-Kontakte auf ultrastruktureller Ebene darzustellen wurden elektronenmikroskopische Präparationen der Proben angefertigt.

## 4.6.1 Herstellung elektronenmikroskopischer Präparate für das Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM)

Für die zweidimensionale, ultrastrukturelle Untersuchung von zellulären Strukturen wie z. B. den Desmosomen, "Tight Junctions" o.ä., wurden die Gewebe und die Zellkulturen für eine konventionelle Transmissions-Elektronenmikroskopie aufgearbeitet.

#### 4.6.1.1 "Konventionelle" Ultradünnschnitt-Elektronenmikroskopie

Für die konventionelle Elektronenmikroskopie wurden Gewebeproben, auf 1 mm Kantenlänge zugeschnitten, bzw. Kulturzellen, auf Deckgläschen oder Filtern gewachsen, 20-30 Min mit 2,5 % Glutaraldehyd (Lösung 1) bei RT fixiert. Die Proben wurden kurz bei RT anfixiert und dann auf Eis oder im Kühlschrank bei 4°C weiterverarbeitet. Nach dreimaligem Waschen (je 5 Min) in Cacodylat-Puffer (Lösung 2) wurden die Proben 2 Std. in 2 % Osmiumtetroxidlösung (Lösung 3) nachfixiert. Es folgten mehrere Waschschritte mit H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> und eine Blockkontrastierung in 0,5% Uranylacetat (Lösung 4) über Nacht. Die Entwässerung und die Einbettung erfolgten bei den Zellkulturen und den Gewebeproben nach der von Franke et al. (1978a) beschriebenen Methode. Dazu wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 %, 70 %, 80 %, 90 % und 96 %) in 5-10 Min Schritten bei 4°C entwässert. Die abschließenden Schritte der Entwässerung wurden bei RT durchgeführt: 2x 100 % Ethanol je 5-10 Min, 2x Propylenoxid je 5-10 Min. Für die Einbettung in das Kunstharz Epon wurden die so entwässerten Proben über Nacht mit einem 1:1-Gemisch von Epon (Lösung 5) und Propylenoxid infiltriert und dann für 5-6 Std. mit reinem Epongemisch inkubiert. Zur Polymerisierung wurden die Gewebeproben in Gelatinekapseln, die mit Epongemisch gefüllt waren, überführt.

Die auf Deckgläschen gewachsenen Kulturzellen wurden flach eingebettet. Die Deckgläschen wurden auf mit Aluminiumfolie ummantelte Objektträger gelegt (Zellen nach oben) und die mit Epon gefüllten Gelatinekapseln darauf gestülpt (Flacheinbettung). Streifen von den auf Filtern gewachsenen Zellen wurden in spezielle, mit Epon gefüllte Flachformen, gelegt. Die Polymerisierung der so vorbereiteten Proben erfolgte bei 60°C in einem Zeitraum von 48 Std. Bei den flach eingebetteten Zellen musste das Deckgläschen vor dem Ultradünnschneiden entfernt werden. Das Eintauchen des gesamten Blockes in flüssigen Stickstoff (LN<sub>2</sub>) bewirkte durch das Temperaturgefälle das "Absprengen" des Glases.

Ultradünnschnitte der eingebetteten Proben von ca. 50 nm Dicke wurden mit einem Ultramikrotom (Reichert Ultracut; Leica, Bensheim) angefertigt. Die auf Kupfernetzchen aufgebrachten Ultradünnschnitte wurden nach dem Antrocknen mit folgenden Schwermetalllösungen nachkontrastiert: 15 Min mit Uranylacetatlösung (Lösung 6) und anschließend, nach mehreren Waschschritten mit  $H_2O_{demin}$ , 5 Min mit Bleicitratlösung (Lösung 7, nach Reynolds *et al.* 1963). Die Auswertung der Ultradünnschnitte erfolgte mit Hilfe der Elektronenmikroskope EM900 bzw. EM910 (Zeiss, Oberkochen).

## 4.6.1.2 Lösungen

Lösung 1 :							
Glutaraldehyd-Lösung:	2,5 % 50,0 mM	Glutaraldehyd KCl					
	2,5 mM	MgCl <sub>2</sub> in Cacodylat-Puffer pH 7,2					
Lösung 2 :							
Cacodylat-Puffer:	50,0 mM	Na-Cacodylat, pH 7,2					
Lösung 3 :							
2 % OsO₄-Lösung:	2 % (w/v)	OsO <sub>4</sub> in Cacodylat-Puffer pH 7,2					
Lösung 4 :							
0,5 % Uranylacetat-Lösung:	0,5 %	Uranylacetat in H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>					
Lösung 5: Epon:							
- Gemisch A:	50,0 mL	DDSA (2-Dodecylsuccinylanhydride)					
	31,0 mL	Epon 812					
- Gemisch B:	44,5 mL	MNA (Methylnadic anhydride)					
	50,0 mL	Epon (Glycidether)					
Gemisch A und B wurden in	n vernaltnis 3:	2 (w/v) gemischt und 0,15 mL 2, 4, 6-1 ris(dimethyl-					
aminomethyl)phenol (DMP3	0) als Katalysa	tor auf 10 mL Eponmischung zugefügt.					
Lösung 6:							
2 % Uranylacetat-Lösung:	2 % (w/v)	Uranylacetat in Methanol					
Lösung 7:							
Bleizitrat-Lösung:	1,33 g	PbNO <sub>3</sub>					
	1,76 g	Na-Citrat-Dihydrat					
	8,00 mL	1M NaOH					
ad 50 mL H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub> (vorher frisch abgekocht)							
PhNO und No Citrat Dibyd	rat wurden zur	achet in 30 ml. H.O (vorher frisch shackacht)					

PbNO<sub>3</sub> und Na-Citrat-Dihydrat wurden zunächst in 30 mL H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> (vorher frisch abgekocht) 20 Min gerührt, anschließend wurde NaOH zugefügt und auf 50 mL mit H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> aufgefüllt.

### 4.6.1.3 Immun-Elektronenmikroskopie

Kryostatschnitte von 4 µm Dicke wurden auf Deckgläschen aufgebracht. Kulturzellen wurden auf Deckgläschen wachsen gelassen. Je nach verwendetem Erstantikörper wurden die Proben für 5-10 Min mit 2 % Formaldehyd in PBS (frisch hergestellt aus Paraformaldehyd) fixiert. Um eine gute Zugänglichkeit für die Antikörper zu gewährleisten wurde entweder mit 0,1 % Triton-X in PBS für 2 Min oder mit 0,1 % Saponin in PBS für 5-10 Min permeabilisiert. Die Inkubation des Erstantikörpers erfolgte über einen Zeitraum von 1-2 Std. Nach 3 Waschschritten mit PBS für je 5 Min wurden die Präparate mit den entsprechenden Zweitantikörpern (anti-Maus-, anti-Meerschweinchen- oder anti-Kaninchen-Immunglobuline), die an 1,4 nm große, kolloidale Goldpartikel ("Nanogold"; Biotrend, Köln) gekoppelt waren, über Nacht inkubiert. Nach dem Auswaschen der nicht gebundenen Antikörper mit PBS (3 x 5 Min) wurden die Präparate mit 2,5% Glutaraldehyd in Cacodylat-Puffer (Lösung 1) für 15 Min bei RT fixiert und anschließend kurz mit PBS gewaschen. Es folgten zwei Inkubationen für je 5 Min mit Saccharose-Lösung (Lösung 8). Die Silber-Verstärkung der Goldpartikel erfolgte nach der von Uchida et al. (1996) beschriebenen Methode und nach den Angaben des Herstellers für 3-8 Min (Silver Enhancement Kit, Nanoprobes, Stony Brooks, NY, USA). Nach zwei 5-minütigen Waschschritten mit Natriumthiosulfat-Lösung (Lösung 9) und zwei 5minütigen Waschschritten mit H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> wurden die Präparate mit 0,2% OsO<sub>4</sub> (Lösung 10) 30 Min auf Eis nachfixiert. Die Entwässerung und die Einbettung der Präparate in Kunstharz erfolgten nach der bereits beschriebenen Methode der Flacheinbettung (siehe 4.6.1.1).

Lösung 8:

Saccharoselösung	200 mM	Saccharose		
	50 mM	HEPES, pH 5,8		
Lösung 9:				
Natriumthiosulfatlösung	250 mM	Natriumthiosulfat		
	50 mM	HEPES pH 5,8		
Lösung 10:				
0,2 % OsO₄-Lösung	0,2 % (w/v)	OsO₄ in Natrium-Cacodylatpuffer		

## 4.6.2 Gefrierbruch Technik (Freeze-Fracture)

Die Gefrierbruchtechnik ist eine von Moor und Mühlethaler 1963 entwickelte und beschriebene Präparationstechnik für elektronenmikroskopische Präparate (Moor 1963; Nermut 1977). Hierbei werden die Proben eingefroren und anschließend im tiefkalten Zustand gebrochen. Derartige Gefrierbrüche liefern einen Einblick in den ultrastrukturellen "Ist-Zustand" der Transmembranproteine vor dem Einfrieren. Um zu zeigen, dass Tight Junction Proteine nicht nur in der indirekten-Immunfluoreszenz an der Membran lokalisiert sind, sondern auch dreidimensionale Strukturen ausbilden, wurde diese Technik verwendet.

#### 4.6.2.1 Probenpräparation

Die für die Versuche verwendete menschliche Haut wurde spätestens 1-3 Std. nach der Probenentnahme während der Operation verwendet. In der Zwischenzeit wurde die Haut auf einem in MEM getränkten Tuch bei 4°C gelagert. Von der Haut, die am Haaransatz entnommen wurde, wurden mit einer 3 mm Stanze (Stiefel, Wächtersbach) Hautproben ausgestanzt und für 24 Std. bei 4°C in Karnovsky-Lösung (Karnovsky und Deane 1955) fixiert. Als Kryoschutz folgte eine Inkubation in 87 % Glyzerin für 24 Std. bei 4°C. Der Kryoschutz ist notwendig, um die Bildung von Eiskristallen und damit die Zerstörung des Gewebes während des Einfrierens zu verhindern bzw. zu minimieren. Das zugegebene Glyzerin erniedrigt dabei den Gefrierpunkt des in der Haut vorhandenen Wassers. Dadurch erhöht sich die Wärmeleitfähigkeit der Probe und sie wird schneller eingefroren. Die ausgestanzten Hautproben wurden kurz mit Filterpapier von oberflächlichem Glyzerin befreit, um dann in flüssiges Ethan "geschossen" zu werden. Dabei fällt eine durch ein Gewicht beschleunigte Pinzette senkrecht in ein Gefäß mit flüssigem Ethan (Richter et al. 2004), was zu Verwirbelungen des flüssigen Ethans beim Eintauchen führt und damit einem besseren Kälte-Wärme-Austausch zwischen der Probe und der Flüssigkeit bewirkt. Der Kälte-Wärme-Austausch wird auch als Abkühlrate bezeichnet und ist bei dem Prozess des Einfrierens von entscheidender Bedeutung für die Strukturerhaltung der Probe. Da die Ultrastruktur von Transmembranproteinen untersucht werden soll, ist die Strukturerhaltung während des Einfrierens besonders wichtig. Bereits kleinste die Risse in den Proben würden eine Beurteilung erheblich erschweren.

Nach dem Einfrieren wurden die Proben bis zu ihrer Verwendung für einen Gefrierbruch in flüssigem Stickstoff (LN<sub>2</sub>) aufbewahrt. Für den Gefrierbruch wurden tiefgefrorene Proben auf einen in LN<sub>2</sub> vorgekühlten Probenhalter (Bal-Tec, Liechtenstein) montiert. Die so befestigten Proben wurden mit einem vorgekühlten "Kupfer-Deckel" abgedeckt. Der "Kupfer-Deckel" wirkt wie eine Kühlfalle, welche den Wasserdampf, der sich sonst auf der Probe niedergeschlagen hätte, aus der Umgebungsluft abfängt. Um die dreidimensionalen Strukturen der Transmembranproteine in Zellkulturmodellen darzustellen, wurden diese für 2 Std. mit 2% Glutaraldehyd bei 4°C fixiert. Nach der Fixierung wurde das Glutaraldehyd 3x 5 Min mit Cacodylat-Puffer ausgewaschen, die Zellen kurz mit PBS gespült und für 20 Min mit Glyzerin als Gefrierschutz inkubiert. Anschließend wurden sie mit Hilfe eine Zellschabers (Corning, Costar, Bodenheim) von der Zellkulturschale abgelöst. Ein Tropfen der Zellsuspension wurde zwischen zwei Goldplättchen (Durchmesser 0,3 cm) in LN<sub>2</sub> eingefroren, indem die Zellsuspension in flüssigen Stickstoff "eingeschossen" wurde, um Verwirbelungen und damit einen schnelleren Kälte-Wärme-Austausch zwischen dem flüssigen Stickstoff und den Goldplättchen zu erreichen. Die so eingefrorenen Zellen wurden bis zum ihrem Verbrauch in LN<sub>2</sub> gelagert (Fujimoto 1995).

Lösungen:

Karnovsky-Lösung	0,4 mL	16% (w/v) Formaldehyd (Endkonzentration 0,2%)
	2,5 mL	25% (w/v) Glutardialdehyd (Endkonzentration 1,25%)
	40,0 mL	0,2 M Natrium-Cacodylatpuffer pH 7,0-7,4
	7,0 mL	H <sub>2</sub> O <sub>demin</sub>
	30,0 mg	CaCl <sub>2</sub>

## 4.6.2.2 Gefrierbruch

Die wie unter 4.6.2.1 beschrieben präparierten Proben wurden mit Hilfe eines "Gegenstrom-Manipulators" in die Gefrierbruchanlage (BAF 060, Bal-Tec, Liechtenstein) eingeschleust. Um die Umgebungsluft mitsamt ihrem Wasserdampf von der Probe fernzuhalten, wurde durch den Manipulator trockenes Stickstoffgas geleitet. Nachdem der Manipulator an die Gefrierbruchanlage angedockt war und in seinem Inneren Hochvakuum erreicht war, wurde der Probenhalter (Abb. 4.1b, Pfeil) mit der Probe in die vorgesehene Halterung in der Gefrierbruchanlage geschoben (siehe Abb. 4.1a-b).



**Abb. 4.1:** a Gefrierbruchanlage mit angedocktem Manipulator. b Probenhalter in einer Gefrierbruchanlage

Die Halterung sorgte dafür, dass die Probe auch im Hochvakuum definiert gekühlt wird, um ein Aufwärmen der Probe und damit die Bildung von Eiskristallen in der jeweiligen Probe zu verhindern. Anschließend wurde der Manipulator (siehe Abb. 4.1b, Pfeil), der für den Transfer von der Gefrierbruchanlage in das Kryo-SEM (Gemini 1530, Leo/Zeiss, Oberkochen) verwendet wurde, mit LN<sub>2</sub> für 15 Min eingekühlt. Mit Hilfe eines frischen Mikrotom-Einmalmessers (Leica, Nussloch) wurde die Probe bei -110°C und 1 x 10<sup>-7</sup> mbar gebrochen (siehe Abb. 4.2).



Abb. 4.2: Skizze einer von Wasser umgebenen Probe bei einem Gefrierbruch

Im Anschluss an den Gefrierbruch wurden die Gewebeproben für 10 Min gefriergeätzt. Der Prozess des Gefrierätzens erfolgt durch die Sublimation von Wasser (siehe Abb. 4.3), also durch den gezielten Übergang von Eis zu Wasserdampf aufgrund von niedriger Temperatur (-110°C) und hohem Druck (Moor 1963; Nermut 1977).



Abb. 4.3: Phasendiagramm von Wasser

Der Gefrierätzschritt war notwendig, um kleine Membranstrukturen, wie z. B. die extrazellulären Schleifen der Transmembranproteine in Geweben freizulegen. Nach der Gefrierätzung wurde die Bruchfläche in einem Winkel von 45° durch abdampfen von 3 nm Pt/C von einer "Kanone" bedampft. Weitere 2 nm wurden im Winkel von 10-90° aufgedampft, um den aufgetragenen Pt/C-Film zu stabilisieren (Walther und Muller 1997).

Die Zellkulturproben wurden auf einem Doppelabdrucktisch befestigt und in die bereits vorgekühlte Gefrierätzanlage (BAF 040, Bal-Tec, Liechtenstein) gebracht. Nach dem Erreichen des Hochvakuums wurden die Goldplättchen und damit die Zellsuspension unter direkter Bedampfung aus einem Winkel von 45° mit Pt/C aufgebrochen. Anschließend wurden etwa 3 nm Pt/C auf die gebrochene Zellkultursuspension aufgedampft. Auf diese Pt/C-Schicht wurde zur Stabilisierung der so genannten Replika etwa 20 nm Kohle aufgedampft. Die so gewonnenen Replikas wurden entweder direkt für die Betrachtung im TEM in Chlorbleiche gereinigt, mit PBS abgespült und mit einem beschichteten Kupfergrid aufgefangen, oder für eine Immunmarkierung weiterverwendet.

#### 4.6.2.3 Kryo-Rasterelektronenmikroskopie

Nach der Bedampfung der Gewebeprobe wurde diese mit dem vorgekühlten Manipulator (siehe Abb. 4.1a, Pfeil) im Hochvakuum aus der Gefrierbruchanlage in das ebenfalls vorgekühlte (-120°C) Rasterelektronenmikroskop (Kryo-SEM) (Gemini 1539, Leo/Zeiss, Oberkochen) transferiert (Ritter 1999). Elektronenmikroskopische Bilder wurden digital aufgenommen und mit Hilfe des Computerprogramms Adobe Photoshop weiter bearbeitet.

## 4.7 Physiologische Methoden

#### 4.7.1 Bestimmung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER)

Bei dem transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER) handelt es sich um eine Messmethode zur Messung der Integrität der epithelialen Barriere anhand des passiven Ionenflusses über ein Epithelmodell (siehe Abb. 4.5). Zur Messung des TEER wurden die Zellen zum Teil auf Gelatine-beschichtete, permeable Polyestermembranen mit einem Porendurchmesser von 0,4 µm ausgesät (Corning/Costar, Bodenheim). Sobald der Zellrasen konfluent war, wurden die TEER-Messungen, in Triplikaten mittels eines Millicell-ERS Volt-Ohmmeters mit sog. STX-Chopstick-Elektroden (Millipore, Schwalbach) durchgeführt. Der Hintergrundwiderstand wurde über einer Gelatine-beschichteten Polyestermembran ohne Zellbesatz ermittelt. Die gemessenen Werte wurden durch die Subtraktion des Hintergrund-Widerstandes normalisiert (Delie und Rubas 1997; Meyle et al. 1999). Für Messungen an Air-Interface-Kulturen, in denen die Zellen nur über das basolaterale Kompartiment mit Medium versorgt wurden, wurden die Zellen 30 Min vor Beginn der Messung im apikalen Kompartiment mit vorgewärmtem und CO<sub>2</sub>-äquilibriertem Medium bedeckt und bis zur Messung im Brutschrank inkubiert. Die Messung wurde wie beschrieben durchgeführt, wobei nach Beendigung der Messung das Medium aus dem apikalen Kompartiment vorsichtig wieder abgesaugt wurde (Ehrhardt et al. 2002). Die Messwerte werden bei dem verwendeten Gerät in  $\Omega^*$ cm<sup>2</sup> als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS Sigma Plot (Systat Software, Erkrath).

Messkonfiguration:



Abb. 4.5: Messkonfiguration für TEER-Messungen

# 4.7.2 Messung der Barrierefunktion von Epithelien anhand des Transports von FITC-markierten Dextranen

Zur Messung der Funktionalität der Barriere von Epithelien und zur Bestimmung der Ausschlussgrößen von Molekülen, wurden apikal auf diese Epithelien fluoreszenzmarkierte Dextrane appliziert. Die Zellen wurden dafür als ein- bzw. mehrschichtige Zellkultur auf Transwell-Filtern (Corning/Costar, Bodenheim) kultiviert. Mit Hilfe der TEER-Messungen (siehe 4.7.1) wurde zunächst der transepitheliale Widerstand gemessen und damit die Integrität der Barriere der Epithelien bestimmt. Nachdem der gewünschte TEER-Wert für die jeweilige Zellkultur erreicht wurde, wurde das Medium der Zellen auf HBSS/Ca<sup>++</sup> (mit Phenolrot) gewechselt und für 3 Std. äguilibriert. In die basale Kammer der 12-Well-Platte wurden 1500 µL, in die apikale Kammer 475 µL Medium pipettiert. Anschließend wurde aus der basalen Kammer 100 µL abgenommen. Diese stellten den Leerwert der Messung dar. In die apikale Kammer wurden 25 µL FITC-Dextran, gelöst in HBSS/Ca<sup>++</sup> (mit Phenolrot) mit einer Endkonzentration von 2,5 mg/mL, appliziert. 30, 60, 120 und 180 Min nach der Applikation der Dextrane wurden aus der basalen Kammer 100 µL-Proben entnommen und sofort bei -20°C eingefroren. Nach der letzten Probenentnahme wurden alle entnommenen Proben mit 900 µL HBSS/Ca<sup>++</sup> (mit Phenolrot) gemischt. Anschließend wurde im Fluorometer die Intensität der Fluoreszenz der Proben, anhand derer sich die Menge der markierten Dextrane, welche das Epithel passiert hatten, feststellen ließ, gemessen. Zuvor wurde eine Messbereichskurve erstellt, um den linearen Messbereich zu definieren. Bei einer Konzentration der Stocklösung von 50 mg/ml lag der lineare Messbereich der Fluoreszenzintensitäten zwischen den Verdünnungen 1:10.000 und 1:1.000.000. Die FITCmarkierten Moleküle hatten eine  $\lambda$ -Exzitation (Anregungswellenlänge) von 490 nm und eine  $\lambda$ -Emission von 515 nm. Die Messungen wurden immer in Triplikaten durchgeführt. Um die Versuchbedingungen zu überwachen, wurden neben den Wells, die mit den markierten

Dextranen inkubiert wurden, auch Wells als Negativkontrolle gemessen die nur mit HBSS/Ca<sup>++</sup> (mit Phenolrot) inkubiert wurden. Neben diesen Negativkontrollen wurde noch ein weiteres Well ohne Zellen als Leerwert für das TEER-Monitoring und als Kontrolle für den Dextran Transport verwendet. Das Well ohne Zellen stellte für die Dextran-Partikel keine Permeabilitätsschranke dar, somit konnte der Effekt des Filters auf den TEER und den Transport gemessen werden. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS SigmaPlot (Systat Software, Erkrath).

## 4.7.3 "Tracer"-Technik (Lanthanchlorid-Ionen-Diffusion in Epithelien)

Ein Hilfsmittel zur morphologischen Lokalisierung von Barriere-Strukturen in Geweben ist die Tracer-Technik (Revel und Karnovsky 1967). Dabei wurden elektronendichte Tracer-Moleküle, wie Peroxidasen oder Lanthansalze, in Lösung gebracht. Diese Lösung wurde den Mäusen subkutan injiziert und für 30-60 Min bei RT inkubiert. Tracer-Moleküle können frei im Interzellularraum diffundieren. Da derartige Moleküle nur in vernachlässigbaren Mengen phagocytiert werden und praktisch keine Cytopempsis (Transport durch Zellen hindurch) auftritt, eine Ausnahme stellen eventuell die Endothelzellen dar, markieren sie den Interzellularraum bis zum Auftreffen auf eine Barriere. Obgleich diese Moleküle beträchtlich größer sind als Wasser, existiert bis heute keine bessere Methode (Landmann 1985), um eine intakte Barriere im Gewebe darzustellen. In dieser Arbeit wurde die Haut lebender Labormäuse für die Tracer-Technik verwendet. Zudem wurden Zellkulturen verwendet, die mit unterschiedlichen Kulturbedingungen und Kulturzeiten auf Transwell-Filtern (Corning/Costar, Bodenheim) kultiviert wurden. Für die Zellkulturen wurde als Tracer 600 mM Lanthanchlorid in TBS mit pH 6,5 gelöst und anschließend 1:10 mit DMEM gemischt (finale Konzentration des Lanthanchlorids: 60 mM). Für die Gewebe war 60 mM Lanthanchlorid in isotonischer Kochsalzlösung gelöst. Die verschiedenen Zellkulturmodelle wurden in Transwell-Platten (Corning/Costar, Bodenheim) von basal über einen Filter für 12 Std. bei 4°C mit der Lanthanlösung inkubiert.

Anschließend wurden die Proben für die konventionelle Elekronenmikroskopie am Transmissionselektronenmikroskop vorbereitet (siehe 4.6.1), mit der Änderung, dass allen Lösungen bis hin zum 96 %-igen Ethanol 60 mM Lanthanchlorid zugegeben wurde, um ein Auswaschen des Lanthanchlorids zu verhindern. Nach dem Einbetten in Epon wurden von den Proben Ultradünnschnitte angefertigt (siehe 4.6.1.3) und diese mit Hilfe des EM 910 (Zeiss) ausgewertet.

#### Lanthanchlorid-Lösung

600 mM LaCl<sub>3</sub> in 10x TBS lösen und die benötigte Menge auf 60 mM LaCl<sub>3</sub> mit MEM verdünnen.

64

## 5. Ergebnisse

## 5.1 Bildung, Anordnung und mögliche Funktionen von "Tight Junctions" und Tight Junction-Proteinen in Säugetier-Plattenepithelien

## 5.1.1 Mikroskopische Darstellung eines komplexen Plattenepithels am Beispiel der Epidermis

Der Aufbau von Plattenepithelien soll hier zunächst am Beispiel der Epidermis, einer besonders komplexen Epithelform, in Erinnerung gerufen werden, so mit einem Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbten Querschnitt (Abb. 5.1) durch die typische Schichtenfolge: Den proliferationsfähigen Zellen des *Stratum basale* folgen die Schichten des *Stratum spinosum*, diesen dann als letzte lebende Zellschicht das *Stratum granulosum* (Abb. 5.1a-c), überlagert von den Schichten der kernlosen, verhornten Zellen des *Stratum corneum*.



## Abb. 5.1: Lichtmikroskopische Darstellung HE-gefärbten Zellschichten der menschlichen Epidermis der Fußschle im Querschnitt

Der Querschnitt der menschlichen Epidermis der Fußsohle (a) zeigt die einzelnen Zellschichten. Die Zellen des *Stratum basale* (Str. b.) sitzen der Basallamina auf und sind deutlich nebeneinander aufgereiht. Die Zellen des mehrschichtigen *Stratum spinosum* (Str. sp.) weisen meist längliche Zellkerne auf, während die Zellen des *Stratum granulosum* (Str. gr.), der letzten lebenden Zellschicht oft ziegelsteinartig erscheinen. Die Zellen des *Stratum corneum* (Str. C.) sind abgeflacht, und Zellkerne sind nicht mehr erkennbar. Die Grenze zwischen Dermis und Epidermis, die Basallamina, ist hier mit einer gepunkteten Linie konturiert. b zeigt eine Detailaufnahme des *Stratum granulosum* in dem teilweise die desmosomalen Zell-Zell-Kontakte (D) zu erkennen sind. In der Detailaufnahme der Basallamina ist die Aufreihung der einzelnen Basalzellen des *Stratum basale* deutlich zu erkennen (c). Strichmarke: 20 µm

Zur Darstellung der Zell-Zell-Kontakte in den verschiedenen mehrschichtigen Epithelien werden in der Regel elektronenmikroskopische Techniken verwendet (Zelickson 1967; Breathnach 1971; Montagna 1974; Freinkel 2001). Zur Einführung zeigt Abb. 5.2 als Beispiel einen Querschnitt der apikalen Zellschichten der menschlichen Epidermis aus dem Kopfhaar-Ansatz. Zwischen den Zellen der letzten lebenden Zellschicht des *Stratum granulosum*, sind die Plasmamembranen mit ihren häufigen desmosomalen Strukturen (Abb. 5.2; D) zu erkennen. In den Zellen des *Stratum granulosum* sind hier auch Cytoskelett-Filamente zu erkennen. In den plattenförmigen Zellen des *Stratum corneum* (Str. c.) sind die Zellkerne dagegen bereits abgebaut. Auch die Cytoskelett-Filamente sind in der Regel nicht mehr als Filament-Strukturen aufzulösen. Jedoch sind die desmosomalen Strukturen (Abb. 5.3; D) auch zwischen diesen verhornten Zellen zu sehen.



Str. c.

Str. gr.

Abb. 5.2: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der oberen Schichten in menschlicher Epidermis des Kopfhaar-Ansatzes

TEM-Aufnahmen zeigen die letzte lebende Zellschicht des *Stratum granulosum* (Str. gr.) und die keratinisierten Zellen des *Stratum corneum*. Zwischen den beiden Zellen im Str. gr. sind desmosomale Strukturen (D) zu erkennen auch in den apikal gelegenen Zellen des *Stratum corneum* (Str. c.). Strichmarke: 1 µm

Eine besondere Methode zur Untersuchung der Ultrastruktur der Membranober- und Binnenflächen und damit von Anordnungen bestimmter Membranproteine ist die elektronenmikroskopische Präparationsmethode des Gefrierbrechens. Zum Nachweis der Schichtung und der Strukturen der einzelnen Zellschichten der Epidermis wurde menschliche Haut wie unter 4.6.2. beschrieben präpariert und in einem gekühlten (-120°C) Rasterelektronenmikroskop ausgewertet.

Abb. 5.3 zeigt einen Gefrierbruch durch die verschiedenen Zellschichten der menschlichen Epidermis aus dem Haaransatz. Unten links sind die obersten 2-3 Zell-Lagen des *Stratum spinosum* (Str. sp.) mit ihren Zellkernen (ZK) und den undulierenden Plasmamembranen (M) zu erkennen. Nach oben hin werden die Zellen des *Stratum spinosum* von den Zellen des *Stratum granulosum* (Str. gr.) bedeckt, in denen viele Granula (Gr) gefunden werden, von denen einige unter anderem die in diesen Zellen produzierten Lipide an die Oberfläche und somit in den Interzellularraum sezernieren.



## Abb. 5.3: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung verschiedener Zellschichten der menschlichen Epidermis im Gefrierbruch

Der horizontale Gefrierbruch durch die menschliche Epidermis lässt die einzelnen Zellschichten erkennen. Vom *Stratum spinosum* (Str. sp.) sind die obersten 2-3 Zellschichten zu sehen. Die Zellen dieser Schicht sind durch undulierende Plasmamembranen (M) ausgezeichnet. In den Zellen des *Stratum granulosum* (Str. gr.) sind Keratohyalin-Granula (Gr) zu erkennen. Die verhornten Zellen des etwa 20 Zellschichten umfassenden *Stratum corneum* (Str. c.) sind durch ihre extrem flache Form und starke Verzahnung (Pfeile) deutlich von den lebenden Zellen des *Stratum granulosum* zu unterscheiden. Strichmarke: 10 µm

# 5.1.2 Schichtenspezifische Synthesen und Anordnungen von Zellverbindungsproteinen in Plattenepithelien: Desmosomale Proteine in der Epidermis als Beispiel

Die Zellen der ein- und mehrschichtigen Epithelien unterscheiden sich unter anderem in ihrer unterschiedlichen Differenzierung und damit auch in der Synthese und der Anordnung von Proteinen in den einzelnen Zellschichten. Neben den Cytokeratinen, welche in der Pathologie bereits routinemäßig als zelltyp-spezifische Differenzierungs-"Marker" (Moll et al. 1982; Moll 1990) verwendet werden, sind die desmosomalen Cadherine besonders gut charakterisierte Cytoskelett-Proteine und die einzigen bisher in Plattenepithelien und den davon abgeleiteten Karzinomen gut untersuchte Proteingruppe.

So werden etwa die Desmogleine Dsg 1-4, die Desmocolline Dsc 1-3 und die Plakophiline PKP 1-3 in verschiedenen Geweben bzw. in verschiedenen Schichten eines Plattenepithels oft unterschiedlich gebildet. Als besonders klares Beispiel ist in der Abb. 5.4 das schichtenspezifische unterschiedliche Vorkommen der vier Desmogleine in der menschlichen Fußsohlen Epidermis immunhistochemisch dargestellt:

<sup>&</sup>lt;sup>\*</sup> Im Zuge dieser Arbeit sind außer TJ-Proteinen und TJ-verwandten Strukturen vielfach auch Desmosomen bzw. desmosomale Proteine untersucht worden, letztere als die besonders in mehrschichtigen Epithelien dominierenden Zell-Zell-Kopplungselemente. Die daneben auch in Plattenepithelien vorkommenden Puncta adhaerentia und ihre spezifischen Hauptkomponenten (u.a. E-Cadherin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin, Protein p120<sup>ctn</sup>) sind zwar gelegentlich dargestellt, aber nicht systematisch zum Vergleich herangezogen worden (dazu sei z.B. auf die folgenden Arbeiten verwiesen Green et al. 1987; O'Keefe et al. 1987; Kaiser et al. 1993; Haftek et al. 1996; Lewis et al. 1997; Vasioukhin et al. 2000; Perez-Moreno et al. 2003). Das erschien vor allem deshalb vorstellbar, weil für die Puncta adhaerentia bisher keine vertikalen Differenzierungsunterschiede beschrieben worden sind.



Abb. 5.4: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierungen von desmosomalen Proteinen in menschlicher Fußsohlen-Epidermis *in situ* 

Die stratifizierungstypischen desmosomalen Cadherine Dsg 3, Dsg 1 und Dsg 4 färben die Zellgrenzen der verschiedenen Zellagen spezifisch an. Dsg 2 zeigt hier nur eine Färbung der Zellgrenzen der Basalzellschicht. Antikörper gegen Dsg 3 färben die Basalzellen und die Zellen des *Stratum spinosum*. Dsg 1-Antikörper zeigen eine spezifische Reaktion in den suprabasalen Zellen des *Stratum spinosum* und der Zellen des *Stratum granulosum*. Dsg 4 färbt nur die Zellgrenzen der Zellen des *Stratum granulosum*. Die DAPI-Immunfluoreszenz (blau) stellt Zellkerne dar. Diese Abbildung wurde freundlicher Weise von Dr. L. Langbein (diese Abteilung) zur Verfügung gestellt. Strichmarke: 20 µm

Während Dsg 2 hier wie in einigen anderen Epithelien nur auf die proliferationsfähigen Zellen der Basalzellschicht - teilweise auch noch der ersten suprabasalen Schicht – beschränkt ist, kommt Dsg 1 nur in suprabasalen Schichten – oft mit zunehmender Intensität -, Dsg 3 in fast allen Schichten vor, wobei in einigen Hautarealen Dsg 3 nicht in der Basalzellschicht zu finden ist, und Dsg 4 nur im Bereich des *Stratum granulosum* (an manchen Stellen auch noch in der obersten *Stratum spinosum* –Schicht) vorkommt. Ähnliche Schichten-spezifische Anordnungen sind außer für Dsg 1-4 auch für Dsc 1-3 und PKP 1-3

beschrieben worden (Koch et al. 1992; Buxton et al. 1993; Heid et al. 1994; Schafer et al. 1994; King et al. 1995; Nuber et al. 1995; Mertens et al. 1996; Nuber et al. 1996; Schafer et al. 1996; Moll et al. 1997; Hanakawa et al. 2004; Bazzi et al. 2006). Unterschiede in der Proteinsynthese von Zell-Zell-Kontakt-Proteinen zwischen ein- und mehrschichtigen Epithelien (normal und pathologisch) sind auch für die Cadherine der Schleimhaut des Gebärmutterhalses gezeigt worden (de Boer et al. 1999).

## 5.1.3 Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Tight Junction-Proteine in Säugetier-Plattenepithelien

Immunhistochemische Untersuchungen von einigen TJ-Proteinen an Kryostatschnitten menschlicher Epidermis haben gezeigten, dass Occludin, Claudin-1 und Protein ZO-1 an den Grenzen der Zellen des *Stratum granulosum* ko-lokalisieren (Brandner 2000; Brandner et al. 2001; Yoshida et al. 2001; Brandner et al. 2002; Langbein et al. 2002). Zur Analyse der Verteilung dieser und weiterer TJ- und Cytoskelett-Proteine in der menschlichen Epidermis, wurden Kryostatschnitte (siehe 4.4.1.1) angefertigt und Immunmarkierungen, wie unter 4.4.2.1 beschrieben, durchgeführt.

Antikörper gegen das TJ-Transmembranprotein Occludin zeigten in den Immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen spezifische Immunmarkierungen der Zellgrenzen der obersten lebenden Zellschichten des Stratum granulosum direkt unterhalb der verhornten, abgestorbenen Zellen des Stratum corneum (Abb. 5.5). Antikörper gegen das TJ-Plaque-Protein ZO-1 wiesen eine nahezu identische Färbung wie Occludin auf. Diese Zellgrenzen reagieren auch mit Antikörpern gegen das TJ-Transmembranprotein Claudin-1 (Abb. 5.5c). Mit Claudin-1 waren jedoch nicht nur die Zellgrenzen der beiden obersten Zellschichten positiv, sondern auch Zellgrenzen vieler Zellschichten des Stratum spinosum der menschlichen Epidermis (Abb. 5.5), wobei die Anzahl und Lage etwas unterschiedlich in verschiedenen Stellen der Haut erschien. Um die so gefärbten Zellgrenzen den einzelnen Schichten zuordnen zu können wurden in Abb. 5.5 auch die korrespondierenden DIC-(Differenzieller Interferenzkontrast) mikroskopischen Bilder (a', b', c') gezeigt. Aus den immunfluoreszenzmikroskopischen Lokalisierungen verschiedenen TJder Transmembranproteine in den Plasmamembranen der Epidermis konnte geschlossen werden, dass zum einen in den apikalen lebenden Zellen der Epidermis generell typische TJ-Proteine nachweisbar waren, zum anderen aber auch Claudin-1 als ein typisches TJ-Protein in den Zellgrenzen weiterer lebenden Zellschichten der menschlichen Epidermis nachgewiesen werden konnte. Diese Lokalisierungen der TJ-Proteine sind an verschiedenen anderen Plattenepithelien und mit verschiedenen elektronenmikroskopischen Methoden geprüft und erweitert worden.



Abb. 5.5: CLSM ("Confocal Laser Scanning Microscopy") Analyse der Lokalisierung von Tight Junction-Proteinen in menschlicher Epidermis *in situ* 

Die Immunfluoreszenzen mit den Antikörpern gegen die TJ-Proteine Occludin, Claudin-1 und Protein ZO-1 weisen in der menschlichen Epidermis eine unterschiedliche Lokalisierung der Proteine entlang der Plasmamembranen der Zellen auf. Während hier die Färbung mit Occludin und Protein ZO-1 auf die beiden obersten lebenden Zell-Lagen des *Stratum granulosum* beschränkt war, reagieren die Antikörper gegen Claudin-1 an Zellgrenzen vieler *Stratum spinosum*-Schichten. a', b', c' zeigen die DIC (Differentielle Interferenzkontrast)-Bilder der entsprechenden Immunfluoreszenzen. Die Grenze zur Dermis, die Basallamina ist durch gestrichelte, weiße Linien dargestellt. Strichmarke: 20 µm

Die Untersuchung weiterer Plattenepithelien wie z.B. der Schnauze ("Muffel"), der Gingiva und der Zunge des Rindes, sollte zeigen, ob TJ-Strukturen auch in anderen mehrschichtigen epithelialen Geweben anderer Spezies (Maus, Ratte und Rind) nachgewiesen werden können.

Am Beispiel der Rinder-Gingiva soll hier die Lokalisierung der verschiedenen TJ-Proteine eingehend dargestellt werden. Claudin-1 ließ sich, wie auch in der menschlichen Epidermis, an den Zellgrenzen vieler *Stratum spinosum*-Zellschichten nachweisen (Abb. 5.6). Dagegen lieferte das Protein Occludin (Abb. 5.6) in den mehrschichtigen Epithelien (Zunge, Schnauze, Gingiva und Vagina) des Rindes nicht nur in den Zellgrenzen der letzten obersten lebenden Zellschichten ein Signal, wie das in der Epidermis der Fall war. Antikörper gegen dieses Protein reagierten zwar nach wie vor in den adluminalen Zellschichten, aber eben auch mit etwa 5-10 Schichten des *Stratum spinosum*, also wesentlich breiter als in der Epidermis. Auch die Reaktionen mit Cingulin (Abb. 5.6) und Claudin-4 (Abb. 5.6) waren bei diesen Rindergeweben über wesentlich mehr suprabasale Zellschichten hin zu erkennen. Weiterhin Ko-Lokalisieren Cingulin, Claudin-1 und Claudin-4 mit Occludin.



Abb. 5.6: Ko-Lokalisierung von Tight Junction-Proteinen im Plattenepithel der Rindergingiva Bei der Immunfluoreszenzmikroskopie der verschiedenen mehrschichtigen Epithelien fiel vor allem auf, dass Occludin, Claudin-4 und Cingulin nicht nur wie zuvor für die menschliche Epidermis beschrieben, auf die Zellgrenzen der obersten, d.h. hier adluminalen Zellschichten beschränkt war, sondern auch Grenzen der weiter basal liegenden Zellen markiert. Claudin-1 färbte wie in der menschlichen Epidermis die Grenzen vieler weiterer Zellschichten, d.h. der *Stratum spinosum*-Äquivalente. Die Basallamina ist jeweils durch die gestrichelten weißen Linien dargestellt. Strichmarke: 50 µm

In weiteren Doppel-immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen fiel auf, dass sowohl in der Mäuse-Epidermis bzw. der Mäuse-Zunge (nicht gezeigt) als auch in der Rinder-Gingiva (Abb. 5.6), der Rinder-Zunge (nicht gezeigt) der Rinder-Schnauze und der Rinder-Vagina (nicht gezeigt) TJ-Proteine wie Occludin, Protein ZO-1, Cingulin, Claudin-1 und Claudin-4 an den Zellgrenzen lokalisiert sind. Daraus kann man schließen, dass TJ-Proteine in mehrschichtigen Epithelien generell nicht nur auf eine schmale adluminale Zone beschränkt sind, sondern auch in subapikalen Zellschichten vorkommen.

Um zu überprüfen, ob die Verteilung der TJ-Proteine in den Zellgrenzen des *Stratum granulosum* einer Beteiligung an der *Zonula occludens* bzw. der Barriere-Funktion entspricht, in dem diese einen gemeinsamen geschlossenen Ring um die Zellen herum bilden, wurden verschiedene Plattenepithelien mit spezifischen TJ-Antikörpern untersucht. In nahezu horizontalen Schnitten im Bereich des *Stratum granulosum* menschlicher Epidermis erkennt man, dass die TJ vollständig die Zellen benachbarter Keratinocyten einschließen, wobei das TJ-Membranprotein Occludin (Abb. 5.7a) mit dem cytoplasmatischen Plaque-Protein ZO-1 (Abb. 5.7b) weitgehend Ko-Lokalisiert (Abb. 5.7c). Deutlich zu erkennen ist die ringförmige Färbung der Zellgrenzen nahezu aller Zellen des *Stratum granulosum*. Neben Protein ZO-1 wurden Claudin-1, Claudin-4, Claudin-7 und Cingulin auf eine Ko-Lokalisierung mit Occludin in dieser Zellschicht in der Epidermis wie in verschiedenen Plattenepithelien untersucht. Alle diese TJ-Proteine lieferten ein vergleichbares Ergebnis und erlauben damit den Schluss, dass ein kompletter Satz von TJ-Proteinen vorhanden ist.



#### Abb. 5.7: Lokalisierung von Tight Junction-Proteinen in Flachschnitten menschlicher Epidermis *in situ* (CLSM-Aufnahmen)

Die Immunfluoreszenz zweier TJ-Proteine ist in den meisten Fällen allseits an den Zellgrenzen der Keratinozyten sichtbar. Die Färbungen in nahezu horizontalen Schnitten durch das *Stratum granulosum* der menschlichen Epidermis zeigen eine Ko-Lokalisierung (gelb in c) des Transmembranproteins Occludin (rot in a) und des cytoplasmatischen Plaque-Proteins ZO-1 (grün in b) in den *Zonula occludens*artigen Zell-Zell-Kontakten dieser Zellschicht. Strichmarke: 50 µm

# 5.1.4 Elektronenmikroskopische Untersuchungen von TJ bzw. anderen TJ-Protein-haltigen Strukturen in verschiedenen Plattenepithelien

Die Fluoreszenzdarstellung in immunhistochemisch behandelten Schnitten hat eindeutig eine Lokalisierung der TJ-Proteine in den Plasmamembranen vor allem der Zellen des *Stratum granulosum*, aber auch anderer Schichten der menschlichen Epidermis wie einiger anderer Plattenepithelien ergeben. Daher sollte diese Zone zunächst elektronenmikroskopisch auf typische TJ-Strukturen näher untersucht werden.

## 5.1.4.1 Darstellung von klassischen Tight Junction-Strukturen in der fötalen, menschlichen Epidermis

Um TJ-Strukturen in der menschlichen Epidermis optimal nachzuweisen, wurde zunächst fötale Fußsohlenepidermis untersucht, da diese fötale Epidermis noch nicht so kompakt wie - und noch weicher ist als - die Epidermis erwachsener Menschen und außerdem durch tiefe Verzahnungen ("Rete Ridges") in der Dermis verankert ist. Außerdem fehlen im Vergleich zur Epidermis von erwachsenen Menschen einige Zellschichten des Stratum corneum. Aufgrund dieser Eigenschaften ist hier oft eine besonders gute Fixierung und Gewebeerhaltung erreichbar. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten foetaler Fußsohlenepidermis (4.6.1.1) zeigten typische TJ-Strukturen als "Kissing Points" (Abb. 5.8a; Pfeile). Die TJ-Strukturen sind in den Plasmamembranen benachbarter Zellen der letzten lebenden Zellschicht des Stratum granulosum direkt unterhalb des Stratum corneum zu finden. Zwischen den einzelnen "Kissing Points" waren desmosomale Strukturen (D) mit ihren im cytoplasmatischen Plaque inserierenden Intermediärfilament-Bündeln zu erkennen. Um nachzuweisen, dass es sich bei den beschriebenen Strukturen tatsächlich **TJ-Strukturen** um handelt, wurden Immunmarkierungen (4.6.1.3) mit Antikörpern gegen das TJ-Markerprotein Occludin durchgeführt, die eine Akkumulation von Immunogoldkörnern an den Plasmamembranen des Stratum granulosum unterhalb der verhornten Keratinozyten des Stratum corneum als interdesmosomale Strukturen erkennen ließen (Abb. 5.8b; Pfeile), ähnlich wie bereits für andere Hauttypen beschrieben (Morita et al. 1998; Brandner 2000; Brandner et al. 2001; Pummi et al. 2001; Brandner et al. 2002; Langbein et al. 2002; Schluter et al. 2004).



Abb. 5.8: Ultrastrukturelle Untersuchungen von Tight Junction-Strukturen in fötaler menschlicher Fußsohlenepidermis

Die elektronenmikroskopische Aufnahme fötaler menschlicher Epidermis zeigt die klassischen Tight Junction-Strukturen der "Kissing Points" (a, Pfeile) zwischen den Plasmamembranen aneinandergrenzender Zellen im *Stratum granulosum*. Des Weiteren sind desmosomale Strukturen (D) vor allem auch durch ihren elektronendichten Plaque mit inserierenden Intermediärfilament-Bündeln zwischen den einzelnen "Kissing Points" zu erkennen.

Immunogold-markierte interdesmosomale Strukturen finden sich in den Plasmamembranen der Zellen der letzten lebenden Zellschicht im *Stratum granulosum* direkt unterhalb der verhornten Keratinozyten des *Stratum corneum* (a, b). Zur Darstellung vgl. Brandner et al. 2002, vgl. ferner Langbein et al. 2002 und Schlüter et al. 2002. Strichmarke: a 0,2 µm; b 0,5 µm

Um sicher zu sein, dass die Bildung solcher typischer TJ-Strukturen nicht nur ein Phänomen der fötalen Epidermis ist, wurde eine Epidermis-Probe aus dem Haaransatz eines erwachsenen Menschen entnommen, mit Hilfe eines Hochdruckgefrierers (Baltec, Liechtenstein) eingefroren und in einer Gefriersubstitution das Wasser der Probe schrittweise gegen Aceton und anschließend gegen Epon ausgetauscht.



Abb. 5.9: Ultrastrukturelle Untersuchung von Tight Junctions in erwachsener menschlicher Epidermis des Haaransatzes

Die elektronenmikroskopische Aufnahme der erwachsenen menschlichen Epidermis zeigt die klassische Tight Junction-Struktur eines "Kissing Points" (Pfeile) zwischen den Plasmamembranen aneinandergrenzender Zellen im *Stratum granulosum*. Zudem ist eine desmosomale Struktur (D) als elektronendichter Plaque unterhalb der Plasmamembran zu erkennen. Strichmarke: 100 nm

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten dieser Epidermis bestätigten das in der fötalen menschlichen Epidermis erhaltene Ergebnis (Abb. 5.8). In der Plasmamembran von zwei nebeneinander liegenden Zellen des *Stratum granulosum* war die ursprüngliche, als typische TJ-Struktur beschriebene Struktur des "Kissing Points" (Abb. 5.9; Pfeile) in unmittelbarer Nachbarschaft zu desmosomalen Strukturen (D) nachzuweisen.

# 5.1.5 Ultrastrukturelle Untersuchungen von Zell-Zell-Kontakten in der Epidermis mit Hilfe der Gefrierbruch-Technik

Um die ausgedehnten TJ-Strukturen der menschlichen Epidermis genauer - und vor allem in ihrer flächigen Anordnung untersuchen zu können, wurde die Epidermis in Gefrierbruch-Präparationen (4.6.2) vorbereitet und die mit Metall bedampften Bruchpräparate in einem vorgekühlten Raster-Elektronenmikroskop (Leo Gemini "Scanning Electron Microscope"; Kryo-SEM) durchmustert. Der Vorteil des gekühlten (-120°C) Raster-Elektronenmikroskopes ist, dass die Replika vor dem Mikroskopieren nicht von biologischem Material gereinigt werden muss, da die Bilder vornehmlich durch reflektierte Elektronen entstehen. Indem man die Reinigungsschritte zur Entfernung des biologischen Materials umgeht, bei der die Replika leicht fragmentiert, erhält man im gekühlten Rasterelektronenmikroskop wesentlich größere Bereiche, die untersucht werden können.

Bei der Gefrierbruchtechnik handelt es sich um die Technik der Wahl, wenn die Ausdehnung und die intramembranöse Ultrastruktur von TJ in Epithelien untersucht werden sollen. Dazu wurde die menschliche Epidermis aus der Region des Haaransatzes nach Karnovsky (Karnovsky und Deane 1955) fixiert, mit Glyzerin als Kryoschutz behandelt, in flüssiges Ethan eingeschossen und darin eingefroren. Nach dem Gefrierbruch in einer Gefrierätzanlage wurde durch einen Gefrierätz-Schritt dem Gewebe Eis entzogen, um auf der Bruchfläche selbst kleinste Strukturen freizulegen. Nach der Bedampfung mit 5 nm Pt/C und dem Transfer in das Leo Gemini Kryo-SEM ("Scanning Electron Microscope") wurden die Gefrierbruch-Präparate ausgewertet. Dabei waren neben TJ-Strukturen (Elias und Friend 1975; Morita et al. 1998) in den Plasmamembranhälften der Zellen der letzten lebenden Schicht (Stratum granulosum) auch zwischen den Desmosomen (D) großflächig weitere eigenartige interdesmosomale Strukturen (Abb. 5.10, Sternchen) praktisch auf der gesamten Plasmamembran der Zellen im Stratum granulosum zu erkennen. Es zeigte sich ein ausgeprägtes, größtenteils, - aber eben nicht immer und überall - kontinuierliches Netzwerk von neuartigen TJ-artigen Strukturen, die als Stränge und Netzwerkbildungen zwischen den Desmosomen, die in ihrer Größe, Form und Entfernung untereinander variierten, oft miteinander verbunden zu sein schienen. Dabei fiel auf, dass die strangartigen TJ-artigen Strukturen nicht nur ein sehr ausgedehntes, sondern auch ein sehr komplexes, Netzwerk in der Plasmamembran der obersten lebenden Zellschicht des Stratum granulosum in Verbindung mit der ersten "differentiell abgestorbenen" Membran des Stratum corneum bildeten, hin und wieder auch von einzelnen kleinen Ring- oder Strang- oder Perlenketten-Teil-Strukturen in interdesmosomalen Arealen unterbrochen. Dieses ausgedehnte interdesmosomale Netzwerk lässt vermuten, dass diese Struktur durch vielzählige, reliefartig in der Membran verankerte Transmembranproteine gebildet wird. Diese Beobachtungen stimmen grundsätzlich mit denen von Caputo und Peluchetti (1977) sowie von Elias et al. (1977) überein. Die häufigen und engen Verbindungen dieser strangartigen Strukturen mit desmosomalen Strukturen könnte eine molekulare Verwandtschaft zu - oder eine Bildung an - den Desmosomen dieser Schicht andeuten. Bevor allerdings Hypothesen zur biologischen Funktion und zu den beteiligten Bildungsmechanismen dieser Strukturen aufgestellt werden können muss zunächst die molekulare Analyse dieser strangartigen Strukturen durchgeführt werden.



Abb. 5.10: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung des strangartigen interdesmosomalen Netzwerkes in den Plasmamembranen der Zellen des *Stratum granulosum* im Gefrierbuch des Haaransatzes der menschlichen Epidermis *in situ* 

Dieses Bild eines intramembranösen Gefrierbruchs zeigt vielzählige Desmosomen (D) mit ihrer Variabilität in Größe und Form und ein ausgedehntes strangartiges Desmosomen verbindendes System (Sternchen). Strichmarke: 0,5 µm

Die flächenhafte Ausdehnung dieser interdesmosomalen strangartigen Strukturen war jedoch nicht in allen Zellen des *Stratum granulosum* so ausgeprägt, dass die gesamte Plasmamembran damit bedeckt war. Es wurden auch immer wieder Bereiche mit wenigen, bzw. relativ kleinen Strangelementen festgestellt, wie z.B. in Abb. 5.11 zu sehen ist.



Abb. 5.11: Rasterelektronenmikroskopisches Bild einer Gefrierbruch-Präparation menschlicher Epidermis aus der Region des *Stratum granulosum* 

Die z.T. weit voneinander entfernten desmosomalen Strukturen (D) variieren in Größe und Form. Erwähnenswert sind die Ring- oder Lasso-förmigen, strangartigen Strukturen die oft von den Desmosomen ausgehen und diese teilweise verbinden, oder isolierte kreisförmige bzw. lineare Strukturen im interdesmosomalen Raum bilden. Strichmarke: 0,5 µm

# 5.1.6 Ultrastrukturelle Untersuchungen in TJ-Protein-haltigen subapikalen Zellschichten verschiedener Plattenepithelien: Definition des *Punctum occludens*

Um in den subapikalen Zellschichten der Plattenepithelien Strukturen zu identifizieren, die mit den Lokalisierungen der TJ-Proteine in der Immunfluoreszenzmikroskopie korrelieren, wurden die entsprechenden Gewebestücke für die Ultradünnschnitt-Elektronenmikroskopie präpariert und in Epon eingebettet. Zusätzlich wurden Kryostatschnitte angefertigt, die mit spezifischen Antikörpern gegen Occludin bzw. andere TJ-Proteine zusammengebracht wurden, mit durch Immunogold-markierte Zweitantikörper und Silberverstärkung behandelt, dann fixiert, entwässert und in Epon eingebettet wurden. Die Auswertung der Ultradünnschnitte (als Beispiel ist ein Rinderzungenpräparat Abb. 5.12 vorgestellt) ließ in den subapikalen Zellschichten zahlreiche desmosomale Strukturen (Abb. 5.12; b; D) erkennen, zwischen denen andere TJ-artige Zell-Zell-Kontaktstrukturen zu erkennen waren (Abb. 5.12; b; Klammern und Pfeile). Der Nachweis von Immunogold-markierten Occludin-Antikörpern an derartigen Strukturen (Abb. 5.12; a, c) bestätigte, dass an diesen interdesmosomalen Strukturen das TJ-Transmembranprotein Occludin beteiligt ist. Dabei fiel bei genauerer Betrachtung dieser Strukturen die unterschiedliche Verbreitung und Ausdehnung der Occludin-Markierung in den verschiedenen mehrschichtigen Epithelien ins Auge. Einige dieser interdesmosomalen Junction-Strukturen schienen den von Langbein et al. (2002) beschriebenen "Lamellated Junctions" zu entsprechen. Neben den "Lamellated Junctions" (siehe Abb. 5.12 b, Klammern) war jedoch auch eine weitere Occludin-haltige Struktur erkennbar, in denen Plasmamembranen von gegenüberliegenden Zellen sich nur punktförmig einander genähert hatten und sich so in einzelnen oder kleinen Gruppen von "Kissing Point"-Strukturen berührten (Abb. 5.12; Pfeile), wobei dort im Interzellularspalt manchmal eine Art elektronendichter Punkt zu erkennen war (Abb. 5.12; Pfeile).

Diese beiden Zell-Verbindungsstrukturen, die größeren "Lamellated Junctions" und die in dieser Arbeit als *Puncta occludentia* ("Stud Junctions") bezeichneten kleineren punkt- oder zapfenartigen, Occludin-positiven Zell-Zell-Kontaktstellen konnten in allen untersuchten Plattenepithelien erkannt werden (einige Beispiele sind in Abb. 5.13 vorgestellt), wo sie im größten Teil in den Schichten des jeweiligen *Stratum spinosum*-Äquivalents auch mit immunelektronenmikroskopischen Methoden nachweisbar waren. Ähnliche, doch noch präliminäre Beobachtungen wurden auch für Claudin-1 und Claudin-4 gemacht (nicht gezeigt).

Die Häufigkeit dieser als "Stud Junctions" bezeichneten kleinen Membran-Membran-Kontakt-Strukturen, die offenbar in den interdesmosomalen Abschnitten recht regelmäßig in den untersuchten Plattenepithelien vorkommen, hat natürlich sofort die Frage nach entsprechenden Erscheinungen in den Gefrierbruch-Präparationen aufgeworfen. Aus dem ebenso regelmäßigen vorkommen von knopf- oder zapfenartigen, kleinen (Durchmesser max. 12 nm) Erhebungen im interdesmosomalen Bereich (Abb. 5.14 stellt ein Beispiel in der Mäuseepidermis vor), muss man die Hypothese ableiten, dass es sich bei – zumindest einem Teil von – diesen intramembranösen kleinen Erhebungen um solche *Puncta occludentia* handelt.



Abb. 5.12: Immuno-Elektronenmikroskopische Identifizierung Occludin-haltiger interdesmosomaler Strukturen in subapikalen Zellschichten der Rinderzunge

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen subapikaler Zellschichten der Rinderzunge (a-c) demonstrieren zahlreiche desmosomale Strukturen (D), zwischen denen verschieden große Zell-Zell-Kontaktstrukturen (b, Pfeile und Klammern) zu erkennen sind. Die Immunmarkierung mit spezifischen Antikörpern gegen Occludin (a und c) belegt, dass diese interdesmosomalen Strukturen Occludinhaltig sind. Bei den mit den Klammern bezeichneten Strukturen handelt es sich um die von Langbein et al. (2002) beschriebenen TJ-verwandten "Lamellated Junctions", während die mit Pfeilen vorgestellten Strukturen neue, relativ kleine, bisher noch nicht beschriebene und von uns als "Stud Junctions" bezeichnete Strukturen darstellen. Strichmarke: a, c 0,5 µm, b 0,2 µm

In allen untersuchten Plattenepithelien war die neuartige interdesmosomale Struktur (D) der "Stud Junctions" (Abb. 5.13; a-c, Pfeilspitzen) in den subapikalen Zellschichten nachweisbar.



Abb. 5.13: Elektronenmikroskopische Darstellung Occludin-haltiger interdesmosomaler Strukturen des neuen Typs der "Stud Junctions" in den subapikalen Zellschichten der Plattenepithelien der Rinderschnauze, der Rinderzunge und der Rindergingiva Elektronenmikroskopische Aufnahmen der subapikalen Zellschichten der Rinderschnauze (a-a'), der Rinderzunge (b-b') und der Rindergingiva (c-c') zeigen die neuartige interdesmosomale Occludinhaltige Struktur der sog. "Stud Junctions" (a-c, Pfeilspitzen). In Aufnahmen Occludin-Immunogoldmarkierter Schnitte ist diese Struktur stets in allen Geweben mit Immunogoldpartikeln markiert (a'-c'). Strichmarke: a-c 0,2 µm, a'-c' 0,1 µm



Abb. 5.14: Elektronenmikroskopische Aufnahme von intramembranösen interdesmosomalen Strukturen im Gefrierbruch

Zwischen den Desmosomen (D) und hier der Gap Junction (GJ) finden sich im Gefrierbruch der Zellschichten - des *Stratum spinosum* der Mäuse-Epidermis - in lockerer und unterschiedlich dichter Verteilung einzelne Erhebungen (in dieser Darstellung 4-12 nm breit), in diesen Regionen die der Lokalisierung von Occludin bzw. Claudin-1 in der Immunelektronenmikroskopie (vgl. Abb. 5.14; a'-c') topologisch entsprechen. Deshalb werden diese *Puncta* als Korrelate der Occludin- bzw. Claudin-1-Lokalisierung angesehen. Vergrößerung: 40.000:1

Diese kleinen, Membran-Membran-Kontaktstellen können natürlich keine Barriere-Funktion erfüllen, da sie nur örtlich begrenzt vorkommen. Ihre funktionelle Bedeutung bleibt daher vorerst ungeklärt.

# 5.1.7 Biochemischer Nachweis von Tight Junction-Proteinen in mehrschichtigen Plattenepithelien

Zur Charakterisierung der TJ-Proteine in mehrschichtigen Epithelien, wurden Proteinextrakte der jeweiligen Gewebe wie unter 4.3.1.2 beschrieben hergestellt und mittels SDS-PAGE "Western Blot"-Analyse (4.3.5) charakterisiert. In Abb. 5.15 ist exemplarisch der biochemische Nachweis (siehe 4.3.5.3) der TJ-Transmembranproteine Claudin-1 und Occludin in verschiedenen mehrschichtigen Epithelien dargestellt.

Die mit SDS-haltigem Puffer erhaltenen Lysate der verschiedenen Gewebe (menschliche Epidermis, Rindergingiva, Rinderzunge und Rinderschnauze) wurden durch SDS-PAGE (4.3.3) aufgetrennt und auf PVDF-Membranen übertragen ("Blot"-Verfahren; siehe 4.3.5.1). Zur Überprüfung des Transfers wurden die Membranen mit Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt (Abb. 5.15a).

Der Nachweis der TJ-Proteine Occludin (Abb. 5.15 b) bzw. Claudin-1 (Abb. 5.15 c) erfolgte mit Hilfe von spezifischen Antikörpern und anschließender Chemilumineszenz. Dabei zeigten sich spezifische Polypeptid-Banden mit einem apparenten Molekulargewicht (MG) von etwa 60 kDa für Occludin (b<sup>\*</sup>) und etwa 22 kDa für Claudin-1 (c). Im Lysat der als Negativkontrolle mitgeführten SV80 Fibroblastoid-Zellkulturen war für beide Genprodukte keine Chemilumineszenz-Reaktion sichtbar. In der nachstehenden Tabelle (Tab. 5.1) sind die Ergebnisse der biochemischen Analysen diverser TJ-Proteine (Occludin, Cingulin, Protein ZO-1, Claudin-1, Claudin-4, Claudin-7) in mehrschichtigen Epithelien von Mensch und Rind zusammengefasst.



## Abb. 5.15: Biochemischer Nachweis verschiedener Tight Junction-Proteine in mehrschichtigen Epithelien

"Biolabs" Marker-Proteine (3) und Gesamtproteinlysate von SV80 Fibroblastoid-Zellkulturen (1), menschlicher Epidermis (2), Rinder-Gingiva (4), -Schnauze (5) und –Zunge (6) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt (a) bzw. mit dem "Western-Blot"-Verfahren analysiert (b-c). Die Coomassie-Brilliant-Blau gefärbte PVDF-Membran (a) zeigt den gelungenen Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf die PVDF-Membran. Claudin-1 (~22 kDa) und Occludin (~60 kDa) erschien als spezifische Banden bei allen mehrschichtigen Epithelien, jedoch nicht in der Negativkontrolle.

<sup>\*</sup> Es sind bisher zwei Spleißformen von Occludin bekannt, was aber hier nicht weiter berücksichtigt wird, da beide oft auch in den selben Zellen vorkommen Coyne, C. B., M. K. Vanhook, et al. (2002). "Regulation of airway tight junctions by proinflammatory cytokines." <u>Mol Biol Cell</u> **13**(9): 3218-34.

	Occludin	Cingulin	ZO-1	Claudin-1	Claudin-4	Claudin-7
Menschliche Epidermis	+	+	+	+	+	+
Rinder-Zunge	+	+	+	+	+	+
Rinder-Schnauze	+	+	+	+	+	+
Rinder-Gingiva	+	+	+	+	+	+

Tab. 5.1: Zusammenfassung der biochemischen Analysen der Tight Junction-Proteine in einigen mehrschichtigen Epithelien

Die TJ-Transmembranproteine Occludin und die geprüften Mitglieder der Claudin-Familie, d.h. Claudin-1, Claudin-4 und Claudin-7, wurden in allen untersuchten mehrschichtigen Epithelien nachgewiesen. Ebenso wurden die TJ-Plaque-Proteine Cingulin und Protein ZO-1 in diesen Epithelien gefunden.

# 5.1.8 Darstellung der Barriere-Funktion von Tight Junction-Strukturen in Plattenepithelien mit Hilfe eines elektronendichten "*Tracers"* (LaCl<sub>3</sub>) am Beispiel der Mäuse-Epidermis

Nach dem biochemischen und dem licht- wie elektronenmikroskopischen Nachweis der TJ-Proteine und Strukturen in Plattenepithelien stellte sich nun die Frage, inwieweit diese zur Barriere-Funktion dieser Gewebe beitragen. Eine elektronenmikroskopische Methode, die diese Funktion in epithelialen Zellverbänden darstellen, ist der Einsatz von elektronenoptisch dichten Testsubstanzen (*"Tracer"*) wie Lanthanchlorid-Ionen (LaCl<sub>3</sub>), die in Lösung frei durch den Interzellularraum diffundieren können. Die Präzipitation von LaCl<sub>3</sub> führt dann dazu, dass es als elektronendichter Niederschlag im Interzellularraum direkt im Elektronenmikroskop ortsgetreu nachgewiesen werden kann (vgl. 4.7.3). Mit Hilfe dieses *Tracers* lässt sich so im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) eine Struktur, die für eine Barriere-Funktion verantwortlich ist darstellen. In dieser Arbeit wurden derartige Versuche an einigen Plattenepithelien durchgeführt, insbesondere der Epidermis. Aus der Literatur ist bekannt (Elias und Friend 1975; Squier und Rooney 1976; Landmann 1985; 1986), dass diese Methode am besten so angewendet wurde, dass die lanthanhaltige Lösung subkutan injiziert wird und erst im Anschluss an eine bestimmte Inkubationszeit die Tiere getötet werden, um die Haut elektronenmikroskopisch zu untersuchen (vgl. 4.7.3).

Die subkutan injizierte Lanthanverbindung war dann nach der Präzipitation zwischen den Epidermiszellen der Maus als schwarzer, elektronendichter Niederschlag zwischen den Plasmamembranen der Zellen zu erkennen (Abb. 5.16; Pfeile). Desmosomale Strukturen (Abb. 5.16; D) dagegen stellten für die Diffusion keine Barriere dar, so dass die LaCl<sub>3</sub>-Lösung sich vom basalen Bereich bis in die Interzellularspalten der suprabasalen Zellen ausbreiten konnte (Abb. 5.16 a-b).





Die LaCl<sub>3</sub>-Lösung ist spezifisch in den Interzellularspalten der Epidermis als elektronendichtes Präzipitat zu erkennen. Der interzellulare Spalt der Desmosomen (D) stellt keine Barriere für die Diffusion des LaCl<sub>3</sub> dar (a-b), TJ-Strukturen (weiße Klammer in b) jedoch schon. Aus diesem Grund findet sich bei dieser Versuchsanordnung im *Stratum corneum* kein LaCl<sub>3</sub>. Vergrößerung: 24000:1

Im Interzellularspalt unterhalb der letzten lebenden Zellschicht war eine Akkumulation des schwarzen Lanthansalz-Niederschlags sehr gut sichtbar. Erst im subapikalen Bereich der lateralen Plasmamembranen des *Stratum granulosum* befand sich eine Struktur, die eine freie Diffusion der LaCl<sub>3</sub>-Ionen verhinderte. Dabei handelte es sich um die TJ-Struktur (Abb. 5.16; weiße Klammer). Ähnliche Ergebnisse wurden in anderen Plattenepithelien erhalten (nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass entgegen der bis vor kurzem dominierenden Lehrbuchmeinung Strukturen im apikalen Bereich der Epidermis wie anderer Plattenepithelien existieren, die eine TJ-artige Struktur und typische TJ-Proteine aufweisen und als Art Zonula occludens die parazelluläre Ausbreitung von Molekülen und Partikeln begrenzen können. Außerdem ist bewiesen worden, dass TJ-Protein-haltige interdesmosomale Zell-Zell-Kontakt-Strukturen auch in Plasmamembranen weiterer subapikaler Zellschichten als Bausteine anderer Zellverbindungen vorkommen. Neben den sog. "Lamellated Junctions" konnte in dieser Arbeit eine neuartige häufige Struktur, die von uns als Punctum occludens bezeichnet wurde, identifiziert werden. Diese Strukturen können keine Barriere-Funktion ausüben, da sie nur örtlich begrenzt vorkommen.

## 5.2 Bildung, Anordnung und mögliche Funktionen von Tight Junctions und Tight Junction-Proteinen in Kulturen polarer epithelialer Zellen

# 5.2.1 Charakterisierung von Tight Junctions in Zellkulturen, die von Zellen des Darmepithels abgeleitet sind

## 5.2.1.1 Genexpressionsanalyse von Tight Junction-Proteinen in polaren Epithelzellen

Eines der Ziele dieser Arbeit war es, mögliche Unterschiede in der Protein-Zusammensetzung von TJ ein- und mehrschichtiger Epithelien aufzuklären. Dazu mussten zunächst die TJ-Komponenten "klassischer" polarer Epithelien charakterisiert werden.

Für den Nachweis der verschiedenen mRNAs der einzelnen Claudine vor allem solcher für die keine spezifischen Antikörper zur Verfügung standen, wurde aus den proliferierenden Zellen der einzelnen Linien die RNA isoliert (siehe 4.2.1) und anschließend aus der Gesamt-RNA mit Hilfe der "Reversen Transkription" (siehe 4.2.2) die cDNA hergestellt. Die cDNAs dienten als Vorlage für die Amplifikation der Claudine mittels PCR (siehe 4.2.3).



Abb. 5.17: Analyse von Claudin-8, -9, -11, -12 und -15 in CaCo-2-Zellen eines Darmepithel abgeleiteten Adenokarzinoms der Linie CaCo-2

Die cDNAs der Claudine wurden mittels PCR amplifiziert und in einem Agarose-Gel elektrophoretisch nach der Anzahl ihrer Basenpaare aufgetrennt. Die jeweilige Größe der Fragmente ließ sich anhand des Markers (Spur 1) ablesen. Die PCR-Produkte der CaCo-2-Zellen wurden jeweils in den Spuren 2 aufgetragen, die der als Positiv-Kontrolle dienenden menschlichen Keratinozyten der Linie HaCaT-Zellen in den Spuren 3. Die PCR für Claudin-8 (Cl-8) ergab ein 687 bp großes Fragment bei der Kontrollzell-Linie HaCaT (Spur 3), CaCo-2-Gene (Spur 2) exprimierten dagegen kein Cl-8. Ferner exprimierten CaCo-2-Zellen weder Claudin-9 (452 bp) noch Claudin-11 (340 bp). Die cDNAs von Claudin-12 (460 bp) und Claudin-15 (199 bp) lieferten entsprechende Fragmente bei den CaCo-2- und den HaCaT-Zellen

Anhand der Ergebnisse der RT-PCR-Reaktionen konnte die unterschiedliche Synthese verschiedener Claudine in den CaCo-2-Zellen und in den als Positiv-Kontrolle dienenden HaCaT-Zellen nachgewiesen werden. Eine Synthese von Claudin-8, -9 und -11 konnte nur in HaCaT-Zellen (Abb. 5.17; 3) nachgewiesen werden. Für Claudin-12 und -15 hingegen
wurden RT-PCR-Produkte aus den mRNAs sowohl der CaCo-2- als auch der HaCaT-Zellen erhalten.

In Tab. 5.2 ist zusammenfassend die mit Hilfe der RT-PCR nachgewiesene Expression verschiedener Claudin-Gene in den beiden Zell-Linien CaCo-2 und HaCaT dargestellt. Während die HaCaT-Zellen mRNAs für Claudin-1, -4, -7, -8, -9, -11, -12, -15 und -16 bildeten, ließ sich in den CaCo-2-Zellen nur die Synthese von Claudin-1, -4, -7, -12, 15 und -16 nachweisen. Alle weiteren der 18 geprüften Claudin-Gene waren in diesen beiden Linien negativ.

Tab. 5.2: Zusammenfassung der Expressions-Analyse der Gene von Claudinen in CaCo-2- und HaCaT-Zellen

Claudin-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	15	16	17	18
HaCaT	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
CaCo-2	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-

#### 5.2.1.2 Biochemischer Nachweis von TJ-Proteinen in Kulturen polarer Epithelzellen

Zum biochemischen Nachweis von TJ-Proteinen in Kulturen polarer epithelialer Zellen dienten CaCo-2-Zellen, eine etablierte Linie, die aus einem menschlichen Coloncarcinom gewonnen wurde. Von den CaCo-2-Zellen wurden mit "Laemmli-Puffer" Extrakte (siehe 4.3.1.2) hergestellt, die Polypeptide dieses Lysates mit Hilfe einer SDS-PAGE (siehe 4.3.3) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen (siehe 4.3.5). Die Membran wurde zur Überprüfung des Transfers mit Coomassie-Brilliant-Blau (Abb. 5.18 a) angefärbt (siehe 4.3.5.2). Die aufgetrennten Polypeptide wurden anschließend mit Hilfe spezifischer Antikörper in einem Western Blot (siehe 4.3.5.3) nachgewiesen.

Abb. 5.18 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Western Blots für Claudin-1 (b), mit einem Molekulargewicht von etwa 22 kDa und für Occludin (c) mit etwa 60 kDa. Dabei führte die Inkubation mit dem Claudin-1-Antikörper zu spezifischen Banden bei den Gesamtzellproteinen von CaCo-2- (1) und MDCK-Zellen (2). Die MDCK-Zellen, die aus einer bestimmten Region der Hundeniere stammen, wurden verwendet, da ihre TJ auch durch funktionelle Untersuchungen sehr gut charakterisiert sind (Furuse et al. 2001; Van Itallie et al. 2001).



# Abb. 5.18: Biochemischer Nachweis verschiedener Tight Junction-Transmembranproteine in den polaren Epithelzellen der Linie CaCo-2

Polypeptide der Gesamtproteinlysate von CaCo-2- (1) und MDCK- (2) Zellen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen mit Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt (a) und anschließend mit dem Western Blot-Verfahren analysiert (b und c). Die mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbte PVDF-Membran zeigt, dass der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran gelungen war. Sowohl für Claudin-1 (b; ~22 kDa) als auch für Occludin (c; ~60 kDa) wurden spezifische Banden im Western Blot bei den CaCo-2- und bei den MDCK-Zellen festgestellt

In Tab. 5.3 sind die Ergebnisse aller Western Blot-Ergebnisse an diesen beiden polaren Zell-Linien zusammengefasst: Neben Occludin und Claudin-1 ließen sich in beiden Zelltypen noch die Transmembranproteine Claudin-4 und Claudin-7 sowie die Plaque-Proteine ZO-1, Symplekin und Cingulin nachweisen.

Tab. 5.3: Zusammenfassung der biochemischen Analyse der Tight Junction-Proteine in CaCo-2-Zellen

	Occludin	Cingulin	Symplekin	ZO-1	CI-1	CI-2	CI-3	CI-4	CI-5	CI-7
MDCK	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
CaCo-2	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+

### 5.2.1.3 Immunlokalisierung von Tight Junction-Proteinen in CaCo-2-Zellen

Immunfluoreszenzmikroskopie mit spezifischen Antikörpern gegen Occludin, Claudin-1, Claudin-4 und Claudin-7 lieferte in CaCo-2-Zellen (Abb. 5.19) die aus der Literatur bekannte TJ-Darstellung (Furuse et al. 1993; Furuse et al. 1998; Tsukita et al. 2001; Schneeberger und Lynch 2004; Van Itallie und Anderson 2005; Furuse und Tsukita 2006). Sowohl Occludin als auch die durch Western Blots nachgewiesenen Claudin-1, Claudin-4 und Claudin-7 (5.2.1.1) reagieren in derselben Struktur. Um die Vitalität der Zellen darzustellen, wurden zusätzlich die Kerne mit Hilfe einer Chromatinfärbung (DAPI) erkennbar gemacht.



Abb. 5.19: Immunlokalisierungen verschiedener Tight Junction-Proteine in den polaren CaCo-2-Zellen

Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie der Claudine -1, -4 und -7 und von Occludin ergibt die für Tight Junctions typische Färbung, d.h. eine fein gezeichnete Linie entlang der Plasmamembranen, die eine Darstellung der *Zonula occludens* ist. Die Immunfluoreszenzreaktion des DAPI führt zu einer blauen Färbung der Zellkerne. Strichmarke: 200 µm

### 5.2.1.4 Ultrastrukturelle Untersuchung der Tight Junctions der CaCo-2-Zellen

Nach dem biochemischen Nachweis von TJ-Proteinen in den CaCo-2-Zellen und der Lokalisierung solcher TJ-Proteine in der *Zonula occludens* dieser Kulturen sollte zur direkten Demonstration der TJ auch die dazugehörige Ultrastruktur untersucht werden. Dazu wurden Ultradünnschnitte im TEM ausgewertet. Für eine Immunogold-markierung der Zellen wurden diese vor der Einbettung mit spezifischen Antikörpern gegen Occludin bzw. Cingulin, einem TJ-Plaque-Protein, inkubiert und mit einem Zweit-Antikörper, an den Nanogoldpartikel gekoppelt waren, dargestellt. Die Nanogoldpartikel wurden anschließend mit Hilfe einer Silberverstärkung vergrößert.

Im TEM-Bild von Ultradünnschnitten von CaCo-2-Zellen (Abb. 5.20) sind apikal Mikrovilli (Mv) zu erkennen, während - knapp unterhalb dieser Mikrovilli - an apikolateralen Zellgrenzen ein – hier mit einer Klammer gekennzeichneter - Junction-Bereich (im rechten oberen Eck von Abb. 5.20 vergrößert dargestellt) dargestellt ist. In diesem Junction-Bereich sind in Abb. 5.20 neben Desmosomen (Des) auch eine *Zonula adhaerens* (ZA) und eine TJ-Struktur, ein "Kissing Point" (TJ), zu sehen.

Die Immunogold-markierung des TJ-Plaque-Proteins Cingulin in der linken unteren Ecke der Abb. 5.20 zeigt die Markierung der TJ-Struktur auf der cytoplasmatischen Seite der Plasmamembranen. Die Versuche mit Occludin ergaben grundsätzlich dasselbe Ergebnis (nicht gezeigt).



Abb. 5.20: Elektronenmikroskopische Darstellung der Tight Junction-Strukturen in CaCo-2-Zellen und die Immunlokalisierung von Cingulin an diesen Strukturen Ein apikaler Zellverbindungs-Komplex bestehend aus Desmosom (DES, bzw. Pfeil im Insert), *Zonula adhaerens* (ZA) und Tight Junction (TJ) "Kissing Points" ist an der apikolateralen Membran unterhalb der Mikrovilli (Mv) zu erkennen. Cingulin, ein cytoplasmatisches Plaque-Protein der TJ lokalisiert direkt an der Plasmamembran in den "Kissing Points". Vergrößerung: a 20000:1; b-c 50000:1

Zur Darstellung von TJ wird die elektronenmikroskopische Präparationsmethode des Gefrierbruchs (siehe 4.6.2) bevorzugt angewendet, da sich mit ihrer Hilfe die topographische intramembranöse Morphologie von TJ untersuchen lässt. Da bei dieser Technik die Bruchebene bevorzugt innerhalb der Lipid-Doppelschichten der Plasmamembranen liegt, eignet sie sich für die Untersuchung von intramembranösen Strukturen ganz besonders.

Für diese Gefrierbruchpräparationen wurden CaCo-2-Zellen wie unter 4.6.2 beschrieben präpariert und in die Gefrierbruchanlage eingebracht. Nach dem Bruch im Hochvakuum und einer Metall-Kohle-Bedampfung wurden die erhaltenen Replicae (Metallabdrucke des biologischen Materials) mit Natriumhypochloridlösung gesäubert, auf Elektronenmikroskopische-Netze ("Grids") aufgefangen und im TEM ausgewertet.



Abb. 5.21: Elektronenmikroskopische Gefrierbruch-Darstellung des Netzwerkes von reliefstrang-artigen Tight Junction-Strukturen in der apikolateralen Membran von CaCo-2-Zellen Die z.T. ausgedehnten TJ-Strukturen dieser Zellen bilden eine geschlossene *Zonula occludens* von erheblicher Breite (Klammer am rechten Rand; die sog. "P-Face" und "E-Face" sind bezeichnet). Auf der apikalen Seite der Zellen sind quergebrochene Mikrovilli (Mv) zu erkennen. Vergrößerung: 20000:1

Auf der apikolateralen Membranfläche waren hier typische, hauptsächlich P-Face assoziierte, TJ-Netzwerke mit je 10-18 parallelen strangartigen Strukturen (Abb. 5.21; Klammer am rechten Rand) erkennbar, d.h. typische *Zonula occludens*-Strukturen polarer einschichtiger Zellen. Die parallelen strangartigen Strukturen waren hier untereinander sehr stark vernetzt, was für eine hohe Komplexizität und Barrierewirksamkeit des Netzwerkes spricht (Claude und Goodenough 1973; Claude 1978; Noske et al. 1994).

### 5.2.1.5 Physiologische Untersuchungen zur Tight Junction-Barriere der CaCo-2-Zellkulturen

CaCo-2-Zellkulturen dienten in der vorliegenden Arbeit auch als Kontrolle für Beurteilungen von Art und Qualität der jeweiligen Barriere-Wirkung. Dazu wurden TEER-Messungen (siehe 4.7.1) in Triplikaten mittels eines Millicell-ERS Volt-Ohmmeters mit sog. STX-chopstick-Elektroden (Millipore, Schwalbach, Germany) durchgeführt.

Abb. 5.22 zeigt, dass nach zwei Tagen die Konfluenz der Zellschicht erreicht wurde und der transepitheliale elektrische Widerstand stetig anstieg. Bereits nach 5 Tagen wurde ein Widerstand erreicht, der in der Literatur für mittelmäßig dichte bzw. relativ undichte Epithelien (z.B. bestimmte Abschnitte der Henleschen-Schleife der Niere, in denen die Diffusion bestimmter Ionen, als Absorption dieser Salze, erwünscht ist) beschrieben wird. Am 9. Tag erreichte der Widerstand einen Wert von etwa 1000  $\Omega/cm^2$  und stieg bis zum 14. Tag auf bis zu 1500  $\Omega/cm^2$  an. Derartige Werte erreichen nur Epithelien wie z.B. der Darm (Delie und Rubas, 1997), die als absolut dicht beschrieben werden.



# Abb. 5.22: Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) von CaCo-2 "Monolayer"-Zellkulturen

Zur Messung des TEER wurden CaCo-2-Zellen auf Gelatine-beschichtete, permeable Polyestermembranen ausgesät und bis zur Bildung einer Ein-Zellschicht ("Monolayer") belassen. Der Widerstand wurde über mehrere Tage gemessen und gegen die Zeit aufgetragen.

Der Widerstand über die Zellkultur stieg mit dem erreichen der Konfluenz stetig an. Erst bei einem Wert von etwa 1500  $\Omega$ /cm<sup>2</sup> erreichte die Messkurve ein Plateau. Diese Widerstandswerte entsprechen denen von in der Literatur als besonders undurchlässig beschriebenen Epithelien

Um die Ausschlussgröße der in Abb. 5.22 vorgestellten TJ-Barriere bestimmen zu können, wurden im Anschluss an die TEER-Messung Transportversuche mit FITCmarkierten Dextran-Partikeln unterschiedlicher Größe durchgeführt (Abb. 5.23). Dazu wurden die Fluoreszenz-markierten Dextran-Partikel in das Medium in der apikalen Kammer der Zellkulturplatte, in der die Zellen wuchsen, gegeben (siehe Skizze der Vorrichtung in Abb. 4.5). Nach unterschiedlich langen Zeitintervallen von 30, 75, 135, 180 und 240 Min wurden aus dem basalen Medium Proben entnommen und die über das Epithel transportierten Dextran-Partikel anhand ihrer Fluoreszenz mit Hilfe eines Fluorometers gemessen.



Abb. 5.23: Messung der Barrierefunktion der CaCo-2 Zellkulturen

Von den Dextran-Partikeln der Größe 4 kDa (FD4) diffundierte bereits innerhalb der ersten 75 Min die größte Menge durch das Epithel ins basale Medium. Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz blieb den Messwerten für 135, 180 und 240 Min gleich. Die Dextran-Partikel mit einer Größe von 70 kDa (FD70) können den epithelialen Zellrasen nicht bzw. kaum passieren. Die CaCo-2 Zellen bilden demnach eine Barriere für Partikel mit einer Größe von 70 kDa und darüber

In Abb. 5.23 ist die Fluoreszenzintensität des basalen Mediums gegen die Zeit aufgetragen. Von den Fluoreszenz-markierten Dextran-Partikeln mit einer Größe von 4 kDa passiert nur etwa 10 % die Zellschicht in den ersten 30 min. Nach 75 min hatte bereits der größte Teil der für die Gesamtfluoreszenz verantwortlichen Partikel die Zellschicht passiert. Nach 135, 180 bzw. 240 Min fand keine signifikante Änderung der Fluoreszenz mehr statt. Die markierten Dextrane mit einer Größe von 70 kDa konnten während der gesamten Versuchsdauer von 4 Std. den Zell-Layer nicht bzw. kaum passieren. Daraus kann geschlossen werden, dass die Barriere der CaCo-2 Zellen für Partikel mit einer Größe von 4 kDa durchlässig war, während Partikel mit einer Größe von 70 kDa die Barriere nicht mehr durch freie Diffusion parazellulär passieren konnten.

Wie schon für mehrschichtige Epithelien beschrieben wurde (siehe 5.1.8), ist LaCl<sub>3</sub> ein geeigneter *Tracer*, um die Barriere-Funktion eines Epithels im TEM darzustellen und gleichzeitig die für die Barriere verantwortlichen Strukturen zu identifizieren. Nach der Inkubation der "Monolayer"-Kulturen mit LaCl<sub>3</sub> wurden diese ähnlich präpariert, wie im Abschnitt 5.1.8 für Gewebeproben beschrieben.



Abb. 5.24: Darstellung der Tight Junction-Barriere und der Interzellularspalten von CaCo-2 Zellen mit Lanthanchlorid

Das von basal in die Interzellularspalten der Zellen diffundierte LaCl<sub>3</sub> ist als elektronendichtes Präzipitat zu erkennen (a-b, Pfeile). Der desmosomale Spalt (D) bildete keine Barriere für LaCl<sub>3</sub> (b), wohl aber die TJ "Kissing Point"-Strukturen (Pfeilspitze in b). Auf der apikalen Seite der Zellen sind Mikrovilli (Mv) zu erkennen, präzipitiertes Lanthan jedoch nicht mehr. Vergrößerung: a 16000:1, b 50000:1

Wie in Abb. 5.24a zu sehen ist, diffundierte LaCl<sub>3</sub> frei durch die Interzellularspalten der Zellkultur - vom basalen Kompartiment der Inkubationskammer nach apikal. Durch den desmosomalen Spalt (D) konnte das LaCl<sub>3</sub> frei diffundieren (Abb. 5.24 b; Pfeile). TJ- "Kissing Points" jedoch (z.B. Pfeilspitze in Abb. 5.24 b) bilden in den CaCo-2-Zellen eine undurchdringliche Diffusionsbarriere für Lanthan-Ionen. Die Oberfläche der Zellen war eindeutig frei von schwarzem Lanthanpräzipitat. Da LaCl<sub>3</sub> ausschließlich ins basale Medium gegeben wurde und nur aufsteigend durch freie Diffusion entlang der Interzellularspalten in den subapikalen Bereich der Zellen gelangen konnte, kann aus dem Ergebnis geschlossen werden, dass die TJ-Strukturen hier eine Barrierefunktion ausüben.

# 5.2.2 Charakterisierung von Tight Junction-Strukturen in Kulturen polarer, bronchialepithelialer Zellen

Eines der Ziele dieser Arbeit war die Aufklärung von möglichen Veränderungen der TJ, bei der Entwicklung von mehrschichtigen Epithelien. Vor allem sollte dabei die Veränderung der TJ während der Differenzierung des Bronchialepithels von seinem normalen einschichtigen bzw. "pseudostratifizierten" Zustand zu einer Plattenepithelmetaplasie untersucht werden. Nachdem in den letzten Jahren die Ergebnisse verschiedener Publikationen (Brandner 2000; Brandner et al. 2001; Brandner et al. 2002; Furuse et al. 2002; Langbein et al. 2002) auf das grundsätzliche Vorkommen von TJ in mehrschichtigen Epithelien hindeuteten, sollten die möglichen Veränderungen der Synthese und Anordnung dieser Proteine während der Metaplasie-Entwicklung in situ und in Zellkultur untersucht werden. Hierzu wurden zunächst Zellen bronchialepithelialen Ursprungs (16HBE, CaLu-3) benutzt, die somit von einem Epithel abstammen, das in der Literatur als eher undichtes ("moderate leaky") Epithel beschrieben wird. Die 16HBE140<sup>-</sup> Zellen wurden vor allem auch deshalb verwendet, weil sie sich bei bestimmten Kulturbedingungen zu anscheinend mehrschichtigen Kulturen verändern können. Die CaLu-3-Linie wurde dabei vor allem als bronchialepitheliale Kontrolle verwendet. Da das Ursprungsgewebe der interne. Zellkulturlinien für die Proteinausstattung der einzelnen Zellen mit entscheidend ist und eben diese Proteinzusammensetzung die Barriere-Eigenschaften des jeweiligen Zelltyps mit bestimmt, wurden zunächst die molekulare Zusammensetzung, die Struktur und die physiologischen Barriere-Eigenschaften der TJ dieser Zellkulturlinien untersucht.

# 5.2.2.1 mRNA-Analyse von Tight Junction-Proteinen in den bronchialepithelialen Linien 16HBE- und CaLu-3

Da noch nicht für alle bisher beschriebenen Claudine spezifische Antikörper vorhanden waren, konnten einige nur über die Expression ihrer Gene mit Hilfe von RT-PCR (siehe 4.2.2) nachgewiesen werden. So konnte gezeigt werden, dass die menschliche bronchialepitheliale Linie CaLu-3 mRNAs für die Claudine -9, -10, -11, -12 und -17 (Abb. 5.25) enthielt, dagegen die bronchialepitheliale Zell-Linie 16HBE die Claudine -6, -9, -11 und -12. Beide Linien zeigten also bezüglich ihrer Claudin-Ausstattung einige Unterschiede. Während z.B. Claudin-6 nur von den 16HBE-Zellen gebildet wurde, fand man die Claudine -10 und -17 ausschließlich in der Linie CaLu-3. Alle anderen Claudine wurden entweder von beiden oder von keiner der beiden Linien synthetisiert (Tab. 5.4).

1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
												-	-				
			Constant of the second	-		-			-								
	ı.	0			0			4.0			4.4			4.0			4 -

Claudin-6 Claudin-9 Claudin-10 Claudin-11 Claudin-12 Claudin-17 Abb. 5.25: Expressionsanalyse von Claudin -6, -9, -10, -11, -12 und -17 in zwei bronchialepithelialen Zelllinien

Die PCRs mit den cDNAs der bronchialepithelialen Zell-Linie 16HBE (Spur 2) liefern PCR-Produkte von Claudin-6 (196 bp), Claudin-9 (452 bp), Claudin-11 (340 bp) und Claudin-12 (460 bp). Die Claudine-10 und -17 sind hingegen in diesen Zellen nicht nachzuweisen. Die PCRs mit den CaLu-3 cDNAs (Spur 1) zeigen entsprechende Fragmente von Claudin-9 (452 bp), Claudin-10 (220 bp), Claudin-11 (340 bp), Claudin-12 (460 bp) und Claudin-17 (675 bp), aber waren negativ für Claudin-6. Die Spezifität der einzelnen PCRs wurde u.a. durch eine Wasserkontrolle (Spur 3) gezeigt

Tab. 5.4:ZusammenfassungderExpressionsanalysevonClaudin-GenenindenbronchialepithelialenZell-Linien16HBE undCaLu-3.

Claudin-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	15	16	17	18
16HBE	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
CaLu-3	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-

# 5.2.2.2 Biochemischer Nachweis und Lokalisierung von Tight Junction-Proteinen in den Zellen der Linien 16HBE und CaLu-3

Da ein Nachweis der mRNAs für bestimmte Proteine nicht bedeutet, dass diese auch in der Translation gebildet wurden die Proteine Zell-Lysate der jeweiligen Zell-Linien auf ein SDS-PAGE-Gel (siehe 4.3.3) aufgetragen und über eine Gelelektrophorese mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe des "Western Blot"-Verfahrens (siehe 4.3.5.3) nachgewiesen.

Die Anfärbung der PVDF-Membranen (Abb. 5.26 a) mit Coomassie-Brilliant-Blau (siehe 4.3.5.2) diente wieder als Kontrolle des Transfers der Proteine vom Gel auf die Membran. Die Chemolumineszenz-Reaktion auf Autoradiographiefilmen (siehe 4.3.5.3) nach der Inkubation der Membran mit spezifischen Antikörpern zeigte dann die spezifischen Banden der einzelnen TJ-Proteine. Occludin war sowohl in den als Einzelzellschicht charakterisierten 16HBE-Zellen als auch in der CaLu-3-Zell-Linie nachweisbar (Abb. 5.26 b; ML). Auch das etwa 22 kDa große Claudin-1 wird sowohl von diesen 16HBE- als auch von CaLu-3-Zellen gebildet (Abb. 5.26 c; ML). Cytoplasmatische Plaque-Proteine lassen sich ebenfalls in beiden Zelllinien nachweisen: Cingulin (110 kDa) wurde in einschichtigen 16HBE- und CaLu-3 Kulturen (Abb. 5.26 d, ML) in der richtigen Größe nachgewiesen. Lysate von CaCo-2-Zellen dienten bei diesen Untersuchungen als Referenz der untersuchten Proteine. Auf die Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen der mehrschichtigen als AIC-Kulturen erhaltenen Zellverbände wird in Kapitel 5.6.2 eingegangen werden.



Abb. 5.26: Biochemischer Nachweis von Tight Junction-Proteinen in den bronchialepithelialen Linien 16HBE und CaLu-3

Die mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbte PVDF-Membran belegt den Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran. Für Occludin (~60 kDa), Claudin-1 (~23 kDa) und Cingulin (~137 kDa) werden die spezifischen Banden sowohl in den einschichtig als "Monolayer" (ML) gewachsenen Zellen beider Linien, als auch in den mehrschichtig gewachsenen Zellen (AIC) der Linie 16HBE. Als Positiv-Kontrolle dienten Lysate von CaCo-2 Zellen

Eine Zusammenfassung der Western Blot-Analysen stellt Tab. 5.5 vor. Die einschichtig gewachsenen bronchialepithelialen Zellen 16HBE und CaLu-3 wiesen dasselbe Muster der getesteten Proteine auf. Beide Zell-Linien waren positiv für die drei Plaque-Proteine Cingulin, Symplekin und Protein ZO-1. Zudem exprimierten sie die Transmembranproteine Occludin, Claudin -1, -3, -4, -5 und -7. Von den im Western Blot getesteten Claudinen war lediglich Claudin-2 in beiden Zelllinien nicht nachweisbar.

Tab. 5.5: Zusammenfassung der biochemischen Analysen der Tight Junction-Proteine in den bronchialepithelialen Zell-Linien 16HBE und CaLu-3

	Occludin	Cingulin	Symplekin	ZO-1	CI-1	CI-2	CI-3	CI-4	CI-5	CI-7
16HBE	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
CaLu-3	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

Um diese biochemisch gewonnenen Ergebnisse zu verifizieren und die TJ-Proteine zu lokalisieren, wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen (siehe 4.4.1.3) der TJ Proteine in einschichtig gewachsenen 16HBE- und CaLu-3-Zellkulturen durchgeführt. Es zeigte sich auch hier wieder die typische Verteilung der TJ-Proteine, wie sie in einschichtigen, polaren Zellkulturen zu erwarten war und wie sie bereits in den CaCo-2 Zellen beobachtet wurde (vgl. Abb. 5.19). Neben dem Transmembranprotein Occludin ließen sich auch hier Claudin-1, Claudin-4 und Claudin-7 in Zellen beider Linien an Zell-Zell-Kontaktstellen als kontinuierliche *Zonula occludens*-Struktur darstellen (16HBE: Abb. 5.27; CaLu-3: Abb. 5.28). Spezifische Plaque-Proteine scheinen auch in diesen Zell-Linien die Transmembranproteine mit dem Aktin-Cytoskelett zu verbinden, da Occludin und die Claudine auch mit den Plaque-Proteinen Cingulin, Protein ZO-1 sowie Symplekin (vgl. Tab. 5.5) mit Occludin bzw. den Claudinen ko-lokalisierten.



Abb. 5.27: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von Tight Junction-Proteinen in der bronchialepithelialen Linie 16HBE

Die Immunfluoreszenzen der Claudine -1, -4 und -7, sowie die von Occludin, Cingulin und Protein ZO-1 ergeben alle die für TJ typische Färbung: eine fein gezeichnete Linie entlang der Plasmamembranen, welche die *Zonula occludens* darstellt. Die Zellkerne erschienen DAPI-blau. Strichmarke: 20 µm



Abb. 5.28: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von Tight Junction-Proteinen in der bronchialepithelialen Zell-Linie CaLu-3

Die Immunfluoreszenzen der Claudine -1, -4 und -7 sowie die von Occludin, Cingulin und Protein ZO-1 zeigen eine für TJ typische Färbung, eine fein gezeichnete Linie entlang der Plasmamembran. Die Zellkerne sind durch DAPI blau gefärbt. Strichmarke: 20 µm

# 5.2.2.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Anordnung von Tight Junctions in den bronchialepithelialen Zellkulturlinien 16HBE und CaLu-3

Die Ergebnisse der molekularbiologischen, biochemischen und immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der einschichtigen, polaren 16HBE- und CaLu-3-Zellkulturen ließ in TEM-Aufnahmen Bilder von TJ-"Kissing Points", den klassischen TJ-Strukturen, erwarten. In beiden bronchialepithelialen Linien wies die laterale Plasmamembran starke Faltung und Verzahnungen sowie viele Desmosomen auf (Abb. 5.29 a-c; mit D in b und c bezeichnet). Am apikalen Ende der lateralen Plasmamembranen der jeweils aneinander-grenzenden Zellen waren in der Tat in beiden Zelltypen typische TJ-Strukturen zu erkennen (Abb. 5.29 b-c; Pfeilspitzen).



Abb. 5.29: Elektronenmikroskopische Darstellung von Tight Junction-Strukturen in Zellkulturen der einschichtigen bronchialepithelialen Linien 16HBE (a-b) und CaLu-3 (c)

Einschichtige 16HBE-Zellen zeigen vereinzelte Mikrovilli (Mv) auf der apikalen Óberfläche. Eine starke Faltung der lateralen Plasmamembranen, desmosomale (D) und TJ-Strukturen ("Kissing Point"; Pfeil) sind zu erkennen (b). Die Plasmamembranen der CaLu-3 Zellen zeigen oft weniger starke Faltung, jedoch auch desmosomale (D) und Tight Junction-Strukturen (Pfeil). Strichmarke: a-b 0,5 µm, c 1 µm

In Gefrierbruch-Präparaten ließen die CaLu-3-Zellen ein typisches kontinuierliches subapikales Netzwerk von etwa 3-6 Reihen querverbundener Strang-Relief-Strukturen erkennen (Abb. 5.30). Im Vergleich zur aus dem Darm stammenden CaCo-2-Linie wiesen die CaLu-3-Zellen eine offenbar geringere Komplexität auf.



Abb. 5.30: Elektronenmikroskopische Gefrierbruch-Darstellung des Netzwerkes von strangartigen Tight Junction-Relief-Strukturen in der apikolateralen Membran von CaLu-3-Zellen Die z.T. ausgedehnten TJ-Strukturen dieser Zellen bilden eine geschlossene *Zonula occludens* von erheblicher Breite (Klammer am rechten Rand; die sog. "P-Face" und "E-Face" sind bezeichnet). Auf der apikalen Membran der Zellen sind quergebrochene Mikrovilli (Mv) zu sehen. Vergrößerung: 20000:1

Im Gegensatz dazu zeigten die im Kulturmedium als "Monolayer" gewachsenen 16HBE-Zellen im Gefrierbruch nur wenige und locker angeordnete lokale Ansammlungen von strangartigen TJ-Strukturen (Abb. 5.31). Die beobachteten Relief-Stränge bildeten zwar ein ausgedehntes System, schienen aber nicht die ganze Zelle zu umschließen (an den in Abb. 5.31 mit Pfeilen gekennzeichneten Stellen endet hier ein solches Netzwerk von Strängen). Derartig desorganisierte strangartige Strukturen sind aus der Literatur bereits von krankhaft veränderten Bronchialepithelien-Geweben bekannt, so z.B. bei Patienten mit zystischer Fibrose (Godfrey 1997).



Abb. 5.31: Elektronenmikroskopische Gefrierbruch-Darstellung des Netzwerkes von strangartigen Tight Junction-Relief-Strukturen in der apikolateralen Membran von als Ein-Zellschicht gewachsenen 16HBE-Zellen

In der apikolateralen Membran der Zellen lassen sich diskontinuierliche, lokal begrenzte strangartige TJ-Strukturen erkennen (die Klammer am linken Rand bezeichnet die Zone, weiße Pfeile weisen auf einige der Unterbrechungen der TJ-"Ridges" hin). Auffallend ist dass das Netzwerk nicht die gesamte Zelle umschließt, sondern abrupt endet (Pfeile). Auf der apikalen Membran der Zellen sind quergebrochene Mikrovilli (Mv) zu sehen. Vergrößerung: 20000:1

# 5.2.2.4 Untersuchung der physiologischen Barriere-Eigenschaften der einschichtig gewachsenen Kulturen von bronchialepithelialen Zellen der Linien 16HBE und CaLu-3

An Zellen der beiden Linien wurden Messungen des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) durchgeführt (siehe 4.7.1). Anhand der Ergebnisse der Gefrierbuch-Untersuchungen (siehe vorheriges Kapitel) war zu erwarten, dass die Messwerte der einschichtigen 16HBE-Zellen nur unmaßgeblich höher ausfallen würden als der Leerwert. Die Messkurve in Abb. 5.32 zeigt, dass physiologischen Eigenschaften in Einklang mit den ultrastrukturellen Ergebnissen stehen. Die einschichtigen 16HBE-Zellen (Abb. 5.32; 16HBE LCC) erreichten lediglich Widerstandswerte von etwa 200 Ohm, d.h. typische Werte einer als undicht ("leaky") beschriebenen Zellkultur. Auf die Messwerte der mehrschichtigen 16HBE-Zellen (AIC) wird im Abschnitt 5.6.2 eingegangen.



Abb. 5.32: Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) von den bronchialepithelialen Zellkulturen 16HBE und CaLu-3 Die TEER-Widerstandswerte der 16HBE und CaLu-3 Linien wichen weit voneinander ab. Die einschichtigen (LCC) CaLu-3-Zellen erreichten nach drei Wochen Messwerte mit Spitzenwerten von über 1500  $\Omega/cm^2$ . Die einschichtig gewachsenen (LCC) 16HBE Zellen hingegen erreichten nur sehr geringe Messwerte. Die am höchsten gemessenen Widerstandswerte lagen bei dieser Zelllinie bei  $\sim$ 200  $\Omega/cm^2$ 

Dagegen ergaben einschichtig (LCC) konfluent gewachsene Zellen der Linie CaLu-3 einen Anstieg des transepithelialen elektrischen Widerstandes bis auf etwa 1500  $\Omega/cm^2$  (Abb. 5.32; CaLu-3 LCC). Diese Widerstandswerte entsprachen fast denen der sehr undurchlässigen darmepithelialen Linie CaCo-2. Verglichen mit den CaCo-2-Zellen (Abb. 5.22) erreichten die CaLu-3-Zellen unter diesen Kulturbedingungen allerdings erst nach doppelt so langer Wachstumszeit diese Widerstandswerte.

In Transportversuchen mit fluoreszierenden Dextran-Partikeln sollte die Integrität der Barriere des epithelialen Zellrasens geprüft werden. Um die Ausschlussgrößen der Barriere-Funktion definieren zu können, wurden Dextran-Partikel der Molekulargewichtsgrößen 4 kDa, 70 kDa und 250 kDa eingesetzt. Bei den einschichtig gewachsenen 16HBE-Zellen zeigte sich, dass die Zellen für die 4 kDa großen Dextran-Partikel kaum eine Barriere darstellten: Bereits nach 20 Min wurde etwa ein Fünftel der insgesamt in den drei Versuchstunden gemessenen Fluoreszenz in der unteren Kammer nachgewiesen (Abb. 5.33). Für die 70 kDa großen Dextran-Partikel stellten die Zellen dagegen bereits eine

bemerkenswerte Diffusionsbarrie dar: Von diesen Dextran-Partikeln konnte über die gesamte Versuchszeit nur etwa ein Fünftel das Epithelmodell auf parazellulärem Wege passieren (Abb. 5.33). Die Messwerte für das größte Dextran mit einem Molekulargewicht von etwa 250 kDa glichen in etwa dem Leerwert. Der Leerwert wurde ermittelt, indem die Lösung mit dem 250 kDa großen Dextran auf den leeren Filter gegeben wurde. Für die größeren Dextran-Partikel stellte wahrscheinlich die Porengröße der Filter oder die Menge der Poren in den Filtern das größte Diffusionshindernis dar.



Abb. 5.33: Messung der Barriere-Funktion der einschichtigen 16HBE Zellkulturen

Von den Dextran-Partikeln der Größe 4 kDa (FD4) diffundierten bereits innerhalb der ersten Stunde etwa ein Drittel der gemessenen Gesamtfluoreszenz durch die 16HBE-Zellen ins basale Medium. Die gemessene Gesamtfluoreszenz der FD70-Dextran-Partikel betrug im basalen Medium nur etwa ein Fünftel der für die FD4-Partikel gemessenen Fluoreszenz. Von den 250 kDa (FD250) großen Dextran-Partikeln passierte nur ca. 1% den Zellrasen. Der Messwert dieser Partikel war nicht signifikant höher als der des Leerwertes, bei dem nur die Eigenfluoreszenz des verwendeten Mediums gemessen wurde



Abb. 5.34: Messung der Barriere-Funktion der einschichtigen CaLu-3 Zellkulturen Bei Dextran-Partikeln der Größe 4 kDa (FD4) diffundierten bereits innerhalb der ersten Stunde etwa 25 % der gemessenen Gesamtfluoreszenz durch den Zellrasen ins basale Medium. Von den 70 kDa (FD70) großen Dextran-Partikeln passierten nur etwa 20 % den CaLu-3 Zellrasen Bei den 250 kDa (FD250) großen Dextran-Partikeln war des Messwert identisch mit dem Leerwert

In den einschichtig gewachsenen Zellen der Linie CaLu-3 (Abb. 5.34) ließ sich in dieser Versuchsanordnung trotz der in den Gefrierbruchbildern gezeigten ausgedehnten und komplexeren strangartigen TJ-Strukturen und einem wesentlich höheren TEER-Wert kein signifikanter Unterschied zu den einschichtigen 16HBE-Zellen feststellen. Auch bei diesen Zellen hatten nach etwa 60 Min bereits etwa 25 % der gemessenen Gesamtfluoreszenz die Zellschicht passiert. Der Messwert des Fluoreszenz-Anteils der nach drei Stunden den CaLu-3 Zellrasen passiert hatte, war bei den Dextran-Partikeln mit der Größe von 4 kDa etwa 10 % niedriger und bei den Dextran-Partikeln mit einer Größe von 70 kDa bis zu 50 % niedriger als die Fluoreszenz, die bei den 16HBE-Zellen nach 3 Std. gemessen wurde. Zusammenfassend kann daraus geschlossen werden, dass die einschichtigen CaLu-3-Zellen, die etwa 10 % weniger Dextran-Partikel der Größe 4 kDa und auch nur halb so viele Dextran-Partikel mit einer Größe von 70 kDa passieren ließen als die einschichtigen 16HBE-Zellen damit eine weniger durchlässige Barriere für Dextran-Partikel bilden.

Die Diffusion des zuvor bereits ausgiebig beschriebenen elektronendichten Indikators für TJ-Barrieren, LaCl<sub>3</sub> ermöglichte auch eine ultrastrukturelle Untersuchung der Diffusionsbarriere zwischen den Zellen der einschichtigen 16HBE- und CaLu-3-Kulturen. Sowohl bei den 16HBE- als auch bei den CaLu-3 Zellen war eindeutig zu erkennen, dass

das LaCl<sub>3</sub> hier frei durch die Interzellularspalten diffundieren konnte. Bei beiden Zellsystemen waren Lanthanpräzipitate auf den apikalen Zellmembranen zu sehen (nicht gezeigt).

Es stellte sich daher die Frage, wie sich die Unterschiede der physiologischen Barriere-Eigenschaften der bronchialepithelialen Linien 16HBE und CaLu-3 auf der einen Seite und der "klassischen" polaren Colon-Karzinom-Linie CaCo-2 auf der anderen Seite erklären lassen. Um eventuelle molekulare Unterschiede der am Aufbau der TJ-Strukturen beteiligten Proteine und Protein-Komplexe zu bestimmen, wurden Lysate der verschiedenen Zell-Linien mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation und Immunpräzipitation untersucht.

## 5.3 Biochemische Charakterisierung der Tight Junction-Proteinkomplexe verschiedener Zellkultursysteme

### 5.3.1 Dichtegradientenzentrifugation von TJ-Molekülkomplexen in Lysaten verschiedener Zellkultursysteme

Zur biochemischen Charakterisierung der TJ-Proteine und ihrer Interaktionen in CaCo-2 Zellen musste zunächst ein Lysis-Puffer gefunden werden, mit dem es möglich war, Transmembran-Proteine selektiv schonend in Lösung zu bringen. Mit den beiden Detergenzien Triton-X 100 und n-Octyl-β-D-glucopyranosid (OBG) ließen sich z.B. verschiedene Claudin-Transmembranproteine (Cl-1, Cl-4 und Cl-7) zu beträchtlichen Teilen in Lösung bringen (nicht gezeigt). Zur Bestimmung der Partikelgröße dieser TJ-Protein-Komplexe wurden solche Lysate einer Dichtegradientenzentrifugation in einem 5-30% Saccharose-Dichtegradienten (siehe 4.3.6) unterzogen. Die einzelnen Fraktionen wurden im Anschluss mit Hilfe einer SDS-PAGE (siehe 4.3.3) analysiert.

Bei den Dichtegradientenzentrifugationen der mit Triton-X 100 solubilisierten Proben aller untersuchten Zell-Linien zeigte sich, dass das Transmembran-Protein Claudin-1 und alle anderen in RT-PCR- bzw. Immunblot-Versuchen gefundenen TJ-Transmembran-Proteine auch als Proteine in Fraktionen nachgewiesen werden konnten, die einem Sedimentationskoeffizienten von etwa 4,6 S entsprachen (Pape in Vorbereitung) also wohl Claudin-Monomeren entsprachen (nicht gezeigt). Mit dem nicht-ionischen Detergenz OBG war eine etwas breitere Verteilung der TJ-Proteine - zwischen 4,6 S und 16,5 S festzustellen. Die Analyse dieser Verteilungen (Abb. 5.35 a-d) mit Hilfe von Western Blots zeigte eine weitestgehend ähnliche Verteilung von Claudin-1 (Abb. 5.35 b), Claudin-4 (Abb. 5.35 c) und Claudin-7 (Abb. 5.35 d). Während Claudin-1 überwiegend in den Fraktionen 6-13 nachzuweisen war, konnte Claudin-4 in den Fraktionen 6-15 und Claudin-7 in den Fraktionen 6-10 gefunden werden. Eine Art gemeinsames Maximum der Verteilungen lag in den Fraktionen 6 und 7, was einem Sedimentationskoeffizienten von etwa 11-12 S entsprach und die Möglichkeit einer Komplexbildung dieser Claudine jeweils mit sich selbst oder untereinander andeutete. Bei allen anderen untersuchten TJ-Transmembran-Proteinen wie z.B. Occludin oder JAM (nicht gezeigt) wurde ein ähnliches Bild der Verteilung der Hauptfraktionen beobachtet.

Auch in den beiden bronchialepithelialen Zellkulturen 16HBE (Abb. 5.36) und CaLu-3 (nicht gezeigt) zeigte sich wie bei den oben vorgestellten Ergebnissen der CaCo-2-Zellen eine ähnliche Verteilung der Protein-Komplexe in Abhängigkeit vom verwendeten Detergenz (Abb. 5.36 a). Die Analyse der Western Blots der Fraktionen ergab ähnliche S-Werte bei den Proteinen der bronchialepithelialen Zellen wie bei den CaCo-2-Zellen: Claudin-1 konnte hauptsächlich in den Fraktionen 5-10, Claudin-4 in den Fraktionen 5-10 und Claudin-7 in den Fraktionen 6-10 nachgewiesen werden. Der Große Teil der TJ-Proteine dieser Zellen war in den Fraktionen 8 und 9 nachweisbar, was Sedimentationskoeffizienten von etwa 12-13 S entsprach.

Die Beobachtungen der Verteilung von unterschiedlichen Komplexgrößen in Saccharose-Gradienten in Abhängigkeit vom verwendeten Detergenz wurden *in situ* an Rinderzungen-Lysaten überprüft und grundsätzlich bestätigt (nicht gezeigt). Daraus lässt sich schließen, dass die beobachtete TJ-Protein-Verteilung kein zellkultur-spezifisches Phänomen darstellte, sondern auch in Geweben reproduzierbar war Daraus kann die Hypothese abgeleitet werden, dass die Transmembranproteine der TJ homo- oder heterotypische Komplexe in den Plasmamembranen epithelialer Zellen bilden.



## Abb. 5.35: Charakterisierung des Sedimentationsverhaltens von Tight Junction-Proteinen der Zellkultur-Linie CaCo-2

Die mit Coomassie-Brilliant-Blau (a) gefärbte PVDF-Membran zeigt den fehlerfreien Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran. Spur 1 entspricht der Fraktion mit der geringsten Dichte und Spur 17 der Fraktion mit der höchsten Dichte. M = Biolabs Marker mit den Referenzproteinen. Z = unbehandeltes Zellextrakt. Western Blot-Analysen (b-d) zeigen, dass Claudin-1 (b), Claudin-4 (c) und Claudin-7 (d) überwiegend in den Fraktionen 6 und 7 nachweisbar sind, was einem Sedimentationskoeffizienten von etwa 11-12 S entspricht. Die Pfeilspitzen geben die Spitzenfraktionen der Referenzproteine Rinderserumalbumin (BSA; 4,6 S), Katalase (11,3 S) und Thyroglobulin (16,5 S) an



## Abb. 5.36: Charakterisierung des Sedimentationsverhaltens von Tight Junction-Proteinen der Zellkultur-Linie 16HBE

Die mit Coomassie-Brilliant-Blau (a) gefärbte PVDF-Membran zeigt den fehlerfreien Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran. Spur 1 entspricht der Fraktion mit der geringsten Dichte und Spur 17 der Fraktion mit der höchsten Dichte. M = Biolabs Marker mit den Referenzproteinen. Z = unbehandeltes Zellextrakt. Western Blot-Analysen (b-d) zeigen, dass Claudin-1 (b), Claudin-4 (c) und Claudin-7 (d) überwiegend in den Fraktionen 8 und 9 nachweisbar sind, was einem Sedimentationskoeffizienten von etwa 12-13 S entspricht. Die Pfeilspitzen geben die Spitzenfraktionen der Referenzproteine BSA (4,6 S), Katalase (11,3 S) und Thyroglobulin (16,5 S) an

### 5.3.2 Nachweis heterotypischer Claudin-Komplexe in polaren Epithelzellen unterschiedlicher Herkunft

Um zu untersuchen, ob es sich bei den in der Dichtegradientenzentrifugation erhaltenen Komplexen um homo- oder heterotypische Claudin-Komplexe handelte, oder ob sogar weitere Proteine an diesen Komplexen beteiligt waren, wurden koimmunpräzipitationsversuche (siehe 4.3.7) mit verschiedenen, gegen TJ Transmembran-Proteine gerichteten Antikörpern durchgeführt.

Für diese ko-immunpräzipitationen wurden die 100000xg Überstände der Ultrazentrifugationen von Gesamtzell-Lysaten (siehe 4.3.1.4) mit magnetischen Kügelchen, an die spezifische Antikörper gegen TJ-Proteine gebunden wurden, inkubiert. Die so an den "Beads" immun-absorbierten Proteinkomplexe wurden anschließend mit Hilfe von SDS-PAGE und Western Blots charakterisiert. In den vorliegenden Experimenten wurden die Immunpräzipitationen immer mit an Magnet-Kügelchen gebundenen Claudin-1 bzw. Claudin-4 oder Claudin-7-Antikörpern durchgeführt. Bei den hier exemplarisch dargestellten ko-immunpräzipitationen handelt es sich um die mit Claudin-1 Antikörpern erhaltenen ko-immunpräzipitate.

Aus CaCo-2 Zellen (Abb. 5.37 a-d), die mit dem OBG-Lysis-Puffer behandelt waren, konnten Claudin-1 und Claudin-7 in homo- und heterotypischen Komplexen mit Claudin-1 kopräzipitiert werden (Abb. 5.37 b, d). Dies gelang sowohl mit Antikörpern gegen Claudin-1 als auch mit Claudin-7-spezifischen Antikörpern. Claudin-4 konnte in CaCo-2-Lysaten jedoch weder mit Claudin-1 (Abb. 5.37 c) noch mit Claudin-7 (nicht gezeigt) ko-präzipitiert werden.

Wie in Abb. 5.37 gezeigt, konnten in den OBG-Lysaten der beiden einschichtig gewachsenen bronchialepithelialen Zell-Linien 16HBE (Abb. 5.37 e-h) und CaLu-3 (Abb. 5.37 i-m) Claudin-1 (Abb. 5.37 f und j) und Claudin-7 (Abb. 5.37 h und m) in heterotypischen Komplexen miteinander ko-präzipitiert werden. Im Gegensatz zur Linie CaCo-2, die in den physiologischen Untersuchungen zur TJ Barriere sowohl einen hohen transepithelialen elektrischen Widerstand aufbauten als auch für die verschiedenen FITCmarkierten Dextran-Partikel eine deutliche Diffusions-Barriere darstellten, konnte auch Claudin-4 mit Claudin-1 (Abb. 5.37 g) und Claudin-7 (nicht gezeigt) in der einschichtigen bronchialepithelialen Zell-Linie 16HBE ko-präzipitiert werden. In den bronchialepithelialen Kontrollzellen der Linie CaLu-3, die ähnlich wie CaCo-2-Zellen hohe TEER-Meßwerte erreichten und auch eine wesentlich bessere Barriere aufbauten als die bronchialepithelialen Zellen der 16HBE-Zell-Linie, aber dennoch sowohl für die fluoreszenz-markierten Dextran-Partikel als auch für LaCl<sub>3</sub> durchlässig waren, ließ sich Claudin-4 mit Claudin-1 und Claudin-7 ko-präzipitieren. Weitere untersuchte TJ-Transmembran-Proteine wie Occludin, Claudin-2, -3 und JAM-1 waren in den ko-immunpräzipitaten der epithelialen Zell-Linien nicht nachweisbar (nicht gezeigt).



Abb. 5.37: Nachweis heterotypischer Claudin-Komplexe in Zellen der epithelialen Linien CaCo-2, 16HBE und CaLu-3

a, e, i: Mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbte Kontrollen der Übertragung der Proteine vom Gel auf die PVDF-Membran. Biolabs Marker (M); ko-immunpräzipitate (IP); Magnet-Kügelchen die mit den Zell-Lysaten ohne Antikörper inkubiert worden waren (Pre); Magnet-Kügelchen mit Antikörpern (AK); Gesamtzell-Lysat (Z). Polypeptide der Linien CaCo-2 (a-d), 16HBE (e-h) und CaLu-3 (i-m) wurden mit TJ-Antikörpern (Claudin-1) ko-präzipitiert. Bei den CaCo-2-Zell-Lysaten konnte Claudin-1 mit Claudin-7, bei den 16HBE- und CaLu-3-Zell-Lysaten konnte Claudin-1 mit Claudin-7 und zusätzlich mit Claudin-4 ko-präzipitiert werden.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass in polaren Epithelzell-Linien, die eine signifikante Barriere - gemessen an hohen TEER-Meßwerten, einer Undurchlässigkeit für LaCl<sub>3</sub> und FITC-markierte Dextran-Partikel - bilden, wahrscheinlich eine Interaktion von Claudin-1 und Claudin-7 an der Bildung der TJ-Barriere beteiligt sein kann. Eine zusätzliche Interaktion von Claudin-4 hingegen ist grundsätzlich offenbar möglich, kann aber hinsichtlich seiner funktionellen Bedeutung noch nicht abschließend bewertet werden.

# 5.4 Charakterisierung verschiedener Tight Junction-Proteine in menschlichem Bronchialepithel in situ

In der histologischen Literatur wird das Bronchialepithel als ein einschichtiges Epithel mit "pseudostratifizierten" Eigenschaften behandelt (Abb. 5.38).



#### Abb. 5.38: Darstellung der typischen bronchialepithelialen Zelltypen in situ

Die elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme des Bronchialepithels zeigt, dass dieses Epithel aus verschiedenen Zelltypen, die alle an der Basalmembran inserieren, aber nicht alle das Lumen erreichen, besteht. Zu den Zelltypen, die das Lumen nicht erreichen, gehören die Basalzellen (Bs) und die einzelnen, im Bronchialepithel verstreut liegenden neuroendokrinen Zellen (in dieser Abbildung nicht zu sehen). Die Basalzellen fallen durch ein dunkles und organellen-armes Cytoplasma auf. Zu den Zelltypen, die das Lumen erreichen, gehören die Mucus bildenden und sezernierenden Becherzellen (Be) und die Cilien-tragenden Zellen (ZZ). Alle lumenständigen Zellen sind lang gestreckte Zylinderepithelzellen, deren schlanke Fortsätze sich zwischen den Basalzellen bis zur Basalmembran fortsetzen. Strichmarke: 10 µm

Die verschiedenen Zelltypen dieses Epithels sitzen der Basallamina auf, wobei nicht alle Zellen das Lumen erreichen. Neben den Basalzellen (Abb. 5.38; Bs), die das Lumen nicht erreichen, gibt es noch die neuroendokrinen Zellen (in dieser Abbildung nicht zu sehen) und die Mucus bildenden und sezernierenden Becherzellen (Abb. 5.38; Be) sowie die Cilientragenden Zellen (Weiss 1977; McDowell et al. 1978; Gould 1988; Inayama et al. 1988). Die basal gelegenen Zellen gelten als undifferenzierte Reserve- oder Stammzellen und fallen durch ein dunkles und organellen-armes Cytoplasma auf. Alle lumenständigen Zellen sind lang gestreckte Zylinderepithelzellen, deren schlanke, basalen Fortsätze sich zwischen den Basalzellen bis zur Basalmembran fortsetzen. Die adluminalen Zellen lassen sich relativ leicht unterscheiden, in solche, die einen dichten apikalen Cilien-Besatz tragen (Abb. 5.38; ZZ), und solche, die Schleim-Vesikel enthalten (Abb. 5.38; Be) (Rhodin 1966; McDowell et al. 1978; McDowell 1980).

# 5.4.1 Immunlokalisierung von Tight Junction-Proteinen in menschlichem Bronchialepithel *in situ*

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Kryostatschnitten des menschlichen Bronchialepithels zeigten eine für polare Epithelien typische Verteilung der TJ-Proteine (Bacher et al. 1992; Coyne et al. 2003). Occludin und Claudin-4 reagierten mehr oder weniger ausschließlich im apikolateralen Bereich der Zellen d.h. direkt unterhalb der Cilienbasen, ebenso wie Protein ZO-1 und Cingulin, wohingegen erstaunlicher Weise Antikörper gegen Claudin-1 und Claudin-7 größte Teile der lateralen Zellgrenzen anfärbten (Abb. 5.39). Bei der intensiv roten Färbung der Zellen nach Inkubation mit Antikörpern gegen Claudin-4 handelte es sich z.B. um eine Hintergrundfärbung, wobei wahrscheinlich Zweit-Antikörper z.T. am schleimigen Inhalt der Becherzellen haften blieben.



Abb. 5.39: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von Tight Junction-Proteinen in menschlichem Bronchialepithel *in situ* 

Die Immunfluoreszenzen mit Antikörpern gegen die Claudine -1, -4 und -7, sowie die Fluoreszenzen mit Occludin, Cingulin und Protein ZO-1 ergeben eine für TJ in polaren Epithelien typische Färbung. Occludin, Claudin-4, Protein ZO-1 und Cingulin erscheinen als fein gezeichnete Linien in den apikolateralen Membranen unterhalb des Cilien- bzw. Mikrovilli-Besatzes. Claudin-1 und Claudin-7 zeigen, wie in den mehrschichtigen Epithelien eine Färbung der gesamten Zellgrenzen von basal bis apikal, wobei die Claudin-1 Färbung nach apikal abnahm. Zellkerne (blau). Im Bindegewebe unterhalb der Basalmembran (gestrichelte Linie) sah man manchmal eine Hintergrundfärbung durch die Akkumulation von Antikörpern im fetthaltigen Gewebe. Strichmarke: 20 µm

# 5.4.2 Ultrastrukturelle Untersuchung von Tight Junctions in menschlichem Bronchialepithel *in situ*

Da die Lokalisierung der TJ-Proteine mit indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie an Kryostatschnitten einen ersten Hinweis darauf gegeben hatte, dass in der apikolateralen Zellmembran TJ-Strukturen zu finden sein könnten, wurden die TJ dieser Zellen mit elektronenmikroskopischen Methoden *in vivo* untersucht.

### 5.4.2.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Ultradünnschnitten

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Ultradünnschnitten des menschlichen Bronchialepithels (Abb. 5.40) ließen sich neben Desmosomen (Abb. 5.40; D) und Adhärenz-Verbindungen (Abb. 5.40; AJ, Klammer) auch TJ-artige Strukturen (Abb. 5.40; Klammer) am apikalen Ende der lateralen Membran der Zellen direkt unterhalb der Zentriolen-Cilienansatz-Ebene (Abb. 5.40; C) erkennen.



Abb. 5.40: Ultrastrukturelle Untersuchung der Tight Junctions in menschlichem Bronchialepithel *in situ* 

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Plasmamembran der bronchialepithelialen Zellen, hier zwischen zwei Cilien-tragenden adluminalen Zellen, zeigen Desmosomen (D), Adhaerens Junctions (AJ) und in der apikolateralen Region der Plasmamembran TJ-artige Strukturen (TJ). Auf der apikalen Membran der bronchialepithelialen Zellen ist ein dichter Mikrovilli- (Mv) bzw. Cilien (C)-Besatz erkennbar. Strichmarke: 0,5 nm

Zur Gefrierbruch-Darstellung der Zell-Zell Verbindungsstrukturen normalen Bronchialepithels soll, da kein frisches menschliches Gewebe zur Verfügung stand, hier auf ein Bild aus der Literatur (Godfrey 1997) zurückgegriffen werden (Abb. 5.41).



#### Abb. 5.41: Elektronenmikroskopische Gefrierbruch-Darstellung des Netzwerkes von reliefstrang-artigen Tight Junction-Strukturen in der apikolateralen Membran des menschlichen Bronchialepithels *in situ*

Die z.T. ausgedehnten TJ-Strukturen dieser Zellen (Klammer am linken Rand) bilden in der apikolateralen Plasmamembran der bronchialepithelialen Becherzellen (Be) und Cilien-tragenden Zellen (ZZ) eine geschlossene *Zonula occludens*. Die TJ-Strukturen der beiden unterschiedlichen Zelltypen zeigen geringe Variationen in Anzahl und Komplexizität der strangartigen Strukturen. Neben den Cilien sind auch z.T. quergebrochene (qMv) und nicht gebrochene Mikrovilli (Mv) auf der apikalen Membran des Bronchialepithels zu sehen. Vergrößerung: 327.000:1, (aus: Godfrey et *al.,* 1997)

Die strangartigen TJ-Strukturen direkt unterhalb der z.T. quergebrochenen Mikrovilli (qMv) und Cilien (Z) auf der apikalen Membran sind deutlich zu erkennen. Bei diesen Strukturen handelt es sich um TJ-Strukturen zwischen einer Cilien-tragenden Zelle (ZZ) und einer anscheinend noch nicht voll differenzierten Becherzelle (Be) des menschlichen Bronchus. Der am linken Bildrand mit einer Klammer markierte Bereich der strangartigen TJ-Strukturen beinhaltet bis zu 12 Stränge mit vielen Strangvernetzungen. In der rechten Ecke der linken Zelle ist anscheinend eine trizelluläre Region zu erkennen, die durch drei aneinandergrenzende Zellen gebildet wird.

### 5.4.3 Charakterisierung der verschiedenen Zelltyp-Differenzierungs-"Marker" in menschlichem Bronchialepithel *in situ*

Um zu untersuchen, ob eine Veränderung der TJ-Strukturen während der Transformation des Bronchialepithels in eine Platten-Metaplasie (PEM) zu beobachten ist, war es zunächst erforderlich, weitere Proteine zu charakterisieren, mit derer Hilfe man den jeweiligen Differenzierungszustand der Zellen feststellen könnte. Zu diesen Proteinen können verschiedene Differenzierungs-Marker gezählt werden, welche bereits in der pathologischen Diagnostik Anwendung finden. Neben den Cytokeratinen (CK) gehören dazu auch die desmosomalen Cadherine, hier vor allem die Desmogleine Dsg1-3.

#### 5.4.3.1 Immunlokalisierung der Cytokeratine im Bronchialepithel

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Kryostatschnitten nach Inkubation mit verschiedenen Cytokeratin-Antikörpern wiesen die typische Lokalisierung der Cytokeratine in menschlichem Bronchialepithel nach. Das Muster der jeweiligen Cytokeratin-Bildung in menschlichem Bronchialepithel in situ verdeutlichte, dass dieses Gewebe gewisse Gemeinsamkeiten sowohl mit einschichtigen als auch mit mehrschichtigen Epithelien hat. So wiesen die adluminalen, hochprismatischen Zellen ein Cytoskelett-Proteinmuster auf, das dem der einschichtigen Epithelien entsprach: Sie bilden Filamente, die CK 8 und CK 18 (Abb. 5.42) enthalten, d.h. die für einschichtige Epithelien typischen Cytokeratine, sie enthalten aber auch die Cytokeratine CK 7 und CK 19 (nicht gezeigt). Die in den Basalzellen bestimmter mehrschichtiger Epithelien synthetisierten CK 5 und CK 14 (Abb. 5.42) sind auch in den Basalzellen des Bronchialepithels nachweisbar (Nelson und Sun 1983; Sun et al. 1983; Bosch et al. 1988; Lersch und Fuchs 1988; Purkis et al. 1990). Weiterhin fanden sich in den Basalzellen die Cytokeratine CK 6 (nicht gezeigt), CK 15 und CK 17 (Czernobilsky et al. 1984). Einige basale Zellen zeigten auch eine Filamentfärbung mit CK 20 (Abb. 5.42). Bei diesen Zellen handelte es sich wahrscheinlich um die neuroendokrinen Zellen, die nur vereinzelt in normalem menschlichem Bronchialepithel vorkommen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das menschliche Bronchialepithel die typischen Vertreter der Intermediärfilament-Polypeptide einschichtiger Epithelien: (CK 7, CK 8, CK 18 und CK 19) enthält. Zudem werden in bestimmten Zellen CK 5, CK 6, CK 14, CK 15 und CK 17 synthetisiert, die als charakteristische Cytoskelett-Bestandteile komplexer Epithelien gelten und in unterschiedlichem Ausmaß in mehrschichtigen Epithelien synthetisiert werden. Die gezeigten Ergebnisse entsprechen der bisher publizierten Verteilung der Cytokeratine in menschlichem Bronchialepithel (Moll et al. 1982; Moll et al. 1989; Troyanovsky et al. 1989; Moll 1990).

Besonders CK 4 und CK 13 gelten dabei als "Marker" mehrschichtiger, nicht-verhornter Epithelien, wobei ihr immunhistochemischer Nachweis meist auf die ersten suprabasalen Zellschichten beschränkt ist (Franke 1986; Leube et al. 1988; Bosch et al. 1989; Kuruc et al. 1989; Leube und Rustad 1991). Im Bronchialepithel reagieren Antikörper gegen CK 4 und CK 13 dabei meist in vereinzelten Zellen oder Zellgruppen (Broers et al. 1988; Broers et al. 1989; Leube und Rustad 1991).



Abb. 5.42: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von Cytokeratinen menschlichem Bronchialepithel *in situ* 

Die Aufnahmen zeigen, dass die Verteilung bzw. Expression der Cytokeratine des Bronchialepithels gewisse Gemeinsamkeiten sowohl mit einschichtigen als auch mit mehrschichtigen Epithelien aufweist. Die adluminalen, hochprismatischen Zellen weisen einen Phänotyp auf, der dem der einschichtigen Epithelien entspricht, da sie z.B. die für einschichtige Epithelien typischen CK8/18 synthetisieren. In den flachen Basalzellen fanden sich hingegen hauptsächlich die für die basalen Zellschichten einiger mehrschichtiger Epithelien typischen Cytokeratine CK5, CK14, CK15 und CK17. Antikörper gegen CK20 stellten nur vereinzelte Zellen im menschlichen Bronchialepithel dar, was der typischen Verteilung von neuroendokrinen Zellen in diesem Gewebe entspricht. Die Grenzen zum Bindegewebe sind durch eine weiße gestrichelte Linie dargestellt. Zellkerne (blau). Strichmarke: 20 µm

in

#### 5.4.3.2 Verteilung desmosomaler Proteine im menschlichen Bronchialepithel

Desmosomen-bildende Proteine sind als weitere "Marker" zur Unterscheidung verschiedener epithelialer Differenzierungsstadien in Plattenepithelien bekannt (Franke et al. 1981; Franke et al. 1982; Garrod 1990; Kapprell 1990; Schwarz et al. 1990; Schäfer 1997; Bazzi et al. 2006). Desmosomen vermitteln dabei den Kontakt zwischen Epithelzellen und dienen als Verankerungsstrukturen für die Intermediärfilamente vom Cytokeratin-Typ (Franke et al. 1981; Franke et al. 1982; Geiger et al. 1983). Um die unterschiedliche Differenzierung zwischen gesundem Bronchialepithel und PEM anhand der desmosomalen Proteine untersuchen zu können, wurden zunächst immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt (Abb. 5.43).



Abb. 5.43: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung desmosomaler Proteine in menschlichem Bronchialepithel *in situ* 

Die für suprabasale Zellschichten mehrschichtiger Epithelien typischen desmosomalen Cadherine Dsg 1 und Dsg 3 sind im Bronchialepithel negativ. Dsg 2 und Desmoplakin dagegen sind hier stets in den desmosomalen Strukturen aller Zellen des Bronchialepithels enthalten. Die Grenzen zum Bindegewebe sind durch gestrichelte weiße Linien dargestellt. Zellkerne (blau). Strichmarke: 20 µm

Im komplexen Epithel des menschlichen Bronchus zeigte sich Desmoplakin (Abb. 5.43) in den Desmosomen aller Zellen. Auch das für die basalen Zellschichten mehrschichtiger Epithelien und polarer Epithelien beschriebene desmosomale Cadherin Desmoglein Dsg 2 wurde an den Desmosomen aller Zellen nachgewiesen. Antikörper gegen die beiden Desmogleine Dsg 1 und Dsg 3 dagegen die typisch für die suprabasalen Zellschichten mehrschichtiger Epithelien sind, lieferten im menschlichen Bronchialepithel kein Signal.

## 5.5 Verteilung verschiedener Cytoskelett- und Zell-Zell-Verbindungsproteine in Plattenepithelmetaplasien der menschlichen Lunge *in situ*

Es ist bekannt, dass das menschliche Bronchialepithel auf den ständigen Einfluss von schädlichen Noxen wie z.B. Zigarettenrauch oder Staubpartikel, mit der Bildung einer Plattenepithelmetaplasie (PEM) reagieren kann. Diese PEM ist normalerweise reversibel, kann aber auch die Grundlage für die Bildung eines Plattenepithelkarzinoms z.B. in der Lunge sein, d.h. zum weltweit am häufigsten vorkommenden Tumor des Mannes führen (Beresford 1981; Lugo und Putong 1984; Slack 1986). Die PEM wird in den Lehrbüchern als eine Transformation eines bestimmten Gewebetyps in einen anderen differenzierten definiert. Nahezu alle komplexen Epithelien, d.h. Epithelien, die basale Zellen und hochprismatische, adluminale Zellen enthalten, sind in der Lage, PEM zu bilden. Hauptsächlich wurden PEM in den Oberflächenepithelien des luftleitenden Systems (Auerbach et al. 1957; Auerbach et al. 1961; Niimi et al. 1987; Yamamoto et al. 1987; Leube und Rustad 1991) und im Cervixepithel (Moll et al. 1983; Czernobilsky et al. 1984; Huszar et al. 1986; de Boer et al. 1999) beschrieben.

### 5.5.1 Reaktionen von Differenzierungs-Markern in der Plattenepithelmetaplasie der Lunge

#### 5.5.1.1 Immunlokalisierung der Cytokeratine in Plattenepithelmetaplasien

Aus der Literatur war bekannt, dass bei der Bildung der PEM zum Teil starke Veränderungen im Cytokeratin-Muster stattfinden. So sind CK 7 und CK 20 oft in PEM überhaupt nicht mehr nachweisbar (siehe auch Moll 1990). In dieser Arbeit sollte zunächst das CK-Muster im Vergleich zum gesunden Bronchialepithel untersucht werden. Dazu wurden Gewebeschnitte mit Antikörpern gegen CK 8/18, CK 4, CK 5, CK 13, CK 14, CK 15, CK 17 und CK 19 durchgeführt. Wie in Abb. 5.44 zu sehen ist, konnten CK 8, 18 und 19 in fast allen Zellen nachgewiesen werden (Abb. 5.44).

Die basalzell-typischen Cytokeratine CK 5, CK 14, CK 15 verhielten sich in den PEM recht unterschiedlich in Vergleich zum normalen Bronchialepithel. So waren CK 5 (Abb. 5.44) und CK 14 (nicht gezeigt) hauptsächlich in der Basalzellschicht und gelegentlich auch in einzelnen suprabasal gelegenen Zellen nachweisbar. Ihre Synthese schien damit in der PEM nicht wesentlich beeinflusst zu sein. Die Bildung von CK 6 und CK 16 (nicht gezeigt) sowie von CK 15 und CK 17 (Abb. 5.44) dagegen war im Vergleich zum gesunden Bronchialepithel

durchweg erhöht (Obara et al. 1988; Leube und Rustad 1991). Auch die stratifizierungsassoziierten CK 4 (nicht gezeigt) und CK 13 (Abb. 5.44) waren in verstärktem Maße und zwar in vielen Zellen der PEM zu finden (Moll et al. 1982; Moll et al. 1983; Moll 1985; Huszar et al. 1986; Moll 1986; Moll et al. 1986; van Muijen et al. 1986; Leube und Rustad 1991). Dies steht im Gegensatz zum begrenzten Vorkommen dieser stratifizierungs-assoziierten Cytokeratine in Zellen des gesunden Bronchialepithels und spricht für eine erhöhte Differenzierungsleistung innerhalb der Zellen der PEM. Die für verhornende mehrschichtige Epithelien typischen Cytokeratine CK 1, CK 10 und CK 11 jedoch waren - wie schon im gesunden Bronchialepithel - auch in PEM Strukturen nicht nachweisbar.

Zusammenfassend kann man sagen, dass keine PEM-Zelle in ihrer Cytoskelett-Zusammensetzung den Zellen des normalen Bronchialepithels entspricht. Dies verdeutlicht, dass umfangreiche Veränderungen der Gewebedifferenzierung während der Bildung der PEM stattfinden.
Ergebnisse



Abb. 5.44: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung einiger Cytokeratine in menschlichen Plattenepithelmetaplasien der Lunge *in situ* 

Die Aufnahmen der verschiedenen Cytokeratine zeigen, dass in der PEM ihre Verteilung im Vergleich zum gesunden Bronchialepithel verändert ist. Typische Cytokeratine von einschichtigen Epithelien wie CK 8, CK 18 und CK 19 sind in fast allen Zellen der PEM nachweisbar, wenn auch oft in unterschiedlicher Intensität. Die Verteilung der basalzell-typischen CK ist in der PEM unterschiedlich verändert. CK 5 ist weiterhin hauptsächlich in den basalen Zellen nachweisbar und nur vereinzelt in den darüber liegenden Zellen. Dagegen ist CK 15 im Vergleich zum gesunden Bronchialepithel in den basalen Zellen und in den ersten suprabasalen Zellen nachweisbar. Das stratifizierungs-typische CK 13 ist zusätzlich in vielen suprabasalen Zellen nachweisbar. Die Grenzen zum Bindegewebe sind durch gestrichelte, weiße Linien gekennzeichnet. Zellkerne (blau) gefärbt. Strichmarke: 20 µm

#### 5.5.1.2 Desmosomale Proteine in menschlichen Plattenepithelmetaplasien in situ

Die desmosomalen Proteine eignen sich neben den Cytokeratinen ebenfalls als Differenzierungs-Marker (Franke et al. 1983; Schwechheimer et al. 1984; Moll et al. 1986; Parrish et al. 1986; Moll et al. 1997; Mertens et al. 1999; Papagerakis et al. 2003; Furukawa et al. 2005; Schwarz et al. 2006). Um die Differenzierung in der PEM mit der von gesunden Plattenepithelien vergleichen zu können, wurden deshalb auch die desmosomalen Proteine im Respirationstrakt der PEM untersucht (Abb. 5.45).



Abb. 5.45: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung desmosomaler Proteine in menschlichen Plattenepithelmetaplasien der Lunge *in situ* 

Das stratifizierungs-typische desmosomale Cadherin Dsg 3 zeigt in den Aufnahmen eine Färbung der Zellgrenzen sehr vieler Zellen der PEM, besonders im suprabasalen Bereich. Dsg 1 hingegen ist in der PEM negativ. Dsg 2, das typische desmosomale Cadherin der basalen Zellen, und Desmoplakin sind in allen Zellgrenzen positiv. Die Grenzen zum Bindegewebe sind durch gestrichelte, weiße Linien gekennzeichnet. Zellkerne (blau). Strichmarke: 20 µm

Neben den cytoplasmatischen Plaque-Proteinen Desmoplakin (Abb. 5.45), Plakoglobin und Plakophilin PKP2 (hier nicht gezeigt) und dem basalzelltypischen Desmoglein Dsg 2 (Abb. 5.45; Dsg 2) fand sich in der PEM auch das Desmoglein Dsg 3 (Abb. 5.45; Dsg 3) in den Desmosomen der Zellen der PEM besonders in suprabasalen Bereichen. Das nur in suprabasalen Schichten mehrschichtiger Epithelien vorkommende Desmoglein Dsg 1 (Abb. 5.45; Dsg 1) dagegen konnte in der PEM nicht nachgewiesen werden.

Verglichen mit den Beobachtungen in gesundem Bronchialepithel, zeigen diese Ergebnisse, dass in einer PEM nicht nur eine Vermehrung der Zellschichten des vorher einschichtigen Bronchialepithels stattfindet, sondern dass die Zellen anscheinend auch Differenzierungs-Schritte durchmachten, die u.a. dazu führen, dass sich Desmoglein Dsg 3 - in bestimmten suprabasalen Schichten nachweisen lassen.

#### 5.5.2 Lokalisierung von Tight Junction-Proteinen in Plattenepithelmetaplasien der Lunge *in situ*

Ob die drastische histologische Veränderung während der PEM-Bildung (Stratifizierung und Differenzierung des Epithels) einen Einfluss auf die Anordnung von TJ-Strukturen und das Muster der TJ-Proteine hatte, sollte ebenfalls mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikoskopie untersucht werden. Für diese Untersuchungen der TJ-Protein-Komposition wurden dieselben PEM-Präparate verwendet, wie für die Untersuchungen der Cytokeratine und desmosomalen Proteine.

Claudin-1 war dabei praktisch in allen Zellschichten nachweisbar, Claudin-7 meist in den oberen Schichten der PEM der Lunge *in situ* (Abb. 5.46). Dagegen konnten Reaktionen von Occludin und Claudin-4 ausschließlich in der obersten Zellschicht erkannt werden und zwar exakt an den apikolateralen Zell-Zell-Verbindungen. Dasselbe war auch für das Protein ZO-1 festzustellen (Abb. 5.46). Occludin und Cingulin reagierten vereinzelt an Membranen an Grenzen anderer Zellschichten (Abb. 5.46), jedoch konnte die Signifikanz solcher gelegentlicher Reaktionen nicht gesichert werden.



## Abb. 5.46: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von Tight Junction-Proteinen in Plattenepithelmetaplasien des menschlichen Bronchialtrakts *in situ*

Occludin lässt sich in apikolateralen der obersten, manchmal der zwei obersten Membranen der Zellschichten darstellen, Protein ZO-1 und Claudin-4 zeigen ausschließlich eine Markierung in den apikolateralen Grenzen der obersten Zellschicht. Cingulin reagiert ebenfalls in dieser Weise. Claudin-1 zeigt in der PEM eine Färbung der gesamten Plasmamembranen fast aller Zellen von basal bis apikal, Claudin-7 hingegen färbt 2-3 der obersten Zellschichten, jedoch nicht die basalen Zellen. Im Bindegewebe unterhalb der Basallamina (gestrichelte weiße Linie) findet sich eine Hintergrundfärbung durch die Akkumulation von Antikörpern im fetthaltigen Gewebe. Strichmarke: 20 µm

#### 5.6 Untersuchung des 16HBE AIC-Zellkulturmodells der Plattenepithelmetaplasie des Bronchialtrakts

Als Zellkulturmodell für die PEM der Lunge wird in der Literatur von einigen Autoren die unter 5.2.2 bereits charakterisierte bronchialepitheliale Zell-Linie 16HBE angesehen (vgl. Ehrhardt et al. 2002 und darin zitierte Literatur), da die 16HBE-Zellen unter bestimmten Zellkultur-Bedingungen mehrschichtig wachsen können. Aus diesem Grund sind solche mehrschichtig erscheinenden 16HBE-Zellkulturen auf die verschiedenen Differenzierungs-Marker und TJ-Proteine hin vergleichend untersucht werden.

#### 5.6.1 Charakterisierung der Differenzierungs-Marker im 16HBE AIC-Zellkulturmodell

Bei dem 16HBE Zellkulturmodell für die Plattenepithelmetaplasie (PEM) handelt es sich um 16HBE-Zellen, die mit Hilfe der "Air Liquid Interface" (AIC) Technik gehalten und so zu mehrschichtig erscheinenden Kulturen verändert. Das bedeutet, dass diese Zellen dabei von der basalen Seite her mit Kulturmedium versorgt und auf der apikalen Seite keinem Flüssig-Medium, sondern allein der Luft ausgesetzt waren.

#### 5.6.1.1 Immunlokalisierung der Cytokeratine in mehrschichtig gewachsenen 16HBE-Zellkulturen

Um festzustellen, ob das 16HBE AIC-Zellkulturmodell als ein befriedigendes Modell für die PEM dienen kann, wurden zunächst Änderungen der Cytoskelett-Differenzierung in den mehrschichtig gewachsenen Zellkulturen an Paraffin- und Kryostatschnitten untersucht. Da die Ergebnisse der Immunlokalisierungen der untersuchten Proteine keine signifikanten Unterschiede zwischen Kryostat- und Paraffinschnitten zeigten, wurden hier ausschließlich die Ergebnisse der Paraffinschnitte dargestellt, da bei diesen mit einer wesentlich besseren Strukturerhaltung zu rechnen war.

Eine drastische Reduktion einfacher Cytokeratine wie CK 7 (nicht gezeigt) und CK 20 (Abb. 5.47) war auch in der Zellkultur nachweisbar. Auch Cytokeratin CK 19 (Abb. 5.47), das in der PEM *in situ* nicht signifikant reduziert war sowie die Cytokeratine CK 8 und CK 18 (Abb. 5.47) ließen sich in dem Zellkulturmodell in Zellen aller Schichten nachweisen. Im Vergleich zum gesunden Bronchialepithel und zur PEM war die Bildung der basalzelltypischen Cytokeratine CK 5, CK 14 und CK 15 jedoch stark verändert: Während die Cytokeratine CK 5 (Abb. 5.47) und CK 14 (nicht gezeigt) hier keineswegs nur auf die

Basalzellen beschränkt waren, waren die Cytokeratine CK 6 und CK 16 (nicht gezeigt) bzw. CK 15 und CK 17 (Abb. 5.47), deren Expression in der PEM *in situ* noch signifikant erhöht war, im Zellkulturmodell überhaupt nicht mehr nachweisbar. Stratifizierungs-assoziierte Cytokeratine wie CK 4 und CK 13 oder gar die Cytokeratine CK 1, CK 10 und CK 11 waren im 16HBE-Zellkulturmodell ebenfalls nicht nachweisbar (Ergebnisse nicht gezeigt).

Daher muss man allein schon aus diesem Ergebnis folgern, dass die im AIC-Modell gewachsenen Kulturen der 16HBE-Linie zwar im Querschnitt mehrschichtig erscheinen, diese Struktur aber in der Zelldifferenzierung der Schichten keine gesicherte vertikale Differenzierung der Zellstrukturen wie in der Synthese der entsprechenden "Marker"-Moleküle erkennen lässt. Sie stellt also im Zell- und Molekularbiologischen Sinn kein Zellkultur-Modell der PEM dar.

Die Zell-Linie CaLu-3 (Abb. 5.48) die aus einem bronchialen Adenokarzinom gewonnen worden war, sollte zusätzlich als Kontrolle für Zellen bronchialepithelialer Herkunft auch im AIC-Zellkulturmodell geprüft werden. Aus diesem Grund wurden sie den gleichen Versuchsbedingungen unterworfen, wie die 16HBE-Zellen.

Dabei wuchsen die Zellen unter AIC-Bedingungen als einschichtige Kultur, wobei lediglich einige wenige lokale Ansätze von Mehrschichtigkeit ("Mounds") gebildet wurden. Neben den für diese Zellen ohnehin typischen Cytokeratine CK 8, CK 18, CK 19 und CK 20 konnten auch die basalzell-typischen Cytokeratine CK 5, CK 15 und CK 17 (Abb. 5.48) in den meisten Zellen nachgewiesen werden; manche kommen wohl in allen vor. Die stratifizierungs-assoziierten Cytokeratine CK 4, CK 13 bzw. CK 1, CK 10 und CK 11 (nicht gezeigt) waren in den CaLu-3 Zellen auch unter diesen AIC-Bedingungen dagegen nicht zu beobachten.



### Abb. 5.47: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von Cytokeratinen im mehrschichtigen 16HBE-Zellkulturmodell

Die Reaktionen der verschiedenen Cytokeratine zeigen, dass das 16HBE-Zellkultur-Modell kein Abbild der PEM bzw. normaler mehrschichtiger Epithelien ist. Alle Zellen dieses Kulturmodells zeigen ein für einschichtige Epithelien charakteristisches Cytokeratin-Muster. Für einschichtige Epithelien typische CK 8/18 und CK 19 finden sich in allen Zellen. Durch die bronchialepitheliale Herkunft der 16HBE-Zellen ist das Vorkommen des hauptsächlich in den basalen Zellschichten der mehrschichtigen Epithelien vorkommenden Cytokeratins CK 5 zu erklären, das aber hier ebenfalls in allen Schichten zu finden ist, oft sogar besonders stark in der obersten. Die Cytokeratine CK 15, CK 17 und CK 20 sind im Zellkulturmodell negativ bzw. wiesen gelegentlich einzelne Zellen mit charakteristischer Reaktion auf. Das Cytokeratin-Muster zeigt, dass es sich bei dem 16HBE AIC-kultivierten Zellkulturmodell zwar um ein mehrschichtig erscheinendes Zellkulturmodell handelt, dass aber eine entsprechende Differenzierungsleistung der einzelnen Zellen ausbleibt. Die Abgrenzung zum Polyesterfilter ist durch eine gestrichelte, weiße Linie gekennzeichnet. Zellkerne (blau). Strichmarke: 20 µm



### Abb. 5.48: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von Cytokeratinen in CaLu-3-Zellen, die in AIC-Kulturen gehalten waren

Zellen aller Schichten können hier sowohl die für die einschichtige Epithelien typischen Cytokeratine CK 8/18, CK 19 und CK 20 als auch die typischen Cytokeratine CK 5, CK 15 und CK 17 der Basalzellen mehrschichtiger Epithelien produzieren. Die Abgrenzung zum Polyesterfilter ist durch eine gestrichelte, weiße Linie gekennzeichnet. Zellkerne (blau). Strichmarke: 20 µm

# 5.6.1.2 Anordnung desmosomaler Proteine in Kulturmodellen bronchialepithelialer Zellen

Nachdem das Fehlen der stratifizierungs-assoziierten Cytokeratine CK 4 und CK 13 im mehrschichtigen 16HBE Zellkulturmodell bereits darauf hindeutete, dass es sich bei diesem Zellkulturmodell zwar um eine Aufeinanderschichtung von Zellen handelt, dabei aber die apikal liegenden Zellen kein anderes Differenzierungsmuster aufweisen, als die der Basalzellschicht, sollten zur weiteren Prüfung dieser im Gegensatz zur Literatur stehenden Aussage die desmosomalen Proteine als Differenzierungsmarker hinzugezogen werden.

AIC-Zellkulturmodell Im mehrschichtigen 16HBE ließ sich neben dem cytoplasmatischen Plaque-Protein der desmosomalen Strukturen, Desmoplakin, nur das für die basalen Zellschichten typische Desmoglein 2 (Abb. 5.49) nachweisen, und zwar in allen Schichten. Die stratifizierungs- und differenzierungs-assoziierten Desmogleine Dsg 3 und Dsg 1 wurden in den mehrschichtig gewachsenen 16HBE-Zellen überhaupt nicht synthetisiert (Abb. 5.49). Diese Ergebnisse unterstützen somit die Befunde der Cytokeratin-Synthese und wiesen erneut darauf hin, dass bei dem mehrschichtigen 16HBE Zellkulturmodell zwar eine gleichmäßige Aufschichtung der Zellen stattfand, eine terminale Differenzierung jedoch ausblieb.



Abb. 5.49: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung desmosomaler Proteine im 16HBE AIC-Zellkulturmodell

Dsg 1 und Dsg 3 sind im mehrschichtigen bronchialepithelialen 16HBE-Zellkulturmodell negativ. Dsg 2 und Desmoplakin lassen sich an den Zellgrenzen aller Schichten des Zellkulturmodells nachweisen. Zellkerne (blau). Die Abgrenzung zum Polyesterfilter ist durch eine gestrichelte, weiße Linie gekennzeichnet. Strichmarke: 20 µm

Die zur Kontrolle verwendeten CaLu-3-Zellen wuchsen selbst in AlC-Kulturen nur einschichtig, wobei bei anwachsender Zellzahl diverse Zellen nach oben geschoben wurden ohne abzusterben. Die so entstandenen "Mounds" zeigten außerdem, wie das 16HBE-Zellkulturmodell - keine Differenzierungsleistung. Auch in den CaLu-3-Zellkulturen ließ sich neben dem desmosomalen Plaque-Protein Desmoplakin (Abb. 5.50) nur das desmosomale Cadherin Desmoglein Dsg 2 (Abb. 5.50) an den Zellgrenzen - in dem für desmosomale Strukturen typischen punktuellen Färbemuster - nachweisen. Die stratifizierungs-assoziierten

desmosomalen Cadherine Dsg 3 und Dsg 1 konnten auch in diesen Zellkulturen nicht nachgewiesen werden (Abb. 5.50).



Abb. 5.50: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung desmosomaler Proteine im CaLu-3 AIC-Zellkulturmodell

Dsg 1 und Dsg 3 waren im CaLu-3-Zellkulturmodell negativ. Dsg 2 und Desmoplakin reagieren an Zellgrenzen aller Zellen der CaLu-3-Zellkultur. Die Abgrenzung zum Polyesterfilter ist durch eine gestrichelte, weiße Linie gekennzeichnet. Zellkerne (blau). Strichmarke: 20 µm

# 5.6.2 Charakterisierung von Tight Junction-Proteinen in mehrschichtigen bronchialepithelialen Zellkulturmodellen

In der PEM der menschlichen Lunge zeigten die Immunlokalisierungen der TJ-Proteine die für die *Zonula occludens* typische Färbung in den obersten Zell-Lagen (5.4.2). Da das mehrschichtig erscheinende 16HBE-Zellkulturmodell in der pharmazeutischen Forschung vor allem für Experimente zur Stoffaufnahme pharmazeutischer Präparate eingesetzt wird,

schien es hier besonders wichtig zu sein, die möglichen Barriere-Eigenschaften – auch im Hinblick auf Bezüge zur PEM – zu überprüfen.

# 5.6.2.1 Biochemischer Nachweis von Tight Junction-Proteinen in mehrschichtig erscheinenden 16HBE-Zellen

Die Proteine der Zell-Lysate der 16HBE AIC-Zellen und der bronchialepithelialen Zellkulturkontrolle (CaLu-3) wurden durch SDS-PAGE (siehe 4.3.3) aufgetrennt. Im Western Blot-Verfahren (siehe 4.3.5.3) wurden mit spezifischen Antikörpern verschiedene TJ-Proteine nachgewiesen (Abb. 5.51). Als Positiv-Kontrolle wurden Lysate von Bon- und CaCo-2-Zellen verwendet.



### Abb. 5.51: Biochemischer Nachweis verschiedener Tight Junction-Proteine in AIC-Zellkulturen der bronchialepithelialen Linien 16HBE und CaLu-3

Polypeptide der Gesamtproteinlysate von 16HBE, CaLu-3, CaCo-2- (c-d) und Bon- (b) Zellen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen, mit Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt (a) bzw. anschließend nach dem Western Blot-Verfahren analysiert (b-d). Die mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbte PVDF-Membran (a) zeigt, dass der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran gelungen ist. Für Claudin-3 (b), Claudin-4 (c) und Claudin-7 (d) (~23 kDa) wurden spezifische Banden in den beiden mehrschichtig erscheinenden AIC-Linien (16HBE und CaLu-3) und der Kontrollen (Bon oder CaCo-2) festgestellt.

Die Ergebnisse für Claudin-3 (b), Claudin-4 (c) und Claudin-7 (d) sind in Abb. 5.51 dargestellt. Sowohl das anscheinend mehrschichtig gewachsene 16HBE AIC-Zellkulturmodell als auch die in gleicher Weise gehaltenen CaLu-3-Zellen waren positiv für Claudin-3, Claudin-4 und Claudin-7. Neben diesen drei gezeigten Claudinen wurden die TJ-Proteine Occludin, Cingulin, Symplekin, Protein ZO-1, Claudin-1, Claudin-2 und Claudin-5 auf ihr Vorkommen geprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.6 zusammengefasst.

Während die Transmembranproteine Occludin, Claudin-1 und Claudin-5 in beiden Zellkulturen nachgewiesen wurden, konnte Claudin-2 in keiner der beiden bronchialepithelialen Zell-Linien entdeckt werden (Tab. 5.6). Die Plaque-Proteine Cingulin, Symplekin und Protein ZO-1 wurden sowohl in den 16HBE-AIC als auch in den CaLu-3 AIC-

Zellen erkannt. Das lässt darauf schließen, dass in beiden Zell-Linien die verschiedenen Transmembranproteine über die genannten cytoplasmatischen Plaque-Proteine mit dem Aktin-Cytoskelett verbunden vorlagen. Die Ergebnisse der entsprechenden einschichtigen Zellkulturen (ML) wurden bereits unter 5.2.2.2 beschrieben.

Tab. 5.6: Zusammenfassung der biochemischen Analyse der Tight Junction-Proteine in AICkulturen der bronchialepithelialen Linien 16HBE und CaLu-3

	Occludin	Cingulin	Symplekin	ZO-1	CI-1	CI-2	CI-3	CI-4	CI-5	CI-7
16HBE	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
CaLu-3	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

# 5.6.2.2 Immunlokalisierungen von Tight Junction-Proteinen in mehrschichtigen bronchialepithelialen Zellkulturmodellen

Die Immunfluoreszenzmikroskopie des 16HBE AIC-Zellkultur-Modells ergab ein völlig anderes Ergebnis als erwartet (Abb. 5.52). Die Reaktionen mit Claudin-1- bzw. Claudin-7 Antikörpern wiesen das für mehrschichtige Epithelien typische Bild auf, d.h. starke Reaktionen an den Plasmamembranen der Zellen aller Schichten von basal bis apikal. Neu war jedoch das Färbemuster der anderen TJ-Proteine. Sowohl die Transmembranproteine (Occludin und Claudin-4) als auch beide Plaque-Proteine (Cingulin und Protein ZO-1) reagierten so - wie bereits für Claudin-1 und Claudin-7 beschrieben - an den lateralen Plasmamembranen aller Zellen (Abb. 5.52).

Vergleichbare Reaktionen boten auch die CaLu-3 AIC-Zellkulturen (Abb. 5.53): Antikörper gegen die TJ-Proteine Occludin, Claudin-1, Claudin-4, Claudin-7, Protein ZO-1 und Cingulin reagierten mit den Plasmamembranen aller Zellen. Das CaLu-3-Zellkulturmodell ist jedoch grundsätzlich als einschichtiger Zellrasen bekannt, der sich lediglich lokal zu "Hügeln" ("Mounds") erheben kann.



### Abb. 5.52: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von Tight Junction-Proteinen im bronchialepithelialen 16HBE AIC-Zellkulturmodell

Occludin, Claudin-4, Protein ZO-1 und Cingulin sind nicht auf die Plasmamembranen der obersten ein bis zwei Zellschichten beschränkt, vielmehr sind hier auch Stellen an den Plasmamembranen der basalen Zellschichten angefärbt. Claudin-1 und Claudin-7 zeigen das gewohnte Färbemuster in allen Zellschichten. Die Abgrenzung zum Polyesterfilter ist durch eine gestrichelte, weiße Linie gekennzeichnet und in der mittleren Abbildung auf der rechten Seite direkt zu sehen. Zellkerne (blau). Strichmarke: 20 µm



### Abb. 5.53: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von Tight Junction-Proteinen im bronchialepithelialen CaLu-3 AIC-Zellkulturmodell

Occludin, Claudin-1, Claudin-4, Claudin-7, Protein ZO-1 und Cingulin färben die Plasmamembranen aller Zellen an. Damit zeigten die Immunfluoreszenzen aller getesteten TJ Proteine ein ähnliches Färbemuster wie im 16HBE AIC-Zellkulturmodell. Die Abgrenzung zum Polyesterfilter ist durch eine gestrichelte, weiße Linie gekennzeichnet. Zellkerne (blau).Strichmarke: 20 µm

Das ungewöhnliche Reaktionsmuster der TJ-Proteine in den anscheinend mehrschichtig gewachsenen 16HBE AIC-Zellen sollte deshalb auch elektronenmikroskopisch geprüft werden.

#### 5.6.2.3 Ultrastrukturelle Untersuchung der Tight Junction-Strukturen in den AIC-Zellkulturen der bronchialepithelialen Linien 16HBE und CaLu-3

Im Ultradünnschnitt erschien das 16HBE AIC-Zellkulturmodell als meist 2-3-reihiges System von Stapeln ineinander verzahnter, vielfältig durch verschiedene Zell-Zell-Verbindungen gekoppelter Zellen (Abb. 5.54 a). An den Zell-Grenzen waren häufig desmosomale Strukturen (Abb. 5.54 b; D) und *Puncta adhaerentia* zu erkennen. Detail-Aufnahmen von Zell-Zell-Kontaktstrukturen der apikalen Zellen zeigten typische TJ ("Kissing Point")-Strukturen sowohl im 16HBE- als auch in den CaLu-3-Zellen im AIC-Modell in allen Schichten (Abb. 5.54 d und e).





### Abb. 5.54: Elektronenmikroskopische Darstellung von Zell-Zell-Verbindungsstrukturen in AIC-Kulturen von 16HBE und CaLu-3

Elektronenmikroskopische Aufnahmen bei höherer Vergrößerung (d-e) von AIC-kultivierten 16HBE (ad) und CaLu-3 (e) Zellen. **a** zeigt einen Querschnitt durch ein mehrschichtiges 16HBE-Zellkulturmodell. Zell-Zell-Kontakte sind in verschiedenen Schichten des Zellkulturmodells zu erkennen. Neben desmosomalen Strukturen (D in b) erkennt man manchmal auch Strukturen die an "Lamellated Junctions" (Klammern in b und c) erinnern, nicht nur an der apikalen Seite der Zellen, sondern auch in den basalen Zellen des mehrschichtigen 16HBE-Zellkulturmodells. Klassische TJ "Kissing Points" (weiße Kästchen im oberen Teil) ließen sich im apikolateralen Plasmamembranen der 16HBE (Vergrößerung in d) und CaLu-3- (Vergrößerung in e) Zellkulturmodelle erkennen. Strichmarken: a-e 5 µm, Einsatz: 125.000:1 Nachdem bei der Untersuchung der Zell-Zell-Kontakte zwischen den Zellen der 16HBE AIC-Kulturen neben klassischen TJ-Strukturen auch neuartige, als Occludin-haltig beschriebene Strukturen zu sehen waren, sollten die AIC-Kulturen mit Hilfe der Gefrierbruchtechnik untersucht werden, um die dreidimensionale Erstreckung dieser an "Lamellated Junctions" erinnernden Strukturen aufzuklären. Dazu wurden die mit Glutaraldehyd fixierten, mehrschichtig gewachsenen 16HBE-Zellen (Abb. 5.55) in einer Gefrierbruchanlage nach dem Gefrierbruch mit Platin-Kohle beschichtet. Nach der Reinigung konnten die Replika-Präparate in einem TEM ausgewertet werden. Zum Vergleich wurden identisch behandelte CaLu-3-Zellkulturmodelle (Abb. 5.56) herangezogen.



Abb. 5.55: Elektronenmikrokopische Darstellung des Netzwerkes von Tight Junction-Strängen im Gefrierbruch einer mehrschichtigen 16HBE AIC-Zellkultur

An verschiedenen Stellen der mit Hilfe der Gefrierbruchtechnik präparierten 16HBE-Zellen findet sich ein diskontinuierliches, lokal begrenztes Netzwerk von strangartigen TJ-Strukturen (Klammer am linken Bildrand). Vergrößerung: 20000:1



Abb. 5.56: Elektronenmikrokopische Darstellung des Netzwerkes von Tight Junction-Strängen im Gefrierbruch einer mehrschichtigen CaLu-3 AIC-Zellkultur

Auf den apikolateralen Membranen der Gefrierbrüche der AIC-kultivierten CaLu-3 Zellen findet sich ein kontinuierliches Netzwerk von ein- bis drei z.T. parallelen strangartigen TJ-Strukturen (Klammer am linken Bildrand). Diese strangartigen Strukturen weisen eine noch geringere Komplexität als die der einschichtig gewachsenen CaLu-3-Zellen auf. Auf der apikalen Membran der Zellen sind quergebrochene Mikrovilli (Mv) zu sehen. Vergrößerung: 40000:1

Die für das Zellkulturmodell einer PEM verwendete bronchialepitheliale Zell-Linie 16HBE TEM-Aufnahmen Gefrierbruch-Präparaten der zeigte in von einschichtig gewachsenen Kultur bereits nur lokal begrenzte TJ-Strukturen, die kein zusammenhängendes Netzwerk um die einzelnen Zellen bildeten (Abb. 5.31). AIC-Kulturen dieser Zell-Linie ergaben ein vergleichbares Bild. Die strangartigen Strukturen (Abb. 5.55; Klammer am linken Bildrand) sprechen für eine noch stärkere räumliche Kondensierung als die in den einschichtigen 16HBE-Zellkulturen. Weiterhin ließ sich feststellen, dass die Strukturen nicht mehr ausschließlich am apikalen Ende der Zellen sondern auf dem ganzen Zellkörper zu finden waren. Diese Verbreitung der Strukturen könnte eventuell die gezeigte Immunlokalisierung der einzelnen TJ-Proteine (Abb. 5.52) erklären.

Bei den Zellen der bronchialepithelialen Kontrolle, CaLu-3, ließ sich eine solche Umverteilung der TJ-Strukturen nicht erkennen. Die strangartigen Strukturen (Abb. 5.56; Klammer am linken Bildrand) befanden sich auch in den AIC-Kulturen an der apikolateralen Plasmamembran gegenüberliegender Zellen direkt unterhalb der Zelloberfläche. In den Gefrierbruchbildern der AIC-Kulturen von CaLu-3 Zellen fiel auf, dass die Anzahl der Stränge im Vergleich zur einschichtigen Kultur deutlich weniger war und damit auch die Komplexität der TJ-Strukturen in der Regel nicht mehr so hoch war, wie bei einschichtig gewachsenen CaLu-3 Zellen.

Die Ergebnisse aus der Untersuchung der Ultrastruktur der TJ-Strukturen ließen vermuten, dass die Barriere-Funktion der mit Hilfe der AIC-Technik kultivierten Zellen bei 16HBE Zellen gar nicht und bei CaLu-3 Zellen nur eingeschränkt vorhanden ist.

# 5.6.2.4 Untersuchungen der Barriere-Eigenschaften von AIC-Kulturen der Epithelzellen der Linien 16HBE und CaLu-3

Die Messung des passiven Ionenflusses über die AIC-"Monolayer"-Kulturen dieser bronchialepithelialen Zellen diente der Prüfung der Frage, ob die morphologischen Erkenntnisse Rückschlüsse auf die Barriere-Funktion der jeweiligen epithelialen Zellkulturmodelle zulassen. Bei der TEER-Messung fiel einheitlich auf, dass die AIC-Zellkulturen allgemein niedrigere Widerstandwerte lieferten als die klassisch gehaltenen, mit Medium bedeckten Zellen (LCC) (Abb. 5.57). Die Widerstandsmesswerte der AIC-Kulturen der 16HBE-Zellen zeigten keine signifikante Veränderung im Vergleich zu den LCC-kultivierten 16HBE-Zellen und waren somit im Einklang mit den Ergebnissen der ultrastrukturellen Untersuchungen.

Dagegen zeigten die Messwerte der AIC-Kulturen der bronchialepithelialen CaLu-3-Zellen eine starke Reduzierung des Widerstandes auf ein Drittel des Wertes der LCCkultivierten Zellkulturen.



Abb. 5.57: Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) von AIC-Zellkulturen

Die Widerstandswerte der Zellkulturen untereinander wichen weit voneinander ab. Während die AICkultivierten CaLu-3 Zellen zu Beginn und zum Ende der Messzeiten Messwerte bis zu 500  $\Omega/cm^2$ erreichten und ansonsten nur Messwerte von ca. 200-250  $\Omega/cm^2$  aufwiesen, waren die Messwerte der 16HBE AIC-kultivierten Zellen mit konstanten Werten um 30  $\Omega/cm^2$  nur sehr gering. In beiden Zell-Linien waren die Widerstandsmesswerte der AIC-Kulturen wesentlich, im Schnitt etwa von zwei Drittel, geringer als die Messwerte der mit Medium bedeckt gewachsenen, einschichtigen Zellen (LCC). Die Widerstandswerte der mehrschichtig gewachsenen 16HBE-Zellen (AIC) lagen nur geringfügig oberhalb der Messwerte, die über die reine Polyestermembran ohne Zellen (~12  $\Omega/cm^2$ ) gemessen wurden Um die TEER-Messwerte mit der Barriere-Funktion korrelieren zu können, wurden am mehrschichtig erscheinenden 16HBE-Zellkulturmodell Transportstudien mit FITC-markierten Dextran-Partikeln unterschiedlicher Größe durchgeführt. Von den auf die apikale Oberfläche des 16HBE-Zellkulturmodells gegebenen, fluoreszenz-markierten 4 kDa großen Dextran-Partikeln passierten bereits nach 20 Min etwa 30 % das Epithel (Abb. 5.58). Nach einer Stunde waren bereits über 50 % der FD4 Dextran-Partikel durch die Zellschicht diffundiert. Die markierten Dextran-Partikel mit 70 kDa Größe konnten bereits wesentlich schlechter das Epithel passieren: Erst nach 60 Min hatte etwa ein Drittel der FD70 Dextran-Partikel die Zellschichten passiert. Von den Dextran-Partikeln mit einer Größe von 250 kDa konnte nur ein sehr geringer Teil das Epithel auf dem parazellulären Wege passieren. Die Ergebnisse bestätigen die TEER-Messungen und zeigten, dass das 16HBE-Zellkulturmodell für die eingesetzten Dextran-Partikel keine signifikante Barriere darstellte.



#### Abb. 5.58: Messung der Barriere-Funktion des mehrschichtigen bronchialepithelialen 16HBE-Zellkulturmodells

Die Dextran-Partikel der Größe 4 kDa (FD4) diffundierten innerhalb der ersten Stunde zu mehr als 50 % der gemessenen Gesamtfluoreszenz durch die Zellschichten ins basale Medium. Von den 70 kDa (FD70) großen Dextran-Partikeln passierte etwa ein Drittel bereits innerhalb der ersten Stunde das Zellkulturmodell. Bei den 70 kDa (FD70) großen Dextran-Partikeln zeigt die Messkurve einen konstanten Anstieg der Fluoreszenz im basalen Medium, wohingegen bei den 4 kDa (FD4) großen Dextran-Partikeln die Kurve bereits nach der ersten Versuchsstunde abflacht. Von den Dextran-Partikel mit der Größe von 250 kDa (FD250) konnten nur sehr wenige durch den Zellrasen hindurch diffundieren. Das 16HBE-Zellkulturmodell stellte für die verwendeten Dextran-Partikel keine signifikante Barriere dar

Im Abschnitt 5.2.2.5 wurde bereits erwähnt, dass wahrscheinlich die Poren der Polyestermembranen, auf denen die Zellen gewachsen waren, eine Barriere für die großen Dextran-Partikel darstellte, da die Messkurve, die sich aus den Messungen der Diffusion der 250 kDa großen Dextran-Partikel über ein zellfreies System ergab, vergleichbar mit der Messkurve der 16HBE-Zellen ist. Verglich man die Messkurve der FD250 Dextran-Partikel, die die kultivierten Zellen passierten mit der Messkurve von den FD250 Dextran-Partikeln, die durch die AIC-kultivierten Zellen diffundierten (Abb. 5.59), ließ sich feststellen, dass die einschichtig gewachsenen Zellkulturen eine 15-20-fach undurchlässigere Barriere für solch große Partikel bildeten. Wie anhand der ultrastrukturellen Untersuchungen zu erwarten war, passierten damit große Dextran-Partikel die mehrschichtige Zellkultur fast ebenso gut wie kleine Dextran-Partikel. Die erhaltenen Ergebnisse der einzelnen Dextrane ließen sich durch das – gemäß der Größe - veränderte Diffusionsverhalten der Partikel erklären.



Abb. 5.59: Detailbetrachtung der Diffusion von 250 kDa großen Dextran-Partikeln zur Bestimmung der Barriere-Funktion des mehrschichtigen bronchialepithelialen 16HBE-Zellkulturmodells im Vergleich mit dem LCC-kultivierten 16HBE-Modell Zur genaueren Betrachtung der Diffusion der 250 kDa großen Dextran-Partikel durch das Zellkulturmodell wurden die Messwerte der mehrschichtigen (AIC; aus Abb. 5.59) gegen die der einschichtigen Zellkultur aufgetragen. Dabei wurde deutlich, dass die einschichtigen Zellkulturen (LCC, aus Abb. 5.34 eine 15-20 fach bessere Barriere gegen große Partikel, wie z.B. den FD250 Dextran-Partikeln, bildeten als die mehrschichtigen Zellkulturen

Nachdem bei der Linie CaLu-3 in den Untersuchungen der Ultrastruktur eine veränderte Morphologie der TJ-Strukturen zwischen den LCC- und den AIC-kultivierten Zellen beobachtet wurde, sollte auch diese Veränderung anhand einer Transportstudie geprüft werden (Abb. 5.60). Hier wurden exemplarisch die Messwerte für die FD70 Dextran-Partikel aufgezeigt, da sie sehr gut den Unterschied der beiden Kultivierungsmethoden

150

aufzeigen, ohne dabei in den Messwerten zu weit auseinander zu liegen. In Abbildung 5.60 sind die gemessenen Fluoreszenzwerte der Dextran-Partikel mit 70 kDa, die die unterschiedlich kultivierten CaLu-3 Zellen passiert haben, gegeneinander aufgetragen. Es ist deutlich zu sehen, dass nach 20 Min etwa zehnmal mehr fluoreszenzmarkierte FD70 Dextran-Partikel das AIC-Zellkulturmodell passierten, als das LCC-kultivierte Zellkulturmodell. Insgesamt diffundierten in der Versuchszeit von 180 Min etwa fünfmal soviel markierte FD70 Dextran-Partikel durch die AIC-Kultur. Um auszuschließen, dass diese Messwerte durch Löcher in den Zellkulturmodellen verfälscht wurden, wurde die epitheliale Barriere auch anhand der TEER-Werte kontrolliert (nicht gezeigt).

Anhand dieses Experimentes ließ sich zeigen, dass das Vorhandensein einer typischen TJ-Struktur für die Barriere-Funktion von Epithelzellen allein noch nicht ausreicht. Die Komplexität dieser Struktur, etwa die Anzahl der strangartigen Strukturen und deren Vernetzung untereinander, scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen. Ob diese Komplexität von der jeweiligen molekularen Zusammensetzung der TJ-Protein-Komplexe abhängig ist, ist bisher ungeklärt.



Abb. 5.60: Messung der Barriere-Funktion von einschichtig bzw. als AIC-Kultur gewachsenen CaLu-3-Zellen anhand der Diffusion von 70 kDa großen Dextran-Partikeln Bereits nach 20 Min diffundierten 10x mehr Dextran-Partikel durch die AIC-kultivierten Zellkulturen als durch die Medium bedeckt wachsenden Zellkulturen (LCC). Über die gesamte Versuchszeit konnten etwa 5-10x mehr 70 kDa große Dextran-Partikel in AIC-kultivierten Zellen vom apikalen Medium durch die Zellschichten in das basale Medium diffundieren als in LCC-kultivierten. Die Barriere-Funktion der AIC-kultivierten CaLu-3 Zellkulturen war demnach im Vergleich zu den LCC-kultivierten Zellkulturen wesentlich eingeschränkt

Die erhaltenen Messwerte der Barriere-Funktion der CaLu-3-Zellen waren etwa fünf bis sechs mal schwächer, als die von Mathias et al. (1996) bei Primärkulturen beobachteten Messwerte, da die CaLu-3 Zellen vor dem Versuch nur etwa eine Woche gehalten wurden und zu diesem Zeitpunkt TEER-Werte von ~900  $\Omega$ /cm<sup>2</sup> hatten im Gegensatz zu den ~1200  $\Omega$ /cm<sup>2</sup> der Primärkulturen (Mathias et al. 1995; Mathias et al. 1996) und darin zitierte pharmakologische Literatur).

Um auszuschließen, dass es sich bei den gemessenen Dextran-Transportwerten nicht um einen Transport durch die Zellen hindurch, einer sog. Cytopempsis, handelte, wurde zusätzlich die Diffusion des *Tracers* LaCl<sub>3</sub> untersucht. Sowohl bei den mehrschichtigen, AICkultivierten 16HBE- (nicht gezeigt) als auch bei den AIC-kultivierten CaLu-3-Zellen (Abb. 5.61) diffundierte das LaCl<sub>3</sub> aus dem basalen Kompartiment durch die Interzellularspalten auf die apikale Oberfläche (Pfeilköpfe). Dass die AIC-Kulturen des 16HBE Zellkulturmodells keine wesentliche Barriere für die Diffusion von LaCl<sub>3</sub> darstellen konnten, bestätigten somit die bisher dargestellten Ergebnisse der TEER-Messungen (Abb. 5.57), der Transportversuche mit Fluoreszenz-markierten Dextran-Partikel (Abb. 5.58 und 5.59) und die *Tracer*-Elektronenmikoskopie.





Abb. 5.61 Darstellung der Tight Junction-Barriere und des Interzellularspaltes der bronchialepithelialen AIC-Kulturen von CaLu-3-Zellen mit Lanthanchlorid LaCl<sub>3</sub> konnte von basal durch die

Interzellularspalten (Pfeile) der CaLu-3-Zellen diffundieren und ist hier als elektronendichtes Präzipitat zu erkennen. Das Cytoplasma und die Zellkerne (ZK) der Zellen sind frei von Lanthanpräzipitaten. Trotz der TJ-typischen Strukturen (b; schwarze Klammer) waren auf den apikalen Zellen Lanthanchloridpräzipitate (b; Pfeilspitzen) zu erkennen. Strichmarke: 0,5 µm

Im CaLu-3-Zellkulturmodell ließen sich in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen vereinzelt TJ -Strukturen nachweisen (Abb. 5.61 b, schwarze Klammer), die anscheinend die Diffusion des LaCl<sub>3</sub> einschränkten. In den Übersichtsaufnahmen (Abb. 5.61 a) konnte man jedoch auf der apikalen Oberfläche der AIC-Kulturen schwarze Präzipitate vom LaCl<sub>3</sub> erkennen (Abb. 5.61 a; Pfeilköpfe). Die Barriere der CaLu-3 AIC-Kulturen schien also -

zumindest stellenweise - im Vergleich zur Barriere der einschichtigen CaLu-3 LCC-Kulturen so verändert zu sein, dass LaCl<sub>3</sub> bis auf die apikale Seite der Zellen diffundieren konnte.

Da die 16HBE-Zellen weder im einschichtigen, noch im mehrschichtigen Zustand eine signifikante Barriere bildeten, bei den CaLu-3-Zellen jedoch ein Unterschied zwischen den einschichtigen LCC- und den AIC-Kulturen messbar war, sollten die Unterschiede in den Protein-Interaktionen der TJ-Proteine, die für den Aufbau der Barriere-Funktion verantwortlich sind, in den verschieden kultivierten CaLu-3 Zellen näher untersucht werden.

Bei den AIC-kultivierten CaLu-3 Zellkulturmodellen konnten, wie in den LCCkultivierten CaLu-3 Zellen, die Claudine-1, Claudin-4 und Claudin-7 miteinander koimmunpräzipitiert werden (nicht gezeigt). Ein Unterschied in den Interaktionen der TJ-Proteine ließ sich bisher nicht nachweisen.

#### 5.8 Immunlokalisierung von Tight Junction-Proteinen in unterschiedlich differenzierten Plattenepithelkarzinomen der menschlichen Lunge *in situ*

Nachdem in den als Vorläuferläsionen von Plattenepithelkarzinomen der Lunge beschriebenen Plattenepithelmetaplasien bronchialepithelialen Ursprungs TJ-Proteine in Zellverbindungen der apikalen Zellschichten nachgewiesen werden konnten, sollte untersucht werden. ob auch die in ihrer Differenzierung unterschiedlichen Plattenepithelkarzinome der Lunge TJ-Proteine enthalten und wie diese angeordnet sind. Die Einordnung der Tumore erfolgte dabei vor allem nach ihrem Differenzierungsgrad. Von den Plattenepithelkarzinomen der Lunge wurden drei verschiedene Typen bzw. Differenzierungsgrade (G1-G3) untersucht.

Basaloide Plattenepithelkarzinome (G1) zeigten in der Immunfluoreszenzmikroskopie mit desmosomalen Cadherinen wie den Desmogleinen, die in dieser Arbeit als Differenzierungsmarker verwendet wurden, nur Signale mit dem basalzelltypischen Desmoglein Dsg 2 und Plaque-Proteinen von denen in dieser Arbeit systematisch nur Desmoplakin geprüft wurde (hier nicht gezeigt). Nicht verhornende Plattenepithelkarzinome der Lunge (G2) hingegen reagierten spezifisch mit Antikörpern gegen Desmoplakin, Desmoglein Dsg 2 und das stratifizierungstypische Desmoglein Dsg 3, was auch der zunehmenden Differenzierung dieses Karzinomtyps entspricht (nicht gezeigt). Verhornende Plattenepithelkarzinome der Lunge (G3) *in situ* reagierten ebenfalls sowohl mit spezifischen Antikörpern gegen Dsg 2 und Dsg 3. Antikörper gegen das in mehrschichtigen Epithelien apikal lokalisierende Desmoglein Dsg 1 reagiert nur mit Desmosomen von zwei bis drei Zellschichten an den sog. "Hornperlen" (nicht gezeigt). Das topologische Vorkommen dieser Differenzierungstypischen Desmosomen-Proteine ist im wesentlichen in Übereinstimmung mit Angaben in der Literatur (Klingmuller et al. 1970; Krunic et al. 1998; Kurzen et al. 2003).

#### 5.8.1 Immunlokalisierung von Tight Junction-Proteinen in basaloiden Plattenepithelkarzinomen

Zur Untersuchung der TJ-Proteine basaloider Plattenepithelkarzinome *in situ* wurden Immunfluoreszenz-Experimente an Paraffinschnitten mit Antikörpern gegen Occludin, Claudin-1, Claudin-4, Claudin-7, Protein ZO-1 und Cingulin durchgeführt. Das Gewebematerial wurde freundlicherweise von Dr. Nikolaus Gassler (Pathologisches Institut der Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Occludin und Protein ZO-1 basaloiden reagierten auch in den Plattenepithelkarzinomen nur an Plasmamembranen der Endothelien der Gefäße (vgl. Abb. 5.62). Die Tumorränder zum Bindegewebe dagegen wiesen keine Reaktion mit spezifischen Antikörpern gegen diese beiden Proteine auf. Auch die Claudine -1, -4 und -7 ließen sich in eigentlichen Tumorstrukturen nicht mit Sicherheit nachweisen (Abb. 5.62). Das TJ-Plaque-Protein Cingulin ließ manchmal an den Grenzen der zwei bis drei Zellschichten, die direkt am Tumorrand zum Stroma lagen, Reaktionen erkennen, deren Signifikanz jedoch nicht gesichert werden konnte.



## Abb. 5.62: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von TJ-Proteinen in basaloiden Plattenepithelkarzinomen der Lunge des Menschen

Occludin und Protein ZO-1 reagieren nur an den Zellgrenzen der Endothelien. Claudin-1, Claudin-4 und Claudin-7 ließen sich in eigentlichen Tumorstrukturen nicht mit Sicherheit nachweisen. Cingulin dagegen ließ manchmal eine – schwache – Reaktion in den zwei bis drei Zell-Lagen erkennen, die direkt an das Stroma angrenzen. Die Grenzen zwischen Tumor und Stroma sind durch eine gestrichelte, weiße Linie dargestellt. Zellkerne (blau). Strichmarke: 20 µm

# 5.8.2 Immunlokalisierung von Tight Junction-Proteinen in nicht verhornenden Plattenepithelkarzinomen der Lunge *in situ*

Occludin und Protein ZO-1 ließen in Paraffinschnitten nicht verhornender Plattenepithelkarzinome keine signifikante Färbung von Zellgrenzen innerhalb der Tumoren erkennen (Abb. 5.63). An den Zell-Zell-Kontakten von Tumorrändern zum Stroma hin und zwischen den endothelialen Zellen der Gefäße, zeigte sich jedoch mit diesen beiden Proteinen ein typisches TJ-Muster. Antikörper gegen Claudin-1 dagegen bildeten oft Grenzen zwischen Tumorzellen als durchgehende Linie ab. Auch Antikörper gegen Claudin-7 wiesen an manchen Stellen ein ausgeprägteres Färbemuster auf, das jedoch nicht mit Sicherheit TJ-Strukturen zuzuordnen war (Abb. 5.63).



Abb. 5.63: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierungen von TJ-Proteinen in nicht verhornenden Plattenepithelkarzinomen der Lunge

Occludin und Protein ZO-1 reagieren in den nicht verhornenden Plattenepithelkarzinomen ausschließlich an den Zellgrenzen der Endothelien und an den Tumorrändern zum Stroma hin. Claudin-1 und Claudin-7 erscheinen an Zellgrenzen der Tumor-Strukturen, lassen sich jedoch nicht immer mit Sicherheit TJ-Strukturen zuordnen. Die Grenzen zwischen Tumor und Stroma sind durch gestrichelte, weiße Linien dargestellt. Zellkerne (blau). Strichmarke: 20 µm

#### 5.8.3 Immunlokalisierung von Tight Junction-Proteinen in verhornten Plattenepithelkarzinomen der Lunge

Außer Reaktionen mit Occludin und Protein ZO-1 auf Blutgefäß-Endothelien ließen sich mit den diversen TJ-Antikörpern gegen TJ-Proteine (Occludin, Claudin-1, Claudin-7, Protein ZO-1 und Cingulin) durchaus starke Reaktionen in den "Hornperlen"-Strukturen (Abb. 5.64) und insbesondere an den Tumorrändern erkennen. Claudin-1 und Claudin-7 Immunfluoreszenzen dagegen waren häufiger in feiner Verteilung auch an Zellgrenzen in einiger Entfernung von "Hornperlen" zu erkennen, jedoch fehlt hierfür noch eine Demonstration der Signifikanz durch Ko-Lokalisierung bzw. Immunelektronenmikroskopie. Protein ZO-1 war darüber hinaus auch noch an anderen Stellen innerhalb des Tumors zu erkennen. Zur Lokalisierung von Occludin und Claudin-1 siehe auch Langbein et al. (2003) und Morita et al. (2004) und die Literatur darin.



### Abb. 5.64: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierungen von TJ-Proteinen in verhornten Plattenepithelkarzinomen der Lunge des Menschen *in situ*

Occludin (weiße Pfeile), Claudin-4, Cingulin und Protein ZO-1 reagieren in den Karzinomen oft an den "Hornperlen", die dem *Stratum spinosum* bzw. *granulosum* der Epidermis entsprechen. Es zeigt sich dabei häufig eine positive Markierung der Zellgrenzen in den 1-2 Zellschichten unterhalb der "Hornperlen". Occludin und Cingulin reagieren zusätzlich in den Zellgrenzen der endothelialen Zellen. Claudin-1 und Claudin-7 reagieren z.T. auch mit den Plasmamembranen der Tumorzellen in einiger Entfernung der "Hornperlen". Die "Hornperlen" sind mit weißen Sternchen markiert, während die Grenzen zwischen Tumor- und Stroma durch gestrichelte, weiße Linien dargestellt sind. Zellkerne (blau). Strichmarke: 20 µm

#### 5.9 Identifizierung und Lokalisierung des Tight Junction-Transmembranproteins Tricellulin in verschiedenen menschlichen Epithelien *in situ* und in Zellkulturen

Alle bisher bekannten Zell-Zell-Verbindungsproteine betrafen i.d.R. homophile Junctions zwischen zwei Zelltypen. Zusätzlich gibt es aber in Epithelien – erst recht in Plattenepithelien – Stellen, an denen drei oder vier Zellen aneinanderstoßen. Es ist offenkundig, dass parazelluläre Diffusion bzw. parazelluläre Translokationsprozesse auch an diesen Stellen versperrt sein müssen. Kürzlich wurde ein Protein identifiziert, das in einschichtigen Epithelien solche Stellen verklammert und verschließt. 2005 wurde Tricellulin als neues TJ-Protein von Ikenouchi et al. beschrieben. Tricellulin ist ein Occludin-verwandtes Polypeptid, das vier Transmembran-durchgänge bildet. Mit Hilfe der von Frau Sachiko Tsukita (Universität Kyoto, Japan) zur Verfügung gestellten Antikörper sollte die Lokalisierung von Tricellulin in Komplexen menschlichen Geweben, wie in von menschlichen Plattenepithelien abstammenden Kulturzellen untersucht werden.

# 5.9.1 Immunlokalisierung von Tricellulin in menschlichem Bronchialepithel *in situ*

Das Vorkommen von Tricellulin in menschlichem Bronchialepithel *in situ* wurde durch indirekte Doppel-Immunfluoreszenzmikroskopie an fixierten Kryostatschnitten von Lungengewebe durchgeführt. Die zum Vergleich eingesetzten Antikörper gegen das Protein ZO-1 zeigten die bereits beschriebene Reaktion der gesamten *Zonula occludens,* die das Bronchialepithel zum Lumen hin abschließt (Abb. 5.65; grün). Die Immunmarkierung des Tricellulins ergab Signale in derselben Zellschicht, beschränkte sich aber auf Stellen, an denen drei Zellen zusammenstoßen (Abb. 5.65; rot), was besonders klar in den Doppel-Immunfluoreszenzen zu erkennen war (Abb. 5.65; gelb). Ähnliche Ergebnisse wurden bei Vergleichen von Tricellulin mit Occludin bzw. geeigneten Claudinen erhalten (nicht gezeigt).


20-1



Abb. 5.65: Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) der Lokalisierung von Tricellulin und Protein ZO-1 im menschlichen Bronchialepithel in situ Tricellulin zeigt ausschließlich eine punktuelle Färbung der Zell-Zell-Grenzen, an denen drei Zellen zusammenstoßen. Die Gegenfärbung mit Protein ZO-1 stellt wieder die Zonula occludens der apikalen Zellgrenzen dar, die direkt unterhalb des Lumens lokalisiert sind. Die Doppel-Immunmarkierung zeigt eindeutig eine Ko-Lokalisierung (gelbe Punkte) dieser beiden TJ-Proteine den trizellulären in Zellkontakten (Mischbild). Strichmarke: 20 µm

## 5.9.2 Immunlokalisierung von Tricellulin in Zellkulturen einschichtiger polarer Epithelzellen

Um die Lokalisierung des Tricellulins auch in den zum Vergleich verwendeten polaren Zellkultursystemen zu prüfen, wurden Doppel-Immunfluoreszenz-Experimente mit Antikörpern gegen Tricellulin in Kombination mit Protein ZO-1, Claudin-1 oder dem mit Tricellulin verwandten TJ-Transmembranprotein Occludin an den darmepithelialen CaCo-2-Zellen (Abb. 5.66) durchgeführt. Wiederum erschienen alle bisher bekannten TJ-Proteine wie z.B. Occludin an den Zell-Zell-Grenzen aller CaCo-2-Zellen (Ikenouchi et al. 2005) und mit Antikörpern gegen Tricellulin war erneut eine punktuelle Färbung ausschließlich an den trizellulären Kontakten der CaCo-2-Zellen nachweisbar (Abb. 5.66; grün). Die partielle Ko-Lokalisierung von Tricellulin mit Occludin demonstrierte das auf beeindruckend spezifische Weise (Abb. 5.66; gelbe Punkte).



#### Abb. 5.66: Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) der Lokalisierung von Tricellulin und Occludin in einschichtigen epithelialen CaCo-2 Kulturzellen

Die Immunfluoreszenz von Tricellulin zeigt ausschließlich eine punktuelle Färbung der Zell-Zell-Grenzen, an denen drei Zellen zusammenstoßen. Die Gegenfärbung mit Occludin führt dagegen zu einer kontinuierlichen Färbung der Zellgrenzen aller Zellen, d.h. einer Darstellung der *Zonula occludens*. Die Doppel-Immunmarkierung mit Occludin und Tricellulin führt eindeutig zu einer Ko-Lokalisierung (gelbe Punkte) an den trizellulären Zellkontakten. Strichmarke: 20 µm

## 5.9.3 Immunlokalisierung von Tricellulin in Zellen der menschlichen bronchialepithelialen Zellkulturlinien 16HBE und CaLu-3

Auch in diesen beiden polaren Epithelzell-Linien zeigte sich wieder die charakteristische Färbung der verwendeten Antikörper. Sowohl Occludin als auch Protein ZO-1 wiesen das klassische *Zonula occludens*-Reaktionsmuster an den Zell-Zell-Grenzen auf, die als durchgezogene feine Linien erkennbar waren (Abb. 5.67; rot). Tricellulin dagegen ließ Reaktionen ausschließlich an den trizellulären Kontakten der bronchialepithelialen Zellen erkennen (Abb. 5.67; grün). Die punktförmige Färbung mit Tricellulin war exakt an den Stellen lokalisiert, an denen drei Linien der *Zonula occludens*-Proteine zusammen stießen (Abb. 5.67; gelbe Punkte).



Abb. 5.67: Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) von Tricellulin und Occludin bzw. Protein ZO-1 in den menschlichen Bronchialepithelial-Zellkulturlinien 16HBE und CaLu-3 Tricellulin zeigt ausschließlich punktuelle Reaktionen der Zell-Zell-Grenzen, an denen drei Zellen zusammenstoßen. Die Gegenfärbung mit Occludin (16HBE-Zellen) bzw. Protein ZO-1 (CaLu-3-Zellen) führt zur *Zonula occludens*-Färbung der Zellgrenzen aller Zellen. Die Doppel-Immunmarkierung mit Occludin oder Protein ZO-1 und Tricellulin zeigt eindeutig eine Ko-Lokalisierung (gelbe Punkte) dieser beiden TJ-Proteine an den trizellulären Zellkontakten. Strichmarke: 20 µm

## 5.9.4 Immunlokalisierung von Tricellulin in Kulturen von stratifiziert wachsenden Zellen der menschlichen Keratinocyten-Linie HaCaT

Als besonders gut etabliertes Modellsystem einer von einem Plattenepithel abgeleiteten Zellkulturlinie, die noch dazu nicht maligne transformiert und so zur Bildung von mehreren "normalen" Epidermis-Zellschichten in der Lage ist, wurde die menschliche Keratinocyten-Zell-Linie HaCaT (Boukamp et al. 1988; Ryle et al. 1989; Boukamp et al. 1990) verwendet. Zellen dieser Linie sind zunächst durch ausgedehnte Zellbrücken verbunden, die in gewisser Weise denen des *Stratum spinosum in situ* ähnlich sind und vornehmlich Desmosomen sowie *Puncta adhaerentia* enthalten (einen Überblick über diese Wachstumsform gibt Abb. 5.68).



Abb. 5.68: Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) von Cytokeratinen und Desmosomen in einer einschichtigen Keratinozyten-Kultur der menschlichen Linie HaCaT Die Cytokeratin-Filamente (grün) durchziehen die gesamten HaCaT-Zellen und sind über Desmosomen (rot) an korrespondierenden Stellen der Plasmamembranen verankert. Primäre Antikörper: Lu-5 für Cytokeratine und Desmoplakin (DP*mix*) zur Darstellung der Desmosomen-Plaques. Zellkerne (blau). Strichmarke: 20 µm Bei zunehmender Zelldichte können sich hier jedoch auch Verbände von Zellen, die über längere Strecken dicht – d.h. ohne erkennbare Brücken - aneinandergrenzen und zunehmend *Zonula occludens*-artige TJ-Verbindungen ausbilden.

Bisher ist die Lokalisierung von Tricellulin ausschließlich in einschichtigen Epithelien untersucht worden. Zur Prüfung der Frage, ob Tricellulin auch in mehrschichtigen Epithelien als eine Art Verschlussklammer die "Lücken" zwischen den Plasmamembranen von drei aneinandergrenzenden Zellen verschließt, wurden die Tricellulin-Antikörper auch auf sehr dicht und lokal mehrschichtig gewachsene Kulturen der menschlichen HaCaT-Keratinocyten eingesetzt. Während die einschichtigen HaCaT-Kulturen keine Reaktion mit den benutzten Antikörpern erkennen ließen, änderte sich das Bild nach Erreichen der Zell-Konfluenz drastisch. HaCaT-Zellen sind bekannt dafür, dass sie unter solchen Bedingungen lokal zunächst eine zweite Zellschicht bilden, die sich dann ausbreiten kann und so zur Entstehung von sog. "Mounds" führt (Boukamp et al. 1988). In diesen Zellschichten (weitere können unter bestimmten Bedingungen folgen) lassen sich typischerweise spezifische Differenzierungs-Marker nachweisen.

Doppel-Immunfluoreszenzmikroskopie mit Antikörpern gegen Occludin (Abb. 5.69; rot) und Tricellulin (Ab. 5.69; grün) ergab ausschließlich in den "Oberschicht"-Zellen positive Tricellulin-Signale (Abb. 5.69; gelb, links unten), wie vor allem in dem Bild mit den übereinander gelegten Farb-Känalen und dem Phasenkontrastbild (DIC) deutlich zu erkennen ist (Abb. 5.69; rechts unten). Occludin wies in der oberen Schicht das typische Färbemuster auf, d.h. durchgängige Linien an den Zell-Zell-Kontakten der stratifizierten Zellen. Die weiter basal liegenden Zellen waren sowohl für Occludin als auch für Tricellulin negativ. Die Antikörper gegen Tricellulin dagegen zeigten ausschließlich an den trizellulären Kontaktstellen der "Oberschicht"-Zellen eine spezifische Reaktion.



Abb. 5.69: Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) von Tricellulin und Occludin in einer teil-stratifizierten Keratinocyten-Kultur der menschlichen Linie HaCaT

Tricellulin und Occludin ergeben ausschließlich in den Zellen der Oberschicht in sog. "Mounds" Reaktionen. Tricellulin zeigt dabei eine punktuelle Färbung der Zell-Zell-Grenzen, an denen drei Zellen zusammenstoßen. Die Gegenfärbung mit Antikörpern gegen Occludin zeigt eine kontinuierliche Färbung der Zellgrenzen der Zellen, also eine typische *Zonula occludens*-Darstellung. Die Doppel-Immunmarkierung mit Occludin und Tricellulin ergibt dann eindeutig eine Ko-lokalisierung (gelb) dieser beiden TJ-Proteine in den trizellulären Zellkontakten der "Mounds". Das Phasenkontrastbild (DIC) zeigt, dass in den nicht gefärbten Bereichen Zellen sind, die kein Tricellulin-Signal zeigen. Strichmarke: 20 µm

Vergrößerte Aufnahmen der "Mounds" der stratifizierten HaCaT-Zell-Kulturbereiche zeigen die Bildung der "Verschluss-Strukturen" an Zell-Kontakten der Oberschicht. Sowohl die Bildung einer Art *Zonula occludens* (Abb. 5.70; grüne Linien) als auch die "Verschlüsse" an den trizellulären Kontakten durch das Protein Tricellulin (Abb. 5.70; gelbe Punkte) sind deutlich zu erkennen. Besonders deutlich wird das in der Aufnahme der Ko-lokalisierung mit dem DIC-Interferenzkontrastbild im Hintergrund, bei dem die Zellen anhand ihrer Zellkerne zu erkennen sind. Am Rand von diesem Bild ist zu erkennen, dass die unscharf abgebildeten Zellen unterhalb der Abbildungsebene liegen und keine Tricellulin- und Occludin-Signale zeigen.



Abb. 5.70: Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) von Tricellulin und Occludin in einer teil-stratifizierten Keratinocyten-Kultur der menschlichen Linie HaCaT

Die Doppel-Immunmarkierung mit Occludin und Tricellulin zeigt eindeutig eine Ko-Lokalisierung (gelb) dieser beiden TJ-Proteine in den trizellulären Zellkontakten in den stratifizierten Bereichen, während Occludin auch darüber hinaus entlang – fast – der gesamten Zellgrenze vorkommt. Das Phasenkontrastbild (DIC) zeigt das in den nicht gefärbten Bereichen Zellen sind, die unterhalb der Abbildungsebene liegen und kein Occludin- bzw. Tricellulin-Signal zeigen. Strichmarke: 20 µm

Ähnliche topologisch höchst spezifische Ko-lokalisierungen mit Tricellulin wurden auch an Dreizell-Ecken für alle anderen bisher bekannten Tight Junction-Proteine festgestellt (nicht gezeigt).

Aufgrund dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, warum die geprüften Zelltypen und Gewebe der mehrschichtigen Epithelien *in situ* und in Zellkultur negativ für Tricellulin waren, mit Ausnahme der zuvor beschriebenen "oberen" Zellschicht der HaCaT-Kulturen. Eine Erklärung war, dass in diesen Geweben entweder kein Tricellulin vorkommt, es dort maskiert ist oder in einer anderen zelltyp-spezifischen Form existiert. Zur Klärung dieser Frage wurde eine systematische Datenbank-Suche unternommen. Tatsächlich wurde im Genom und in mRNA-Populationen (cDNA-Banken) des Menschen und anderer Spezies (z.B. Maus, Zebrafisch) ein weiteres Tricellulin-Molekül gefunden (Abb. 5.72). Diese Suche ergab ferner, dass dieses Molekül auch von Ikenouchi et al. im Januar 2006 gefunden und durch Eintrag in die Datenbank zugänglich gemacht wurde. Ein Aminosäuresequenz-Vergleich der beiden Tricellulin-Proteine untereinander und mit Occludin ist in Abb. 5.71 vorgestellt. Dabei führt die absolute Identität von Tricellulin und Tricellulin und Tricellulin beta um zwei Spleißvarianten von mRNAs desselben Gens handeln könnte (Abb. 5.72).

Ein Sequenzvergleich (Abb. 5.72) zwischen beiden Spleißvarianten von Tricellulin (von nun an als Tricellulin alpha bezeichnet) und Tricellulin beta mit Hilfe der "Accession"-Nummern (GenBank) und dem NCBI-Programm "Evidence Viewer" deutet die Zusammensetzung der verschiedenen Exone an.

Tricellulin alpha und Tricellulin beta beinhalten beide die Exone Exon 1 und Exon 2. Die kürzere Spleißvariante Tricellulin beta enthält jedoch nur eine verkürzte Variante (Exon 3b) des Exons 3a. Weiterhin unterscheidet sich die C-terminale Region der beta-Form (Exon 4b) vom c-Terminus von Tricellulin alpha mit Exon 4a, Exon 5a und Exon 6a.

	1	11	21	31	41	51	61	71
Tric hum	MS ND GR SRI	NRDR <mark>R</mark> Y <mark>DE</mark> VP	SDLPYQDTTI	RT <mark>H</mark> PILHD SEI	RAVSADPL <mark>P</mark> PF	PL <mark>P</mark> LQPPFG	P <mark>D</mark> FYSSDTEE!	PAIAPDLKPVRR
Tric beta hum	<mark>MS</mark> ND GR SRI	NRDR <mark>RYDE</mark> VP	SDLPYQDTTI	RT <mark>H</mark> PILHD SEI	RAVSADPL <mark>P</mark> PF	PL <mark>P</mark> LQPPFGI	P <mark>d</mark> fyssdteei	PAIAPDLKPVRR
Occludin hum	<mark>MS</mark> SRPLESI	PPPY <mark>R</mark> P <mark>DE</mark> FK	PN	<mark>H</mark> YAPS <mark>ND</mark> I	Y <mark>G</mark> GEMHVR <mark>P</mark> MI	.SQ <mark>P</mark> AYSF <mark>Y</mark> PI	E <mark>D</mark> EILHFYKW	T <mark>S</mark> PPGV <mark>IR</mark> ILSM
Consensus	msndgrsri	nrdrrydevp	sdlpyqdttii	rthpilhdse:	ravsadplppp	թիրիզբրեց	pdfyssdtee	paiapdlkpvrr
	81	91	101	111	121	131	141	151
Tric hum	FVPD SUKN:	F <mark>F</mark> RGKKKD PE	WDKPV-SDIRY	YI <mark>S</mark> D <mark>G</mark> VECSP:	PASPARPNHRS	PLNSCKDP <mark>Y</mark>	<mark>GG</mark> SEGTFSSRI	KE AD <mark>A</mark> VFPRD PY
Tric beta hum	FVPD SUKN:	F <mark>F</mark> RGKKKD PE	WDKPV-SDIRY	YI <mark>SD</mark> GVECSP:	PASPARPNHRS	PLNSCKDP <mark>Y</mark>	<mark>GG</mark> SEGTFSSRI	KE AD <mark>A</mark> VFPRD PY
Occludin hum	L <mark>I</mark> IVMCIA:	I <mark>F</mark> ACVASTLA	WDRGYG <mark>T</mark> SLL(	GG <mark>S</mark> V <mark>G</mark> YPYGG:	S <mark>G</mark> FG <mark>S</mark> YGSGY0	YGYGYGYGYG <mark>Y</mark>	<mark>gg</mark> ytd pr <mark>aak</mark> i	GFML <mark>AM</mark> AAFCFI
Consensus	fvpdswkn:	ffrgkkkdpe	wdkpv sdiry	yisdgvecsp	pasparpnhrs	plnsckdpy	ygsegtfssrl	keadavfprdpy
	161	171	181	191	201	211	221	231
Tric hum	GS <mark>L</mark> DRHTQ-	-TV <mark>R</mark> TYSEKV.	EE <mark>YNL</mark> RYSYM	KSWA <mark>G</mark> LLRIL	GVVELLL <mark>G</mark> AGV	F <mark>a</mark> cvtayihi	KD <mark>SEWYNL</mark> FG	YS <mark>Q</mark> P <mark>Y</mark> GMGGV <mark>G</mark> G
Tric beta hum	GS <mark>L</mark> DRHTQ-	-TV <mark>R</mark> TYSEKV	EE <mark>Y</mark> N <mark>L</mark> RYSYM	KSWA <mark>G</mark> LLRIL	GVVELLL <mark>G</mark> AGV	F <mark>A</mark> CVTAYIHI	KD <mark>SEWYNL</mark> FGI	YS <mark>Q</mark> P <mark>Y</mark> GMGGV <mark>G</mark> G
Occludin hum	AA <mark>L</mark> VIFVT:	SV <mark>IR</mark> SEMSRT	RR <mark>Y</mark> YLSVII <mark>V</mark> :	S <mark>AIL<mark>GIM</mark>VF<mark>L</mark></mark>	ATIVY <mark>IM</mark> GVNF	T <mark>a</mark> qs <mark>sg</mark> sly	G- <mark>SQIYAL</mark> CN·	<mark>Q</mark> F <mark>Y</mark> TP <mark>AA</mark> TGL
Consensus	gsldrhtq	tvrtysekv	eeynlrysym	(swagllril)	gvvelllgagv	facvtayih	kdsewynlfg	Азаблашаалаа
	241	251	261	271	281	291	301	311
Tric hum	LGSM <mark>Y</mark> GGY	Y <mark>YTGPKTPF</mark> V	lv <mark>v</mark> aglaw <mark>i</mark> tt	FIIILVLGMS	MYY <mark>R</mark> TILLDSN	IWWP <mark>L</mark> TEFGII	WALFILYMA	AAIVY <mark>V</mark> NDTNRG
Tric beta hum	lgsm <mark>y</mark> ggy	<mark>Y</mark> YTGPKTPFV	lv <mark>v</mark> aglaw <mark>i</mark> tt	FIIILVLGMS	MYY <mark>R</mark> TILLDSN	IWP <mark>L</mark> TEFGII	VVALFILYMA	AAIVY <mark>V</mark> NDTNRG
Occludin hum	YVDQ <mark>Y</mark> LY <mark>H</mark>	Y <mark>CVVDPQEA</mark> I	A <mark>IVLG</mark> FMI <mark>I</mark> V/	AFA <mark>LII</mark> FFAVI	KTR <mark>R</mark> KMDRYDF	(SNI <mark>L</mark> W <mark>D</mark> KEH)	IYDEQPPN <mark>V</mark> EI	EW <mark>V</mark> KN <mark>V</mark> SAGTQD
Consensus	lasmaday	vytopktpfv	lvvaglawit	tiiilvloms	mvvrtilldsr	wwpltefgi	nvalfilyma:	aaivyvndtnrg
	321	221	2/1	351	361	371	291	201
Tric hum	GLCVVPLF	NTP <mark>WNAVECR</mark>	VEG <mark>G</mark> OTAAMT	FLEVIMINVL.	ISALWCLKLME	HEAABBHRE	VMEOOET <mark>MEP</mark>	SUSSERVACEMA
Tric beta hum	GLCYYPLE	NTPVNAVECR	VEGGOTAAMT	LEVIMIVYL.	ISALVCLKLME	HEAARRHRE	YMEODE TNEP:	SL <mark>SSKRKMCEMA</mark>
Occludin hum	VPSPPSD	VERVDSPMAY	SSNGKWNDKR	YPESSYKST	PVPEVVOELPI	TSPVDDFR01	PRYSSGGNEE	PSKRAPAKGRA
Consensus	alcyvnlfi	ntnynavfor	verrariaami1	flfytmivyl	isalvclklwr	heaarrhre	meggeinen	slaskrkmcema
compensat	401	411	421	431	441	451	461	471
Tric hum	TSCDPOPD	SEVMENELDT	ARMERELLSC	TPPCHTPKP	TVMPDVVARVE	TOTOTIOTIO	NT AVENDAR	SEVELSAEVOA
Tric heta hum	TSCDRORD	SEVMERELDT	ARMEPELLSCI				PD	ANE FUELVEMOR
Occludin hum	GRSKRTEO	DHYETDYTTG	GESCDELEEDU	JIREYPP		- <mark>ITSD</mark> OOROI	L <mark>YKRNF</mark> DTGL	DEYKSLOSELDE
Consensus	tsgdrqrd:	sevnfkelrt	akmkpellsgf	nipp		idr	yk f	eykle
	481	491	501	511	521	531	541	551
Tric hum	VLRKFDEL	DAVMSRLPHH	SESROEHERIS	SRIHEE F <mark>K</mark> KK	NDPTFLEKKE	RCDYLKNKL	SHIKORIOE Y	KVMNUDVOGYS
Tric beta hum	HRVSODDL	DLLTS						
Occludin hum	INKELSRL	DKELDDYR	- <mark>e</mark> ese <mark>e</mark> ymaaj	ADEYNRL <mark>K</mark> QV	KGSADYKS <mark>KK</mark> I	IH <mark>C</mark> KQ <mark>LK</mark> SKL:	SHIKKMVGD VI	ROKT
Consensus	d 1	d s	e e	k l	k kk	c lk kl:	shik y	1 1
	561	571	581	591	601	611	621	631
Tric hum								
Tric beta hum								
Occludin hum								

## Abb. 5.71: Vergleich der Aminosäuresequenzen der humanen TJ-Proteine Tricellulin, Tricellulin beta und Occludin

Aminosäuren, die in einer Position identisch sind, sind blau hinterlegt. Aminosäuren ähnlichen Charakters sind mit grüner Farbe gekennzeichnet und Aminosäuren, die bei allen drei Proteinen gleich sind, sind gelb hervorgehoben. Da sich die Aminosäuresequenz von Tricellulin und Tricellulin beta ausschließlich im C-Terminus-Bereich unterscheidet, könnte es sich bei Tricellulin und Tricellulin beta um unterschiedliche Spleißvarianten derselben mRNA handeln.



### Abb. 5.72: Schematische Darstellung der genomischen Region von menschlichem Tricellulin und Tricellulin beta auf Chromosom 5

Das mit dem NCBI-Programm "Evidence Viewer" und den "Accession"-Nummern (AB219936.1 und AB219937.1) von GenBank erhaltene "Allignment" stellt die unterschiedlichen Exone der beiden Spleißvarianten von Tricellulin dar. Die beiden Exone 1 und 2 sind in beiden Spleißvarianten identisch. Tricellulin beta enthält jedoch eine verkürzte Variante von Exon 3a und die c-terminale Region der beta-Form mit Exon 4b unterscheidet sich vollständig von den Exonen 4a, 5a und 6a des Tricellulins

#### 6. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es einmal, weiter zur Aufklärung von TJ-Proteinen und ihren Strukturen sowie ihren molekularen Anordnungen und physiologischen Leistungen in normalen Plattenepithelien beizutragen, insbesondere aber herauszufinden, ob es TJ-Proteine und –Systeme auch in pathologischen Bildungen wie der Plattenepithelmetaplasie des Tracheal- und Bronchialtrakts *in situ* sowie in bestimmten Zellkultur-Modellsystemen gibt und was dort ihre biochemischen und physiologischen Charakteristika sind. Dadurch sollte auch ein Beitrag zur Zell- und Molekularbiologie sowie zur Histologie der Plattenepithelmetaplasie geleistet werden, der dann als Grundlage für verbesserte Prävention, Diagnostik und Therapie des häufigsten tödlichen Tumors des Mannes auf der nördlichen Erdhalbkugel dienen könnte. Der Übersichtlichkeit halber ist die Diskussion der Ergebnisse in bestimmte Abschnitte gegliedert.

# 6.1 Tight Junctions als wirkliche "Schlussleisten" (*Zonulae occludentes*) auch in mehrschichtigen Epithelien

In vielzelligen Organismen bilden Epithelien funktionelle Grenzschichten an den Körperoberflächen und als Auskleidung vieler innerer Lumina. Zum einen trennen die Epithelien das Körperinnere und die Fortsetzung der Oberfläche, die Lumina der inneren Organe, von der Außenwelt. Zum anderen unterteilen Epithelien das Körperinnere in verschiedene Gewebe-Kompartimente. Die Epithelzellen sind dabei untereinander in vielfältiger Weise durch verschiedene Zell-Zell-Kontakte – oft in einer apikalen Anordnung als "Schlussleiste" (Stöhr 1906) - zu einem bestimmten – meist recht stabilen - Epithelgewebe verknüpft (Farguhar und Palade 1963). Dabei sind die "Tight Junctions" (TJ) für die Abtrennung und somit Aufrechterhaltung der unterschiedlichen molekularen Zusammensetzungen der einzelnen Kompartimente besonders wichtig. Sie stellen die Hauptbarriere für die parazelluläre Ausbreitung von Zellen, Partikeln und vielen Molekülarten dar (Tsukita et al. 2001; Schneeberger und Lynch 2004; Van Itallie und Anderson 2005; Aijaz et al. 2006; Furuse und Tsukita 2006).

Zwischen 1960 und 2000 wurden TJ der einschichtigen polaren Epithelien sowohl ultrastrukturell als auch physiologisch schon recht intensiv untersucht (Claude 1978; Diamond 1978; Meldolesi et al. 1978; Kachar und Pinto da Silva 1981; Stevenson und Goodenough 1984; Gumbiner 1985; Madara und Dharmsathaphorn 1985; Balda et al. 1996; Matter und Balda 1999; Tsukita et al. 2001; Van Itallie und Anderson 2005; Furuse und Tsukita 2006).

Andererseits galt seit damals auch schon das "Dogma", dass TJ oder äquivalente Strukturen in mehrschichtigen Epithelien nicht vorkommen (Elias und Friend 1975; Elias et al. 1977; Fawcett 1994), und die Frage von TJ-Strukturen und –Funktionen als reguläre Charakteristika der Plattenepithelien wie z.B. der Epidermis wird auch heute noch immer von vielen Autoren kontrovers diskutiert, obwohl seit spätestens dem Jahre 2002 die Existenz sowohl von typischen TJ-Proteinen und –Strukturen als auch von TJ-abhängigen, lebenswichtigen Funktionen in einer Reihe von Plattenepithelien eigentlich unbestreitbar ist (Morita et al. 1998; Brandner et al. 2001; Pummi et al. 2001; Brandner et al. 2002; Furuse et al. 2002; Langbein et al. 2003; Malminen et al. 2003). Eine Übersicht der Literatur hierzu ist in der Arbeit von Schlüter et al. (2004) gegeben worden.

Des Weiteren war bislang physiologisch ungeklärt, ob TJ-Strukturen in Plattenepithelien auch an der Barriere-Funktion dieser Gewebe beteiligt sind. Besonders sorgfältige elektronenmikroskopische Untersuchungen an mehrschichtigen Epithelien haben aber auch hier mehr oder weniger deutliche, TJ-typische "Kissing Points" im Querschnitt und entsprechende strangartige Relief-TJ-Strukturen im Gefrierbruch nachgewiesen, so z.B. in der Epidermis im apikalen Bereich des Stratum granulosum. Diese strangartigen Strukturen erschienen allerdings in ihrer Größe bzw. flächenhaften Ausdehnung an manchen Stellen eingeschränkt bzw. unterbrochen und wurden dann aufgrund dieser räumlichen Begrenzung von manchen Autoren auch als Maculae occludentes bezeichnet (Caputo und Peluchetti 1977; Elias et al. 1977; Schluter et al. 2004). Hieraus folgerten dann viele Autoren, dass eben ausgedehnte und geschlossene TJ-Systeme z.B. in normaler menschlicher Epidermis bzw. in anderen Plattenepithelien von Säugetieren nicht existieren (Squier 1973; Elias und Friend 1975; Elias et al. 1977; Andersen 1980; Fawcett 1994). Stattdessen wurde die offenbar ja existierende Barriere-Funktion z.B. für parazelluläre Diffusion auf der Höhe des Stratum granulosum einer interzellulären Akkumulation von Lipiden zugeschrieben, vornehmlich solchen, die von Zellen der Granulosum-Schichten in den Interzellularraum abgegeben werden und diesen Raum ausfüllen können (vgl. Diskussion bei (Matolsty 1965; Landmann et al. 1981; Landmann 1985, 1986; Orlando et al. 1992; Drenckhahn 1994; Elias 1996; Madison 2003; Norlen 2003; Segre 2003; Fluhr et al. 2006; Segre 2006). Ein wirksames TJ-System wurde – von solchen Autoren – z.T. sogar bis heute mit geradezu weltanschaulicher Inbrunst abgestritten, auch wenn man sehr wohl auf elektronenmikroskopische vielfach belegte TJ-Strukturen in der Epidermis von anderen Wirbeltieren wie etwa von Fischen, Amphibien und Sauropsiden verweisen kann (historische Übersichtsartikel: (Montagna 1974; Fox 1986; Landmann 1986; Matoltsy 1986; Sawyer 1986; Whitear 1986).

Immunfluoreszenzmikroskopie an diesen Epithelien zeigte dabei durchweg eine Ko-Lokalisierung der einzelnen TJ-Komponenten in den Zell-Zell-Grenzen der obersten lebenden Zellschichten, lichtmikroskopisch als durchgehend erscheinende *Zonula occludens*-Kontur. Diese Ergebnisse unterstützen somit die Vorstellung von der Existenz eines TJ-Abschluss-Systems in den äußeren lebenden apikalen Zellschichten der Epidermis wie in vielen, wahrscheinlich allen Plattenepithelien überhaupt. Dies wird auch durch Beobachtung von typischen TJ "Kissing Points" in diesen Zellschichten sowie von strangartigen Reliefstrukturen in Gefrierbruchpräparationen gestützt. Die dargestellten Ergebnisse stehen so in Übereinstimmung vor allem mit jüngeren immunhistochemischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen verschiedener Forschergruppen (Elias und Friend 1975; Morita et al. 1998; Brandner et al. 2001; Pummi et al. 2001; Yoshida et al. 2001; Brandner et al. 2002; Furuse et al. 2002; Langbein et al. 2002; Tebbe et al. 2002; Langbein et al. 2003; Malminen et al. 2003). Auch stimmen ihre Interpretation als "Schlussleiste" auch mit den Ergebnissen der hier beschriebenen LaCl<sub>3</sub>-Experimente wie auch mit ähnlichen "Tracer"-Experimenten in der Literatur im Grunde überein (Hashimoto 1971; McNutt et al. 1971; Squier 1973; Squier und Rooney 1976; Elias et al. 1977; Landmann et al. 1981; King 1983; Landmann 1985, 1986; Holland et al. 1989; Simon et al. 1993) vgl. auch die Ergebnisse, nicht die Interpretationen bei (Elias und Friend 1975). Dabei ist die Barriere für eine Diffusion der elektronendichten Tracer sowohl von außen nach innen als auch umgekehrt demonstrierbar.

Dass TJ-Proteine und –Strukturen an Barriere-Funktionen – z.B. gegen den Verlust von Wasser und Ionen - wesentlich beteiligt sind, ist auch durch die Experimente mit Claudin-1-"gene-knock-out"-Mäusen (Furuse et al. 2002) demonstriert worden, die am ersten postnatalen Tag alle ausnahmslos aufgrund von Austrocknung starben. Dieser Befund schließt jedoch andererseits nicht aus, dass auch interzelluläres lipidöses Material für die Bildung einer Barriere in der Epidermis gegen den Verlust von Wasser und Ionen essentiell ist bzw. in bestimmten Plattenepithelien sein kann. So starben Mäuse kurz nach ihrer Geburt, bei denen das Gen für den Fettsäuretransporter Fatp4 ausgeschaltet worden war (Herrmann et al. 2003). Auch ähnlich erscheinende Befunde bei Neugeborenen, die an angeborenen Defekten des Hyperkeratose-Kontraktur-Syndroms leiden (Holbrook et al. 1987), lassen sich so interpretieren. Zusammengenommen scheinen die Ergebnisse der Untersuchungen zur Barriere in der Epidermis - und möglicherweise auch anderer Plattenepithelien - die Hypothese von Shimono und Clementi (Shimono und Clementi 1976) zu bestätigen, dass sowohl TJ als auch interzelluläre Ablagerungen lamellarer Lipid-Anordnungen lebenswichtige Beiträge zur Bildung dieser Barriere leisten! Beide Strukturen scheinen für ein Überleben unverzichtbar zu sein.

### 6.2 Puncta occludentia in Plattenepithelien: Identifizierung und Definition als kleinstes Tight Junction-Element und Baustein für größere TJ-verwandte Strukturen

In dieser Arbeit ist das Vorkommen einiger charakteristischer interdesmosomaler Strukturen mit kompakter Mittelschicht-Struktur und von variabler, aber bemerkenswerter Ausdehnung in bestimmten Zellschichten unterhalb der Granulosum-Schicht bzw. ihres Äquivalents in nicht-epidermalen Plattenepithelien vor allem in der Zunge und der Gingiva, aber auch in der Rinderschnauze, wie die sog. Coniunctio laminosa ("lamellated Junction") und die Lunctura structa ("Sandwich Junction") bestätigt worden (vgl. Langbein et al. 2002, Schlüter et al. 2004). Mit großer Regelmäßigkeit wurde aber beobachtet, dass in bestimmten Zellschichten bis hinunter zur Plattenepithel-Mitte und manchmal sogar darüber hinaus deutlich positive Immunfluoreszenz- und Immunelektronenmikroskopie Reaktionen für einige TJ-Proteine zu beobachten waren, vor allem z.B. für Claudin-1 und z.T. auch Claudin-4 oder Occludin, ohne dass an diesen Stellen TJ-verwandte Strukturen zu erkennen waren, von gelegentlichen "Kissing Points" abgesehen (z.B. 5.12 – 5.14). Gefrierbruch-Untersuchungen solcher interdesmosomaler Regionen ließ dann aber regelmäßig kleine (<12 nm Durchmesser) Säulenstumpf- bzw. zapfenartige Erhebungen erkennen, meist in unregelmäßiger Anordnung oder eng aneinander gereiht (z.B. Abb. 5.14). Da in diesen durchweg TJ-Protein-positiven Arealen keine andere Struktur zu erkennen war, blieb nur der Schluss übrig, dass es sich bei diesen kleinen Einheiten um lokale Membran-Membran-Kontakte handelt, die an bestimmten Stellen bzw. in bestimmten Situationen sich auch zu Reihen anordnen können, danach sogar zu relief-artigen Strängen fusionieren mögen. Dieser einigen der Gefrierbruch-Immunelektronenmikroskopischen-Eindruck wird auch in Lokalisierungen z.B. von Occludin in Hepatocyten durch Fujimoto (1995) erhalten. Diese kleinste definierbare TJ-verwandte Struktureinheit, deshalb Punctum occludens ("Stud Junction") bezeichnet, scheint in manchen Zellen bzw. Membranarealen sogar recht häufig zu sein. Sie kommt, den Immuncytochemischen Reaktionen nach zu urteilen, auch in Plattenepithelmetaplasien vor (siehe auch nachstehende Abschnitte).

Das Auftreten solch kleiner *Puncta-Strukturen*, die sich lokal anhäufen bzw. aneinanderreihen können, ist an sich keine neue Gefrierbruch-Beobachtung. Sie ist auch früher schon sowohl in einschichtigen als auch in mehrschichtigen Epithelien gemacht worden und – als eine morphologische Einheit – auch mit der Bildung längerer, strangartiger Strukturelemente und so letztlich mit der Entstehung von *Zonulae occludentes* in Verbindung gebracht worden (in einschichtigen Epithelien z.B. Friend und Gilula 1972; Claude und Goodenough 1973; Montesano et al. 1975, 1976; Fawcett 1981; bzgl. mehrschichtiger

Epithelien und Plattenepithelkarzinomen vgl. z.B. McNutt et al. 1971; Breathnach 1972; Orwin et al. 1973; Elias und Friend 1975; Caputo und Peluchetti 1977; Leloup 1979; McLaughlin et al. 1985; Meyle et al. 1999; Hemmi et al. 2004). Nun ist dies- vor allem durch die Immunelektronenmikroskopie – wie auch direkt einer molekularen Hypothese zugänglich gemacht worden.

Diese *Puncta occludentia*-Strukturen sind in ihrer am wenigsten auffälligen Verteilung – in der schematischen Skizze der Abb. 6.1 dargestellt, im Vergleich sozusagen mit einer typischen Anordnung entsprechender Relief-Stränge in einer *Zonula occludens*-Anordnung (Abb.: 6.1a; vgl. Stevens und Lowe 1992). In dieser Darstellung ist der suggerierte Eindruck, dass die Stränge (a) aus den Druckknopf-Strukturen der *Puncta* (b) durch lineare Assoziation hervorgehen können, eine Hypothese, die z.B. biochemisch-genetisch in Transfektionsexperimenten prüfbar ist.



Transmembranproteine

Abb. 6.1: Schematische Darstellung einer *Zonula occludens* (a; modifiziert nach Stevens und Lowe 1992) und des Aufbaus bzw. der Verteilung von "Stud Junctions" (Puncta occludentia) in Plasmamembranen des *Stratum spinosum* der Epidermis und *Stratum spinosum*-äquivalenten Bereichen anderer Plattenepithelien. Diese "Stud Junctions", die typische TJ-Proteine enthalten, stellen die wohl kleinste Baueinheit von TJ-artigen Strukturen dar.

# 6.3 Molekulare Komponenten der TJ-Strukturen in epidermalen Keratinocyten *in situ* und in Zellkultur

Eine Zusammenfassung der biochemischen und immunologischen Nachweise von TJ-Proteinen in der Epidermis und in Keratinocyten ist in der Tab. 6.1 gegeben. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren (z.B. Brander et al. 2001, 2002) überein. Entsprechende Bestimmungen für einige Rinderplattenepithelien sind in der Tabelle 5.1 zusammengefasst. Da noch immer einige Mitglieder der Claudin-Proteinfamilie nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden können, kann das Ergebnis aber noch nicht als abgeschlossenes Bild der TJ-Proteine dieser Zellen und Gewebe angesehen werden. Außerdem ist die topologische Variabilität – verschiedene Genexpressionsmuster in verschiedenen Zellschichten – in der Epidermis beträchtlich.

### 6.4 Die TJ-Proteine und –Strukturen der Bronchialepithelien, von Bronchial-Zellkultur-Linien und der Bronchial-Plattenepithelmetaplasie

molekulare Aufbau und die besondere Der spezifische physiologische Leistungsfähigkeit, so vor allem auch die relative parazelluläre Durchlässigkeit bzw. Undurchlässigkeit sollten auch bei den Epithelien der Luftwege – besonders der Bronchien und der Bronchiolen - große Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Intaktheit und Gesundheit des Gewebes und somit des gesamten Körpers haben. So sind z.B. von Tierversuchen wie von pathologischen Untersuchungen mannigfaltige Hinweise auf Schäden des TJ-Systems berichtet worden, einschließlich Demonstrationen sogar akut einwirkender Noxen von Tabakrauch und Ozon bis zu Entzündungsprozessen (Boucher et al. 1980; Gordon et al. 1998; Coyne et al. 2002; Kohlhaufl et al. 2002; Biesalski und Nohr 2003; Coyne et al. 2003; Boitano et al. 2004; Kato et al. 2005).

Erstaunlicherweise gibt es bisher keine systematische Untersuchung über die Zell-Zell-Verbindungen, insbesondere TJ, in Bronchial-Plattenepithelmetaplasien *in situ* oder in Zellkulturmodellen. Ebenso fehlen solche Untersuchungen an entsprechenden Plattenepithelkarzinomen der Lunge (zu entsprechenden Studien von Cytokeratinen siehe u.a. die Übersicht bei Leube und Rustad 1991; ferner: van de Molengraft et al. 1993; Fisseler-Eckhoff et al. 1996; Iyonaga et al. 1997; Schlage et al. 1998; van Dorst et al. 1998). In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb auch die Frage behandelt werden, ob man Aussagen zur Molekularbiologie und zur Physiologie von entsprechenden Gewebeproben oder Zellkulturen erhalten kann, auch mit der Erwartung, dass einige davon zu diagnostischen oder präventiven Maßnahmen bzw. Verbesserungen führen könnten.

Wie Tab. 6.1 zeigt, ist die TJ-Protein-Ausstattung der Bronchialepithelzellen in situ und in den beiden Zellkultur-Linien sehr ähnlich, und die TJ-Anordnung ist typisch für einschichtige polare Epithelzellen. Auch ist die Ausstattung wie die Zonula occludens-artige Anordnung der apikalen, d.h. adluminalen Zellschicht der Plattenepithelmetaplasie-Strukturen recht ähnlich (lediglich Claudin-1 und Claudin-7 weisen hier eine generelle breitere apikolaterale Reaktion auf, vgl. Abb. 5.46). Jedoch lassen sich hier – wie auch bei den Cytokeratinen (vgl. dazu auch Leube und Rustad 1991) - deutliche vertikale Differenzierungen erkennen, auffällig vor allem für Occludin, Claudin-4, Claudin-7, Protein ZO-1 und Cingulin, Differenzierungsunterschiede, die bisher bei den entsprechenden Lungen-Karzinomen eben nicht auszumachen waren. Es bleibt zu prüfen, ob sich solche deutlichen Architekturelement-Unterschiede zur Beantwortung histologisch-diagnostischer Fragen nutzen lassen. In jedem Falle sollte der Befund, dass diese Plattenepithelmetaplasien anscheinend über ein intaktes Zonula occludens-System bei pharmakologischen und anderen therapeutischen Ansätzen ebenso verfügen, berücksichtigt werden wie bei eventuellen Beurteilungen metaplasie-ähnlicher Läsionen in situ.

Tab. 6.1: Tabellarische Übersicht der Nachweise von Tight Junction-Proteinen in verschiedenen Zelltypen bzw. Zellschichten bestimmter menschlicher Epithelgewebe bzw. Epithelzellkulturlinien (Immunfluoreszenzmikroskopie-Ergebnisse, z.T. zusammen mit SDS-PAGE-"Immunoblots")

Zelltyp		Occludin*	Tricellulin	Claudin-1	Claudin-4	Claudin-7	Protein ZO-	Cingulin
			α				1	
Bronchialepithel in situ	adluminal	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
Bronchial- Plattenepithelmetaplasie <i>in situ</i>	adluminal	positiv		positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
	basal	negativ		positiv	negativ	negativ	negativ	negativ
Bronchial- Plattenepithelkarzinom	in/an "Hornperlen"	positiv		positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
	Hornperlen-fern	positiv		positiv	positiv		positiv	positiv
CaLu-3-Zellkulturen		Positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
Zellkultur-Linie 16HBE	submers	Positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
	AIC	positiv		positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
HaCaT-Zellkulturen	einschichtig	negativ	negativ	positiv	negativ		negativ	negativ
	zweischichtig/suprabasal	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
Epidermis <i>in situ**</i>	Stratum granulosum	positiv		positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
	Stratum spinosum	negativ		z.T.	z.T.	z.T.	z.T.	z.T.
	Stratum basale	negativ		negativ	negativ	positiv	negativ	negativ

\* Die Existenz einer kleineren Spleißvariante des Occludin (Coyne et al. 2002; Ghassemifar et al. 2002) ist hier nicht berücksichtigt.

\*\* verschiedene Schichten des Stratum spinosum können in verschiedenen Teilen der Haut bzw. der Körperoberfläche lokal unterschiedlich reagieren.

----- noch nicht gesondert bestimmt

z.T. zum Teil positiv

# 6.5 Evaluierung der mehrschichtig gewachsenen bronchialen Zellkulturen als *in vitro*-Modelle für Plattenepithelmetaplasien

Die in dieser Arbeit vielfach eingesetzten menschlichen bronchialepithel-Zellkultur-Linien 16HBE und CaLu-3 können, wenn sie an einer Kulturmedium-Luft-Grenze (AIC) gehalten werden, zwar zu einer gewissen Zellschichtendicke anwachsen, die mehrschichtig erscheint (vgl. Ehrhardt et al. 2002 und darin zitierte Literatur; ebenso Mathias et al. 1995, 1996 zu pharmakologischen Versuchen an primären Kaninchen-Bronchialepithel-Zellkultur-Linien), jedoch weder elektronenmikroskopisch – morphologisch, noch immuncytochemisch, noch in ihren physiologischen Eigenschaften an echte mehrschichtige oder gar an polare einschichtige Epithelzell-"Monolayer"-Kulturen heranreicht. Vor allem lässt sich in diesen AIC-Kulturen keinerlei Basal-zu-Apikal-Differenzierung der Cytoskelettund Zellverbindungskomponenten erkennen. Diese Zellkulturen können also kein experimentelles Modellsystem für eine Plattenepithelmetaplasie darstellen, sondern müssen als etablierte Zellkultur-Linien sui generis – für welche Versuche auch immer – angesehen werden.

### 6.6 Die Tricelluline, ein Lücken-Verschluss-Protein in Epithelgeweben, und seine mögliche Bedeutung in pathologisch veränderten Epithelien

Mit der Entdeckung des Tricellulin-alpha im Jahre 2005 war schlagartig klar geworden, dass die bisherigen TJ-Analysen und -Betrachtungen sich eben nur mit der Zell-Zell-Kopplung, also der Verbindung von zwei Zellen befasst hatten, dass es aber eben auch immer Orte gibt, an denen drei Zellen aneinander grenzen. Allein schon um hier keine "Lücken" in der TJ-Barriere, in der Schlussleiste als Ganzes, entstehen zu lassen, hätte man eigentlich ein von topologisch für diese Kontaktpunkte drei Zellen gerade spezialisiertes Transmembranprotein postulieren müssen. Bisher waren diese "Dreiecken-Verklammerungen" durch ein Tricellulin (Tricellulin-alpha) nur in einschichtigen polaren Epithelien bzw. Epithelzellkulturen demonstriert worden (Ikenouchi et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit ist nun aber – am Beispiel mehrschichtig gewachsener menschlicher Keratinocyten der Linie HaCaT – gezeigt worden, dass Tricellulin auch Berührungs-Stellen von drei Zellen in einem Plattenepithelzellsystem schließen kann. Es ist wohl anzunehmen, dass zu einem vollfunktionsfähigen Plattenepithelsystem auch in einer Plattenepithelmetaplasie – ein Verschluss der "Ecken" gehört. Andererseits ist bei den Experimenten zu dieser Arbeit klar geworden, dass es mindestens zwei, eventuell noch mehr Spleißvarianten des Tricellulin-Gens gibt und

dass für andere Tricellulin-Typen derzeit noch spezifische Reagenzien fehlen. Aber schon jetzt – und trotz dieser noch empfindlichen Lücke an Nachweismöglichkeiten – hat die Existenz des Tricellulins zu einem Überdenken der TJ-Physiologie und –Pathologie geführt.

#### 6.6 Folgerungen und Forderungen

Angesichts der Tatsache, dass der häufigste maligne Tumor in unseren Breiten, das Plattenepithelkarzinom der Lunge, nicht direkt aus dem Bronchialepithel entstehen kann, sondern eben nur aus einem bereits mehrschichtigen (Plattenepithelmetaplasie) oder zu mehrschichtigem Wachstum spontan transformierten Zelltyp, auch angesichts der Tatsache, dass es für ein ouvertes Plattenepithelkarzinom derzeit keine Erfolg versprechende Therapie gibt, und schließlich auch angesichts der Tatsache, dass dieser Tumor auch dann noch sehr häufig sein wird wenn die Haupt-Noxe, der Tabakrauch, beseitigt wäre, kann es eigentlich nur Forderung geben, die erste häufige und erkennbare Vorläufer-Läsion, die die Plattenepithelmetaplasie, zum Hauptgegenstand von Diagnostik und Therapie zu machen. Dementsprechend sollte diese Metaplasie, die sich vielfach ja auch durch spezifische Probleme wie dem "Raucherhusten" bekannt gibt, auch zum Gegenstand biologischmedizinischer Forschung erklärt werden, vor allem auch deshalb, weil diese Fehlbildung grundsätzlich noch reversibel ist.

#### 7. Literatur

- Achstatter, T., R. Moll, et al. (1986). "Expression of glial filament protein (GFP) in nerve sheaths and non-neural cells re-examined using monoclonal antibodies, with special emphasis on the co-expression of GFP and cytokeratins in epithelial cells of human salivary gland and pleomorphic adenomas." <u>Differentiation</u> **31**(3): 206-27.
- Aijaz, S., M. S. Balda, et al. (2006). "Tight junctions: molecular architecture and function." <u>Int Rev Cytol</u> **248**: 261-98.
- Akat, K., H. D. Mennel, et al. (2003). "Molecular characterization of desmosomes in meningiomas and arachnoidal tissue." <u>Acta Neuropathol (Berl)</u> **106**(4): 337-47.
- Alexander, J. J., E. M. Bey, et al. (1976). "Establishment of a continuously growing cell line from primary carcinoma of the liver." <u>S Afr Med J</u> **50**(54): 2124-8.
- Alexandre, M. D., Q. Lu, et al. (2005). "Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Clconductance and increases the paracellular Na+ conductance in LLC-PK1 cells." <u>J Cell Sci</u> **118**(Pt 12): 2683-93.
- Amasheh, S., N. Meiri, et al. (2002). "Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells." J Cell Sci **115**(Pt 24): 4969-76.
- Andersen, L. (1980). "Cell junctions in squamous epithelium during wound healing in palatal mucosa of guinea pigs." <u>Scand J Dent Res</u> 88(4): 328-39.
- Anderson, J. M., B. R. Stevenson, et al. (1988). "Characterization of ZO-1, a protein component of the tight junction from mouse liver and Madin-Darby canine kidney cells." J Cell Biol **106**(4): 1141-9.
- Angst, B. D., C. Marcozzi, et al. (2001). "The cadherin superfamily: diversity in form and function." <u>J Cell</u> <u>Sci</u> **114**(Pt 4): 629-41.
- Arrate, M. P., J. M. Rodriguez, et al. (2001). "Cloning of human junctional adhesion molecule 3 (JAM3) and its identification as the JAM2 counter-receptor." J Biol Chem **276**(49): 45826-32.
- Askanazy, M. (1919). "Über die Veränderungen der großen Luftwege." <u>Corr-Blatt f. Schw. Ärzte</u> **49**: 465-474.
- Auerbach, O., J. B. Forman, et al. (1957). "Changes in the bronchial epithelium in relation to smoking and cancer of the lung; a report of progress." <u>N Engl J Med</u> **256**(3): 97-104.
- Auerbach, O., A. P. Stout, et al. (1961). "Changes in bronchial epithelium in relation to cigarette smoking and in relation to lung cancer." <u>N Engl J Med</u> **265**: 253-67.
- Aurrand-Lions, M., L. Duncan, et al. (2001). "JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells." J Biol Chem **276**(4): 2733-41.
- Aurrand-Lions, M. A., L. Duncan, et al. (2000). "Cloning of JAM-2 and JAM-3: an emerging junctional adhesion molecular family?" <u>Curr Top Microbiol Immunol</u> **251**: 91-8.
- Bacher, A., K. Griebl, et al. (1992). "Protease inhibitors suppress the formation of tight junctions in gastrointestinal cell lines." <u>Exp Cell Res</u> **200**(1): 97-104.
- Bahjaoui-Bouhaddi, M., F. Padilla, et al. (1997). "Localized deposition of M-cadherin in the glomeruli of the granular layer during the postnatal development of mouse cerebellum." <u>J Comp Neurol</u> 378(2): 180-95.
- Balcarova-Stander, J., S. E. Pfeiffer, et al. (1984). "Development of cell surface polarity in the epithelial Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line." <u>Embo J</u> **3**(11): 2687-94.
- Balda, M. S. and K. Matter (2003). "Epithelial cell adhesion and the regulation of gene expression." <u>Trends Cell Biol</u> **13**(6): 310-8.
- Balda, M. S., J. A. Whitney, et al. (1996). "Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein." <u>J Cell Biol</u> 134(4): 1031-49.
- Barrios-Rodiles, M., K. R. Brown, et al. (2005). "High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells." <u>Science</u> **307**(5715): 1621-5.
- Bazzi, H., A. Getz, et al. (2006). "Desmoglein 4 is expressed in highly differentiated keratinocytes and trichocytes in human epidermis and hair follicle." <u>Differentiation</u> **74**(2-3): 129-40.
- Bazzoni, G., O. M. Martinez-Estrada, et al. (2000). "Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin." <u>J Biol Chem</u> **275**(27): 20520-6.
- Behrens, J. (1999). "Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression." <u>Cancer</u> <u>Metastasis Rev</u> **18**(1): 15-30.
- Behrens, J., J. P. von Kries, et al. (1996). "Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1." <u>Nature</u> **382**(6592): 638-42.

- Bejui-Thivolet, F., N. Liagre, et al. (1990). "Detection of human papillomavirus DNA in squamous bronchial metaplasia and squamous cell carcinomas of the lung by in situ hybridization using biotinylated probes in paraffin-embedded specimens." <u>Hum Pathol</u> 21(1): 111-6.
- Ben-Yosef, T., I. A. Belyantseva, et al. (2003). "Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration." <u>Hum Mol Genet</u> 12(16): 2049-61.
- Beresford, W. A. (1981). "Chodroid bone." <u>Secondary cartilage and metaplasia. Urban &</u> <u>Schwarzenberg, Baltimore</u>: 67-78.
- Bierkamp, C., K. J. McLaughlin, et al. (1996). "Embryonic heart and skin defects in mice lacking plakoglobin." <u>Dev Biol</u> **180**(2): 780-5.
- Biesalski, H. K. and D. Nohr (2003). "Importance of vitamin-A for lung function and development." <u>Mol</u> <u>Aspects Med</u> **24**(6): 431-40.
- Black, H. and L. V. Ackerman (1952). "The importance of epidermoid carcinoma in situ in the histogenesis of carcinoma of the lung." <u>Ann Surg</u> **136**(1): 44-55.
- Bloom, W., Fawcett, D. W. (1975). "A Textbook of Histology." <u>10. edn. W. B. Saunders Company,</u> <u>Philadelphia</u>: 1033 pp.
- Boitano, S., Z. Safdar, et al. (2004). "Cell-cell interactions in regulating lung function." <u>Am J Physiol</u> <u>Lung Cell Mol Physiol</u> **287**(3): L455-9.
- Bonikos, D. S., K. G. Bensch, et al. (1976). "Bronchopulmonary dysplasia: the pulmonary pathologic sequel of necrotizing bronchiolitis and pulmonary fibrosis." <u>Hum Pathol</u> **7**(6): 643-66.
- Bonne, S., J. van Hengel, et al. (1999). "Plakophilin-3, a novel armadillo-like protein present in nuclei and desmosomes of epithelial cells." J Cell Sci **112 ( Pt 14)**: 2265-76.
- Borrmann, C. M., C. Grund, et al. (2006). "The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. II. Colocalizations of desmosomal and fascia adhaerens molecules in the intercalated disk." <u>Eur J Cell Biol</u>.
- Borrmann, C. M., C. Mertens, et al. (2000). "Molecular diversity of plaques of epithelial-adhering junctions." <u>Ann N Y Acad Sci</u> **915**: 144-50.
- Bosch, F. X., R. E. Leube, et al. (1988). "Expression of simple epithelial type cytokeratins in stratified epithelia as detected by immunolocalization and hybridization in situ." J Cell Biol **106**(5): 1635-48.
- Bosch, F. X., J. P. Ouhayoun, et al. (1989). "Extensive changes in cytokeratin expression patterns in pathologically affected human gingiva." <u>Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol</u> 58(1): 59-77.
- Boucher, R. C., J. Johnson, et al. (1980). "The effect of cigarette smoke on the permeability of guinea pig airways." Lab Invest **43**(1): 94-100.
- Boukamp, P., R. T. Petrussevska, et al. (1988). "Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line." J Cell Biol **106**(3): 761-71.
- Boukamp, P., E. J. Stanbridge, et al. (1990). "c-Ha-ras oncogene expression in immortalized human keratinocytes (HaCaT) alters growth potential in vivo but lacks correlation with malignancy." <u>Cancer Res</u> **50**(9): 2840-7.
- Brandner, J. M., P. Houdek, et al. (2001). "Tight-Junction-Systems in mammalian squamous stratified epithelia." <u>Biol. Cell</u> **93**(3/4): 247.
- Brandner, J. M., Houdek, P., Kief, S., Grund, C., Franke, W. W., Moll, I. (2000). "Are there "tightjunctions" in human epidermis?" <u>Abstract.</u>
- Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology,
- Chicago, May 9 ± 12, 2000. J. Invest. Dermatol. 114: 823.
- Brandner, J. M., S. Kief, et al. (2002). "Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes." <u>Eur J Cell Biol</u> **81**(5): 253-63.
- Breathnach, A. S. (1971). "An Atlas of the Ultrastructure of Human Skin." J. & A. Churchill, London.
- Breathnach, A. S., C. Stolinski, et al. (1972). "Ultrastructure of foetal and post-natal human skin as revealed by the freeze-fracture replication technique." <u>Micron</u> **3**: 287-304.
- Broers, J. L., L. de Leij, et al. (1989). "Expression of intermediate filament proteins in fetal and adult human lung tissues." <u>Differentiation</u> **40**(2): 119-28.
- Broers, J. L., F. C. Ramaekers, et al. (1988). "Cytokeratins in different types of human lung cancer as monitored by chain-specific monoclonal antibodies." <u>Cancer Res</u> **48**(11): 3221-9.
- Buxton, R. S., P. Cowin, et al. (1993). "Nomenclature of the desmosomal cadherins." <u>J Cell Biol</u> **121**(3): 481-3.
- Caputo, R. (1981). "The junctions in skin." Am J Dermatopathol 3(3): 315-22.
- Caputo, R. and D. Peluchetti (1977). "The junctions of normal human epidermis. A freeze-fracture study." <u>J Ultrastruct Res</u> 61(1): 44-61.
- Cereijido, M., J. Valdes, et al. (1998). "Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity." <u>Annu Rev Physiol</u> **60**: 161-77.

- Citi, S., H. Sabanay, et al. (1988). "Cingulin, a new peripheral component of tight junctions." <u>Nature</u> **333**(6170): 272-6.
- Claude, P. (1978). "Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens." <u>J Membr Biol</u> **39**(2-3): 219-32.
- Claude, P. and D. A. Goodenough (1973). "Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia." J Cell Biol **58**(2): 390-400.
- Coggins, C. R. (1998). "A review of chronic inhalation studies with mainstream cigarette smoke in rats and mice." <u>Toxicol Pathol</u> **26**(3): 307-14; discussion 315.
- Colegio, O. R., C. M. Van Itallie, et al. (2002). "Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells." <u>Am J Physiol Cell Physiol</u> **283**(1): C142-7.
- Collins, J. E., P. K. Legan, et al. (1991). "Cloning and sequence analysis of desmosomal glycoproteins 2 and 3 (desmocollins): cadherin-like desmosomal adhesion molecules with heterogeneous cytoplasmic domains." J Cell Biol **113**(2): 381-91.
- Coulombe, P. A., L. Ma, et al. (2001). "Intermediate filaments at a glance." <u>J Cell Sci</u> **114**(Pt 24): 4345-7.
- Cowin, P., Franke, W.W., Grund, C., Kapprell, H.-H., Kartenbeck, J. (1985). "The desmosomeintermediate filament complex." In: The Cell in Contact (G.M. Edelmann, J.-P. Thiery, eds), John-Wiley & Sons, New York: 427-460.
- Cowin, P., H. P. Kapprell, et al. (1985). "The complement of desmosomal plaque proteins in different cell types." <u>J Cell Biol</u> **101**(4): 1442-54.
- Cowin, P., H. P. Kapprell, et al. (1986). "Plakoglobin: a protein common to different kinds of intercellular adhering junctions." <u>Cell</u> **46**(7): 1063-73.
- Cowin, P., D. Mattey, et al. (1984). "Distribution of desmosomal components in the tissues of vertebrates, studied by fluorescent antibody staining." <u>J Cell Sci</u> 66: 119-32.
- Coyne, C. B., T. M. Gambling, et al. (2003). "Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability." <u>Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol</u> **285**(5): L1166-78.
- Coyne, C. B., M. K. Vanhook, et al. (2002). "Regulation of airway tight junctions by proinflammatory cytokines." <u>Mol Biol Cell</u> **13**(9): 3218-34.
- Cozens, Á. L., M. J. Yezzi, et al. (1994). "CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells." <u>Am J Respir Cell Mol Biol</u> **10**(1): 38-47.
- Cunningham, S. A., M. P. Arrate, et al. (2000). "A novel protein with homology to the junctional adhesion molecule. Characterization of leukocyte interactions." J Biol Chem **275**(44): 34750-6.
- Czernobilsky, B., R. Moll, et al. (1984). "Intermediate filaments of normal and neoplastic tissues of the female genital tract with emphasis on problems of differential tumor diagnosis." <u>Pathol Res</u> <u>Pract</u> **179**(1): 31-7.
- Damjanov, I., Linder, J. (1996). "Anderson's Pathology." Volume 1, Mosby, St. Louis, USA.
- D'Atri, F. and S. Citi (2002). "Molecular complexity of vertebrate tight junctions (Review)." <u>Mol Membr</u> <u>Biol</u> **19**(2): 103-12.
- de Boer, C. J., E. van Dorst, et al. (1999). "Changing roles of cadherins and catenins during progression of squamous intraepithelial lesions in the uterine cervix." <u>Am J Pathol</u> **155**(2): 505-15.
- Delie, F. and W. Rubas (1997). "A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model." <u>Crit Rev</u> <u>Ther Drug Carrier Syst</u> **14**(3): 221-86.
- Diamond, J. M. (1978). "Channels in epithelial cell membranes and junctions." <u>Fed Proc</u> **37**(12): 2639-43.
- Drenckhahn, D., Zenker, W. (1994). "Benninghoff Anatomie." <u>15. edn. Urban & Schwarzenberg,</u> <u>München</u> **1. & 2.**: 866 pp. & 985 pp.
- Duguay, D., R. A. Foty, et al. (2003). "Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: qualitative and quantitative determinants." <u>Dev Biol</u> **253**(2): 309-23.
- Ebata, N., Y. Nodasaka, et al. (2001). "Desmoplakin as a specific marker of lymphatic vessels." <u>Microvasc Res</u> **61**(1): 40-8.
- Ebnet, K., C. U. Schulz, et al. (2000). "Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domaincontaining proteins AF-6 and ZO-1." J Biol Chem **275**(36): 27979-88.
- Ebnet, K., A. Suzuki, et al. (2001). "The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM)." Embo J 20(14): 3738-48.
- Edelman, G. M., Thiery, J. -P. (Eds.) (1985). "The Cell in Contact." John Wiley & Sons, New York: 507 pp.
- Ehrhardt, C., C. Kneuer, et al. (2002). "Influence of apical fluid volume on the development of functional intercellular junctions in the human epithelial cell line 16HBE14o-: implications for the use of this cell line as an in vitro model for bronchial drug absorption studies." <u>Cell Tissue Res</u> **308**(3): 391-400.
- Elias, P. M. (1996). "The stratum corneum revisited." J Dermatol 23(11): 756-8.

- Elias, P. M. and D. S. Friend (1975). "The permeability barrier in mammalian epidermis." <u>J Cell Biol</u> **65**(1): 180-91.
- Elias, P. M. and D. S. Friend (1976). "Vitamin-A-induced mucous metaplasia. An in vitro system for modulating tight and gap junction differentiation." <u>J Cell Biol</u> **68**(2): 173-88.
- Elias, P. M., N. S. McNutt, et al. (1977). "Membrane alterations during cornification of mammalian squamous epithelia: a freeze-fracture, tracer, and thin-section study." <u>Anat Rec</u> **189**(4): 577-94.
- Eshkind, L., Q. Tian, et al. (2002). "Loss of desmoglein 2 suggests essential functions for early embryonic development and proliferation of embryonal stem cells." <u>Eur J Cell Biol</u> **81**(11): 592-8.
- Evers, B. M., C. M. Townsend, Jr., et al. (1991). "Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth." <u>Gastroenterology</u> **101**(2): 303-11.
- Fanning, A. S., L. L. Mitic, et al. (1999). "Transmembrane proteins in the tight junction barrier." <u>J Am</u> <u>Soc Nephrol</u> **10**(6): 1337-45.
- Farquhar, M. G. and G. E. Palade (1963). "Junctional complexes in various epithelia." <u>J Cell Biol</u> **17**: 375-412.
- Fawcett, D. W. (1981). "The Cell." W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA 2. Ausgabe.
- Fawcett, D. W. (1994). "ATextbook of Histology." Chapman and Hall, New York, USA.
- Fejerskov, O. (1973). "Keratinized squamous epithelium of normal and wounded palatal mucosa in guinea pigs. A light and electron microscopical investigation." J Periodontal Res Suppl **11**: 1-80.
- Ferrary, E. and O. Sterkers (1998). "Mechanisms of endolymph secretion." <u>Kidney Int Suppl</u> 65: S98-103.
- Fisseler-Eckhoff, A., S. Erfkamp, et al. (1996). "Cytokeratin expression in preneoplastic lesions and early squamous cell carcinoma of the bronchi." <u>Pathol Res Pract</u> **192**(6): 552-9.
- Fluhr, J. W., K. R. Feingold, et al. (2006). "Transepidermal water loss reflects permeability barrier status: validation in human and rodent in vivo and ex vivo models." <u>Exp Dermatol **15**(7)</u>: 483-92.
- Fogh, J., J. M. Fogh, et al. (1977). "One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice." <u>J Natl Cancer Inst</u> **59**(1): 221-6.
- Fox, H. (1986). "The skin of Amphibia, Kapitel 5: Epidermis." In: Biology of the Integument. Band 2 Vertebrates. Breiter-Hahn, J., Matoltsy, A.G., Richards, K.S. (eds.). Springer-Verlag, Heidelberg: 78-110.
- Franke, W. W., M. D. Goldschmidt, et al. (1989). "Molecular cloning and amino acid sequence of human plakoglobin, the common junctional plaque protein." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **86**(11): 4027-31.
- Franke, W. W., C. Grund, et al. (1983). "Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. IV. Ultrastructure of primary mesenchymal cells and their cell-cell interactions." <u>Differentiation</u> 25(2): 121-41.
- Franke, W. W., C. Grund, et al. (1982). "Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. III. Primary mesenchymal cells and the first appearance of vimentin filaments." <u>Differentiation</u> 23(1): 43-59.
- Franke, W. W., P. J. Koch, et al. (1994). "The desmosome and the syndesmos: cell junctions in normal development and in malignancy." <u>Princess Takamatsu Symp</u> **24**: 14-27.
- Franke, W. W., R. Moll, et al. (1983). "Immunocytochemical identification of epithelium-derived human tumors with antibodies to desmosomal plaque proteins." Proc Natl Acad Sci U S A 80(2): 543-7.
- Franke, W. W., R. Moll, et al. (1982). "Desmoplakins of epithelial and myocardial desmosomes are immunologically and biochemically related." <u>Differentiation</u> **23**(2): 115-27.
- Franke, W. W., Moll, R., Achstätter, T., Kuhn, C. (1986). "Cell typing of epithelia and carcinomas of the female genital tract using cytoskeletal proteins as markers." <u>In: Peto, R., zur Hausen, H. (eds)</u> <u>Banbury Report 212: Viral etiology of cervical cancer. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold</u> Spring Harbor, New York: 121-148.
- Franke, W. W., E. Schmid, et al. (1981). "Antibodies to high molecular weight polypeptides of desmosomes: specific localization of a class of junctional proteins in cells and tissue." <u>Differentiation</u> 20(3): 217-41.
- Franke, W. W., E. Schmid, et al. (1979). "Widespread occurrence of intermediate-sized filaments of the vimentin-type in cultured cells from diverse vertebrates." <u>Exp Cell Res</u> **123**(1): 25-46.
- Franke, W. W., S. Winter, et al. (1987). "Identification of the conserved, conformation-dependent cytokeratin epitope recognized by monoclonal antibody (lu-5)." <u>Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol</u> **411**(2): 137-47.
- Freinkel, R. K., Woodley, D.T. (eds.) (2001). "The Biology of the skin." <u>The Parthenon Publishing Group</u> Limited, Casterton Hall, Carnforth, Lancs., UK.
- Friend, D. S. and N. B. Gilula (1972). "Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues." J Cell Biol **53**(3): 758-76.

- Fuchs, E. and K. Weber (1994). "Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease." Annu Rev Biochem 63: 345-82.
- Fujimoto, K. (1995). "Freeze-fracture replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labeling of integral membrane proteins. Application to the immunogold labeling of intercellular junctional complexes." J Cell Sci 108 (Pt 11): 3443-9.
- Fukuhara, A., K. Irie, et al. (2002). "Involvement of nectin in the localization of junctional adhesion molecule at tight junctions." <u>Oncogene</u> **21**(50): 7642-55. Fukuhara, A., K. Irie, et al. (2002). "Role of nectin in organization of tight junctions in epithelial cells."
- Genes Cells 7(10): 1059-72.
- Furukawa, C., Y. Daigo, et al. (2005). "Plakophilin 3 oncogene as prognostic marker and therapeutic target for lung cancer." Cancer Res 65(16): 7102-10.
- Furuse, M., K. Furuse, et al. (2001). "Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells." J Cell Biol 153(2): 263-72.
- Furuse, M., M. Hata, et al. (2002). "Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice." J Cell Biol 156(6): 1099-111.
- Furuse, M., T. Hirase, et al. (1993). "Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions." J Cell Biol 123(6 Pt 2): 1777-88.
- Furuse, M., H. Sasaki, et al. (1998). "A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts." J Cell Biol 143(2): 391-401.
- Furuse, M. and S. Tsukita (2006). "Claudins in occluding junctions of humans and flies." Trends Cell Biol.
- Gallicano, G. I., C. Bauer, et al. (2001). "Rescuing desmoplakin function in extra-embryonic ectoderm reveals the importance of this protein in embryonic heart, neuroepithelium, skin and vasculature." Development 128(6): 929-41.
- Garrod, D. R. (1993). "Desmosomes and hemidesmosomes." Curr Opin Cell Biol 5(1): 30-40.
- Garrod, D. R., Mattey, D.L., Marston, J.E., MEasures, H.R. Vilela, M.J. (1990). "Desmosomes." In: Edelmann, G.M., Cunningham, B.A., Thiery, J.P. (eds): Morphoregulatory molecules. John Wiley and Sons, New York Chichester Brisbane Toronto Singapore: 318-339.
- Gaush, C. R., W. L. Hard, et al. (1966). "Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK)." Proc Soc Exp Biol Med 122(3): 931-5.
- Geiger, B., E. Schmid, et al. (1983). "Spatial distribution of proteins specific for desmosomes and adhaerens junctions in epithelial cells demonstrated by double immunofluorescence microscopy." Differentiation 23(3): 189-205.
- Getsios, S., A. C. Huen, et al. (2004). "Working out the strength and flexibility of desmosomes." Nat Rev Mol Cell Biol 5(4): 271-81.
- Ghassemifar, M. R., B. Sheth, et al. (2002). "Occludin TM4(-): an isoform of the tight junction protein present in primates lacking the fourth transmembrane domain." J Cell Sci 115(Pt 15): 3171-80.
- Giepmans, B. N. and W. H. Moolenaar (1998). "The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein." Curr Biol 8(16): 931-4.
- Godfrey, R. W. (1997). "Human airway epithelial tight junctions." Microsc Res Tech 38(5): 488-99.
- Godsel, L. M., Getsios, S., Huen, A. C., Green, K. J. (2004). "The molecular composition and function of desmosomes." Cell Adhesion (Behrens, J., Nelson, W. J., eds.; Handbook of Experimental Pharmacology 165) Springer Verlag, Berlin: 137-193.
- Gonzalez-Mariscal, L., A. Betanzos, et al. (2003). "Tight junction proteins." Prog Biophys Mol Biol 81(1): 1-44.
- Goodenough, D. A. (1999). "Plugging the leaks." Proc Natl Acad Sci U S A 96(2): 319-21.
- Goodenough, D. A. and N. B. Gilula (1974). "The splitting of hepatocyte gap junctions and zonulae occludentes with hypertonic disaccharides." J Cell Biol 61(3): 575-90.
- Goodenough, D. A. and D. L. Paul (2003). "Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels." Nat Rev Mol Cell Biol 4(4): 285-94.
- Gordon, R. E., E. Park, et al. (1998). "Taurine protects rat bronchioles from acute ozone exposure: a freeze fracture and electron microscopic study." Exp Lung Res 24(5): 659-74.
- Gould, V. E., Moll, R., Chejfec, G., Franke, W.W. (1988). "Cytoskeletal Characteristics of Epithelial Neoplasms of the Lung." in: Rosen, S.T., Mulshine, J.L., Cuttitta, F., Abrams, P.G. (eds.) Biology of Lung Cancer 37.
- Gould, V. E., R. Wenk, et al. (1971). "Ultrastructural observations on bronchial epithelial hyperplasia and squamous metaplasia." Cancer 28(2): 426-36.
- Gow, A., C. Davies, et al. (2004). "Deafness in Claudin 11-null mice reveals the critical contribution of basal cell tight junctions to stria vascularis function." J Neurosci 24(32): 7051-62.
- Gow, A., C. M. Southwood, et al. (1999). "CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/claudin-11 null mice." Cell 99(6): 649-59.

- Green, K. J. and C. A. Gaudry (2000). "Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments?" <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **1**(3): 208-16.
- Green, K. J., B. Geiger, et al. (1987). "The relationship between intermediate filaments and microfilaments before and during the formation of desmosomes and adherens-type junctions in mouse epidermal keratinocytes." J Cell Biol **104**(5): 1389-402.
- Green, K. J. and J. C. Jones (1996). "Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components." Faseb J **10**(8): 871-81.
- Griswold, M. D. (1995). "Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis." <u>Biol Reprod</u> 52(2): 211-6.
- Grossmann, K. S., C. Grund, et al. (2004). "Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac junction formation." J Cell Biol **167**(1): 149-60.
- Gumbiner, B., Louvard, D. (1985). "Localized barriers in the plasma membranes: a common way to form domains." <u>Trends Biochem Sci</u> **10**: 435-438.
- Gumbiner, B., T. Lowenkopf, et al. (1991). "Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(8): 3460-4.
- Gumbiner, B. M. (1996). "Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis." <u>Cell</u> **84**(3): 345-57.
- Hadj-Rabia, S., L. Baala, et al. (2004). "Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease." <u>Gastroenterology</u> **127**(5): 1386-90.
- Haftek, M., M. U. Hansen, et al. (1996). "Interkeratinocyte adherens junctions: immunocytochemical visualization of cell-cell junctional structures, distinct from desmosomes, in human epidermis." J Invest Dermatol **106**(3): 498-504.
- Hammerling, B., C. Grund, et al. (2006). "The complexus adhaerens of mammalian lymphatic endothelia revisited: a junction even more complex than hitherto thought." <u>Cell Tissue Res</u> 324(1): 55-67.
- Hanakawa, Y., H. Li, et al. (2004). "Desmogleins 1 and 3 in the companion layer anchor mouse anagen hair to the follicle." J Invest Dermatol **123**(5): 817-22.
- Hasegawa, M., A. Seto, et al. (1996). "Localization of E-cadherin in peripheral glia after nerve injury and repair." <u>J Neuropathol Exp Neurol</u> **55**(4): 424-34.
- Hashimoto, K. (1971). "Intercellular spaces of the human epidermis as demonstrated with lanthanum." J Invest Dermatol **57**(1): 17-31.
- Haskins, J., L. Gu, et al. (1998). "ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin." <u>J Cell Biol</u> **141**(1): 199-208.
- Hatzfeld, M., G. I. Kristjansson, et al. (1994). "Band 6 protein, a major constituent of desmosomes from stratified epithelia, is a novel member of the armadillo multigene family." J Cell Sci **107 ( Pt 8)**: 2259-70.
- Heid, H. W., A. Schmidt, et al. (1994). "Cell type-specific desmosomal plaque proteins of the plakoglobin family: plakophilin 1 (band 6 protein)." <u>Differentiation</u> **58**(2): 113-31.
- Hemmi, A., N. Terada, et al. (2004). "Squamous cell carcinoma with sarcomatous feature (so-called carcinosarcoma) of stomach probably metastasized from esophageal tumor: a case report with quick-freezing and deep-etching method." <u>Med Electron Microsc</u> **37**(2): 119-29.
- Herrmann, H. and U. Aebi (2004). "Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds." Annu Rev Biochem **73**: 749-89.
- Herrmann, H., Harris, J. R. (1998). "Intermediate Filaments." <u>Subcellular Biochemistry Series, Plenum</u> Press, New York **31**.
- Herrmann, T., F. van der Hoeven, et al. (2003). "Mice with targeted disruption of the fatty acid transport protein 4 (Fatp 4, Slc27a4) gene show features of lethal restrictive dermopathy." <u>J Cell Biol</u> **161**(6): 1105-15.
- Hirabayashi, S., M. Tajima, et al. (2003). "JAM4, a junctional cell adhesion molecule interacting with a tight junction protein, MAGI-1." Mol Cell Biol **23**(12): 4267-82.
- Hirano, T., N. Kobayashi, et al. (2000). "Null mutation of PCLN-1/Claudin-16 results in bovine chronic interstitial nephritis." <u>Genome Res</u> **10**(5): 659-63.
- Hirase, T., S. Kawashima, et al. (2001). "Regulation of tight junction permeability and occludin phosphorylation by Rhoa-p160ROCK-dependent and -independent mechanisms." <u>J Biol Chem</u> 276(13): 10423-31.
- Hofmann, I., M. Schnolzer, et al. (2002). "Symplekin, a constitutive protein of karyo- and cytoplasmic particles involved in mRNA biogenesis in Xenopus laevis oocytes." <u>Mol Biol Cell</u> **13**(5): 1665-76.
- Holbrook, K. A., B. A. Dale, et al. (1987). "Arrested epidermal morphogenesis in three newborn infants with a fatal genetic disorder (restrictive dermopathy)." J Invest Dermatol **88**(3): 330-9.
- Holland, V. F., G. A. Zampighi, et al. (1989). "Morphology of fungiform papillae in canine lingual epithelium: location of intercellular junctions in the epithelium." J Comp Neurol **279**(1): 13-27.

Hollnagel, A., C. Grund, et al. (2002). "The cell adhesion molecule M-cadherin is not essential for muscle development and regeneration." Mol Cell Biol **22**(13): 4760-70.

Holtfreter, J. (1939). "Gewebeaffinität, ein Mittel der embryonalen Formbildung." <u>Arch. Exp. Zellforsch.</u> Gewebezucht **23**: 169-209.

Hoshino, T., K. Shimizu, et al. (2004). "A novel role of nectins in inhibition of the E-cadherin-induced activation of Rac and formation of cell-cell adherens junctions." <u>Mol Biol Cell</u> **15**(3): 1077-88.

Huelsken, J. and W. Birchmeier (2001). "New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates." <u>Curr Opin Genet Dev</u> **11**(5): 547-53.

Huszar, M., O. Gigi-Leitner, et al. (1986). "Monoclonal antibodies to various acidic (type I) cytokeratins of stratified epithelia. Selective markers for stratification and squamous cell carcinomas." <u>Differentiation</u> **31**(2): 141-53.

Ide, N., Y. Hata, et al. (1999). "Localization of membrane-associated guanylate kinase (MAGI)-1/BAIassociated protein (BAP) 1 at tight junctions of epithelial cells." <u>Oncogene</u> **18**(54): 7810-5.

Ikeda, W., H. Nakanishi, et al. (1999). "Afadin: A key molecule essential for structural organization of cell-cell junctions of polarized epithelia during embryogenesis." <u>J Cell Biol</u> **146**(5): 1117-32.

Ikenouchi, J., M. Furuse, et al. (2005). "Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells." <u>J Cell Biol</u> **171**(6): 939-45.

Inayama, Y., G. E. Hook, et al. (1988). "The differentiation potential of tracheal basal cells." <u>Lab Invest</u> 58(6): 706-17.

Itoh, M., H. Sasaki, et al. (2001). "Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions." <u>J Cell Biol</u> **154**(3): 491-7.

Iyonaga, K., M. Miyajima, et al. (1997). "Alterations in cytokeratin expression by the alveolar lining epithelial cells in lung tissues from patients with idiopathic pulmonary fibrosis." <u>J Pathol</u> **182**(2): 217-24.

Jamora, C. and E. Fuchs (2002). "Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton." <u>Nat Cell Biol</u> **4**(4): E101-8.

Jesaitis, L. A. and D. A. Goodenough (1994). "Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein." <u>J Cell Biol</u> **124**(6): 949-61.

Johansson, A., M. Driessens, et al. (2000). "The mammalian homologue of the Caenorhabditis elegans polarity protein PAR-6 is a binding partner for the Rho GTPases Cdc42 and Rac1." <u>J Cell Sci</u> **113 ( Pt 18)**: 3267-75.

Kachar, B. and P. Pinto da Silva (1981). "Rapid massive assembly of tight junction strands." <u>Science</u> **213**(4507): 541-4.

Kaiser, H. W., W. Ness, et al. (1993). "Talin: adherens junction protein is localized at the epidermaldermal interface in skin." <u>J Invest Dermatol</u> **101**(6): 789-93.

Kamberov, E., O. Makarova, et al. (2000). "Molecular cloning and characterization of Pals, proteins associated with mLin-7." J Biol Chem **275**(15): 11425-31.

Kapprell, H. P., K. Owaribe, et al. (1988). "Identification of a basic protein of Mr 75,000 as an accessory desmosomal plaque protein in stratified and complex epithelia." J Cell Biol **106**(5): 1679-91.

Kapprell, H.-P., Owaribe, K., Schmelz, M., Franke, W.W. (1990). "Subplasmalemmal plaques of intercellular junctions: common and distinguishing proteins." <u>See Garrod et al., 1990</u>: 285-314.

Karnovsky, M. L. and H. W. Deane (1955). "Aldehyde formation in the lipide droplets of the adrenal cortex during fixation, as demonstrated chemically and histochemically." <u>J Histochem Cytochem</u> **3**(2): 85-102.

Kartenbeck, J., Langbein, L. (2003). "Epithelien." <u>Lehrbuch Vorklinik, Eds.: Schmidt, H. G., Unsicker, K.</u> **B**(B16): 317-330.

Kartenbeck, J., K. Schwechheimer, et al. (1984). "Attachment of vimentin filaments to desmosomal plaques in human meningiomal cells and arachnoidal tissue." J Cell Biol **98**(3): 1072-81.

Kato, Y., T. Hirano, et al. (2005). "Frequent loss of E-cadherin and/or catenins in intrabronchial lesions during carcinogenesis of the bronchial epithelium." Lung Cancer **48**(3): 323-30.

Kelly, D. E. and F. L. Shienvold (1976). "The desmosome: fine structural studies with freeze-fracture replication and tannic acid staining of sectioned epidermis." Cell Tissue Res **172**(3): 309-23.

Keon, B. H., S. Schafer, et al. (1996). "Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein." <u>J Cell</u> Biol **134**(4): 1003-18.

Kikyo, M., T. Matozaki, et al. (2000). "Cell-cell adhesion-mediated tyrosine phosphorylation of nectin-2delta, an immunoglobulin-like cell adhesion molecule at adherens junctions." <u>Oncogene</u> **19**(35): 4022-8.

King, B. F. (1983). "The permeability of nonhuman primate vaginal epithelium: a freeze-fracture and tracer-perfusion study." <u>J Ultrastruct Res</u> **83**(1): 99-110.

- King, I. A., K. H. Sullivan, et al. (1995). "The desmocollins of human foreskin epidermis: identification and chromosomal assignment of a third gene and expression patterns of the three isoforms." J <u>Invest Dermatol</u> **105**(3): 314-21.
- Kitajima, Y. and S. Mori (1980). "Freeze-fracture study of the occurrence of plasma membrane differentiations in human basal cell carcinoma." J Dermatol **7**(6): 389-96.
- Kitajiri, S., T. Miyamoto, et al. (2004). "Compartmentalization established by claudin-11-based tight junctions in stria vascularis is required for hearing through generation of endocochlear potential." J Cell Sci **117**(Pt 21): 5087-96.
- Kiuchi-Saishin, Y., S. Gotoh, et al. (2002). "Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments." J Am Soc Nephrol **13**(4): 875-86.
- Klingmuller, G., H. U. Klehr, et al. (1970). "[Desmosomes in the cytoplasm of dedifferentiated keratinocytes of squamous cell carcinoma]." <u>Arch Klin Exp Dermatol</u> **238**(4): 356-65.
- Koch, P. J. and W. W. Franke (1994). "Desmosonal cadherins: another growing multigene family of adhesion molecules." <u>Curr Opin Cell Biol</u> **6**(5): 682-7.
- Koch, P. J., M. D. Goldschmidt, et al. (1992). "Complexity and expression patterns of the desmosomal cadherins." Proc Natl Acad Sci U S A 89(1): 353-7.
- Koch, P. J., M. J. Walsh, et al. (1990). "Identification of desmoglein, a constitutive desmosomal glycoprotein, as a member of the cadherin family of cell adhesion molecules." <u>Eur J Cell Biol</u> 53(1): 1-12.
- Kohlhaufl, M., K. Haussinger, et al. (2002). "Inhalation of aerosolized vitamin a: reversibility of metaplasia and dysplasia of human respiratory epithelia -- a prospective pilot study." <u>Eur J Med</u> <u>Res</u> **7**(2): 72-8.
- Konishi, T., P. É. Hamrick, et al. (1978). "Ion transport in guinea pig cochlea. I. Potassium and sodium transport." <u>Acta Otolaryngol</u> **86**(1-2): 22-34.
- Kostrewa, D., M. Brockhaus, et al. (2001). "X-ray structure of junctional adhesion molecule: structural basis for homophilic adhesion via a novel dimerization motif." <u>Embo J</u> **20**(16): 4391-8.
- Krunic, A. L., D. R. Garrod, et al. (1998). "Immunohistochemical staining for desmogleins 1 and 2 in keratinocytic neoplasms with squamous phenotype: actinic keratosis, keratoacanthoma and squamous cell carcinoma of the skin." <u>Br J Cancer</u> **77**(8): 1275-9.
- Kühnel, W. (2002). "Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie." <u>11 edn.</u> <u>Thieme, Stuttgart</u> **535 pp.**
- Kuruc, N. and W. W. Franke (1988). "Transient coexpression of desmin and cytokeratins 8 and 18 in developing myocardial cells of some vertebrate species." <u>Differentiation</u> **38**(3): 177-93.
- Kuruc, N., R. E. Leube, et al. (1989). "Synthesis of cytokeratin 13, a component characteristic of internal stratified epithelia, is not induced in human epidermal tumors." <u>Differentiation</u> **42**(2): 111-23.
- Kurzen, H., I. Munzing, et al. (2003). "Expression of desmosomal proteins in squamous cell carcinomas of the skin." <u>J Cutan Pathol</u> **30**(10): 621-30.
- Landmann, L. (1985). "Permeabilitätsbarriere der Epidermis." Grosse
- Scripta 9. Grosse Verlag, Berlin.
- Landmann, L. (1986). "The skin of Reptiles, Kapitel 9: Epidermis." <u>In: Biology of the Integument. Band 2</u> <u>Vertebrates. Breiter-Hahn, J., Matoltsy, A.G., Richards, K.S. (eds.). Springer-Verlag,</u> <u>Heidelberg</u>: 150-187.
- Landmann, L. (1986). "The skin of reptiles: epidermis and dermis." in: J.
- Bereiter-Hahn, A. G. Matoltsy, K. S. Richards (eds.), Biology of the
- Integument. 2. Vertebrates. Springer-Verlag, Berlin: 150-187.
- Landmann, L., C. Stolinski, et al. (1981). "The permeability barrier in the epidermis of the grass snake during the resting stage of the sloughing cycle." <u>Cell Tissue Res</u> **215**(2): 369-82.
- Langbein, L., C. Grund, et al. (2002). "Tight junctions and compositionally related junctional structures in mammalian stratified epithelia and cell cultures derived therefrom." <u>Eur J Cell Biol</u> **81**(8): 419-35.
- Langbein, L., U. F. Pape, et al. (2003). "Tight junction-related structures in the absence of a lumen: occludin, claudins and tight junction plaque proteins in densely packed cell formations of stratified epithelia and squamous cell carcinomas." <u>Eur J Cell Biol</u> **82**(8): 385-400.
- Leloup, R., Laurent, L., Ronveaux, M.F., Drochmans, P., Wanson J.C. (1979). "Desmosomes and Desmogenesis in the Epidermis of Calf Muzzle." <u>Biol. Cellulaire</u> **34**: 137-152.
- Lersch, R. and E. Fuchs (1988). "Sequence and expression of a type II keratin, K5, in human epidermal cells." <u>Mol Cell Biol</u> **8**(1): 486-93.
- Leube, R. E., B. L. Bader, et al. (1988). "Molecular characterization and expression of the stratificationrelated cytokeratins 4 and 15." J Cell Biol **106**(4): 1249-61.
- Leube, R. E., Kartenbeck, J. (1996). "Molekulare Komponenten der Intermediärfilamente und ihrer Verankerungsstrukturen in Epithelzellen: Differenzierungsmarker in der Gewebe- und Tumordiagnostik." In: Onkologie. Zeller, zur Hausen, H. (Hrsg.).

Leube, R. E. and T. J. Rustad (1991). "Squamous cell metaplasia in the human lung: molecular characteristics of epithelial stratification." Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 61(4): 227-53.

- Lewis, J. E., J. K. Wahl, 3rd, et al. (1997). "Cross-talk between adherens junctions and desmosomes depends on plakoglobin." <u>J Cell Biol</u> **136**(4): 919-34.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem 193(1): 265-75.
- Lugo, M. and P. B. Putong (1984). "Metaplasia. An overview." Arch Pathol Lab Med 108(3): 185-9.
- Madara, J. L. and K. Dharmsathaphorn (1985). "Occluding junction structure-function relationships in a cultured epithelial monolayer." J Cell Biol 101(6): 2124-33.
- Madison, K. C. (2003). "Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis." J Invest Dermatol 121(2): 231-41.
- Malminen, M., V. Koivukangas, et al. (2003). "Immunohistological distribution of the tight junction components ZO-1 and occludin in regenerating human epidermis." Br J Dermatol 149(2): 255-60
- Mandai, K., H. Nakanishi, et al. (1997). "Afadin: A novel actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell-to-cell adherens junction." J Cell Biol 139(2): 517-28.
- Mathe, G., G. Santelli, et al. (1986). "Correlation of bronchial epidermoid metaplasia with level of tobacco consumption in heavy smokers." Cancer Detect Prev 9(1-2): 79-81.
- Mathias, N. R., K. J. Kim, et al. (1996). "Targeted drug delivery to the respiratory tract: solute permeability of air-interface cultured rabbit tracheal epithelial cell monolayers." J Drug Target 4(2): 79-86.
- Mathias, N. R., K. J. Kim, et al. (1995). "Development and characterization of rabbit tracheal epithelial cell monolayer models for drug transport studies." Pharm Res 12(10): 1499-505.
- Matolsty, A. G., Parakkal, P.F. (1965). "Membrane-coating granules of keratinizing epithelia." J Cell Biol **24**: 297-307.
- Matoltsy, A. G. (1986). "The skin of Mammals, Kapitel 14: Structure and Function of the Mammalian Epidermis." In: Biology of the Integument. Band 2 Vertebrates. Breiter-Hahn, J., Matoltsy, A.G., Richards, K.S. (eds.). Springer-Verlag, Heidelberg: 255-271.
- Matter, K. and M. S. Balda (1999). "Occludin and the functions of tight junctions." Int Rev Cytol 186: 117-46.
- Matter, K. and M. S. Balda (2003). "Functional analysis of tight junctions." Methods 30(3): 228-34.
- McDowell, E. M., L. A. Barrett, et al. (1978). "The respiratory epithelium. I. Human bronchus." J Natl Cancer Inst 61(2): 539-49.
- McDowell, E. M., Hess, F.G., Trump, B.F. (1980). "Epidermoid metaplasia, carcinoma in situ, and carcinomas of the lung." In: Trump., B.F., Jones, R.T. (eds): Diadnostic electron microscopy. Wiley and Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto: 37-96.
- McLaughlin, B. J., R. B. Caldwell, et al. (1985). "Freeze-fracture guantitative comparison of rabbit corneal epithelial and endothelial membranes." Curr Eye Res 4(9): 951-61.
- McNutt, N. S., R. A. Hershberg, et al. (1971). "Further observations on the occurrence of nexuses in benign and malignant human cervical epithelium." J Cell Biol 51(3): 805-25.
- Mechanic, S., K. Raynor, et al. (1991). "Desmocollins form a distinct subset of the cadherin family of cell adhesion molecules." Proc Natl Acad Sci U S A 88(10): 4476-80.
- Meldolesi, J., G. Castiglioni, et al. (1978). "Ca++-dependent disassembly and reassembly of occluding junctions in guinea pig pancreatic acinar cells. Effect of drugs." J Cell Biol 79(1): 156-72.
- Mertens, C., C. Kuhn, et al. (1996). "Plakophilins 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque." <u>J Cell Biol</u> **135**(4): 1009-25. Mertens, C., C. Kuhn, et al. (1999). "Desmosomal plakophilin 2 as a differentiation marker in normal and
- malignant tissues." Differentiation 64(5): 277-90.
- Meyers, J. A., D. Sanchez, et al. (1976). "Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid." J Bacteriol 127(3): 1529-37.
- Meyle, J., K. Gultig, et al. (1999). "Transepithelial electrical resistance and tight junctions of human gingival keratinocytes." J Periodontal Res 34(4): 214-22.
- Mithal, A. and J. L. Emery (1976). "Squamous metaplasia of the tracheal epithelium in children." Thorax **31**(2): 167-71.
- Mitic, L. L., C. M. Van Itallie, et al. (2000). "Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 279(2): G250-4.
- Miyahara, M., H. Nakanishi, et al. (2000). "Interaction of nectin with afadin is necessary for its clustering at cell-cell contact sites but not for its cis dimerization or trans interaction." J Biol Chem 275(1): 613-8.

- Miyamoto, T., K. Morita, et al. (2005). "Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice." J Cell Biol **169**(3): 527-38.
- Moll, I., H. Kurzen, et al. (1997). "The distribution of the desmosomal protein, plakophilin 1, in human skin and skin tumors." <u>J Invest Dermatol</u> **108**(2): 139-46.
- Moll, R. (1990). "Cytokeratine als Differenzieruungsmarker: Expressionsprofile von Epithelien und epithelialen Tumoren." <u>Gustav Fischer, Stuttgart</u>.
- Moll, R., Blobel, G.A., Franke, W.W. (1985). "Zytoskelett-Proteine in der Diagnostik der Bronchialkarzinome." <u>Aktuelle Onkologie</u> 26: 81-92.
- Moll, R., P. Cowin, et al. (1986). "Desmosomal proteins: new markers for identification and classification of tumors." Lab Invest **54**(1): 4-25.
- Moll, R., D. Dhouailly, et al. (1989). "Expression of keratin 5 as a distinctive feature of epithelial and biphasic mesotheliomas. An immunohistochemical study using monoclonal antibody AE14." Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol **58**(2): 129-45.
- Moll, R., W. W. Franke, et al. (1982). "The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells." <u>Cell</u> **31**(1): 11-24.
- Moll, R., Franke, W.W. (1986). "Cytochemical cell typing of metastatic tumors according to their cytoskeletal proteins." In: Biochemistry and molecular genetics of cancer metastasis, Lapis, K., Liotta, L.A. and Rabson, A.S. (eds.), Boston: 101-114.
- Moll, R., R. Levy, et al. (1983). "Cytokeratins of normal epithelia and some neoplasms of the female genital tract." Lab Invest **49**(5): 599-610.
- Moll, R., I. Moll, et al. (1986). "Intermediärfilamente als Kriterium bei der Diagnostik von Hauttumoren." Der Pathologe **7**: 164-174.
- Montagna, W. u. P., P.F. (1974). "The Structure and Function of Skin." <u>Academic Press, INC., Harcourt</u> Brace Jovanovich, Publishers, New York, NY, USA **3. Ausgabe**.
- Montesano, R., D. S. Friend, et al. (1975). "In vivo assembly of tight junctions in fetal rat liver." <u>J Cell</u> <u>Biol</u> **67**(2PT.1): 310-9.
- Montesano, R., G. Gabbiani, et al. (1976). "In vivo induction of tight junction proliferation in rat liver." J Cell Biol **68**(3): 793-8.
- Moor, H., Mühlethaler, K. (1963). "Fine structure in frozen-etched yeast cells." <u>J. Cell Biol.</u> **17**(3): 609-628.
- Morita, K., M. Furuse, et al. (1999). "Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **96**(2): 511-6.
- Morita, K., M. Itoh, et al. (1998). "Subcellular distribution of tight junction-associated proteins (occludin, ZO-1, ZO-2) in rodent skin." J Invest Dermatol **110**(6): 862-6.
- Morita, K., H. Sasaki, et al. (1999). "Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis." J Cell Biol **145**(3): 579-88.
- Morita, K., H. Sasaki, et al. (1999). "Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells." J Cell Biol **147**(1): 185-94.
- Morita, K., S. Tsukita, et al. (2004). "Tight junction-associated proteins (occludin, ZO-1, claudin-1, claudin-4) in squamous cell carcinoma and Bowen's disease." <u>Br J Dermatol</u> **151**(2): 328-34.
- Mueller, H. and W. W. Franke (1983). "Biochemical and immunological characterization of desmoplakins I and II, the major polypeptides of the desmosomal plaque." J Mol Biol **163**(4): 647-71.
- Nagafuchi, A. and M. Takeichi (1989). "Transmembrane control of cadherin-mediated cell adhesion: a 94 kDa protein functionally associated with a specific region of the cytoplasmic domain of E-cadherin." <u>Cell Regul</u> **1**(1): 37-44.
- Nelson, W. G. and T. T. Sun (1983). "The 50- and 58-kdalton keratin classes as molecular markers for stratified squamous epithelia: cell culture studies." <u>J Cell Biol</u> **97**(1): 244-51.
- Nelson, W. J. and P. J. Veshnock (1986). "Dynamics of membrane-skeleton (fodrin) organization during development of polarity in Madin-Darby canine kidney epithelial cells." <u>J Cell Biol</u> **103**(5): 1751-65.
- Nermut, M. V. (1977). "Freeze-drying for electron microscopy." <u>in: M. A. Hayat (ed), Principles and</u> <u>Techniques of Electron Microscopy. Van Nostrand Reinhold Company, New York, London</u>: 79-98.
- Nielsen, P. A., A. Baruch, et al. (2001). "Characterization of the association of connexins and ZO-1 in the lens." <u>Cell Commun Adhes</u> 8(4-6): 213-7.
- Niimi, T., M. Imaizumi, et al. (1987). "Immunohistochemical characteristics of proliferative and metaplastic lesions in bronchial mucosa." <u>Am J Clin Pathol</u> **88**(5): 545-51.
- Nilles, L. A., D. A. Parry, et al. (1991). "Structural analysis and expression of human desmoglein: a cadherin-like component of the desmosome." <u>J Cell Sci</u> 99 (Pt 4): 809-21.
- Nitta, T., M. Hata, et al. (2003). "Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice." J Cell Biol **161**(3): 653-60.

- Norlen, L. (2003). "Molecular skin barrier models and some central problems for the understanding of skin barrier structure and function." <u>Skin Pharmacol Appl Skin Physiol</u> **16**(4): 203-11.
- North, A. J., W. G. Bardsley, et al. (1999). "Molecular map of the desmosomal plaque." <u>J Cell Sci</u> 112 ( Pt 23): 4325-36.
- Noske, W., C. C. Stamm, et al. (1994). "Tight junctions of the human ciliary epithelium: regional morphology and implications on transepithelial resistance." <u>Exp Eye Res</u> **59**(2): 141-9.
- Nuber, U. A., S. Schafer, et al. (1995). "The widespread human desmocollin Dsc2 and tissue-specific patterns of synthesis of various desmocollin subtypes." <u>Eur J Cell Biol</u> **66**(1): 69-74.
- Nuber, U. A., S. Schafer, et al. (1996). "Patterns of desmocollin synthesis in human epithelia: immunolocalization of desmocollins 1 and 3 in special epithelia and in cultured cells." <u>Eur J Cell</u> <u>Biol</u> **71**(1): 1-13.
- Obara, T., M. Baba, et al. (1988). "Localization of keratin mRNA in human tracheobronchial epithelium and bronchogenic carcinomas by in situ hybridization." <u>Am J Pathol</u> **131**(3): 519-29.
- Ohba, Y., H. Kitagawa, et al. (2000). "A deletion of the paracellin-1 gene is responsible for renal tubular dysplasia in cattle." <u>Genomics</u> **68**(3): 229-36.
- Ojakian, G. K. and R. Schwimmer (1988). "The polarized distribution of an apical cell surface glycoprotein is maintained by interactions with the cytoskeleton of Madin-Darby canine kidney cells." J Cell Biol **107**(6 Pt 1): 2377-87.
- O'Keefe, E. J., R. A. Briggaman, et al. (1987). "Calcium-induced assembly of adherens junctions in keratinocytes." J Cell Biol **105**(2): 807-17.
- Orlando, R. C., E. R. Lacy, et al. (1992). "Barriers to paracellular permeability in rabbit esophageal epithelium." <u>Gastroenterology</u> **102**(3): 910-23.
- Orwin, D. F., R. W. Thomson, et al. (1973). "Plasma membrane differentiations of keratinizing cells of the wool follicle. 3. Tight junctions." <u>J Ultrastruct Res</u> **45**(1): 30-40.
- Osborn, M., M. Ludwig-Festl, et al. (1981). "Expression of glial and vimentin type intermediate filaments in cultures derived from human glial material." <u>Differentiation</u> **19**(3): 161-7.
- Paffenholz, R. and W. W. Franke (1997). "Identification and localization of a neurally expressed member of the plakoglobin/armadillo multigene family." <u>Differentiation</u> **61**(5): 293-304.
- Paffenholz, R., C. Kuhn, et al. (1999). "The arm-repeat protein NPRAP (neurojungin) is a constituent of the plaques of the outer limiting zone in the retina, defining a novel type of adhering junction." <u>Exp Cell Res</u> **250**(2): 452-64.
- Pai, L. M., C. Kirkpatrick, et al. (1996). "Drosophila alpha-catenin and E-cadherin bind to distinct regions of Drosophila Armadillo." <u>J Biol Chem</u> **271**(50): 32411-20.
- Palekar, M. S. and S. M. Sirsat (1975). "Lanthanum staining of cell surface and junctional complexes in normal and malignant human oral mucosa." <u>J Oral Pathol</u> **4**(5): 231-43.
- Palmeri, D., A. van Zante, et al. (2000). "Vascular endothelial junction-associated molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily, is localized to intercellular boundaries of endothelial cells." J Biol Chem **275**(25): 19139-45.
- Papagerakis, S., A. H. Shabana, et al. (2003). "Immunohistochemical localization of plakophilins (PKP1, PKP2, PKP3, and p0071) in primary oropharyngeal tumors: correlation with clinical parameters." <u>Hum Pathol</u> **34**(6): 565-72.
- Pape, U. F., Hofmann, I., Langbein, L., Praetzel, S., Schluter, H., Schnoelzer, M., Franke, W.W. (in Vorbereitung). "Homo- and herterooligomeric complex formation *in vivo* of human claudins-1, -4 and -7 in cell lines derived from simple and stratified epithelia."
- Pardridge, W. M. (1998). "Introduction to the Blood-Brain Barrier." Cambridge University Press.
- Parker, A. E., G. N. Wheeler, et al. (1991). "Desmosomal glycoproteins II and III. Cadherin-like junctional molecules generated by alternative splicing." <u>J Biol Chem</u> **266**(16): 10438-45.
- Parrish, E. P., D. R. Garrod, et al. (1986). "Mouse antisera specific for desmosomal adhesion molecules of suprabasal skin cells, meninges, and meningioma." Proc Natl Acad Sci U S A 83(8): 2657-61.
- Peifer, M. and E. Wieschaus (1990). "The segment polarity gene armadillo encodes a functionally modular protein that is the Drosophila homolog of human plakoglobin." <u>Cell</u> **63**(6): 1167-76.
- Perez, T. D., Nelson, W. J. (2004). "Cadherin adhesion: mechanisms and molecular interactions." <u>Cell</u> <u>Adhesion (Behrens, J., Nelson, W. J., eds.; Handbook of Experimental Pharmacology 165)</u> <u>Springer Verlag, Berlin</u>: 3-21.
- Perez-Moreno, M., C. Jamora, et al. (2003). "Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions." <u>Cell</u> **112**(4): 535-48.
- Protonotarios, N., A. Tsatsopoulou, et al. (2001). "Genotype-phenotype assessment in autosomal recessive arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (Naxos disease) caused by a deletion in plakoglobin." J Am Coll Cardiol **38**(5): 1477-84.

- Pummi, K., M. Malminen, et al. (2001). "Epidermal tight junctions: ZO-1 and occludin are expressed in mature, developing, and affected skin and in vitro differentiating keratinocytes." <u>J Invest</u> <u>Dermatol</u> **117**(5): 1050-8.
- Purkis, P. E., J. B. Steel, et al. (1990). "Antibody markers of basal cells in complex epithelia." <u>J Cell Sci</u> 97 ( Pt 1): 39-50.
- Rahner, C., L. L. Mitic, et al. (2001). "Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut." <u>Gastroenterology</u> **120**(2): 411-22.
- Revel, J. P. and M. J. Karnovsky (1967). "Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver." <u>J Cell Biol</u> **33**(3): C7-C12.
- Rhodin, J. A. (1966). "The ciliated cell. Ultrastructure and function of the human tracheal mucosa." <u>Am</u> <u>Rev Respir Dis</u> **93**(3): Suppl:1-15.
- Richter, C. B. (1970). "Application of infectious agents to th study of lung cancer: Studies on the etiology and morphogenesis of metaplastic lung lesions in mice." <u>In: Nettesheim P, Hanna MG,</u> <u>Deatherage JW (eds): Morphology of experimental respiratory carcinogenesis</u> **USAEC, Oak Ridge**: 365-382.
- Richter, T., C. Peuckert, et al. (2004). "Dead but highly dynamic--the stratum corneum is divided into three hydration zones." <u>Skin Pharmacol Physiol</u> **17**(5): 246-57.
- Ritter, M., Herny, D., Wiesner, S., Pfeiffer, S., Wepf, R. (1999). "A versatlie high-vacuum cryo-transfer for Cryo-FESEM, cryo-SPM and other imaging techniques." <u>Microsc. Microanal</u> 5 (Supp. 2): 424-425.
- Roh, M. H., O. Makarova, et al. (2002). "The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost." J Cell Biol **157**(1): 161-72.
- Rose, O., C. Grund, et al. (1995). "Contactus adherens, a special type of plaque-bearing adhering junction containing M-cadherin, in the granule cell layer of the cerebellar glomerulus." <u>Proc Natl</u> <u>Acad Sci U S A</u> **92**(13): 6022-6.
- Ruiz, P., V. Brinkmann, et al. (1996). "Targeted mutation of plakoglobin in mice reveals essential functions of desmosomes in the embryonic heart." <u>J Cell Biol</u> **135**(1): 215-25.
- Ryle, C. M., D. Breitkreutz, et al. (1989). "Density-dependent modulation of synthesis of keratins 1 and 10 in the human keratinocyte line HACAT and in ras-transfected tumorigenic clones." <u>Differentiation</u> **40**(1): 42-54.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." <u>Science</u> **239**(4839): 487-91.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." <u>Proc Natl Acad</u> Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Sawyer, R. H., Knapp, L.W., O'Guin, W.M. (1986). "The skin of Birds, Kapitel 11: Epidermis, Dermis and Appendages." In: Biology of the Integument. Band 2 Vertebrates. Breiter-Hahn, J., Matoltsy, A.G., Richards, K.S. (eds.). Springer-Verlag, Heidelberg: 194-238.
- Schafer, S., P. J. Koch, et al. (1994). "Identification of the ubiquitous human desmoglein, Dsg2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins." <u>Exp Cell Res</u> 211(2): 391-9.
- Schäfer, S., Nuber, U.A., Moll, R., Franke, W.W. (1997). "Desmosomes and hemidesmosomes: differences and similarities in skin and mucosae." <u>In: Oculodermal Diseases. Pleyer, U.,</u> <u>Hartmann, C., Sterry, W. eds., AEolus Press, Buren, Netherlands</u>: 75-94.
- Schafer, S., S. Stumpp, et al. (1996). "Immunological identification and characterization of the desmosomal cadherin Dsg2 in coupled and uncoupled epithelial cells and in human tissues." <u>Differentiation</u> **60**(2): 99-108.
- Schafer, S., S. M. Troyanovsky, et al. (1993). "Cytoskeletal architecture and epithelial differentiation: molecular determinants of cell interaction and cytoskeletal filament anchorage." <u>C R Acad Sci III</u> **316**(11): 1316-23.
- Schlage, W. K., H. Bulles, et al. (1998). "Cytokeratin expression patterns in the rat respiratory tract as markers of epithelial differentiation in inhalation toxicology. II. Changes in cytokeratin expression patterns following 8-day exposure to room-aged cigarette sidestream smoke." <u>Toxicol Pathol</u> 26(3): 344-60.
- Schluter, H., R. Wepf, et al. (2004). "Sealing the live part of the skin: the integrated meshwork of desmosomes, tight junctions and curvilinear ridge structures in the cells of the uppermost granular layer of the human epidermis." <u>Eur J Cell Biol</u> **83**(11-12): 655-65.
- Schmelz, M. and W. W. Franke (1993). "Complexus adhaerentes, a new group of desmoplakincontaining junctions in endothelial cells: the syndesmos connecting retothelial cells of lymph nodes." <u>Eur J Cell Biol</u> **61**(2): 274-89.
- Schmelz, M., R. Moll, et al. (1994). "Complexus adhaerentes, a new group of desmoplakin-containing junctions in endothelial cells: II. Different types of lymphatic vessels." <u>Differentiation</u> **57**(2): 97-117.

- Schmidt, A., H. W. Heid, et al. (1994). "Desmosomes and cytoskeletal architecture in epithelial differentiation: cell type-specific plaque components and intermediate filament anchorage." <u>Eur</u> <u>J Cell Biol</u> **65**(2): 229-45.
- Schmidt, A., L. Langbein, et al. (1999). "Plakophilin 3--a novel cell-type-specific desmosomal plaque protein." Differentiation **64**(5): 291-306.
- Schneeberger, E. E. and R. D. Lynch (2004). "The tight junction: a multifunctional complex." <u>Am J</u> <u>Physiol Cell Physiol</u> **286**(6): C1213-28.
- Schroeder, H. E. and J. Theilade (1966). "Electron microscopy of normal human gingival epithelium." J Periodontal Res 1(2): 95-119.
- Schwarz, J., A. Ayim, et al. (2006). "Differential expression of desmosomal plakophilins in various types of carcinomas: correlation with cell type and differentiation." <u>Hum Pathol</u> **37**(5): 613-22.
- Schwarz, M. A., K. Owaribe, et al. (1990). "Desmosomes and hemidesmosomes: constitutive molecular components." <u>Annu Rev Cell Biol</u> **6**: 461-91.
- Schwechheimer, K., J. Kartenbeck, et al. (1984). "Vimentin filament-desmosome cytoskeleton of diverse types of human meningiomas. A distinctive diagnostic feature." Lab Invest **51**(5): 584-91.
- Segre, J. (2003). "Complex redundancy to build a simple epidermal permeability barrier." <u>Curr Opin Cell</u> <u>Biol</u> **15**(6): 776-82.
- Segre, J. A. (2006). "Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders." <u>J Clin Invest</u> **116**(5): 1150-8.
- Serikov, V. B., C. Leutenegger, et al. (2006). "Cigarette smoke extract inhibits expression of peroxiredoxin v and increases airway epithelial permeability." <u>Inhal Toxicol</u> **18**(1): 79-92.
- Shimono, M. and F. Clementi (1976). "Intercellular junctions of oral epithelium. I. Studies with freezefracture and tracing methods of normal rat keratinized oral epithelium." <u>J Ultrastruct Res</u> **56**(1): 121-36.
- Simon, A. M. and D. A. Goodenough (1998). "Diverse functions of vertebrate gap junctions." <u>Trends</u> <u>Cell Biol</u> **8**(12): 477-83.
- Simon, D. B., Y. Lu, et al. (1999). "Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg2+ resorption." <u>Science</u> **285**(5424): 103-6.
- Simon, S. A., V. F. Holland, et al. (1993). "Transcellular and paracellular pathways in lingual epithelia and their influence in taste transduction." <u>Microsc Res Tech</u> **26**(3): 196-208.
- Slack, J. M. (1986). "Epithelial metaplasia and the second anatomy." Lancet 2(8501): 268-71.
- Soule, H. D., J. Vazguez, et al. (1973). "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma." <u>J Natl Cancer Inst</u> **51**(5): 1409-16.
- Squier, C. A. (1973). "The permeability of keratinized and nonkeratinized oral epithelium to horseradish peroxidase." J Ultrastruct Res **43**(1): 160-77.
- Squier, C. A. and L. Rooney (1976). "The permeability of keratinized and nonkeratinized oral epithelium to lanthanum in vivo." <u>J Ultrastruct Res</u> **54**(2): 286-95.
- Staehelin, L. A. (1974). "Structure and function of intercellular junctions." Int Rev Cytol 39: 191-283.
- Steinberg, M. S. (1962). "Mechanism of tissue reconstruction by dissociated cells. II. Time-course of events." <u>Science</u> **137**: 762-3.
- Steinberg, M. S. (1962). "The nature and origin of "ECM", a putative mediator of mutual cell adhesions." <u>Am Zool</u> **2**: 561-562.
- Steinberg, M. S. (1962). "On the mechanism of tissue reconstruction by dissociated cells. I. Population kinetics, differential adhesiveness. and the absence of directed migration." <u>Proc Natl Acad Sci</u> <u>U S A</u> 48: 1577-82.
- Steinberg, M. S. (1963). "Reconstruction of tissues by dissociated cells. Some morphogenetic tissue movements and the sorting out of embryonic cells may have a common explanation." <u>Science</u> **141**: 401-8.
- Steinberg, M. S. (1970). "Does differential adhesion govern self-assembly processes in histogenesis? Equilibrium configurations and the emergence of a hierarchy among populations of embryonic cells." <u>J Exp Zool</u> **173**(4): 395-433.
- Steinberg, M. S. (1996). "Adhesion in development: an historical overview." Dev Biol 180(2): 377-88.
- Steinberg, M. S. and M. Takeichi (1994). "Experimental specification of cell sorting, tissue spreading, and specific spatial patterning by quantitative differences in cadherin expression." <u>Proc Natl</u> <u>Acad Sci U S A</u> **91**(1): 206-9.
- Stevens, A., Lowe, J. (1992). "Histology." Gower Medical Publishing, London, GB.
- Stevenson, B. R., J. M. Anderson, et al. (1988). "Tight junction structure and ZO-1 content are identical in two strains of Madin-Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance." J Cell Biol **107**(6 Pt 1): 2401-8.
- Stevenson, B. R. and D. A. Goodenough (1984). "Zonulae occludentes in junctional complex-enriched fractions from mouse liver: preliminary morphological and biochemical characterization." <u>J Cell</u> <u>Biol</u> **98**(4): 1209-21.

Stevenson, B. R. and B. H. Keon (1998). "The tight junction: morphology to molecules." <u>Annu Rev Cell</u> <u>Dev Biol</u> **14**: 89-109.

Stevenson, B. R., J. D. Siliciano, et al. (1986). "Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia." <u>J Cell</u> <u>Biol</u> **103**(3): 755-66.

Stöhr, P. (1906). "Lehrbuch der Histologie und der Mikroskopischen Anatomie des Menschen." <u>Verlag</u> von Gustav Fischer, Jena **12.Auflage**: 58-53.

Straub, B. K., J. Boda, et al. (2003). "A novel cell-cell junction system: the cortex adhaerens mosaic of lens fiber cells." J Cell Sci **116**(Pt 24): 4985-95.

Sun, T. T., R. Eichner, et al. (1983). "Keratin classes: molecular markers for different types of epithelial differentiation." <u>J Invest Dermatol</u> **81**(1 Suppl): 109s-15s.

Takahashi, K., H. Nakanishi, et al. (1999). "Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domaincontaining protein." J Cell Biol 145(3): 539-49.

Takai, Y. and H. Nakanishi (2003). "Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions." <u>J Cell</u> <u>Sci</u> **116**(Pt 1): 17-27.

Takeichi, M. (1977). "Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins." J Cell Biol **75**(2 Pt 1): 464-74.

Tebbe, B., J. Mankertz, et al. (2002). "Tight junction proteins: a novel class of integral membrane proteins. Expression in human epidermis and in HaCaT keratinocytes." <u>Arch Dermatol Res</u> 294(1-2): 14-8.

Thilander, H. and G. D. Bloom (1968). "Cell contacts in oral epithelia." J Periodontal Res 3(2): 96-110.

Tobioka, H., Y. Tokunaga, et al. (2004). "Expression of occludin, a tight-junction-associated protein, in human lung carcinomas." <u>Virchows Arch</u> **445**(5): 472-6.

Todaro, G. J. and H. Green (1966). "Cell growth and the initiation of transformation by SV40." <u>Proc Natl</u> <u>Acad Sci U S A</u> **55**(2): 302-8.

Toyofuku, T., M. Yabuki, et al. (1998). "Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes." J Biol Chem **273**(21): 12725-31.

Troyanovsky, S. M., V. I. Guelstein, et al. (1989). "Patterns of expression of keratin 17 in human epithelia: dependency on cell position." <u>J Cell Sci</u> 93 (Pt 3): 419-26.

Trump, B. F., E. M. McDowell, et al. (1978). "The respiratory epithelium. III. Histogenesis of epidermoid metaplasia and carcinoma in situ in the human." J Natl Cancer Inst **61**(2): 563-75.

Tsukita, S., M. Furuse, et al. (1999). "Structural and signalling molecules come together at tight junctions." <u>Curr Opin Cell Biol</u> **11**(5): 628-33.

Tsukita, S., M. Furuse, et al. (2001). "Multifunctional strands in tight junctions." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **2**(4): 285-93.

Turksen, K. and T. C. Troy (2004). "Barriers built on claudins." J Cell Sci 117(Pt 12): 2435-47.

van de Molengraft, F. J., C. C. van Niekerk, et al. (1993). "OV-TL 12/30 (keratin 7 antibody) is a marker of glandular differentiation in lung cancer." <u>Histopathology</u> **22**(1): 35-8.

van Dorst, E. B., G. N. van Muijen, et al. (1998). "The limited difference between keratin patterns of squamous cell carcinomas and adenocarcinomas is explicable by both cell lineage and state of differentiation of tumour cells." J Clin Pathol **51**(9): 679-84.

Van Itallie, C., C. Rahner, et al. (2001). "Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability." <u>J Clin Invest</u> **107**(10): 1319-27.

Van Itallie, C. M. and J. M. Anderson (2004). "The molecular physiology of tight junction pores." <u>Physiology (Bethesda)</u> **19**: 331-8.

Van Itallie, C. M. and J. M. Anderson (2005). "Claudins and Epithelial Paracellular Transport." <u>Annu Rev</u> <u>Physiol</u>.

van Muijen, G. N., D. J. Ruiter, et al. (1986). "Cell type heterogeneity of cytokeratin expression in complex epithelia and carcinomas as demonstrated by monoclonal antibodies specific for cytokeratins nos. 4 and 13." Exp Cell Res **162**(1): 97-113.

Vasioukhin, V., C. Bauer, et al. (2000). "Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion." <u>Cell</u> **100**(2): 209-19.

Vega-Salas, D. E., P. J. Salas, et al. (1987). "Formation of the apical pole of epithelial (Madin-Darby canine kidney) cells: polarity of an apical protein is independent of tight junctions while segregation of a basolateral marker requires cell-cell interactions." J Cell Biol **104**(4): 905-16.

Walther, P. and M. Muller (1997). "Double-layer coating for field-emission cryo-scanning electron microscopy--present state and applications." Scanning **19**(5): 343-8.

Weber, S., L. Schneider, et al. (2001). "Novel paracellin-1 mutations in 25 families with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis." J Am Soc Nephrol **12**(9): 1872-81.

Weiss, L., Greep, R.O. (1977). "The Trachea Chapter in the Textbook of Histology."
- Whitear, M. (1986). "The skin of Fishes including cyclostomes, Kapitel 2: Epidermis." <u>In: Biology of the</u> <u>Integument. Band 2 Vertebrates. Breiter-Hahn, J., Matoltsy, A.G., Richards, K.S. (eds.).</u> <u>Springer-Verlag, Heidelberg</u>: 8-38.
- Whittock, N. V. and C. Bower (2003). "Genetic evidence for a novel human desmosomal cadherin, desmoglein 4." J Invest Dermatol **120**(4): 523-30.
- Wilcox, E. R., Q. L. Burton, et al. (2001). "Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29." <u>Cell</u> **104**(1): 165-72.
- Wu, X., K. Hepner, et al. (2000). "Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2." <u>Proc Natl Acad Sci</u> <u>U S A</u> 97(8): 4233-8.
- Wu, Y., D. Dowbenko, et al. (2000). "Interaction of the tumor suppressor PTEN/MMAC with a PDZ domain of MAGI3, a novel membrane-associated guanylate kinase." J Biol Chem 275(28): 21477-85.
- Yamamoto, M., K. Shimokata, et al. (1987). "Immunoelectron microscopic study on the histogenesis of epidermoid metaplasia in respiratory epithelium." <u>Am Rev Respir Dis</u> **135**(3): 713-8.
- Yamamoto, T., N. Harada, et al. (1997). "The Ras target AF-6 interacts with ZO-1 and serves as a peripheral component of tight junctions in epithelial cells." <u>J Cell Biol</u> **139**(3): 785-95.
- Yokoyama, S., K. Tachibana, et al. (2001). "alpha-catenin-independent recruitment of ZO-1 to nectinbased cell-cell adhesion sites through afadin." Mol Biol Cell **12**(6): 1595-609.
- Yoshida, Y., K. Morita, et al. (2001). "Altered expression of occludin and tight junction formation in psoriasis." <u>Arch Dermatol Res</u> **293**(5): 239-44.
- Yu, A. S., A. H. Enck, et al. (2003). "Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation." J Biol Chem **278**(19): 17350-9.
- Zelickson, A. S. (1967). "Ultrastructure of normal and abnormal skin." <u>Lea & Febiger, Philadelphia, USA</u>. Zhou, X., A. Stuart, et al. (2004). "Desmoplakin is required for microvascular tube formation in culture." J Cell Sci **117**(Pt 15): 3129-40.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Schematische Darstellung (A) der klassischen Einteilung der subapikalen "Junctions	10
Abb. 2.3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Desmosomen	12
Tab. 2.2:	13
Abb. 2.4: Schmematische Darstellung der unterschiedlichen Transportvorgänge über epitheliale Ze	llen
	15
Abb. 2.5: klassische Strukturen der TJ in elektronenmikroskopischen Aufnahmen	16
Abb. 2.6: Schematisches Modell der Interaktionen der TJ-Proteine	17
Tab. 2.3: Molekulare Bestandteile der Tight Junctions	18
Tab. 3.3: In dieser Arbeit verwendete Geräte	23
Tab. 3.4: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien	24
Tab. 3.5: In dieser Arbeit verwendete Kits	25
Tab. 3.6: In dieser Arbeit verwendete primer	25
Tab. 3.7: In dieser Arbeit verwendete humane Zelllinien	27
Tab.3.8: In dieser Arbeit verwendete Medien und Zusätze	28
Tab. 3.9: In dieser Arbeit verwendete Erstantikörper	29
Tab. 4.1: Molekulargewichtsmarker (New England BioLabs, Frankfurt)	42
Tab. 4.2: Versuchsaufbau beim "Semidry-Electroblotting"-Verfahren	44
Abb. 4.5: Messkonfiguration für TEER-Messungen	63
Abb. 5.1: Lichtmikroskopische Darstellung HE-gefärbten Zellschichten der menschlichen Epidermis	s der
Fußsohle im Querschnitt	65
Abb. 5.2: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der oberen Schichten in menschliche	۶r
Epidermis des Kopfhaar-Ansatzes	66
Abb. 5.3: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung verschiedener Zellschichten der menschlich	ıen
Epidermis im Gefrierbruch	67
Abb. 5.4: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierungen von desmosomalen Proteinen in	
menschlicher Fußsohlen-Epidermis in situ	69
Abb. 5.5: CLSM ("Confocal Laser Scanning Microscopy") Analyse der Lokalisierung von Tight Junc	tion-
Proteinen in menschlicher Epidermis in situ	71
Abb. 5.6: Ko-Lokalisierung von Tight Junction-Proteinen im Plattenepithel der Rindergingiva	72
Abb. 5.7: Lokalisierung von Tight Junction-Proteinen in Flachschnitten menschlicher Epidermis in s	itu
(CLSM-Aufnahmen)	74
Abb. 5.8: Ultrastrukturelle Untersuchungen von Tight Junction-Strukturen in fötaler menschlicher	
Fußsohlenepidermis	76
Abb. 5.9: Ultrastrukturelle Untersuchung von Tight Junctions in erwachsener menschlicher Epidern	nis
des Haaransatzes	77
Abb. 5.10: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung des strangartigen interdesmosomalen	
Netzwerkes in den Plasmamembranen der Zellen des Stratum granulosum im Gefrierbuch des	
Haaransatzes der menschlichen Epidermis in situ	79

Abb. 5.11: Rasterelektronenmikroskopisches Bild einer Gefrierbruch-Präparation menschlicher	
Epidermis aus der Region des Stratum granulosum	80
Abb. 5.12: Immuno-Elektronenmikroskopische Identifizierung Occludin-haltiger interdesmosomaler	
Strukturen in subapikalen Zellschichten der Rinderzunge	82
Abb. 5.13: Elektronenmikroskopische Darstellung Occludin-haltiger interdesmosomaler Strukturen o	des
neuen Typs der "Stud Junctions" in den subapikalen Zellschichten der Plattenepithelien der	
Rinderschnauze, der Rinderzunge und der Rindergingiva	83
Abb. 5.14: Elektronenmikroskopische Aufnahme von intramembranösen interdesmosomalen Strukt	uren
im Gefrierbruch	83
Abb. 5.15: Biochemischer Nachweis verschiedener Tight Junction-Proteine in mehrschichtigen	
Epithelien	84
Tab. 5.1: Zusammenfassung der biochemischen Analysen der Tight Junction-Proteine in einigen	
mehrschichtigen Epithelien	85
Abb. 5.16: Elektronenmikroskopische Darstellung der Tight Junction-Barriere und der	
Interzellularspalten in der Rücken-Epidermis der Maus mittels Lanthanchlorid	86
Abb. 5.17: Analyse von Claudin-8, -9, -11, -12 und -15 in CaCo-2-Zellen eines Darmepithel abgeleit	teten
Adenokarzinoms der Linie CaCo-2	88
Tab. 5.2: Zusammenfassung der Expressions-Analyse der Gene von Claudinen in CaCo-2- und	
HaCaT-Zellen	89
Abb. 5.18: Biochemischer Nachweis verschiedener Tight Junction-Transmembranproteine in den	
polaren Epithelzellen der Linie CaCo-2	90
Tab. 5.3: Zusammenfassung der biochemischen Analyse der Tight Junction-Proteine in CaCo-2-Ze	llen
	90
Abb. 5.19: Immunlokalisierungen verschiedener Tight Junction-Proteine in den polaren CaCo-2-Zel	len
	91
Abb. 5.20: Elektronenmikroskopische Darstellung der Tight Junction-Strukturen in CaCo-2-Zellen un	nd
die Immunlokalisierung von Cingulin an diesen Strukturen	92
Abb. 5.21: Elektronenmikroskopische Gefrierbruch-Darstellung des Netzwerkes von relief-strang-ar	tigen
Tight Junction-Strukturen in der apikolateralen Membran von CaCo-2-Zellen	93
Abb. 5.22: Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) von CaCo-2 "Monolay	/er"-
Zellkulturen	94
Abb. 5.23: Messung der Barrierefunktion der CaCo-2 Zellkulturen	95
Abb. 5.24: Darstellung der Tight Junction-Barriere und der Interzellularspalten von CaCo-2 Zellen m	nit
Lanthanchlorid	96
Abb. 5.25: Expressionsanalyse von Claudin-6, -9, -10, -11, -12 und -17 in zwei bronchialepithelialer	۱
Zell-Linien	98
Tab. 5.4: Zusammenfassung der Expressionsanalyse von Claudin-Genen in den bronchialepithelial	en
Zell-Linien 16HBE und CaLu-3	98
Abb. 5.26: Biochemischer Nachweis von Tight Junction-Proteinen in den bronchialepithelialen Linie	n
16HBE und CaLu-3	99

Tab. 5.5: Zusammenfassung der biochemischen Analysen der Tight Junction-Proteine in den	
bronchialepithelialen Zell-Linien 16HBE und CaLu-3 9	99
Abb. 5.27: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von Tight Junction-Proteinen in der	
bronchialepithelialen Linie 16HBE 10	00
Abb. 5.28: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von Tight Junction-Proteinen in der	
bronchialepithelialen Zell-Linie CaLu-3 10	01
Abb. 5.29: Elektronenmikroskopische Darstellung von Tight Junction-Strukturen in Zellkulturen der	
einschichtigen bronchialepithelialen Linien 16HBE (a-b) und CaLu-3 (c) 10	02
Abb. 5.30: Elektronenmikroskopische Gefrierbruch-Darstellung des Netzwerkes von strang-artigen Tig	ght
Junction-Relief-Strukturen in der apikolateralen Membran von CaLu-3-Zellen 10	03
Abb. 5.31: Elektronenmikroskopische Gefrierbruch-Darstellung des Netzwerkes von strang-artigen Tig	ght
Junction-Relief-Strukturen in der apikolateralen Membran von als Ein-Zellschicht gewachsenen 16HB	BE-
Zellen 10	04
Abb. 5.32: Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) von den bronchial-	
epithelialen Zellkulturen 16HBE und CaLu-3 10	05
Abb. 5.33: Messung der Barriere-Funktion der einschichtigen 16HBE Zellkulturen 10	06
Abb. 5.34: Messung der Barriere-Funktion der einschichtigen CaLu-3 Zellkulturen 10	07
Abb. 5.35: Charakterisierung des Sedimentationsverhaltens von Tight Junction-Proteinen der Zellkult	ur-
Linie CaCo-2 11	10
Abb. 5.36: Charakterisierung des Sedimentationsverhaltens von Tight Junction-Proteinen der Zellkult	ur-
Linie 16HBE 11	11
Abb. 5.37: Nachweis heterotypischer Claudin-Komplexe in Zellen der epithelialen Linien CaCo-2,	
16HBE und CaLu-3 11	13
Abb. 5.38: Darstellung der typischen bronchialepithelialen Zelltypen in situ 11	14
Abb. 5.39: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von Tight Junction-Proteinen in	
menschlichem Bronchialepithel in situ 11	16
Abb. 5.40: Ultrastrukturelle Untersuchung der Tight Junctions in menschlichem Bronchialepithel in situ	u
11	17
Abb. 5.41: Elektronenmikroskopische Gefrierbruch-Darstellung des Netzwerkes von relief-strang-artig	gen
Tight Junction-Strukturen in der apikolateralen Membran des menschlichen Bronchialepithels in situ	
11	18
Abb. 5.42: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von Cytokeratinen in menschlichem	
Bronchialepithel in situ 12	21
Abb. 5.43: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung desmosomaler Proteine in menschlichem	Ì
Bronchialepithel in situ 12	22
Abb. 5.44: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung einiger Cytokeratine in menschlichen	
Plattenepithelmetaplasien der Lunge in situ 12	25
Abb. 5.45: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung desmosomaler Proteine in menschlichen	
Plattenepithelmetaplasien der Lunge in situ 12	26
Abb. 5.46: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von Tight Junction-Proteinen in	

Abb. 5.47: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von Cytokeratinen im mehrschichtigen	
16HBE-Zellkulturmodell	131
Abb. 5.48: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von Cytokeratinen in CaLu-3-Zellen, die	e in
AIC-Kulturen gehalten waren	133
Abb. 5.49: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung desmosomaler Proteine im 16HBE AIC-	-
Zellkulturmodell	135
Abb. 5.50: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung desmosomaler Proteine im CaLu-3 AIC	:-
Zellkulturmodell	136
Abb. 5.51: Biochemischer Nachweis verschiedener Tight Junction-Proteine in AIC-Zellkulturen der	
bronchialepithelialen Linien 16HBE und CaLu-3	137
Tab. 5.6: Zusammenfassung der biochemischen Analyse der Tight Junction-Proteine in AIC-kulture	en
der bronchial-epithelialen Linien 16HBE und CaLu-3	138
Abb. 5.52: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von Tight Junction-Proteinen im	
bronchialepithelialen 16HBE AIC-Zellkulturmodell	139
Abb. 5.53: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von Tight Junction-Proteinen im	
bronchialepithelialen CaLu-3 AIC-Zellkulturmodell	141
Abb. 5.54: Elektronenmikroskopische Darstellung von Zell-Zell-Verbindungsstrukturen in AIC-Kultur	ren
von 16HBE und CaLu-3	143
Abb. 5.55: Elektronenmikroskopische Darstellung des Netzwerkes von Tight Junction-Strängen im	
Gefrierbruch einer mehrschichtigen 16HBE AIC-Zellkultur	145
Abb. 5.56: Elektronenmikroskopische Darstellung des Netzwerkes von Tight Junction-Strängen im	
Gefrierbruch einer mehrschichtigen CaLu- AIC-Zellkultur	146
Abb. 5.57: Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) von AIC- Zellkulturen	148
Abb. 5.58: Messung der Barriere-Funktion des mehrschichtigen bronchialepithelialen 16HBE-	
Zellkulturmodells	149
Abb. 5.59: Detailbetrachtung der Diffusion von 250 kDa großen Dextran-Partikeln zur Bestimmung	der
Barrierefunktion des mehrschichtigen bronchialepithelialen 16HBE-Zellkulturmodells im Vergleich n	nit
dem LCC-kultivierten 16HBE-Modell	150
Abb. 5.60: Messung der Barriere-Funktion von einschichtig bzw. als AIC-Kultur gewachsenen CaLu	J-3-
Zellen anhand der Diffusion von 70 kDa großen Dextran-Partikeln	151
Abb. 5.61: Darstellung der Tight Junction-Barriere und des Interzellularspaltes der bronchialepitheli	alen
AIC-Kulturen von CaLu-3-Zellen mit Lanthanchlorid	153
Abb. 5.62: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von TJ-Proteinen in basaloiden	
Plattenepithelkarzinomen der Lunge des Menschen	156
Abb. 5.63: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierungen von TJ-Proteinen in nicht verhornend	len
Plattenepithelkarzinomen der Lunge	157
Abb. 5.64: Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisierungen von TJ-Proteinen in verhornten	
Plattenepithelkarzinomen der Lunge des Menschen in situ	159
Abb. 5.65: Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) der Lokalisierung von Tricellulin und Pro	otein
ZO-1 im menschlichen Bronchialepithel in situ	161

Abb	. 5.66: Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) der Lokalisierung von Tricellulin und	
	Occludin in einschichtigen epithelialen CaCo-2 Kulturzellen	163
Abb	. 5.67: Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) von Tricellulin und Occludin bzw. Protein	n
	ZO-1 in den menschlichen Bronchialepithelial-Zellkulturlinien 16HBE und CaLu-3	165
Abb.	. 5.68: Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) von Cytokeratinen und Desmosomen in	
	einer einschichtigen Keratinocyten-Kultur der menschlichen Linie HaCaT	166
Abb.	. 5.69: Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) von Tricellulin und Occludin in einer teil-	
	stratifizierten Keratinocyten-Kultur der menschlichen Linie HaCaT	168
Abb.	. 5.70: Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) von Tricellulin und Occludin in einer teil-	-
	stratifizierten Keratinocyten-Kultur der menschlichen Linie HaCaT	169
Abb.	. 5.71: Vergleich der Aminosäuresequenzen der humanen TJ-Proteine Tricellulin, Tricellulin bet	a
	und Occludin	171
Abb.	. 5.72: Schematische Darstellung der genomischen Region von menschlichem Tricellulin und	
	Tricellulin beta auf Chromosom 5	172
Abb.	. 6.1: Schematische Darstellung einer Zonula occludens und des Aufbaus bzw. der Verteilung v	/on
	"Stud Junctions" in Plasmamembranen des Stratum spinosum der Epidermis	176
Tab.	. 6.1: Tabellarische Übersicht der Nachweise von TJ-Proteinen in verschiedenen Zelltypen bzw	
	Zellschichten bestimmter menschlicher Epithelgewebe bzw. Epithelzellkulturlinien	179

## Danksagung

Prof. Dr. Werner Franke (Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg) danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, seine wissenschaftliche Betreuung einschließlich der zahlreichen Diskussionen und Anregungen, die für diese Arbeit entscheidend waren, sowie für seine immerwährende Hilfsbereitschaft.

Prof. Dr. Bernhardt Dobberstein (Zentrum für Molekulare Biologie Heidelberg) danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Prof. Dr. Hartwig Wolburg (Pathologisches Institut der Universität Tübingen) danke ich ganz besonders für die Einführung in Methoden des Gefrierbrechens und die Anleitung zur Immunmarkierung an diesen Proben.

Prof. Dr. Ingrid Moll (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) danke ich für die Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft während meiner Zeit in Hamburg.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Roger Wepf (Beiersdorf AG, Hamburg) für die vielen, z.T. auch nächtlichen Stunden am Mikroskop, die spannenden Diskussionen und seine ausgeprägt ruhige Art beim Näherbringen von elektronenmikroskopischen Techniken.

Christine Grund und Silke Prätzel danke ich für ihre Assistenz und die begleitende technische Unterstützung bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen. Bei Cilly Kuhn bedanke ich mich für die geduldige Beantwortung all meiner Fragen zur Immunhistochemie.

Für gute Ratschläge und spannende Diskussionen möchte ich mich bei Dr. Ilse Hofmann und Dr. Lutz Langbein bedanken. Für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor und anregende Diskussionen danke ich Dr. Marion Schmidt-Zachmann, Dr. Hans Heid und Dr. Ulrich F. Pape.

Dem Zellkultur-Team Michaela Hergt, Edeltraut Noffz und Heiderose Schumacher danke ich für die Hilfe bei der Kultivierung der verschiedenen Linien.

Martin Sattler und Stefan Wiesner danke ich für die Beantwortung meiner vielen technischen Fragen und für ihre Hilfe bei der Lösung technischer Probleme während meiner Zeit bei der Firma Beiersdorf in Hamburg.

Bei Jutta Bulkescher, Cathleen Hanisch, Sebastian Pieperhoff, Susanne Voltmer, Steffi Winter und Ralph Zimbelmann in der Abteilung Franke und bei Dr. Stefan Biel, Katja Dunkelmann, Dr. Frank Fischer, Erwin Gärtner, Sonja Pagel-Wolff, Stefan Puschmann, Tobias Richter, Dr. Sonja Wessel, Katrin Wilke und Markus Wölfel in der Abteilung für analytische Mikroskopie der Firma Beiersdorf bedanke ich mich ebenfalls für die vielseitige Unterstützung und die kollegiale und konstruktive Arbeitsatmosphäre.

Ein besonderes Dankeschön geht an alle übrigen Mitglieder der Abteilung Franke und der Abteilung für analytische Mikroskopie der Beiersdorf AG, für die stete Hilfsbereitschaft und den stets abwechslungsreichen Laboralltag.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt Frau Thea Junghans für die Herberge in Hamburg-Altona, die immer für mich offen stand und für die abendlichen Gespräche und die hervorragende Verkostung.

Weiterhin danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG; Projekt-Nr.: DFG Fr 308/26-3 und DFG Fr 308/27-1) und der Beiersdorf AG, hier vor allem dem Abteilungsleiter der Forschung Dr. H. Wenck für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und meinen Brüdern mit ihren Familien für ihr Interesse, ihre Aufmunterung und ihre Unterstützung in den vergangenen Jahren.

Mein allergrößter Dank gilt jedoch Kerstin – für ihre Liebe, ihre ausdauernde Ermunterung, das kritische Korrekturlesen und dafür, dass sie ist, wie sie ist.