

**Untersuchung der Expression, Lokalisation und
Funktionalität von Tight Junctions in murinen und humanen
Modellsystemen mit Barrieredefekten in der Haut**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
im Department Biologie der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Nina Kirschner

HAMBURG 2010

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. T. BURMESTER
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Frau Priv.-Doz. Dr. J. BRANDNER
Tag der Disputation: 27. November 2009

Hamburg, den 11. November 2009



J. Ganzhorn

Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	AUFBAU UND FUNKTION DER HAUT.....	1
1.1.1	<i>Epidermale Entwicklung der Haut</i>	2
1.2	TIGHT JUNCTIONS UND TIGHT JUNCTION-PROTEINE.....	5
1.2.1	<i>Tight Junctions und Tight Junction-Proteine in der Haut</i>	7
1.2.2	<i>Einfluss von TJs auf die Barrierefunktion und Polarität von kultivierten Keratinozyten und der Haut</i>	9
1.3	ZIEL DER ARBEIT	11
1.3.1	<i>Psoriasis</i>	12
1.3.2	<i>Das CD44 knock-out Mausmodell</i>	13
2	MATERIAL.....	15
2.1	CHEMIKALIEN	15
2.2	ZELLKULTURMATERIALEN.....	15
2.3	TIERE UND GEWEBE	15
2.4	ZELLKULTUR	16
2.5	ANTIKÖRPER	16
2.6	PRIMER.....	17
2.7	FITC-DEXTRANE	17
2.8	ZYTOKINE.....	17
2.9	KITS.....	17
3	METHODEN.....	18
3.1	ZELLKULTUR	18
3.1.1	<i>Anzucht von humanen Keratinozyten</i>	18
3.1.1.1	<i>Isolierung und Kultivierung von humanen Keratinozyten</i>	18
3.1.1.2	<i>Subkultivierung von humanen Keratinozyten</i>	18
3.1.2	<i>Anzucht muriner Keratinozyten</i>	19
3.1.2.1	<i>Herstellung des Feederlayers</i>	19
3.1.2.2	<i>Isolierung und Kultivierung von murinen Keratinozyten</i>	19
3.1.2.3	<i>Subkultivierung von murinen Keratinozyten</i>	20
3.1.3	<i>Porcine ex vivo Hautmodelle</i>	20
3.1.3.1	<i>Anlegen der Hautmodelle</i>	20
3.2	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	20
3.2.1	<i>Proteinextraktion</i>	20

3.2.2	<i>Proteinbestimmung</i>	21
3.2.3	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)</i>	21
3.2.4	<i>Western-Blot</i>	22
3.2.5	<i>Proteindetektion</i>	23
3.2.6	<i>Coomassie Blaufärbung</i>	23
3.2.7	<i>Antikörpermarkierung</i>	23
3.2.8	<i>Stripping</i>	24
3.2.9	<i>Rac1 Pull-Down Assay</i>	24
3.3	IMMUNHISTOLOGISCHE METHODEN	25
3.3.1	<i>Herstellung von Gefrierschnitten</i>	25
3.3.2	<i>Aufbereitung der Zellen</i>	25
3.3.3	<i>Immunhistochemischer Nachweis</i>	25
3.3.4	<i>Konfokale Laser Scanning Mikroskopie</i>	26
3.3.5	<i>Elektronenmikroskopie</i>	26
3.4	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	26
3.4.1	<i>RNA-Isolierung aus Zellen und Gewebe</i>	26
3.4.2	<i>Synthese komplementärer DNA mit Hilfe der reversen Transkription</i>	27
3.4.3	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>	27
3.4.4	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	28
3.4.5	<i>Quantitative Real-time PCR</i>	29
3.4.6	<i>Auswertung der Real-time PCR</i>	29
3.5	BARRIERE-ASSAYS IN VITRO	30
3.5.1	<i>Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes</i>	30
3.5.2	<i>Messung des parazellulären Tracer Flux</i>	30
3.5.3	<i>Behandlung von humanen Keratinozyten mit Zytokinen</i>	31
3.6	BARRIERE-ASSAYS IN VIVO	31
3.6.1	<i>Biotinylierung</i>	31
3.6.2	<i>Permeabilitäts-Assay</i>	31
3.7	PROLIFERATIONS-ASSAY	32
3.7.1	<i>Bestimmung des proliferativen Index in den Hautmodellen</i>	32
3.8	STATISTIK	32
4	ERGEBNISSE	33
4.1	VERÄNDERUNG VON TJ-MOLEKÜLEN UND FUNKTION IN PSORIASIS UND DIE MÖGLICHE BETEILIGUNG VON IL-1 β UND TNF α	33
4.1.1	<i>Lokalisation von TJ-Proteinen in Psoriasis</i>	33
4.1.2	<i>Nachweis der mRNA von TJ-Proteinen in psoriatischer Haut</i>	34

4.1.3	<i>TJ-Barrierefunktion in ex vivo psoriatischer Haut.....</i>	35
4.1.4	<i>Einfluss von IL-1β und TNFα auf die TJ-Proteinexpression in ex vivo Hautmodellen</i>	36
4.1.5	<i>Korrelation der Veränderung von TJ-Proteinen mit Differenzierung und Proliferation</i>	40
4.1.6	<i>Einfluss von IL-1β und TNFα auf die TJ-Funktion in Keratinozyten.....</i>	42
4.1.7	<i>IL-1β beeinflusst die Lokalisation und Expression von TJ-Proteinen in kultivierten Keratinozyten</i>	43
4.1.8	<i>IL-1β und TNFα haben keinen Einfluß auf die Proliferation in kultivierten Keratinozyten</i>	46
4.2	REGULATION VON CD44 BEIM AUFBAU VON TIGHT JUNCTIONS UND DER BARRIEREFUNKTION	47
4.2.1	<i>Der Verlust von CD44 verzögert die Ausbildung der aussen-nach-innen Barrierefunktion in embryonaler Epidermis</i>	47
4.2.2	<i>CD44-Defizienz beeinträchtigt die zelluläre Lokalisation der Lamellar Bodies in embryonaler Epidermis</i>	48
4.2.3	<i>Der Verlust von CD44 bewirkt eine temporäre Veränderung der Expression und Lokalisation von TJ-Proteinen und Par3 in der Haut von Mausembryonen</i>	49
4.2.4	<i>CD44-Defizienz verändert die Expression und Lokalisation von TJ-Proteinen in kultivierten Keratinozyten</i>	52
4.2.5	<i>CD44-Defizienz beeinflusst die TJ-Funktionalität</i>	55
4.2.6	<i>Bestimmung der Proliferation.....</i>	57
4.2.7	<i>Verlust von CD44 beeinflusst die Proteine Par3, Rac1 und Tiam1 in kultivierten Keratinozyten</i>	58
4.2.8	<i>Die verzögerte Barrierefunktion und die veränderte Lokalisation und Expression von TJ-Proteine in den CD44 k/o Mäusen sind mit einer verminderten Rac1 Aktivität assoziiert.....</i>	60
5	DISKUSSION	61
5.1	TIGHT JUNCTION-PROTEINE IN PSORIATISCHER HAUT	61
5.1.1	<i>Funktionelle TJs sind in psoriatischer Epidermis in tieferen Schichten lokalisiert</i>	62
5.1.2	<i>IL-1β und TNFα regulieren die TJ-Protein Lokalisation und Expression in ex vivo Hautmodellen.....</i>	63
5.1.3	<i>IL-1β und TNFα regulieren die TJ-Barrierefunktion in Keratinozyten.....</i>	65
5.2	CD44 REGULIERT DEN AUFBAU VON TIGHT JUNCTIONS UND IHRE BARRIEREFUNKTION	67

5.2.1	<i>CD44 verändert die Lokalisation und Expression von TJ-Proteinen.....</i>	67
5.2.2	<i>CD44 beeinflusst die TJ-Barrierefunktion</i>	68
5.2.3	<i>CD44 beeinträchtigt die Polarität von Keratinozyten.....</i>	69
5.2.4	<i>CD44 reguliert den Aufbau von Tight Junctions und ihre Barrierefunktion über Rac1 und Par3</i>	70
5.3	VERGLEICH DER TJ-BARRIEREFUNKTION IN MURINEN UND HUMANEN MODELLSYSTEMEN.....	72
6	ZUSAMMENFASSUNG	76
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	78
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	86
9	TABELLENVERZEICHNIS.....	88

Abkürzungsverzeichnis

AJ(s)	Adherens Junction(s)
aPKC	atypische Proteinkinase C
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest	destilliertes Wasser (<i>aqua destillata</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
Ca ²⁺	Calcium
cDNA	Komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
cFCS	Fötale Kälberserum (<i>chelexed fetal calf serum</i>)
Cldn	Claudin
C _T	Schwellenwert-Zyklus (<i>threshold cycle</i>)
DAPI	4',6-Diamidino-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DPEC	Diethylpyrocarbonat
E	Embryonaltag
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence Detection</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
et al.	Und andere (<i>et alteri/alii</i>)
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor (<i>guanine nucleotide exchange factor</i>)
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde (<i>hour</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IF	Immunfluoreszenz
IL-1β (IL1B)	Interleukin-1 beta
JAM	<i>Junctional Adhesion Molecule</i>
k/o	<i>Knock-out</i>
kDa	Kilo Dalton
KGM	<i>Keratinocyte Growth Medium</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

LB	<i>Lamellar Body</i>
M	Molar
mA	Milliampere
MAGUK	Membran assoziierte Guanylatkinase
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
min	Minute
mKGM	<i>Murine Keratinocyte Growth Medium</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NGS	Normales Ziegen Serum (<i>normal goat serum</i>)
Occl	Occludin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK	p21-aktivierte Kinase
PBD	p21-Bindungsdomäne
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	pH-Wert (<i>potentia hydrogenii</i>)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Penicillin-Streptomycin
qRT-PCR	quantitative <i>Real-time</i> PCR
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
s	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (<i>standard error of the mean</i>)
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>tris buffered saline + Tween-20</i>)
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TER	Transepithelialer Widerstand (<i>transepithelial electrical resistance</i>)
TJ(s)	Tight Junction(s)
TNF α	Tumor Nekrose Faktor alpha
U	Einheit enzymatischer Aktivität (<i>units</i>)
V	Volt
WB	Western Blot
WST	Tetrazolium-Salz
WT	Wildtyp
ZO-1	Zonula Occludens Protein 1

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut ist eine der wichtigsten Barrieren des Körpers und schützt ihn vor dem Eindringen von Erregern und Fremdstoffen aber auch vor dem Verlust von Wasser und Elektrolyten. Die Haut besteht von außen nach innen betrachtet aus drei Schichten, der Epidermis (Oberhaut), der Dermis (Lederhaut) und der Subkutis (Unterhaut). Die Epidermis, die oberste Hautschicht, ist ein vierschichtiges verhornendes Plattenepithel und besteht zu 90% aus Keratinozyten. Sie setzt sich aus den folgenden Schichten zusammen: aus dem *Stratum corneum* (SC, Hornschicht), *Stratum granulosum* (SG, Granularzellschicht), *Stratum spinosum* (SS, Stachelzellschicht) und dem *Stratum basale* (SB, Basalschicht). In den einzelnen Schichten der Epidermis sind die Keratinozyten ausgehend vom *Stratum basale* einem komplexen Weg der Differenzierung ausgesetzt mit dem Endpunkt im *Stratum corneum* (Abbildung 1.1.1).

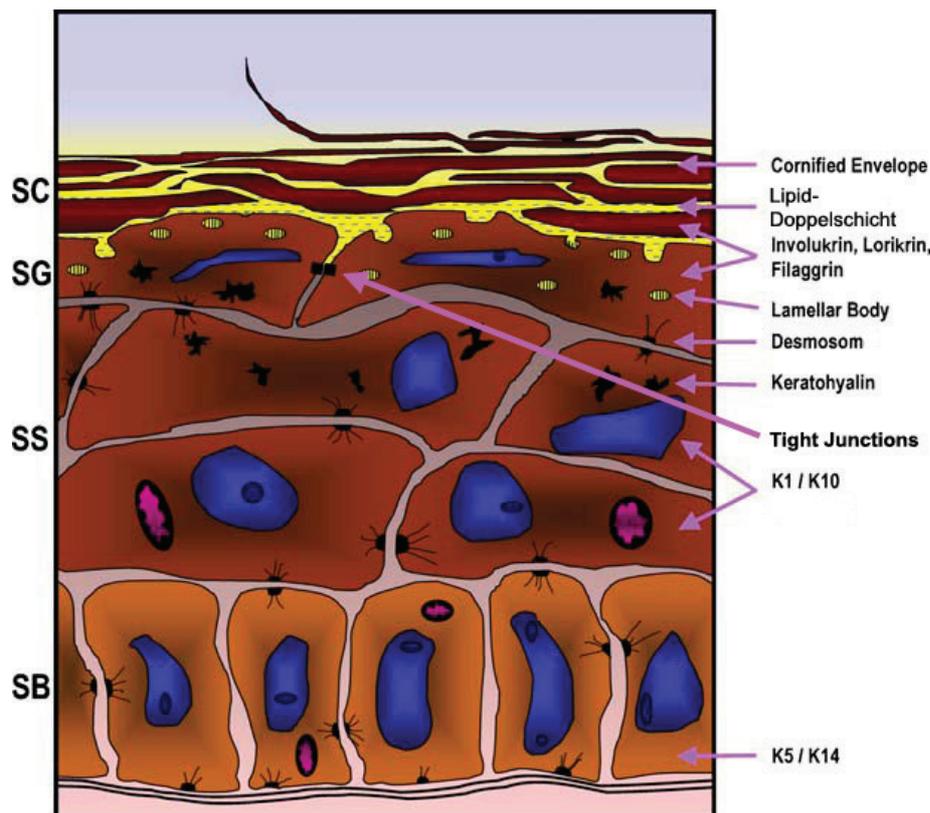


Abbildung 1.1.1: Schematischer Aufbau der Epidermis. Während der Differenzierung werden epidermale Lipide wie Cholesterol, Phospholipide, Glycosylceramide und hydrolytische Enzyme von Keratinozyten synthetisiert und in *Lamellar Bodies* angereichert. Hydrolytische Enzyme, wie β -Glucocerebrosidase und die saure Sphingomyelinase werden an die Zwischenräume des *Stratum corneum* abgegeben, wo sie die sekretierten Glycosylceramide und Phospholipide umwandeln in Ceramide und freie Fettsäuren, die in die Lipid-Doppelschicht eingebaut werden. Darüberhinaus synthetisieren Keratinozyten der verschiedenen Differenzierungsstufen charakteristische Zytokeratine (basal: K5 und K14; suprabasal: K1 und K10) und *Cornified Envelope*-assoziierte Proteine z.B. Involukrin und Lorikrin (modifiziert nach PROKSCH *et al.*, 2006).

Im *Stratum basale*, der untersten Schicht der Epidermis sitzen die Basalzellen direkt auf der Basalmembran. Durch Proliferation sind die Basalzellen als Stammzellen für die Neubildung von Keratinozyten verantwortlich. Diese werden innerhalb von 28 Tagen in die äußeren Schichten verschoben. In der Basalschicht befinden sich auch die Melanozyten, die pigmentbildenden Zellen, und die Merkelzellen, die neuroendokrinen Zellen, der Haut. Im *Stratum spinosum* werden erstmals die *Lamellar Bodies* (LBs) sichtbar. Sie enthalten die Vorläufersubstanzen der epidermalen Lipide in Form von scheibenförmig (lamellar) angeordneten Doppellipidmembranen. Diese Schicht ist gekennzeichnet durch eine Vielzahl von Desmosomen, die den Zellen ein stachelartiges Erscheinungsbild geben. Das *Stratum granulosum* ist durch die Anwesenheit der so genannten Keratohyalingranula gekennzeichnet. Diese Granula enthalten neben dem Keratohyalin, einer Vorstufe des Keratins, so genannte Filaggrine. Im *Stratum granulosum* befinden sich ebenfalls die Tight Junction-Strukturen. Im oberen *Stratum granulosum* laufen sehr schnelle Differenzierungsprozesse der Keratinozyten ab, die unter anderem durch eine Abflachung der Zellen, Verlust der Zellkerne und der Zellorganellen sowie Dehydratation gekennzeichnet sind. Das *Stratum corneum* besteht aus zwei voneinander abhängigen Bestandteilen, den Korneozyten und der extrazellulären lipidreichen Matrix. Die lipidreiche Matrix wird von den LBs des *Stratum granulosum* abgegeben. Die Korneozyten werden anstelle einer Plasmamembran mit einer Hornhülle, dem *Cornified Envelope*, bestehend aus Proteinen wie Involukrin, Lorikrin und Keratolinin, abgegrenzt (MADISON, 2003).

Die physikalische Barriere der Epidermis ist hauptsächlich im *Stratum corneum* lokalisiert, allerdings tragen Bestandteile der lebenden Epidermis wie Tight Junctions, Gap Junctions und Adhärenz Junctions, aber auch Desmosomen und Elemente des Zytoskeletts zu der Barrierefunktion bei (PROKSCH *et al.*, 2008). Neben der physikalischen Barriere bildet die Epidermis auch eine chemische und immunologische Barriere. Die chemische Barriere besteht aus Lipiden, Säuren, hydrolytischen Enzymen und antimikrobiellen Peptiden und die immunologische Barriere setzt sich aus humoralen und zellulären Bestandteilen des Immunsystems zusammen.

1.1.1 Epidermale Entwicklung der Haut

Während der Entwicklung benötigt der Fötus eine Barriere, um sich vor intrauterinen Infektionen zu schützen und um eine Grenze zum Fruchtwasser zu bilden. Diese anfängliche Barriere, ein einschichtiges hochproliferierendes Ektoderm, beginnt zu stratifizieren (Abbildung 1.1.2A). Das darauf folgend entstehende Periderm gewährleistet eine temporäre Barriere gegenüber der wässrigen Umgebung *in utero* (Abbildung 1.1.2B).

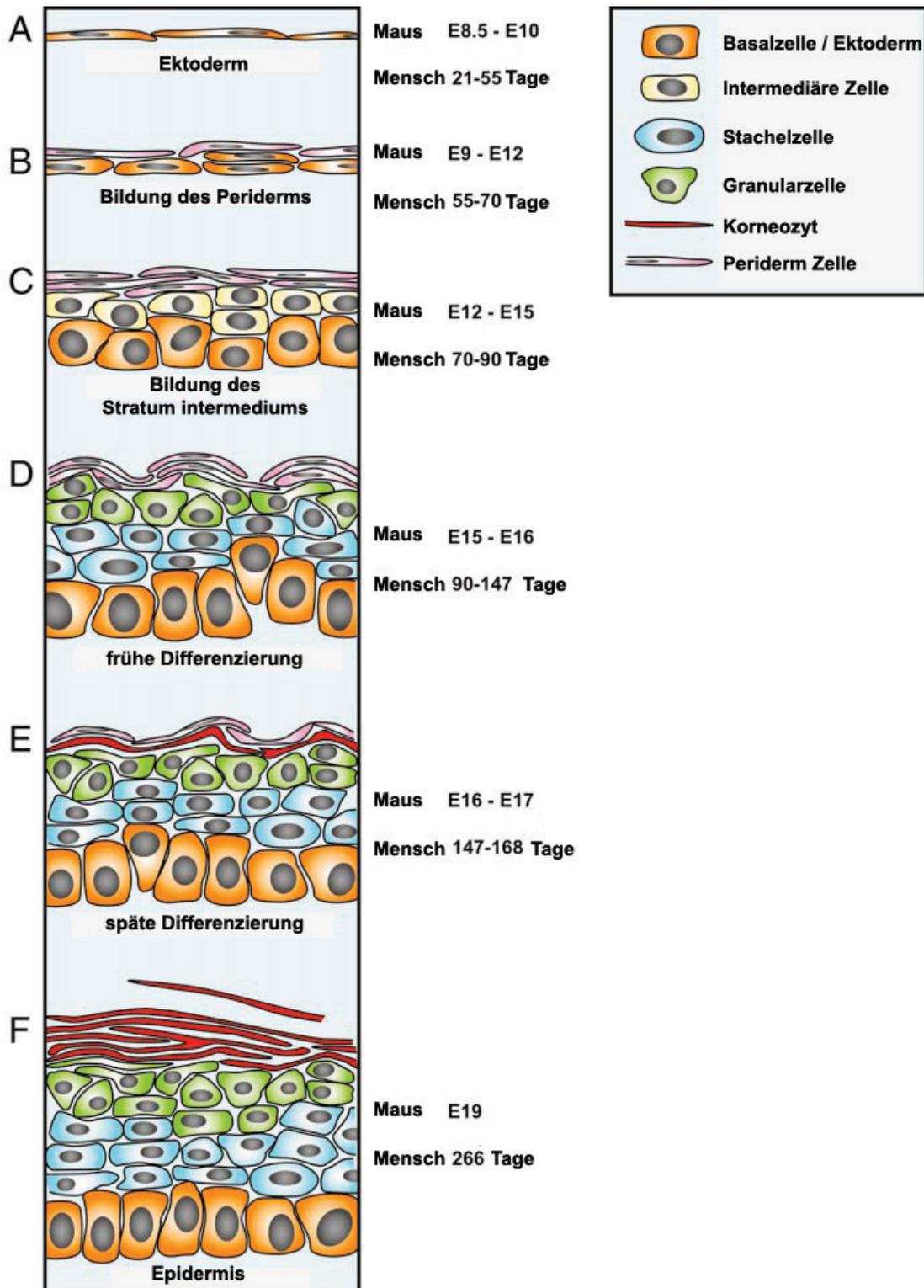


Abbildung 1.1.2: Epidermale Entwicklung in Maus und Mensch. (A) Die Epidermis ist abgeleitet von einem einschichtigen Ektoderm, welches zu stratifizieren beginnt und eine vorübergehende Zellschicht, das Periderm produziert (B). Durch weitere Stratifizierung entsteht eine dazwischenliegende ektodermale Schicht (C), das *Stratum intermedium*. Zellen dieser dazwischenliegenden Schicht erreichen die frühe Phase der Differenzierung (D, E) und differenzieren zum *Stratum spinosum* und *Stratum granulosum* der Epidermis (F). Die terminale Differenzierung ist gekennzeichnet durch die Ausbildung des *Stratum corneum*s. Entwicklungszeitpunkte für Maus und Mensch werden gezeigt. E: Embryonaltage nach Konzeption (modifiziert nach BYRNE *et al.*, 2003).

Die Zellen des Periderms sind abgeleitet von den Basalzellen. Sie unterscheiden sich in der Zellmorphologie, im Keratinprofil, der molekularen Architektur der Tight Junctions und der Präsenz von Mikrovilli auf der apikalen Oberfläche, die ins Fruchtwasser reichen, von differenzierten adulten Zellen (MORITA *et al.*, 1998; MORITA *et al.*, 2002). Nach der Peridermbildung kommt es zur weiteren Differenzierung und Stratifizierung der Epidermis, so dass diese um die 34ste Woche (human) bzw. am Tag E19 (murin) des Reifungsprozesses fähig ist als Barriere in einer terrestrischen Umgebung zu fungieren. Beim Menschen löst sich zu diesem Zeitpunkt das Periderm von den darunter liegenden Schichten und wird Teil der vernix caseosa (Käseschmiere) des Neugeborenen.

Eine intakte Permeabilitätsbarriere ist in Mäusen ab dem Embryonaltag 17 (E17) ausgebildet. Mit einem Toluidinblau-Assay kann die Barriere sichtbar gemacht werden, denn permeable Haut kann blau gefärbt werden (Abbildung 1.1.3). Bis zum Embryonaltag E16 zeigt die Epidermis eine einheitliche blaue Färbung. Die Formation der Hautbarriere beginnt dann ab E16 in einem festgelegten Muster von dorsal nach ventral (Abbildung 1.1.3Aii-viii).

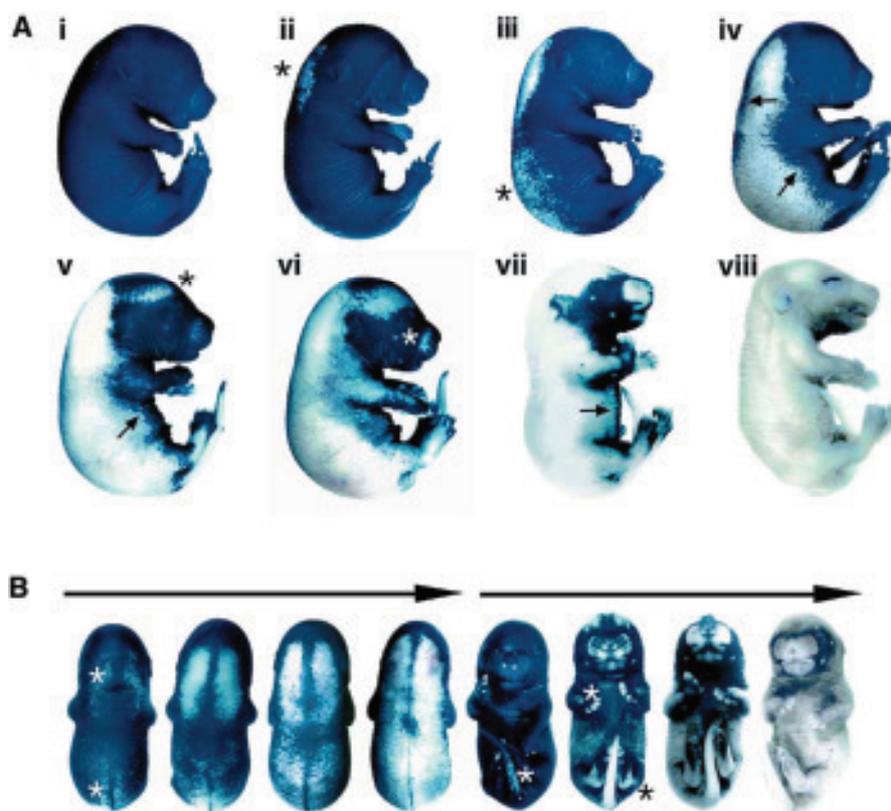


Abbildung 1.1.3: Permeabilität embryonaler Mauhaut. Die Permeabilität der murinen Haut verändert sich in einem festgelegten Muster im Embryonaltag E16; (Ai-viii) zunehmendes Alter. Dorsal beginnend breitet sich die Impermeabilität der Haut über den Körper aus (Pfeile). (B) Dorsaler und ventraler Blick auf Embryonen, die den Verlauf der Impermeabilität zeigen (Sterne: Spezifische Regionen mit beginnender Barriere). Alter der Embryonen: Ai < E16; Av = E16 (11 h später); Aviii > E17 (modifiziert nach HARDMAN *et al.*, 1998).

Beim Menschen formt sich die Barriere ebenfalls in einem festgelegten Muster. Am Kopf wird die Barriere zwischen der 20. und 21. Woche (140 und 147 Tagen) gebildet, während die abdominale Epidermis eine komplette Barriere erst zwischen der 23. und 24. Woche (161 und 168 Tagen) zeigt (HARDMAN *et al.*, 1999).

1.2 Tight Junctions und Tight Junction-Proteine

Tight Junctions sind Zell-Zell-Verbindungen die benachbarte Zellen miteinander verbinden. In der Gefrierbruchtechnik erscheinen die TJs als kontinuierliche Stränge, die die Zelle umranden (Abbildung 1.2.1A, B). In transmissions-elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind sie als enge Kontakte der Plasmamembranen von zwei benachbarten Zellen ohne interzelluläre Zwischenräume, den so genannten *Kissing Points*, zu sehen. Sie kontrollieren den parazellulären Fluss von Molekülen und Ionen in dem sie eine größen- und ionenselektive Barriere bilden (Barrierefunktion) (ANDERSON, 2001). In Kooperation mit assoziierten Polaritätskomplexen wie Par3/Par6/aPKC, Crumbs/PALS/PATJ und Scribble/Dlg/Lgl (HURD *et al.*, 2003; LEMMERS *et al.*, 2004; QIN *et al.*, 2005) trennen sie die Zellmembran in einen apikalen und einen basolateralen Bereich und bewirken damit die Bildung und Aufrechterhaltung der Polarität der Zellen (Zaunfunktion) (SCHNEEBERGER & LYNCH, 2004; AIJAZ *et al.*, 2006; SHIN *et al.*, 2006) (Abbildung 1.2.1C). Zusätzlich sind TJ-assoziierte Proteine an Zellproliferation, Differenzierung und Vesikeltransport beteiligt (MATTER *et al.*, 2005).

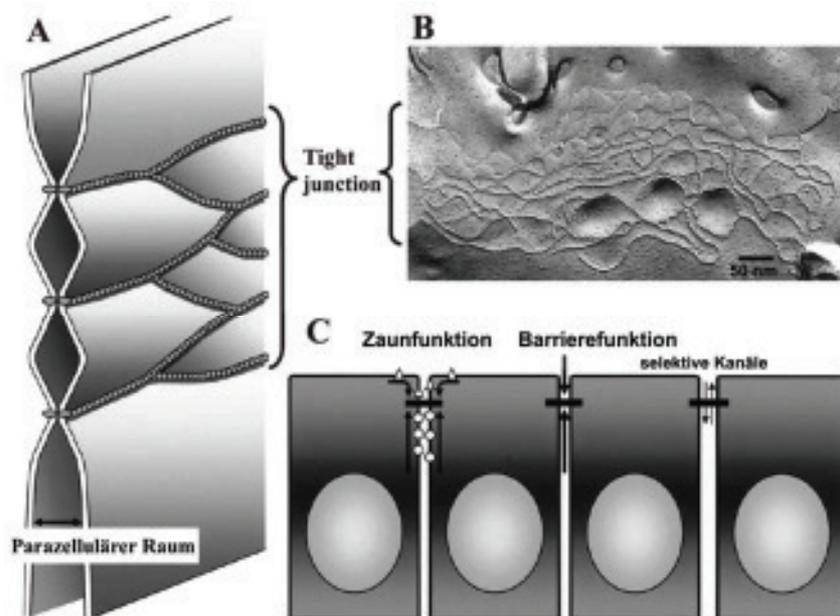


Abbildung 1.2.1: Morphologie und Funktion von Tight Junctions. (A) Schematische Darstellung der TJs. (B) TJ-Stränge, die mittels Gefrierbruch-Technik dargestellt wurden. (C) Schematische Darstellung der Zaun- und Barrierefunktion von TJs (modifiziert nach SAWADA *et al.*, 2003).

Zu funktionellen TJs tragen Transmembranproteine, wie Occludin (Occl), Tricellulin und die Familien der Claudine (Cldn) und der *Junctional Adhesion Molecules* (JAMs), sowie Plaque-Proteine, wie ZO-1-3, Symplekin, MUPP1 und Cingulin, die unter anderen eine Verbindung zum Aktinzytoskelett herstellen, bei (STEVENSON & KEON, 1998; TSUKITA *et al.*, 2001) (Abbildung 1.2.2).

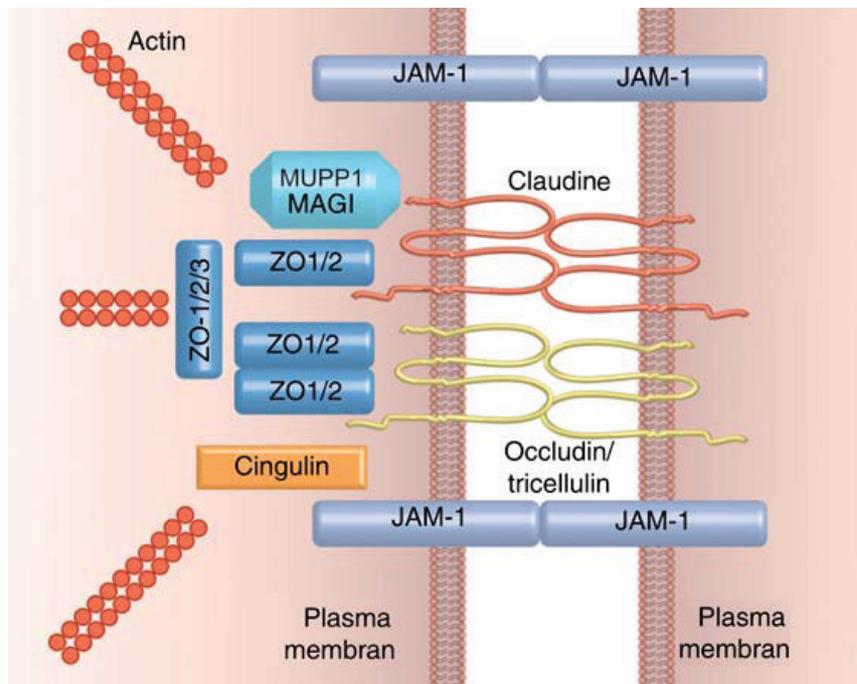


Abbildung 1.2.2: Hauptkomponenten der Tight junctions. ZO-1 oder ZO-2 sind wichtig für die Zusammenlagerung von Claudinen und Occludin und führen zur Bildung von TJ-Strängen. Die Plaque-Proteine ZO-1-3 und Cingulin stellen eine Verbindung zum Aktinzytoskelett her (modifiziert nach NIESSEN, 2007).

Occludin war das erste Transmembranprotein der Tight junctions, das identifiziert wurde (FURUSE *et al.*, 1993). Die Funktion von Occludin in den TJs ist jedoch noch unklar, denn in Occludin-defizienten Mäusen sind TJ-Stränge ausgebildet und ihre Barrierefunktion ist nicht beeinträchtigt. Die Mäuse zeigen aber einen Phänotyp, der charakterisiert ist durch Wachstumsverzögerung, Unfruchtbarkeit und Gastritis (SAITOU *et al.*, 2000). Das kürzlich entdeckte Transmembranprotein Tricellulin ist ein Occludin-verwandtes Protein, das nur an trizellulären Kontakten von 3 aufeinandertreffenden Zellen lokalisiert ist (IKENOUCI *et al.*, 2005). IKENOUCI und Mitarbeiter (2005) zeigten, dass die Ausschaltung von Tricellulin mittels siRNA in Epithel-Zellen (Eph4) eine verminderte Lokalisation von Occludin und Cldn3 an den Zell-Zell-Kontakten und eine Beeinträchtigung der Barrierefunktion zur Folge hat. Eine Mutation von Tricellulin bewirkt beim Menschen Taubheit (RIAZUDDIN *et al.*, 2006). Die Claudin Familie besteht aus 24 Mitgliedern, die unterschiedlich in diversen Organen und Geweben exprimiert sind. Manipulationen der Claudin Expression beeinflussen direkt die parazelluläre größen- und ionenselektive Barriere (VAN ITALLIE *et al.*, 2001; NITTA *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die große Vielfalt der

Claudine die Größen- und Ionenspezifität, aber auch die Dichtigkeit der TJ-Barriere in verschiedenen Epithelien und Endothelien bestimmt (ANDERSON *et al.*, 2004; FURUSE & TSUKITA, 2006). Beim Menschen konnte eine Mutation von Cldn1 bei der mit Ichthyosis assoziierten neonatalen sklerosierenden Cholangitis gefunden werden (HADJ-RABIA *et al.*, 2004). Eine Mutation von Cldn14 resultiert in Taubheit durch Haarzelldegradation in der Cochlea (WILCOX *et al.*, 2001). Eine weitere Gruppe von TJ-Transmembranproteinen, die Mitglieder der JAM Familie, gehören zur Immunoglobulin Superfamilie. Die JAM-Familie besteht aus den Proteinen JAM-A, -B, -C und -4. JAMs werden auch auf Leukozyten und Langerhans-Zellen exprimiert und tragen zu deren transendothelialen Migration bei (EBNET *et al.*, 2004). Zusätzlich reguliert JAM-C die Polarisation und Differenzierung von Spermatozoen durch Rekrutierung der Polaritätskomplexe (GLIKI *et al.*, 2004).

Eine wichtige Gruppe von Plaque-Proteinen, die eine Verbindung zwischen den Transmembranproteinen und dem Aktinzytoskelett herstellen sind die Zonula Occludens Proteine ZO-1, -2 und -3. Diese Proteine gehören zur Familie der Membran-assoziierten Guanylatkinase (MAGUK) und sind charakterisiert durch 3 Amino (N)-terminale PDZ Domänen, eine SH3 Domäne und einer GUK Domäne. Mit ihrer PDZ Domäne interagieren diese Proteine mit Claudinen und Occludin, während ihr Carboxy (C)-terminales Ende mit Aktin assoziiert ist und die Verbindung zum Zytoskelett herstellt (SCHNEEBERGER & LYNCH, 2004). UMEDA und Mitarbeiter (2006) konnten zeigen, dass die Anwesenheit von ZO-1 und/oder ZO-2, nicht aber ZO-3, wichtig ist für die Zusammenlagerung von Claudinen, die Ausbildung von TJ-Strängen und die Barrierefunktion. MUPP1 und MAGI sind ebenfalls TJ-Plaque-Proteine, die eine PDZ Domäne enthalten und mit den Transmembranproteinen assoziiert sind. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl in MDCK-Zellen als auch in Keratinozyten die Interaktion des Somatostatinrezeptors 3 mit MUPP1 die Permeabilität von TJs reguliert (LIEW *et al.*, 2009; VOCKEL, 2009). Das TJ-Plaque-Protein Cingulin interagiert mit ZO-1, JAMs und Aktin und ist möglicherweise ein wichtiger Regulator der Tight Junction Dynamik während der Aktomyosin Kontraktion (CITI *et al.*, 1988; CLAYBURGH *et al.*, 2005).

1.2.1 Tight Junctions und Tight Junction-Proteine in der Haut

Lange Zeit war die Existenz von TJs in der Säugetier-Haut umstritten (ELIAS & FRIEND, 1975, 1976; ELIAS *et al.*, 1977; FAWCETT, 1994), doch in den letzten Jahren konnten TJ-Strukturen und TJ-Proteine in der Haut und in kultivierten Keratinozyten von Mensch, Schwein und Maus nachgewiesen werden (als Übersicht siehe BRANDNER, 2009). In der Epidermis sind die typischen TJ-Strukturen, die *Kissing Points*, im *Stratum granulosum* lokalisiert. Allerdings kann die Anwesenheit von TJ-Proteinen über diese Schicht

hinausgehen. Zum Beispiel sind Cldn1, Cldn7, JAM-A und MUPP1 über die gesamten lebenden Schichten der Epidermis verteilt, dagegen befinden sich Occludin und Cingulin nur im *Stratum granulosum* und ZO-1, Cldn4 und Symplekin kommen in den oberen Schichten der Epidermis vor (MORITA *et al.*, 1998; PUMMI *et al.*, 2001; BRANDNER *et al.*, 2002; FURUSE *et al.*, 2002; LANGBEIN *et al.*, 2002; BRANDNER *et al.*, 2006) (Abbildung 1.2.3).

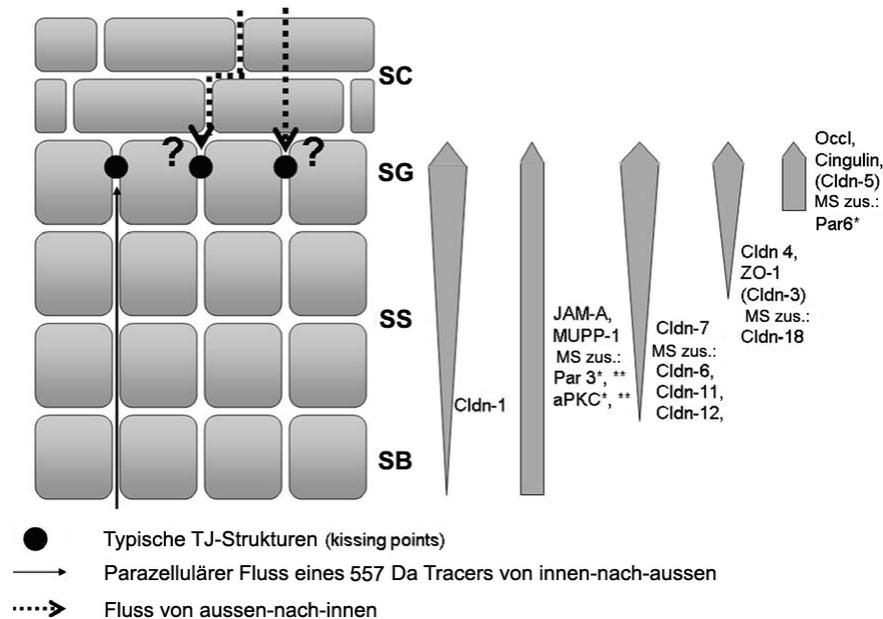


Abbildung 1.2.3: Schematische Darstellung der Lokalisation von TJ-Strukturen und TJ-Proteinen in der Epidermis. *Verschiedene Lokalisationen von Isoformen; **teilweise im Zytoplasma und an den Zell-Zell-Kontakten; SB, *Stratum basale*; SS, *Stratum spinosum*; SG, *Stratum granulosum*; SC, *Stratum corneum*; MS, Maus; zus., zusätzlich. Proteine in Klammer wurden nur sehr schwach nachgewiesen (modifiziert nach BRANDNER, 2009).

In der Embryonalentwicklung der Maus treten ZO-1 und ZO-2 bereits am Tag E11.5 und Cldn6 und Occludin an den Tagen E12.5 - E13.5 im Periderm auf. In der sich entwickelnden Epidermis von Mäusen kommen Cldn11 und Cldn18 ab Tag E14.5 und Cldn1 ab Tag E15.5 vor. Zum Zeitpunkt E17.5, wenn die Epidermis alle Schichten gebildet hat, ist Occludin an den Zell-Zell-Kontakten der Granularzellschicht lokalisiert. Hier sind auch die typischen TJ-Strukturen (damals als *Maculae occludentes* bezeichnet) zu finden (MORITA *et al.*, 1998). Die Proteine Cldn6, Cldn11 und Cldn18 kommen in E17.5 Epidermis in allen Schichten vor und Cldn1 ist auf die suprabasalen Schichten beschränkt (TROY *et al.*, 2007). Die Lokalisation von ZO-1 und ZO-2 wurden zum Zeitpunkt E17.5 noch nicht nachgewiesen, in peridermalen Zellen sind sie an den Zell-Zell-Kontakten lokalisiert (MORITA *et al.*, 2002).

In der Haut des Menschen wurden die TJ-Proteine Occludin und ZO-1 ab der 8. Woche an den Zell-Zell-Kontakten der peridermalen Zellen nachgewiesen. In der 21. Woche sind

sie in der Granularzellschicht lokalisiert (PUMMI *et al.*, 2001). Zu diesem Zeitpunkt wurden auch typische TJ-Strukturen ultrastrukturell an fötaler Fußsohlenepidermis analysiert (BRANDNER *et al.*, 2002; SCHLÜTER, 2004). In peridermalen Zellen sind typische TJ-Strukturen in der 17. Woche zu sehen (PUMMI *et al.*, 2001)

1.2.2 Einfluss von TJs auf die Barrierefunktion und Polarität von kultivierten Keratinozyten und der Haut

In kultivierten Keratinozyten induziert extrazelluläres Calcium (Ca^{2+}) die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und Differenzierung (HENNING & HOLBROOK, 1983). Während der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten in Keratinozyten werden zunächst *primordiale* Zellverbindungen, die Bestandteile von AJs und TJs enthalten an der basolateralen Plasmamembran gebildet. Bei diesem Prozess spielt Calcium eine wesentliche Rolle, da die Adhäsion zwischen Zellen zunächst über das Calcium-abhängige E-cadherin vermittelt wird. Bei der Anwesenheit von Calcium aktiviert der Cadherin-Komplex den Polaritätskomplex Par3/Par6/aPKC über den Rac-spezifischen Guaninnukleotid-Austauschfaktor Tiam1. Tiam1 interagiert mit Par3, welches an das Transmembranprotein JAM-A gebunden ist und fördert die Aktivität von Rac1. Daraufhin erfolgt die Aktivierung der aPKC durch Rac1. Diese Aktivierung ist verantwortlich für die apikale Rekrutierung von JAM-A, Occludin und Claudinen, die daraufhin in der Lage sind sich von den AJ-Proteinen zu separieren und TJ-Stränge zu bilden (MERTENS *et al.*, 2006). Verschiedene Arbeiten zeigten, dass nach Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration (Ca^{2+} -*switch*) TJ-Proteine an den Zell-Zell-Kontakten von Keratinozyten akkumulieren (PUMMI *et al.*, 2001; BRANDNER *et al.*, 2002; YUKI *et al.*, 2007). Darüber hinaus wiesen YUKI und Mitarbeiter (2007) einen Zusammenhang zwischen der Formation und Funktionalität von TJs mittels Messungen des Transepithelialen Widerstandes (TER) und des Parazellulären *Tracer* Flux (PTF) nach. Des Weiteren zeigten sie, dass eine Behandlung mit Ochratoxin A, ein Mykotoxin, das spezifisch die Expression von Cldn4 vermindert, die Barrierefunktion beeinträchtigt. Weitere aktuelle Studien zeigten eine Korrelation zwischen der Expression einzelner TJ-Proteinen und dem TER in Keratinozyten. Bei dem *knock-down* von Cldn1 durch siRNA fand sich ein erniedrigter TER, der einher ging mit einem zusätzlichen Verlust von Occludin an den Zell-Zell-Kontakten und einer verminderten Lokalisation von ZO-1. Wenn Occludin ausgeschaltet wurde, kam es zu einem erniedrigten TER und einer verminderten ZO-1 Lokalisation, allerdings war die Cldn1 Lokalisation unbeeinflusst (YAMAMOTO *et al.*, 2008). Dass die Lokalisation bestimmter TJ-Proteine an den Zell-Zell-Kontakten aber vermutlich nicht ausreichend ist für den Nachweis von funktionellen TJs konnten HELFRICH und Mitarbeiter (2006) zeigen. In

murinen Keratinozyten, in denen die aPKC Aktivität gehemmt wurde, war der TER vermindert, obwohl TJ-Proteine wie Cldn1, Occludin und ZO-1 an den Zell-Zell-Kontakten lokalisiert waren. In HaCaT Zellen konnte nachgewiesen werden, dass bei der Ausbildung des TERs die Phosphorylierung von Cldn4 durch die aPKC eine wichtige Rolle spielt (AONO & HIRAI, 2008).

Während die Barrierefunktion von TJs in kultivierten Keratinozyten allgemein akzeptiert ist, ist ihre Bedeutung in der Haut nach wie vor umstritten. Allerdings nehmen seit einigen Jahren die Hinweise zu, dass sie zumindest für die innen-nach-aussen Barriere der (Maus)Haut eine wichtige Rolle spielen. Bereits 1971 konnte von HASHIMOTO gezeigt werden, dass Lanthanum von TJs in der menschlichen Epidermis gestoppt wird. Dieses Ergebnis wurde bisher allerdings beim Menschen noch nicht bestätigt, allerdings konnte Holger Schlüter in seiner Doktorarbeit (2004) ebenfalls einen Stopp von Lanthanum im *Stratum granulosum* in Mausepidermis zeigen. FURUSE und Mitarbeiter (FURUSE *et al.*, 2002) zeigten auf lichtmikroskopischer Ebene durch intradermale Injektion eines 557 Da Diffusions-Tracers in Haut neugeborener Mäuse funktionelle TJs für diesen *Tracer* im *Stratum granulosum*. In der Epidermis von Cldn1-defizienten Mäusen waren die TJs für diesen *Tracer* durchlässig. Interessanterweise wurde keine veränderte *Stratum corneum* Komposition festgestellt. Ebenfalls eine gestörte innen-nach-aussen Barriere weisen Epidermis-spezifische E-cadherin k/o Mäuse auf. Diese sind ebenfalls durch einen erhöhten Wasserverlust charakterisiert und sterben innerhalb des ersten Tages nach der Geburt. Die Abwesenheit von E-cadherin führt zu einem Verlust von Cldn1 im *Stratum granulosum*, weitere TJ-Proteine wie ZO-1 und Cldn4 zeigten eine veränderte Lokalisation (TUNGGAL *et al.*, 2005). Interessanterweise führt die Claudin-1-Defizienz im Menschen ebenfalls zu einem Haut-Phänotyp, wenn auch nicht so schwerwiegend wie in der Maus. Patienten mit Mutation im Claudin-1 Gen, die zum Verlust dieses Proteins führt, zeigen das NISCH-Syndrom (neonatal ichthyosis - sclerosing cholangitis) (HADJ-RABIA *et al.*, 2004). Weiterhin wurde ein Verlust der TJ-Barrierefunktion in Kanal aktivierende Protease 1 (CAP1/Prss8)-defizienten Mäusen gefunden, diesen Mäusen fehlt Occludin im *Stratum granulosum* und sie sterben ebenfalls nach der Geburt an einem hohen Wasserverlust (LEYVRAZ *et al.*, 2005). Auch die Überexpression von Cldn6 in Mäusen resultiert in einer veränderten Barrierefunktion der Haut, die zum Tod der Mäuse führt (TURKSEN & TROY, 2002). All diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass sowohl der Verlust als auch die Überexpression von TJ-Proteinen in der Epidermis zu einer gestörten innen-nach-aussen Barriere führen. Somit ist eine exakte Komposition von Tight Junction-Proteinen wichtig für diese Funktion.

Ein weiterer Hinweis für eine Rolle der TJs in der Barrierefunktion der Haut ist, dass in zahlreichen Hautkrankheiten mit einer gestörten *Stratum corneum* Barrierefunktion, wie

Psoriasis vulgaris, Lichen planus und Ichthyosis vulgaris eine veränderte Lokalisation und Expression von TJ-Proteinen gezeigt werden konnte (PUMMI *et al.*, 2001; YOSHIDA *et al.*, 2001; BRANDNER *et al.*, 2006; PELTONEN *et al.*, 2007; WATSON *et al.*, 2007). Übereinstimmend ist dabei die verbreiterte Expression von TJ-Proteinen, die normalerweise auf die obersten Schichten der Epidermis beschränkt sind. Auch die Kolonisation der Haut mit dem nicht pathogenen *Staphylokokkus epidermidis* resultiert ebenfalls in einer Hochregulation von TJ-Proteinen (OHNEMUS *et al.*, 2007). Darüberhinaus treten auch nach Verwundung, wenn das *Stratum corneum* komplett entfernt wurde, und während der Regeneration der Epidermis TJ-Proteine verbreitert auf (BRANDNER *et al.*, 2002; MALMINEN *et al.*, 2003). TJ-Proteine sind aber auch verbreitert exprimiert, wo das stratifizierende Epithel an eine feuchte Umgebung grenzt, wie zum Beispiel bei der Gingiva (LANGBEIN *et al.*, 2002; SCHLÜTER *et al.*, 2007). Somit beobachtet man eine Hochregulation von TJ-Proteinen immer dann, wenn die *Stratum corneum* Barriere gestört, verändert oder abwesend ist. Dies könnte für eine Art Rettungssystem dieser Proteine für die gestörte *Stratum corneum*-Barriere sprechen.

Über die Beteiligung von TJs zur Ausbildung der Zellpolarität in Keratinozyten ist noch nichts bekannt, ihre Assoziation mit Zellpolaritätskomplexen deutet aber darauf hin. Interessanterweise ist der Aufbau des *Stratum corneum* abhängig von der Verschmelzung der LBs mit der extrazellulären Matrix an dem Übergang des *Stratum granulosum* zu dem *Stratum corneum* (MENON *et al.*, 1992) und braucht dafür einen gerichteten polarisierten Transport. Aufgrund der Zaunfunktion von TJs in einfachen Epithelien, die zu einem gerichteten Vesikeltransport in diesen Zellen führt, könnte man vermuten, dass TJs in der Regulation der Polarität dieses Prozesses involviert sind, was aber noch nicht gezeigt wurde.

1.3 Ziel der Arbeit

Trotz der vielen Hinweise, dass TJs eine Rolle in der Barrierefunktion von Maus und Mensch spielen könnten (primär bei ihrem Aufbau oder sekundär als Rettungssystem), ist dies vor allem beim Menschen nach wie vor umstritten. Auch sind Stimuli, die TJs in Keratinozyten der Haut beeinflussen können, mit Ausnahme der Ca^{2+} -Konzentration, weitgehend unbekannt. Darüber hinaus ist die Beteiligung von TJs an der Zellpolarität in Keratinozyten bisher weitgehend ungeklärt.

Um die Bedeutung von TJs in Keratinozyten der Haut und ihre Regulation genauer zu klären, wurden in dieser Arbeit zwei Modellsysteme untersucht: zum einen die Hautkrankheit Psoriasis, zum anderen das CD44 k/o Mausmodell. Beide Modelle sind durch einen Barrieredefekt der Haut charakterisiert. Das k/o Mausmodell zeichnet sich

zusätzlich durch den Verlust der Polarität der LB-Sekretion aus. Diese beiden Modelle werden vergleichend untersucht, um neben Antworten auf die spezifischen Fragestellungen für jedes Modell auch Hinweise auf allgemeine Prinzipien des Aufbaus und der Funktion von TJs in Keratinozyten der Haut bei Mensch und Maus zu erhalten.

1.3.1 Psoriasis

Psoriasis ist eine entzündliche Hautkrankheit, die ca 2% der westlichen Bevölkerung betrifft. Histopathologisch ist sie ein dynamischer Prozess. Die frühe Phase ist charakterisiert durch die anfängliche Weitung von Gefäßen, Einwanderung von mononukleären Zellen und Granulozyten in die Dermis und anschliessend in die Epidermis sowie durch eine leichte Spongiose des Epithels. Das Plaque-Stadium zeigt eine Verdickung der Epidermis (Akanthose), in manchen Bereichen lebende Keratinozyten bis in das *Stratum corneum* (variable Parakeratose) und in die Epidermis-einwandernde Infiltratzellen, wie T-Zellen und Granulozyten, die subcorneale Pusteln bilden, sowie geweitete Gefäße und mononukleäres Infiltrat in der papillären Dermis. Generell ist die Psoriasis gekennzeichnet durch starke Hyperproliferation und veränderte Differenzierung der Keratinozyten. Darüber hinaus ist die Barrierefunktion der Haut eingeschränkt, was durch die Messung des Transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) nachgewiesen wurde. Ein stark erhöhter TEWL wurde in der frühen Phase der Psoriasis gemessen, während ein mäßig erhöhter TEWL in chronischen Plaques, mit dem verdickten *Stratum corneum*, vorliegt. In nicht-beeinträchtigter Haut von Psoriatikern ist der TEWL normal (MOTTA *et al.*, 1994).

Für TJ-Proteine wurde bereits gezeigt, dass Proteine, die normalerweise im *Stratum granulosum* lokalisiert sind, wie z.B. Occludin und Proteine die auf die oberen Schichten begrenzt sind, wie z.B. ZO-1 und Cldn4, eine verbreiterte Expression in der Epidermis der Plaque-Psoriasis zeigen (PUMMI *et al.*, 2001; YOSHIDA *et al.*, 2001; BRANDNER *et al.*, 2006; PELTONEN *et al.*, 2007). In geheilten Psoriasis Plaques nehmen Occludin und ZO-1, aber nicht Cldn4, wieder eine normale Verteilung ein (PELTONEN *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu der Verbreiterung der Proteine Occludin, ZO-1 und Cldn4, ist Cldn1 in Psoriasis Plaques herunterreguliert, besonders auffällig in den oberen und unteren Zellschichten der Epidermis (BRANDNER *et al.*, 2006; WATSON *et al.*, 2007). Welche Faktoren diese veränderte Lokalisation beeinflussen und welche Bedeutung sie für die Barrierefunktion von TJs haben, ist unbekannt. Da pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF α in erhöhter Menge in psoriatischen Plaques vorhanden sind, ist ihre Beteiligung denkbar. Darüber hinaus ist der Einfluss von pro-inflammatorischen Zytokinen auf TJs aus

einfachen Epithelien bekannt (MA *et al.*, 2004; AL-SADI & MA, 2007; KIMURA *et al.*, 2008; KIMURA *et al.*, 2009).

In der vorliegenden Arbeit sollte nun geklärt werden, welchen Einfluss die veränderte Lokalisation von TJ-Proteinen auf die TJ-Barrierefunktion hat und ob die pro-inflammatorischen Zytokine wie IL-1 β und TNF α zu den Veränderungen von TJ-Proteinen beitragen könnten.

1.3.2 Das CD44 *knock-out* Mausmodell

CD44 ist ein transmembranes Glycoprotein, das in vielen Geweben, wie z.B. im zentralen Nervensystem, in der Lunge, Epidermis, Leber und Pankreas exprimiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass neben der Standardform (CD44s) eine Vielzahl von varianten Isoformen (CD44v1-10) existieren. Diese verschiedenen Formen von CD44 werden durch ein einziges, hoch konserviertes Gen kodiert (FOX *et al.*, 1994; HIRANO *et al.*, 1994; MACKAY *et al.*, 1994; SEITER *et al.*, 1998), das 20 Exons umfasst, von denen 10 Exons durch alternatives Spleißen reguliert werden können. Die Expression der varianten Isoformen unterscheidet sich abhängig von Zelltyp und Wachstumsbedingungen (SCREATON *et al.*, 1993). Die N-terminale Proteindomäne von CD44 beinhaltet Bereiche, die als Bindungsstelle für verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix fungieren. CD44 Liganden sind Hyaluronsäure, Chondroitin, Kollagen, Laminin und Fibronectin. Der Hauptbindungspartner von CD44 ist die Hyaluronsäure (ARUFFO *et al.*, 1990). Der N-terminale Bereich wird von der Plasmamembran, durch die Stammregion getrennt, die durch die varianten Exons vergrößert werden kann. Zum Beispiel beim Menschen auf die Varianten v2-v10 und bei Mäusen auf die Varianten v1-v10. Der intrazelluläre Bereich ist ein C-terminales Ende und formt die zytoplasmatische Domäne, die mit dem Zytoskelett der Zelle interagiert (UNDERHILL, 1992).

Um die biologische Rolle von CD44 zu verstehen haben PROTIN und Mitarbeiter (1999) ein CD44 *knock-out* (k/o) Mausmodell generiert, dem CD44 komplett fehlt einschließlich aller varianten Isoformen. Die CD44 k/o Maus ist lebensfähig, fertil und zeigt keine Abnormalitäten in ihrer Physe oder im Verhalten. Allerdings ist das Immunsystem charakterisiert durch ein gestörtes Leukozyten Homing. Untersuchungen zur Struktur und Funktion der Epidermis dieser CD44 k/o Mäuse zeigten zunächst eine verdünnte Epidermis und eine Verminderung von Proliferation und Differenzierung im Vergleich zu den WT Mäusen. Nach akuter Verletzung des *Stratum corneums* durch *Tape stripping* oder Aceton-Behandlung kam es zu einem Verlust der apikalen Polarisation der *Lamellar Body* (LB)-Sekretion ins *Stratum corneum* und zu einer verzögerten Wiederherstellung der Hautbarriere (BOURGUIGNON *et al.*, 2006).

Aufgrund der Tatsache, dass CD44 k/o Mäuse eine gestörte Barrierefunktion und einen Verlust der Zellpolarität nach Barrieredisruption aufweisen und aufgrund dessen, dass TJs in einfachen Epithelien und Endothelien sehr wichtig sind für die Barrierefunktion und Zellpolarität, sollte in dieser Arbeit geklärt werden, ob TJ-Proteine als Effektormoleküle an der Ausbildung des Haut-Phänotyps der CD44 k/o Mäuse beteiligt sein könnten. Somit wurde die Interaktion von CD44, TJs, Barrierefunktion und Zellpolarität genauer untersucht. Um die Auswirkung der CD44-Defizienz bei Mäusen auf die Anordnung und Funktion der Tight Junctions aufzuklären, wurde die aktive Barrierebildung in sich entwickelnder embryonaler Maushaut und in kultivierten Keratinozyten nach Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration (*Ca²⁺-switch*) untersucht.

2 Material

2.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Amersham Pharmacia (Freiburg), Baker (Deventer), Bio-Rad (München), Geyer (Hamburg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) sowie von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen und im analytischen Reinheitsgrad eingesetzt.

2.2 Zellkulturmaterialien

Die allgemeinen Zellkulturmaterialien stammten von der Firma Falcon/Becton-Dickinson (Heidelberg). DMEM/Ham's F12, die Zusätze L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin, Trypsin und EDTA wurden von der Firma Biochrom (Berlin) bezogen. Das fötale Kälberserum und das Quantum 333 Komplett Medium für Fibroblasten von der Firma PAA (Cölbe).

2.3 Tiere und Gewebe

Die CD44 *knock-out* (CD44^{tm1Hbg/J}) Mäuse und der dazugehörige Wildtyp (B6129SF2/J) wurden von der Firma Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) bezogen. Männliche und weibliche Mäuse wurden über Nacht verpaart und die Schwangerschaftstage wurden nach einem vaginalen Plug, am darauf folgenden Tag gezählt und als Embryonaltag (E) 0.5 definiert. An den Tagen E17.5 und E18.5 wurden die schwangeren Mäuse getötet und die Embryonen entnommen. Die Tierversuchsgenehmigung (FL104-04) wurde von der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz (Hamburg) bewilligt.

Menschliche Haut wurde während Routineoperationen von Hautzysten und Tumoren oder bei Circumcisionen gewonnen. Das verwendete Gewebe war mindestens 2 cm von jeglicher Läsion entfernt lokalisiert. Psoriatische Haut wurde zur Diagnosestellung gewonnen. Die Verwendung des Materials wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg (WF08/08) genehmigt.

Die *ex vivo* Hautmodelle wurden aus Ohren von Schweinen gewonnen, diese wurden von einer lokalen Schlachtereier bezogen. Bei den Tieren handelt es sich um eine Kreuzung zwischen Yorkshire sowie Deutschem Edelschwein. Die geschlachteten Schweine waren in der Regel etwa 6 Monate alt.

Zur Isolierung von RNA wurden die Gewebeproben in RNAlater (Qiagen, Hamburg) gegeben und bis zur Verarbeitung bei 4°C höchstens 4 Wochen gelagert.

Für die Proteinextraktion wurde das Gewebe in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Das Gewebe für die Immunhistochemie wurde in vorgekühltem Isopentan cryokonserviert und ebenfalls bei -80°C gelagert.

2.4 Zellkultur

Humane primäre Keratinozyten wurden aus Kindervorhäuten isoliert. Die Vorhäute wurden freundlicherweise von der Kinderchirurgie (Universitätsklinikum Eppendorf) zur Verfügung gestellt.

Murine primäre Keratinozyten wurden aus Haut neugeborener Mäuse (2-3 Tage alt) isoliert.

2.5 Antikörper

Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten Antikörper mit der jeweiligen Verdünnung für die Immunfluoreszenz (IF) und den Immunoblot (WB) und der Bezugsquelle

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
Kaninchen anti-Claudin-1	IF 1:150	Zymed Laboratories, San Francisco, USA (#71-7800)
	WB 1:500	
Kaninchen anti-Claudin-4	IF 1:100	Zymed Laboratories, San Francisco, USA (#36-4800)
	WB 1:100	
Maus anti-Claudin-4	IF 1:30	Zymed Laboratories, San Francisco, USA (#18-7341)
	WB 1:100	
Maus anti-Occludin	IF 1:100	Zymed Laboratories, San Francisco, USA (#33-1500)
	WB 1:50	
Kaninchen anti-ZO-1	IF 1:100	Zymed Laboratories, San Francisco, USA (#61-7300)
	WB 1:100	
Kaninchen anti-ZO-2	IF 1:100	Zymed Laboratories, San Francisco, USA (#38-9100)
	WB 1:200	
Ziege anti-JAM-A	IF 1:30	R&D Systems, Mineapolis, USA (#AF1103)
	WB 1:100	
Ratte anti-E-cadherin	IF 1:500	Zymed Laboratories, San Francisco, USA (#13-1900)
	WB 1:100	
Kaninchen anti-Tiam1	WB 1:100	Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, USA (#sc-872)
Kaninchen anti-aPKC ζ	IF 1:100	Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, USA (#sc-216)
	WB 1:100	
Kaninchen anti-aPKC ι/λ	IF 1:100	Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, USA (#sc-11399)
	WB 1:100	
Kaninchen anti-Rac1	IF 1:100	Calbiochem, Darmstadt (#AB4202)
	WB 1:100	
Kaninchen anti-Par3	IF 1:100	Upstate, Temecula, USA (#07-330)
	WB 1:200	
Maus anti-Ki67	IF 1:50	Dako, Hamburg (#7240)
Maus anti-Involukrin	IF 1:200	Lab Vision Products, Fremont, USA (#MS126P0)
Maus anti-Filaggrin	IF 1:200	Quartett, Berlin (#060600302)
Maus anti- β -Aktin	WB 1:500	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (#A1978)
Maus anti- α -Tubulin	WB 1:200	Calbiochem, Darmstadt (#CP06)

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die sekundären Antikörper von der Firma Molecular Probes (Karlsruhe) bezogen. Diese waren mit dem Fluorochrom Alexa 594 (Verdünnung 1:1250), Alexa 488 (1:600) oder Cy3 (1:600) gekoppelt. Als Neaktivkontrollen dienten die entsprechenden Antikörper-Isotypen von der Firma Dako (Hamburg).

Für den Immunoblot wurden die sekundären Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörper der Fa. Dianova (Hamburg) in einer 1:5000 Verdünnung eingesetzt.

2.6 Primer

Für die *Real-time* PCR wurden FAMTM-markierte TaqMan®-Sonden der Firma Applied Biosystems (Foster, CA, USA) benutzt:

Tabelle 2.2: Übersicht der verwendeten TaqMan®-Sonden

TaqMan®-Sonde	Spezies
Cldn1 (Hs01076359_m1)	Human
Cldn4 (Hs00533616_s1)	Human
Cldn7 (Hs00600772_m1)	Human
ZO-1 (Hs01551876_m1)	Human
Occludin (Hs00170162_m1)	Human
JAM-A (Hs00170991_m1)	Human
18S RNA (Hs99999901_s1)	Kontrolle

2.7 FITC-Dextrane

Die FITC-Dextrane in den Größen 4 kDa und 40 kDa wurden von der Firma Sigma (München) bezogen.

2.8 Zytokine

Die Zytokine TNF α und IL-1 β wurden von der Firma PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA) bezogen.

2.9 Kits

Das *Quick Cell Proliferation Assay Kit II* wurde von der Firma BioCat (Heidelberg) und das *Active Rac1 Pull-down and Detection Kit* wurde von der Firma Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA) benutzt.

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Anzucht von humanen Keratinozyten

Keratinozyten Wachstumsmedium (KGM)

Keratinocyte growth medium 2 Promocell (Heidelberg)

Keratinozyten Differenzierungsmedium

Tabelle 3.1: Zusammensetzung des Differenzierungsmediums

	100 ml Ansatz
DMEM	60 ml
Ham F12	30 ml
FCS	10 ml
Hydrocortison (1 mg/ml)	40 µl
Insulin (5 mg/ml)	200 µl
PS (10000 U/ml)	50 µl
Vitamin C (10 mg/ml)	500 µl

3.1.1.1 Isolierung und Kultivierung von humanen Keratinozyten

Keratinozyten wurden aus humanen Vorhäuten enzymatisch isoliert und anschließend kultiviert. Ein Teil der Vorhaut wurde in PBS gewaschen und klein geschnitten. Nach Inkubation über Nacht in einer 0,25%igen Trypsin-Lösung bei 4°C wurde die Epidermis von der Dermis gelöst. Die gewonnenen Zellen wurden in 5 ml 10%igem FCS suspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurden mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer (Fa. Brand) ausgezählt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte unter dem Phasenkontrastmikroskop, hierbei wurde die Zellzahl in den vier großen Quadranten ermittelt. Durch Bildung des Mittelwertes aus den vier Quadranten, Multiplizieren mit dem Faktor für die Verdünnung und dem Faktor 10.000 ergaben sich die Zellzahl/ml.

Nach der Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde die Zellsuspension bei 1100 rpm für 5 min zentrifugiert und auf die gewünschte Zelldichte mit KGM eingestellt. Für die Kultivierung wurden jeweils $0,7 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ Zellen/ml in eine Zellkulturschale eingesät und mit jeweils 10 ml KGM aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Das Nährmedium wurde dreimal pro Woche erneuert.

3.1.1.2 Subkultivierung von humanen Keratinozyten

Eine Subkultivierung erfolgte, nachdem die Zellen zu einem konfluenten Monolayer herangewachsen waren. Das Medium wurde entfernt und die Zellen mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,1% Trypsin + 0,02% EDTA) vom Boden der Zellkulturschale abgelöst. Die Trypsinwirkung wurde durch die Zugabe von 5 ml 10%igem FCS gestoppt. Nach der Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde die Zellsuspension bei 1100 rpm für 5 min

zentrifugiert und für weitere Untersuchungen wurde die gewünschte Zelldichte mit KGM eingestellt.

3.1.2 Anzucht muriner Keratinozyten

Murines Keratinozyten Wachstumsmedium (mKGM)

Tabelle 3.2: Zusammensetzung des mKGM

	500 ml Ansatz
DMEM/Ham's F12	435 ml
cFCS	50 ml
L-Glutamin	5 ml
PS (10000 U/ml)	5 ml
Vitamin C (10 mg/ml)	2,5 ml
Hydrocortison (5 mg/ml)	50 µl
Insulin (5 mg/ml)	500 µl
EGF (10 µg/ml)	500 µl
Adenin (0,18 M)	500 µl
Choleratoxin (10 ⁻⁷ M)	500 µl

3.1.2.1 Herstellung des *Feederlayers*

Für optimale Wachstumsbedingungen wurden die murinen Keratinozyten auf einem *Feederlayer* (Fütterungs-Zellen) aus 3T3-Fibroblasten kultiviert. Diese Zellen wurden in Quantum 333 Medium (PAA) unter Zusatz von 1% Penicillin-Streptomycin kultiviert und einmal wöchentlich im Verhältnis 1:3 geteilt.

Vor der Verwendung als *Feederlayer* wurde die Proliferation der konfluenten 3T3-Fibroblasten durch eine zweistündige Inkubation mit Mitomycin C (4 µg/ml) inhibiert. Anschließend folgte die Lösung aus den Kulturflaschen mit Trypsin-EDTA (0,05% Trypsin + 0,02% EDTA) und die Aussaat. Nach 24 h wurden die murinen Keratinozyten zu dem *Feederlayer* gegeben.

3.1.2.2 Isolierung und Kultivierung von murinen Keratinozyten

Die murinen Keratinozyten wurden aus der Haut von 3 Tage alten Mäusen enzymatisch isoliert und anschließend kultiviert. Die Haut wurde nach einer Desinfektion entnommen und über Nacht in einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,1% Trypsin + 0,02% EDTA) bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Dermis von der Epidermis gelöst.

Die Epidermis wurde mit 2 Skalpelln sehr gut zerkleinert und mit Medium in ein 2 ml Tube überführt. Zum Suspendieren der Zellen wurden diese über einen Zellstrainer vereinzelt. Die suspendierten murinen Keratinozyten wurden in beschichtete 6-well-Platten mit zusätzlichem *Feederlayer* eingesät und bei 32°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

3.1.2.3 Subkultivierung von murinen Keratinozyten

Eine Subkultivierung erfolgte, nachdem die Zellen zu einem konfluenten Monolayer herangewachsen waren. Die Zellen wurden mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,1% Trypsin + 0,02% EDTA) vom Boden der Zellkulturschale abgelöst. Die Trypsinwirkung wurde durch die Zugabe von 4 ml 10%igem cFCS gestoppt. Die Zellsuspension wurde bei 1100 rpm für 5 min zentrifugiert und auf die gewünschte Zelldichte mit mKGM eingestellt.

3.1.3 Porcine *ex vivo* Hautmodelle

Kulturmedium

Tabelle 3.3: Zusammensetzung des Kulturmediums

	100 ml Ansatz
DMEM	97 ml
FCS	2 ml
PS (10000 U/ml)	1 ml
Hydrocortison (5 mg/ml)	400 µl

3.1.3.1 Anlegen der Hautmodelle

Schweineohren wurden unter fließendem Wasser gesäubert und die Ohr-Innenfläche von den Haaren befreit. Eine sterile Mullbinde wurde auf die Ohr-Innenfläche gelegt und mit Sterillium getränkt. Nach 10 min Inkubation wurden die Ohren mit steriler Kochsalzlösung abgespült. Unter einer sterilen Werkbank wurden 6 mm Stanzen entlang der Plicae entnommen und in mit Medium und Gaze bestückte 12-*well*-Platten gesetzt, so dass die Dermis mit Medium umspült wurde, aber die Epidermis trocken blieb. Die Hautmodelle wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

50 µl Zytokin-Lösung (100 ng/ml oder 1 µg/ml; gelöst in PBS) wurden direkt in die Dermis injiziert und die Hautmodelle für 30 min, 60 min, 6 h und 24 h inkubiert. Als Kontrolle diente eine Injektion mit PBS.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Proteinextraktion

RIPA-Puffer

Tris	50 mM
NaCl	150 mM
NP40=Igepal	1 %
Na-deoxycholate	0,5 %
EDTA	5 mM
SDS	0,1 %

Protease-Inhibitormix

Leupeptin	1 mg
Pepstatin A	0,1 mg
Bacitracin	10 mg
PMSF	10 mM

Die Gewebeproben wurden mit 500 µl RIPA-Protease-Inhibitor-Puffer (10 µl Protease-Inhibitormix auf 1 ml RIPA-Puffer) versetzt und in einem Tissue Lyser (Tissue Lyser Qiagen, Hamburg) für 3 min bei 30 Hz homogenisiert. Die Proteinextraktion aus Keratinozyten erfolgte in demselben RIPA-Puffer. Die Zellen wurden zunächst eine viertel Stunde mit dem Puffer auf Eis inkubiert und anschließend mit einem Zellschaber in Suspension gebracht. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 4°C und 13000 rpm in der Biofuge 13 (Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand mit den Proteinen wurde in ein neues Eppendorf-Tube überführt. Für die Proteinbestimmung wurde 1 µl entnommen, der restliche Überstand wurde bei -80°C eingefroren.

3.2.2 Proteinbestimmung

Bradford-Farbreagenz

Coomassie Brilliant Blau G250	0,01 %
Ortho-Phosphorsäure (88%)	1,6 M
Abs. Ethanol (99%)	0,8 M

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford. Der Farbstoff liegt in saurer Lösung hauptsächlich in der protonierten, kationischen Form mit einem Absorptionsmaximum von 470 nm (rot) vor. Bei der Bildung des Farbstoff-Proteinkomplexes wird dagegen die im Gleichgewicht mit der kationischen Form stehende anionische Form stabilisiert, welche ein Absorptionsmaximum von 595 nm (blau) besitzt.

Für die Bestimmung wurden die Proben in 100 µl Aqua dest verdünnt und mit 900 µl Bradford-Farbreagenz gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, wurde parallel eine BSA-Verdünnungsreihe gemessen und eine Eichgerade erstellt.

3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Acrylamid-Lösung

Acrylamid	30 %
Bis	0,8 %

Trenngel-Puffer, pH 8,8

Tris	1,5 M
SDS	0,4 %

Sammelgel-Puffer, pH 6,8

Tris	0,5 M
SDS	0,4 %

Ammoniumpersulfat (APS)

Ammoniumpersulfat 10 %

Elektrophorese-Puffer, pH 8,8

Glycin 0,19 mM
 Tris 23 mM
 SDS 0,2 %

SDS-Proben-Puffer, pH 6,8

Tris 60 mM
 Glycerin 10 %
 β-Mercaptoethanol 10 %
 SDS 5 %
 Bromphenolblau 0,5 %

Nach der Proteinbestimmung wurden die Proben mit zweifach konzentriertem SDS-Proben-Puffer im gleichen Volumen gemischt. Die Proben wurden auf 1 µg/µl eingestellt und für die SDS-Page eingesetzt.

Die eindimensionale Auftrennung von Proteingemischen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem nach LÄMMLI (1970).

Tabelle 3.4: Zusammensetzung der Gellösungen

	Sammelgel	Trenngele mit vers. Acrylamidkonzentrationen		
		8 %	12 %	14 %
Acrylamid-Lösung	1,3 ml	8 ml	12 ml	14 ml
Trenngel-Puffer	-	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
Sammelgel-Puffer	2,5 ml	-	-	-
Aqua dest	5,9 ml	14,2 ml	10,2 ml	8,2 ml
10 % APS	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Gele und Elektrophorese-Puffer wurden in eine Elektrophoresekammer (Bio-Rad, München) eingebracht. Vor dem Beladen des Gels wurden die Proben für 3 min bei 95°C denaturiert. Nach kurzer Abkühlung bei Raumtemperatur wurden 20 - 30 µg Protein aufgetragen. Die Proteine wurden bei 200 V aufgetrennt. Als Molekulargewichts-Standard wurde der *prestained SDS molecular weight marker* von Bio-Rad verwendet.

3.2.4 Western-Blot

Transfer-Puffer

Methanol 20 %
 Glycin 192 mM
 Tris 25 mM
 SDS 0,02 %

Die geoelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Es wurde ein Nass-Blott-Verfahren mit einem Maxi-Wet-Tank (Bio-Rad) verwendet. Die aus Nitrocellulose bestehende Blottingmembran wurde als proteinbindendes Material genutzt. Die für das Blotting-Sandwich verwendeten

Filterkartonpapiere, Nitrocellulosemembranen, Schwammpads und die Gele wurden ca. 15 min in Transfer-Puffer äquilibriert. Für den Transfer wurde für 1 h eine Stromdichte von 350 mA bei einer Spannung von 100 V angelegt. Die Kühlung erfolgte durch ein Kühlelement und im 4°C Raum.

3.2.5 Proteindetektion

Ponceau-S-Lösung

TBST-Puffer, pH 7,4

Tris	10 mM
NaCl	150 mM
Tween	0,05 %

Um die Qualität von Elektrophorese und Blot zu überprüfen, wurden die Nitrocellulosemembranen 5 min in Ponceau-S-Lösung angefärbt. Die gefärbten Banden auf der Membran wurden markiert. Nach der Markierung der Proteinbanden erfolgte die Entfärbung der Membran durch Waschen in TBST-Puffer.

3.2.6 Coomassie Blaufärbung

Coomassie-Blau-Lösung

Methanol	40 %
Essigsäure	5 %
Coomassie Brilliantblau G250	0,4 %

Entfärbe-Lösung

Methanol	40 %
Essigsäure	5 %

Konservierungs-Lösung

Essigsäure	7,5 %
------------	-------

Das Gel wurde direkt nach der Elektrophorese gefärbt, um die einzelnen Banden sichtbar zu machen oder die Färbung diente als Kontrolle des Blottes, um zu überprüfen, ob die Proteine transferiert wurden. Nach einer 1-stündigen Inkubation in Färbe-Lösung erfolgte die Entfärbung in Entfärbe-Lösung. Anschließend wurden die Gele in Konservierungs-Lösung gelagert.

3.2.7 Antikörpermarkierung

Blockierungslösung

Magermilchpulver	5 % in TBST-Puffer
------------------	--------------------

Unspezifische Bindungsstellen wurden durch die Inkubation in Blockierungslösung bei RT für 60 min abgesättigt. Der Primärantikörper wurde entsprechend in Blockierungslösung verdünnt, auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach der Primärantikörper-Markierung wurde die Membran dreimal 5 min in

TBST-Puffer bei RT gewaschen. Daraufhin wurde der Sekundärantikörper 1:5000 in Blockierungslösung verdünnt und für 30 min bei RT auf einem Überkopfschüttler mit der Membran inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBST-Puffer erfolgte die Detektion der gebundenen Antikörper mit dem ECL-System (ECL Western blotting detection reagent, Amersham-Pharmacia). Zur Detektion wurde die Membran in einem 1:1 Gemisch aus ECL-Lösung 1 und ECL-Lösung 2 für 1 min bei RT inkubiert, vorsichtig abgetropft und in eine Prospekthülle überführt. In einer Röntgenkassette (Amersham-Pharmacia) wurden anschließend Röntgenfilme (Konica Minolta) für 30 s, 1 min, 2 min und 5 min aufgelegt und entwickelt. Das Molekulargewicht der detektierten Banden wurde anhand des Molekulargewichtstandards bestimmt.

3.2.8 Stripping

Um die Nitrozellulosemembran mit weiteren Antikörpern markieren zu können, wurde sie von den vorherigen Antikörpern befreit, indem sie bei 4°C über Nacht in Ponceau-S-Lösung inkubiert wurde. Anschließend erfolgte ein erneutes Waschen der Nitrozellulosemembran in TBST-Puffer.

3.2.9 Rac1 Pull-Down Assay

Rac1 gehört zur Familie der Rho-ähnlichen GTPasen, die verschiedenste zelluläre Prozesse regulieren. Die Rho-ähnlichen GTPasen liegen entweder in einem GDP-gebundenen inaktiven Zustand oder in einem GTP-gebundenen aktiven Zustand vor und werden durch GEFs mit einer Konformationsänderung aktiviert.

Um die Menge an aktivem Rac1 zu bestimmen, wurde das *Active Rac1 Pull-Down and Detection Kit* der Firma Pierce (Rockford, IL, USA) verwendet. Das Kit beruht auf dem Mechanismus, dass die p21-Bindungsdomäne (PBD) der Kinase Pak1 (p21-aktivierte Kinase) aktives Rac1 (Rac1-GTP) bindet.

Gewebe-Lysate (1000 µg) wurden mit 20 µg Glutathion S-Transferase (GST) gebunden mit PBD und Glutathione Agarose Beads in Bindungspuffer für 1 h bei 4° C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Nach Zentrifugation für 30 s bei 8.000 rpm wurde die Säule 3-mal in Bindungspuffer gewaschen. Die aktive Form von Rac1 wurde anschließend mit doppelt konzentriertem SDS aus der Agarose herausgewaschen und mittels SDS-Page aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem monoklonalen Rac1-Antikörper detektiert.

3.3 Immunhistologische Methoden

3.3.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Von den cryokonservierten Gewebeproben wurden 6 µm Schnitte im Cryostaten (Leica LM 3050, Leica, Nussloch) bei einer Blocktemperatur von -21°C angefertigt. Die Schnitte wurden auf Superfrost/Plus-Objekträger (Assitent, Sondheim) aufgezogen und mindestens 30 min bei RT getrocknet. Die Fixierung erfolgte für 10 min in -20°C kaltem Aceton oder für 30 min in 4°C kaltem 95% Alkohol mit anschließender Inkubation in Aceton für 1 min bei RT. Die Schnitte wurden entweder direkt weiter verwendet oder bei -80°C aufbewahrt.

3.3.2 Aufbereitung der Zellen

Die zu untersuchenden Zellen wurden nach ihrer Kultivierung auf den Deckgläschen für den immunhistologischen Nachweis 5 min in -20°C kaltem Methanol und anschließend 15 s in -20°C kaltem Aceton fixiert.

Für die Kultivierung von murinen Keratinozyten auf Deckgläschen wurden sterile Deckgläschen mit 50 µg/ml Kollagen I in PBS für 1 h bei 37°C beschichtet. Anschließend wurden die Deckgläschen mit PBS gewaschen und bis zum Gebrauch in PBS gelagert.

3.3.3 Immunhistochemischer Nachweis

PBS-Puffer, pH 7,4

NaCl	140 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	8,1 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM

Durch die Immunhistochemie kann die Lokalisation von Proteinen in Gewebeschnitten mittels farbstoffmarkierter Antikörper nachgewiesen werden. Um das Austrocknen der Schnitte zu verhindern, fanden die Färbungen in einer dunklen Feuchtkammer statt. Zur Überprüfung der Antikörperspezifität und -qualität wurde bei jeder Färbung eine Positiv- und Negativkontrolle durchgeführt. Als Negativkontrolle diente der jeweilige Isotyp des Antikörpers in derselben Proteinkonzentration.

Um unspezifische Bindungsstellen auf den Schnitten abzublocken, wurden diese mit Blockierungspuffers (2% Normal-Ziegen-Serum oder Normal-Esel-Serum) für eine viertel Stunde inkubiert. Zum Permeabilisieren der Membran wurde eine 0,01% Triton X-100 Lösung verwendet. Daraufhin folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper bei RT für 30 min. Nach den Waschschritten mit PBS dreimal für 5 min wurde der Sekundärantikörper aufgetragen. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT wurden die Gewebeschnitte mit PBS für 5 min gewaschen, gefolgt von einer 1-minütigen Inkubation in einer DAPI-Lösung. Daraufhin wurde nochmals gewaschen in PBS (jeweils dreimal für

5 min) und anschließend zweimal für 3 min mit Aqua dest gespült, bevor sie mit Fluoromount-G (Southern Biotech, USA) eingedeckt wurden. Zum Aushärten des Fluoromount-G wurden die Präparate über Nacht bei RT ruhen gelassen. Die Dokumentation erfolgte an einem Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss, Jena) und die Abbildungen wurden mit dem Programm Openlab Version 9.0.1 (Improvision Systems, Tübingen) erstellt.

3.3.4 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Die Aufnahmen für die horizontale Darstellung der xy-Ebene wurden an einem Olympus FV1000D-Mikroskop (BX61, Olympus, Hamburg) mit dem Programm FV10-ASW (Olympus) angefertigt. In einer Bildserie von 8 Aufnahmen wurden die Zellen alle 0,45 µm aufgenommen. Die Bilderserien wurden zunächst mit der Software ImageJ (NIH) zu einem z-Stapel zusammengesetzt. Anschließend lässt sich über die Software des Volume Viewers die vertikale xz-Ebene darstellen.

3.3.5 Elektronenmikroskopie

Fixativ

Glutardialdehyd	2 %
Na-Cocadylat	100 mM

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurde den E17.5 Embryonen ein kleines Stück Haut aus dem Nacken entnommen und fixiert. Das Gewebe wurde sofort in ein Reaktionsgefäß mit eisgekühltem Fixativ gegeben, anschließend wurden die Biopsien in 1 mm² große Würfel geschnitten. Die Gewebestücke wurden in ein neues Reaktionsgefäß mit eisgekühltem Fixativ geben, mit Parafilm umschlossen und bei 4°C verschickt. Die Einbettung und die elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Marek Haftek und Mitarbeitern (Hopital Edouard Herriot, Lyon) durchgeführt.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 RNA-Isolierung aus Zellen und Gewebe

Die RNA-Isolierung erfolgte mittels *RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit* (Quiagen). Konfluente Zell-Monolayer aus 12-well- oder 6-well-Platten wurden mit 350 µl des im Kit enthaltenen RLT-Puffer (1% Mercaptoethanol) lysiert, eine Homogenisierung erfolgte, indem das Zell-Lysat auf eine Shredder-Säule gegeben wurde.

Höchstens 30 mg der in RNAlater fixierten Hautproben wurden in 300 µl RLT-Puffer (1% Mercaptoethanol) homogenisiert. Zur Proteinverdauung wurden 10 µl Proteinkinase K und 590 µl RNase freies Wasser zugegeben und 10 min bei 55°C inkubiert. Anschließend wurde 3 min bei 10000 rpm in der Biofuge fresco (Heraeus) zentrifugiert.

Das Homogenisat wurde mit 450 µl absolutem Alkohol versetzt und auf eine *Spin column* gegeben. Des Weiteren erfolgte die RNA-Isolierung durch mehrere Wasch- und Elutionsschritte nach Vorgabe des Arbeitsprotokolls. Die Bestimmung der RNA-Konzentration und der Reinheit erfolgte durch die Messungen der Absorption bei 260 nm und 280 nm, wobei eine Extinktion bei 260 nm von 1,0 einer Menge von 40 µg RNA entspricht.

3.4.2 Synthese komplementärer DNA mit Hilfe der reversen Transkription

Mit Hilfe des *iScript cDNA Synthesis Kits* (Bio-Rad) ließ sich aus RNA die komplementäre DNA (cDNA) synthetisieren. 3 µg RNA wurden in einem Ansatz von 60 µl eingesetzt:

Tabelle 3.5: Zusammensetzung des cDNA Synthese Ansatzes

Reagenzien	Ansatz
Reaktions-Mix	12 µl
Reverse Transkriptase	3 µl
RNA	3 µg
	ad. 60 µl H ₂ O

Der Ansatz wurde zunächst für 5 min bei 25°C inkubiert, dann folgte eine Inkubation für 30 min bei 42°C und schließlich 5 min bei 85°C. Die cDNA wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.4.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht gezielt einzelne Nukleotidsequenzen *in vitro* zu amplifizieren. Nach einer Hitzedenaturierung der DNA lagern sich die Primer, zwei kurze, synthetische Einzelstrang-Oligonukleotide, unter geeigneten Temperaturbedingungen an den entsprechenden komplementären DNA-Abschnitten an. Die Primer sind komplementär zu den flankierenden Sequenzen des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes. Ausgehend von diesen Primern synthetisiert eine DNA-Polymerase eine komplementäre DNA-Sequenz. Das Syntheseprodukt dient nach erneuter Hitzedenaturierung wiederum als Matrize. Die PCR besteht aus drei aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten, die bei unterschiedlicher Temperatur ablaufen: (1) Denaturierung der Doppelstrang-DNA, (2) Annealing der Primer und (3) Elongation von komplementären DNA-Strängen durch die Polymerase. Diese drei Reaktionsschritte werden in aufeinander folgenden Zyklen fortlaufend wiederholt, wobei mit jedem Zyklus eine Verdopplung der DNA-Menge erzielt wird. Auf diese Weise kann in kurzer Zeit eine große Menge DNA synthetisiert werden.

Zu Versuchsbeginn wurden folgende Reaktionsbestandteile zusammenpipettiert:

Tabelle 3.6: Zusammensetzung des PCR Ansatzes

Reagenzien	Ansatz
cDNA	1,0 µl
Inkubationspuffer (10x)	5,0 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl
dNTPs (2 mM)	5,0 µl
Primer sense	25 pmol
Primer antisense	25 pmol
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
	ad. 50 µl H ₂ O

Zur Amplifizierung wurde folgendes Programm im UNO Thermoblock (Biometra, Göttingen) eingestellt:

Tabelle 3.7: Reaktionsbedingungen der Polymerase-Kettenreaktion

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1.	95	60
2.	55	30
3.	72	30
4.	94	60
5.	55	30
6.	72	30
7.	Schleife zu 4. mit 40 Wiederholungen	
8.	4	

Das Ergebnis der Amplifikation wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Dazu wurde jeweils 1 µl des PCR-Produktes eingesetzt.

3.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Durch die Agarose-Gelelektrophorese können lineare DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Wanderungstrecke linearer DNA ist nach ihrem Molekulargewicht umgekehrt proportional. Als Größenstandard diente eine 100 bp DNA Leiter der Firma Invitrogen (Karlsruhe).

TBE-Puffer, pH 8,3

Tris	89,0 mM
Borsäure	89,0 mM
EDTA	2,5 mM

DNA-Lösung

DNA	1 µl
Beladungspuffer	4 µl
DPEC-Wasser	20 µl

Um das Agarosegel herzustellen, wurde 1 g SeaKem LE Agarose in 50 ml TBE-Puffer in der Mikrowelle verflüssigt. Vor dem Gießen des Gels wurden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben. Die flüssige Agarose wurde auf einen Glasschlitten einer Gelelektrophoresekammer bis zu einer Höhe von 0,5 cm gegossen. Mit Hilfe eines

Kammes wurden Taschen geformt. Nach Erstarren der Agarose wurde das Gel in der Elektrophoresekammer mit dem TBE-Puffer überschichtet, und die DNA-Lösung wurde in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde zunächst 15 min bei 30 V und anschließend 50 min bei 60 V durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese erfolgte die Dokumentation in einem GeneGenius System der Firma Syngene (Cambridge, UK).

3.4.5 Quantitative *Real-time* PCR

Die quantitative *Real-time* PCR (qRT-PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion beruht, und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus durchgeführt. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Die qRT-PCR wurde in einem Ansatz von 25 μ l durchgeführt, dieser bestand aus 2 μ l cDNA und 23 μ l PCR-Mastermix. Für den PCR-Mastermix wurden die FAMTM-markierten TaqMan®-Sonden (Applied Biosystems) und der iQ-Supermix (Bio-Rad) verwendet, der bereits Puffer, dNTPs und die *Taq*-Polymerase enthält. Aus folgender Tabelle kann die Zusammensetzung des PCR-Mastermixes entnommen werden.

Tabelle 3.8: Zusammensetzung des PCR Ansatzes

Reagenzien	25 μ l Ansatz
cDNA	2 μ l
Primer	1,25 μ l
Supermix	12,5 μ l
DPEC-Wasser	9,25 μ l

Die qRT-PCR wurde mit einem iCycler iQ5 *Real-time* PCR Detection System (Bio-Rad) unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt: Start bei 50°C für 2 min, initiales Aufheizen auf 95°C für 10 min, gefolgt von 40 Zyklen in der Abfolge Denaturierung bei 95°C für 15 s und Annealing und Extension bei 60°C jeweils für 1 min. Die Fluoreszenz wurde mit der iCycler Software (Bio-Rad) analysiert.

3.4.6 Auswertung der *Real-time* PCR

Bei der relativen Quantifizierung wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Werte die Genexpression zweier Proben relativ zueinander als n-fache Expression angegeben. Der C_T -Wert beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

Zunächst wurden die C_T -Werte der Probe ($C_{T,P}$) gegen eine Kontrolle ($C_{T,K}$), ein konstant exprimiertes Housekeeping-Gen, normalisiert. Aus dem C_T -Wert der Probe und der Kontrolle erhielt man demzufolge den $\Delta C_{T,P}$ -Wert (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

$$\Delta C_{T,P} = (C_{T,P}) - (C_{T,K})$$

In einem weiteren Schritt wurde der $\Delta\Delta C_T$ -Wert gebildet, der der Differenz der normalisierten Werte zweier verschiedener Proben entspricht.

$$\Delta\Delta C_{T,P} = (C_{T,P1}) - (C_{T,P2})$$

Für die Bestimmung des tatsächlichen Unterschieds der Expressionslevel der beiden Proben wurde die Genexpressionsrate (G) ermittelt:

$$G = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

3.5 *Barriere-Assays in vitro*

3.5.1 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes

Für die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes wurden 10^5 Zellen in eine 12-Transwell-Platte (Costar Transwell, Corning Incorporated, New York, USA) eingesät, die einen Polyester-Filter ($1,2 \text{ cm}^2$, $0,4 \mu\text{m}$ Porengröße) enthalten. Es wurde 0,5 ml Zellsuspension auf die apikale und 1,5 ml KGM auf die basale Seite des Filters gegeben. KGM diente als Kontrolle. Alle 24 h wurde das Medium gewechselt. Bei Erreichen der Konfluenz wurde das Niedrig- Ca^{2+} -Medium durch Hoch- Ca^{2+} -Medium ersetzt und es erfolgte die Messung des transepithelialen Widerstandes unter Verwendung eines speziellen Volt-Ohm-Meters (Millicell-ERS, Millipore, Schwalbach) im Kulturmedium jeweils bevor dieses gewechselt wurde. Hierzu wurden die mechanisch gekoppelten Elektroden so aufgesetzt, dass sich eine apikal und die andere basal des Filtereinsatzes befand. Angaben zum Widerstand über den Zell-Monolayer erfolgten in $\Omega \cdot \text{cm}^2$.

3.5.2 Messung des parazellulären *Tracer* Flux

Zur Messung des parazellulären *Tracer* Flux wurden hydrophile *Tracer*-Moleküle, wie z.B. Fluorophor-gekoppelte Dextrane verwendet. Die FITC-Dextrane in den Größen 4 kDa und 40 kDa wurden in einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml in Hoch- Ca^{2+} -Medium apikal alle 24 h zu dem Zell-Monolayer gegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium aus dem basalen Kompartiment gesammelt. Die Messung wurde an einem Tecan Fluoreszenzreader (Männedorf, Schweiz) durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Standardkurve mit 8 Werten zwischen 0 und 50 $\mu\text{g/ml}$ FITC-Dextran aufgenommen. Als Nullwert diente Medium ohne Zusatz der FITC-Dextrane.

3.5.3 Behandlung von humanen Keratinozyten mit Zytokinen

Die Behandlung der Zellen mit Zytokin-Lösungen erfolgte nach Konfluenz. Die Zytokine wurden in einer Endkonzentration von 1 ng/ml oder 100 ng/ml in KGM (1,8 mM Ca²⁺) apikal oder basal zu den Zellen gegeben (t= 0 h). Daraufhin erfolgte die Messung des transepithelialen Widerstandes alle 24 h nach Behandlung. Die Zytokin-Lösung wurde alle 48 h erneut zugegeben.

3.6 Barriere-Assays *in vivo*

3.6.1 Biotinylierung

Um die Permeabilität der Epidermis von innen-nach-aussen zu prüfen, wurden 10 mg Biotinylierungsreagenz (BR) (EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin; Pierce) in 1 ml PBS (1 mM CaCl₂) gelöst. 50 µl dieser BR-Lösung wurden in die Dermis von Mäusen oder Hautmodellen injiziert und 30 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Hautstück oder Hautmodell entnommen und cryokonserviert. Das Biotinylierungsreagenz (557 Da Diffusions-*Tracer*) hat die Eigenschaft, dass es durch den Extrazellularraum diffundieren und dabei Proteine biotinylieren kann. Der *Tracer* kann dann anschliessend mit einer TexasRed-Streptavidin-Färbung nachgewiesen werden. Der *Tracer* ist nicht membrangängig, kann also nicht in Zellen aufgenommen werden. Zum Färben wurden 6 µm dicke Schnitte anfertigt. Die Schnitte wurden für 30 min in 95% Ethanol bei 4°C und für 1 min in 100% Aceton bei RT fixiert. Um unspezifische Bindungsstellen auf den Schnitten abzublocken, wurden diese mit 2% NGS bei RT für 15 min inkubiert. Zum Permeabilisieren der Membran wurde gleichzeitig mit einer 0,01% TritonX-100 Lösung inkubiert. Daraufhin erfolgte zunächst die Primärantikörper-Inkubation bei RT für 30 min. Nach waschen mit PBS dreimal für 5 min wurde die Sekundärantikörper-Inkubation in Kombination mit TexasRed-Streptavidin für 30 min bei RT durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die Gewebeschnitte mit PBS für 5 min gewaschen, gefolgt von einer 1-minütigen Inkubation in einer DAPI-Lösung. Daraufhin wurde nochmals gewaschen in PBS (jeweils dreimal für 5 min) und anschließend zweimal für 3 min mit Aqua dest gespült, bevor sie mit Fluoromount-G (Southern Biotech, USA) eingedeckt wurden. Zum Aushärten des Fluoromount-G wurden die Präparate über Nacht bei RT ruhen gelassen.

3.6.2 Permeabilitäts-Assay

Um die Permeabilität der Epidermis von aussen-nach-innen zu prüfen, wurde der Permeabilitäts-Assay modifiziert nach HARDMAN *et al.* (1998) durchgeführt. Embryonen (E17.5 und E18.5) und neugeborene Mäuse wurden eingeschläfert, daraufhin erfolgte eine Dehydrierung der Haut durch Inkubation in einer Methanolreihe von 25%, 50%, 75% und 100% für jeweils eine Minute gefolgt von einer Rehydrierung in den gleichen

Methanol Konzentrationen für wieder jeweils eine Minute. Die Mäuse wurden in PBS gewaschen und für 30 min in einer 0.1% Toluidinblau-Lösung gebadet, schließlich folgte ein gründliches Waschen in PBS und die Ergebnisse wurden mit einer Digitalkamera dokumentiert.

3.7 Proliferations-Assay

Mit dem *Quick Cell Proliferation Assay Kit II* (Fa. BioCat, Heidelberg) wurde die Proliferation von Keratinozyten bestimmt. Als Maß für die Vitalität wurde die metabolische Aktivität der Zellen nach Inkubation mit dem Tetrazoliumsalz (WST) gemessen. Das WST wird durch mitochondriale Dehydrogenasen zu Formazan, ein rotes lösliches Produkt, reduziert. Es wurden je nach Versuchsansatz $10^4 - 5 \times 10^4$ Zellen in 100 μ l Niedrig- Ca^{2+} -Medium in eine 96-well-Platte eingesät und bis zur Konfluenz 48 h inkubiert. In einem weiteren Versuch wurde bei Erreichen der Konfluenz das Niedrig- Ca^{2+} -Medium durch Hoch- Ca^{2+} -Medium ersetzt und inkubiert oder zusätzlich wurde ein Teil der Zellen mit 100 ng/ml Zytokinen behandelt. Nach den verschiedenen Inkubationszeiten (24 h - 96 h) wurden 10 μ l WST-Reagenz hinzugegeben und für 4 h unter Kulturbedingungen inkubiert. Daraufhin erfolgte die Messung der Absorption in einem Microtiterplatten-Reader der Firma Tecan bei einer Wellenlänge von 450 nm.

3.7.1 Bestimmung des proliferativen Index in den Hautmodellen

Ki67-positive Zellen der Hautmodelle wurden markiert und mittels des oben erwähnten Fluoreszenz Mikroskops ausgezählt. Die Ki67-positiven Zellen wurde mit der Gesamtzahl der Zellen in der Basalschicht (DAPI gefärbte Zellen) korreliert. Jeweils 3 Gesichtsfelder wurden pro Probe ausgewertet.

3.8 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit dem Student T-Test durchgeführt. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM angezeigt.

4 Ergebnisse

4.1 Veränderung von TJ-Molekülen und Funktion in Psoriasis und die mögliche Beteiligung von $IL-1\beta$ und $TNF\alpha$

4.1.1 Lokalisation von TJ-Proteinen in Psoriasis

In Plaque-Psoriasis wurde bereits gezeigt, dass eine veränderte Lokalisation von TJ-Proteinen vorliegt (PUMMI *et al.*, 2001; YOSHIDA *et al.*, 2001; BRANDNER *et al.*, 2006; PELTONEN *et al.*, 2007; WATSON *et al.*, 2007). Um zu klären, ob dies eine späte Veränderung in der Psoriasis ist, z.B. aufgrund der Hyperproliferation und der veränderten Differenzierung der Keratinozyten, oder eine frühe Veränderung, die ggf. in der Pathogenese der Psoriasis eine Rolle spielen könnte, wurden in der Doktorarbeit von Claudia Pötzl (in Vorbereitung) die Lokalisation von TJ-Proteinen in gesunder Haut mit der Frühform- und der Plaque-Psoriasis verglichen. Die dort gefundenen Ergebnisse konnten

in dieser Arbeit bestätigt werden:

Occludin war in gesunder Haut an den lateralen Seiten der Plasmamembran der Granularzellen lokalisiert. ZO-1 und Cldn4 waren ebenfalls an der lateralen Plasmamembran angereichert, aber sie wurden auch an der gesamten Membran der oberen Zellen der Epidermis beobachtet (Abbildung 4.1.1A-C). In der frühen Phase der Psoriasis aber auch in der Plaque-Psoriasis wurde eine verbreiterte Expression von den Proteinen Occludin, ZO-1 und Cldn4 beobachtet. In der Plaque-Psoriasis kam Cldn4 allerdings hauptsächlich im Zytoplasma vor (Abbildung 4.1.1D-I).

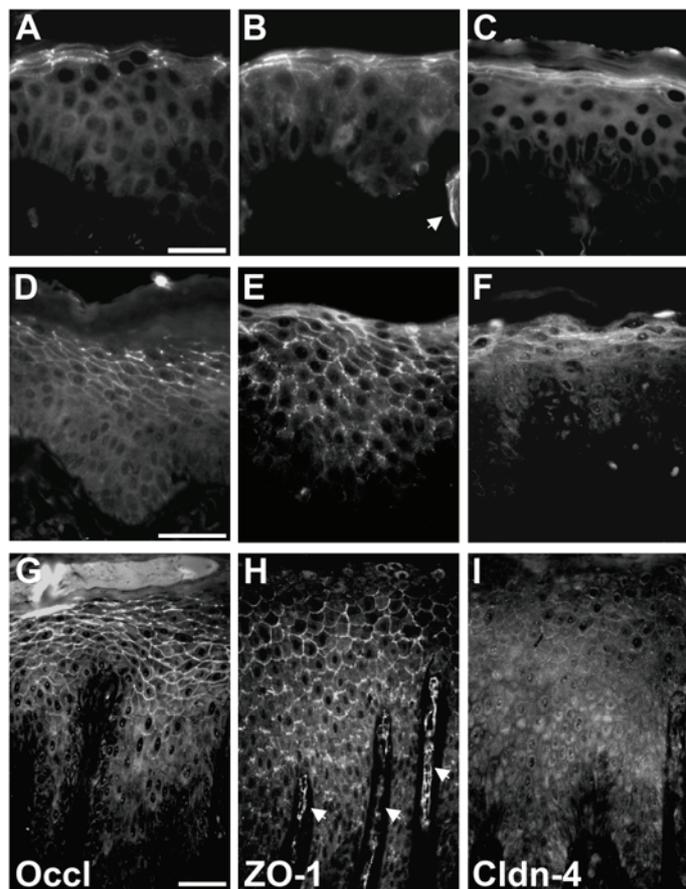


Abbildung 4.1.1: Lokalisation von Occludin, ZO-1 und Cldn4. Immunfluoreszenz-Lokalisation von Occl (A, D, G), ZO-1 (B, E, H) und Cldn4 (C, F, I) in normaler Haut (A, B, C), in der frühen Phase (D, E, F) und in Plaque (G, H, I) Psoriasis. Verbreiterte Lokalisation von Occl und ZO-1 in Psoriasis. Pfeile: Blutgefäße positiv für TJ-Proteine. Maßstab: (A-C): 20 μ m, (D-I): 50 μ m.

Das Protein Cldn1, das normalerweise in allen Schichten der Epidermis vorkommt, zeigte eine verminderte Expression, vor allem in den oberen aber auch in den unteren Schichten der Epidermis der frühen Phase der Psoriasis (Abbildung 4.1.2A, C). In Plaque-Psoriasis wurde für Cldn1 häufig eine komplette Herunterregulation gefunden (Abbildung 4.1.2E). Es gibt aber auch Fälle, bei denen die Cldn1-Färbung auch in Plaque-Psoriasis sehr intensiv ist, allerdings mit Ausnahme der oberen und unteren Schichten.

JAM-A ist ebenfalls in allen lebenden Schichten der gesunden Epidermis zu finden (Abbildung 4.1.2B). In den beiden Psoriasis-Formen wurden bis auf eine ganz leichte Herunterregulation in den obersten Schichten keine Veränderungen gefunden (Abbildung 4.1.2D, F).

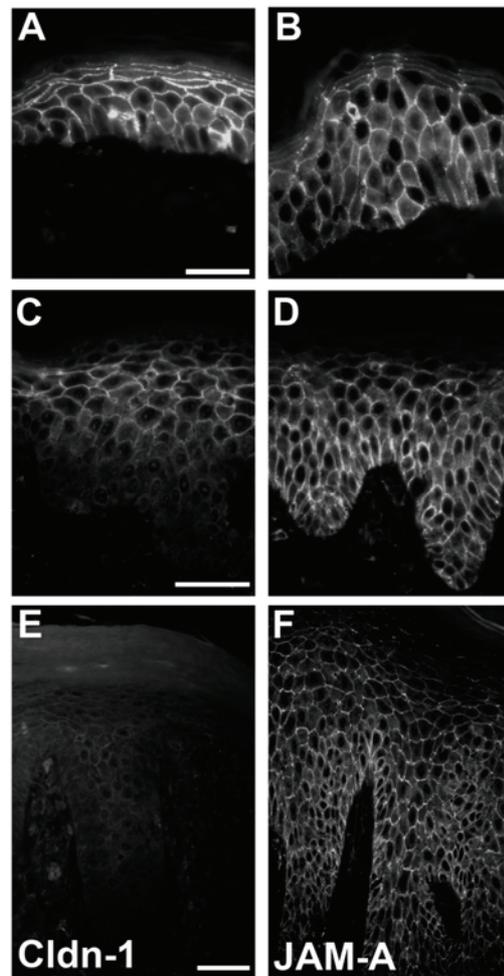


Abbildung 4.1.2: Lokalisation von Cldn1, Cldn7 und JAM-A. Immunofluoreszenz Lokalisation von Cldn1 (A, C, E) und JAM-A (B, D, F) in normaler Haut (A, B), der frühen Phase (C, D) und Plaque (E, F) Psoriasis. Herunterregulation von Cldn1 in unteren und oberen Schichten der Epidermis der frühen Phase der Psoriasis mit weiterer Herunterregulation in der Plaque-Psoriasis. Maßstab: (A, B): 20 µm, (C-F): 50 µm.

4.1.2 Nachweis der mRNA von TJ-Proteinen in psoriatischer Haut

Um den Nachweis der verschiedenen TJ-Proteine in psoriatischer Haut auch auf mRNA-Ebene zu bestätigen, wurde mittels RT-PCR die Anwesenheit der mRNA der TJ-Proteine Occludin, ZO-1, Cldn1, Cldn4, Cldn7 und JAM-A in gesunder und psoriatischer Haut untersucht. Abbildung 4.1.3A zeigt, dass die mRNA aller untersuchten TJ-Proteine in der Haut von Psoriatikern exprimiert werden. Eine Quantifizierung mittels *Real-time* PCR bestätigte einen erhöhten Gehalt von Occludin und ZO-1 mRNA in psoriatischer Haut im Vergleich zu normaler Haut. Cldn1 wurde auf mRNA-Ebene in psoriatischer Haut erniedrigt gefunden, während es für Cldn4, Cldn7 und JAM-A keine Veränderungen gab (Abbildung 4.1.3B).

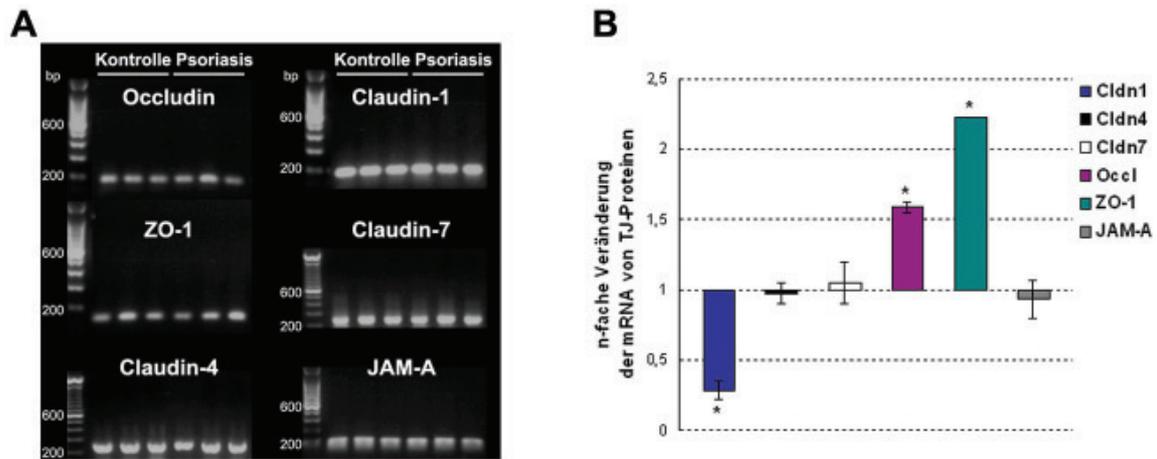


Abbildung 4.1.3: Expression und Quantifizierung der mRNA von verschiedenen TJ-Proteinen in gesunder und in psoriatischer Haut. (A) Nachweis der angezeigten TJ-Proteine in gesunder und psoriatischer Haut (n=3) mittels RT-PCR und Agarose-Gelelektrophorese. (B) *Real-time* PCR des Cldn1, Cldn4, Cldn7, Occludin, ZO-1 und JAM-A mRNA Expressionsniveaus. Die Werte sind als n-fache Veränderung im Vergleich von psoriatischer Haut zu normaler Haut angezeigt (Mittelwerte \pm SEM; n=3). * $p < 0.05$.

4.1.3 TJ-Barrierefunktion in *ex vivo* psoriatischer Haut

Die TJ-Barrierefunktion kann in der Epidermis *in vivo* mittels eines biotinylierten 557 Da *Tracers* (Biotinylierungsreagenz; BR) ermittelt werden. Bei einer intakten Barriere gelangt das BR, welches in die Dermis injiziert wurde, parazellulär vom *Stratum basale* bis zum *Stratum granulosum* (SG), wo es von den TJs, markiert durch Occludin, zurückgehalten wird. Ist die Barriere hingegen gestört, diffundiert das BR bis zum *Stratum corneum* (Furuse et al., 2002). Es stellte sich die Frage, ob die Veränderung der TJ-Proteine zu einer verbesserten TJ-Barrierefunktion führen, im Sinne eines „Rettungsmechanismus“ für die beeinträchtigte *Stratum corneum* Barriere, oder ob sie ein Zeichen für eine eingeschränkte TJ-Barrierefunktion ist. Deshalb wurde die TJ-Barrierefunktion in psoriatischer Haut mittels des 557 Da Diffusions-*Tracers* im Vergleich zu gesunder Haut untersucht. In *ex vivo* Hautmodellen von psoriatischer Haut wurde der *Tracer* in die Dermis injiziert und nach 30-minütiger Inkubation detektiert. In der gesunden Haut konnte der *Tracer* im Extrazellularraum bis in die oberste lebende Schicht (SG) diffundieren und wurde dort an TJs gestoppt (Abbildung 4.1.4A). In psoriatischer Haut sah man deutlich die verbreiterte Expression von Occludin. Der *Tracer* wurde auch hier an TJ-Strukturen, markiert durch Occludin, gestoppt. Im Gegensatz zu normaler Haut war dieser Stopp aber nicht in der obersten lebenden Schicht der Epidermis lokalisiert, sondern tiefer (Abbildung 4.1.4B). Es handelte sich bei den für diese Versuche verwendeten Proben um psoriatische Proben, in denen Cldn1 noch vorhanden war, mit Ausnahme einer teilweisen Herunterregulation in den obersten und untersten Schichten. Dennoch konnte auch hier ein Stopp des *Tracers* an Cldn1-positiven Bereichen beobachtet werden (Abbildung

4.1.4C). Die Kolokalisation zwischen Cldn1 und Occludin war in mehreren Schichten zu finden (Abbildung 4.1.4D).

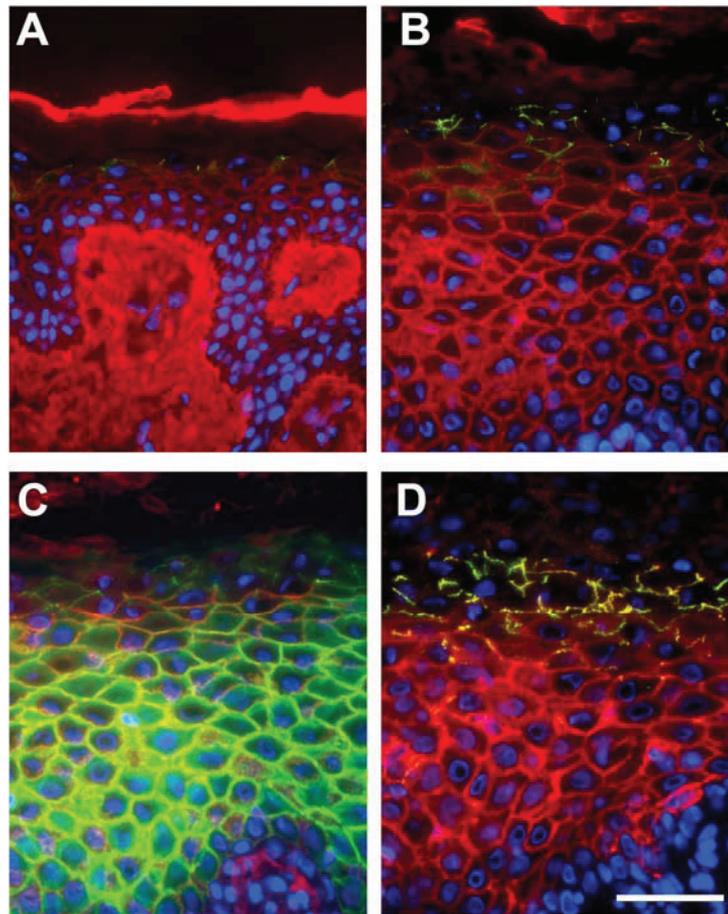


Abbildung 4.1.4: Barriere Biotin-Assay in psoriatischer Haut. Biotin wurde in die Dermis von gesunden (A) und psoriatischen Hautstanzen (B-D) injiziert und 30 min inkubiert. Auf Schnitten wurde mittels Immunfluoreszenz-Färbung die Diffusion des Tracers markiert. Überlagerte Epifluoreszenz-Aufnahmen (A und B) rot: Biotin; grün: Occludin; blau: DAPI; (C) rot: Biotin; grün: Cldn1; blau: DAPI; (D) rot: Cldn1; grün: Occl; blau: DAPI. Maßstab: 50 µm.

4.1.4 Einfluss von IL-1 β und TNF α auf die TJ-Proteinexpression in *ex vivo* Hautmodellen

Es ist bekannt, dass in psoriatischer Haut Keratinozyten aber auch Entzündungszellen erhöhte Mengen an IL-1 β und TNF α produzieren (COOPER *et al.*, 1990; ETTEHADI *et al.*, 1994; YOSHINAGA *et al.*, 1995; SCHOTTELIUS *et al.*, 2004). Deshalb wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Lokalisation und Expression von Occludin, ZO-1 und Cldn1 durch IL-1 β und TNF α beeinflusst werden können. Für diese Untersuchung wurden 50 µl der jeweiligen Zytokin-Lösung (100 ng/ml oder 1 µg/ml) in *ex vivo* Hautmodelle injiziert und für 30 min, 60 min, 6 h und 24 h inkubiert. In porcinen *ex vivo* Hautmodellen traten 24 h nach Behandlung sowohl mit 100 ng/ml als auch mit 1 µg/ml IL-1 β die Proteine Occludin und ZO-1 in verbreiteter Lokalisation auf (Abbildung 4.1.5A-F). Die Injektion von 100 ng/ml

IL-1 β verursachte keine Veränderung in der Cldn1 Intensität, dagegen führte die Injektion von 1 $\mu\text{g/ml}$ in einigen Bereichen zu einer Herunterregulation (Abbildung 4.1.5G, H), während andere Bereiche keine Veränderung zeigten. Western-Blot-Analysen bestätigten die Hochregulation von ZO-1, während die Proteinexpression von Cldn1 unverändert blieb (Abbildung 4.1.5J). Diese Ergebnisse konnten auch in menschlichen *ex vivo* Modellen bestätigt werden (Abbildung 4.1.5K für Western-Blot-Analyse).

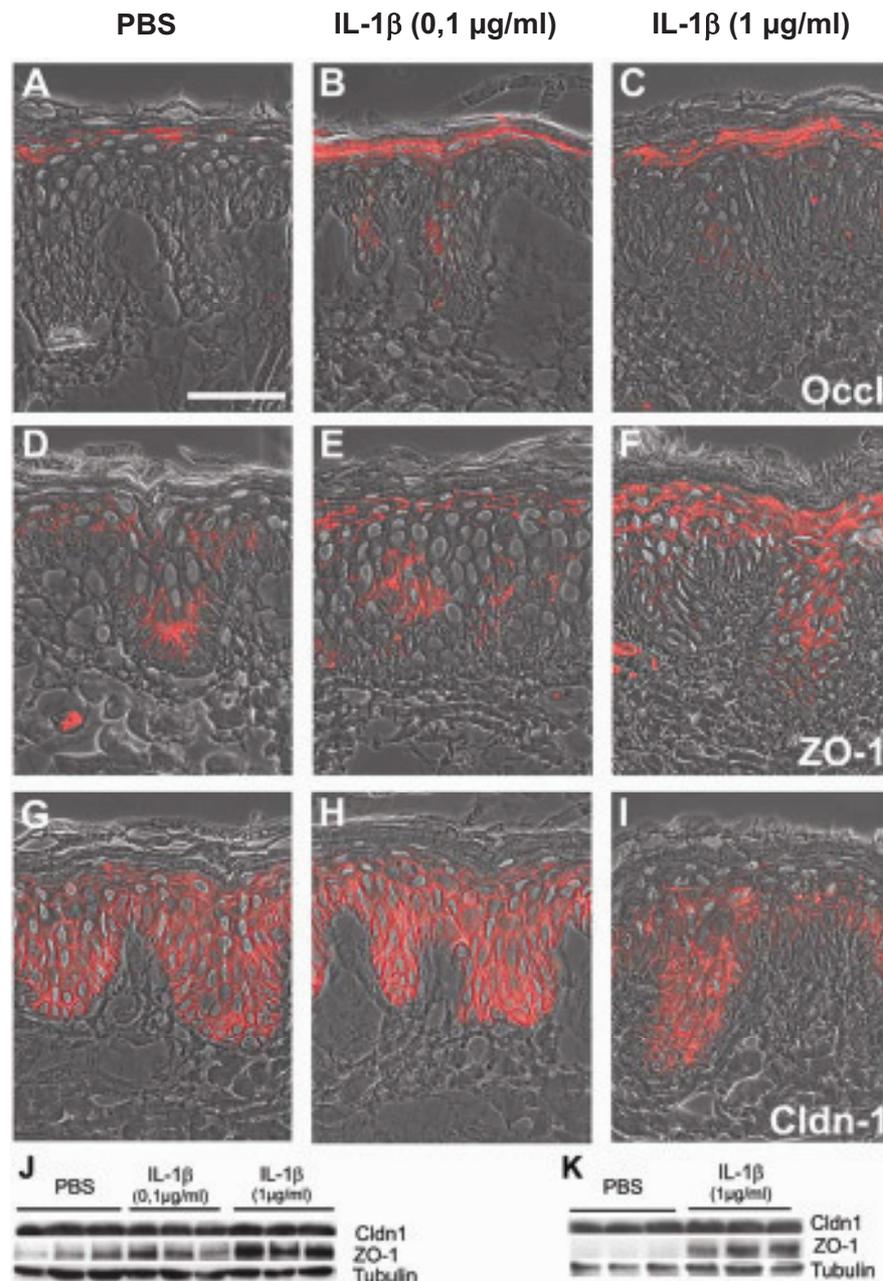


Abbildung 4.1.5: Einfluss von IL-1 β auf die Lokalisation und die Proteinmenge von TJ-Proteinen 24 h nach der Injektion in *ex vivo* Hautmodelle. PBS (A, D, G), 0.1 $\mu\text{g/ml}$ IL-1 β (B, E, H) und 1 $\mu\text{g/ml}$ IL-1 β (C, F, I) wurden in porcine *ex vivo* Hautmodelle injiziert (n=9). (A-I) Immunfluoreszenz-Färbung der Modelle 24 h nach der Zytokin Injektion (A-C: Occl, D-F: ZO-1, G-I: Cldn1; Überlagerung von Epifluoreszenz- und Phasenkontrast-Aufnahmen) (J, K) Western-Blot-Analysen mit porcinen (J) und humanen (K) *ex vivo* Modellen. Maßstab: 50 μm .

Um zu überprüfen, ob die Veränderungen der TJ-Proteine auch hier als ein frühes Ereignis auftreten, wurde die Untersuchung ebenfalls für 30 min, 60 min und 6 h durchgeführt. Zu diesen Zeitpunkten konnte ebenfalls eine verbreiterte Expression von Occludin und ZO-1 nachgewiesen werden, allerdings nicht so stark ausgeprägt wie nach 24 h. Exemplarisch wird hier die Inkubation nach 60 min dargestellt (Abbildung 4.1.6).

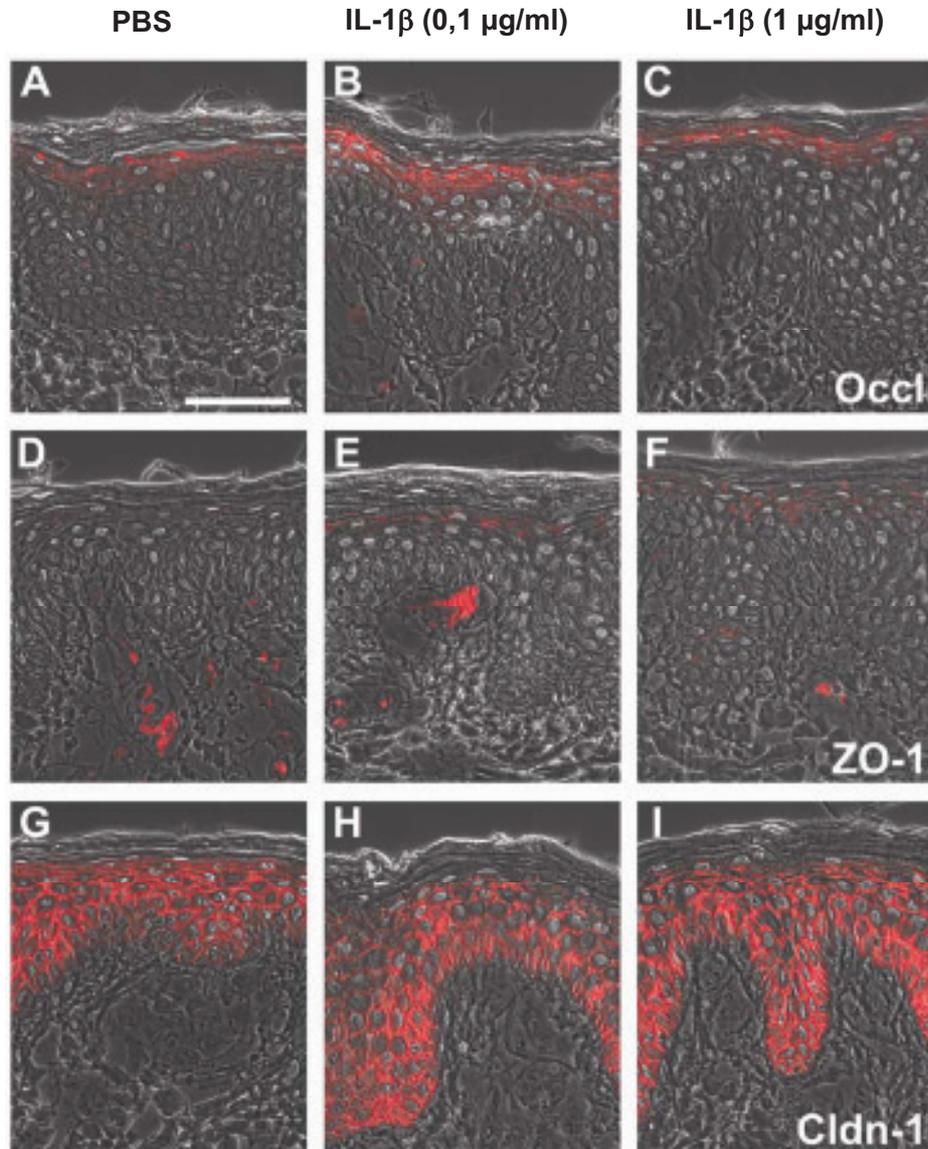


Abbildung 4.1.6: Einfluss von IL-1 β auf die Lokalisation von TJ-Proteinen 60 min nach Injektion in *ex vivo* Hautmodelle. PBS (A, D, G), 0.1 $\mu\text{g/ml}$ IL-1 β (B, E, H) und 1 $\mu\text{g/ml}$ IL-1 β (C, F, I) wurden in porcine *ex vivo* Hautmodelle injiziert (n=9). (A-I) Immunfluoreszenz-Färbung der Modelle 60 min nach der Zytokin Injektion (A-C: Occl, D-F: ZO-1, G-I: Cldn1; Überlagerung von Epifluoreszenz- und Phasenkontrast-Aufnahmen). Maßstab: 50 μm .

Nach Injektion von TNF α war zu den frühen Zeitpunkten (30 min, 60 min, 6 h) nur eine leicht verstärkte Expression von Occludin zum Zeitpunkt 6 h zusehen (Abbildung nicht gezeigt). Jedoch 24 h nach Injektion zeigte Occludin eine ausgeprägte verbreiterte

Expression, dies galt auch ganz leicht für ZO-1. Für Cldn1 wurde eine leicht verminderte Expression in den oberen Schichten nachgewiesen (Abbildung 4.1.7A-F). Die Western-Blot-Analysen zeigten auf Proteinebene eine leichte Herunterregulation von Cldn1 und eine leicht verstärkte Expression von ZO-1 (Abbildung 4.1.7G).

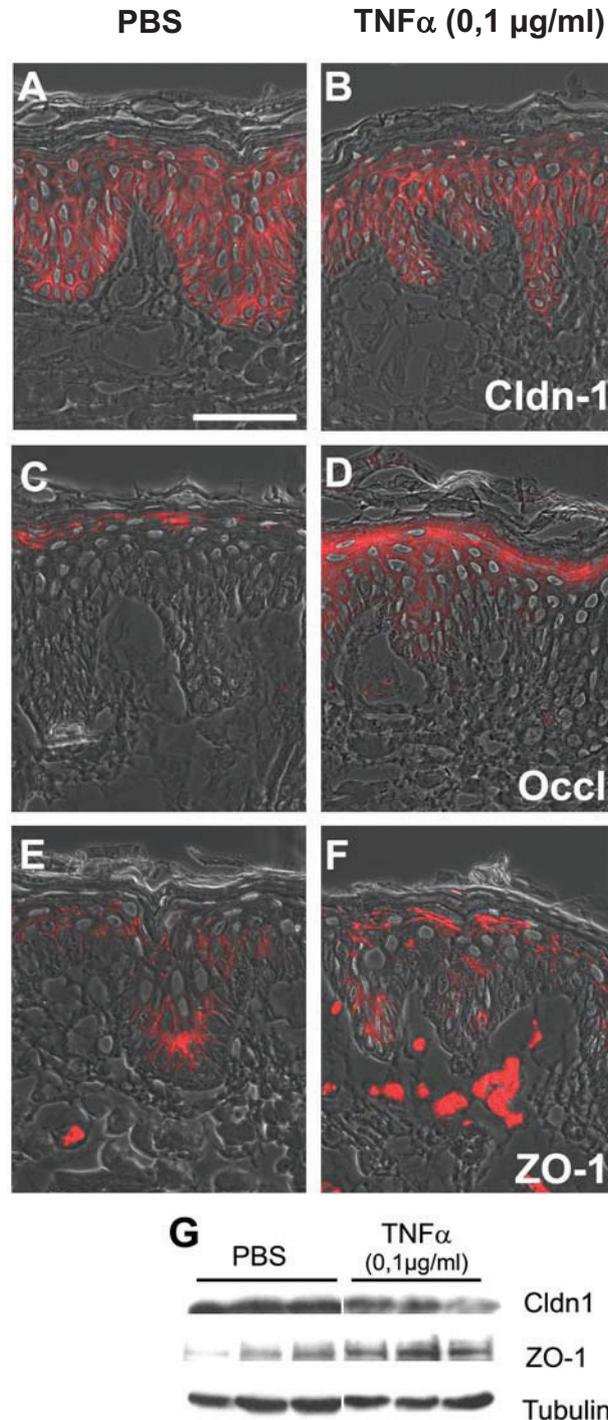


Abbildung 4.1.7: Einfluss von $\text{TNF}\alpha$ auf die Lokalisation und die Proteinmenge von TJ-Proteinen 24 h nach der Injektion in *ex vivo* Hautmodelle. PBS (A, C, E) und $0,1 \mu\text{g/ml}$ $\text{TNF}\alpha$ (B, D, F) wurden in porcine *ex vivo* Hautmodelle injiziert (n=9). (A-F) Immunfluoreszenz-Färbung der Modelle 24 h nach der Zytokin Injektion (A, B: Cldn1, C, D: Occl, E, F: ZO-1; Überlagerung von Epifluoreszenz- und Phasenkontrast-Aufnahmen). (G) Western-Blot-Analysen mit porcinen *ex vivo* Modellen. Maßstab: 50 μm .

4.1.5 Korrelation der Veränderung von TJ-Proteinen mit Differenzierung und Proliferation

Psoriatische Plaques sind charakterisiert durch Veränderungen des Differenzierungsmusters und einem erhöhten proliferativem Index von Keratinozyten. Es galt die Frage zu klären, ob die Veränderungen der Expression und Lokalisation von TJ-Proteinen in Psoriasis und nach Behandlung von IL-1 β und TNF α eine Konsequenz von Veränderungen in Differenzierung und Proliferation sind oder diesen vorausgehen. Dazu wurden in psoriatischer Haut und in den *ex vivo* Hautmodellen parallel zu den TJ-Proteinen die Differenzierungs-Marker Involucrin und Filaggrin und die Zellproliferation durch Anwesenheit von Ki67 untersucht. Dabei konnte eine Veränderung der Expression von Involucrin und Filaggrin bereits in der frühen Phase der Psoriasis nachgewiesen werden, die sich weitaus stärker in der Plaque-Psoriasis zeigte. Auch der proliferative Index war in beiden Phasen der Psoriasis erhöht. Infolgedessen herrscht in der frühen Phase der Psoriasis eine Veränderung der TJ-Proteine, epidermaler Differenzierung und Proliferation (Abbildung 4.1.8) und man kann aus diesen Untersuchungen keine Aussage über die zeitliche Abfolge der Veränderungen machen.

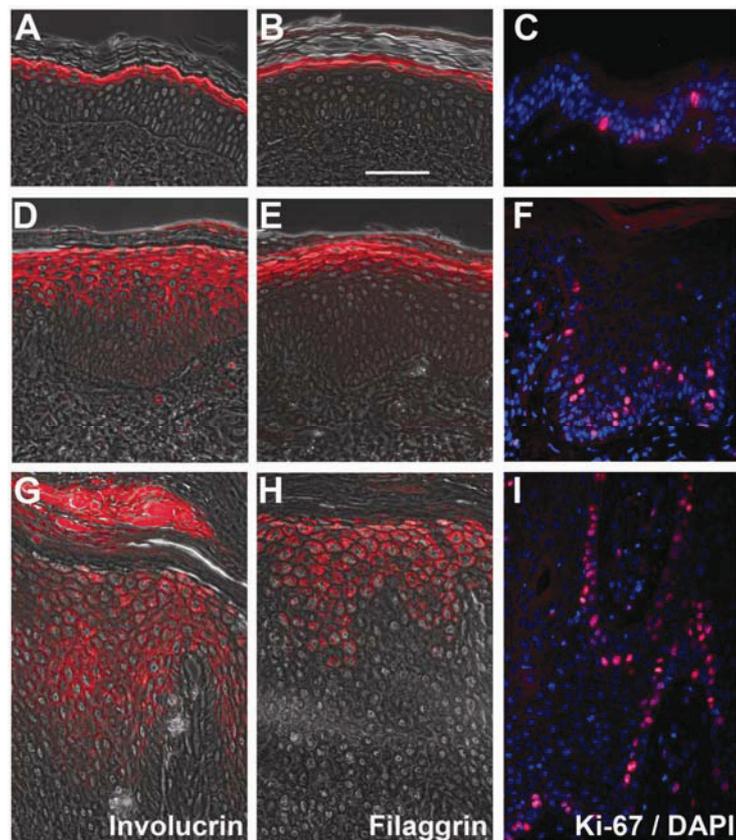


Abbildung 4.1.8: Differenzierung und proliferativer Index in der Frühform- und der Plaque-Psoriasis. Lokalisation von Involucrin (rot: A, D, G), Filaggrin (rot: B, E, H) und Ki-67 (rot: C, F, I) in normaler Haut (A, B, C), sowie in der frühen Phase (D, E, F) und in Plaque (G, H, I) Psoriasis. (A, B, D, E, G, H) Überlagerung von Epifluoreszenz- und Phasenkontrast-Aufnahmen. (C, F, I) Überlagerung von Epifluoreszenz-Aufnahmen von Ki-67 (rot) und DAPI (blau). Maßstab: 50 μ m.

Jedoch war eine Aussage über die zeitliche Abfolge der Veränderungen mit den *ex vivo* Modellen möglich. Die immunhistochemischen Färbungen der *ex vivo* Modelle zeigten 30 min, 60 min, 6 h und 24 h nach Injektion weder eine Veränderung in der Lokalisation und Intensität von Involukrin und Filaggrin noch im proliferativem Index, obwohl hier Veränderungen von TJ-Proteinen bereits zu finden waren (Abbildung 4.1.9A-G). Die Abbildung 4.1.9 zeigt exemplarisch die Färbungen von Modellen 60 min nach Zytokin-Injektion und die Werte des proliferativen Index von 30 min bis 24 h nach Injektion.

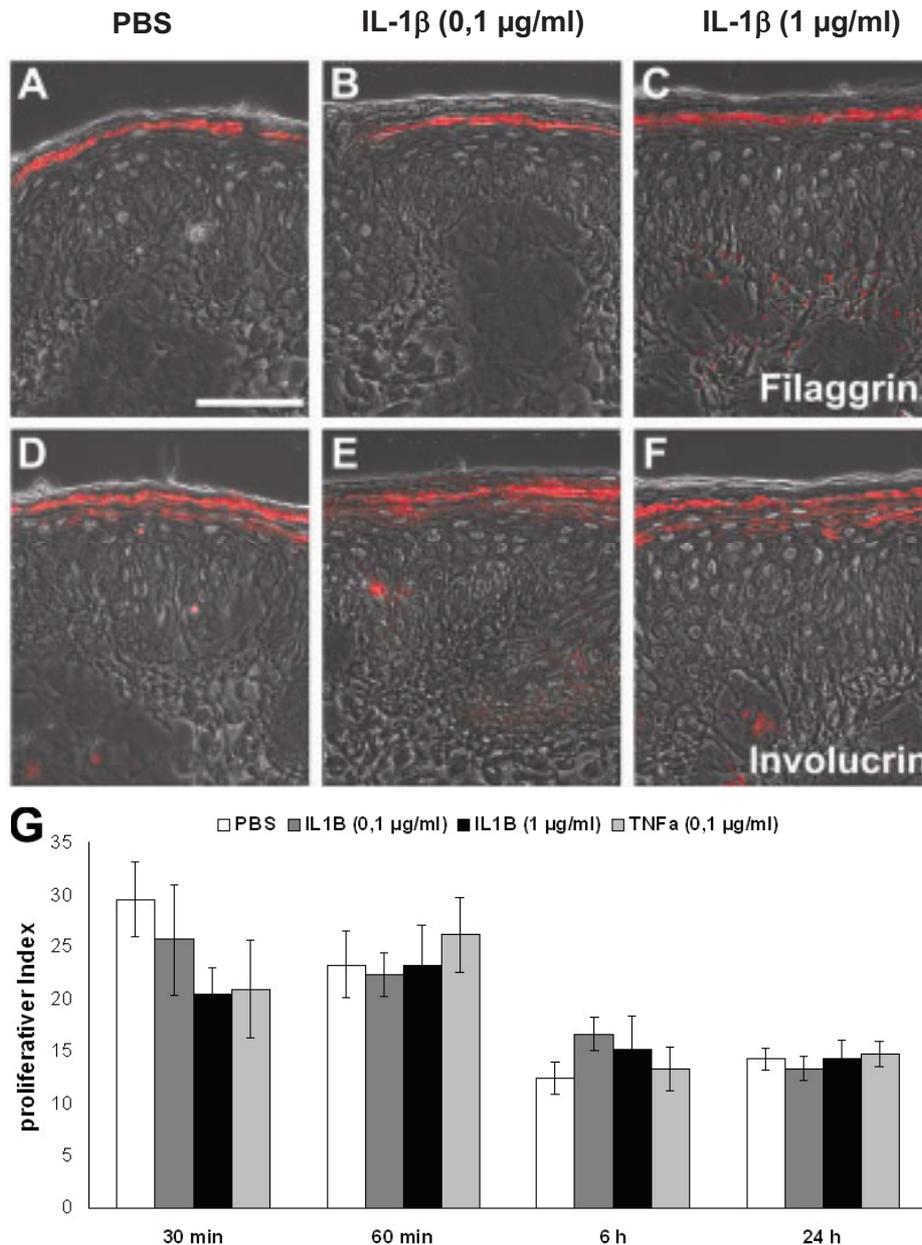


Abbildung 4.1.9: Einfluß von IL-1 β und TNF α auf Differenzierung und den proliferativen Index. PBS (A, D), 0,1 μ g/ml IL-1 β (B, E) und 1 μ g/ml IL-1 β (C, F) wurden in porcine *ex vivo* Hautmodelle injiziert (n=9). (A-I) Immunfluoreszenz-Färbung der Modelle 60 min nach der Zytokin Injektion (A-C: Filaggrin; D-F: Involucrin; Überlagerung von Epifluoreszenz- und Phasenkontrast-Aufnahmen). Maßstab: 50 μ m. (G) Proliferativer Index der Epidermis der Hautmodelle zu den angezeigten Zeitpunkten. PBS (weiß), 0,1 μ g/ml IL-1 β (dunkelgrau) oder 1 μ g/ml IL-1 β (schwarz) und 0,1 μ g/ml TNF α (hellgrau). (Mittelwerte \pm SEM; n=3).

4.1.6 Einfluss von IL-1 β und TNF α auf die TJ-Funktion in Keratinozyten

Um den Einfluss von Zytokinen auf die Funktionalität von TJs zu untersuchen, wurden humane primäre Keratinozyten mit IL-1 β und TNF α behandelt. Dabei konnte festgestellt werden, dass IL-1 β eine konzentrations- und zeitabhängige Erhöhung und Erniedrigung des Transepithelialen Widerstandes (TER) hervorrief. 24 h nach Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration (Ca²⁺-Switch) und damit der Induktion der Bildung von Zell-Zell-Verbindungen und IL-1 β -Behandlung stieg der TER im Vergleich zur Kontrolle an. Dieser Anstieg war stärker ausgeprägt, wenn 100 ng/ml statt 1 ng/ml eingesetzt wurden. Zu späteren Zeitpunkten (72 h und 96 h) war der TER nach IL-1 β -Behandlung im Vergleich zur Kontrolle signifikant erniedrigt. Hier war der Effekt ebenfalls stärker ausgeprägt durch die Behandlung mit 100 ng/ml IL-1 β (Abbildung 4.1.10A, B). Es konnten keine Unterschiede zwischen der apikalen und der basalen Applikation von IL-1 β festgestellt werden (Abbildung 4.1.10B, C). Auch TNF α zeigte einen biphasischen Effekt. Der TER zeigte eine Erhöhung bei 24 h und eine Erniedrigung zu den späteren Zeitpunkten (Abbildung 4.1.10D).

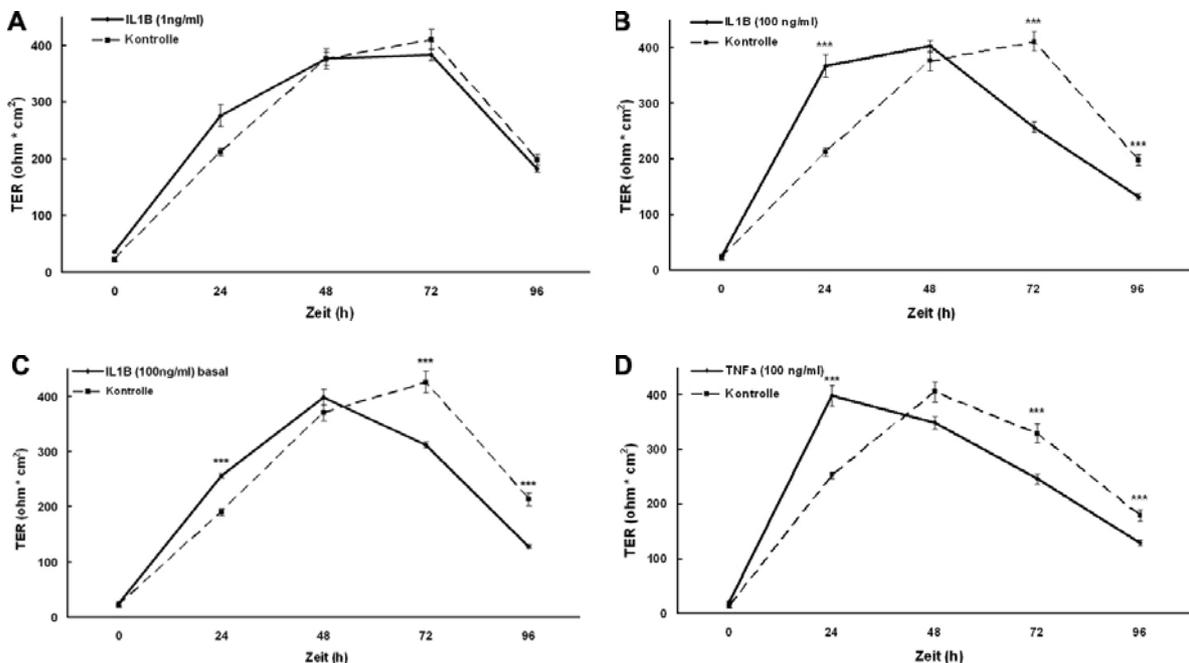


Abbildung 4.1.10: Einfluss von IL-1 β und TNF α auf die TJ-Funktionalität in kultivierten Keratinozyten. Transepithelialer Widerstand (TER) von kultivierten Keratinozyten nach Ca²⁺-switch und Inkubation mit 1 ng/ml IL-1 β (A), 100 ng/ml IL-1 β apikal zugegeben (B), 100 ng/ml IL-1 β basal zugegeben (C) und 100 ng/ml TNF α apikal zugegeben (D). ***: Signifikante Unterschiede (p<0.05) zwischen Kontrolle und IL-1 β - oder TNF α -behandelten Zellen (Mittelwerte \pm SEM; n=9).

Des Weiteren wurden die Zytokine zu bereits ausgebildeten Tight Junctions gegeben. Als Richtwert wurde dafür ein TER von ca. $350 \Omega \cdot \text{cm}^2$ verwendet. Die Behandlung mit IL-1 β führte dabei zu keiner Veränderung des TERs, dahingegen ließ die TNF α -Behandlung den TER signifikant ansteigen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abbildung 4.1.11A, B).

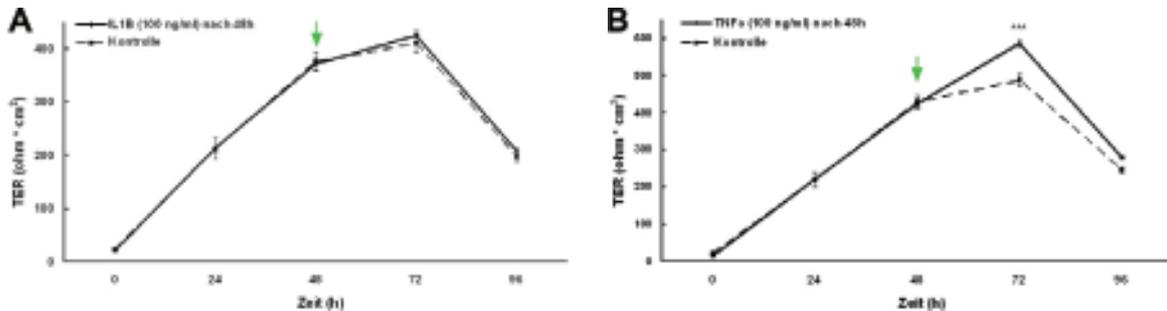


Abbildung 4.1.11: Einfluss von IL-1 β und TNF α auf die TJ-Funktionalität in kultivierten Keratinozyten. IL-1 β (A) und TNF α (B) wurden 48 h nach Ca²⁺-switch appliziert. TNF α zeigt einen Effekt auf Zellen mit bereits ausgebildeten TJs. ***: Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen Kontrolle und IL-1 β - oder TNF α -behandelten Zellen. Pfeile zeigen den Zeitpunkt der Zytokingabe an (Mittelwerte \pm SEM; $n=9$).

4.1.7 IL-1 β beeinflusst die Lokalisation und Expression von TJ-Proteinen in kultivierten Keratinozyten

Um zu klären, welche molekularen Mechanismen zu den Veränderungen des TERs in IL-1 β -behandelten Keratinozyten führen, wurde die Lokalisation verschiedener TJ-Proteine sowie ihre Expression auf Protein- und mRNA-Ebene zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Immunfluoreszenzfärbungen von Keratinozyten nach 24-stündigem Ca²⁺-switch und IL-1 β -Behandlung zeigten eine verstärkte Immunlokalisation von Cldn1 und Cldn4 im Zytoplasma und eine durchgängigere Färbung für beide Proteine an den Zell-Zell-Kontakten. Für die Proteine ZO-1 und Occludin konnte ebenfalls nach 24 h eine intensivere und durchgängigere Färbung an den Zell-Zell-Kontakten detektiert werden. Somit geht der ansteigende TER mit einer verstärkten Intensität von Claudinen, ZO-1 und Occludin an den Zell-Zell-Kontakten einher.

Nach 96 h Ca²⁺-switch und IL-1 β -Behandlung war Cldn1 im Vergleich zur Kontrolle vermindert an den Zell-Zell-Kontakten zu finden, während Cldn4 unverändert an den Zell-Zell-Kontakten lokalisiert war, aber eine leicht stärkere zytoplasmatische Verteilung in den behandelten Zellen zeigte. Nach 72 h Ca²⁺-switch und IL-1 β -Behandlung wurde eine verminderte Intensität für Occludin festgestellt und nach 96 h Ca²⁺-switch und IL-1 β -Behandlung war neben Occludin auch ZO-1 im Vergleich zur Kontrolle vermindert an den Zell-Zell-Kontakten zu finden (Abbildung 4.1.12).

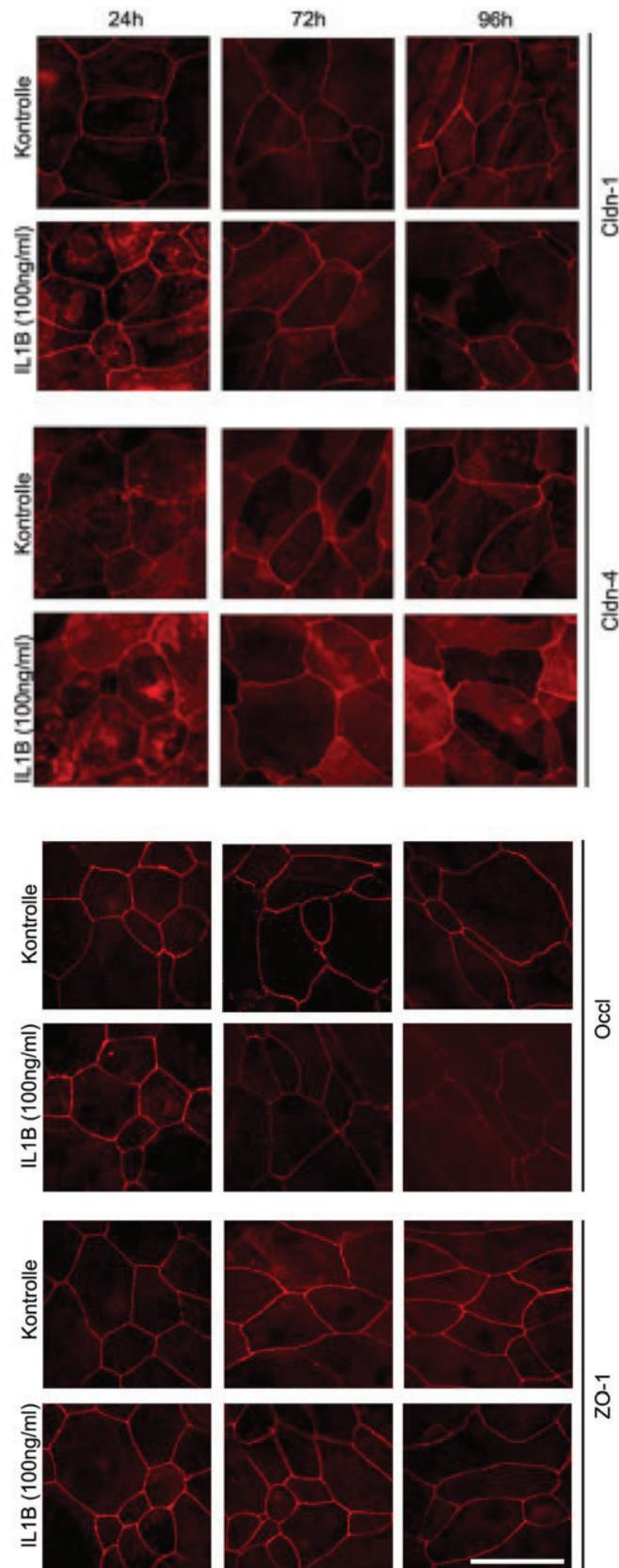


Abbildung 4.1.12: Einfluss von IL-1 β auf die Lokalisation von TJ-Proteinen in kultivierten Keratinozyten. Epifluoreszenz-Aufnahmen von Cldn1, Cldn4, Occl und ZO-1 in kultivierten Keratinozyten zu den angezeigten Zeitpunkten nach Ca²⁺-switch und Applikation von IL-1 β . Maßstab: 20 μ m.

In der Proteinexpression konnten nach 24 h keine Unterschiede festgestellt werden, während zu den späten Zeitpunkten (72 h und 96 h) für Cldn1, Occludin und schwach auch für ZO-1 eine verminderte Proteinexpression nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4.1.13). Hiermit konnte gezeigt werden, dass der verminderte TER zu späten Zeitpunkten mit einer Verminderung der Proteinmenge für Cldn1 und Occludin, und teilweise auch ZO-1 einhergeht.

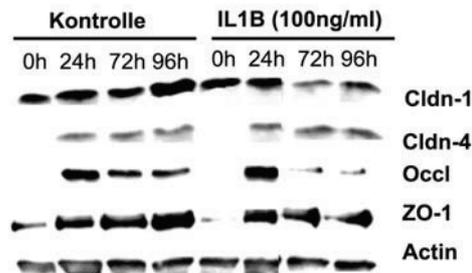
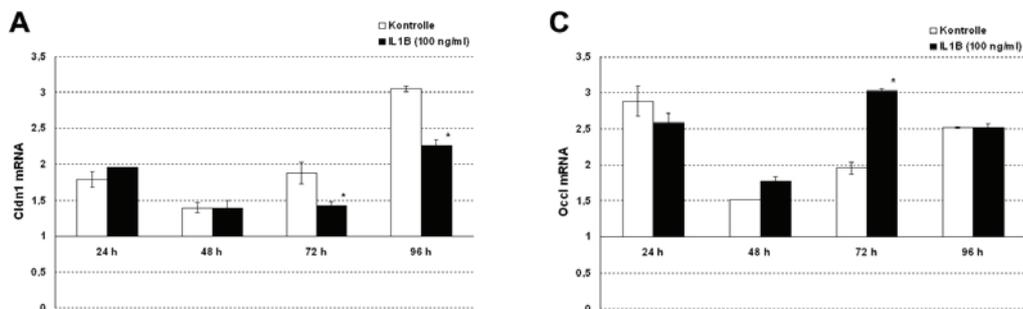


Abbildung 4.1.13: Einfluss von IL-1 β auf die Expression von TJ-Proteinen in kultivierten Keratinozyten. Western-Blot-Analysen von Keratinozyten 24 h, 72 h und 96 h nach Ca²⁺-switch ohne (links; Kontrolle) und mit (rechts) Applikation von 100 ng/ml IL-1 β (IL1B). Gleiche Proteinmengen wurden mittels SDS-PAGE separiert und mit einem Immunoblot wurden die angezeigten Proteinen detektiert. Actin diente als Gelbeladungskontrolle.

Auf mRNA-Ebene wurde zunächst ein signifikant erhöhter Cldn4 mRNA-Gehalt nach 24-stündiger IL-1 β -Behandlung gefunden, während die anderen Moleküle nur geringe Unterschiede zeigten. 72 h nach Behandlung wurde ein signifikant erhöhter Gehalt von Cldn4, ZO-1 und Occludin mRNA festgestellt, dagegen zeigte sich für Cldn1 mRNA ein signifikant erniedrigter Gehalt im Vergleich zur Kontrolle. Nach 96 h IL-1 β -Behandlung konnte lediglich ein signifikant erniedrigter Gehalt von Cldn1 mRNA nachgewiesen werden (Abbildung 4.1.14).



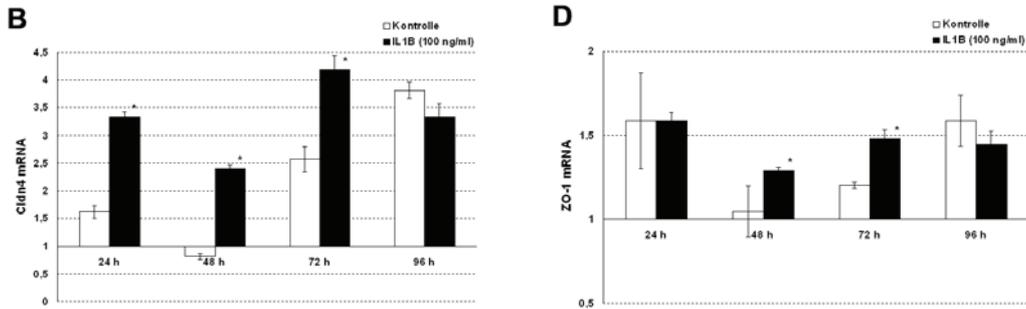


Abbildung 4.1.14: Einfluss von IL-1 β auf die mRNA Expression von TJ-Proteinen in kultivierten Keratinozyten. Transkriptionsunterschiede von (A) Cldn1, (B) Cldn4, (C) Occl und (D) ZO-1 zwischen Zellen mit und ohne Behandlung mit IL-1 β (IL1B) zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Werte sind als n-fache Veränderung zwischen den angegebenen Zeitpunkten zu dem Zeitpunkt 0 h angezeigt (Mittelwerte \pm SEM; n=3). * p<0.05 (Vergleich zwischen IL-1 β -behandelten und nicht-behandelten Zellen).

4.1.8 IL-1 β und TNF α haben keinen Einfluß auf die Proliferation in kultivierten Keratinozyten

Um zu prüfen, ob der veränderte TER nach Applikation von IL-1 β und TNF α durch eine veränderte Proliferation der Zellen und damit eine veränderte Zelldichte bedingt sein könnte, wurden Proliferationsstudien an Keratinozyten im Hoch-Ca²⁺-Medium mit Hilfe eines Proliferations-Assays durchgeführt. Der Assay beruht auf der Basis, dass ein Tetrazoliumsalz durch mitochondriale Dehydrogenasen zu Formazan, ein rotes lösliches Produkt, reduziert werden kann. Dieses Formazan ist proportional zu der Anzahl lebender Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Proliferation nach Behandlung mit den Zytokinen IL-1 β und TNF α in Keratinozyten nicht verändert (Abbildung 4.1.15). Dieses Resultat lässt darauf schließen, dass die Veränderungen der TJ-Proteine und Funktion nicht von Veränderungen in Proliferation abhängen.

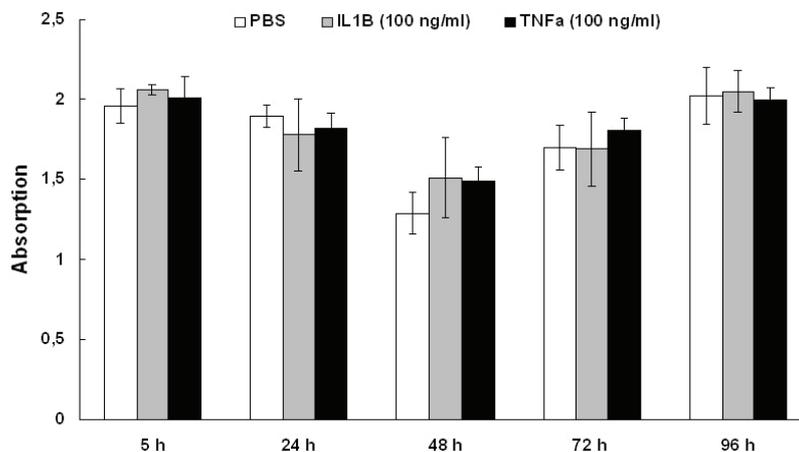


Abbildung 4.1.15: Einfluß von IL-1 β und TNF α auf die Proliferation von kultivierten Keratinozyten. Proliferation von kultivierten Keratinozyten inkubiert mit PBS (weiß), 100 ng/ml IL-1 β (hellgrau) oder 100 ng/ml TNF α (schwarz) für 5 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Ca²⁺-switch mittels Absorption gemessen (Mittelwerte \pm SEM; n=3).

4.2 Regulation von CD44 beim Aufbau von Tight Junctions und der Barrierefunktion

Unter der Berücksichtigung, dass CD44 k/o Mäuse eine gestörte Barrierefunktion und einen Verlust der Zellpolarität nach Barrieredisruption aufweisen und dass aus einfachen Zylinderepithelien und Endothelien bekannt ist, dass TJs sehr wichtig sind für Barrierefunktion und Zellpolarität, soll die Frage geklärt werden, ob TJs am Haut-Phänotyp von CD44 k/o Mäusen beteiligt sind. Um die Auswirkungen einer CD44-Defizienz bei Mäusen auf die Anordnung und Funktion der TJs aufzuklären, wurde die aktive Barrierebildung in embryonaler Maushaut und Keratinozyten nach Ca^{2+} -Switch, verwendet. An den Tagen E17.5 und E18.5 wurden die Embryonen entnommen. Ein Embryonaltag (E) ist mit 0.5 definiert, da männliche und weibliche Mäuse über Nacht verpaart wurden und die Schwangerschaftstage am darauf folgenden Tag gezählt wurden. Beim Ca^{2+} -switch wurde die Ca^{2+} -Konzentration erhöht, d.h. von 70 μ M Ca^{2+} (Niedrig- Ca^{2+} -Medium) auf 1,8 mM Ca^{2+} (Hoch- Ca^{2+} -Medium), um die aktive Barrierebildung von Keratinozyten zu induzieren.

4.2.1 Der Verlust von CD44 verzögert die Ausbildung der aussen-nach-innen Barrierefunktion in embryonaler Epidermis

Zunächst wurde überprüft, ob die embryonale Epidermis denselben Haut-Phänotyp, eines verzögerten Barriereaufbaus zeigt, wie die adulte Haut nach einer Verletzung (BOURGUIGNON *et al.*, 2006). Die Differenzierung der normalen Maushaut in eine Epidermis mit vollständig ausgereifter Barriere erfolgt mit dem Embryonaltag E17.5. Andere Arbeiten zeigten bereits, dass WT Mäuse eine funktionelle Barriere am Tag E17.5 zeigen (KURAMOTO *et al.*, 2002; SEVILLA *et al.*, 2007). Aus diesem Grund wurden für die Untersuchung 17.5 und 18.5 Tage alte Embryonen herangezogen.

Mit dem Haut-Permeabilitäts-Assay (HARDMAN *et al.*, 1998) konnte gezeigt werden, dass die CD44 k/o Mäuse eine verzögerte Barriereausbildung während des Reifungsprozesses aufweisen. In Abbildung 4.2.1 ist zu erkennen, dass die CD44 k/o Embryonen am Tag E17.5 eine unvollständige Barriere aufweisen, im Gegensatz zu den WT Mäusen zeigen diese Mäuse eine starke Blaufärbung. Es handelt sich hier um eine verzögerte Barriereausbildung, da ab Tag E18.5 auch von den CD44 k/o Mäusen eine intakte Barriere ausgebildet wurde.

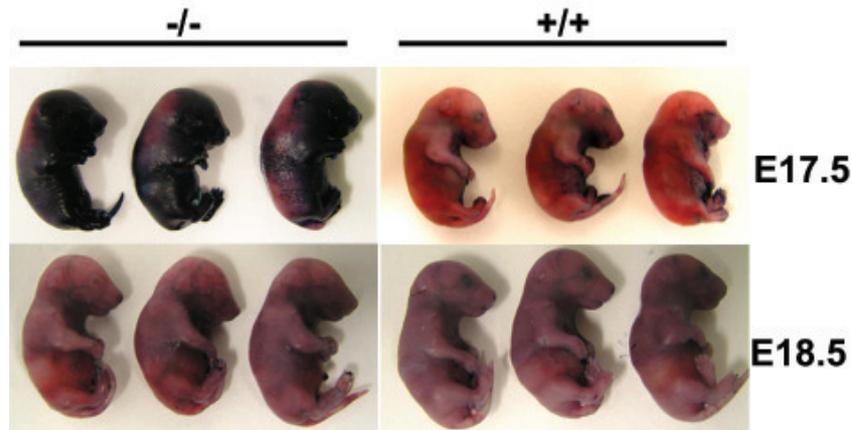


Abbildung 4.2.1: Verzögerte epidermale aussen-nach-innen Permeabilitäts-Barriere in CD44 k/o Mäusen zum Zeitpunkt E17.5. Haut-Permeabilitäts-Assay mittels Toluidinblau-Färbung an E17.5 und E18.5 k/o (-/-) und WT (+/+) Embryonen.

4.2.2 CD44-Defizienz beeinträchtigt die zelluläre Lokalisation der *Lamellar Bodies* in embryonaler Epidermis

Um die Verteilung der *Lamellar Bodies* (LBs) in der Haut der Embryonen (E17.5) darzustellen, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. In der Epidermis der WT Embryonen sind die LBs immer im apikalem Bereich der Zellen lokalisiert (Abbildung 4.2.2B, D). Im *Stratum spinosum* und *Stratum granulosum* der CD44 k/o Mäuse hingegen zeigen die Zellen eine unpolare Verteilung der LBs. Sie sind nicht nur auf den apikalen Teil der Zellen beschränkt, sondern konnten auch im basalem Bereich der Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 4.2.2A, C). Somit hat man einen Verlust der polaren Lokalisation von LBs während der Entwicklung der epidermalen Barriere in CD44 k/o Embryonen, vergleichend zur adulten Haut nach Barriere-disruption.

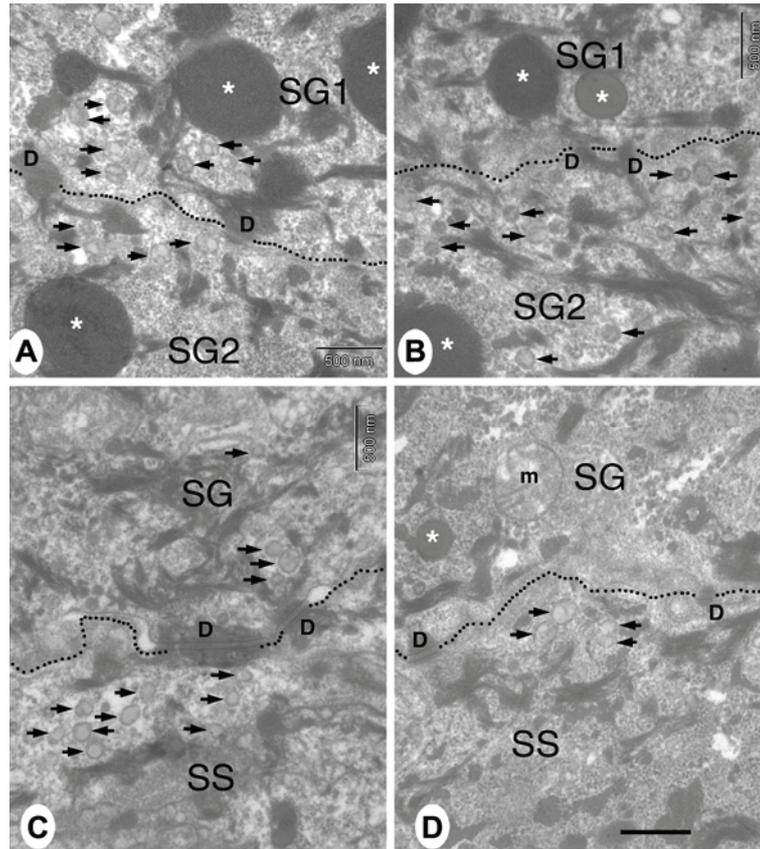


Abbildung 4.2.2: Ultrastrukturelle Aufnahmen der WT und CD44 k/o Epidermis der E17.5 Mäuse. (A und B) Keratinozyten der Granularzellschicht von der CD44 k/o (A) und WT (B) Epidermis. (C und D) Keratinozyten an der Grenze zwischen *Stratum granulosum* (SG) und *Stratum spinosum* (SS) in CD44 k/o (C) und WT (D) Epidermis. Die gestrichelte Linie gibt die Grenze zwischen den Zellschichten an; Pfeile: LB-ähnliche Vesikel, *: Keratohyalin Granula, D: Desmosomen, m: Mitochondrien. Maßstab: 500 nm.

4.2.3 Der Verlust von CD44 bewirkt eine temporäre Veränderung der Expression und Lokalisation von TJ-Proteinen und Par3 in der Haut von Mausembryonen

Zur weiteren Analyse der CD44 k/o Mäuse wurde die Lokalisation und Expression von TJ-Proteinen und Polaritätskomplex-Proteinen in Hautproben der Embryonalstadien E17.5 und E18.5 untersucht.

Cldn1 kommt in embryonaler Maushaut in den suprabasalen Schichten der Epidermis vor (TROY *et al.*, 2007). Für die E17.5 WT Embryonen wurde ebenfalls eine Lokalisation in den suprabasalen Schichten der Epidermis nachgewiesen, allerdings zeigten die CD44 k/o Embryonen neben einer Verteilung in weniger Schichten eine verminderte Immunfärbung. Cldn4 ist in der Haut von embryonalen Mäusen noch nicht gezeigt, in neugeborenen Mäusen kommt Cldn4 lediglich in der Granularzellschicht vor (FURUSE *et al.*, 2002). In der Epidermis von E17.5 WT Embryonen wurde zum ersten Mal eine

Lokalisation von Cldn4 in der Granularzellschicht bestätigt. In CD44 k/o Mäusen ließ sich für Cldn4 eine verminderte Immunfärbung feststellen (Abbildung 4.2.3).

ZO-1 kommt im Periderm von E11.5 Embryonen an den Zell-Zell-Kontakten vor (MORITA *et al.*, 2002). In embryonaler E17.5 Epidermis der WT Mäuse war ZO-1 in allen suprabasalen Schichten entlang der gesamten Membran lokalisiert, während es in CD44 k/o Mäusen nur in den oberen Schichten der Epidermis vorkommt. Dabei war ZO-1 vor allem auf die lateralen Plasmamembranen konzentriert (Abbildung 4.2.3).

Par3 ist an den Zell-Zell-Kontakten aller suprabasalen Schichten der Epidermis von neugeborenen Mäusen lokalisiert (TUNGGAL *et al.*, 2005) auch hier wurde die Verteilung von Par3 in embryonaler Epidermis noch nicht untersucht. Am Tag E17.5 der WT und CD44 k/o Mäuse zeigte sich auch hier eine Verteilung von Par3 an den Zellgrenzen aller suprabasalen Schichten der Epidermis. Die Verteilung in der Epidermis der CD44 k/o Mäuse war allerdings ungleichmäßig und schwächer (Abbildung 4.2.3). Par3 wurde mit einem Antikörper, der alle drei Isoformen erkennt, markiert.

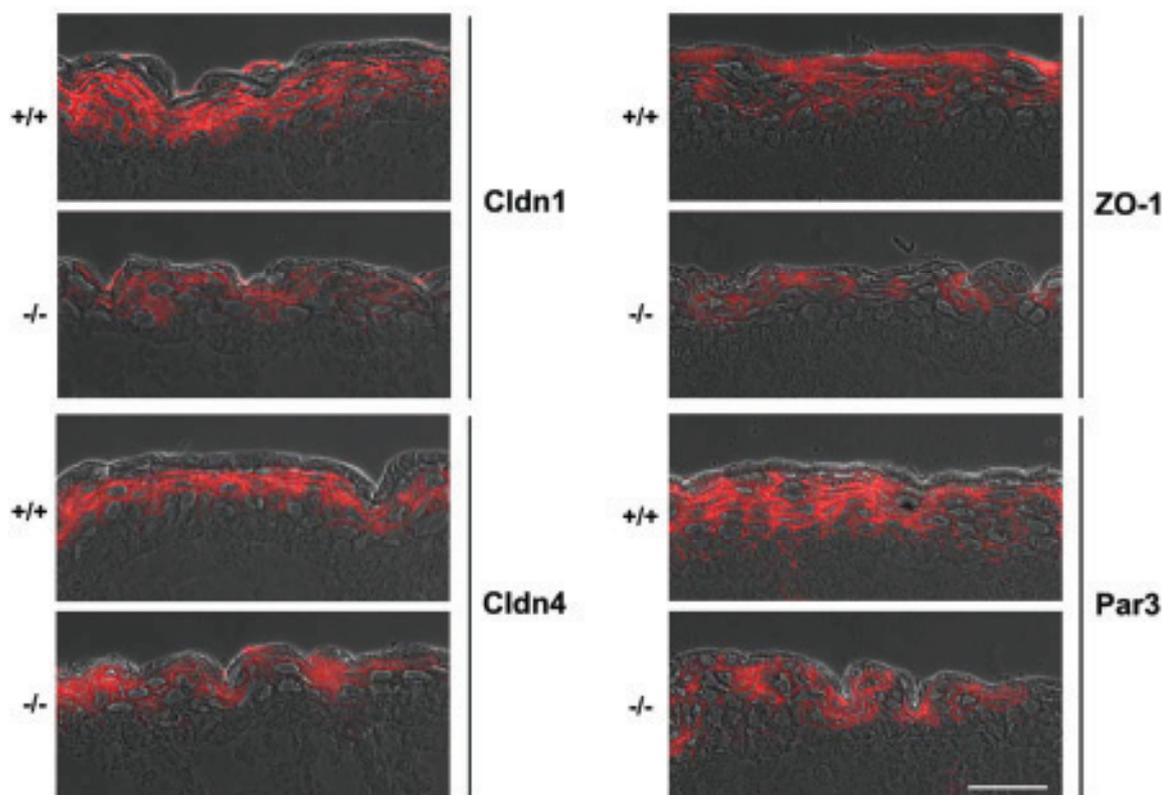


Abbildung 4.2.3: Immunolokalisation von TJ-Proteinen und Par3 in muriner Epidermis am Tag E17.5. Immunolokalisation von Cldn1, Cldn4, ZO-1 und Par3 in der Epidermis von WT und CD44 k/o Mäusen. Überlagerung von Epifluoreszenz- und Phasenkontrast-Aufnahmen. Maßstab: 50 µm.

Diese Beobachtungen konnten mittels Western-Blot-Analysen bestätigt werden. Es wurde eine verminderte Expression der TJ-Proteine Cldn1, Cldn4 und ZO-1 in den Hautlysaten der E17.5 k/o Mäuse im Vergleich zum WT gefunden. Am Tag E18.5 war die Proteinexpressionen von Cldn1 der CD44 k/o Mäuse wieder angeglichen und die der Proteine Cldn4 und ZO-1 zeigten eine leicht verstärkte Expression im Vergleich zum WT (Abbildung 4.2.4).

Auch das Polaritätskomplex-Protein Par3, das aus drei Isoformen mit unterschiedlichen Molekularmassen besteht (180 kDa, 150 kDa, 100 kDa), war in den 180 kDa und 150 kDa Isoformen in der CD44 k/o Haut vermindert exprimiert, während ab Tag E18.5 die Proteinmengen im Vergleich zu den WT Mäusen erhöht waren. Die Expression der 100 kDa Isoform blieb zu beiden Zeitpunkten unverändert im Vergleich zum WT.

Das Protein aPKC ζ ist in der Epidermis von neugeborenen Mäusen im Zytoplasma der Basalzellen zu finden (HELFRICH *et al.*, 2006). In der embryonalen Epidermis wurde das Protein ebenfalls im Zytoplasma der Basalzellen der Epidermis nachgewiesen allerdings ohne wesentliche Unterschiede zwischen WT und CD44 k/o Mäusen (Daten nicht gezeigt). Auch die Western-Blot-Analysen zu beiden Isoformen aPKC ζ und PKC ν/λ zeigten keinen Unterschied zwischen der Haut von WT und CD44 k/o Mäusen (Daten nicht gezeigt).

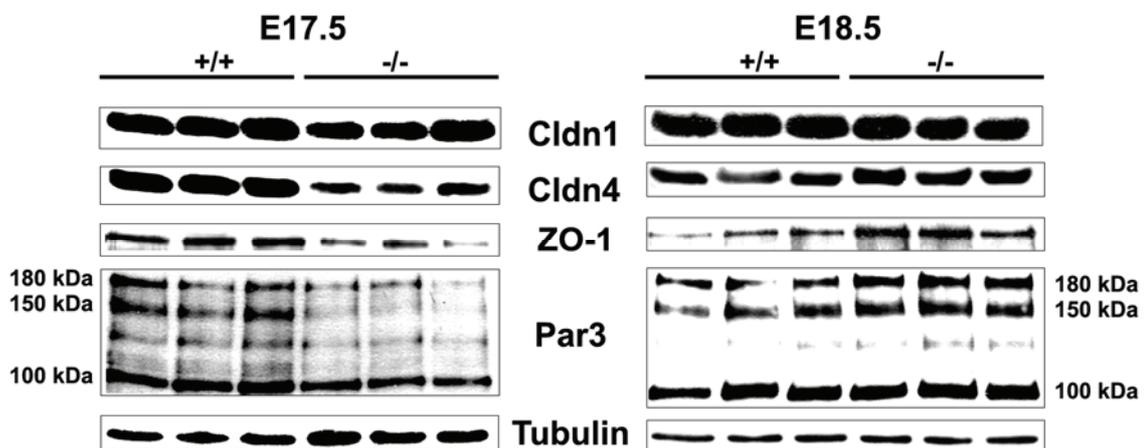


Abbildung 4.2.4: Nachweis der Expression der TJ-Proteine Cldn1, Cldn4, ZO-1, sowie des Polaritätskomplex-Proteins Par3 an den Embryontagen E17.5 und E18.5. Western-Blot-Analysen von Gesamthautlysaten der WT (+/+) und CD44 k/o (-/-) Embryonen der Tage E17.5 und E18.5. Gleiche Proteinmengen wurden mittels SDS-PAGE separiert und mit einem Immunoblot wurden die angezeigten Proteine detektiert. Tubulin diente als Gelbeladungskontrolle. Die Molekulargewichte der verschiedenen Par3 Isoformen wurden an der Seite markiert.

4.2.4 CD44-Defizienz verändert die Expression und Lokalisation von TJ-Proteinen in kultivierten Keratinozyten

Um die subzelluläre Lokalisation von TJ-Proteinen im Detail zu untersuchen, wurden kultivierte Keratinozyten verwendet. Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden die murinen Keratinozyten auf Kollagen-beschichteten Deckgläschen angezüchtet und um die aktive Barrierebildung der Keratinozyten zu induzieren, wurde die Ca^{2+} -Konzentration erhöht (Ca^{2+} -*switch*).

Bereits nach 24 h Ca^{2+} -*switch* zeigten die TJ-Proteine Cldn1, Cldn4 und Occludin eine kontinuierliche Verteilung an den Zell-Zell-Kontakten der WT Keratinozyten. Bei den CD44 k/o Keratinozyten war die Verteilung von Cldn1, Cldn4 und Occludin punktförmig und unregelmäßig, statt gerader Linien zeigten die Zell-Zell-Kontakte eine gefältete kurvige Form. Cldn1 konnte darüberhinaus nach 72 h vermindert an den Zell-Zell-Kontakten der CD44 k/o Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 4.2.5A).

Die Western-Blot-Analysen der im Hoch- Ca^{2+} -Medium kultivierten Keratinozyten zeigten ein starke Herunterregulierung des TJ-Proteins Cldn1 und eine leichte Verminderung von Cldn4 zu den späten Zeitpunkten in den CD44 k/o Zellen im Vergleich zu WT Zellen. Interessanterweise war die Proteinexpression von Occludin etwas erhöht in den CD44 k/o Zellen nachzuweisen (Abbildung 4.2.5B).

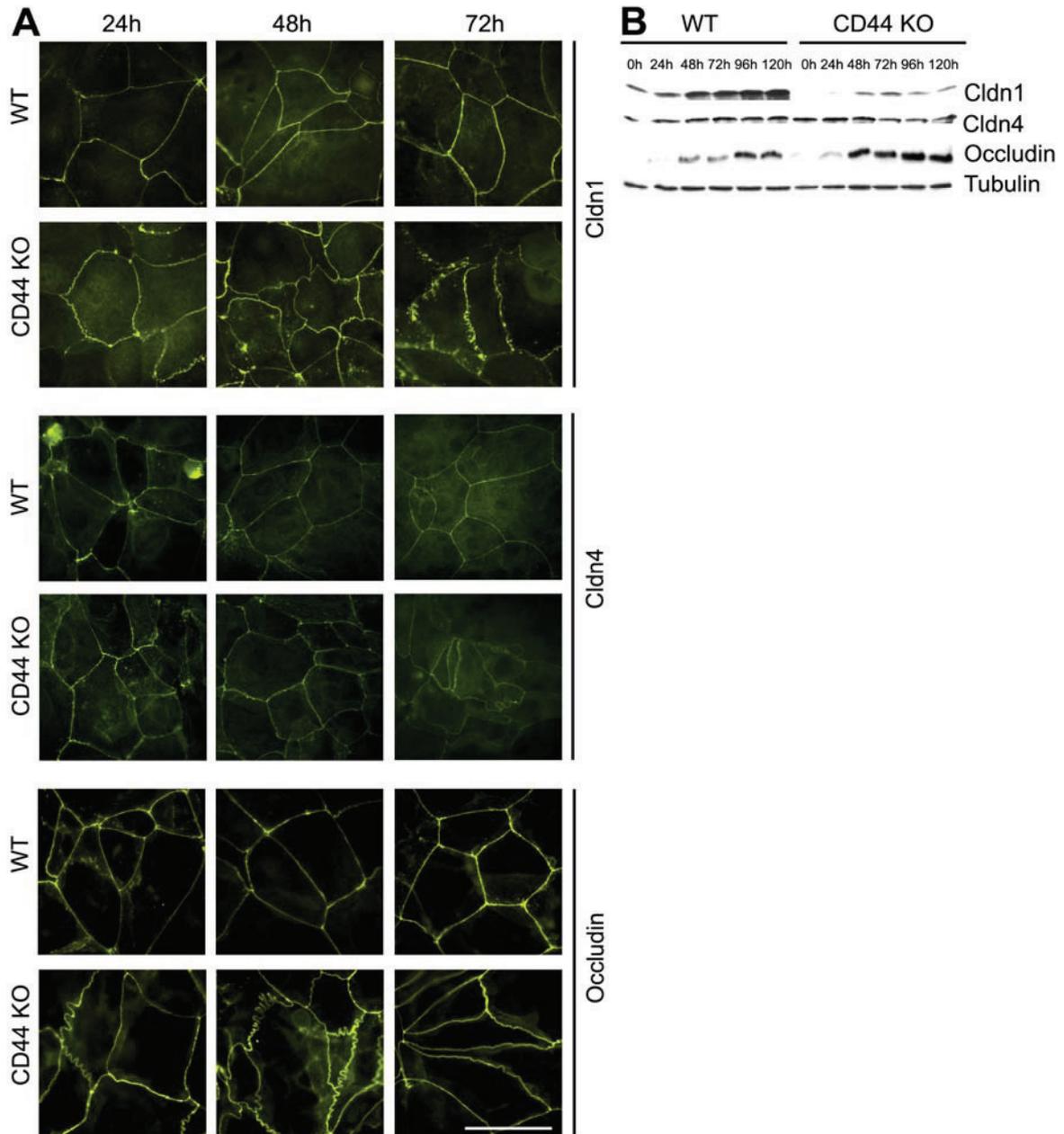


Abbildung 4.2.5: CD44-Defizienz verändert die Anordnung der Zell-Zell-Kontakte und Expression von TJ-Transmembranproteinen in kultivierten Keratinozyten. (A) Epifluoreszenz-Aufnahmen von Cldn1, Cldn4 und Occludin in kultivierten WT und CD44 k/o (KO) Keratinozyten zu den angegebenen Zeitpunkten nach Ca^{2+} -switch. Maßstab: 20 μ m. (B) Western-Blot-Analysen von WT und CD44 k/o Keratinozyten 0 h, 24 h, 72 h, 96 h und 120 h nach Ca^{2+} -switch. Gleiche Proteinmengen wurden mittels SDS-PAGE separiert und mit einem Immunoblot wurden die angezeigten Proteine detektiert. Tubulin diente als Gelbelastungskontrolle.

In der xz-Ebene ist es möglich die vertikale Verteilung von Membranproteinen entlang der lateralen Plasmamembran anzuschauen. Um die Polarität der kultivierten CD44 k/o Keratinozyten zu untersuchen, wurden die xz-Aufnahmen mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop angefertigt. Es wurden Keratinozyten nach Ca^{2+} -switch jeweils mit

dem Adhärenzverbindungs-Protein E-cadherin und den TJ-Proteinen Occludin (Abbildung 4.2.6) bzw. Cldn4 (Daten nicht gezeigt) doppelgefärbt. In normal polarisierten Zellen befinden sich die TJs apikal von AJs (FARQUHAR & PALADE, 1963). Dies konnte auch in den WT Keratinozyten nachgewiesen werden. Occludin, als Marker für TJs, war apikal über E-cadherin, als Marker für AJs, angeordnet und die beiden Proteine klar voneinander separiert. In CD44 k/o Zellen wurden beide Proteine in derselben Ebene der lateralen Seite der Plasmamembran gefunden (Abbildung 4.2.6).

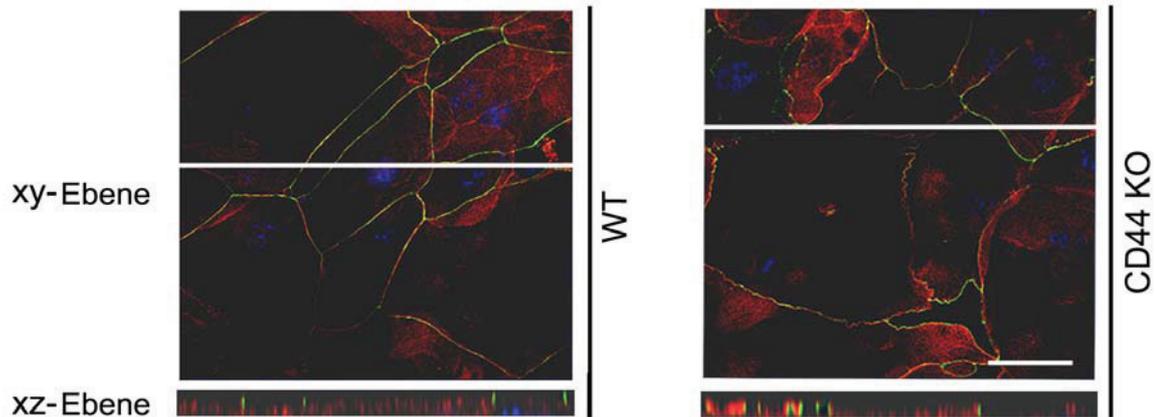


Abbildung 4.2.6: CD44-Defizienz führt zur veränderten Lokalisation von Occludin entlang der lateralen Plasmamembran. WT und CD44 k/o (KO) Zellen wurden auf Deckgläschen für 72 h kultiviert. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen E-cadherin (*rot*) und Occludin (*grün*) gefärbt. 8 Bilder aus der xy-Ebene wurden in 0.45 μm Intervallen vom unteren Teil bis zum oberen Teil der Zelle mit einem Konfokal-Mikroskop aufgenommen. Die xz-Aufnahme wurde in Höhe der weißen Linie auf dem xy-Bild generiert. Maßstab 20 μm .

Die Färbungen von Claudinen und Occludin weisen daraufhin, dass diese Proteine vollständig zur Zellmembran rekrutiert wurden, aber dennoch zeigten sie eine gestörte Anordnung der Zell-Zell-Kontakte. Daraufhin wurden die Plaque-Proteine ZO-1 und ZO-2 untersucht, die eine wichtige Rolle bei der Formation der TJ-Stränge und der parazellulären Barriere spielen (UMEDA *et al.*, 2006). Beide Proteine zeigten ähnliche Lokalisationsmuster wie die TJ-Transmembranproteine in den CD44 k/o Keratinozyten. Statt gerade strukturierter Linien an den Zell-Zell-Kontakten wie bei den WT Zellen waren hier ebenfalls die stark gewellte Anordnung bei den CD44 k/o Keratinozyten zu finden (Abbildung 4.2.7A). Die Western-Blot-Analysen der TJ-Plaque-Proteine zeigten keine offensichtlichen Unterschiede in der Proteinexpression für ZO-2, aber eine verminderte Expression für ZO-1 zu frühen Zeitpunkten (Abbildung 4.2.7B).

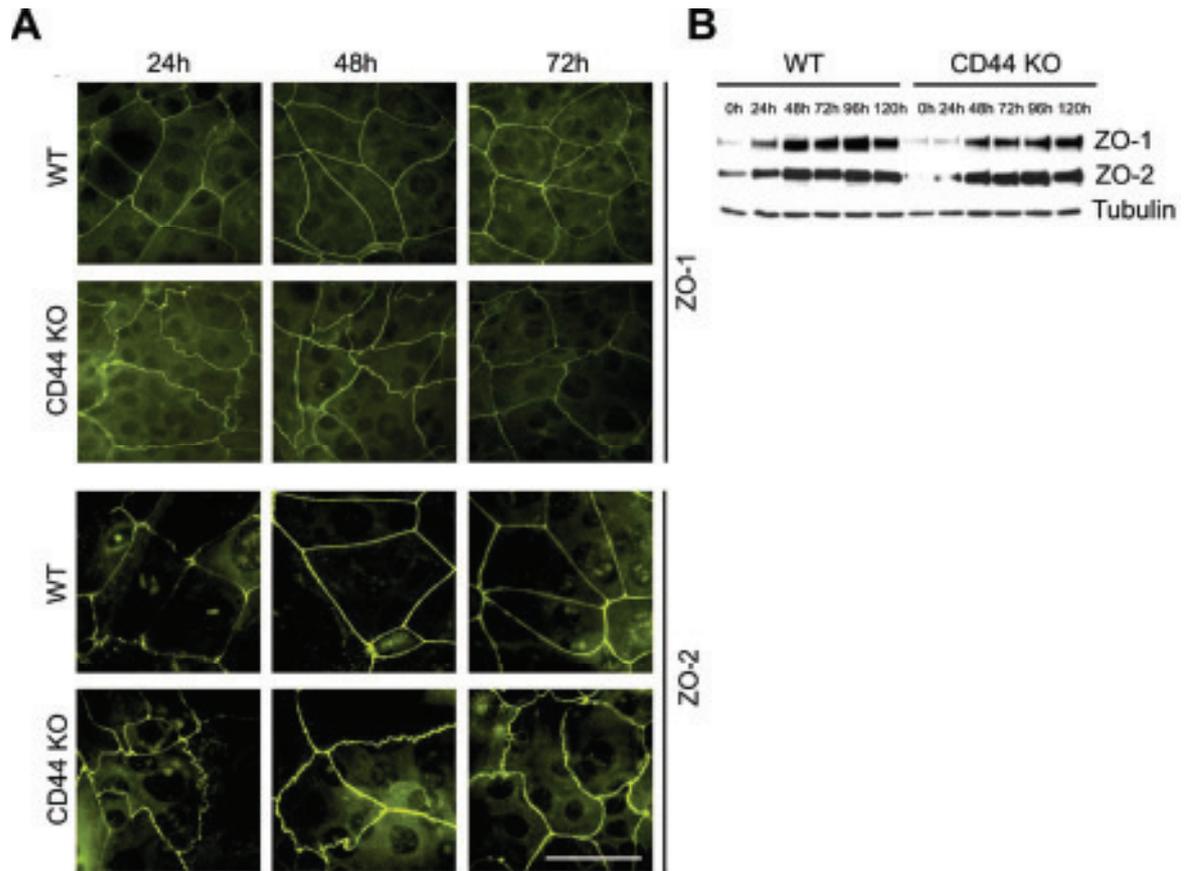


Abbildung 4.2.7: CD44-Defizienz verändert die Anordnung der Zell-Zell-Kontakte und die Expression von TJ-Plaques-Proteinen in kultivierten Keratinozyten. (A) Epifluoreszenz-Aufnahmen von ZO-1 und ZO-2 in kultivierten WT und CD44 k/o (KO) Keratinozyten zu den angegebenen Zeitpunkten nach Ca^{2+} -switch. Maßstab: 20 μ m. (B) Western-Blot-Analysen von WT und CD44 k/o Keratinozyten 0 h, 24 h, 72 h, 96 h und 120 h nach Ca^{2+} -switch. Gleiche Proteinmengen wurden mittels SDS-PAGE separiert und mit einem Immunoblot wurden die angezeigten Proteine detektiert. Tubulin diente als Gelbelastungskontrolle.

4.2.5 CD44-Defizienz beeinflusst die TJ-Funktionalität

Tight Junctions fungieren als selektive Diffusionsbarriere für Ionen und hydrophile Moleküle. Zur Untersuchung der TJ-Funktionalität in Keratinozyten über einen längeren Zeitraum in Hoch- Ca^{2+} -Medium wurde zum einen der Transepitheliale Widerstand (TER) und zum anderen der Parazelluläre *Tracer Flux* (PTF) gemessen. Die Messungen des TERs und des PTFs können Auskunft über die Funktionalität der TJ-Barriere während ihres Aufbaus geben. Der TER ist ein Maß für die Barriere einer Zellschicht für Ionen, der PTF zeigt die Barrierefunktion für grössere hydrophile Moleküle unterschiedlicher Molekulargewichte. YUKI und Mitarbeiter (2007) konnten mittels eines erhöhten TERs und eines erniedrigten PTFs den direkten Zusammenhang zwischen den TJs und der Barrierefunktion von humanen epidermalen Keratinozyten zeigen.

Aus Abbildung 4.2.8 ist ersichtlich, dass murine WT Keratinozyten einen TER von bis zu $1400 \Omega \cdot \text{cm}^2$ innerhalb von 4 Tagen entwickeln, dagegen ist die Ausbildung des TERs in CD44 k/o Zellen verzögert und vermindert im Vergleich zu den WT Zellen. CD44 k/o Zellen erreichen ihren maximalen TER bei $1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ zwei Tage später als WT Zellen.

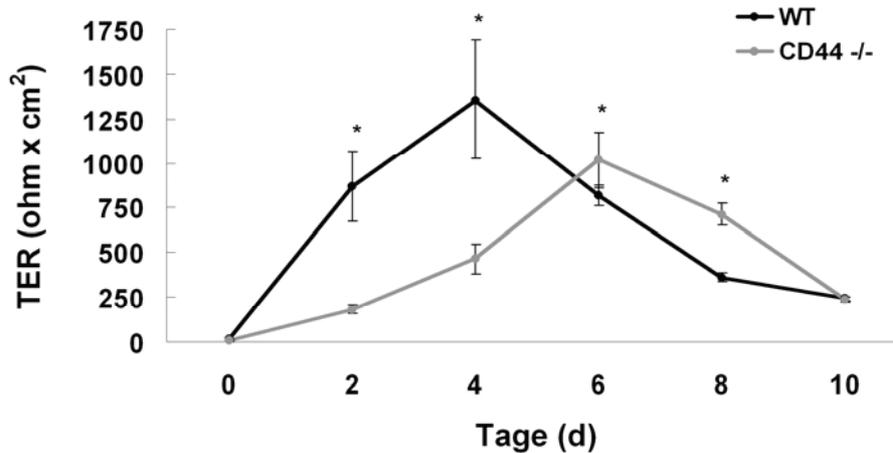


Abbildung 4.2.8: CD44-Defizienz beeinträchtigt den transepithelialen elektrischen Widerstand. Transepithelialer elektrischer Widerstand (TER) der kultivierten WT und CD44 k/o (-/-) Keratinozyten nach Ca^{2+} -switch. *: Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen WT Keratinozyten und CD44 k/o Keratinozyten. (Mittelwerte \pm SEM; $n=9$).

Dagegen konnte keine gestörte Barrierefunktion für nicht-ionische Dextrane in den CD44 k/o Zellen nachgewiesen werden. Beide Populationen bilden nach Ca^{2+} -switch eine Barriere für 4 kDa und 40 kDa Dextrane aus (Abbildung 4.2.9).

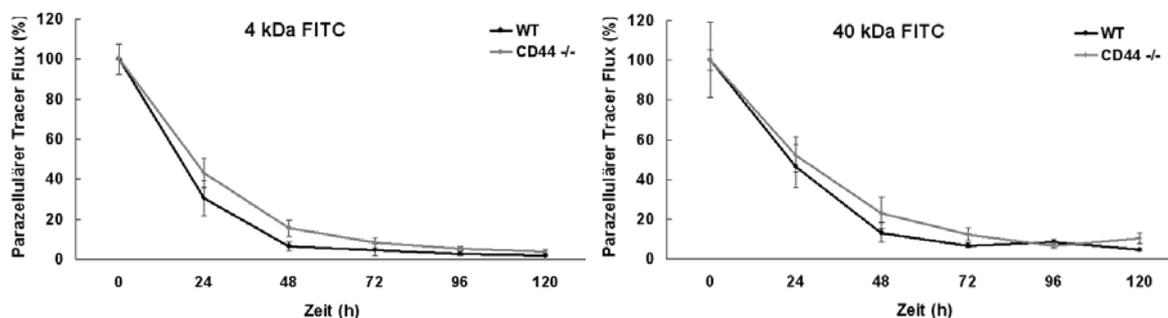


Abbildung 4.2.9: Einfluss von CD44 auf den Parazellulärer Tracer Flux (PTF). Die parazelluläre Diffusion der 4 kDa und 40 kDa FITC-Dextrane wurde für jeweils 2 h nach Ca^{2+} -switch (0 h) alle 24 h in kultivierten WT und CD44 k/o (-/-) Keratinozyten gemessen. Die angegebenen Werte sind prozentual zum 0 h-Wert (Mittelwerte \pm SEM; $n=9$).

Die TJ-Barrierefunktion kann in der Epidermis *in vivo* mittels eines biotinylierten 557 Da Tracers (Biotinylierungsreagenz) ermittelt werden. Für dieses Experiment wurde der

557 Da *Tracer* in die Dermis der E17.5 Mäuse injiziert und beobachtet wie weit dieser *Tracer* in die Epidermis diffundiert. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass der Verlust von CD44 keinen Einfluss auf das Diffusionsmuster des *Tracers* hat. Beide Mäuse sowohl der WT als auch der CD44 k/o zeigten eine begrenzte Diffusion des *Tracers* bis hin zum *Stratum granulosum*, wo die TJ-Strukturen, markiert durch Occludin, lokalisiert waren (Abbildung 4.2.10).

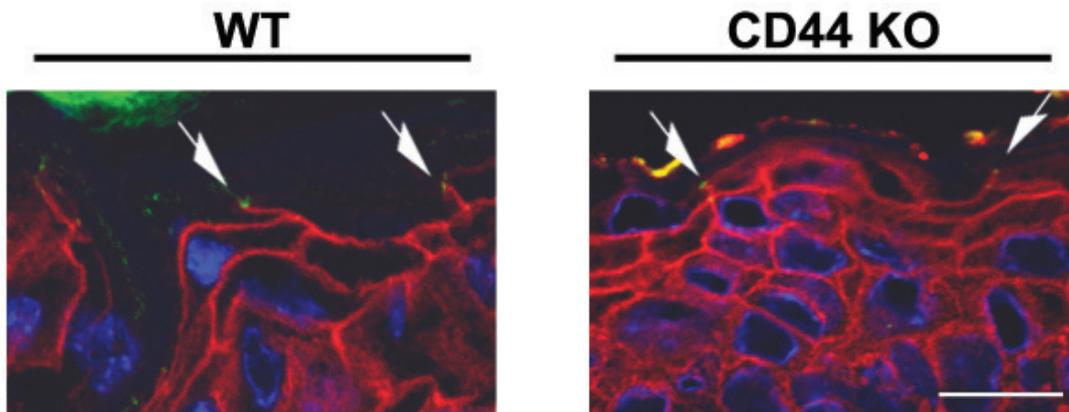


Abbildung 4.2.10: TJ-Barriere in WT und CD44 k/o Mäusen zum Zeitpunkt E17.5. Innen-nach-aussen Barriere Biotin-Assay in E17.5 WT und k/o (KO) Embryonen (rot: Biotin; grün: Occludin (Pfeile); blau: DAPI; Überlagerung von Epifluoreszenz-Aufnahmen). Maßstab: 15 µm.

4.2.6 Bestimmung der Proliferation

Um zu analysieren, ob der verzögerte und erniedrigte TER in den CD44 k/o Zellen auf ein verändertes Proliferationsverhalten zurückzuführen ist, wurde ein Proliferations-Assay durchgeführt. Es wurde die Proliferation nach 48-stündiger Kultivierung in Niedrig-Ca²⁺-Medium und in Hoch-Ca²⁺-Medium untersucht. Es konnten in beiden Fällen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 4.2.11).

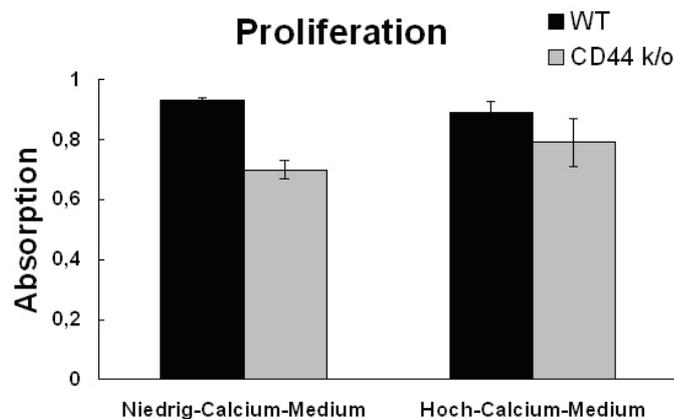


Abbildung 4.2.11: Proliferation kultivierter Keratinozyten in Niedrig-Ca²⁺-Medium und Hoch-Ca²⁺-Medium. Proliferaton von WT (schwarz) und CD44 k/o (grau) Keratinozyten nach 48-stündiger Kultivierung in Niedrig-Ca²⁺-Medium und Hoch-Ca²⁺-Medium von kultivierten Keratinozyten. (Mittelwerte ± SEM; n=3).

4.2.7 Verlust von CD44 beeinflusst die Proteine Par3, Rac1 und Tiam1 in kultivierten Keratinozyten

Zur Klärung der möglichen Ursachen der veränderten Lokalisationen und Proteinmengen der TJ-Proteine wurden *upstream* Moleküle, die bekannt sind für die Regulation der Bildung und Funktionalität von TJs in Keratinozyten, wie z.B. aPKC, Par3, Rac1 und Tiam1 untersucht (MERTENS *et al.*, 2005; HELFRICH *et al.*, 2006). Interessanterweise induziert der Verlust von CD44 eine vermehrte Lokalisation von Par3 an den Zell-Zell-Kontakten der CD44 k/o Zellen vergleichend zu den WT Zellen, daraus lässt sich vermuten, dass Par3 vermehrt an die Zell-Zell-Kontakte rekrutiert wird (Abbildung 4.2.12A).

Im Gegensatz dazu zeigten Western-Blot-Analysen eine starke Herunterregulation der 150 kDa und eine leichte Verminderung der 180 kDa Isoform von Par3. Es wurden keine Unterschiede für die 100 kDa Isoform gefunden. Des Weiteren wurden keine offensichtlichen Veränderungen in der Proteinexpression von aPKC ι/λ oder aPKC ζ nachgewiesen. Jedoch sind in den CD44 k/o Zellen die Proteine Tiam1 24 h nach Ca²⁺-*switch* und Rac1 48 h nach Ca²⁺-*switch* im Vergleich zu den WT Zellen leicht vermindert (Abbildung 4.2.12B).

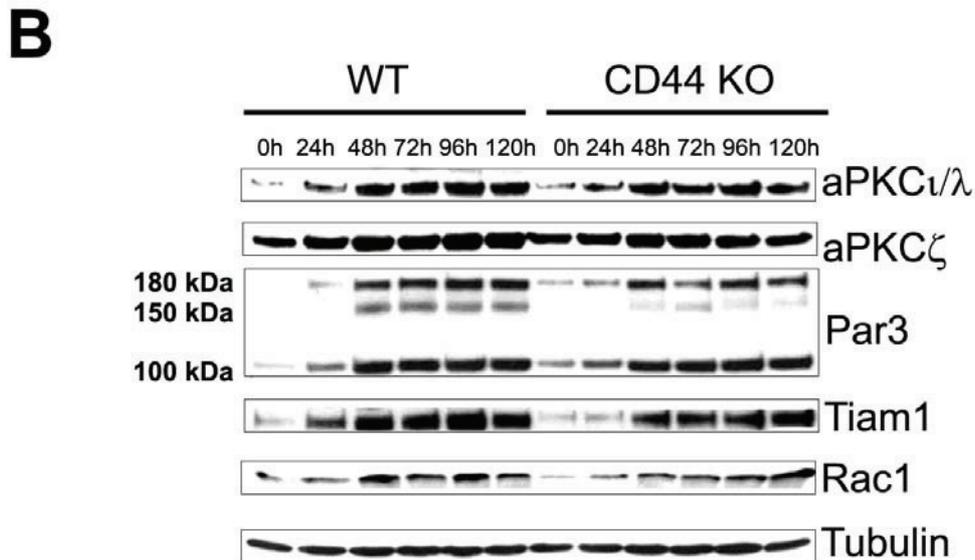
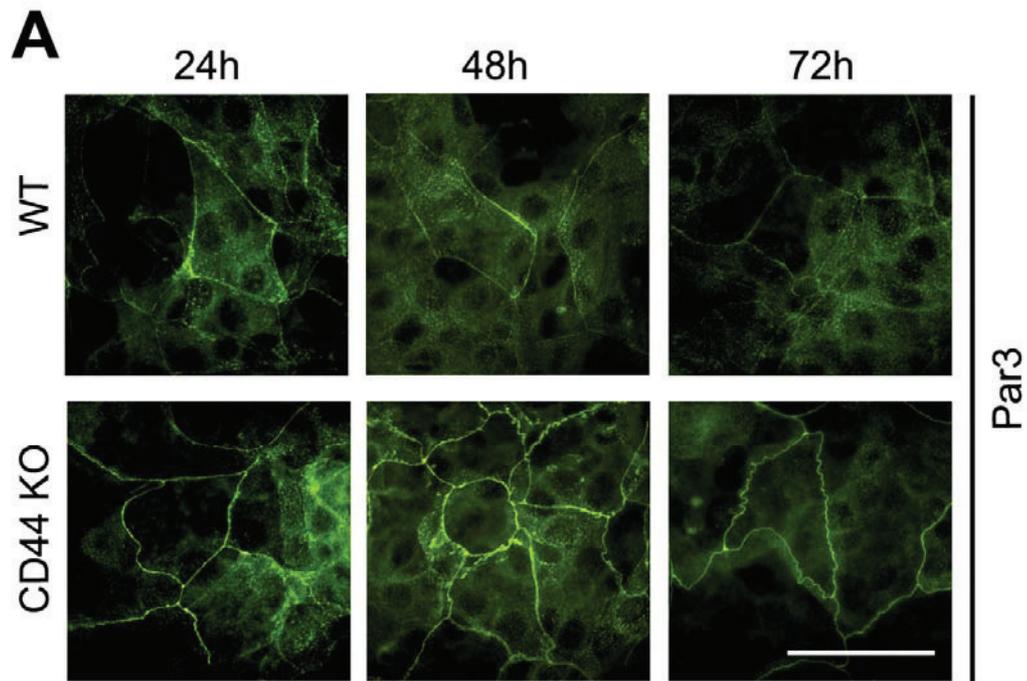


Abbildung 4.2.12: CD44-Defizienz verändert die Lokalisation von Par3 und beeinflusst die Expression von Polaritätskomplex-Proteinen sowie Tiam1 und Rac1. (A) Epifluoreszenz-Aufnahmen von Par3 in kultivierten WT und CD44 k/o (KO) Keratinozyten zu den angezeigten Zeitpunkten nach Ca²⁺-switch. Maßstab: 20 μ m. (B) Western-Blot-Analysen von WT und CD44 k/o Keratinozyten 0 h, 24 h, 72 h, 96 h und 120 h nach Ca²⁺-switch. Gleiche Proteinmengen wurden mittels SDS-PAGE separiert und mit einem Immunoblot wurden die angezeigten Proteine detektiert. Tubulin diente als Gelbeladungskontrolle.

4.2.8 Die verzögerte Barrierefunktion und die veränderte Lokalisation und Expression von TJ-Proteine in den CD44 k/o Mäusen sind mit einer verminderten Rac1 Aktivität assoziiert

Um zu prüfen, ob Rac1 auch *in vivo* verändert ist, wurden die Gesamtmenge an Rac1 in CD44 k/o Mäusen mit der in WT Mäusen verglichen und keine Unterschiede gefunden (Abbildung 4.2.13A). Jedoch ist nicht nur die Präsenz von Rac1 wichtig, sondern auch ihre Aktivität, d.h. die Rac1-GTP Form, ist der Schlüssel für ihre Wirkungsweise. Deshalb wurde die Expression der aktiven Rac1-GTP Form, in Hautlysaten von E17.5 und E18.5 CD44 k/o und WT Embryonen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass in den CD44 k/o Embryonen des Stadiums E17.5 im Vergleich zu den WT Embryonen verminderte Mengen an aktivem Rac1 vorliegen (Abbildung 4.2.13A). Die Quantifizierung zeigt eine 70%ige Verminderung der aktiven Rac1 Menge in der E17.5 CD44 k/o Haut vergleichend zur WT Haut (Abbildung 4.2.13B).

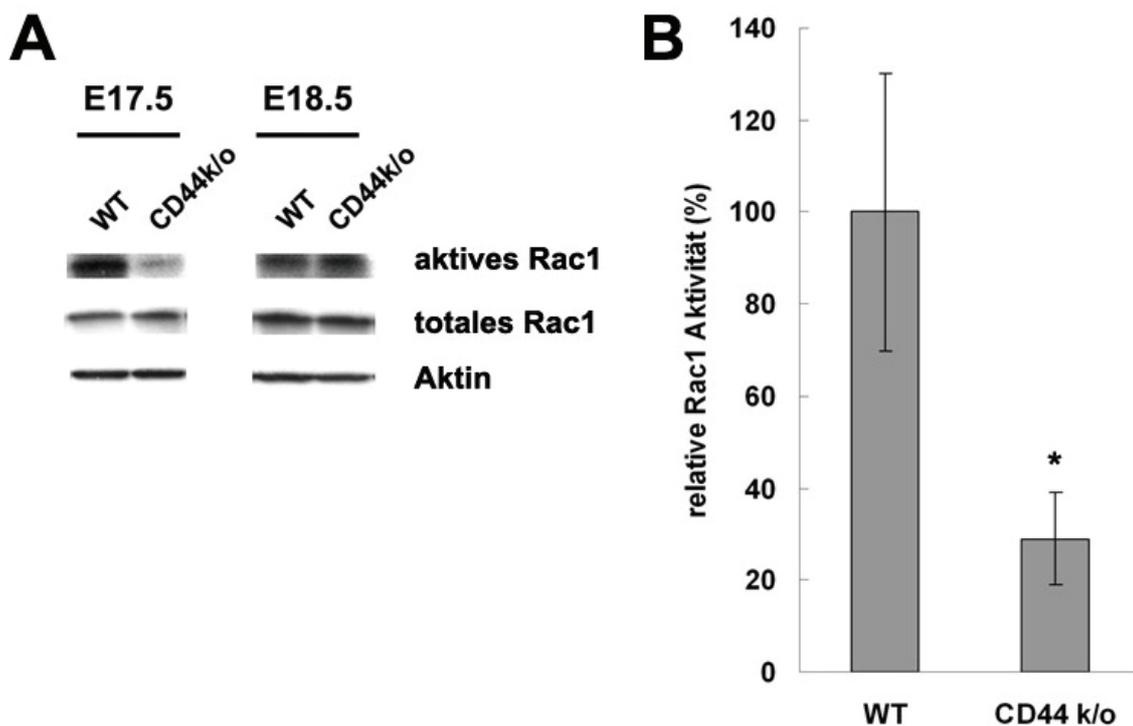


Abbildung 4.2.13: Pull-down Assay für aktives Rac1. (A) Nachweis des aktivem und totalem Rac1 Proteingehalts in Hautlysaten von E17.5 und E18.5 WT und CD44 k/o Embryonen. (B) Quantifizierung der Rac1 Aktivität in der Haut von CD44 k/o und WT Embryonen (E17.5). (Mittelwerte \pm SEM; n=3).

5 Diskussion

Die Beteiligung von Tight Junctions an der Barrierefunktion der Haut ist umstritten. Um den Zusammenhang zwischen Hautbarrierefunktion und Expression und Funktion von TJ-Proteinen weiter aufzuklären, wurden in dieser Arbeit TJ-Proteine in zwei Modellsystemen untersucht, die durch eine eingeschränkte Barrierefunktion der Haut gekennzeichnet sind: Läsionale psoriatische Haut und die Haut von CD44-defizienten Mäusen.

5.1 Tight Junction-Proteine in psoriatischer Haut

Psoriasis ist eine Hauterkrankung, die eine eingeschränkte Barrierefunktion des *Stratum corneums* zeigt (MOTTA *et al.*, 1994). Es wurde bereits beschrieben, dass eine stark ausgeprägte Form der Psoriasis, die Plaque-Psoriasis, mit Veränderungen der Lokalisation und Proteinexpression von TJ-Proteinen assoziiert ist. Für die Proteine Occludin, ZO-1 und Cldn4, die in gesunder Haut in den oberen Schichten der Epidermis lokalisiert sind, wurde eine verbreiterte Expression gefunden. Diese Verbreiterung wurde, mit Ausnahme von Cldn4 in abgeheilten Plaques nicht mehr beobachtet (PUMMI *et al.*, 2001; YOSHIDA *et al.*, 2001; BRANDNER *et al.*, 2006; PELTONEN *et al.*, 2007; WATSON *et al.*, 2007). Cldn1, das in allen lebenden Schichten der Epidermis lokalisiert ist, wurde in Psoriasis unterschiedlich beschrieben: Während BRANDNER und Mitarbeiter (2006) eine limitierte Herunterregulation in den oberen und unteren Schichten zeigten, fanden PELTONEN und Mitarbeiter (2007) keine Veränderung und WATSON und Mitarbeiter (2007) beschrieben eine starke Herunterregulation in allen Schichten. In der Dissertation von Claudia Pötzl wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die verbreiterte Lokalisation von ZO-1, Occludin und Cldn4 schon in der frühen Phase der Psoriasis auftritt und konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die verbreiterte Expression ein frühes Ereignis in Psoriasis ist, welches andauert während die Psoriasis fortschreitet. Des Weiteren wurde eine limitierte Herunterregulation von Cldn1 und Cldn7 in den obersten und untersten Schichten der Epidermis in der Frühform der Psoriasis gezeigt. In Plaque-Psoriasis konnte in einigen Fällen ebenfalls eine limitierte, in anderen aber eine stärker ausgeprägte Herunterregulation gefunden werden. Des Weiteren wurde zunächst mittels Analysen zur mRNA bestätigt, dass die zuvor beschriebenen TJ-Proteine in der psoriatischen Haut exprimiert werden. Dieser Nachweis war vor allem bei den Claudinen wichtig, da aufgrund von Sequenzhomologien Kreuzreaktionen in der Immunhistologie auftreten können und aufgrund der sehr ähnlichen Molekulargewichte zwischen 20 und 27 kDa auch Western-Blot-Analysen nicht als eindeutiger Beweis dienen können. Bei einer anschließenden Quantifizierung konnte nachgewiesen werden, dass

der mRNA-Gehalt der Proteine Occludin und ZO-1 in psoriatischer Haut signifikant erhöht war, dagegen der Gehalt für Cldn1 mRNA signifikant vermindert war. Der Gehalt an mRNA kodierend für die Proteine Cldn4, Cldn7 und JAM-A zeigte keine Unterschiede. In Folge dessen handelt es sich bei den für Cldn4 und Cldn7 beobachteten Veränderungen um Relokalisationen der Moleküle, während die anderen TJ-Proteine durch ihren Aufbau und Abbau beeinflusst sein könnten.

5.1.1 Funktionelle TJs sind in psoriatischer Epidermis in tieferen Schichten lokalisiert

Die Veränderungen in Lokalisation und Expression der TJ-Proteine in psoriatischer Haut könnten generell zwei mögliche Folgen für die Barrierefunktion der TJs haben:

Zum einen könnten sie zu einer verbesserten oder anders lokalisierten Barrierefunktion beitragen. Occludin charakterisiert in muriner Haut die Areale in der Epidermis, an denen dermal injizierte *Tracer* stoppen und TJ-Strukturen durch Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht werden können (FURUSE *et al.*, 2002). Es ist das TJ-Protein, dessen Lokalisation in der Epidermis nur auf das *Stratum granulosum* beschränkt ist, während andere TJ-Proteine auch in tieferen Schichten zu finden sind. Die verbreiterte Lokalisation von Occludin in psoriatischer Epidermis führt zu mehr Zellschichten mit Koexpression von Cldn1, Occludin, ZO-1 und Cldn7, zumindest in der frühen Phase der Psoriasis und in Plaque-Psoriasis mit beschränkter Herunterregulation der Claudine. Diese verbreiterte Kolokalisation könnte nun zu funktionellen TJs in mehreren oder tieferen Schichten führen. Es könnte sich dabei um eine Art Rettungssystem handeln, das versucht die beeinträchtigte Barrierefunktion des *Stratum corneums* in der (frühen) Psoriasis zu kompensieren. Interessanterweise wiesen bereits YOSHIDA und Mitarbeiter (2001) Occludin-tragende TJ-Strukturen elektronenmikroskopisch in tieferen Schichten der psoriatischen Epidermis nach, allerdings wurden sie von den Autoren (genauso wie TJ-Strukturen in normaler Haut) noch als *Maculae occludentes* bezeichnet.

Zum anderen könnte die veränderte Expression und Lokalisation aber auch eine beeinträchtigte Barrierefunktion von TJs widerspiegeln, die zur Gesamtbeeinträchtigung der Barrierefunktion in der psoriatischen Epidermis beiträgt. Von Cldn1-defizienten Mäusen und Epidermis-spezifischen E-cadherin k/o Mäusen, die ebenfalls einen Verlust von Cldn1 im *Stratum granulosum* aufweisen, ist bekannt, dass sie eine defekte TJ-Barriere für einen 557 Da *Tracer* (BRs) und eine stark beeinträchtigte Hautbarrierefunktion zeigen (FURUSE *et al.*, 2002; TUNGGAL *et al.*, 2005). Demnach könnte der Verlust von Cldn1 in psoriatischer Epidermis in den obersten und untersten Schichten

(der aber zum Teil auch stärker ausgeprägt gefunden wurde) zu einer beeinträchtigten Barrierefunktion von TJs führen.

In dieser Arbeit konnte an psoriatischen Hautproben, bei denen Cldn1 nur in den obersten und untersten Schichten herunterreguliert war, eine intakte TJ-Barriere für den intradermal injizierten 557 Da *Tracer* nachgewiesen werden. Diese Barriere lag aber nicht wie in gesunder Haut in der obersten lebenden Schicht der Epidermis, sondern in tieferen Schichten. Dies zeigt, dass TJs in Psoriasis tatsächlich ein Rettungssystem sein könnten, die eine Barriere bereits in tieferen Hautschichten formen. Wie sich die TJ-Barrierefunktion in psoriatischer Haut mit stärkerer Herunterregulation von Cldn1 verhält, konnte aufgrund der geringen Anzahl an Proben bisher noch nicht untersucht werden und eine Klärung sollte in zukünftigen Experimenten erfolgen. Interessanterweise wurde zwar ein Stop des 557 Da *Tracers* an Orten, die durch Occludin markiert waren, nachgewiesen, es konnte aber auch deutlich beobachtet werden, dass es darüber hinaus Occludin-markierte Strukturen gab, die für den *Tracer* durchlässig waren. Durch die Verwendung von konfokaler Mikroskopie konnte ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um unterschiedliche mikroskopische Ebenen handelte. Auch konnte kein Unterschied in der Kolo-kalisation mit Cldn1 beobachtet werden. Deshalb müssen zukünftige Untersuchungen klären, welche Proteine bzw. deren Modifikationen tatsächlich für funktionelle TJs von Bedeutung sind.

5.1.2 IL-1 β und TNF α regulieren die TJ-Protein Lokalisation und Expression in *ex vivo* Hautmodellen

Es ist aus verschiedenen Geweben bekannt, dass Zytokine TJ-Proteine und Funktionalität beeinflussen können (ZECH *et al.*, 1998; SCHMITZ *et al.*, 1999; COYNE *et al.*, 2002; SAWADA *et al.*, 2003; ZEISSIG *et al.*, 2007; AMASHEH *et al.*, 2009). Psoriatische Epidermis ist charakterisiert durch ein erhöhtes Vorkommen von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 β und TNF α (COOPER *et al.*, 1990; ETTEHADI *et al.*, 1994; YOSHINAGA *et al.*, 1995; SCHOTTELIUS *et al.*, 2004). Folglich wurde die Hypothese erstellt, dass auch in psoriatischer Haut Zytokine an den Veränderungen der TJ-Proteine beteiligt sein könnten. Um ein erhöhtes Vorkommen von IL-1 β und TNF α zu simulieren, wurden diese Zytokine getrennt voneinander in verschiedenen Konzentrationen in *ex vivo* Hautmodelle injiziert und für 24 h inkubiert. Dies führte zu einer verbreiterten Lokalisation von ZO-1 und Occludin sowie zu einer erhöhten Proteinexpression von ZO-1 (die Proteinexpression von Occludin konnte leider aufgrund von experimentellen Schwierigkeiten nicht in den *ex vivo* Modellen untersucht werden). Das Verteilungsmuster von Occludin und ZO-1 in den *ex vivo* Modellen ähnelt dem der frühen Phase von Psoriasis, so dass IL-1 β und TNF α an

der veränderten Lokalisation und Expression von Occludin und ZO-1 in Psoriasis zumindest in der frühen Phase beteiligt sein könnten. Genauere Untersuchungen unseres Hautmodells zu weiteren Zeitpunkten (30 min, 60 min, 6 h) bestätigten die verbreiterte Expression von Occludin und ZO-1 nach Injektion von IL-1 β auch zu früheren Zeitpunkten, wenn auch weniger stark ausgeprägt. Zu allen Zeitpunkten waren hingegen die Differenzierung der Epidermis, nachgewiesen durch die Expression und Lokalisation von Involukrin und Filaggrin und durch die Beurteilung der allgemeinen Morphologie, sowie der proliferative Index, ermittelt durch Ki67-positive Zellen, unverändert. Demzufolge beeinflusst IL-1 β zu diesen Zeitpunkten nur die Veränderungen von TJ-Proteinen, (noch) nicht aber die Veränderungen in Proliferation und Differenzierung, die für die Psoriasis typisch sind. Man könnte somit vermuten, dass die Veränderungen von Occludin und ZO-1 den Veränderungen von Differenzierung und Proliferation vorangehen. In diesem Zusammenhang ist es besonders interessant, dass in MDCK Zellen gezeigt werden konnte, dass ZO-1 einen Einfluss auf die Proliferation hat (BALDA *et al.*, 2003). Darüber hinaus ist es wichtig für die Barrierefunktion in Epithel-Zellen (UMEDA *et al.*, 2006). Für Occludin wurde eine Beteiligung an der Barriere- als auch an der Zaunfunktion nachgewiesen (MCCARTHY *et al.*, 1996; SCHNEEBERGER & LYNCH, 2004; LEYVRAZ *et al.*, 2005). Eine verbreiterte Expression von ZO-1 und Occludin sowie ein erhöhter mRNA-Gehalt beider Proteine wurden ebenfalls während einer beginnenden Infektion mit *Staphylokokkus aureus* und bei einer bakteriellen Besiedelung mit *Staphylokokkus epidermidis* beobachtet (OHNEMUS *et al.*, 2007). Auch hier scheint es sich um eine Art Rettungssystem der TJs zu handeln, da die Barriere der Haut durch die bakterielle Besiedelung herausgefordert wird.

Für Cldn1 wurde in den *ex vivo* Hautmodellen eine Herunterregulation in den oberen Schichten der Epidermis nach Injektion von 100 ng/ml und 1 μ g/ml IL-1 β beobachtet. Eine komplette Herunterregulation wurde bei Konzentrationen von 100 ng/ml nicht beobachtet, aber gelegentlich bei Injektionen mit 1 μ g/ml, vermutlich an Injektionsstellen mit hohen Konzentrationen. Normale Haut enthält 175 pg/ml IL-1 β und psoriatische Haut 600 pg/ml (COOPER *et al.*, 1990). Da dies ein Gesamtwert für Hautbiopsien ist und nicht den Wert in speziellen Gebieten der Epidermis widerspiegelt, wurden für die *ex vivo* Modelle eine 200fache (100 ng/ml) und 2000fache (1 μ g/ml) höhere Konzentration gewählt. Jedoch kann die korrekte Konzentration, die eine *in vivo* Situation wiedergeben könnte, nur geschätzt werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Konzentrationen in der Haut inhomogen sind aufgrund von Konzentrationsgradienten nahe Zytokin-produzierender Zellen. Dies könnte auch erklären, weshalb in verschiedenen Schnitten von psoriatischen Proben eine unterschiedlich starke Herunterregulation von Cldn1 beobachtet wurde (siehe Seite 34). WATSON und Mitarbeiter zeigten in einer Arbeit 2007, die während der

Anfertigung dieser Doktorarbeit veröffentlicht wurde, dass die Injektion von 50 µl IL-1β mit einer Konzentration von $>10^7$ IU/mg in gesunde Haut zu einer Herunterregulation von Cldn1 und Cldn3 in allen Schichten der Epidermis führt. In Zellkulturen beobachteten sie eine Reduktion von Cldn1 nach 24-stündiger Inkubation ab Konzentrationen von 100 µg/ml und eine Herunterregulation von Cldn3 ab Konzentrationen von 1 µg/ml. Diese starken Herunterregulationen, durch die von WATSON benutzten sehr hohen Konzentrationen, unterstützen ebenfalls die Theorie des konzentrationsabhängigen Ausmaßes der Herunterregulation.

Die Injektion von TNFα zeigte erst nach 24 h eine schwach verminderte Lokalisation und Expression von Cldn1. Interessanterweise fanden WATSON und Mitarbeiter (2007) nach zweistündiger Inkubation der Injektion von TNFα auch keinen Einfluss auf Cldn1 und Cldn3 und gingen von einer nicht ausreichenden Inkubationszeit aus.

5.1.3 IL-1β und TNFα regulieren die TJ-Barrierefunktion in Keratinozyten

Zur detaillierten Untersuchung der Korrelation zwischen Zytokingabe, Lokalisation von TJ-Proteinen und TJ-Funktionalität wurden Untersuchungen in Keratinozyten-Zellkulturen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Applikation von IL-1β den transepithelialen Widerstand in Keratinozyten in einer konzentrations- und zeitabhängigen Weise beeinflusst. 24 h nach Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration und IL-1β-Zugabe wurde ein erhöhter TER beobachtet, während anschließend zu späten Zeitpunkten (72 h und 96 h) ein erniedrigter TER im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden konnte. Die Hochregulation des TERs zu frühen Zeitpunkten war mit einer verstärkten Immunlokalisation von TJ-Proteinen an den Zell-Zell-Kontakten assoziiert, dennoch lag keine Erhöhung im Proteingehalt für TJ-Proteine vor. Auf mRNA-Ebene konnte nachgewiesen werden, dass nach 24 h die Cldn4 mRNA signifikant vermehrt exprimiert wurde, während die anderen Proteine keine Veränderung zeigten.

Die Hochregulation des TERs scheint somit eine Konsequenz der Relokalisation von TJ-Proteinen zu sein. An diesen Modifikationen der TJs könnten z.B. Phosphorylierung verschiedener TJ-Moleküle beteiligt sein. Die Bedeutung der Phosphorylierung von Cldn4 bei der Bildung des TERs in HaCaT Zellen wurde kürzlich beschrieben (AONO & HIRAI, 2008). Auch in anderen Zelltypen konnte gezeigt werden, dass Phosphorylierungen von TJ-Proteinen die TJ-Barrierefunktion modulieren können (ANDREEVA *et al.*, 2001; NUNBHAKDI-CRAIG *et al.*, 2002; D'SOUZA *et al.*, 2007; SETH *et al.*, 2007).

Die Erniedrigung des TERs zu späteren Zeitpunkten (72 h und 96 h) war mit einer verminderten Immunlokalisation von TJ-Proteinen an den Zell-Zell-Kontakten, sowie auch mit einem verminderten Proteingehalt von einzelnen TJ-Proteinen korreliert. Auch der Cldn1 mRNA-Gehalt war stark erniedrigt. Interessanterweise konnte 72 h nach Behandlung der Zellen ein erhöhter mRNA-Gehalt für Cldn4, Occludin und ZO-1 beobachtet werden. Dies könnte ein kompensatorischer Effekt sein. Damit könnte die Herunterregulation eine Konsequenz des Verlustes der Proteine an den Zell-Zell-Kontakten und ihres Abbaus sein. YUKI und Mitarbeiter (2007) haben gezeigt, dass die Behandlung von Keratinozyten mit Ochratoxin A zu einem Verlust von Cldn4 und einer Erniedrigung des TERs führt. Auch die Herunterregulation von Cldn1 und Occludin durch RNA-Interferenz resultiert in einer Erniedrigung des TERs (YAMAMOTO *et al.*, 2008).

In weiteren Versuchen konnte ebenfalls ein Einfluss von $\text{TNF}\alpha$ auf die TJ-Funktionalität in einer zeitabhängigen Weise nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass beide Zytokine, IL-1 β und $\text{TNF}\alpha$, eine Rolle bei den Veränderungen der TJs in Psoriasis spielen. Über welche Regulationswege dies geschieht, muss in zukünftigen Experimenten geklärt werden. In verschiedenen Epithel-Zellkulturen, z.B. Colon- (Caco-2) und Cornea- (HEC) Epithel-Zelllinien wurde beobachtet, dass Konzentrationen von 1 – 10 ng/ml IL-1 β oder $\text{TNF}\alpha$ die Expression und Lokalisation von TJ-Proteinen, wie ZO-1 und Occludin, beeinträchtigen können und zu einer gestörten Barrierefunktion führen. An diesen Vorgängen ist $\text{NF}\kappa\text{B}$ beteiligt (MA *et al.*, 2004; AL-SADI & MA, 2007; KIMURA *et al.*, 2008; KIMURA *et al.*, 2009). Es ist bemerkenswert, dass sowohl IL-1 β als auch $\text{TNF}\alpha$ den transepithelialen Widerstand direkt nach Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration, wenn sich die TJs in ihrer Bildung befinden, beeinflussen können. Während $\text{TNF}\alpha$ auch in der Lage ist sich auf den TER auszuwirken, wenn es zu Zellen appliziert wurde, die über bereits fertig ausgebildete TJs verfügten. Es ist somit denkbar, dass IL-1 β nur die TJ-Funktionalität in Haut mit einem aktivem *turnover*, wie in der Psoriasis, beeinflusst, dagegen kann $\text{TNF}\alpha$ auch auf normale Hautkonditionen einwirken.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Veränderungen von TJs ein frühes Ereignis in Psoriasis sind und dass sie zu einer funktionellen TJ-Barriere in tieferen epidermalen Schichten führen. Dies könnte auf einen Rettungsmechanismus der TJs für die Hautbarriere hinweisen. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Expression und die Lokalisation der TJ-Proteine aber auch die TJ-Funktionalität in Keratinozyten durch IL-1 β und $\text{TNF}\alpha$ beeinflusst werden. Da diese Zytokine wichtig in Psoriasis sind und da ähnliche Veränderungen in der frühen Phase der Psoriasis und in Zytokin-injizierten Modellen beobachtet wurden, könnten sie eine zentrale Rolle in der Regulation von TJs in der Psoriasis spielen.

5.2 CD44 reguliert den Aufbau von Tight Junctions und ihre Barrierefunktion

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Maus-Modellsystem verwendet, bei dem durch das Ausschalten des Oberflächenrezeptors CD44 eine temporäre Beeinträchtigung der Hautbarriere sowie eine Veränderung der Polarität von Keratinozyten im *Stratum granulosum* existiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression und Lokalisation von TJ-Proteinen durch die CD44-Defizienz verändert sind.

5.2.1 CD44 verändert die Lokalisation und Expression von TJ-Proteinen

CD44 ist in allen lebenden Schichten der Epidermis exprimiert und spielt eine wichtige Rolle in der epidermalen Differenzierung, Lipidsynthese und Barrierefunktion (BOURGUIGNON *et al.*, 2006). Jedoch sind die Effektor-Moleküle, die zu diesen Veränderungen beitragen, unbekannt. Da TJ-Proteine beteiligt sind an der Barrierefunktion und Zellpolarität von einschichtigen Epithel- und Endothel-Zellen (SHIN *et al.*, 2006), wird eine Beteiligung von TJ-Proteinen an den durch die CD44-Defizienz induzierten Hautveränderungen postuliert.

Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Verlust von CD44 zu einer temporären Veränderung der TJ-Protein Lokalisation und Expression, während des Aufbaus der Hautbarriere in sich entwickelnder, embryonaler Epidermis, führt. Diese Veränderung deckt sich zeitlich mit einer verzögerten Hautbarriere-Ausbildung in Maus Embryonen am Tag E17.5. Am Embryonaltag E18.5 ist eine normale Expression und Verteilung von TJ-Proteinen, abgesehen von einer leichten Überexpression für Cldn4, ZO-1 und Par3, wiederhergestellt. Die Wiederherstellung korreliert zeitlich mit einer komplett funktionierenden epidermalen Barriere. Diese Beobachtungen weisen stark darauf hin, dass die Veränderungen der TJ-Proteine direkt am Hautbarriere-Phänotyp der CD44 *k/o* Mäuse beteiligt sind.

Verschiedene Mausmodelle zeigten bereits, dass TJs und TJ-assoziierte Moleküle eine Rolle in der Barrierefunktion von Maushaut spielen: Mäuse mit einer Cldn1-Defizienz sterben innerhalb eines Tages nach der Geburt aufgrund eines erhöhten Transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) (FURUSE *et al.*, 2002). Dieses Phänomen konnte ebenfalls für eine *knock-out* Maus, in der E-cadherin spezifisch in der Epidermis ausgeschaltet wurde, gezeigt werden. In der Epidermis dieser Maus kommt eine reguläre Verteilung von Occludin vor, während Cldn1 in der Granularzellschicht fehlt und Cldn4 und ZO-1 eine unregelmäßige Verteilung zeigen. Auch hier stirbt die Maus innerhalb von 7-12 Stunden nach der Geburt aufgrund des Wasserverlustes (TUNGGAL *et al.*, 2005). Des

Weiteren sterben CAP1/Prss8-defiziente Mäuse innerhalb von 60 Tagen nach der Geburt ebenfalls durch einen erhöhten TEWL. Diese Mäuse zeigen eine normale Cldn1 Lokalisation, wohingegen Occludin abwesend ist. Die Lokalisation von ZO-1 ist leicht verändert an den Zell-Zell-Kontakten der Granularzellen zu finden (LEYVRAZ *et al.*, 2005). Schließlich zeigen Mäuse, die Cldn6 überexprimieren eine defekte epidermale Permeabilitäts-Barriere und sterben innerhalb von 48 Stunden nach Geburt (TURKSEN & TROY, 2002). Alle diese beschriebenen Mausmodelle zeigen eine starke Korrelation zwischen einer veränderten Expression und Lokalisation von verschiedenen TJ-Proteinen und einem Barrieredefekt in der Haut.

5.2.2 CD44 beeinflusst die TJ-Barrierefunktion

Um den Einfluss der CD44-Defizienz auf Keratinozyten besser im Detail untersuchen zu können, wurde das Modell der Barrierebildung nach Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration in Keratinozyten-Kulturen verwendet. Es wurden dabei Keratinozyten verwendet, die aus CD44-defizienten Mäusen bzw. dem dazugehörigen Wildtypen isoliert und kultiviert wurden. Es stellte sich auch hier heraus, dass während des Aufbaus der Barriere der Verlust von CD44 die Lokalisation und Expression von TJ-Proteinen verändert. Diese Veränderungen sind assoziiert mit einer Beeinträchtigung der TJ-Funktionalität bezüglich des TERs. Wie bereits beschrieben, haben aktuelle Arbeiten an humanen kultivierten Keratinozyten gezeigt, dass eine Korrelation zwischen TJ-Proteinexpression und Lokalisation und ihrer Funktionalität, gemessen durch den TER besteht (siehe Seite 66) (YUKI *et al.*, 2007; YAMAMOTO *et al.*, 2008). Demnach ist es wahrscheinlich, dass die verminderte Proteinexpression von Cldn1, Cldn4 und ZO-1 in den CD44 k/o Zellen verantwortlich ist für die geringere und verzögerte Ausbildung des TERs in diesen Zellen. Bemerkenswerterweise sind dagegen keine Veränderungen in der Permeabilität für große Moleküle, wie 4 kDa und 40 kDa FITC-Dextrane, in CD44-defizienten Keratinozyten zu finden. Auch die *in vivo* Ergebnisse sprechen dafür, dass keine Veränderung der TJ-Barrierefunktion in den CD44 k/o Keratinozyten für Moleküle auftritt, die größer als Ionen sind. In Versuchen mit einem 557 Da *Tracer* wurde keine erhöhte Permeabilität dieses *Tracers* durch die TJs im *Stratum granulosum* in den CD44 k/o Mäusen festgestellt. Eine voneinander unabhängige Regulation der ionenselektiven Barriere und der Barriere für größere Moleküle in TJs konnten FURUSE und Mitarbeiter (2001) in Untersuchungen mit MDCK I- und MDCK II-Zellen nachweisen. Dabei spielte die Zusammensetzung von Claudinen in den TJ-Strängen eine große Rolle. MDCK I-Zellen enthalten im Gegensatz zu MDCK II-Zellen kein Cldn2. Wenn dieses Protein in MDCK I-Zellen transfiziert wurde, wurden die *tight* TJs zu *leaky* TJs umgewandelt und der TER von MDCK I-Zellen (12.992

$\pm 594 \Omega \cdot \text{cm}^2$) näherte sich dem von MDCK II-Zellen ($206 \pm 35 \Omega \cdot \text{cm}^2$) an. Allerdings waren die *leaky* TJs nur für Ionen durchlässig und nicht für Dextrane. NITTA und Mitarbeiter (2003) haben gezeigt, dass die Blut-Hirn-Schranke in Cldn5-defizienten Mäusen eine gröÙenselektive Veränderung aufweist. Bei *Tracer* Experimenten konnten sie eine Diffusion eines 443 Da großen Biotin Reagenz in k/o Mäusen nachweisen, hingegen keine Diffusion für größere Moleküle, wie das Rinderserumalbumin (68 kDa). In einem weiteren Versuch wurde eine Mischung aus einem Tetramethyl-Rhodaminegekoppeltem Dextran (10 kDa) und dem Höchstfarbstoff 33258 (562 Da) durch das Herz perfundiert. Nach 5 min Inkubation verblieben die Farbstoffe in den BlutgefäÙen des WT Gehirns, lediglich die Endothel-Zellen waren mit Höchst 33258 angefärbt. Im Gehirn der Cldn5 k/o Mäuse waren neben den Endothel-Zellen auch Neurone und Gliazellen mit Höchst markiert. Die Dextrane waren sowohl im WT als auch in der k/o Maus ausschließlich in den BlutgefäÙen zu finden.

Interessanterweise sind CD44 k/o Mäuse lebensfähig und zeigen keine bedeutenden Defekte in der Hautbarriere nach der Geburt, wohingegen Cldn1 und E-cadherin-defiziente Mäuse bereits am ersten Tag nach der Geburt aufgrund ihres Hautbarriere-defekts versterben. Diese Mäuse zeigen aber auch einen Defekt für die Barriere des 557 Da *Tracers*, was zu dem weit schwereren Phänotyp beitragen könnte (FURUSE *et al.*, 2002; TUNGGAL *et al.*, 2005). Des Weiteren lassen die beobachteten temporären Veränderungen in der epidermalen Barrierefunktion der CD44 k/o Mäuse und der verzögerte Barriereaufbau in den kultivierten CD44 k/o Keratinozyten vermuten, dass andere Moleküle in der Lage sind CD44 im Signalweg zu ersetzen. Diese Rettung könnte auch zu der Überexpression der TJ-Proteine Cldn4 und ZO-1 sowie der 150 kDa Isoform von Par3, wie sie am Embryonaltag E18.5 zu beobachten waren und bis zum Neugeborenen-Stadium anhielten, führen. In Lorikrin-defizienten Mäusen wurde ebenfalls eine temporäre Beeinträchtigung der Barrierefunktion während der Embryonalphase nachgewiesen. Ein kompensatorischer Mechanismus, der einen schwerwiegenden Phänotypen in den neugeborenen Lorikrin-defizienten Mäusen verhinderte, war eine erhöhte Expression von anderen *Cornified Envelope* Proteinen, wie den Mitgliedern der SPR (*Small Proline Rich*)-Protein-Familie (KOCH *et al.*, 2000). Genauere Untersuchungen zu möglichen kompensatorischen Mechanismen in den CD44 k/o Mäusen müssen in Zukunft noch erfolgen.

5.2.3 CD44 beeinträchtigt die Polarität von Keratinozyten

Die Ausbildung von interzellulären Verbindungen wird durch ein Calcium abhängiges Zusammenlagern von Cadherinen an den gegenüberliegenden Zellmembranen

angestoßen. Darauf folgt die Rekrutierung von Adhärenzverbindungs- (AJ; Adherens Junctions) und TJ-Proteinen, welche zusammen die so genannten *primordialen* (vorläufigen) Verbindungen ausbilden. Die Komponenten dieser *primordialen* Verbindungen sind an der basolateralen Seite der Plasmamembran lokalisiert. Die Assoziation von Tiam1 mit Par3 begünstigt die Aktivierung von Rac1, welche notwendig ist für die Aktivierung der aPKC des Polaritätskomplexes, damit JAM-A, Occludin und Claudine rekrutiert werden können und TJ-Stränge bilden. In Folge dessen separieren sich die TJ-Proteine von den AJ-Proteinen, teilen die Plasmamembran in einen apikalen und basolateralen Bereich für Lipide und führen damit zur Zellpolarität (MERTENS *et al.*, 2006).

Der Verlust von CD44 führt zu einer Beeinträchtigung der Polarisierung in kultivierten Keratinozyten. In den WT Zellen erfolgte eine eindeutige Separierung der TJ-Proteine Occludin bzw. Cldn4 und des AJ-Proteins E-cadherin entlang der lateralen Plasmamembranen, während Occludin und Cldn4 in den CD44 k/o Zellen in einer Ebene mit E-cadherin an den lateralen Seiten der Plasmamembranen lokalisiert waren. Diese Ergebnisse spiegeln eine gestörte Separierung der TJ-Proteine von den AJ-Proteinen und damit eine inkomplette Polarisierung der Zellen wider. Diese inkomplette Polarisierung könnte ebenfalls der Grund für den Verlust der apikalen Lokalisation der LBs in der Epidermis der CD44 k/o Mäuse sein, da ohne Polarisierung kein gerichteter Vesikeltransport erfolgen kann.

Neben der gestörten Separation der TJ-Proteine von den AJ-Proteinen wurde eine auffällig kurvige Verteilung der Proteine Cldn1, Occludin, ZO-1, ZO-2 und Par3 an den Zell-Zell-Kontakten der CD44 k/o Zellen gefunden. Eine ähnliche kurvige Verteilung von ZO-1 an den Zell-Zell-Kontakten wurde in Tuba-defizienten Zellen nachgewiesen (OTANI *et al.*, 2006). Tuba ist ein spezifischer Guanin Nukleotid Austauschfaktor (GEF; *guanine nucleotide exchange factor*) von Cdc42. Aufgrund der Ähnlichkeiten in den kurvigen Verteilungsmustern, der Wichtigkeit des GEFs Tiam1 für die Bildung von TJ-Strängen und der leicht verminderten Expression von Tiam1 in CD44 k/o Zellen, könnte dies ein Hinweis sein, dass Tiam1 eine Rolle bei der veränderten Anordnung der Zell-Zell-Kontakte der CD44 k/o Zellen spielt.

5.2.4 CD44 reguliert den Aufbau von Tight Junctions und ihre Barrierefunktion über Rac1 und Par3

Bei der Untersuchung, welche Mechanismen ursächlich sein könnten für die veränderte Lokalisation von TJ-Proteinen und die eingeschränkte TJ-Funktionalität, wurden erniedrigte Mengen der aktiven Form von Rac1 in den Hautlysaten der E17.5 CD44 k/o

Mäuse gefunden. Es wurde bereits an Brusttumor-Zellen gezeigt, dass Rac1 ein *downstream* Signalmolekül von CD44 ist. Die Bindung von Hyaluronsäure an CD44v3 stimuliert während der Migration der Brusttumor-Zellen die Tiam1-spezifische Rac1 Aktivierung (BOURGUIGNON *et al.*, 2000). Darüberhinaus ist bekannt, dass Rac1 ein wesentliches Molekül für den Aufbau von funktionellen TJs in Keratinozyten darstellt. MERTENS und Mitarbeiter (2005) konnten zeigen, dass ein defekter Aufbau von TJs in Tiam1 k/o Keratinozyten wiederhergestellt wurde, nachdem sie konstitutiv-aktives Rac1 in diese Zellen transfiziert hatten. In einer darauffolgenden Arbeit konnten HELFRICH und Mitarbeiter (2006) zeigen, dass die Inhibierung der aPKC Aktivität, trotz einer normalen Lokalisation von TJ-Proteinen, wie Cldn1, Occludin und ZO-1, an den Zell-Zell-Kontakten zu einem Verlust der TJ-Funktionalität in murinen Keratinozyten führt. Dies deutet darauf hin, dass aPKC-abhängige Phosphorylierungen eine Rolle für die Ausbildung funktioneller TJs in Keratinozyten spielen. AONO und HIRAI (2008) konnten kürzlich nachweisen, dass die aPKC in HaCaT-Zellen die Formation von TJs über die Phosphorylierung von Cldn4 reguliert. Demzufolge spielt die verminderte Menge an aktivem Rac1 eine wichtige Rolle in CD44 k/o Zellen. Dies sollte in Zukunft durch Transfektionen mit dominant-aktivem Rac1 genauer geklärt werden.

Während die Bedeutung von Tiam1, Rac1 und aPKC bei der Bildung von TJs in Keratinozyten bereits gezeigt wurde, ist noch nicht genau geklärt, welche Funktion dabei die Polaritätskomplex-Proteine Par3 und Par6 haben. Die aPKC bildet einen Komplex mit Par3 und Par6. Aus einfachen Epithelien ist bekannt, dass sie essentiell für die Formation von TJs sind (OHNO, 2001; MACARA, 2004). Par6 ist dabei wichtig für die Aktivierung von aPKC. Durch die Anbindung von aPKC an die GTP-gebundene Form von Rac1 und Cdc42 kommt es zu einer Konformationsänderung von Par6, welches anschließend die Aktivierung der aPKC ermöglicht (JOBERTY *et al.*, 2000; LIN *et al.*, 2000; GARRARD *et al.*, 2003). Das Gerüstprotein Par3 bindet an JAM-A und ist vermutlich wichtig für die Rekrutierung des Par6/aPKC Komplexes zu den TJs (EBNET *et al.*, 2001). Par3 umfasst 3 Isoformen mit molekularen Massen von 100, 150 und 180 kDa, die durch alternatives Spleißen entstehen. Alle drei Isoformen besitzen die 3 PDZ Domänen, dahingegen fehlt der kleinsten Isoform die aPKC Bindungsstelle (LIN *et al.*, 2000). In Nierenepithel-Zellen wurde gezeigt, dass ein Par3 *knock-down* die Rac1 Aktivität reduziert und dass dieser Vorgang eine zentrale Rolle bei der Formation von TJs in diesen Zellen spielt (OOSHIO *et al.*, 2007). In den CD44 k/o Keratinozyten wurde eine verminderte Proteinexpression der 150 kDa und 180 kDa Isoform von Par3 sowohl in Kulturzellen nach Ca^{2+} -*switch* als auch in der Epidermis am Tag E17.5 nachgewiesen. Diese Herunterregulationen *in vitro* und *in vivo* lassen vermuten, dass diese Isoformen von Par3 eine wichtige Rolle in Aufbau und Funktion von TJs in murinen Keratinozyten spielen und dass sie beteiligt sein könnten an

der verminderten Rac1 Aktivität. Gegenteilig zu der Herunterregulation von Par3 auf Proteinebene, wurde eine erhöhte Lokalisation von Par3 an den Zell-Zell-Kontakten der CD44 k/o Zellen gefunden. Möglicherweise stellt das die 100 kDa Isoform dar, die keine Veränderung der Proteinmenge zeigt. Da diese Isoform nicht in der Lage ist aPKC zu binden, könnte durch ihre Anwesenheit keine korrekte Formierung von TJs eingeleitet werden. Zukünftige Experimente, z.B. durch das Wiedereinbringen von Par3 in die CD44 k/o Zellen, könnten diesen Aspekt der Regulation von TJs weiter aufklären.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass CD44 ein *upstream* Regulator für die Formation und die Funktion von TJs in murinen Keratinozyten ist. Der Verlust von CD44 verändert die TJ-Proteinexpression und Lokalisation in embryonaler Epidermis und in kultivierten Keratinozyten. Die Zellpolarität ist verändert und die TJ-Barrierefunktion für Ionen ist gestört. Die verminderte Expression der 180 und 150 kDa Par3 Isoformen und die verminderte Rac1 Aktivität sind vermutlich beteiligt an diesen Veränderungen von TJs. Die temporäre Korrelation zwischen der Beeinträchtigung der Hautbarrierefunktion und der Veränderung von TJs in CD44 k/o Mäusen lässt vermuten, dass TJs in dem Hautbarriere-Phänotyp dieser Mäuse involviert sind. Die gestörte Separation von AJ- und TJ-Proteinen und demzufolge die gestörten Zellpolarität könnte zu der beobachteten Veränderung der Zellpolarität in der Granularzellschicht der CD44 k/o Epidermis beitragen.

5.3 Vergleich der TJ-Barrierefunktion in murinen und humanen Modellsystemen

In diesem letzten Kapitel der Diskussion sollen die erhaltenen Ergebnisse herangezogen werden, um folgende Fragen näher zu beleuchten: (1) Findet man allgemeine Prinzipien bezüglich der Korrelation von Expression/Lokalisation von TJ-Proteinen und der TJ-Barrierefunktion? (2) Lassen sich die Ergebnisse aus der Maus auf den Menschen übertragen? und (3) Generieren *in vitro* Untersuchungen vergleichbare Ergebnisse zu *in vivo* Untersuchungen?

In kultivierten murinen und humanen Keratinozyten konnte in dieser Arbeit und auch in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass funktionelle TJs bezüglich des Aufbaus eines transepithelialen Widerstands und als Barriere für FITC-Dextrane vorliegen (MERTENS *et al.*, 2005; HELFRICH *et al.*, 2006; YUKI *et al.*, 2007; AONO & HIRAI, 2008; YAMAMOTO *et al.*, 2008). Zur Untersuchung der Korrelation von Expression und Lokalisation von TJ-Proteinen und der TJ-Funktionalität in Keratinozyten wurden in der vorliegenden Arbeit zwei unterschiedliche Modellsysteme verwendet. Zum einen humane Keratinozyten, die

mit pro-inflammatorischen Zytokinen behandelt wurden und zum anderen murine Keratinozyten, die für einen Oberflächenrezeptor defizient sind. Sowohl längere Inkubation von humanen Keratinozyten mit Zytokinen als auch der Verlust von CD44 in murinen Keratinozyten führen zu einer Erniedrigung des TERs. Diese Erniedrigung des TERs wird in beiden Fällen von einer verminderten Immunlokalisation von Cldn1 und ZO-1 an den Zell-Zell-Kontakten sowie einem Verlust der Proteinmengen beider Proteine begleitet. Auf mRNA-Ebene wurde für Cldn1 ein verminderter mRNA-Gehalt nachgewiesen. Somit scheint die Expression/Lokalisation dieser Proteine essentiell für die Funktion von TJs in Keratinozyten zu sein. Dies unterstützen Beobachtungen von YAMAMOTO und Mitarbeitern (2008), die eine Erniedrigung des TERs nach Behandlung der Zellen mit siRNA für Cldn1 und eine daraus folgende verminderte Lokalisation von Cldn1 und ZO-1 an den Zell-Zell-Kontakten beobachtet haben. Gegensätzlich in den hier untersuchten Zellkulturen verhalten sich dagegen Cldn4 und Occludin. Während für Cldn4 in CD44 k/o Zellen eine verminderte Lokalisation an den Zell-Zell-Kontakten und eine verminderte Proteinmenge nachgewiesen wurde, war weder die Lokalisation (mit Ausnahme einer verstärkten intrazellulären Lokalisation) noch die Proteinmenge von Cldn4 nach längerer IL-1 β -Behandlung verändert, trotz erniedrigtem TER. Letzteres steht auch im Gegensatz zu Beobachtungen von YUKI und Mitarbeitern (2007), die nach Ochratoxin A-Behandlung spezifisch einen Verlust von Cldn4 und eine Erniedrigung des TERs beobachten konnten. Eventuell deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass bereits der Verlust von einem Claudin bzw. die daraufhin gestörte Komposition der TJs zu einer Erniedrigung des TER führt. Bei der Remodellierung von TJ-Strukturen durch selektives Entfernen oder Rekrutieren von TJ-Proteinen bleiben die TJ-Strukturen erhalten, aber die TJ-Komponenten sind verändert, so dass es möglicherweise zum Austausch von *tight* (undurchlässige) TJs gegen *leaky* (durchlässigen) TJs kommt, oder auch andersherum (TURKSEN & TROY, 2004; KRAUSE *et al.*, 2008).

Umgekehrt war Occludin zwar in IL-1 β -behandelten Zellen auf Proteinebene stark herabreguliert, dies war aber nicht der Fall bei CD44 k/o Zellen. Interessanterweise zeigen auch Occludin-defiziente Zellen (SAITOU *et al.*, 1998) und auch Occludin-defiziente Mäuse (SAITOU *et al.*, 2000; SCHULZKE *et al.*, 2005) keine Defekte in der Barrierefunktion von TJs. Nachdem könnte die An- oder Abwesenheit von Occludin eventuell andere wichtige Funktionen haben, z.B. in der Modulation der TJ-Selektivität.

Zusammenfassend konnten in den beiden Zellkulturen sowohl Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten gezeigt werden. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Unterschiede aufgrund von Differenzen zwischen menschlichen und murinen Zellen festgestellt wurden. Mäuse stellen aufgrund der *Knock-out*-Technologie

ein wichtiges Untersuchungsobjekt dar. Letztlich ist aber vor allem die Übertragbarkeit dieser Erkenntnisse auf den Menschen von Bedeutung. Dabei sollte bezüglich der Haut bedacht werden, dass sie sich zwischen Mensch und Maus in verschiedenen Aspekten unterscheidet. Die Haut der behaarten und unbehaarten Mäuse besteht nur aus wenigen Zellschichten, die Haut der behaarten Maus enthält darüber hinaus viele Haarfollikel. Demgegenüber umfasst die menschliche Haut wenige Haarfollikel und viele Zellschichten. Beispielsweise ist die Penetration von topisch applizierten Stoffen in der Mauhaut im Vergleich zur menschlichen Haut erhöht (BOND & BARRY, 1988). Hinsichtlich der TJ-Proteine und TJ-Strukturen findet man aber in der menschlichen und in der murinen Haut und in davon abgeleiteten Zellkulturen eine vergleichbare Expression und Lokalisation (als Übersicht siehe BRANDNER, 2009). Auch kann man, wie in dieser Arbeit beschrieben, in beiden den Stop des 557 Da *Tracers* an TJs im *Stratum granulosum* beobachten. Die Vergleichbarkeit gilt vor allem für die Haut von neugeborenen Mäusen, da diese mehr Schichten umfasst als die Haut der erwachsenen Mäuse. Weitere Untersuchungen müssen in Zukunft das Problem der Übertragbarkeit weiter betrachten.

Beim Vergleich von Ergebnissen aus Zellkulturen mit denen der Haut sollte bedacht werden, dass Zellkulturen zwar häufig als Modellsysteme für Gewebe verwendet werden, aber natürlich nur eine Näherung darstellen können. Dies gilt besonders für das dreidimensionale, luft-exponierte System der Epidermis, dem das zweidimensionale, von Medium bedeckte System der Keratinozyten-Zellkultur gegenüber steht. Die bessere Manipulierbarkeit und die gezielteren Möglichkeiten der Untersuchung machen Zellkulturen aber weiterhin unverzichtbar. Deshalb ist es von besonderem Interesse die Vorgänge in Zellkulturen, mit solchen in der Epidermis zu vergleichen. Generell zeigte sich in dieser Arbeit, dass das jeweilige Modell im Vergleich von Zellkultur zur Haut dieselben TJ-Proteine als Schlüssel-Moleküle aufweist. Der Vergleich der Ergebnisse aus CD44 k/o Mauhaut mit denen aus der Zellkultur zeigt eine verminderte Expression von Cldn1, Cldn4, ZO-1 und Par3 sowie einen verzögerten Barriereaufbau in beiden Systemen. Weitergehende vergleichende Untersuchungen, z.B. bezüglich der verschiedenen TJ-Barrieren in beiden Systemen, stehen aber noch aus. Ebenfalls vergleichbar sind die Ergebnisse der Zellkulturen, die mit IL-1 β und TNF α manipuliert wurden, und der *ex vivo* Modelle, in die diese Zytokine injiziert wurden. Hier konnte nach 24-stündiger Inkubation in beiden Systemen eine verstärkte Expression bzw. Lokalisation von Occludin und ZO-1 an den Zell-Zell-Kontakten beobachtet werden, die auch in der frühen Psoriasis zu finden ist. Dahingegen konnte die schwache Herunterregulation von Cldn1 in den obersten Schichten im *ex vivo* Modell, die ebenfalls in der frühen Psoriasis zu beobachten ist, auf Zellkultur-Ebene nach 24 h nicht bestätigt werden. Dies zeigt, dass die Untersuchung von Zellkulturen zwar hilfreiche Informationen liefern können, dass aber

gerade in stratifizierten Epithelien auf den Vergleich mit dem Gewebe nicht verzichtet werden kann.

6 Zusammenfassung

Die Rolle von Tight junctions in der Barrierefunktion der Haut ist noch nicht abschliessend geklärt, molekulare Mechanismen der Beeinflussung von kutanen TJs sind noch weitgehend unbekannt. In dieser Arbeit wurden deshalb die Expression und Lokalisation von TJ-Proteinen sowie die TJ-Funktionalität in zwei Modellen, die einen Barrieredefekt in der Haut aufweisen, die Hautkrankheit Psoriasis und ein CD44 k/o Mausmodell, untersucht.

Psoriasis ist eine entzündliche Hautkrankheit, die charakterisiert ist durch die Hyperproliferation von Keratinozyten, eine gestörte Barrierefunktion des *Stratum corneums* und einer erhöhten Infiltration von Entzündungszellen. Eine veränderte Lokalisation von TJ-Proteinen tritt bereits in der frühen Phase der Psoriasis auf. In dieser Phase sind Occludin, ZO-1 und Cldn4 im Vergleich zur gesunden Haut in mehr Zellschichten der Epidermis lokalisiert, während Cldn1 und Cldn7 in den oberen und unteren Schichten der Epidermis herunterreguliert sind. In der stark ausgeprägten Form der Psoriasis, der Plaque-Psoriasis, findet man ebenfalls die verbreiterte Lokalisation von Occludin und ZO-1, während die Claudine zum Teil vergleichbar zur frühen Phase exprimiert sind, zum Teil aber auch weiter herunterreguliert sind. Die Veränderung von TJ-Proteinen ist somit ein frühes Ereignis in der Psoriasis und nicht die Konsequenz der weitreichenden Veränderungen in der Epidermis der Plaque-Psoriasis. Mittels PCR-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Veränderungen für Occludin, ZO-1 und Cldn1 auch auf RNA-Ebene beobachtet werden können, während dies für die anderen Moleküle nicht der Fall war. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die verbreiterte Lokalisation der TJ-Proteine dazu führt, dass funktionelle TJs, d.h. TJs mit Barrierefunktion für einen molekularen *Tracer*, nicht wie in der normalen Haut in der obersten lebenden Schicht der Epidermis, sondern bereits in tieferen Schichten vorliegen. Dies deutet darauf hin, dass die verbreiterte Expression von TJ-Proteinen in Psoriasis ein Rettungssystem darstellen könnte für die eingeschränkte Barrierefunktion des *Stratum corneums*.

Eine Behandlung von *ex vivo* Hautmodellen mit den pro-inflammatorischen Zytokinen IL-1 β and TNF α , die in erhöhten Konzentrationen in Psoriasis vorkommen, bewirken eine Hochregulation von Occludin und ZO-1, sowie teilweise eine Herunterregulation von Cldn1, ähnlich den Veränderungen in der frühen Phase der Psoriasis. In kultivierten Keratinozyten resultiert die Behandlung mit den Zytokinen in Veränderungen der Lokalisation und Proteinexpression von TJ-Proteinen, die sich mit einer verstärkten TJ-Barrierefunktion zu frühen Zeitpunkten und einer Erniedrigung dieser zu späteren Zeitpunkten korrelieren lassen. Da diese Zytokine wichtig in Psoriasis sind und da

ähnliche Veränderungen in der frühen Phase der Psoriasis und in Zytokin-injizierten Modellen beobachtet wurden, ist es wahrscheinlich, dass sie eine zentrale Rolle in der Regulation von TJs in der Psoriasis spielen.

Die Untersuchungen des CD44 k/o Mausmodells zeigten, dass CD44 ein Regulator für die Formation und die Funktion von TJs in murinen Keratinozyten ist. Der Verlust von CD44 verändert die TJ-Proteinexpression und Lokalisation in embryonaler Epidermis und in kultivierten Keratinozyten. Dieser Verlust ist temporär, denn ausschließlich E17.5 Embryonen weisen eine epidermale Herunterregulation der TJ-Proteine Cldn1, Cldn4, und ZO-1, sowie der für ihren Aufbau wichtigen Polaritätsproteine Par3 und die aktive Form von Rac1, auf. Die E18.5 k/o Mäuse zeigen demgegenüber eine vermehrte Expression von Cldn4, ZO-1, Par3 und keine Veränderungen in der aktiven Form von Rac1. Diese temporären Veränderungen treten parallel zur Beeinträchtigung der Hautbarrierefunktion dieser Mäuse auf: Am Tag E17.5 ist die Barrierefunktion im Vergleich zum Wildtyp noch eingeschränkt, während sie am Tag E18.5 wiederhergestellt ist. Die Funktionalität von TJs in CD44 k/o Keratinozyten ist bezüglich der Barrierefunktion für Ionen eingeschränkt, wohingegen die Permeabilität für grössere Moleküle weder *in vitro* noch *in vivo* verändert ist.

Darüberhinaus führt die CD44-Defizienz zu einer Beeinträchtigung der Polarisierung in kultivierten Keratinozyten. In den WT Zellen erfolgte eine eindeutige Separierung der TJ-Proteine Occludin bzw. Cldn4 vom Adhärensverbindungs-Protein E-cadherin entlang der lateralen Plasmamembranen, während Occludin und Cldn4 in den CD44 k/o Zellen in einer Ebene mit E-cadherin lokalisiert waren. Diese inkomplette Polarisierung ist vermutlich der Grund für den Verlust der apikalen Lokalisation der *Lamellar Bodies* in der Epidermis der CD44 k/o Mäuse, da kein gerichteter Vesikeltransport erfolgen kann. Zusätzlich wurde eine auffällig kurvige Anordnung der Proteine Cldn1, Occludin, ZO-1, ZO-2 und Par3 an den Zell-Zell-Kontakten der CD44 k/o Zellen gefunden, an der wahrscheinlich Tiam1 beteiligt ist.

Es konnte somit in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Tight Junctions an der Barrierefunktion der Haut beteiligt sind. Zum einen sind TJs bei der Psoriasis, einer Hautkrankheit, die einen schon vorhandenen Hautbarrieredefekt zeigt, mit ihrer verbreiteten Lokalisation und Expression als ein Rettungssystem zu sehen. Ein Prozess an dem wahrscheinlich IL-1 β und TNF α beteiligt sind. Auf der anderen Seite trägt die Herunterregulation von TJ-Proteinen und Funktionalität aufgrund der Defizienz für CD44, vermutlich vermittelt über Par3 und Rac1, ursächlich zu der Barrierestörung der Haut von CD44 k/o Mäusen bei.

7 Literaturverzeichnis

- AIJAZ S., BALDA M.S., MATTER K. & KWANG W.J.** (2006) *Tight Junctions: Molecular Architecture and Function*. International Review of Cytology. 248:261-298
- AL-SADI R.M. & MA T.Y.** (2007) *IL-1beta Causes an Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability*. The Journal of Immunology. 178:7:4641-4649
- AMASHEH M., GROTHJOHANN I., AMASHEH S., FROMM A., SÖDERHOLM J.D., ZEITZ M., FROMM M. & SCHULZKE J.-D.** (2009) *Regulation of mucosal structure and barrier function in rat colon exposed to tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in vitro: A novel model for studying the pathomechanisms of inflammatory bowel disease cytokines*. Scandinavian Journal of Gastroenterology. 44:10:1226 - 1235
- ANDERSON J.M.** (2001) *Molecular Structure of Tight Junctions and Their Role in Epithelial Transport*. News in Physiological Sciences. 16:3:126-130
- ANDERSON J.M., VAN ITALLIE C.M. & FANNING A.S.** (2004) *Setting up a selective barrier at the apical junction complex*. Current Opinion in Cell Biology. 16:2:140-145
- ANDREEVA A.Y., KRAUSE E., MÜLLER E.-C., BLASIG I.E. & UTEPBERGENOV D.I.** (2001) *Protein Kinase C Regulates the Phosphorylation and Cellular Localization of Occludin*. Journal of Biological Chemistry. 276:42:38480-38486
- AONO S. & HIRAI Y.** (2008) *Phosphorylation of claudin-4 is required for tight junction formation in a human keratinocyte cell line*. Experimental Cell Research. 314:18:3326-3339
- ARUFFO A., STAMENKOVIC I., MELNICK M., UNDERHILL C.B. & SEED B.** (1990) *CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate*. Cell. 61:7:1303-1313
- BALDA M.S., GARRETT M.D. & MATTER K.** (2003) *The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density*. The Journal of Cell Biology. 160:3:423-432
- BOND J.R. & BARRY B.W.** (1988) *Hairless Mouse Skin is Limited as a Model for Assessing the Effects of Penetration Enhancers in Human Skin*. Journal of Investigative Dermatology. 90:6:810-813
- BOURGUIGNON L.Y.W., ZHU H., SHAO L. & CHEN Y.W.** (2000) *CD44 Interaction with Tiam1 Promotes Rac1 Signaling and Hyaluronic Acid-mediated Breast Tumor Cell Migration*. The Journal of Biological Chemistry. 275:3:1829-1838
- BOURGUIGNON L.Y.W., RAMEZ M., GILAD E., SINGLETON P.A., MAN M.-Q., CRUMRINE D.A., ELIAS P.M. & FEINGOLD K.R.** (2006) *Hyaluronan-CD44 Interaction Stimulates Keratinocyte Differentiation, Lamellar Body Formation/Secretion, and Permeability Barrier Homeostasis*. Journal of Investigative Dermatology. 126:6:1356-1365
- BRANDNER J.M., KIEF S., GRUND C., RENDL M., HOUDEK P., KUHN C., TSCHACHLER E., FRANKE W.W. & MOLL I.** (2002) *Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes*. European Journal of Cell Biology. 81:253-263
- BRANDNER J.M., KIEF S., WLADYKOWSKI E., HOUDEK P. & MOLL I.** (2006) *Tight Junction Proteins in the Skin*. Skin Pharmacology and Physiology. 19:2:71-77
- BRANDNER J.M.** (2009) *Tight junctions and tight junction proteins in mammalian epidermis*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 72:2:289-294
- BYRNE C., HARDMAN M. & NIELD K.** (2003) *Covering the limb - formation of the integument*. Journal of Anatomy. 202:1:113-123

- CITI S., SABANAY H., JAKES R., GEIGER B. & KENDRICK-JONES J.** (1988) *Cingulin, a new peripheral component of tight junctions*. *Nature*. 333:6170:272-276
- CLAYBURGH D.R., BARRETT T.A., TANG Y., MEDDINGS J.B., VAN ELDIK L.J., WATTERSON D.M., CLARKE L.L., MRSNY R.J. & TURNER J.R.** (2005) *Epithelial myosin light chain kinase-dependent barrier dysfunction mediates T cell activation-induced diarrhea in vivo*. *The Journal of Clinical Investigation*. 115:10:2702-2715
- COOPER K.D., HAMMERBERG C., BAADSGAARD O., ELDER J.T., CHAN L.S., TAYLOR R.S., VOORHEES J.J. & FISHER G.** (1990) *Interleukin-1 in Human Skin: Dysregulation in Psoriasis*. *Journal of Investigative Dermatology*. 95:5:24-26
- COYNE C.B., VANHOOK M.K., GAMBLING T.M., CARSON J.L., BOUCHER R.C. & JOHNSON L.G.** (2002) *Regulation of Airway Tight Junctions by Proinflammatory Cytokines*. *Molecular Biology of the Cell*. 13:9:3218-3234
- D'SOUZA T., INDIG F.E. & MORIN P.J.** (2007) *Phosphorylation of claudin-4 by PKC[epsilon] regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells*. *Experimental Cell Research*. 313:15:3364-3375
- EBNET K., SUZUKI A., HORIKOSHI Y., HIROSE T., MEYER ZU BRICKWEDDE M.-K., OHNO S. & VESTWEBER D.** (2001) *The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM)*. *The EMBO Journal*. 20:14:3738-3748
- EBNET K., SUZUKI A., OHNO S. & VESTWEBER D.** (2004) *Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions?* *Journal of Cell Science*. 117:1:19-29
- ELIAS P., M., MCNUTT N.S. & FRIEND D., S.** (1977) *Membrane alterations during cornification of mammalian squamous epithelia: A freeze-fracture, tracer, and thin-section study*. *The Anatomical Record*. 189:4:577-593
- ELIAS P.M. & FRIEND D.S.** (1975) *The permeability barrier in mammalian epidermis*. *The Journal of Cell Biology*. 65:1:180-191
- ELIAS P.M. & FRIEND D.S.** (1976) *Vitamin-A-induced mucous metaplasia. An in vitro system for modulating tight and gap junction differentiation*. *The Journal of Cell Biology*. 68:2:173-188
- ETTEHADI P., GREAVES M.W., WALLACH D., ADERKA D. & CAMP R.D.** (1994) *Elevated tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) biological activity in psoriatic skin lesions*. *Clinical & Experimental Immunology*. 96:1:146-151
- FARQUHAR M.G. & PALADE G.E.** (1963) *Junctional Complexes in various Epithelia*. *The Journal of Cell Biology*. 17:2:375-412
- FAWCETT D.** (1994) *A textbook of histology*. Chapman and Hall, New York.69
- FOX S.B., FAWCETT J., JACKSON D.G., COLLINS I., GATTER K.C., HARRIS A.L., GEARING A. & SIMMONS D.L.** (1994) *Normal Human Tissues, in Addition to Some Tumors, Express Multiple Different CD44 Isoforms*. *Cancer Research*. 54:16:4539-4546
- FURUSE M., HIRASE T., ITOH M., NAGAFUCHI A., YONEMURA S., TSUKITA S. & TSUKITA S.** (1993) *Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions*. *J. Cell Biol.* 123:6:1777-1788
- FURUSE M., FURUSE K., SASAKI H. & TSUKITA S.** (2001) *Conversion of Zonulae Occludentes from Tight to Leaky Strand Type by Introducing Claudin-2 into Madin-Darby Canine Kidney I Cells*. *The Journal of Cell Biology*. 153:2:263-272
- FURUSE M., HATA M., FURUSE K., YOSHIDA Y., HARATAKE A., SUGITANI Y., NODA T., KUBO A. & TSUKITA S.** (2002) *Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice*. *The Journal of Cell Biology*. 156:1099 - 1111

- FURUSE M. & TSUKITA S.** (2006) *Claudins in occluding junctions of humans and flies.* Trends in Cell Biology. 16:4:181-188
- GARRARD S.M., CAPALDO C.T., GAO L., ROSEN M.K., MACARA I.G. & TOMCHICK D.R.** (2003) *Structure of Cdc42 in a complex with the GTPase-binding domain of the cell polarity protein, Par6.* The EMBO Journal. 22:5:1125-1133
- GLIKI G., EBNET K., AURRAND-LIONS M., IMHOF B.A. & ADAMS R.H.** (2004) *Spermatid differentiation requires the assembly of a cell polarity complex downstream of junctional adhesion molecule-C.* Nature. 431:7006:320-324
- HADJ-RABIA S., BAALA L., VABRES P., HAMEL-TEILLAC D., JACQUEMIN E., FABRE M., LYONNET S., PROST Y.D., MUNNICH A., HADCHOUEL M. & SMAHI A.** (2004) *Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: A tight junction disease.* Gastroenterology. 127:5:1386-1390
- HARDMAN M.J., SISI P., BANBURY D.N. & BYRNE C.** (1998) *Patterned acquisition of skin barrier function during development.* Development. 125:8:1541-1552
- HARDMAN M.J., MOORE L., FERGUSON M.W.J. & BYRNE C.** (1999) *Barrier Formation in the Human Fetus is Patterned.* Journal of Investigative Dermatology. 113:6:1106-1113
- HASHIMOTO K.** (1971) *Intercellular Spaces of the Human Epidermis as demonstrated with Lanthanum.* Journal of Investigative Dermatology. 57:1:17-31
- HELFRICH I., SCHMITZ A., ZIGRINO P., MICHELS C., HAASE I., BIVIC A.L., LEITGES M. & NIESSEN C.M.** (2006) *Role of aPKC Isoforms and Their Binding Partners Par3 and Par6 in Epidermal Barrier Formation.* Journal of Investigative Dermatology. 127:4:782-791
- HENNINGS H. & HOLBROOK K.A.** (1983) *Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture : An ultrastructural study.* Experimental Cell Research. 143:1:127-142
- HIRANO H., SCRETON G.R., BELL M.V., JACKSON D.G., BELL J.I. & HODES R.J.** (1994) *CD44 isoform expression mediated by alternative splicing: tissue-specific regulation in mice.* International Immunology. 6:1:49-59
- HURD T.W., GAO L., ROH M.H., MACARA I.G. & MARGOLIS B.** (2003) *Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly.* Nature Cell Biology. 5:2:137-142
- IKENOUCI J., FURUSE M., FURUSE K., SASAKI H., TSUKITA S. & TSUKITA S.** (2005) *Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells.* The Journal of Cell Biology. 171:6:939-945
- JOBERTY G., PETERSEN C., GAO L. & MACARA I.G.** (2000) *The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42.* Nature Cell Biology. 2:8:531-539
- KIMURA K., TERANISHI S., FUKUDA K., KAWAMOTO K. & NISHIDA T.** (2008) *Delayed Disruption of Barrier Function in Cultured Human Corneal Epithelial Cells Induced by Tumor Necrosis Factor- α in a Manner Dependent on NF- κ B.* Investigative Ophthalmology & Visual Science. 49:2:565-571
- KIMURA K., TERANISHI S. & NISHIDA T.** (2009) *Interleukin-1 β -Induced Disruption of Barrier Function in Cultured Human Corneal Epithelial Cells.* Investigative Ophthalmology & Visual Science. 50:2:597-603
- KOCH P.J., DE VIRAGH P.A., SCHARER E., BUNDMAN D., LONGLEY M.A., BICKENBACH J., KAWACHI Y., SUGA Y., ZHOU Z., HUBER M., HOHL D., KARTASOVA T., JARNIK M., STEVEN A.C. & ROOP D.R.** (2000) *Lessons from Loricrin-deficient Mice: Compensatory Mechanisms Maintaining Skin Barrier Function in the Absence of a Major Cornified Envelope Protein.* The Journal of Cell Biology. 151:2:389-400

- KRAUSE G., WINKLER L., MUELLER S.L., HASELOFF R.F., PIONTEK J. & BLASIG I.E.** (2008) *Structure and function of claudins*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1778:3:631-645
- KURAMOTO N., TAKIZAWA T., TAKIZAWA T., MATSUKI M., MORIOKA H., ROBINSON JM & K. Y.** (2002) *Development of ichthyosiform skin compensates for defective permeability barrier function in mice lacking transglutaminase 1*. *The Journal of Clinical Investigation*. 109:2:243-250
- LÄMMLI U.K.** (1970) *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4*. *Nature*. 227:5259:680-685
- LANGBEIN L., GRUND C., KUHN C., PRAETZEL S., KARTENBECK J., BRANDNER J.M., MOLL I. & FRANKE W.W.** (2002) *Tight junctions and compositionally related junctional structures in mammalian stratified epithelia and cell cultures derived therefrom*. *European Journal of Cell Biology*. 81:8:419-435
- LEMMERS C., MICHEL D., LANE-GUERMONPREZ L., DELGROSSI M.-H., MEDINA E., ARSANTO J.-P. & LE BIVIC A.** (2004) *CRB3 Binds Directly to Par6 and Regulates the Morphogenesis of the Tight Junctions in Mammalian Epithelial Cells*. *Molecular Biology of the Cell*. 15:3:1324-1333
- LEYVRAZ C., CHARLES R.-P., RUBERA I., GUITARD M., ROTMAN S., BREIDEN B., SANDHOFF K. & HUMMLER E.** (2005) *The epidermal barrier function is dependent on the serine protease CAP1/Prss8*. *The Journal of Cell Biology*. 170:3:487-496
- LIEW C.W., VOCKEL M., GLASSMEIER G., BRANDNER J., M., FERNANDEZ-BALLESTER G., J., SCHWARZ J., R., SCHULZ S., BUCK F., SERRANO L., RICHTER D. & KREIENKAMP H.-J.** (2009) *Interaction of the human somatostatin receptor 3 with the multiple PDZ domain protein MUPP1 enables somatostatin to control permeability of epithelial tight junctions*. *FEBS letters*. 583:1:49-54
- LIN D., EDWARDS A.S., FAWCETT J.P., MBAMALU G., SCOTT J.D. & PAWSON T.** (2000) *A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity*. *Nature Cell Biology*. 2:8:540-547
- LIVAK K.J. & SCHMITTGEN T.D.** (2001) *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $[\Delta\Delta]CT$ Method*. *Methods*. 25:4:402-408
- MA T.Y., IWAMOTO G.K., HOA N.T., AKOTIA V., PEDRAM A., BOIVIN M.A. & SAID H.M.** (2004) *TNF- α -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF- κ B activation*. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 286:3:367-376
- MACARA I.G.** (2004) *Par Proteins: Partners in Polarization*. *Current Biology*. 14:4:160-162
- MACKAY C.R., TERPE H.J., STAUDER R., MARSTON W.L., STARK H. & GUNTHER U.** (1994) *Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans*. *The Journal of Cell Biology*. 124:1:71-82
- MADISON K.C.** (2003) *Barrier Function of the Skin: La Raison d'Etre of the Epidermis*. *Journal of Investigative Dermatology*. 121:2:231-241
- MALMINEN M., KOIVUKANGAS V., PELTONEN J., KARVONEN S.L., OIKARINEN A. & PELTONEN S.** (2003) *Immunohistological distribution of the tight junction components ZO-1 and occludin in regenerating human epidermis*. *British Journal of Dermatology*. 149:2:255-260
- MATTER K., AIJAZ S., TSAPARA A. & BALDA M.S.** (2005) *Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation*. *Current Opinion in Cell Biology*. 17:5:453-458

- MCCARTHY K.M., SKARE I.B., STANKEWICH M.C., FURUSE M., TSUKITA S., ROGERS R.A., LYNCH R.D. & SCHNEEBERGER E.E.** (1996) *Occludin is a functional component of the tight junction.* Journal of Cell Science. 109:9:2287-2298
- MENON G.K., GHADIALLY R., WILLIAMS M.L. & ELIAS P.M.** (1992) *Lamellar bodies as delivery systems of hydrolytic enzymes: Implications for normal and abnormal desquamation.* British Journal of Dermatology. 126:4:337-345
- MERTENS A.E.E., RYGIEL T.P., OLIVO C., VAN DER KAMMEN R. & COLLARD J.G.** (2005) *The Rac activator Tiam1 controls tight junction biogenesis in keratinocytes through binding to and activation of the Par polarity complex.* The Journal of Cell Biology. 170:7:1029-1037
- MERTENS A.E.E., PEGTEL D.M. & COLLARD J.G.** (2006) *Tiam1 takes PARt in cell polarity.* Trends in Cell Biology. 16:6:308-316
- MORITA K., ITOH M., SAITOU M., ANDO-AKATSUKA Y., FURUSE M., YONEDA K., IMAMURA S., FUJIMOTO K. & TSUKITA S.** (1998) *Subcellular Distribution of Tight Junction-Associated Proteins (Occludin, ZO-1, ZO-2) in Rodent Skin.* Journal of Investigative Dermatology. 110:6:862-866
- MORITA K., FURUSE M., YOSHIDA Y., ITOH M., SASAKI H., TSUKITA S. & MIYACHI Y.** (2002) *Molecular Architecture of Tight Junctions of Periderm Differs From That of the Maculae Occludentes of Epidermis.* Journal of Investigative Dermatology. 118:6:1073-1079
- MOTTA S., MONTI M., SESANA S., MELLES L., GHIDONI R. & CAPUTO R.** (1994) *Abnormality of water barrier function in psoriasis. Role of ceramide fractions.* Archives of Dermatology. 130:4:452-456
- NIESSEN C.M.** (2007) *Tight Junctions//Adherens Junctions: Basic Structure and Function.* Journal of Investigative Dermatology. 127:11:2525-2532
- NITTA T., HATA M., GOTOH S., SEO Y., SASAKI H., HASHIMOTO N., FURUSE M. & TSUKITA S.** (2003) *Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice.* The Journal of Cell Biology. 161:3:653-660
- NUNBHAKDI-CRAIG V., MACHLEIDT T., OGRIS E., BELLOTTO D., WHITE C.L., III & SONTAG E.** (2002) *Protein phosphatase 2A associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex.* The Journal of Cell Biology. 158:5:967-978
- OHNEMUS U., KOHRMEYER K., HOUDEK P., ROHDE H., WLADYKOWSKI E., VIDAL S., HORSTKOTTE M.A., AEPFELBACHER M., KIRSCHNER N., BEHNE M.J., MOLL I. & BRANDNER J.M.** (2007) *Regulation of Epidermal Tight-Junctions (TJ) during Infection with Exfoliative Toxin-Negative Staphylococcus Strains.* Journal of Investigative Dermatology. 128:4:906-916
- OHNO S.** (2001) *Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity.* Current Opinion in Cell Biology. 13:5:641-648
- OOSHIO T., FUJITA N., YAMADA A., SATO T., KITAGAWA Y., OKAMOTO R., NAKATA S., MIKI A., IRIE K. & TAKAI Y.** (2007) *Cooperative roles of Par-3 and afadin in the formation of adherens and tight junctions.* Journal of Cell Science. 120:14:2352-2365
- OTANI T., ICHII T., AONO S. & TAKEICHI M.** (2006) *Cdc42 GEF Tuba regulates the junctional configuration of simple epithelial cells.* The Journal of Cell Biology. 175:1:135-146
- PELTONEN S., RIEHOKAINEN J., PUMMI K. & PELTONEN J.** (2007) *Tight junction components occludin, ZO-1, and claudin-1, -4 and -5 in active and healing psoriasis.* British Journal of Dermatology. 156:3:466-472

- PÖTZL C. (in Vorbereitung) *Immunlokalisation von TJ-Proteinen in Psoriasis*. Universität Hamburg.
- PROKSCH E., FÖLSTER-HOLST R. & JENSEN J.-M. (2006) *Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema*. *Journal of Dermatological Science*. 43:3:159-169
- PROKSCH E., BRANDNER J., M. & JENSEN J.-M. (2008) *The skin: an indispensable barrier*. *Experimental Dermatology*. 17:12:1063-1072
- PROTIN U., SCHWEIGHOFFER T., JOCHUM W. & HILBERG F. (1999) *CD44-Deficient Mice Develop Normally with Changes in Subpopulations and Recirculation of Lymphocyte Subsets*. *The Journal of Immunology*. 163:9:4917-4923
- PUMMI K., MALMINEN M., AHO H., KARVONEN S.-L., PELTONEN J. & PELTONEN S. (2001) *Epidermal Tight Junctions: ZO-1 and Occludin are Expressed in Mature, Developing, and Affected Skin and In Vitro Differentiating Keratinocytes*. *Journal of Investigative Dermatology*. 117:5:1050-1058
- QIN Y., CAPALDO C., GUMBINER B.M. & MACARA I.G. (2005) *The mammalian Scribble polarity protein regulates epithelial cell adhesion and migration through E-cadherin*. *The Journal of Cell Biology*. 171:6:1061-1071
- RIAZUDDIN S., AHMED Z.M., FANNING A.S., LAGZIEL A., KITAJIRI S.-I., RAMZAN K., KHAN S.N., CHATTARAJ P., FRIEDMAN P.L., ANDERSON J.M., BELYANTSEVA I.A., FORGE A., RIAZUDDIN S. & FRIEDMAN T.B. (2006) *Tricellulin Is a Tight-Junction Protein Necessary for Hearing*. *The American Journal of Human Genetics*. 79:6:1040-1051
- SAITOU M., FUJIMOTO K., DOI Y., ITOH M., FUJIMOTO T., FURUSE M., TAKANO H., NODA T. & TSUKITA S. (1998) *Occludin-deficient Embryonic Stem Cells Can Differentiate into Polarized Epithelial Cells Bearing Tight Junctions*. *The Journal of Cell Biology*. 141:2:397-408
- SAITOU M., FURUSE M., SASAKI H., SCHULZKE J.-D., FROMM M., TAKANO H., NODA T. & TSUKITA S. (2000) *Complex Phenotype of Mice Lacking Occludin, a Component of Tight Junction Strands*. *Molecular Biology of the Cell*. 11:12:4131-4142
- SAWADA N., MURATA M., KIKUCHI K., OSANAI M., TOBIOKA H., KOJIMA T. & CHIBA H. (2003) *Tight junctions and human diseases*. *Medical Electron Microscopy*. 36:3:147-156
- SCHLÜTER H. (2004) *Schlussleisten (Zonulae occludentes) und biochemisch verwandte Strukturen: Tight Junction-Proteine und -Funktionen in mehrschichtigen Epithelien, mit besonderer Berücksichtigung der Plattenepithelmetaplasie*. Ruprecht Karls Universität, Heidelberg.
- SCHLÜTER H., MOLL I., WOLBURG H. & FRANKE W.W. (2007) *The different structures containing tight junction proteins in epidermal and other stratified epithelial cells, including squamous cell metaplasia*. *European Journal of Cell Biology*. 86:11-12:645-655
- SCHMITZ H., BARMAYER C., FROMM M., RUNKEL N., FOSS H.-D., BENTZEL C.J., RIECKEN E.-O. & SCHULZKE J.-D. (1999) *Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis*. *Gastroenterology*. 116:2:301-309
- SCHNEEBERGER E.E. & LYNCH R.D. (2004) *The tight junction: a multifunctional complex*. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 286:6:1213-1228
- SCHOTTTELIUS A., J. G. , MOLDAWER L., L. , DINARELLO C., A. , ASADULLAH K., STERRY W. & EDWARDS C., K. . (2004) *Biology of tumor necrosis factor-alpha; implications for psoriasis*. *Experimental Dermatology*. 13:4:193-222

- SCHULZKE J.D., GITTER A.H., MANKERTZ J., SPIEGEL S., SEIDLER U., AMASHEH S., SAITOU M., TSUKITA S. & FROMM M.** (2005) *Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1669:1:34-42
- SCREATON G.R., BELL M.V., BELL J.I. & JACKSON D.G.** (1993) *The identification of a new alternative exon with highly restricted tissue expression in transcripts encoding the mouse Pgp-1 (CD44) homing receptor. Comparison of all 10 variable exons between mouse, human, and rat*. *Journal of Biological Chemistry*. 268:17:12235-12238
- SEITER S., SCHADENDORF D., TILGEN W. & ZÖLLER M.** (1998) *CD44 Variant Isoform Expression in a Variety of Skin-Associated Autoimmune Diseases*. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 89:1:79-93
- SETH A., SHETH P., ELIAS B.C. & RAO R.** (2007) *Protein Phosphatases 2A and 1 Interact with Occludin and Negatively Regulate the Assembly of Tight Junctions in the CACO-2 Cell Monolayer*. *Journal of Biological Chemistry*. 282:15:11487-11498
- SEVILLA L.M., NACHAT R., GROOT K.R., KLEMENT J.F., UITTO J., DJIAN P., MAATTA A. & WATT F.M.** (2007) *Mice deficient in involucrin, envoplakin, and periplakin have a defective epidermal barrier*. *The Journal of Cell Biology*. 179:7:1599-1612
- SHIN K., FOGG V.C. & MARGOLIS B.** (2006) *Tight Junctions and Cell Polarity*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 22:1:207-235
- STEVENSON B.R. & KEON B.H.** (1998) *The Tight Junction: Morphology to Molecules*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 14:1:89-109
- TROY T.-C., LI Y., O'MALLEY L. & TURKSEN K.** (2007) *The temporal and spatial expression of Claudins in epidermal development and the accelerated program of epidermal differentiation in K14-CaSR transgenic mice*. *Gene Expression Patterns*. 7:4:423-430
- TSUKITA S., FURUSE M. & ITOH M.** (2001) *Multifunctional strands in tight junctions*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2:4:285-293
- TUNGGAL J.A., HELFRICH I., SCHMITZ A., SCHWARZ H., GÜNZEL D., FROMM M., KEMLER R., KRIEG T. & NIESSEN C.M.** (2005) *E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions*. *The EMBO Journal*. 24:6:1146-1156
- TURKSEN K. & TROY T.C.** (2002) *Permeability barrier dysfunction in transgenic mice overexpressing claudin 6*. *Development*. 129:7:1775 - 1784
- TURKSEN K. & TROY T.-C.** (2004) *Barriers built on claudins*. *Journal of Cell Science*. 117:12:2435-2447
- UMEDA K., IKENOUCI J., KATAHIRA-TAYAMA S., FURUSE K., SASAKI H., NAKAYAMA M., MATSUI T., TSUKITA S., FURUSE M. & TSUKITA S.** (2006) *ZO-1 and ZO-2 Independently Determine Where Claudins Are Polymerized in Tight-Junction Strand Formation*. *Cell* 126:4:741-754
- UNDERHILL C.** (1992) *CD44: the hyaluronan receptor*. *Journal of Cell Science* 103:2:293-298
- VAN ITALLIE C., RAHNER C. & ANDERSON J.M.** (2001) *Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability*. *The Journal of Clinical Investigation*. 107:10:1319-1327
- VOCKEL M.** (2009) *Funktion der Somatostatinrezeptoren in der humanen Epidermis*. Universität Hamburg.
- WATSON R.E.B., PODDAR R., WALKER J.M., MCGUILL I., HOARE L.M., GRIFFITHS C.E.M. & NEILL C.A.O.** (2007) *Altered claudin expression is a feature of chronic plaque psoriasis*. *The Journal of Pathology*. 212:4:450-458

- WILCOX E.R., BURTON Q.L., NAZ S., RIAZUDDIN S., SMITH T.N., PLOPLIS B., BELYANTSEVA I., BEN-YOSEF T., LIBURD N.A., MORELL R.J., KACHAR B., WU D.K., GRIFFITH A.J., RIAZUDDIN S. & FRIEDMAN T.B.** (2001) *Mutations in the Gene Encoding Tight Junction Claudin-14 Cause Autosomal Recessive Deafness DFNB29*. *Cell*. 104:1:165-172
- YAMAMOTO T., SAEKI Y., KURASAWA M., KURODA S., ARASE S. & SASAKI H.** (2008) *Effect of RNA interference of tight junction-related molecules on intercellular barrier function in cultured human keratinocytes*. *Archives of Dermatological Research*. 300:9:517-524
- YOSHIDA Y., MORITA K., MIZOGUCHI A., IDE C. & MIYACHI Y.** (2001) *Altered expression of occludin and tight junction formation in psoriasis*. *Archives of Dermatological Research*. 293:5:239-244
- YOSHINAGA Y., HIGAKI M., TERAJIMA S., OHKUBO E., NOGITA T., MIYASAKA N. & KAWASHIMA M.** (1995) *Detection of inflammatory cytokines in psoriatic skin*. *Archives of Dermatological Research*. 287:2:158-164
- YUKI T., HARATAKE A., KOISHIKAWA H., MORITA K., MIYACHI Y. & INOUE S.** (2007) *Tight junction proteins in keratinocytes: localization and contribution to barrier function*. *Experimental Dermatology*. 16:4:324-330
- ZECH J.C., POUVREAU I., COTINET A., GOUREAU O., LE VARLET B. & DE KOZAK Y.** (1998) *Effect of cytokines and nitric oxide on tight junctions in cultured rat retinal pigment epithelium*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 39:9:1600-1608
- ZEISSIG S., BURGEL N., GUNZEL D., RICHTER J., MANKERTZ J., WAHNSCHAFFE U., KROESEN A.J., ZEITZ M., FROMM M. & SCHULZKE J.D.** (2007) *Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease*. *Gut*. 56:1:61-72

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.1: Schematischer Aufbau der Epidermis.	1
Abbildung 1.1.2: Epidermale Entwicklung in Maus und Mensch	3
Abbildung 1.1.3: Permeabilität embryonaler Maushaut	4
Abbildung 1.2.1: Morphologie und Funktion von Tight Junctions	5
Abbildung 1.2.2: Hauptkomponenten der Tight junctions	6
Abbildung 1.2.3: Schematische Darstellung der Lokalisation von TJ- Proteinen in der Epidermis	8
Abbildung 4.1.1: Lokalisation von Occludin, ZO-1 und Cldn4	33
Abbildung 4.1.2: Lokalisation von Cldn1, Cldn7 und JAM-A	34
Abbildung 4.1.3: Expression und Quantifizierung der mRNA von verschiedenen TJ- Proteinen in gesunder und in psoriatischer Haut	35
Abbildung 4.1.4: Barriere Biotin-Assay in psoriatischer Haut	36
Abbildung 4.1.5: Einfluss von IL-1 β auf die Lokalisation und die Proteinmenge von TJ- Proteinen 24 h nach der Injektion in <i>ex vivo</i> Hautmodelle	37
Abbildung 4.1.6: Einfluss von IL-1 β auf die Lokalisation von TJ-Proteinen 60 min nach Injektion in <i>ex vivo</i> Hautmodelle.....	38
Abbildung 4.1.7: Einfluss von TNF α auf die Lokalisation und die Proteinmenge von TJ- Proteinen 24 h nach der Injektion in <i>ex vivo</i> Hautmodelle	39
Abbildung 4.1.8: Differenzierung und proliferativer Index in der Frühform- und der Plaque- Psoriasis.....	40
Abbildung 4.1.9: Einfluß von IL-1 β und TNF α auf Differenzierung und den proliferativen Index	41
Abbildung 4.1.10: Einfluss von IL-1 β und TNF α auf die TJ-Funktionalität in kultivierten Keratinocyten	42
Abbildung 4.1.11: Einfluss von IL-1 β und TNF α auf die TJ-Funktionalität in kultivierten Keratinocyten	43
Abbildung 4.1.12: Einfluss von IL-1 β auf die Lokalisation von TJ-Proteinen in kultivierten Keratinocyten	44
Abbildung 4.1.13: Einfluss von IL-1 β auf die Expression von TJ-Proteinen in kultivierten Keratinocyten	45
Abbildung 4.1.14: Einfluss von IL-1 β auf die mRNA Expression von TJ-Proteinen in kultivierten Keratinocyten	46
Abbildung 4.1.15: Einfluß von IL-1 β und TNF α auf die Proliferation von kultivierten Keratinocyten	46

Abbildung 4.2.1: Verzögerte epidermale aussen-nach-innen Permeabilitäts-Barriere in CD44 k/o Mäusen zum Zeitpunkt E17.5	48
Abbildung 4.2.2: Ultrastrukturelle Aufnahmen der WT und CD44 k/o Epidermis der E17.5 Mäuse	49
Abbildung 4.2.3: Immunolokalisation von TJ-Proteinen und Par3 in muriner Epidermis am Tag E17.5.....	50
Abbildung 4.2.4: Nachweis der Expression der TJ-Proteine Cldn1, Cldn4, ZO-1, sowie des Polaritätskomplex-Proteins Par3 an den Embryonaltagen E17.5 und E18.5.....	51
Abbildung 4.2.5: CD44-Defizienz verändert die Anordnung der Zell-Zell-Kontakte und Expression von TJ-Transmembranproteinen in kultivierten Keratinozyten	53
Abbildung 4.2.6: CD44-Defizienz führt zur veränderten Lokalisation von Occludin entlang der lateralen Plasmamembran	54
Abbildung 4.2.7: CD44-Defizienz verändert die Anordnung der Zell-Zell-Kontakte und die Expression von TJ-Plaques-Proteinen in kultivierten Keratinozyten.....	55
Abbildung 4.2.8: CD44-Defizienz beeinträchtigt den transepithelialen elektrischen Widerstand	56
Abbildung 4.2.9: Einfluss von CD44 auf den Parazellulärer <i>Tracer</i> Flux (PTF).....	56
Abbildung 4.2.10: TJ-Barriere in WT und CD44 k/o Mäusen zum Zeitpunkt E17.5.....	57
Abbildung 4.2.11: Proliferation kultivierter Keratinozyten in Niedrig-Ca ²⁺ -Medium und Hoch-Ca ²⁺ -Medium	57
Abbildung 4.2.12: CD44-Defizienz verändert die Lokalisation von Par3 und beeinflusst die Expression von Polaritätskomplex-Proteinen sowie Tiam1 und Rac1	59
Abbildung 4.2.13: Pull-down Assay für aktiviertes Rac1	60

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten Antikörper mit der jeweiligen Verdünnung für die Immunfluoreszenz (IF) und den Immunoblot (WB) und der Bezugsquelle	16
Tabelle 2.2: Übersicht der verwendeten TaqMan®-Sonden.....	17
Tabelle 3.1: Zusammensetzung des Differenzierungsmediums.....	18
Tabelle 3.2: Zusammensetzung des mKGM	19
Tabelle 3.3: Zusammensetzung des Kulturmediums.....	20
Tabelle 3.4: Zusammensetzung der Gellösungen	22
Tabelle 3.5: Zusammensetzung des cDNA Synthese Ansatzes	27
Tabelle 3.6: Zusammensetzung des PCR Ansatzes	28
Tabelle 3.7: Reaktionsbedingungen der Polymerase-Kettenreaktion.....	28
Tabelle 3.8: Zusammensetzung des PCR Ansatzes	29

Danksagung

Ich möchte meinen herzlichen Dank an alle aussprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle bedanke ich mich bei Frau PD Dr. Johanna Brandner für die interessante Themenstellung und die engagierte Betreuung sowie die Bereitstellung aller technischen und finanziellen Mittel. Ihre fachliche Anleitung und die vielen Anregungen aus unseren Diskussionen haben mir bei der Versuchsdurchführung und Fertigstellung dieser Dissertation entscheidend weitergeholfen.

Herrn Prof. Dr. Thorsten Burmester (Zoologisches Institut, Universität Hamburg) danke ich für die Übernahme der Betreuung seitens des Fachbereichs Biologie.

Bei Frau Prof. Dr. Ingrid Moll bedanke ich mich für die Ermöglichung der Anfertigung der Dissertation im Zellbiologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie.

Bei Dr. Martin Behne bedanke ich mich für den Kontakt zum Zellbiologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie.

Für die vergnügliche Zeit im Labor und für das tolle Arbeitsklima danke ich allen Mitarbeitern des Zellbiologischen Labors der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie.

Den technischen Assistenten/innen des Labors Pia Houdek, Ewa Wladykowski und Sabine Vidal und Frank Fischer aus der Zahnklinik danke ich, dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Den Doktoranden/innen Simone Pollock, Claudia Bohner, Franca Fuchs, Matthias Vockel und Christian Börnchen danke ich für die vielen Ratschläge und ihre Hilfe.

Meiner Familie danke ich für ihre Unterstützung, ihr Vertrauen in mich und die Gewissheit immer einen Rückhalt zu haben.

Bei meinen Freundinnen Nici und Maythe bedanke ich mich, dass sie immer für mich da waren, wenn es mal um nicht-wissenschaftliche Probleme ging.

Zum Schluss möchte ich mich bei Chrischi bedanken, der mich immer aufgemuntert hat, stets zuversichtlich war und mit mir durchgehalten hat.