

# Charakterisierung der kanalbildenden Eigenschaften des Tight Junction-Proteins Claudin-17

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Marcel Conrad  
aus Düsseldorf

November 2013

Die experimentellen Arbeiten im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden von Februar 2010 bis November 2013 unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Fromm am Institut für Klinische Physiologie, der Charité - Universitätsmedizin, Campus Benjamin Franklin, durchgeführt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Fromm

Zweitgutachter: Prof. Dr. Volker Haucke

Disputation am: 21.05.2014

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Michael Fromm für die Überlassung des interessanten und herausfordernden Themas, das ich im Rahmen der Förderung im Teilprojekt 1 der DFG-Forschergruppe 721/2 bearbeitet habe. Auch für die intensive Betreuung und Anleitung, die Durchsicht dieser Arbeit und für die ständige Diskussionsbereitschaft möchte ich danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Volker Haucke dafür, dass er sich mit aller Selbstverständlichkeit bereit erklärt hat, meine Doktorarbeit zu bewerten und zu begutachten.

Frau Dr. Susanne Krug gilt ganz besonderer Dank - für die exzellente Einführung in das für mich neue Themengebiet der Tight Junction, für die Einarbeitung in alle dafür notwendiger Methoden und die unmittelbare Betreuung während der Promotionszeit.

Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke, PD Dr. Dorothee Günzel und PD Dr. Rita Rosenthal möchte ich für ihre wertvollen wissenschaftliche Ratschläge und die Unterstützung beim Anfertigen von Vorträgen danken.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Klinische Physiologie und der Med. Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit bei der Bewältigung auftretender experimenteller Schwierigkeiten. Bei Herrn Ing. grad. Detlef Sorgenfrei bedanke ich mich für die vielfältige technische Unterstützung. Dr. Michael Schumann danke ich für die Einführung in die Methode der 3D-Zellkultur und seine konstruktiven Beiträge zu dieser Thematik. Bei Frau In-Fah Lee bedanke ich mich für die experimentelle Unterstützung bei der Gefrierbruchelektronenmikroskopie.

Ich danke meinen Eltern für die Ermöglichung meines Studiums, die Unterstützung während der intensiven Zeit der Doktorarbeit und den Rückhalt und die Rückzugsmöglichkeiten, die sie mir während dieser Zeit geboten haben.

Meiner Schwester danke ich dafür, dass sie im wunderschönen Irland lebt und mich dort immer aufnimmt, wenn mir nach einer Auszeit zu Mute ist.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1	Tight Junctions in Epithelien . . . . .	8
1.1.1	Epithelien . . . . .	8
1.1.2	Tight Junctions . . . . .	9
1.2	Tight Junction-Proteine . . . . .	11
1.2.1	Tight Junction-assoziierte MARVEL-Proteine (TAMPs) . . . . .	11
1.2.2	Junctional Adhesion Molecule (JAM) . . . . .	13
1.2.3	Claudine . . . . .	14
1.3	Claudine . . . . .	14
1.3.1	Struktur . . . . .	15
1.3.2	Interaktionen . . . . .	20
1.3.3	Funktion . . . . .	20
1.4	Claudin-17 . . . . .	24
1.4.1	Lokalisation . . . . .	24
1.4.2	Funktion . . . . .	25
1.4.3	Sequenz und Struktur . . . . .	26
1.5	Lumenmorphogenese im Zellkulturmodell . . . . .	27
1.6	Zielsetzung . . . . .	29
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>30</b>
2.1	Geräte . . . . .	30
2.2	Verbrauchsmaterial . . . . .	30
2.3	Reagenzien und Chemikalien . . . . .	31
2.3.1	Laborchemikalien . . . . .	31
2.3.2	Antikörper . . . . .	32
2.3.3	Synthetische Oligonukleotide (Primer) . . . . .	34
2.3.4	Enzyme und Kits . . . . .	35
2.3.5	Größen- und Molekulargewichtsmarker . . . . .	35
2.4	Puffer und Lösungen . . . . .	37

2.4.1	Puffer und Lösungen für DNA-Techniken . . . . .	37
2.4.2	Puffer und Lösungen für Proteinbiochemie . . . . .	38
2.4.3	Puffer und Lösungen für die Gefrierbruchelektronenmikroskopie . . . . .	39
2.4.4	Lösungen für die Elektrophysiologie . . . . .	39
2.5	Materialien zur Bakterienkultur . . . . .	40
2.5.1	Bakterienstämme . . . . .	40
2.5.2	Kulturmedien . . . . .	40
2.6	Materialien zur eukaryotischen Zellkultur . . . . .	41
2.6.1	Zelllinien . . . . .	41
2.6.2	Zellkulturmedien und Lösungen . . . . .	42
2.7	Computersoftware . . . . .	43
2.8	Statistische Tests . . . . .	43
2.9	Kultivierung von prokaryotischen Zellen . . . . .	43
2.9.1	Transformation kompetenter Zellen . . . . .	44
2.9.2	Glycerolstocks . . . . .	44
2.10	Kultivierung eukaryotischer Zellen . . . . .	44
2.10.1	Kultivierung von MDCK C7-Zellen . . . . .	45
2.10.2	Stabile Transfektion von MDCK C7-Zellen . . . . .	46
2.10.3	Kultivierung von HEK293-Zellen . . . . .	47
2.10.4	Transiente Transfektion von HEK293-Zellen . . . . .	47
2.10.5	3D-Zellkultur . . . . .	48
2.11	DNA-Techniken . . . . .	50
2.11.1	Polymerase chain reaction PCR, Polymerase-Kettenreaktion . . . . .	50
2.11.2	Analytische Präparation von Plasmiden . . . . .	53
2.11.3	Präparative Plasmidpräparation . . . . .	54
2.11.4	Spektrometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nucleinsäuren . . . . .	54
2.11.5	Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen . . . . .	55
2.11.6	Behandlung mit Antarktischer Phosphatase . . . . .	56
2.11.7	Agarosegelelektrophorese . . . . .	56

2.11.8	Isolierung von DNA aus Agarosegelen . . . . .	57
2.11.9	Ligation . . . . .	57
2.11.10	Sequenzierung . . . . .	58
2.12	Proteintechniken . . . . .	58
2.12.1	Membranproteinextraktion aus eukaryotischen Zellen . . . . .	58
2.12.2	Gesamtproteinextraktion aus eukaryotischen Zellen . . . . .	59
2.12.3	Proteinextraktion mit RIPA-Puffer . . . . .	59
2.12.4	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Pierce . . . . .	59
2.12.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	60
2.12.6	Western Blot . . . . .	60
2.13	Zellbiologische Techniken . . . . .	62
2.13.1	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (C-LSM) . . . . .	62
2.13.2	Indirekte Immunfluoreszenz . . . . .	62
2.13.3	Fluoreszenz-Live-Cell-Imaging . . . . .	63
2.13.4	Gefrierbruchelektronenmikroskopie . . . . .	63
2.14	Elektrophysiologische Techniken . . . . .	64
2.14.1	Ussing-Kammer-Technik . . . . .	64
2.14.2	Messung von Dilutionspotentialen . . . . .	66
2.14.3	Messung biionischer Potentiale . . . . .	67
2.14.4	Fluxmessung parazellulärer Größenmarker . . . . .	68
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>69</b>
3.1	Molekulare Basis der Claudin-17-Anionenpore . . . . .	69
3.1.1	Generierung der stabilen Überexpressionsklone . . . . .	69
3.1.2	Einfluss des Aminosäureaustausch auf die Eigenschaften des Claudin-17	70
3.1.3	Einfluss endogener Claudine auf den Widerstand und die Permeabilität von Natrium- und Chloridionen . . . . .	91
3.2	Einfluss kanal- und barrierebildender Claudine auf die Lumenformation im epi- thelialen Zystenmodell . . . . .	97
3.2.1	Überexpression kanal- und barrierebildender Claudine in MDCK C7- Zellen . . . . .	97
3.2.2	Nachweis der kanal- und barrierebildenden Eigenschaften . . . . .	97
3.2.3	Einfluss auf die Größe des Zystenlumens . . . . .	98

<b>4 Diskussion</b>	<b>101</b>
4.1 Claudin-17-Mutagenese . . . . .	101
4.1.1 MDCK C7-Zellmodell . . . . .	101
4.1.2 Aminosäuresubstitutionen im ECL1 . . . . .	102
4.1.3 Theorie der Porenbildung von Claudin-17 . . . . .	105
4.1.4 Die Rolle des zweiten extrazellulären Loops . . . . .	108
4.2 Effekte kanal- und barrierebildender Claudine im 3D-Zellkulturmodell . . . . .	109
4.2.1 Lumenbildung in Abhängigkeit der Claudinausstattung . . . . .	109
4.2.2 Potential des Zystenmodells und Ausblick . . . . .	110
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>112</b>
<b>6 Summary</b>	<b>114</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>116</b>
<b>8 Verzeichnis der eigenen Publikationen</b>	<b>130</b>
<b>9 Lebenslauf</b>	<b>131</b>
<b>10 Anhang</b>	<b>132</b>
10.1 Claudin-17-Überexpressionklone . . . . .	132
10.2 Abkürzungsverzeichnis . . . . .	133
10.3 Vektorkarten . . . . .	137
10.4 Sequenzierungen . . . . .	138

# 1 Einleitung

## 1.1 Tight Junctions in Epithelien

### 1.1.1 Epithelien

Epithelien sind ein- oder mehrschichtige Gewebe, die äußere und innere Oberflächen des Organismus bedecken. Dadurch bilden sie die Grenze zwischen der Umwelt und dem Organismus. Die Eigenschaften des jeweiligen Epithels regulieren somit die Interaktionsmöglichkeiten zwischen Innen- und Außenwelt. Damit kommen dieser Gewebeart wichtige Funktionen zu, z. B. mechanischer Schutz oder Regulation des Stoffaustausches.

Epithelgewebe sind nicht von Blutgefäßen durchzogen und werden durch die Basallamina, einer Proteinschicht aus Kollagen Typ IV und Laminin, von dem darunter liegenden Bindegewebe getrennt. Die Organisation eines Epithelgewebes kann in mehreren Parametern variieren. Man unterscheidet einschichtige (z. B. Pleura) und mehrschichtige (z. B. Haut) Epithelien. Die einschichtigen Epithelien werden wiederum in einfache (mit den Untergruppen einschichtiges Plattenepithel, einschichtiges isoprismatisches und einschichtiges hochprismatisches Epithel) und mehrreihige Epithelien unterschieden. Zu den mehrschichtigen Epithelien zählen das mehrschichtige Plattenepithel (in verhornter und unverhornter Form), das mehrschichtige hochprismatische Epithel, das zweischichtige isoprismatische Epithel und das mehrschichtige isoprismatische Epithel. Weiterhin unterscheidet man noch das Übergangsepithel (Urothel) von den oben genannten. Neben der morphologischen Einteilung können Epithelien auch anhand ihrer Transportleistung klassifiziert werden. Leckepithelien besitzen zumeist eine hohe Gesamtpermeabilität für Ionen, während die von dichten Epithelien in der Regel geringer ist (Fromm, 2010).

Die Zellen aller Epithelien weisen eine Polarität auf, sodass sich die Plasmamembran der apikalen (mukosalen) Seite, d. h. die dem Lumen zugewandte Seite, von der basolateralen (serosalen) Seite unterscheidet. So ist beispielsweise der epitheliale Natriumkanal (ENaC) stets in der apikalen Membran lokalisiert, während die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase bei allen Epithelien in der basolateralen Membran anzutreffen ist.

Die Zellen eines Epithels sind untereinander durch verschiedene Zell-Zell-Kontakte verbunden, die in drei Gruppen eingeteilt werden. Die Tight Junction (Zonula occludens), die Adherens Junction (Zonula adherens) und die Gap Junction stellen die Strukturen dar, über die benachbarte Zellen in Kontakt stehen (Abb. 1).

Adherens Junctions (AJ) bilden in Epithelien eine gürtelförmige Struktur, die die ganze Zelle umspannt, während in anderen Geweben Adherens Junction nur punktförmig auftreten. Cadherine, transmembranale Glykoproteine, sind ein wichtiger Bestandteil der Adherens Junction, da sie durch Interaktion untereinander für die Zelladhäsion sorgen. Dabei treten Cadherine benach-

barter Zellmembranen durch nichtkovalente Wechselwirkungen in direkten Kontakt. Intrazellulär sind die Cadherine über Adapterproteine mit dem Zytoskelett verbunden. Diese Verankerung und die große Anzahl der Cadherinmoleküle in der Adherens Junction sorgt für eine starke Anhaftung zweier benachbarter Zellen.

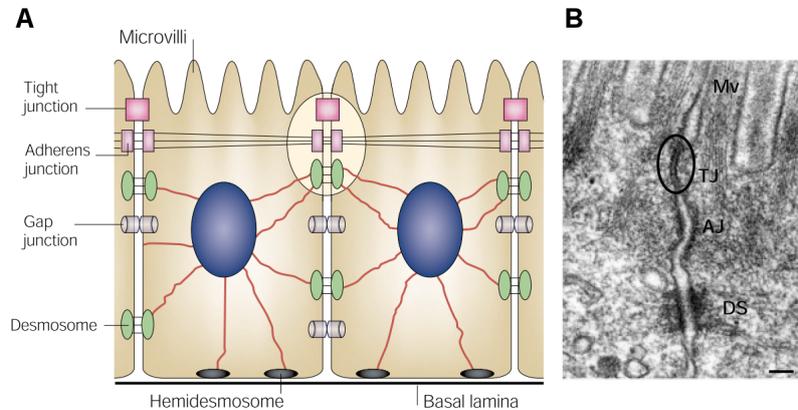


Abbildung 1: **Zellverknüpfungen in epithelialen Zellen.** **A** Schematische Darstellung der Zell-Zell-Verknüpfungen. Die Tight Junction ist die am meisten apikal gelegene Struktur des junctionalen Komplexes. **B** Elektronenmikroskopische Aufnahme intestinaler Epithelzellen (Balken = 200 nm, Mv = Mikrovilli, TJ = Tight Junction, AJ = Adherens Junction, DS = Desmosom, modifiziert nach Tsukita et al., 2001).

Die Funktion der Gap Junctions (GJ) ist die Vermittlung der interzellulären Kommunikation und des Stoffaustauschs zwischen benachbarten Zellen. Aneinandergrenzende Epithelzellen bilden jeweils einen Halbkanal (Konnexon), bestehend aus sechs Konnexinen. Zusammen mit sechs Konnexinen einer benachbarten Zelle bilden sie eine durchgehende Pore, die von kleinen Signalmolekülen, Ionen, Aminosäuren und Glukose passiert werden kann. Im Herzmuskel und Zentralnervensystem dienen Gap Junctions vor allem als elektrische Synapsen zur Weiterleitung von Aktionspotentialen.

Tight Junctions bilden die dritte Gruppe der Zell-Zell-Kontakte und werden im folgenden Abschnitt ausführlich dargestellt.

## 1.1.2 Tight Junctions

### 1.1.2.1 Funktion

Die Tight Junction (TJ, Schlussleiste) spielt eine wichtige Rolle bei der Ausbildung und Erhaltung der Zellpolarität. Sie erzeugt eine Diffusionsbarriere für integrale Membranproteine wie Rezeptoren, Carrier oder Kanäle, die nur im apikalen oder nur im basalolateralen Bereich der Plasmamembran lokalisiert sein dürfen um die Polarität zu gewährleisten („Fence“-Funktion, Diamond, 1977).

Die Hauptaufgabe der Tight Junction ist die Regulation des Stofftransports durch den extrazellulären Spalt („Gate“-Funktion, Diamond, 1977). In Epithelien und Endothelien existiert neben

dem transzellulären Transportweg (vermittelt durch Kanäle, Carrier und ATPasen in der Plasmamembran) ein mehr oder weniger ausgeprägter parazellulärer Transportweg, der durch die Tight Junction und den interzellulären Spalt gebildet wird. Durch diesen parazellulären Weg können Wasser, Ionen und weitere Solute entlang eines bestehenden elektrochemischen Gradienten transportiert werden. Limitiert wird der parazelluläre Transport generell durch abdichtende Tight Junction-Proteine. Es existieren jedoch auch Tight Junction-Proteine, die Kanäle ausbilden, welche selektiv für Größe und Ladung sein können.

Je nach Beitrag der parazellulären elektrischen Leitfähigkeit (indirekt proportional zum Widerstand) an der Gesamtleitfähigkeit des Epithels unterscheidet man lecke, dichte und undurchlässige Epithelien. In lecken Epithelien ist die parazelluläre Leitfähigkeit größer als die transzelluläre Leitfähigkeit. In dichten Epithelien verhält es sich dagegen umgekehrt. Die parazelluläre Leitfähigkeit ist hier kleiner als die transzelluläre. Undurchlässige Epithelien sind der Extremfall dichter Epithelien - bei ihnen ist die parazelluläre Leitfähigkeit um mindestens zwei Größenordnungen kleiner als die transzelluläre.

Lecke Epithelien finden sich vor allem in proximalen Segmenten tubulärer Organe. So sind der Dünndarm oder der proximale Tubulus des Nephrons Orte regen Stoffaustauschs mit geringem parazellulärem Widerstand. Zum distalen Ende hin, d. h. zum distalen Kolon oder dem Sammelrohr der Niere, nimmt der Stofftransport ab und der parazelluläre Widerstand steigt. Ein undurchlässiges Epithel kleidet die Harnblase aus (Fromm, 2010).

### 1.1.2.2 Morphologie

Die Tight Junctions sind die am weitesten apikal gelegenen Strukturen der Zell-Zell-Verknüpfungen und umgürten zusammen mit der Adherens Junction die Epithelzelle vollständig (Farquhar & Palade, 1963). Dabei bildet die Tight Junction neben parallel verlaufenden Strängen auch querverbindende Stränge, wodurch ein mehr oder weniger ausgeprägtes Tight Junction-Netzwerk entsteht. Mittels Gefrierbrüchelektronenmikroskopie konnte bereits Ende der 60er Jahre die netzartige Struktur der Tight Junction visualisiert werden (Staehein et al., 1969) und eine morphometrische Analyse durchgeführt werden. Auf Grundlage einer solchen morphologischen Analyse der Tight Junction in verschiedenen Geweben entwickelte P. Claude die Hypothese, dass der transepitheliale Widerstand (TER) in einem logarithmischen Zusammenhang zur Anzahl der Tight Junction-Stränge steht (Claude, 1978). Inzwischen ist klar, dass dieser Zusammenhang im Prinzip gültig ist, aber dass der Widerstand hauptsächlich von der molekularen Zusammensetzung der Tight Junction abhängt.

Der trizellulären Tight Junction (tTJ) kommt morphologisch wie funktionell eine Sonderstellung zu. An diesen Stellen treffen drei Zellen aufeinander und das Tight Junction-Netzwerk erstreckt sich an dieser Stelle etwa 1 µm weit in basolaterale Richtung. Nach gegenwärtiger Kenntnis finden sich in der tTJ zwei für diese Struktur charakteristische Proteine, Tricellulin und Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR). Die tTJ bildet eine Zentralpore („central

tube“) aus. Es zeigte sich, dass die tTJ durchlässig für Solute bis in den makromolekularen Bereich wird, wenn Tricellulin gering exprimiert ist oder aus der tTJ entfernt wird (Masuda et al., 2011; Krug et al., 2013).

## 1.2 Tight Junction-Proteine

Die Zusammensetzung der Tight Junction bestimmt in großem Ausmaß ihre Eigenschaften und damit auch die des Epithels. Entsprechend der großen Vielfalt an unterschiedlichen Epithelgeweben gibt es auch eine Vielzahl verschiedener Tight Junction-Proteine. Man unterscheidet zwei Proteinfamilien, TAMPs und Claudine, die in eigenen Kapiteln beschrieben werden. Während TAMPs und Claudine echte Bestandteile der Tight Junction sind, ist ein weiteres, von manchen Autoren ebenfalls zu den Tight Junction-Proteinen gezähltes Protein, das Junctional Adhesion Molecule (JAM), dicht unterhalb der Tight Junction lokalisiert. Zudem steht eine große Zahl weiterer Moleküle intrazellulär mit dem Tight Junction-Komplex in Verbindung, z. B. die Zonula Occludens-Proteine (ZO-1, ZO-2 und ZO-3), die die Assoziation an das Zytoskelett bewerkstelligen oder solche, die für die Signaltransduktion zuständig sind.

Hier sollen nachstehend die vier wichtigsten Gruppen von Transmembranproteinen der Tight Junction vorgestellt werden.

### 1.2.1 Tight Junction-assoziierte MARVEL-Proteine (TAMPs)

Die Tight Junction-assoziierten Marvel-Proteine (TAMPs) bilden eine Subgruppe der Marvel-Proteinfamilie und bestehen aus drei Mitgliedern: Occludin, Tricellulin (auch MarvelD2 genannt) und MarvelD3. MarvelD3 ist das zuletzt entdeckte Protein dieser Subfamilie. Gegenwärtig ist wenig über Bedeutung und Funktion von MarvelD3 bekannt, sodass hier nicht näher auf dieses Protein eingegangen wird. Tricellulin und vor allem Occludin werden seit längerem erforscht, so dass diese besser charakterisiert sind.

Die drei TAMPs zeigen den gleichen grundsätzlichen strukturellen Aufbau. Sie sind mit vier Transmembrandomänen in der Membran verankert. Der N- und C-Terminus befinden sich im Zytosol, zwei extrazelluläre Loops sind über die Transmembrandomänen 2 und 3 und einen kleinen verknüpfenden intrazellulären Loop verbunden (Abb. 2)

#### 1.2.1.1 Occludin

Occludin (occludere [lat.] verschließen) wurde als erstes Protein der Tight Junction beschrieben (Furuse et al., 1993). Das Protein wird von einem einzigen Gen gebildet und kann durch alternatives Splicing in mindestens vier Isoformen vorliegen (Mankertz et al., 2002). Es entstehen Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 65 und 83 kDa. Occludin besitzt, wie bereits gesagt, vier Transmembrandomänen, zwei extrazelluläre Loops und drei intrazelluläre

Bereiche (Abb. 2). Sowohl der C- als auch der N-Terminus sind intrazellulär lokalisiert, zudem gibt es einen wenige Aminosäure langen intrazellulären Loop, der über die Transmembrandomänen 2 und 3 die beiden extrazellulären Loops (ECL1 und ECL2) verbindet. Der C-Terminus trägt eine ELL-Sequenz (Proteindomäne des RNA-Polymerase II-Elongationsfactor ELL), eine Signalsequenz, die die Interaktion mit Proteinen der MAGUK-Familie (membrane associated guanylate kinases homologues) wie ZO-1 vermittelt (Li et al., 2005, Tsukita et al., 1998). Über diese Proteine ist Occludin mit dem Zytoskelett der Zelle verbunden, da ZO-1 und Aktin direkt miteinander in Kontakt stehen. Occludin wird ubiquitär in allen epithelialen und endothelialen Zellen exprimiert, nicht jedoch in Fibroblasten (Van Itallie & Anderson, 1997).

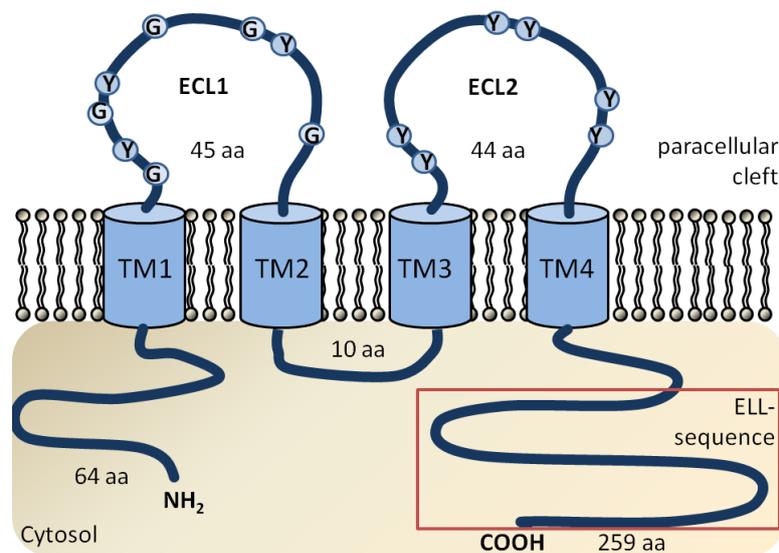


Abbildung 2: **Schematische Darstellung der Struktur des Occludins.** Die Struktur des Occludin ist hier beispielhaft für alle TAMPs dargestellt. Der erste extrazelluläre Loop ist reich an Glycin- und Tyrosinresten. Der intrazelluläre C-Terminus enthält wie Tricellulin eine ELL-Sequenz zur Interaktion mit zytosolischen Proteinen. TM= Transmembrandomäne, ECL=extrazellulärer Loop, aa=Aminosäure, G=Glycin, Y=Tyrosin

Die Funktion von Occludin in Epithelien ist noch nicht abschließend geklärt. Ein Beitrag von Occludin an der parazellulären Permeabilität ist nicht eindeutig zuzuweisen. Überexpressionsstudien in epithelialen MDCK-Zellen zeigten, dass Occludin in die Tight Junction integriert und eine Erhöhung des transepithelialen Widerstands verursacht (Balda et al., 1996; McCarthy et al., 1996). Ein Knockdown von Occludin in MDCK II-Zellen führte zu keiner veränderten Tight Junction-Morphologie. Die Expression verschiedener Claudine war verändert und die Fähigkeit, apoptotische Zellen aus dem Monolayer zu entfernen, war reduziert. Zudem konnte eine vermehrte Ausbreitung von Tricellulin, einem weiteren MARVEL-Protein (siehe 1.2.1.2), in die bizelluläre Tight Junction gezeigt werden (Ikenouchi et al., 2008). Occludin-Knockout-Mäuse weisen einen komplexen Phänotyp auf. Die Morphologie der Tight Junction-Stränge ist unauffällig und die Barriere funktionell intakt (Saitou et al., 2000). Männliche Tiere sind steril,

zudem zeigen alle Tiere Wachstumsretardation, Verlust der Belegzellen des Magen, verminderte Säuresekretion und chronische Inflammation (Schulzke et al., 2005).

In Plattenepithelkarzinomen (maligne Tumore der Epithelien der Haut) geht Occludin häufig verloren (Rachow et al., 2013). In Versuchen mit Keratinozyten konnte gezeigt werden, dass ein Knockdown von Occludin zu einer verringerten Zelladhäsion beiträgt und die Zellen für die Einleitung der Apoptose nach UV-Bestrahlung oder nach Behandlung mit TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) weniger empfindlich waren (Rachow et al., 2013). Diese veränderten Zelleigenschaften können eine Tumorentstehung begünstigen.

Aufgrund der nicht eindeutigen Datenlage hinsichtlich der Barrierefunktion geht man davon aus, dass Occludin eher eine regulatorische Aufgabe zukommt. Occludin könnte dabei ein Target für extrinsische Signale sein, z. B. Wachstumsfaktoren (EGF, VEGF, TGF $\beta$ ), oxidativen Stress und Zytokine, und die Weiterleitung in die Zelle über Signalkaskaden vermitteln (Blasig et al., 2011; Capaldo & Nusrat, 2009). Zudem ist Occludin Zielprotein einer Reihe von Kinasen (PKC, MAP-Kinase, CK1, CK2) und Phosphatasen (PP1, PP2A), die durch Anfügen und Entfernen von Phosphatgruppen die Funktion von Occludin modulieren, z. B. durch eine Umverteilung ins Zytosol (Dörfel & Huber, 2012).

### 1.2.1.2 Tricellulin

Tricellulin wurde erstmals 2005 von Ikenouchi et al. beschrieben. Primär ist Tricellulin in der trizellulären Tight Junction, der Kontaktstelle dreier Zellen, lokalisiert; zu einem geringeren Anteil auch in der bizellulären Tight Junction (Ikenouchi et al., 2005). Es gibt vier Isoformen: Tric-a, Tric-a1, Tric-b und Tric-c (Riazuddin et al., 2006). Tric-a stellt dabei die längste Isoform dar und ist am intensivsten untersucht. Die weiteren Isoformen entstehen durch alternatives Splicing, es fehlen Exon 2, die Occludin C-terminale ELL-Domäne oder Exon 3.

Tricellulin wird in vielen epithelialen Geweben exprimiert, z. B. Pankreas, Lunge, Kolon und Innenohr, und trägt zur Abdichtung des Epithels bei. In Überexpressionsstudien in MDCK II-Zellen konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Permeabilität für Makromoleküle vermindert wird. Bei starker Überexpression lokalisiert Tricellulin auch in die bizelluläre Tight Junction und fungiert dort als signifikante Barriere für kleine anorganische Ionen (Krug et al., 2009).

Mutationen im Tricellulin-Gen führen zu Taubheit, wie auch Mutationen in Claudin-11 und Claudin-14 (Riazuddin et al., 2006).

### 1.2.2 Junctional Adhesion Molecule (JAM)

Das Junctional Adhesion Molecule (JAM) besitzt nur eine Transmembrandomäne und unterscheidet sich so von TAMPs und Claudinen. Zur JAM-Familie zählen JAM-A, -B, -C und -4.

Die Proteine Crb3 (Crumbs protein homolog 3) und CAR (Coxsackie virus and adenovirus receptor) gehören nicht zur JAM-Proteinfamilie sind ihnen aber insofern ähnlich, da sie ebenfalls nur eine Transmembrandomäne besitzen. Weitere strukturelle Gemeinsamkeiten sind zwei Ig-ähnlichen Domänen (Ig-like domain) und das C-terminale PDZ-Bindemotiv (Furuse & Tsukita, 2006).

Die Funktion der JAMs ist weniger gut charakterisiert als die anderer Tight Junction-Proteine. Der Beitrag zur parazellulären Permeabilität nach Überexpression oder Knockdown beruht überwiegend auf sekundären Effekten, so dass ähnlich wie bei Occludin, eine regulatorische Funktion diskutiert wird (Günzel & Fromm, 2012).

### 1.2.3 Claudine

Die parazellulären Barriere- und Kanaleigenschaften eines Epithels werden zum größten Teil durch die Claudine bestimmt, die die Zellen exprimieren. Daher wird die Proteinfamilie der Claudine im folgenden Kapitel näher beleuchtet.

## 1.3 Claudine

Claudine (Cldn) zählen zur PMP-22/EMP/MP20/Claudin Superfamilie. Beim Säuger sind inzwischen 27 Claudine bekannt (Abb. 3). Claudin-13 kommt im Menschen allerdings nicht vor. Mineta et al. konnten für Claudin-24 und -27 nach Überexpression in MDCK-Zellen keine Membranlokalisation nachweisen, was ein Merkmal der Claudine ist (Mineta et al., 2011). Zwischen den Spezies variiert die Zahl der Claudine erheblich. So besitzen Mäuse ähnlich viele Claudine wie der Mensch (27 zu 26), in Fischen, wie z. B. dem Kugelfisch (*Takifugu rubripes*), sind 56 Claudine bekannt (Loh et al, 2004).

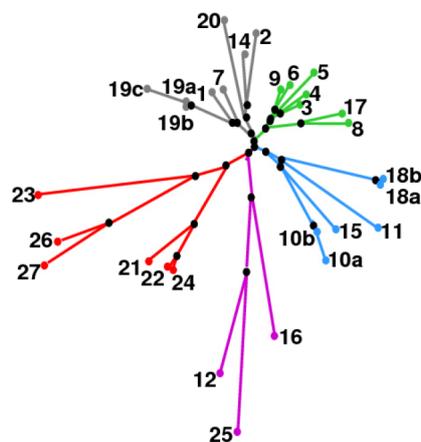


Abbildung 3: **Phylogenetischer Stammbaum der (humanen) Claudine.** Claudin-17 ist evolutionär dem Claudin-8 am nächsten (aus Günzel & Fromm, 2012).

In Invertebraten wie *Drosophila melanogaster* sind drei den Claudinen homologe Proteine (Mega, Sinu und Kune) für die Ausbildung einer Septate Junction genannten Struktur von Bedeutung (Furuse & Tsukita, 2006; Nelson et al., 2010). Septate Junctions befinden sich apikal der Adherens Junction und erscheinen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Form einer einfachen Haushaltsleiter. Auch beim Menschen findet man vergleichbare Strukturen („septate-like junctions“) in den Paranodien der peripheren Nerven (Poliak & Peles, 2003).

### 1.3.1 Struktur

Claudine zählen zu den Tetraspanproteinen und besitzen vier Transmembrandomänen, einen intrazellulären N- und C-Terminus, zwei extrazelluläre Loops, sowie einen kleinen intrazellulären Loop (vgl. Abb. 4). Detaillierte Strukturdaten auf atomarer Ebene, wie sie z. B. mittels Röntgenkristallographie oder NMR-Spektroskopie erhoben werden, existieren bislang nicht. Dies liegt unter anderem an der geringen Größe, den starken hydrophoben Eigenschaften der Transmembrandomänen und der großen Tendenz zur Interaktion mit benachbarten Molekülen.

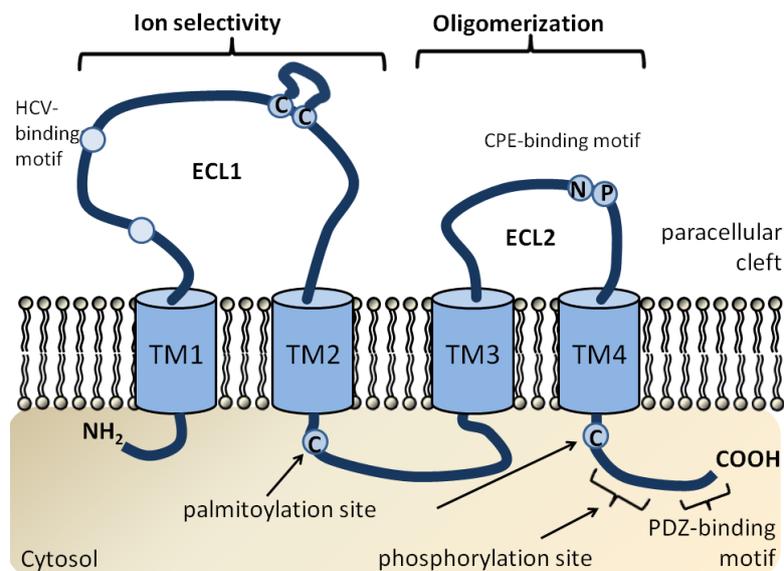


Abbildung 4: **Allgemeiner struktureller Aufbau eines Claudins.** Die Struktur eines Claudins ist vorgegeben durch die vier Transmembrandomänen, der N- und C-Terminus liegen intrazellulär, wie ein kurzer verbindender Loop; auf der extrazellulären Seite finden sich ein großer erster und ein kleinerer zweiter Loop. TM=Transmembrandomäne, ECL=extrazellulärer Loop, C=Cystein, N=Asparagin, P=Prolin

#### N-Terminus

Der N-Terminus befindet sich im Zytosol, ist sehr kurz und nur wenige Aminosäuren lang (Ausnahmen bilden Claudin-5, -16 und -25, die einen längeren N-Terminus aufweisen). Eine entscheidende Funktion wird ihm nicht zugewiesen.

### Erster extrazellulärer Loop (ECL1)

Die Transmembrandomänen (TM) 1 und 2 begrenzen den großen ersten extrazellulären Loop (first extracellular loop, ECL1), der aus 42-56 Aminosäuren (52 Aminosäuren in Claudin-17) besteht. Der ECL1 besitzt viele Charakteristika (Abb. 5): so sind zwei Cysteine in der Sequenz konserviert, von denen man annimmt, dass sie eine Disulfidbrücke ausbilden und eine übergeordnete Faltung des ECL1 vorgeben. Diese Cysteine sind Bestandteil einer charakteristischen Signalsequenz mit weiteren konservierten Aminosäuren:

W-x(15, 20)-[Gn]-L-W-x(2)-C-x(8, 10)-C-x(15, 16)-[qR] (Günzel & Yu, 2013)

Außer den Cysteinen (C54 und C64 in Claudin-17) sind auch einige geladene Aminosäuren charakteristisch für den ECL1. Ein Arginin an Position 81 (in Claudin-17) ist in allen Claudinen konserviert (Abb. 5) und Bestandteil der Signalsequenz. Zudem tauchen weitere geladene Aminosäuren in fast allen Claudinen auf. Unmittelbar benachbart zu dem zweiten Cystein findet sich häufig eine geladene Aminosäure (Lysin 65 in Claudin-17), die für die Porenfunktion von Bedeutung ist (vgl. Tabelle 1). Weiterhin ist eine positive Ladung (Arginin 31 in Claudin-17) in der N-terminalen Hälfte des ECL1 in fast allen Claudinen vorhanden. Allgemein wird angenommen, dass der ECL1 die parazellulären Eigenschaften bestimmt, also die Ausbildung einer Barriere oder einer Pore für Ionen (siehe 1.3.3). Weitere Studien zeigen, dass auch der ECL2 zur Barrierebildung beiträgt (Piehl et al., 2010).

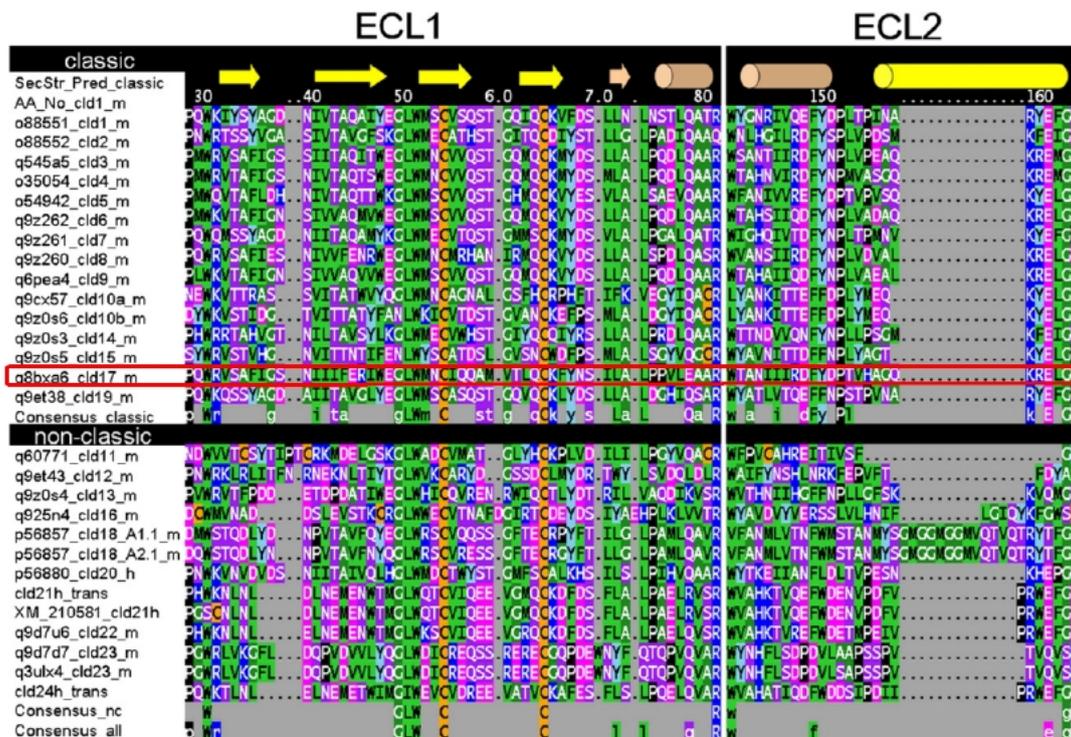


Abbildung 5: Sequenzalignment des ECL1 und ECL2 klassischer und nichtklassischer Claudine. Vergleich der murinen Proteinsequenzen des ersten und zweiten extrazellulären Loops der Claudine (modifiziert nach Krause et al. 2008).

### **Intrazellulärer Loop**

Der kleine intrazelluläre Loop zwischen den Transmembrandomänen 2 und 3 besteht nur aus wenigen Aminosäuren und dient als Linker zwischen den extrazellulären Loops. Zudem befindet sich im intrazellulären Loop einiger Claudine eine Palmitoylierungsstelle, deren korrekte Palmitoylierung entscheidend für die Tight Junction-Lokalisation dieser Claudine ist (Van Itallie et al., 2005).

### **Zweiter extrazellulärer Loop (ECL2)**

Der zweite, kleinere extrazelluläre Loop (ECL2) besteht aus 13-20 Aminosäuren (18 Aminosäuren in Claudin-17), deren Sequenz im Vergleich zu der des ECL1 stark konserviert ist. Eine intensive Mutagenesestudie (Piontek et al. 2008) am ECL2 von Claudin-5 weist darauf hin, dass die homophile Interaktion über den ECL2 vermittelt wird. Weiterhin ist der ECL2 auch an der Regulation des parazellulären Transports beteiligt, eine Eigenschaft, die man hauptsächlich dem ECL1 zugeschrieben hatte (Piehl et al., 2010). Zudem enthalten die ECL2 von Claudin-3, -4, -6, -7, -8 und -14 eine Bindestelle für das *Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPE), welches im Menschen unter anderem eine Lebensmittelvergiftung verursachen kann (Veshnyakova et al., 2010).

### **C-Terminus**

Der Carboxyterminus befindet sich wie der Aminoterminus im Zytoplasma, ist jedoch deutlich länger als dieser. Wie im intrazellulären Loop befindet sich ebenfalls eine Palmitoylierungsstelle im C-Terminus (Van Itallie et al., 2005). Zudem enthalten die meisten Claudine ein PDZ-Bindemotiv (PSD-95/Discs large/Zonula occludens-1-Bindemotif), um mit Gerüstproteinen wie ZO-1 zu interagieren, die dann wiederum mit dem Zytoskelett verankert sind (Aijaz et al., 2006; Guillemot et al., 2008).

Aufgrund der limitierten Möglichkeiten, mit Hilfe strukturbiologischer Methoden hochauflösende Modelle der Claudinstruktur zu erzielen, wurden die meisten Erkenntnisse mittels ortsgerichteter Mutagenese gewonnen. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse von Mutagenesestudien an barriere- und kanalbildenden Claudinen aufgeführt.

Tabelle 1: Ortsgerichtete Mutagenese in Claudinen (nach Günzel and Yu, 2013)

Cldn2	Cldn4	Cldn5	Cldn7	Cldn10a	Cldn15	Cldn16
	R31T kein Effekt			R32D vermin- derte Cl <sup>-</sup> Selekti- vität		
Y35C am Poren- eingang						
			D38R vermin- derte Cl <sup>-</sup> Barriere			D104S vermin- derte Na <sup>+</sup> Se- lektivität
						D105S leicht vermin- derte Na <sup>+</sup> Se- lektivität
	E48Q kein Effekt	E48Q kein Effekt			E46K kein Effekt	R114T kein Effekt
E53Q kein Effekt			E53K leicht vermin- derte Cl <sup>-</sup> Barriere			E119T leicht vermin- derte Na <sup>+</sup> Se- lektivität
		C54S Verlust der Na <sup>+</sup> Barriere				

H57C am Poren- eingang			D55R vermit- telt Cl <sup>-</sup> Selekti- vität			
		C64S Verlust der Na <sup>+</sup> und Mannitol Barriere				
D65N beseitigt Na <sup>+</sup> Bin- destelle	K65D/T vermit- telt Na <sup>+</sup> Selekti- vität			R59D vermin- dert Cl <sup>-</sup> Selekti- vität	E64K vermin- dert Cl <sup>-</sup> Selekti- vität	D132S kein Effekt
I66C dem Porenin- neren zuge- wandt						E133T kein Effekt
	D68N kein Effekt					D135S kein Effekt
D76N kein Effekt	D76N kein Effekt					
	R81T schwa- che ER Expressi- on					R149L/T schwa- che ER Expressi- on
<b>Angelow and Yu, 2009; Yu et al., 2009</b>	<b>Colegio et al., 2002, Hou et al., 2010</b>	<b>Wen et al., 2005</b>	<b>Alexandre et al., 2007</b>	<b>VanItallie et al., 2006</b>	<b>Colegio et al., 2002</b>	<b>Hou et al., 2005</b>



sprüchliche Daten, so dass die genaue Funktion unbekannt ist: Claudin-4 kann in mIMCD3-Zellen, einer epithelialen Zelllinie aus dem Sammelrohr der Niere, einen Anionenkanal bilden (Hou et al., 2010). Frühere (und auch spätere) Studien zeigten hingegen eine abdichtende Funktion des Claudin-4 nach Überexpression in MDCK II oder LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen (Van Itallie et al., 2006, Colegio et al., 2002).

### 1.3.3.1 Barrierebildende Claudine

#### Claudin-1

Claudin-1 ist ein 23 kDa großes Protein, das in den meisten Epithelien des Körpers exprimiert wird. In der Epidermis erhält Claudin-1 die Barriere aufrecht, Knockout-Tiere sterben nach der Geburt aufgrund eines erheblichen Wasserverlusts über die Haut (Furuse et al., 2002). Kirschner und Rosenthal konnten in Zellkultorexperimenten mit humanen und murinen Keratinozyten eine abdichtende Funktion gegenüber Ionen und Makromolekülen nachweisen, jedoch auch zeigen, dass Claudin-1-Knock-down in diesen Zellen keinen Effekt auf den Wassertransport hat (Kirschner et al., 2013). Die abdichtende Funktion konnte auch in Überexpressionsstudien nachgewiesen werden: Der transepitheliale Widerstand (TER) wird durch Claudin-1 erhöht, die Permeabilität für Solute verringert sich stark (Inai et al., 1999).

Claudin-1 ist außerdem mit der Entstehung verschiedener Krankheitsbilder im Menschen, dabei überwiegend Hautkrankheiten, assoziiert. Mutationen im Claudin-1-Gen führen zum NISCH-Syndrom (neonatal ichthyosis-sclerosing cholangitis syndrome), einer autosomal rezessiven Krankheit, die durch Ichthyose (gestörte Verhornung der Haut), Hypotrichose und Entzündungen der Gallenwege gekennzeichnet ist (Baala et al., 2002, Feldmeyer et al., 2006). Weiterhin ist bei Atopischer Dermatitis, trockener Haut und Psoriasis die Expression von Claudin-1 gestört (De Benedetto et al., 2011, Watson et al., 2007).

Zudem kann Claudin-1 ein beteiligter Faktor einer Hepatitis C-Viruserkrankung (HCV) sein. Dabei bildet Claudin-1 durch Interaktion mit dem Tetraspaninmolekül CD81 einen Rezeptor für das HCV. Die physikalische Interaktion des Claudin-1 mit CD81 wurde mittels *in vitro*- und *in silico*-Techniken untersucht, sodass es für den ECL1 des Claudin-1 ein Strukturmodell gibt, das sich jedoch stark an der Interaktion mit CD81 orientiert und nur bedingt als allgemeines Modell für die Struktur des ECL1 von Claudinen betrachtet werden kann (Davis et al., 2012).

In einer aktuellen Studie wurde versucht, das abdichtende Claudin-1 durch gezielten Aminosäureaustausch in einen Ionenpermeablen Kanal zu transformieren (Veshnyakova et al., 2012). Dabei wurden vielfältige Resultate erzielt: Es konnten sowohl Positionen identifiziert werden, die die Abdichtung gegen Ionen noch vergrößerten (z. B. Y33S, Q57H, S74P); andere hatten keinen Effekt auf den TER und die Permeabilitäten von Natrium- und Chloridionen (z. B. K65D, D68S); wiederum andere Mutationen zeigten einen deutlichen Abfall des TER und eine

gesteigerte Permeabilität für Natrium- und Chloridionen (z. B. E48K, S53E und die Doppelmutante S53E/D68S). Das Verhältnis der Permeabilitäten von Natrium- und Chloridionen zueinander wurde durch die Mutationen jedoch nicht beeinflusst, es ist keine ladungsselektive Pore entstanden.

### **Claudin-3**

Wie bereits erwähnt besitzt Claudin-3 im zweiten extrazellulären Loop eine Bindestelle für das *Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPE, siehe 1.3.1) und trägt damit als mögliches Target (neben Claudin-4, -6, -7, -8, -14; Günzel & Yu; 2013) zu einer Lebensmittelvergiftung bei.

Claudin-3 wird in vielen Epithelien und Endothelien des Körpers exprimiert, zumeist auf einem basalen Level. Starke Expression von Claudin-3 findet man in der Blut-Hirn-Schranke, und in den distalen Abschnitten des Darms und der Nierentubuli (Wolburg et al., 2003; Rahner et al., 2001; Kiuchi-Saishin et al., 2002).

In verschiedenen Zellkultursystemen wurde die Funktion von Claudin-3 intensiv untersucht. In Lungenepithelzelllinien bewirkt Claudin-3 eine Erhöhung des TER und eine Verringerung der Permeabilität für Ionen und Makromoleküle (Coyne et al., 2003). Milatz et al. charakterisierten die Funktion des Claudin-3 intensiv in MDCK II-Zellen und konnten seine abdichtende Funktion gegen Ionen, Makromoleküle und auch Wasser bestätigen (Milatz et al., 2010).

### **Claudin-5**

Claudin-5 ist ein wichtiges Protein in den Tight Junction endothelialer Zellen. Knockout-Tiere (Cldn5<sup>-/-</sup>) sterben kurz nach der Geburt aufgrund von Defekten in der Blut-Hirn-Schranke (Nitta et al., 2003). Aber auch in anderen Epithelien, wie Duodenum oder Ileum, konnte Claudin-5 nachgewiesen werden (Rahner et al., 2001). In Überexpressionsstudien in epithelialen Zelllinien konnte eine abdichtende Funktion gezeigt werden (Amasheh et al., 2005). Wen et al. identifizierten zudem die konservierten Cysteine (Positionen 54 und 64) als wichtige Faktoren für die Barrierebildung (Wen et al., 2005).

Der zweite extrazelluläre Loop trägt entscheidend zur Abdichtung gegenüber Makromolekülen bei. Durch ortsgerichtete Mutagenese konnten verschiedene Aminosäuren identifiziert werden, die hierfür essentiell sind (R145, Y148, Piehl et al., 2010). Weiterhin liegt für den ECL2 ein Strukturmodell vor, das mit Hilfe eines sequenzähnlichen Proteins (>80% Homologie) erstellt wurde (Piontek et al., 2008). Der ECL2 wird dabei von einem Helix-Turn-Helix-Motiv gebildet.

#### **1.3.3.2 Kanalbildende Claudine**

Die Bezeichnungen „Kanal“ und „Pore“ werden in der Literatur häufig synonym und uneinheitlich (Shen et al., 2011; Krug et al., 2012) verwendet, sollen hier aber unterschieden werden. Als „Kanal“ wird die vollständige molekulare Einheit bezeichnet, die zur Permeation eines Ions notwendig ist. Die „Pore“ ist der Teil des Kanals, den das Ion oder Wassermolekül durchtritt.

Kanal und Pore können weiter charakterisiert werden. Die Pore von Ionenkanälen ist trichterförmig mit einem weiten Eingang und besitzt in engeren Regionen verschiedene Eigenschaften zur Restriktion des Ionendurchtritts, z. B. einen bestimmten Durchmesser zur Größenselektivität oder eine Nettoladung zur Ladungsselektivität (Dani 1986; Angelow & Yu, 2009). Auf Claudine angewendet bedeutet dies, dass mindestens zwei Claudin-Moleküle einen Kanal ausbilden und die Pore, durch die das Ion tritt, vermutlich von den ersten extrazellulären Loops gebildet wird.

Gating wird häufig für Kanäle beobachtet, stellt aber keine Voraussetzung als Definitionsmerkmal dar, weil z. B. Aquaporinen klassische Gating-Mechanismen fehlen (Tournaire-Roux, 2003). Auch für Claudine ist eine Form von Gating bisher nicht bekannt (Weber CR, 2012; Shen et al., 2008).

### **Claudin-2**

Claudin-2 ist das hinsichtlich seiner Permeabilitätseigenschaften wahrscheinlich am intensivsten untersuchte Claudin. Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn ist Claudin-2 verstärkt exprimiert (Heller et al., 2005; Zeissig et al., 2007). Die physiologische Rolle von Claudin-2 wurde *in vitro* intensiv ausgearbeitet: Furuse et al. konnten zeigen, dass Claudin-2 eine Verringerung des TER verursacht (Furuse et al., 2001), durch selektiven Transport kleiner Kationen durch einen Kanal (Amasheh et al., 2002). Yu et al. konnten die Claudin-2-Pore weiter charakterisieren und bestimmten den Durchmesser mit 6,5-7 Å (Angelow & Yu, 2009, Yu et al., 2009). Zusätzlich konnten sie mit Hilfe der Cystein-Scanning-Mutagenese und dem Einsatz spezieller Inhibitoren sowie Simulationen der Brownschen Molekularbewegung ein Modell der Claudin-2-Pore entwickeln (vgl. Abb. 6), in dem die Aminosäure Aspartat an Position 65, nicht jedoch geladene Aminosäuren an Position 53 oder 76, für die Kationenselektivität verantwortlich ist (vgl. Tabelle 1).

Die Eigenschaften des Claudin-2-Kanals konnte zuletzt 2010 erweitert werden, als beschrieben wurde, dass auch Wasser parazellulär über Claudin-2 transportiert wird (Rosenthal et al., 2010).

### **Claudin-10**

Von Claudin-10 existieren insgesamt sechs verschiedene Splicevarianten (Günzel et al., 2009), wovon zwei, Claudin-10a und -10b intensiv untersucht sind (Van Itallie et al., 2006, Günzel et al., 2009). Claudin-10a und -10b entstehen durch alternatives Splicen und unterscheiden sich im N-terminalen Bereich und im ECL1. Beide Splicevarianten bilden Ionenkanäle aus, jedoch mit unterschiedlicher Ladungsselektivität. Claudin-10b ist stark kationenselektiv, während Claudin-10a präferentiell Anionen transportiert (Van Itallie et al., 2006). Für Claudin-10a gibt es auch Hinweise, welche Aminosäuren eine Rolle für die Chloridpermeabilität spielen. Mittels ortsgerichteter Mutagenese konnten Van Itallie et al. zeigen, dass die Arginine an den Positionen 33 und 59 die Poreneigenschaften beeinflussen, nicht jedoch Lysin an Position 66

(Van Itallie et al., 2006). Die anionenselektive Eigenschaft des Claudin-10a wurde in der Studie von Van Itallie et al. an zwei unterschiedlichen Zelllinien (MDCK II und LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen) demonstriert. In MDCK C7-Zellen, die in der Studie von Günzel et al. verwendet wurden, war die Anionenselektivität weniger stark ausgeprägt. Die Permeabilität für Chloridionen war nach Überexpression von Claudin-10a unverändert, die Permeabilität für Nitrat erhöht (Günzel et al., 2009).

Zu Claudin-10b existieren bislang keine Mutagenesestudien, die den Einfluss einzelner Aminosäuren auf die Ionenpermeabilität beschreiben.

### **Claudin-15**

Wie Claudin-2 und Claudin-10b bildet Claudin-15 einen kationenselektiven Kanal (Van Itallie et al., 2003). Nach einer Überexpression in den bereits erwähnten anionenselektiven LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen erhöht sich die Permeabilität für Natriumionen im Vergleich zur Permeabilität der Chloridionen. In MDCK II-Zellen, die endogen den Kationenkanal Claudin-2 exprimieren, kann nach Überexpression keine gesteigerte Kationenselektivität beobachtet werden (Colegio et al., 2002). Ortsgerichtete Mutagenese mit Claudin-15 in MDCK II-Zellen weisen darauf hin, dass die Aminosäuren Asparaginsäure an Position 55 und Glutaminsäure an Position 64 eine Rolle für die Porenausbildung haben.

Claudin-15-Knockout-Mäuse zeigen einen stark vergrößerten Darm bei ansonsten normaler Körpergröße (Tamura et al., 2008). Auch im Zebrafisch zeigt sich ein veränderter Phänotyp am Darm nach Dysregulation der Claudin-15 Expression (Bagnat et al., 2007).

## **1.4 Claudin-17**

Bis zur funktionellen Charakterisierung des Claudin-17 durch Krug et al. (2012), die dieser Mutagenesestudie vorausging, war sehr wenig über Claudin-17 bekannt. Hu et al. zeigten in einem Methoden-Paper, dass Claudin-17 im Gegensatz zu Claudin-14 in HEK293-Zellen erfolgreich in die Zellmembran eingebaut wird (Hu et al., 2006).

Das Gen, welches Claudin-17 kodiert, ist auf dem langen Arm von Chromosom 21 gelegen (21q22.11) und besteht aus nur einem Exon. In dieser Genregion befindet sich auch das dem Claudin-17 evolutionär verwandte (vgl. Abb. 3) Claudin-8, mit dem es die größte Sequenzhomologie unter den Claudinen teilt.

### **1.4.1 Lokalisation**

Claudin-17 wird in verschiedenen epithelialen und endothelialen Geweben exprimiert. Am intensivsten untersucht ist die Expression in den verschiedenen Abschnitten der Nierentubuli. In proximalen Teilen, wie dem proximalen Tubulus und der Henle-Schleife, ist Claudin-17

stark exprimiert, in weiter distal gelegenen Abschnitten, wie dem distalen Tubulus und dem Sammelrohr, ist die Expression unregelmäßig oder Claudin-17 fehlt vollständig (Krug et al., 2012). Auch in epithelialen Nierenzelllinien, denen Eigenschaften des proximalen Tubulus zugeschrieben werden, konnte Claudin-17 nachgewiesen werden: In LLC-PK<sub>1</sub>-, MDCK II- und MDCK C11-Zellen wird Claudin-17 exprimiert.

Weiterhin wurde Claudin-17 auch im Gehirn und in der Haut gefunden. Während es für die Expression in der Haut (Haarfollikel) gegenteilige Datensätze gibt (Brandner et al., 2002; Krug et al., 2012), ist die Expression im Gehirn bislang nur von Krug et al. beschrieben. Welche Funktion Claudin-17 in diesen beiden Geweben einnimmt, ist unklar.

### 1.4.2 Funktion

Die Funktion von Claudin-17 wurde detailliert in unserem Labor untersucht und ging dieser Mutagenesestudie unmittelbar voraus. Nach Überexpression in der hochohmigen Zelllinie MDCK C7 zeigte sich eine Verringerung des transepithelialen Widerstandes, die mit Hilfe der Zwei-Wege-Impedanz-Technik auf eine Verringerung des parazellulären Widerstandes zurückzuführen war. Bei Dilutionspotential- und Fluxmessungen stellte sich heraus, dass anorganische und organische Anionen selektiv die Tight Junction passieren (Abb. 7), Kationen jedoch in deutlich geringem Maße. Für Chloridionen wurde dies durch direkte Messung mit dem radioaktiven Isotop <sup>36</sup>Cl bestätigt. Die anionenselektive Zelllinie LLC-PK<sub>1</sub> exprimiert endogen stark Claudin-17. Durch transienten Knockdown mittels siRNA gegen Claudin-17 konnte die anionenselektive Eigenschaft der Zellen abgeschwächt werden (Krug et al., 2012).

Hieraus ergab sich, dass Claudin-17 einen ladungsselektiven parazellulären Kanal für anorganische und kleine organische Anionen bildet. Aus der Beziehung zwischen Claudin-17-basierter Permeabilität und den bekannten Durchmessern der unhydrierten Anionen wurde ein Durchmesser für die von Claudin-17 gebildete Pore von 9-10 Å abgeschätzt (Abb. 8).

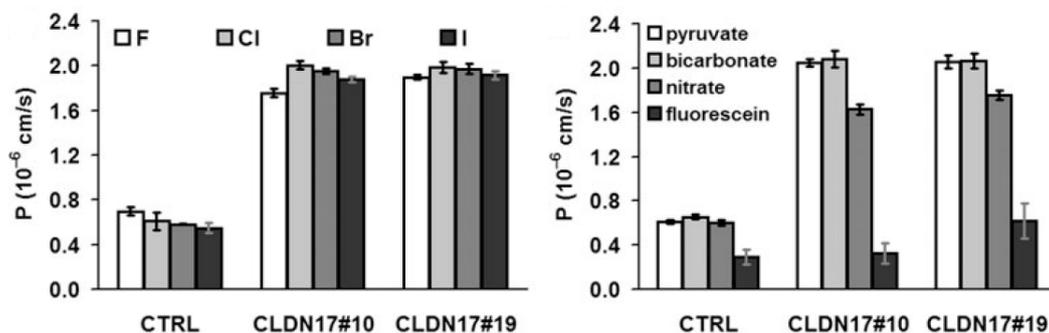


Abbildung 7: **Permeabilität von Claudin-17 transfizierten Zellen.** Permeabilität für anorganische und organische Anionen ermittelt aus Dilutionspotential- und Fluxmessungen mit Claudin-17 transfizierten MDCK C7-Zellen (Klone CLDN17#10 und CLDN17#19) und vektortransfizierten Kontrollen (Krug et al. 2012)

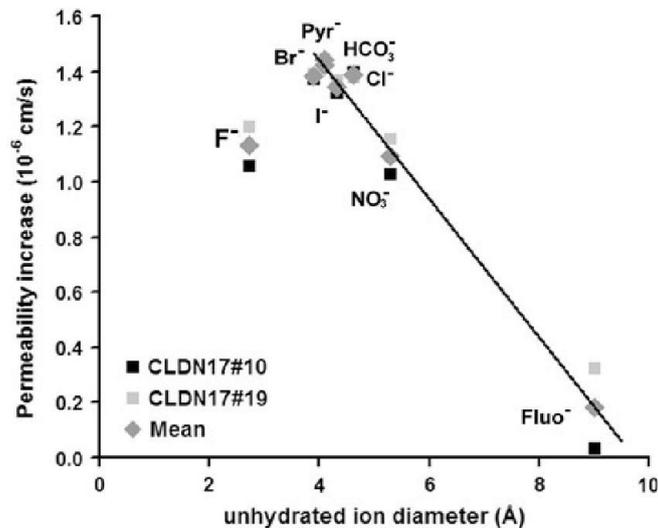


Abbildung 8: **Permeabilitätsänderung kleiner anorganischer und organischer Anionen in Relation zum unhydrierten Ionendurchmesser.** Übersicht über den Permeabilitätsanstieg von CLDN17#10 (schwarze Quader), CLDN17#19 (graue Quader) und deren Mittelwert (graue Rhomben) in Relation zum unhydrierten Ionendurchmesser. Aus der annähernd linearen Beziehung wurde ein Claudin-17-Porendurchmesser von 9-10 Å abgeschätzt (Krug et al., 2012).

Über die physiologische Bedeutung von Claudin-17 an seinem Hauptlokalisationsort, dem proximalen Nierentubulus, existieren noch keine direkten Untersuchungen. Der proximale Tubulus ist der Haupt-Resorptionsort für Chlorid, wobei je zur Hälfte ein transzellulärer und parazellulärer Transportweg angenommen wird, ohne dass die molekulare Basis des parazellulären Durchtritts von Chlorid durch die Tight Junction bisher bekannt war (Alpern et al., 1985; Aronson et al., 1997). In Anbetracht der Lokalisation und Funktion von Claudin-17 ist anzunehmen, dass Claudin-17 die wesentliche molekulare Basis für die parazelluläre Chloridresorption im proximalen Tubulus der Niere darstellt (Krug et al., 2012). Auch weitere Anionen wie Bicarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) könnten durch Claudin-17 parazellulär transportiert werden.

### 1.4.3 Sequenz und Struktur

Wie alle Claudine besitzt Claudin-17 den in Abb. 4 dargestellten Aufbau mit den intrazellulären (C- und N-) Termini, dem kurzen verbindenden Loop, sowie vier Transmembrandomänen und den beiden extrazellulären Loops. Im ersten extrazellulären Loop befinden sich einige Besonderheiten gegenüber anderen kanalbildenden Claudinen (z. B. Cldn2). So ist der ECL1 von Claudin-17 besonders reich an geladenen Aminosäuren (zehn gegenüber fünf in Claudin-2 und Claudin-15). Von Aminosäuren mit positiv oder negativ geladenen Seitenketten geht man nun aus, dass sie aufgrund elektrostatischer Wechselwirkung mit der Umgebung maßgeblich an der Faltung des Proteins und der Wechselwirkung mit der Umgebung beteiligt sind und dadurch großen Einfluss auf die Struktur und Funktion ausüben.

31	81
Homo sapiens	RVS <sup>31</sup> AFVGSNII <sup>56</sup> IVFERLWEGLW <sup>59</sup> MNCIRQARVRLQCKFYSSLLALPPALETAR <sup>81</sup>
Pan troglodytes	RVS <sup>31</sup> AFVGSNII <sup>56</sup> IVFERLWEGLW <sup>59</sup> MNCIRQARVRLQCKVYSSLLALPPALETAR <sup>81</sup>
Mus musculus	RVS <sup>31</sup> AFIGSNII <sup>56</sup> IFERIWEGLW <sup>59</sup> MNCIQ <sup>61</sup> QAM <sup>61</sup> VT <sup>61</sup> LQCKFYNSILALPPVLEAAR
Rattus norvegicus	RVS <sup>31</sup> AFIGSNII <sup>56</sup> IFERIWEGLW <sup>59</sup> MNCIQ <sup>61</sup> QAM <sup>61</sup> VT <sup>61</sup> LQCKFYNSILALPPVLEAAR
Oryctolagus cuniculus	RVS <sup>31</sup> AFIGSNII <sup>56</sup> IVFERIWEGLW <sup>59</sup> MNCV <sup>61</sup> RQARVRFQCKFYSSLLALPPVLEAAR
Canis familiaris	RVS <sup>31</sup> AFVGSNII <sup>56</sup> IVFERLWEGLW <sup>59</sup> MNCV <sup>61</sup> RQAKIRLQCKFYSSLLALPPALEAAR
Sus scrofa	RVS <sup>31</sup> AFIGSNII <sup>56</sup> IVFERIWEGLW <sup>59</sup> MNCV <sup>61</sup> RQAKARLQCKFYSSMLALSPA <sup>61</sup> LEAAR
Bos taurus	RVS <sup>31</sup> AFIGSNII <sup>56</sup> IVFERVWEGLW <sup>59</sup> MNCV <sup>61</sup> RQAKDKLQCKVYD <sup>61</sup> SLALPPALEAAR

Abbildung 9: **Sequenzalignment des ECL1 unterschiedlicher Säugerarten.** Vergleich der Aminosäuresequenz des ECL1 (R31-R81) zwischen verschiedenen Säugerspezies, markiert sind Arginine (Position 56, 59 und 61), für die es in der Maussequenz keine geladene Aminosäuren an der entsprechenden Position gibt.

Innerhalb der Säugetiere ist die Aminosäureabfolge zwischen unterschiedlichen Spezies sehr ähnlich, was nahe legt, dass auch die Funktion erhalten ist. Der Sequenzvergleich des ECL1 (Abb. 9) zeigt, dass fast alle Aminosäuren mit geladenen Seitenketten konserviert sind, mit der Ausnahme dreier Arginine in einem Sequenzabschnitt zwischen Position 56 und 61 (Abb. 9, Markierung). In der Maus findet man in diesem Bereich keine geladenen Aminosäuren, in anderen Spezies sind sie zumindest teilweise erhalten oder durch Variation zu Lysin bleibt die Ladung erhalten.

## 1.5 Lumenmorphogenese im Zellkulturmodell

Die Fähigkeit höherer Lebewesen zur Organisation von Zellen in Gewebe und Organe bringt u. a. den Vorteil der Kompartimentierung. So können verschiedene Funktionsräume, z. B. das Innere des Gastrointestinaltraktes zur Verdauung, abgegrenzt werden. Die polarisierten Zellen der Epithelien, welche die verschiedenen Kompartimente auskleiden, sind entscheidend an der Ausbildung dieser flüssigkeitsgefüllten Lumen beteiligt. So können kleine Lumen bereits von einer einzelnen Zellen umschlossen sein, z. B. in den Tracheen von *Drosophila melanogaster*, zumeist werden Lumen von mehreren Epithelzellen begrenzt (Lubarsky & Krasnow, 2003). Die Entwicklung ganzer Hohlorgane, die häufig röhrenförmig sind, kann sehr unterschiedlich sein und Faltungen, Einstülpungen und andere Mechanismen benötigen. Molekulare Prozesse der zugrunde liegenden zellulären Mechanismen werden zumeist in einfachen Systemen, wie Zellkultur, untersucht. Die konventionelle Zellkultivierung eignet sich hierbei jedoch nicht, erst in Kultivierung mit Zusatz von Bestandteilen der Extrazellulären Matrix, wie Laminin und Kollagen, bilden manche Epithelzellen, darunter MDCK-Zellen, dreidimensionale Strukturen (Zysten). Das 3D-Zellkulturmodell wird häufig zur Studie initialer Polarisierungsprozesse verwendet, die einer Lumenformation unmittelbar vorausgehen (Bryant et al., 2010; Apodaca, 2010).

Die Etablierung des Initiationskomplexes an der apikalen Membran („apical membrane initiation site“ AMIS) benötigt die koordinierte Exozytose verschiedener Proteine wie Par3, aPKC und Crb3, und ist ein Prozess, der vor der Ausbildung des junctionalen Komplexes stattfindet. Erst dann ist ein initiales Lumen definiert und wird durch orientierte Zellteilungen (Mao et al., 2011) und Ionen- und Wasserfluss verändert (Buchholz et al., 2011; Apodaca et al., 2010). Für die Lumenformation in der 3D-Zellkultur gibt es mindestens drei prinzipielle Mechanismen (Datta et al. 2011):

- **A Focalized contact** - benachbarte Zellen adhäreren nur an den am meisten lateral gelegenen Seiten ihrer apikalen Membran.
- **B Hollowing** - dabei wird *de novo* ein apikales Lumen gebildet durch apikalen Transport aneinander liegender Zellen.
- **C Cavitation** - innere Zellen eines Clusters gehen in Apoptose.

Gewöhnlich können alle diese drei Möglichkeiten der Lumenformation beobachtet werden (Abb. 10).

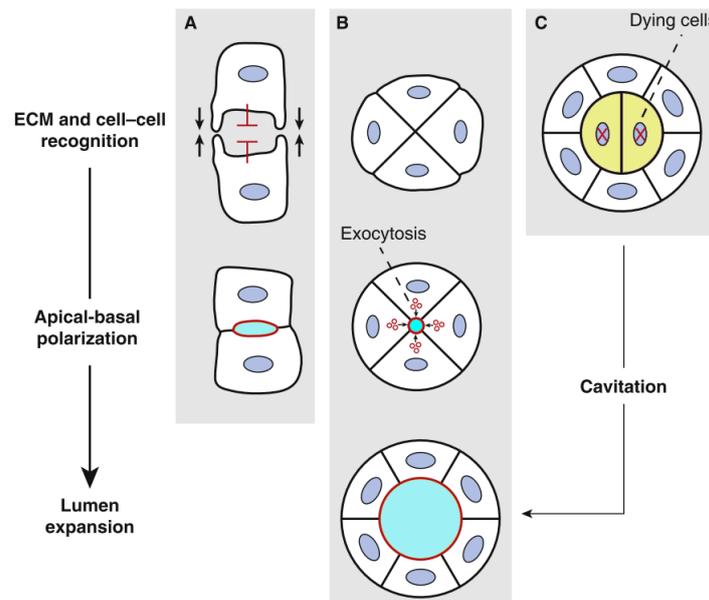


Abbildung 10: **Mechanismen der *de novo*-Lumenformation in 3D-Zellkultur.** Drei mögliche Mechanismen zur Ausbildung von flüssigkeitsgefüllten Lumen in multizellulären Zysten, **A** fokussierter Kontakt, **B** Aushöhlung (hollowing) und **C** Cavitation (modifiziert nach Datta et al., 2011).

Die in **B** dargestellte Lumenexpansion durch Einstrom von Ionen und Wasser kann über den transzellulären und parazellulären Transportweg erfolgen. Der parazelluläre Transport von Ionen wird über kanal- und barrierebildende Claudine (siehe 1.3.3.1, 1.3.3.2 und 1.4.2) reguliert,

zudem ermöglicht Claudin-2 den parazellulären Transport von Wasser. Für verschiedene Claudine wurde der Einfluss auf die Lumentstehung von Zysten bereits nachgewiesen. Die Dysregulation von Claudin-15 führt zu dem bereits erwähnten Phänotyp am Darm von Zebrafischen (siehe auch 1.3.3.2). Wie Bagnat et al. zeigten, hatte eine verringerte Expression von Claudin-15 aufgrund einer Mutation im Transkriptionsfaktor Tcf2 zur Folge, dass *in vivo* mehrere Lumen gebildet wurden. In *in vitro*-Experimenten im 3D-Zellkulturmodell wurde nach Überexpression von Claudin-15 gezeigt, dass sich die Anzahl der Zysten mit mehreren Lumen reduziert und die Größe des Lumens zunimmt. Zusätzlich konnten die Autoren die Rolle transzellulärer Transportproteine mit Hilfe von Forskolin und Oubain herausarbeiten (Bagnat et al., 2007). Schlüsselrollen spielen dabei die Na-K-ATPase und der CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; Bagnat et al., 2007; Li & Naren 2010). Die Ausbildung und Expansion des flüssigkeitsgefüllten Lumens wird durch transzelluläre und parazelluläre Transportprozesse gesteuert.

## 1.6 Zielsetzung

Claudin-17 wurde als ein Tight Junction-Protein beschrieben, das selektiv den Transport von Anionen ermöglicht (Krug et al., 2012). Das Überexpressionsmodell in MDCK C7-Zellen wurde in diesem Institut etabliert und charakterisiert. So war bekannt, dass sich die Tight Junction-Ultrastruktur durch Überexpression nicht verändert und Claudin-17 für Kationen und Wasser impermeabel ist. Das charakteristische Merkmal des Claudin-17 ist es einen Kanal für Anionen zu bilden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die molekulare Basis der Claudin-17-Pore intensiv untersucht. Da wie bereits erwähnt hochauflösende strukturelle Methoden wie Röntgenkristallographie und NMR-Spektroskopie zur Analyse der Claudinstruktur nicht angewandt werden können, sollen in dieser Arbeit durch ortsgerichtete Mutagenese Kenntnisse über die molekulare Grundlage der Claudin-17-Pore, insbesondere über die an der Porenbildung beteiligten Aminosäuren, gewonnen werden. Dazu wurden verschiedene Mutationen in Claudin-17 eingeführt, in MDCK C7-Zellen überexprimiert und hinsichtlich ihrer Fähigkeit eine Anionenpore auszubilden untersucht. Der Fokus lag dabei hauptsächlich auf den geladenen Aminosäuren des ersten extrazellulären Loop (ECL1), zusätzlich wurde jedoch auch der zweite extrazelluläre Loop (ECL2), wenn auch in geringerem Ausmaß, untersucht, da bekannt war, dass der ECL2 in Claudin-5 an der barrierebildenden Funktion beteiligt ist (Piehl et al., 2010).

Zudem wurde ein 3D-Zellkulturmodell etabliert, in dem MDCK C7-Zellen in einem Trägermaterial aus extrazellulärer Matrix wachsen und komplexe dreidimensionale Zysten ausbilden. In einem systematischen Ansatz wurde der Einfluss kanal- und barrierebildender Claudine auf die Lumengröße der entstehenden Zysten untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

<b>Apparatur</b>	<b>Hersteller</b>
Brutschrank HeraCell	Heraeus (Frankfurt)
Elektrophoresekammer	Biorad (München)
Feinwaage	Sartorius (Göttingen)
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf
Heizrührer IKAMAG RCT	IKA Labortechnik (München)
HI 9017 microprocessor pH meter	Hanna Instruments (Kehl)
Inkubator 1000	Heidolph Instruments (Schwabach)
Kühlzentrifuge Avanti™ J25	Beckmann (Lohnhof)
Konfokales Laser Scanning	Zeiss (Jena)
Mikroskop LSM510 Meta	
Mikrowelle	Privileg (Stuttgart)
Mikroplattenlesegerät Infinite M200	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Nanodrop ND-1000	Peqlab (Erlangen)
PCR-Gerät Thermal Cycler 2720	Applied Biosystems(Carlsbad, CA, USA)
Sicherheitswerkbank	Heraeus
Speed Vac	Uniequip (Martinsried)
Tischzentrifuge z233MK	Hermle (Wehingen)
Ultraschallprozessor UP50H	Hielscher (Teltow)
Ussing-Kammer	Institut für Klinische Physiologie (Berlin)
UV-Detektionsanlage	MS-Laborgeräte (Heidelberg)
Vortexgerät	Pharmacia (Freiburg)
Western Blot-Detektionsanlage	Vilber Lourmat (Torcy, Frankreich)
Fusion FX7	
Widerstandsmessgerät	Institut für Klinische Physiologie (Berlin)

### 2.2 Verbrauchsmaterial

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Deckgläser	Menzel Gläser (Braunschweig)
Insulinspritze 1 ml	BD Biosciences (Oxford, UK)
Kryoröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
Labtek® (8 Well)	Thermo Fisher Scientific (Rochester, NY, USA)
Mikrotiterplatten (96 Well)	Sarstedt
Millicell HA-Filter	Millipore (Schwalbach)

Objektträger	Menzel Gläser (Braunschweig)
Pasteurpipetten	Roth (Karlsruhe)
Pipetten (10 µl, 100 µl, 1.000 µl)	Eppendorf
PVDF Membran	Perkin Elmer (Zaventem, Belgien)
Reaktionsgefäße (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (15 ml; 50 ml)	BD Biosciences
Zellkulturflasche (75 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt
Zellkulturschale (6 cm, 10 cm)	Sarstedt
Zellschaber	Sarstedt
Zellulosefilter Whatman®	neoLab Migge (Heidelberg)

## 2.3 Reagenzien und Chemikalien

### 2.3.1 Laborchemikalien

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
β-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
Acrylamid	Merck
Agarose	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Ratiopharm (Ulm)
Bacto™ Agar	BD Biosciences
BCA Protein Assay Reagent A+B	Thermo Fisher Scientific (Rochester, NY, USA)
Bromphenolblau Natriumsalz	Merck
Bovine Serum Albumine (BSA)	AppliChem (Darmstadt)
Calciumchlorid	Merck
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Roche
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	Roth
Ethanol	J.T.Baker (Deventer, Niederlande)
Ethidiumbromid	Invitrogen (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Serva (Heidelberg)
Ethylenglycoltetraacetat (EGTA)	Sigma
Glucose	Roth
Glycerin	Roth
Glycin	Serva
HEPES	Serva

Immersionsöl für Mikroskopie	Zeiss
Isopropanol	J.T.Baker (Deventer, Niederlande)
Kaliumchlorid	Merck
LB Powder	MP Biomedicals (Solon, OH, USA)
Magnesiumchlorid	Merck
Mannitol	Sigma
Matrigel™	BD Biosciences
Methanol	Merck
MountFluor (Mounting Medium)	Biocyc (Luckenwalde)
Natriumazid	Sigma
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumdodecylsulfat	Roth
Natriumnitrat	Roth
Natriumpyruvat	Roth
Natriumthiocyanat	Fluka AG
PBS-Tabletten	Gibco
Phalloidin-AlexaFluor594	Invitrogen
TAE-Puffer (50×)	Genaxxon biosciences
TEMED	Roth
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth
Triton X-100	Sigma
Trypanblau	Chroma (Stuttgart)
Tween 20	Sigma
Ziegenserum	Sigma

## 2.3.2 Antikörper

### 2.3.2.1 Primärantikörper

Die Immundetektion endogen und exogen exprimierter Proteine erfolgte mit Hilfe mono- oder polyklonaler Antikörper, die spezifisch gegen ein Epitop des Proteins produziert wurden. In nachstehender Tabelle sind alle zur Anwendung gekommenen Primärantikörper aufgelistet.

<b>Bezeichnung (Hersteller)</b>	<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
FLAG M2 (Sigma)	monoklonaler anti-FLAG-Tag Antikörper, IgG aus Maus	1:5.000 (WB) 1:600 (IF)
Occludin (Invitrogen)	monoklonaler anti-Occludin Antikörper, IgG aus Kaninchen oder Maus	1:250 (IF)
ZO-1 (Invitrogen)	polyklonaler anti-ZO-1 Antikörper, IgG aus Kaninchen	1:250 (IF)
$\beta$ -Aktin (Sigma)	monoklonaler anti- $\beta$ -Aktin Antikörper, IgG aus Maus	1:10.000 (WB)
Claudin-1 (Invitrogen)	polyklonaler anti-Claudin-1 Antikörper, IgG aus Kaninchen	1:1.000 (WB) 1:250 (IF)
Claudin-4 (Invitrogen)	monoklonaler anti-Claudin-4 Antikörper, IgG aus Maus	1:1.000 (WB) 1:250 (IF)
Claudin-8 (Invitrogen)	polyklonaler anti-Claudin-8 Antikörper, IgG aus Kaninchen	1:250 (IF)
E-Cadherin-647 (BD Biosciences)	Fluorochromgekoppelt, monoklonaler anti-E-Cadherin Antikörper, IgG aus Maus	1:50 (IF)

### 2.3.2.2 Sekundärantikörper

Alle verwendeten Sekundärantikörper sind gegen den F<sub>c</sub>-Teil des jeweiligen Primärantikörper gerichtet und sind enzym- oder fluorochromgekoppelt.

<b>Bezeichnung (Hersteller)</b>	<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
Anti-Maus-POD (Jackson, Suffolk, UK)	Peroxidasegekoppelt, anti-Maus Antikörper	1:10.000
Anti-Kaninchen-POD (Jackson)	Peroxidasegekoppelt, anti-Kaninchen Antikörper	1:10.000
Alexa Fluor594 (Invitrogen)	Fluorochromgekoppelt, anti-Maus Antikörper	1:500
DyLight488 (Jackson)	Fluorochromgekoppelt, anti-Kaninchen Fab	1:500

Alle (Primär- und Sekundär-) Antikörper wurden in den angegebenen Verdünnungen eingesetzt. Für die Immundetektion nach Elektrophorese und Western Blot (WB) oder die Immunfluoreszenz-Färbung (IF) wurden die Antikörper in unterschiedlicher Konzentration eingesetzt.

## 2.3.3 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

Name	Länge [bp]	Sequenz [5'-3']
K65E forw	30	AGGGTCCGGTTGCAATGCGAGTTCTATAGC
K65E rev	30	CTATAGAACTCGCATTGCAACCGGACCCTG
K65A forw	30	AGGGTCCGGTTGCAATGCGCGTTCTATAGC
K65A rev	30	CTATAGAACGCGCATTGCAACCGGACCCTG
K65R forw	30	AGGGTCCGGTTGCAATGCAGGTTCTATAGC
K65R rev	30	CTATAGAACCTGCATTGCAACCGGACCCTG
R31E forw	30	CCTTCTGCCTCAGTGGGAAGTATCAGCTTT
R31E rev	30	AAAGCTGATACTTCCCCTGAGGCAGAAGG
E44A forw	31	AACATTATTGTCTTTGCGAGGCTCTGGGAAG
E44A rev	31	CTTCCCAGAGCCTCGCAAAGACAATAATGTT
R45A forw	30	CATTATTGTCTTTGAGGCGCTCTGGGAAGG
R45A rev	31	CCTTCCCAGAGCGCCTCAAAGACAATAATG
E48K forw	30	GCTCTGGAAAGGGCTCTGGATGAATTGCAT
E48K rev	34	GAGCCCTTTCCAGAGCCTCTCAAAGACAATAAT
E48Q forw	30	TCTTTGAGAGGCTCTGGCAAGGGCTCTGAA
E48Q rev	34	GAGCCCTTGCCAGAGCCTCTCAAAGACAATAATG
R56A forw	31	GAATTGCATCGCACAAGCCAGGGTCCGGTTG
R56A rev	31	CAACCGCGACCCTGGCTTGTGCGATGCAATTC
R56T forw	31	GAATTGCATCACACAAGCCAGGGTCCGGTTG
R56T rev	31	CAACCGCGACCCTGGCTTGTGTGATGCAATTC
R59A forw	30	CATCCGACAAGCCGCGGTCCGGTTGCAATG
R59A rev	30	CATTGCAACCGGACCGCGGCTTGTCCGGATG
R61A forw	26	GACAAGCCAGGGTCGCGTTGCAATGC
R61A rev	26	GCATTGCAACGCGACCCTGGCTTGTC
Y149A forw	28	CATCAGAGATTTCCGCAACCCAGCCATC
Y149A rev	28	GATGGCTGGGTTGGCGAAATCTCTGATG
H154A forw	29	CAACCCAGCCATCGCCATAGGTCAGAAAC
H154A rev	29	GTTTCTGACCTATGGCGATGGCTGGGTTG
N-CMV-30F	30	AATGTCGTAATAACCCCGCCCGTTGACGC
C-CMV-24R	24	TATTAGGACAAGGCTGGTGGGCAC
CFP/YFP N For	22	ACATGGTCCTGCTGGAGTTCGT
Cldn17HindIII	36	CCAAGCTTCGTATGGCATTATCCCTTGCAAATTG
CMV10 forw		
Cldn17BamHI	33	CGCGGATCCTTAGACATAACTGGTGGAGGTCTT
CMV10 rev		

hCldn17 BamHI 33	AAAGGATCCAATGGCATT TTTATCCCTTGCAAAT
CFP for	
hCldn17 EcoRI 33	GGCGAATTCTTAGACATAACTGGTGGAGGTCTT
CFP rev	

Alle Primer wurden von metabion international (Martinsried) bezogen.

### 2.3.4 Enzyme und Kits

Name	Hersteller
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs (NEB, Beverly, MA, USA)
Plasmid Midi Kit	Qiagen (Hilden)
Plasmid Mini Kit	Qiagen
LumiLight <sup>PLUS</sup> Western Blotting Kit	Roche
NucleoSpin <sup>®</sup> Extract II DNA Gel Isolation Kit	Macherey-Nagel (Düren)
HotStartTaq <sup>®</sup> DNA-Polymerase Kit	Qiagen
<i>BamHI</i>	NEB
<i>EcoRI</i>	NEB
<i>HindIII</i>	NEB
<i>Pfu</i> -Polymerase	Stratagene
T4 DNA Ligase	NEB

### 2.3.5 Größen- und Molekulargewichtsmarker

#### 2.3.5.1 DNA-Größenmarker

Die Größe linearer, doppelsträngiger DNA-Moleküle kann bei der gelelektrophoretischen Auftrennung anhand eines Größenmarkers abgeschätzt werden. Zur Anwendung kam „GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder“ der Firma Thermo Scientific (Abb. 11). Dieser Größenstandard umfasst DNA-Fragmente von 100 bp bis 1.000 bp in folgender Reihenfolge:

100 / 200 / 300 / 400 / 500 / 600 / 700 / 800 / 900 / 1.000

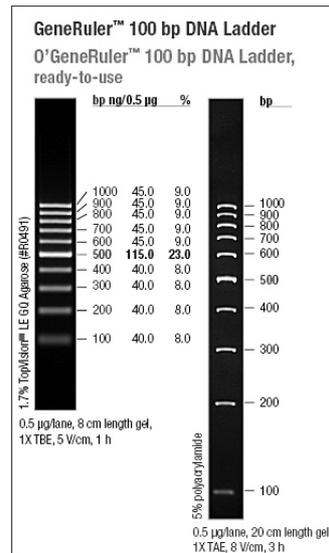


Abbildung 11: **GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific)** Größenmarker GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific)

Zudem wurde auch „ $\lambda$ /HindIII“ der Firma Thermo Scientific eingesetzt (Abb. 12). Dabei handelt es sich um DNA des Phagen  $\lambda$ , die mit der Restriktionsendonuklease *HindIII* verdaut wurde und in Stücke bekannter Größe fragmentiert wird:

125 / 564 / 2.027 / 2.322 / 4.361 / 6.557 / 9.416 / 23.130

Die Lauffront ist zusätzlich mit einem blauen Farbstoff markiert.

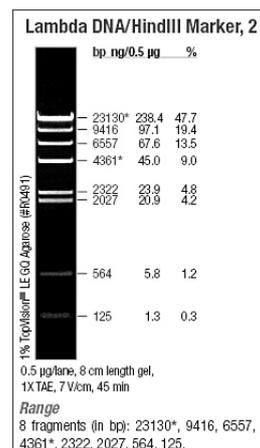


Abbildung 12: **DNA-Größenmarker  $\lambda$ /HindIII (Thermo Scientific)**

### 2.3.5.2 Molekulargewichtsmarker für Proteine

Die Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen erfolgte mit Hilfe des Molekulargewichtsmarkers PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific), welcher aus einer Mischung von zehn, in *E. coli* rekombinant hergestellter, aufgereinigter, vorgefärbter Polypeptide besteht. Die Proteine sind zwischen 10 und 170 kDa groß und mit einem blauen Farbstoff kovalent verbunden, zwei Referenzbanden tragen eine andere Färbung. Die 70 kDa-Bande ist orange eingefärbt, die 10 kDa-Bande ist grün (siehe Abb. 13). Die Markerproteine tragen folgende Molekulargewichte (nach aufsteigenden Molekulargewicht, in kDa):

10 / 17 / 26 / 34 / 43 / 55 / 72 / 95 / 130 / 170

Zusätzlich ist es mit den vorgefärbten Proteinen möglich den Erfolg eines Proteintransfers auf eine (PVDF-) Membran zu überprüfen.

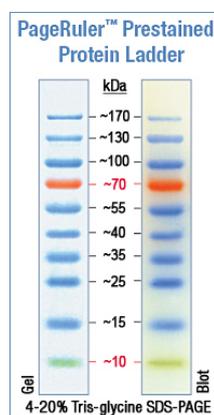


Abbildung 13: **Proteinmarker zur Bestimmung des Molekulargewichts**, PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)

## 2.4 Puffer und Lösungen

### 2.4.1 Puffer und Lösungen für DNA-Techniken

Puffer	Zusammensetzung
6× Ladepuffer für Elektrophorese	50 mM EDTA 50% Glycerin 0,25% Bromphenolblau
50× TAE-Puffer	2 M Tris 0,1 M EDTA 1 M Eisessig

## 2.4.2 Puffer und Lösungen für Proteinbiochemie

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
5× Lämmli	10% SDS 500 mM DTT 500 mM Tris (pH= 6,8) 0,001% Bromphenolblau 50% Glycerol
10× Western-Puffer	1,9 M Glycin 0,25 M Tris
1× Western-Transferpuffer	10% 10× Western-Puffer 10% Methanol
1× Elektrophoresepuffer	10% 10x Western-Puffer 1% SDS
Blockierungslösung (in PBS)	5% BSA 0,0025% Natriumazid
TBST (pH= 7,3)	1,37 M NaCl 0,1 M Tris 0,1% Tween 20
Membranlysepuffer (in PBS)	1 M Tris 1 M MgCl <sub>2</sub> 0,5 M EDTA 0,5 M EGTA
Gesamtlysepuffer (in PBS)	10 mM Tris 150 mM NaCl 0,5% Triton X-100 0,1% SDS
RIPA-Puffer	25 mM HEPES 2 mM EDTA 25 mM NaF 1% SDS
Sammelgel	5,1% Acrylamid 0,125 M Tris (pH= 6,8) 0,1% SDS 0,1% APS 0,01% TEMED
Trenngel	12,5% Acrylamid 0,35 M Tris 0,1% SDS

0,1% APS  
0,01% TEMED

---

Alle Puffer und Lösungen für die Proteinbiochemie wurden, falls nicht anders angegeben, in  $H_2O_{dd}$  angesetzt.

### 2.4.3 Puffer und Lösungen für die Gefrierbruchelektronenmikroskopie

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Glutaraldehydpuffer (in $H_2O_{dd}$ )	60 mM $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$ 10 mM $KH_2PO_4$ 2,5% Glutaraldehyd
Glycerollösungen (in $H_2O_{dd}$ )	10% Glycerol 30% Glycerol

### 2.4.4 Lösungen für die Elektrophysiologie

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Na-Ringer für monovalente Anionen	140 mM NaCl 5,4 mM KCl 1 mM $MgCl_2$ 1,2 mM $CaCl_2$ 10 mM HEPES 10 mM Glukose mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt
Mannitol-Ringer für monovalente Anionen	280 mM Mannitol 5,4 mM KCl 1 mM $MgCl_2$ 1,2 mM $CaCl_2$ 10 mM HEPES 10 mM Glukose mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt
modifizierte Ringer für monovalente Anionen	140 mM $NaNO_3$ / Na-Pyruvat/ $NaSCN$ 5,4 mM KCl 1 mM $MgCl_2$ 1,2 mM $CaCl_2$ 10 mM HEPES

	10 mM Glukose mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt
Standard-Ringer 111	113,6 mM NaCl 21 mM NaHCO <sub>3</sub> 5,4 mM KCl 1 mM MgSO <sub>4</sub> 1,2 mM CaCl <sub>2</sub> 3 mM HEPES 10 mM Glukose

Alle Lösungen für die Elektrophysiologie wurden in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> angesetzt.

## 2.5 Materialien zur Bakterienkultur

### 2.5.1 Bakterienstämme

Zur Transformation von Plasmiden (z. B. pCMV10-Vektor) und deren Vermehrung im prokaryotischen Organismus wurden OneShot<sup>®</sup> Top 10F<sup>'</sup>-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

### 2.5.2 Kulturmedien

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium (als LB Powder)	Trypton 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl 10 g/l
LB-Agar	Trypton 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl 10 g/l Agar 15 g/l
SOC-Medium (Invitrogen)	2% Trypton 0,5% Hefeextrakt 0,06% NaCl 0,05% KCl

Das SOC-Medium wurde gebrauchsfertig vom Hersteller zur Verfügung gestellt. Die Medien wurden in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> angesetzt und durch Autoklavieren sterilisiert. Ampicillin (Ratiopharm) wurde in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt, um einen Selektionsdruck zu erzeugen.

## 2.6 Materialien zur eukaryotischen Zellkultur

### 2.6.1 Zelllinien

#### MDCK C7

MDCK C7 sind epitheliale Zellen aus der Hundeniere und exprimieren kein Claudin-17.

<b>Name</b>	<b>Plasmid</b>	<b>Resistenz</b>
MDCK C7 Vektor (CTRL)	pCMV10	Geneticin (G418)
MDCK C7 Cldn17 wt	pCMV10-Cldn17wt	G418
MDCK C7 mCldn17	pCMV10-mCldn17	G418
MDCK C7 K65A	pCMV10-Cldn17 K65A	G418
MDCK C7 K65E	pCMV10-Cldn17 K65E	G418
MDCK C7 K65R	pCMV10-Cldn17 K65R	G418
MDCK C7 R31E	pCMV10-Cldn17 R31E	G418
MDCK C7 E44A	pCMV10-Cldn17 E44A	G418
MDCK C7 R45A	pCMV10-Cldn17 R45A	G418
MDCK C7 E48K	pCMV10-Cldn17 E48K	G418
MDCK C7 E48Q	pCMV10-Cldn17 E48Q	G418
MDCK C7 R56A	pCMV10-Cldn17 R56A	G418
MDCK C7 R56T	pCMV10-Cldn17 R56T	G418
MDCK C7 R59A	pCMV10-Cldn17 R59A	G418
MDCK C7 R61A	pCMV10-Cldn17 R61A	G418
MDCK C7 Y149A	pCMV10-Cldn17 Y149A	G418
MDCK C7 H154A	pCMV10-Cldn17 H154A	G418
MDCK C7 Cldn2	pCMV4-Cldn2	G418
MDCK C7 Cldn3	pCMV10-Cldn3	G418
MDCK C7 Cldn4	pCMV10-Cldn4	G418
MDCK C7 Cldn15	pCMV4-Cldn15	G418
MDCK C7 pcDNA	pcDNA	G418
MDCK C7 pcDNA Cldn10a	pcDNA-Cldn10a	G418
MDCK C7 pcDNA Cldn10b	pcDNA-Cldn10b	G418

Die hier aufgelisteten Zelllinien leiten sich aus der zuvor beschriebenen Zelllinie MDCK C7 (Gekle et al., 1994), durch stabile Transfektion eines Expressionsvektors (pCMV4, pCMV10 oder pcDNA) ab, der eines der angegebenen Inserts enthält. Die Zelllinien, die exogen Claudin-2, Claudin-15, Claudin-10a oder Claudin-10b in MDCK C7-Zellen exprimieren, wurden nicht im Rahmen dieser Arbeit generiert, sondern wurden in Vorarbeiten im Institut erzeugt und charakterisiert (Rosenthal et al., 2010, Günzel et al., 2009; Rosenthal unveröffentlichte Daten).

Individuelle Klone sind durch „#“ und eine ein- bis vierstellige Nummer gekennzeichnet.

### HEK293

HEK293 sind adhärent wachsende Zellen einer humanen embryonalen Niere. Sie bilden keine Tight Junctions und exprimieren weder Claudine noch Occludin.

Durch transiente Transfektion mit den nachstehend aufgelisteten Plasmiden wurden in HEK293 Fusionsproteine aus cyan fluorescent protein (CFP) und Claudin-17 bzw. den ECL2-Mutanten exprimiert.

Name	Plasmid
HEK293 CFP-Cldn17	CFP-wtCldn17
HEK293 CFP-Cldn17Y149A	CFP-Cldn17Y149A
HEK293 CFP-Cldn17H154A	CFP-Cldn17H154A

#### 2.6.2 Zellkulturmedien und Lösungen

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
MEM Eagle's Salts	Glukose 1,0 mg/ml ohne essentielle Aminosäuren ohne L-Glutamin oder NaHCO <sub>3</sub>	Sigma
Fötales Kälberserum (FKS)		Sigma
Geneticin Stammlösung	30.000 U/ml G418	Biochrom (Berlin)
HEPES-Lösung (in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> )	145 mM NaCl 2,4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,6 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5,4 mM KCl 1,2 mM MgCl <sub>2</sub> 1,2 mM CaCl <sub>2</sub> 10,6 mM HEPES 10 mM D(+)-Glukose pH 7,4	
Penicillin/Streptomycin Stammlösung (100-fach)	Penicillin 10.000 U/ml Streptomycin 10 mg/ml in 0,9% NaCl	PAA Laboratories (Pasching)
Trypsin/EDTA	Trypsin 5 g/l EDTA 2 g/l	Sigma
Trypanblau	1% Trypanblau	

	0,05% HEPES	
Poly-L-Lysin	0,01% Poly-L-Lysin	Sigma

Das „Minimum Essential Medium (MEM) Eagle’s Salts“ wurde mit FKS (10% v/v) und Penicillin/Streptomycin supplementiert. Zusätzlich wurde G418 (300 U/ml - 600 U/ml) zugegeben, wann immer ein Selektionsdruck aufrechterhalten werden musste.

## 2.7 Computersoftware

Microsoft Office 2000 kam für die meisten Standardanwendungen wie Erzeugung von Datentabellen und Abbildungen zum Einsatz.

Zur Auswertung von DNA-Sequenzierungen wurden Chromas (Chromas Lite, Version 2.01, Technelysium Pty Ltd) und die Onlinesoftware BLAST<sup>®</sup> (Basic Local Alignment Search Tool) der National Library of Medicine (<http://www.blast.ncbi.nih.gov>, Abrufdatum 16.10.13) verwendet.

Mikrotiterplatten wurden im Multiplattenlesegerät „infinite M200“ mit der dazugehörigen Software Tecan i-control (Version 1.5.14) gemessen und ausgewertet.

Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden mit der LSM-Software der Firma Zeiss oder mit FIJI (Schindelin et al., 2012) bearbeitet.

In Ussing-Kammer-Experimenten kam die am Institut entwickelte Software Analogon zum Einsatz (Dipl.-Ing. Detlef Sorgenfrei, Institut für Klinische Physiologie).

## 2.8 Statistische Tests

Alle Messwerte sind als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM, *standard error of the mean*) angegeben. Zur Bewertung der Signifikanz wurde unter Annahme einer Normalverteilung der Grundgesamtheiten der ungepaarte Student’s t-Test für unterschiedliche oder nicht verschiedene Varianzen durchgeführt, sowie anschließend eine Bonferroni-Holm-Korrektur angewandt, sofern mehr als zwei Stichproben verglichen wurden. Ergebnisse wurden als signifikant betrachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit mit  $p < 0,05$  berechnet wurde (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## 2.9 Kultivierung von prokaryotischen Zellen

In einer Flüssigkultur prokaryotischer Zellen kann man verschiedene Wachstumsphasen unterscheiden. Zunächst befinden sich die Bakterien in der „Lag-Phase“, in der sie sich an das Nährstoffangebot, den Sauerstoffgehalt, pH etc. anpassen. In der darauf folgenden „Log-Phase“ ver-

mehren sich die Zellen exponentiell. Es wird die „Stationäre Phase“ erreicht, in der die Gesamtzellzahl konstant ist. Abschließend ist in der Kultur eine „Absterbephase“ zu beobachten, die Nährstoffe im Kulturmedium sind aufgebraucht, der pH-Wert hat sich durch die Stoffwechselaktivität und -produkte verändert und ist für das prokaryotische Wachstum ungeeignet, zudem reichern sich toxische Produkte des Sekundärstoffwechsels an, die in die Umgebung abgegeben werden. Die Bakterien sterben ab.

Für die Molekularbiologie sind Mikroorganismen als Produzenten heterologer Proteine und DNA ein wichtiges Werkzeug. So wird der Laborstamm *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  häufig als „Zwischenwirt“ verwendet um Gene von einem Organismus auf einen anderen zu übertragen, z. B. das humane Claudin-17-Gen in MDCK C7-Zellen.

### 2.9.1 Transformation kompetenter Zellen

Die Aufnahme freier DNA aus der Umgebung in eine Bakterienzelle wird als Transformation bezeichnet. Dies ist eine natürliche Eigenschaft vieler Prokaryoten, andere prokaryotische Zellen können durch unterschiedliche Arten der Behandlung „kompetent“ gemacht werden.

Kommerzielle OneShot<sup>®</sup> Top 10F'-Zellen wurden auf Eis aufgetaut (50  $\mu$ l, 30 min). Zu den Bakterien wurden 3  $\mu$ l Plasmid-DNA oder Ligationsansatz pipettiert und für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation der Zellen per Hitzeschock bei 42 °C für 45 Sekunden. Es wurden umgehend 250  $\mu$ l vorgewärmtes (37 °C) SOC-Medium (frei von Selektionsantibiotika) zugegeben, die Kulturen wurden bei 37 °C und 250 rpm für 60 min inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen auf einer selektionsantibiotikumhaltigen LB-Agarplatte ausplattiert. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.9.2 Glycerolstocks

Zur langfristigen Konservierung von Bakterienkulturen können diese bei tiefen Temperaturen eingefroren werden. Als protektive Maßnahme wird üblicherweise Glycerol beigemischt um eine Beschädigung der prokaryotischen Zellen durch Eiskristalle zu verhindern.

Von einer frischen Übernachtskultur wurden 850  $\mu$ l in Kryoröhrchen gefüllt und mit 150  $\mu$ l Glycerol gemischt, anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

## 2.10 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Unter Zellkultur versteht man das Wachstum, die Vermehrung und Kultivierung eukaryotischer Zellen außerhalb eines Organismus.

Man unterscheidet Zellkulturen nach Art der Herkunft der Zelle (Primärzelllinie oder Tumorzelllinie) oder nach Art des Wachstums (Adhäsionskultur oder Suspensionskultur). Primärzellen, z. B. Fibroblasten, sind schwieriger zu gewinnen und stellen oft komplexere Anforderungen an die Zusammensetzung des Mediums als Tumorzelllinien. Einfache Kulturmedien sind zumeist gepufferte, halbsynthetische Nährmedien, denen je nach Anwendungszweck und Anforderungen der Zelllinie mit Salzen, Aminosäuren, Vitaminen und Mineralstoffe zugesetzt werden. Weiterhin sind auch Hormone und Wachstumsfaktoren für die Zellen notwendig und werden den Medien zugefügt, dies kann durch Zusatz von Fötalem Kälberserum (FKS) geschehen oder durch Zugabe definierter Mengen der gewünschten Faktoren (Definiertes Medium).

Viele der üblicherweise im Labor eingesetzten Zelllinien wachsen als Adhäsionskultur, eine Ausnahme bilden die Zellen des peripheren Blutes, z. B. T-Zellen, die als Suspensionskultur gehalten werden. Die Adhäsion der Zellen an die Kulturflasche aus Glas oder Kunststoff kann durch eine Beschichtung (z. B. mit Poly-L-Lysin) am Boden der Flasche unterstützt werden.

Zur Passage der Zellen oder Subkultivierung müssen diese von der Unterlage abgelöst werden. Dies erreicht man durch eine Behandlung mit Trypsin und EDTA. Die Protease Trypsin bricht dabei die kovalenten Bindungen und Proteinbrücken zwischen den Zelloberflächenproteinen und dem Untergrund auf. EDTA ist ein Chelator und komplexiert zweifach positiv geladene Ionen, die die Proteinwechselwirkungen unterstützen. Die Zellen sind daraufhin vereinzelt und kurzzeitig in Suspension und können zur Inokulation neuer Kulturen verwendet werden.

### 2.10.1 Kultivierung von MDCK C7-Zellen

1953 isolierten und beschrieben Madin und Darby epitheliale Zellen aus der Niere eines weiblichen Cockerspaniels. Die Subklone C7 und C11 unterscheiden sich genetisch und zeigen unterschiedliche morphologische wie funktionelle Eigenschaften. Die in dieser Arbeit verwendeten MDCK C7-Zellen stellen ein sehr dichtes Epithel dar mit Widerständen von mindestens  $800 \Omega \cdot \text{cm}^2$ .

Die Kultivierung erfolgte bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ -Begasung in Brutschränken. Dem Kulturmedium MEM wurde 10% (v/v) Fötales Kälberserum (FKS) zugesetzt, die Antibiotika Streptomycin und Penicillin wurden 1:100 eingesetzt.

Die Passage der Zellen erfolgte einmal pro Woche, dazu wurden die Zellen zunächst in PBS gewaschen und für 5 min mit Trypsin vorbehandelt. Für das endgültige Ablösen der Zellen von der Kulturschale wurde das Trypsin erneuert und die Zellen weiter bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml frischem Medium aufgenommen. Ein Milliliter der Zellsuspension wurde auf eine neue, kleine Kulturflasche verteilt.

MDCK C7-Zellen, die stabil mit dem Vektor pCMV10 transfiziert wurden, wurden ebenfalls in MEM kultiviert, welches mit G418 (Endkonzentration 360 U/ml) supplementiert wurde.

### 2.10.2 Stabile Transfektion von MDCK C7-Zellen

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von DNA oder RNA in eukaryotische Zellen. Im Vergleich zur Transformation von Bakterien (siehe 2.7.1) ist die Transfektion aufwendiger und langwieriger. Allerdings existieren für die Molekularbiologie vielfältige Hilfsmittel um DNA auf eine Empfängerzelllinie zu übertragen. Die verschiedenen Transfektionsmethoden unterscheiden sich häufig in der Transfektionseffizienz und bestimmen damit Erfolg oder Misserfolg der Transfektion. Chemische Methoden beruhen prinzipiell auf der Maskierung der negativen Ladung der Nukleinsäuren (Phosphatrückgrat), welche die Passage über die Zellmembran erschwert. Bei der Lipofektion wird die DNA in sogenannte Liposomen eingeschlossen, welche dann nach Zugabe zu den Zellen mit deren Plasmamembran verschmelzen und die DNA ins Zytoplasma entlassen. Andere chemische Transfektionsreagenzien verwenden Calciumphosphat oder DEAE-Dextrane, welche die DNA komplexieren. Diese Komplexe werden schließlich über Endozytoseprozesse in die Zellen aufgenommen. Bei physikalischen Transfektionsverfahren wird die DNA ohne chemische Behandlung in die Zellen eingebracht. Mittels Mikroinjektion können Einzelzellen transfiziert werden, Elektroporation eignet sich für die Transfektion größerer Zellmengen.

Einmal im Zellinneren angelangt, wird die DNA dort transkribiert und translatiert. Damit die Zellen permanent (stabil) die Fremd-DNA exprimieren, wird von außen ein Selektionsdruck erzeugt (z. B. Geneticin, G418), welchen die Zellen mittels Expression eines Resistenzgens, das ebenfalls kodiert sein muss, neutralisieren können. Zellen, die die Fremd-DNA elimieren, sterben aufgrund ihrer fehlenden Resistenz ab.

In dieser Arbeit kamen verschiedene Transfektionsverfahren zum Einsatz um stabile Zelllinien zu erhalten, jeweils mit unterschiedlichem Erfolg.

Standardmäßig wurde mit Lipofectamine (Invitrogen) transfiziert, einem auf Liposomen basierenden Transfektionsreagenz. Zusätzlich wurden MDCK C7-Zellen mit Hilfe von Fugene HD (Promega) transfiziert.

Zur Transfektion mit Lipofectamine wurden MDCK C7-Zellen auf Zellkulturschalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von maximal 80% wachsen gelassen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 4 h mit FKS-freiem Medium (2,5 ml) und dem Transfektionsmix bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Der Transfektionsmix setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen. In Ansatz A wurden 900 µl Medium (ohne FKS) und 54 µl Lipofectamine gemischt. Ansatz B enthielt 900 µl Medium, 90 µl Plus-Reagenz und 2 µg der Plasmid-DNA und wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze A und B vereinigt und erneut für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor das Gemisch zu den Zellen gegeben wurde. Nach den 4 h wurde die Lösung von den Zellen abgenommen und durch serumhaltiges Medium ersetzt.

Nach 24 bis 48 h wurde der Selektionsdruck angelegt um stabile Klone zu erhalten. Dazu

wurde Medium eingesetzt, welches 535 U/ml G418 enthält. Geneticin (G418) ist ein Aminoglykosidantibiotikum, welches die Proteinbiosynthese prokaryotischer und eukaryotischer Zellen durch Inhibition des Elongationsschrittes während der Translation hemmt. Das Neomycin-Resistenzgen, das sich im pCMV10-Vektor befindet, kodiert für eine Neomycinphosphotransferase, welche Neomycin, Geneticin und andere Aminoglykoside neutralisiert, und somit transfizierte Zellen schützt. Nachdem alle nicht transfizierten Zellen abgestorben waren, wurden die vereinzelt Zellklone in weiteren Kulturschalen mit reduziertem Selektionsdruck (360 U/ml) kultiviert. Schließlich wurden die Einzelklone mittels Western Blot und Immunfluoreszenzfärbung auf Expression und Lokalisation des mutierten Claudin-17 getestet. Positive Klone wurden schließlich für weitere Analysen verwendet oder eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Für die Transfektion mit Hilfe des Fugene HD von Promega wurde zunächst ein Transfektionsmix, aus 6 µl Fugene HD Transfektionsreagenz sowie 2 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 100 µl (mit PBS aufgefüllt), pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu diesem Transfektionsansatz wurden 900 µl Zellsuspension nach Trypsinierung gegeben. Die Zellen wurden dann auf Kulturschalen ausgesät. Nach 24 bis 48 h erfolgte die Selektion nach oben beschriebem Schema. Die Transfektion mittels Fugene HD kam hauptsächlich für die Claudin-17-Mutanten R59A und Y149A zum Einsatz, da für diese die Transfektion mit Lipofectamine nicht erfolgreich war.

### 2.10.3 Kultivierung von HEK293-Zellen

HEK293 bezeichnet eine immortale Zelllinie, die aus einer humanen embryonalen Niere durch Transfektion mit Adenovirus-DNA gewonnen wurde. Diese Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie keine Tight Junction ausbilden, sie exprimieren keine Claudine oder Occludin. Aufgrund dieser Tatsache und dem Umstand, dass HEK293-Zellen mit hoher Effizienz transfiziert werden können, wurden diese Zellen benutzt um einfache Anreicherungsstudien mit heterolog exprimiertem Claudin-17 zum Nachweis einer *trans*-Interaktion durchzuführen.

Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung in Brutschränken. Dem Kulturmedium MEM wurden 10% (v/v) Fötale Kälberserum (FKS) zugesetzt, die Antibiotika Streptomycin und Penicillin wurden 1:100 eingesetzt.

### 2.10.4 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen

Die transiente Transfektion wurde wie auch die stabile Transfektion der MDCK C7-Zellen mit Lipofectamine der Firma Invitrogen durchgeführt.

Die HEK293-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Labteks<sup>®</sup> ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ~80% wachsen gelassen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit für 4 h

mit FKS-freiem Medium (100  $\mu$ l) und dem Transfektionsmix (~200  $\mu$ l pro Well) bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Für ein Labtek<sup>®</sup> wurde folgender Transfektionsmix pipettiert: In Ansatz A wurden 2  $\mu$ g Plasmid-DNA in 200  $\mu$ l MEM (ohne Zusätze) und 20  $\mu$ l Plus-Reagenz gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Ansatz B enthielt 200  $\mu$ l MEM (ohne Zusätze) und 12  $\mu$ l Lipofectamine. Vor der Zugabe zu den HEK293-Zellen wurden die Ansätze A und B vereinigt und für weitere 15 min bei RT inkubiert. Anschließend an die 4 h Inkubation mit dem Transfektionsmix wurde dieser entfernt und durch Standardmedium (MEM supplementiert mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin) ersetzt. Nach 24 h wurden die Zellen zum Fluorescence-Live-Cell-Imaging (2.13.3) vorbereitet und unter dem Mikroskop betrachtet.

### 2.10.5 3D-Zellkultur

Als Spezialfall zur konventionellen Kultivierung von Zellen wurde hier eine Methode angewandt, bei der die vereinzelt Zellen in BD Matrigel<sup>™</sup> eingesät wurden, ein Trägermaterial, das von der Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Sarkomazelllinie gewonnen wurde und aus Laminin, Kollagen IV und anderen extrazellulären Matrixproteinen besteht. Während Kulturflaschen oder -schalen mit Flüssigmedium eine zweidimensionale Anhaftungsfläche für die Zellen darstellen, imitiert dieses Trägermaterial einen dreidimensionalen Raum. Damit ändert sich das Wachstumsverhalten der Zellen grundlegend, so dass diese nicht mehr in einem planaren Monolayer wachsen, sondern kugelförmige, multizelluläre Komplexe (Sphären), zum Teil mit Lumen (Zysten) bilden. Zusätzlich befinden sich im BD Matrigel<sup>™</sup> einige Wachstumsfaktoren und Hormone, wie TGF- $\beta$  und Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), in unbekannter Konzentration, da es sich nicht um ein synthetisches Produkt, sondern um extrazelluläres Material handelt. Die Polarität der Epithelzellen bleibt in diesem System erhalten, die apikale Membran ist der Innenseite der Zyste zugewandt und begrenzt ein flüssigkeitsgefülltes Lumen (Abb. 10).

#### Probenvorbereitung

Als Wachstumsstimulus wurden die Zellen 24 h vor dem Einsäen in das BD Matrigel<sup>™</sup> trypsinisiert und auf eine neue Zellkulturflasche gegeben. Nach den 24 h wurden die Zellen erneut trypsinisiert, bei 2.000 rpm für 10 min zentrifugiert, anschließend in 1 ml Nährmedium (ohne Zusätze) aufgenommen und unter dem Mikroskop in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Für alle weiteren Arbeitsschritte wurden vorgekühlte Materialien (Reaktionsgefäße, Filtertips, Labtek<sup>®</sup>) verwendet, da das BD Matrigel<sup>™</sup> sehr schnell bei Temperaturen über 22 °C zu polymerisieren beginnt. Zu 200  $\mu$ l BD Matrigel<sup>™</sup> wurden 20.000 Zellen pipettiert und gemischt. Das Volumen wurde gleichmäßig auf 2 Wells eines Labtek<sup>®</sup> Objektträgers aufgeteilt und für 30 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> zur Polymerisation des Gels gestellt. Schließlich wurde jedes Well mit Nährmedium (mit Zusätzen) aufgefüllt. Das Medium wurde alle 48 h erneuert. Nach 5 Tagen wurde das Experiment gestoppt und die Zellen fixiert und gefärbt.

### **Fixierung und Färbung**

Als Zeitpunkt der Präparatfixierung wurde Tag 5 ausgewählt, da dann Polarisierungsprozesse (Tage 1 bis 3) abgeschlossen waren und die Lumenexpansion stattfand (O'Brien et al., 2001; Martin-Belmonte et al., 2007).

Zunächst wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Anschließend erfolgte ein Permeabilisierungsschritt mit 0,25% Triton-X 100 in PBS für 6 h bei Raumtemperatur. In diese Lösung wurde zusätzlich 12,5 mM Glycin gegeben, welches die Vernetzungsreaktion des PFA stoppt. Die Immunfluoreszenz- und DAPI-Färbung erfolgte bei 4 °C über Nacht. Dabei wurde DAPI in einer Verdünnung von 1:1.000 eingesetzt, das direkt fluoreszenzgekoppelte Phalloidin-594 als Marker für F-Aktin in einer Verdünnung 1:50 und der direkt fluoreszenzgekoppelte E-Cadherin-647 Antikörper in einer Verdünnung von 1:500. Abschließend folgten 4 Waschschrte für je 30 min mit 0,25% Triton-X 100 in PBS und ein Eindecken der Proben mit ProTaq<sup>®</sup> Mounting Medium. Die so behandelten Proben wurden mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops (Zeiss LSM 510 Meta) analysiert.

### **Analyse und Auswertung**

Die mikroskopische Auswertung erfolgte immer zeitnah (am Tag der Färbung oder einen Tag danach), weil die Gefahr bestand, dass die Proben austrocknen und sich dann durch ein mögliches Zusammenziehen des BD Matrigel<sup>™</sup> verändern.

Die Kenngröße, die hier untersucht wurde, war die Lumengröße der einzelnen Zysten. Dazu wurden in 20-facher Vergrößerung Z-Stacks aufgenommen, wobei DAPI und Phalloidin-594 (F-Aktin) detektiert wurden. In Aufnahmen dieser Vergrößerung und Qualität konnte der Lumendurchmesser einzelner Zysten bestimmt werden, wobei Messungenauigkeiten vernachlässigt werden konnten. Zur Messung wurde die Ebene des Stacks ausgewählt, in der die zu vermessende Zyste, das größte Lumen aufweist, wobei der fokussierte Aktinring als Begrenzung gewählt wurde. Bei unregelmäßige geformten Lumen, d. h. solchen, die von einer idealen Kreisform abweichen, wurde durch Messung des größten und kleinsten Durchmessers ein Mittelwert gebildet um sich dem tatsächlichen Durchmesser anzunähern. Zudem wurden Zysten aus der Datenaufnahme ausgeschlossen, falls das Lumen nicht vollständig im Bildausschnitt vorhanden war oder kein Aktinring fokussiert werden konnte, wenn sich dieser in einer sehr tiefen Schichtebene befindet und die Qualität der Aufnahme dadurch limitiert war. Bei Zysten mit mehreren Lumen wurde das größte Lumen gemessen. Zusätzlich zum Innen- wurde auch der Außendurchmesser erfasst.

## 2.11 DNA-Techniken

### 2.11.1 Polymerase chain reaction PCR, Polymerase-Kettenreaktion

#### 2.11.1.1 konventionelle, semiquantitative PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur gezielten Vervielfältigung von DNA definierter Länge und Sequenz. In diesem Verfahren werden Polymerasen, DNA-replizierende Enzyme, verwendet, die aus thermophilen Mikroorganismen isoliert wurden und auch bei hohen Temperaturen aktiv sind. Ausgehend von einer einzelsträngigen DNA-Vorlage (Template) wird in multiplen Reaktionszyklen eine exakte, komplementäre DNA-Kopie produziert.

In einem ersten Schritt wird das heterogene dsDNA-Gemisch durch hohe Temperaturen denaturiert. Bei einer Inkubation bei 95 °C werden die nichtkovalenten chemischen Wechselwirkungen zwischen den beiden DNA-Molekülen eines Doppelstranges gelöst und diese in Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). Nun wird die Amplifikation vorbereitet. Dazu wird die Temperatur soweit reduziert, dass die synthetischen Oligonukleotide (Primer) sequenzspezifisch an die ssDNA hybridisieren. Dieser Vorgang des Annealings definiert die Startpunkte zur DNA-Synthese. Die optimale Temperatur zur Primerhybridisierung ist abhängig von deren Länge und Sequenz. Das Reaktionsgemisch wird nun auf 72 °C erwärmt, der Temperatur bei der die Polymerase eine optimale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht. Es erfolgt ein nukleophiler Angriff des 3'-Hydroxyendes des Oligonukleotids an das  $\alpha$ -Phosphat der Desoxynukleosidtriphosphats (dNTPs), welches unter Abspaltung von Pyrophosphat kovalent an den Primer gebunden wird. Diese chemische Reaktion wird von der Polymerase in großer Geschwindigkeit und Präzision katalysiert. Die DNA wird anhand ihres Templates verlängert (Elongation). Resultat ist eine anhand eines festgelegten Startpunkts sequenzspezifische DNA-Kopie. Diese Kopie kann in nachfolgenden Reaktionsrunden ebenfalls als Template dienen. Eine gewünschte DNA-Sequenz wird mit dem *in vitro*-Verfahren der PCR exponentiell vermehrt werden.

Der Zusatz „semiquantitativ“ soll zum Ausdruck bringen, dass dieses Verfahren qualitativen Charakter hat und nur ungefähre Mengeverhältnisse nachgewiesen werden können. Limitierend ist dabei zum einen das PCR-Verfahren selbst, das nur theoretisch eine Verdopplung der DNA pro Zyklus erlaubt, jedoch in der Praxis zumeist eine 1,6-1,9-fache Vermehrung der DNA zulässt. Zum anderen ist die DNA-Nachweismethode mit agarosegelelektrophoretischer Auftrennung und Färbung mit Ethidiumbromid zur exakten Quantifizierung ungeeignet.

<b>Komponente</b>	<b>Volumen [μl]</b>
H <sub>2</sub> O	14
Puffer	2,5
dNTPs	2
Primer forw	2,5
Primer rev	2,5
<i>Pfu</i> -Polymerase	0,5

Der PCR-Ansatz wurde in ein Reaktionsgefäß pipettiert und mit 1 µl DNA versetzt. Die PCR wurde in dem PCR-Gerät Thermal Cycler 2720 der Firma Applied Biosystems mit folgendem Programm durchgeführt.

Temperatur [°C]	Zeit [min:s]	
95	15:00	
95	00:30	
58	00:30	30 Zyklen
72	01:00	
72	10:00	
4	∞	

### 2.11.1.2 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerechte Mutagenese ist ein Verfahren zur Einführung von Punktmutationen in Gensequenzen mittels PCR. Es sind kommerzielle Systeme (QuikChange II Kit, Agilent Technologies) erhältlich, welche geeignete Vektoren mitliefern und eine Subklonierung notwendig machen. In dieser Arbeit wurde eine andere Strategie verwendet, die nach folgendem Prinzip ablief (Abb. 13):

Die Mutagenese und Klonierung ging aus von dem bereits vorliegenden Expressionsvektor pCMV10, der das wtCldn17-Gen enthält. Da weiter das pCMV10-Vektorsystem verwendet werden sollte, wurden flankierende Primer (Cldn17HindIIICMV10 for, Cldn17BamHICMV10 rev, vgl. 2.3.3) erzeugt, die das vollständige Claudin17-Gen umspannen und Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *BamHI* und *HindIII* zur Ligation in den pCMV10-Vektor tragen. Zusätzlich wurden Primer generiert, die jede gewünschte Mutation tragen (vgl. 2.3.3). Die Erzeugung der mutanten Claudin-17 erfolgte in mehreren sukzessiven Polymerase-Kettenreaktionen. Zunächst wurden zwei Teilstücke des Claudin-17 in getrennten Reaktionen erzeugt unter Verwendung des forward-Primers vom Genanfang (Cldn17HindIIICMV10 for) kombiniert mit einem reverse-Primer, der eine gewünschte Mutation enthält, sowie dem entsprechenden forward-Primer mit der Mutation und dem reverse-Primer mit dem Ende des Cldn17-Gens (Cldn17-BamHICMV10 rev). Nach erfolgreicher Amplifikation wurden die beiden Teilstücke isoliert und in eine weitere PCR zur Generierung eines vollständigen mutierten Claudin-17-Konstrukts eingesetzt. Dazu wurden die Primer „Cldn17HindIIICMV10 for“ und „Cldn17BamHICMV10 rev“ verwendet. Das so mutierte Volllänge-Claudin-17 konnte isoliert und nach Behandlung mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *HindIII* in den ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen behandelten pCMV-10-Vektor ligiert werden. Zur Klonierung in den pCFP-Vektor wurden die bereits mutierten Claudin-17-cDNAs mit den Primern „Cldn17BamHI for“ und „Cldn17EcoRI rev“ amplifiziert, die Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme an die Claudin-17-cDNA anfügen, die zur Ligation in pCFP geeignet sind.

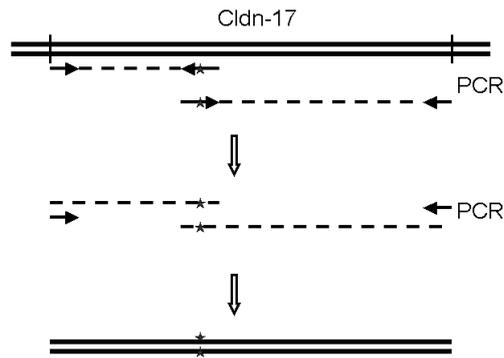


Abbildung 14: **Prinzip der ortsgerechten Mutagenese.** Punktmutationen wurden mit Hilfe sukzessiver Polymerase-Kettenreaktionen in das Claudin17-Gen eingeführt.

### 2.11.1.3 Colony-PCR

Eine weitere Anwendung der PCR ist die „Colony-PCR“. Sie wird zur Überprüfung des Ligations- und Transformationserfolges eingesetzt. Hierbei werden Bakterienklone als Template in die PCR eingesetzt. Durch die hohen Temperaturen während der PCR und Triton X-100 wird die Bakterienzellwand durchlässig und die im Zytoplasma lokalisierten Plasmide treten aus der Zelle aus. Mit genspezifischen und plasmidspezifischen Primern wird DNA amplifiziert. Kolonien, die im Agarosegel ein PCR-Produkt mit erwarteter Größe zeigen, tragen das gewünschte Insert. Auf diese positiven Klone konnte direkt zurückgegriffen werden, weil gleichzeitig zur PCR eine Replikplatte auf LB<sub>Amp</sub>-Medium erstellt wurde. Positive Kolonien wurden zur Inokulation einer 50 ml-Kultur verwendet, die nach Inkubation bei 37 °C über Nacht als Ausgangsmaterial zur präparativen Plasmidisolierung diente.

Die „Colony-PCR“ ist eine Alternative zur Methode des analytischen Verdauens und DNA-Restriktion mittels Endonukleasen.

In dieser Arbeit wird das folgende Pipettierschema und PCR-Programm benutzt.

<b>Komponente</b>	<b>Volumen [µl]</b>
Puffer	2,5
Triton X-100	5
MgCl <sub>2</sub>	1,5
dNTPs	1,4
Primer forw	0,5
Primer rev	0,5
Taq-Polymerase	0,1
H <sub>2</sub> O	16

Der 20 µl Mastermix wurde in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt und mit Hilfe einer sterilen

Pipettenspitze mit einer Bakterienkolonie angeimpft. Anschließend wurde mit derselben Spitze die Bakterienkolonie auf der Replikaplatte LB<sub>Amp</sub> ausgestrichen.

Die „Colony-PCR“ wird mit folgendem Programm durchgeführt.

Temperatur [°C]	Zeit [min:s]	
95	04:00	
95	00:05	
55	00:05	40 Zyklen
72	00:05	
72	00:20	
4	∞	

### 2.11.2 Analytische Präparation von Plasmiden

Plasmide sind kleine, ringförmige, autonom replizierende DNA-Moleküle, die natürlicherweise in Bakterien vorkommen und dort häufig für die Vermittlung von Antibiotikaresistenzen oder zur Vermittlung und Einleitung der Konjugation verantwortlich sind, weil sie die entsprechenden Resistenzgene dafür tragen. Auch in der Molekularbiologie sind Plasmide von großer Bedeutung. Sie lassen sich mit einfachen gentechnischen Maßnahmen gezielt manipulieren und in Bakterien einbringen. Auf diese Weise können beispielsweise Fremdproteine heterolog exprimiert oder Klonierung und Vervielfältigung von Genen erreicht werden.

Vielfach ist für analytische Zwecke eine geringe Menge von Plasmiden notwendig. Die Isolation solcher analytischer Mengen nennt man Minipräparation. Für die Überprüfung von Klonierungsschritten ist die Menge an Plasmid, die eine Minipräparation liefert, ausreichend.

Die Plasmidpräparation wurde mit dem von Qiagen vertrieben Plasmid Miniprep Quick Kit durchgeführt. Die Zellen in 1,5 ml einer Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation bei 5.000×g für 1 min pelletiert und anschließend in 300 µl Puffer 1 („Resuspensionspuffer“ P1, supplementiert mit RNase) resuspendiert. Anschließend wurden 300 µl Puffer 2 („Lysepuffer“ P2) zugesetzt, zum Mischen mehrfach invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei diesem Schritt erfolgte die Zelllyse in alkalischem Milieu. Das Detergenz SDS, das im Puffer enthalten ist, löst die Zellmembran auf. Zellbestandteile, wie Proteine, „chromosomale“ DNA (die DNA von Bakterien ist nicht in Chromosomen organisiert, wird jedoch häufig zur Abgrenzung von Plasmid-DNA als „chromosomale“ DNA bezeichnet) und auch Plasmid-DNA werden in die Umgebung freigesetzt. Natriumhydroxid (NaOH) ist ein weiterer Bestandteil des Puffers und ist dafür verantwortlich, dass der pH-Wert steigt. Dies hat zur Folge, dass DNA und Proteine denaturieren. Nach Zugabe von 300 µl Puffer 3 („Neutralisierungspuffer“ P3) wurde das Gemisch für 15 min bei 4 °C inkubiert. Damit erreicht man eine Fällung der Proteine und „chromosomalen“ DNA, die mit der Zellwand assoziiert ist. In einem weiteren

Zentrifugationsschritt (15 min, 13.000×g) wurden Proteine, „chromosomale“ DNA und weitere Zelltrümmer abzentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die Plasmid-DNA befindet, wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit halben Volumen Isopropanol versetzt und erneut bei 13.000×g für 15 min zentrifugiert. Das Pellet stellt die gefällte Plasmid-DNA dar. Diese wurde durch Zugabe von 250 µl 70% Ethanol durch Zentrifugation bei 13.000×g für 5 min gewaschen, danach in der Speed-Vac getrocknet und schließlich in 40 µl sterilem Wasser aufgenommen.

### 2.11.3 Präparative Plasmidpräparation

Die Minipräparation eignet sich nur zur Isolation analytischer Mengen Plasmid-DNA. In einer präparativen Plasmidpräparation kann eine deutlich größere Menge an Plasmid-DNA isoliert werden. Dazu wird ein kommerziell erhältliches Kit verwendet. Mit Hilfe des Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen können Plasmide über eine Anionensäule mittels Affinitätschromatographie angereichert und hoch rein gewonnen werden.

Es wurden 50 ml LB-Medium, welches Ampicillin als Selektionsantibiotikum (50 µg/ml) enthält, mit 50 µl einer Vorkultur angeimpft und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Kultur wurde zur Bakterienernte für 15 min bei 4 °C und 6.000×g zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde sofort in 4 ml RNase A-haltigem Puffer 1 resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 4 ml Puffer 2. Die Probe wurde durch vorsichtiges Invertieren gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zufügen von 4 ml Puffer 3 und Inkubation für 15 min auf Eis wurde die Suspension neutralisiert. Durch Zentrifugation bei 20.000×g für 30 min wurden Proteine, „chromosomale“ DNA und Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand wurde in ein frisches 50 ml Falcontube überführt und erneut bei 20.000×g für 15 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in dem Überstand auf eine vorequilibrierte Säule (4 ml Puffer QBT) gegeben und dort an das Säulenmaterial gebunden. Es folgten zwei Waschschritte mit je 10 ml Waschpuffer QC. Mit 5 ml Elutionspuffer QF wurde die DNA in neues 50 ml Falcontube eluiert, anschließend mit 3,5 ml Isopropanol versetzt und dann zum Pelletieren der Plasmid-DNA für 30 min bei 4 °C und 15.000×g zentrifugiert. Das Isopropanol wurde entfernt und das Pellet mit 2 ml 70% Ethanol gewaschen (Zentrifugation, 4 °C, 15.000×g, 15 min). Nach Entfernen des Alkohols wurde die Plasmid-DNA getrocknet und in 200 µl sterilem Wasser aufgenommen und die Konzentration bestimmt.

### 2.11.4 Spektrometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Eine einfache Methode zur Bestimmung der Konzentration von DNA-Lösungen ist die Absorptionsspektroskopie. Hierbei wird monochromatisches Licht durch eine verdünnte Messlösung unbekannter Konzentration gestrahlt. Anhand der Absorption des Lichts, welche sich aus der

Differenz der eingestrahnten und der nach Durchgang durch die Lösung gemessenen Lichtmenge ergibt, kann die Konzentration errechnet werden. Es gilt das Lambert-Beersche-Gesetz:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Dabei ist E die Extinktion, also die absorbierte Lichtmenge,  $\varepsilon$  der molare Extinktionskoeffizient, der abhängig von der Wellenlänge  $\lambda$  ist, d ist die Schichtdicke der durchstrahlten Lösung, c ist die Konzentration. Durch einfache mathematische Umformungen und mit Hilfe des Messwertes der Extinktion E kann die Konzentration berechnet werden.

DNA/RNA hat ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm. Aufgrund des Hyperchromazitätseffektes absorbiert einzelsträngige DNA bei dieser Wellenlänge besser als doppelsträngige DNA.

Eine Extinktion von 1 entspricht 50  $\mu\text{g/ml}$  einer doppelsträngigen DNA-Lösung, 40  $\mu\text{g/ml}$  einer RNA- oder einzelsträngigen DNA-Lösung oder 33  $\mu\text{g/ml}$  einer Lösung einzelsträngiger Oligonukleotide.

Die Reinheit einer Messlösung kann ebenfalls mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie bestimmt werden. Je nach Aufreinigungsmethode können unterschiedliche Kontaminationen vorhanden sein. Sowohl Proteine, andere Nukleinsäuren, z. B. RNA, als auch Reste organischer Lösemittel wie Phenol können die Probe verunreinigen. Es lässt sich jedoch nur die Kontamination mit Proteinen spektrometrisch bestimmen. Proteine haben ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm ist ein Maß für die Reinheit der DNA- oder RNA-Lösung. Dabei zeigt ein Quotient zwischen 1,65 und 1,85 eine reine DNA-Aufreinigung an, deutlich kleinere Werte weisen auf eine Kontamination mit Proteinen und Phenol hin, Werte größer 2 sind kennzeichnend für stark RNA-haltige Lösungen oder RNA-Aufreinigungen.

DNA-Proben wurden unverdünnt mit dem Nanodrop ND1000 der Firma peqlab vermessen. Dazu wurden 2  $\mu\text{l}$  der Probe auf die Messoptik pipettiert und dann vermessen. Hier liegt eine sehr kleinere Schichtdicke der DNA-Probe vor, was die Qualität der Messung verbessert.

### 2.11.5 Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen können als Teil eines primitiven „Immunsystems“ niederer, prokaryotischer Organismen angesehen werden. Ihre Aufgabe besteht in der Fragmentierung organismusfremder DNA. Während das eigene Genom intakt bleibt und nicht geschnitten wird, werden in der extragenomischen, fremden DNA die Phosphodiesterbindungen aufgespalten. Dieser Verdau geschieht an für das jeweilige Enzym spezifische, meist palindromische Erkennungssequenzen.

In der Molekularbiologie findet diese Eigenschaft Verwendung, um z. B. zielgerichtet bestimmte DNA-Fragmente zu gewinnen.

Die zur Anwendung kommenden Restriktionsenzyme *BamHI*, *EcoRI* und *HindIII* binden die Erkennungssequenz GGATCC (*BamHI*), GAATTC (*EcoRI*) oder AAGCTT (*HindIII*) und schneiden den Doppelstrang unter Bildung von einzelsträngigen Überhängen, sogenannten „sticky ends“.

Ein 30 µl Restriktionsansatz wurde nach folgendem Schema pipettiert:

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen [µl]</b>
DNA (Plasmid oder Insert)	10
Puffer	3
Enzym	3
H <sub>2</sub> O	14

Das Reaktionsgemisch wurde für mindestens 2 h bei 37 °C inkubiert. Die DNA wurde in zwei aufeinander folgenden Reaktionen mit Restriktionsenzymen behandelt, da unterschiedliche Puffer verwendet wurden. Dazu wurde die geschnittene DNA über eine Säule aufgereinigt (NucleoSpin Kit, vgl. 2.3.4) und in sterilem Wasser aufgenommen und weiter verwendet. Der Erfolg der Restriktion wurde auf einem 1%igen Agarosegel überprüft (vgl. 2.11.6).

### 2.11.6 Behandlung mit Antarktischer Phosphatase

Die Antarktische Phosphatase gehört zu den Alkalischen Phosphatasen, einer Enzymgruppe, die Phosphorsäureester hydrolysieren. Linearisierte DNA oder RNA besitzen eine endständige Phosphatgruppe, die über eine Phosphoesterbindung gebunden ist und notwendig für die Verknüpfung zweier DNA-Stücke mittels einer Ligase ist. Durch Behandlung mit der Antarktischen Phosphatase (aus *TAB5*) wird diese endständige Phosphatgruppe entfernt. Insbesondere für Plasmide ist eine Dephosphorylierung notwendig, um einer Religation vorzubeugen.

Einem Restriktionsverdau (20 µl) wurden je 2,5 µl der Antarktischen Phosphatase sowie des dazugehörigen Puffers zugefügt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung bei 65 °C für 10 min beendet.

### 2.11.7 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Gemischen erfolgt standardmäßig mit Agarosegelen durch Anlegen eines elektrischen Feldes. Die negativ geladene DNA wandert dabei zur Kathode. Die Gelmatrix erhöht die Auflösung der Auftrennung, da sie als molekulares Sieb wirkt und kleinere DNA-Fragmente schneller durch die Gelmaschen passieren als größere.

Der Grad der Vernetzung eines Agarosegels hängt von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente ab, die aufgetrennt werden sollen. In dieser Arbeit wurden 1%ige Agarosegele in

1× TAE-Puffer verwendet. Der Farbstoff Ethidiumbromid wurde in das abgekühlte (ca. 50 °C) Gel in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml gegeben. Erstarrte Agarosegele wurden zur Elektrophorese in mit 1× TAE-Puffer gefüllte Flachbett-Elektrophoresekammer platziert. Die DNA-Gemische wurden mit 6× Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer elektrischen Spannung von 5-10 V/cm.

Die Detektion der DNA-Fragmente ist mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid möglich, der bei Anregung durch UV-Licht fluoresziert. Anhand von „DNA-Leitern“, einem Gemisch von DNA-Fragmenten bekannter Länge, kann die Größe der aufgetrennten Fragmente abgeschätzt werden. Zudem ist auch eine Aussage über die DNA-Konzentration möglich, wenn die Menge in den Markerbanden bekannt ist (vgl. Abb. 11 und 12).

### **2.11.8 Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Die Isolierung von DNA ist eine molekularbiologische Standardmethode, die problemlos mit kommerziell erhältlichen Kits zu bewältigen ist.

Die Agarosegele wurden unter UV-Licht betrachtet und die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Zur Isolierung und Aufreinigung der DNA wurde das NucleoSpin® Extract II DNA Gel Isolation Kit der Firma Macherey-Nagel nach Herstellerangaben verwendet.

### **2.11.9 Ligation**

Das Aneinanderfügen von DNA-Stücken spielt eine entscheidende Rolle bei der Replikation und Reparatur von Strangbrüchen. Bei der Replikation werden am diskontinuierlich wachsenden Strang Okazaki-Fragmente, 100 bis 200 Nukleotide lange DNA-Stücke, synthetisiert und durch eine DNA-Ligase miteinander verknüpft. Dieses natürliche Prinzip der Ligation wird für molekularbiologische Arbeiten ausgenutzt um Gene in Klonierungs- oder Expressionsvektor einzubringen.

Bei der Klonierung werden durch Restriktionsenzyme (2.3.4 und 2.11.5) vorbehandelte Plasmide und Gene mit Hilfe der T4 DNA-Ligase fusioniert. In einem 10 µl Reaktionsansatz werden je 1 µl 10x Ligationspuffer (NEB) und T4 DNA-Ligase pipettiert. Das restliche Volumen wird mit Plasmid- und Insert-DNA aufgefüllt. Die Insert-DNA liegt dabei im Überschuss im Vergleich zur Plasmid-DNA vor. Das exakte Verhältnis ist von der Plasmid- und Insertgröße abhängig. Für die Klonierung des mutierten Claudin-17 in den pCMV10-Vektor wurde ein Verhältnis von 4:1 verwendet, die Klonierung in den CFP-Vektor war bei einem Verhältnis von 6:1 erfolgreich.

Der Klonierungs- und Transformationserfolg kann mit unterschiedlichen Methoden überprüft werden. Zum einen kann nach Plasmidisolierung aus einer Bakterienkultur ein analytischer

Verdau mit Restriktionsenzymen durchgeführt werden. Eine weitere hier zur Anwendung gekommene Methode ist die „Colony“-PCR; dabei werden plasmidspezifische Primer eingesetzt. Zusätzlich wurden alle Plasmide sequenziert, um die Mutation im Claudin-17-Gen zu bestätigen (siehe Anhang 10.4).

### 2.11.10 Sequenzierung

Die Kenntnis über die Abfolge der vier Basen der DNA ist von elementarer Bedeutung für die moderne Molekularbiologie. Anhand der Basensequenz eines Gens kann die Primärstruktur des entsprechenden Proteins abgeleitet werden. Zur Klonierung und heterologen Expression von Fremdproteinen ist dies von praktischer Bedeutung, da die Sequenzierung der DNA einfacher und kostengünstiger als die Proteinsequenzierung ist. Insbesondere für die Generierung von Punktmutationen im Claudin-17-Gen ist das Überprüfen der erfolgreichen Mutagenese entscheidend.

Zur Sequenzierung der einsatzfertigen Expressionsplasmide mit den verschiedenen Claudin-17-Mutationen wurde der Sequenzierservice der Firma LGC Genomics in Anspruch genommen. 5 µl Plasmid-DNA in einer Endkonzentration von 100 ng/µl wurde mit 4 µl einer 10 µM Primerlösung in ein Gesamtvolumen von 14 µl pipettiert und schließlich an LGC Genomics versandt. Bei den eingesetzten Oligonukleotiden (vgl. 2.3.3) handelte es sich um Primer, deren Bindestelle sich innerhalb des Plasmids (pCMV10, pCFP) befand, um zusätzlich zur Bestätigung der erfolgreichen Mutation auch sicherzustellen, dass sich das eingebrachte mutierte Claudin-17 im Leserahmen befindet.

Die Auswertung der Sequenzdaten (Basenabfolge im FASTA-Format und Chromatogramme) erfolgte mittels BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) und der Chromas-Software (Chromas Lite, Version 2.01, Technelysium Pty Ltd). Ausschnitte aus den Chromatogrammen, die die erfolgreiche Mutation zeigen sind im Anhang (Abb. 40) abgebildet.

## 2.12 Proteintechniken

### 2.12.1 Membranproteinextraktion aus eukaryotischen Zellen

Zur Extraktion von Membranprotein aus adhärennten Zellen wurden diese auf Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm (oder HA-Filtern) bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Zunächst wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 750 µl Membranlysepuffer zugesetzt, die Zellen mit einem sterilen Zellschaber vom Untergrund abgelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden homogenisiert, indem sie durch eine Insulinnadel gezogen wurden. Durch Zentrifugation bei 200×g für 5 min wurden Zelltrümmer entfernt. Das Membranprotein wurde aus dem Überstand gewonnen, indem

dieser für 30 min bei 42.000×g zentrifugiert wurde. Das resultierende Pellet wurde in 100 µl Membranlysepuffer aufgenommen.

### **2.12.2 Gesamtproteinextraktion aus eukaryotischen Zellen**

Um Gesamtprotein aus eukaryotischen Zellen zu extrahieren wurden die Zellen auf Petrischalen ausgesät und bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml PBS auf die Petrischalen gegeben, die Zellen mit einem sterilen Zellschaber zusammengeschaubt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1.000×g für 1 min pelletiert und in 500 µl eiskaltem Gesamtysepuffer aufgenommen. Es folgte eine Inkubation bei 4 °C für mindestens 30 min mit wiederholten Mischen. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 15.000×g konnten Zelltrümmer entfernt und das Gesamtprotein aus dem Überstand gewonnen werden.

### **2.12.3 Proteinextraktion mit RIPA-Puffer**

Durch die Verwendung des RIPA-Puffers bei der Proteinextraktion kann auch die Expression von zytoskelett-assoziierten Proteinen betrachtet werden. Die Zellen wurden auf Petrischalen ausgesät und bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Nach Abgießen wurden Mediumrückstände durch Waschen mit PBS entfernt. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Zugabe von 700 µl RIPA-Puffer unter Zuhilfenahme eines Zellschabers. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis mit gelegentlichem Vortexen. Danach wurde die Suspension mit Ultraschall behandelt (13x 1 s, 80% Amplitude) und dreimal durch eine Insulinnadel gezogen.

### **2.12.4 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Pierce**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein kommerziell erhältliches Kit (Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific) verwendet. Das Prinzip dieses Proteinassay beruht auf der Reaktion von Kupferionen mit Proteinen, die einen Komplex bilden. In alkalischem Milieu werden die Kupferionen reduziert und bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) einen farbigen Komplex, der bei 562 nm gemessen werden kann. Die Absorption bei 562 nm ist direkt proportional zu Proteinkonzentration, die man mit Hilfe einer Eichkurve aus Rinderserumalbumin (BSA) bekannter Konzentration errechnen kann.

Die Reaktion und Proteinmessung erfolgt in 96-Well Mikrotiterplatten. Die Werte werden in Doppelmessung bestimmt. Für die BSA-Eichreihe wurden Konzentrationen von 0,2 mg/ml, 0,8 mg/ml und 1,2 mg/ml verwendet. Zusätzlich wurde auch der Lysepuffer auf Eigenabsorption und Proteinverunreinigung überprüft. Die Proben wurde mit Lysepuffer im Verhältnis 1:1 bis

1:4 verdünnt. Zu 10 µl der Proteinprobe, Eichlösung oder Lysepuffer wurden 190 µl der BCA-Gebrauchslösung pipettiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abkühlen der Mikrotiterplatte auf Raumtemperatur wurde die Absorptionsmessung bei 562 nm in einem Tecan Spectra-Photometer durchgeführt.

### 2.12.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine molekularbiologische Standardmethode zur Auftrennung von Proteinen anhand ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes in Gegenwart eines Überschusses an SDS im elektrischen Feld.

SDS ist ein anionisches Detergenz, das an die hydrophoben Bereiche von Proteinen bindet und alle nichtkovalenten chemischen Wechselwirkungen auflöst. Die Bindung an hydrophobe Bereiche des Proteins geschieht in einem konstanten Verhältnis zur Masse des Proteins, etwa 1 Molekül SDS bindet an 2 Aminosäuren (genaues Verhältnis 1,4 mg SDS pro 1 mg Protein). Die Eigenladung der Proteine wird durch die negative Ladung des SDS maskiert. Alle auf diese Weise behandelten Proteine wandern im elektrischen Feld zur Kathode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts (eigentlich Molekülradius) der Proteine.

Die Auftrennung makromolekularer Stoffgemische nach ihrer Größe wird in einer Gelmatrix erreicht, die die Aufgabe eines molekularen Siebes definierter Porengröße hat. Proteine werden je nach Art der Anwendung in Polyacrylamidgelen unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Polyacrylamidgele entstehen durch Kopolymerisierung von Acrylamid mit N,N-Methylenbisacrylamid, das die Quervernetzungen erzeugt. In dieser radikalischen Reaktion dient Ammoniumpersulfat (APS) als Starterreagenz und N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED) als Katalysator. In einer diskontinuierlichen SDS-PAGE nach Laemmli werden Sammel- und Trenngel unterschiedlicher Porengröße und unterschiedlichen pHs hergestellt. Im großmaschigen Sammelgel ist der pH-Wert niedriger, die Proteine werden fokussiert, es erfolgt jedoch noch keine Auftrennung. Erst im Trenngel erfolgt eine Auftrennung nach dem Molekulargewicht. Die Porengröße und damit die Trennungseigenschaften des Gels hängen von der eingesetzten Konzentration von Acrylamid und Methylenbisacrylamid ab. Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgt durch einen zusätzlich aufgetragenen Proteinmarker mit Standardproteinen definierter Größe, mit bekanntem Molekulargewicht (vgl. Abb. 13).

### 2.12.6 Western Blot

#### Proteintransfer

Beim Western Blot-Verfahren werden Proteine, die zuvor in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt wurden, mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine PVDF-Membran über-

tragen. Die Proteine werden durch hydrophobe Wechselwirkungen an der Membran immobilisiert. Ihre immunologische Reaktivität bleibt bei diesem Verfahren erhalten, so dass die Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper immunologisch nachgewiesen werden können.

Zur Übertragung der Proteine aus der Gelmatrix auf die PVDF-Membran wurde diese zunächst in Ethanol äquilibriert und in Western-Transferpuffer getränkt. Anschließend wurde die Membran in dem Blotgitter platziert. Dabei befindet sich die Membran zwischen zwei Lagen aus Schwämmen und zwei Whatman-Papieren. Zusätzlich wurde auch das SDS-Polyacrylamidgel auf der Membran positioniert. Das fertig aufgebaute Blotgitter wurde in die mit Western-Transferpuffer gefüllte Blotkammer in der Orientierung gestellt, dass die Membran zur Kathode zeigt. Die Proteine wanderten demnach aus der Gelmatrix in die Membran, sobald ein elektrisches Feld angelegt wurde. Der Proteintransfer wurde für 60 min bei einer konstanten Spannung von 100 V durchgeführt.

### **Immunologische Proteindetektion**

Nach Beendigung des Proteintransfers wurde die Membran aus Blotkammer und Blotgitter entnommen und kurz in TBST gewaschen um restliches Methanol von der Membran zu entfernen. Zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für mindestens 2 h in PBS mit 5% BSA und 0,002% Natriumazid inkubiert.

Nach diesem Blockierungsschritt wurde die Membran mit Antikörperlösungen gegen die auf der Membran gebundenen Proteine inkubiert. Die spezifischen Primäntikörper, wie sie unter 2.3.2.1 aufgeführt sind, wurden mit der angegebenen Verdünnung in PBS mit 5% BSA und 0,002% Natriumazid eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht. Danach wurde die Membran dreimal für mindestens 10 min in TBST gewaschen, um überschüssigen ungebunden Primäntikörper zu entfernen. Die peroxidasegekoppelten Sekundäntikörper (siehe 2.3.2.2) wurden in der angegebenen Verdünnung in TBST mit 1% Magermilchpulver angesetzt und für 1 h bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Nach Entfernen ungebundener Sekundäntikörper wurden diese mit Hilfe „enhanced chemoluminescence“-Methode (ECL-Färbung nach Pierce) nachgewiesen und somit, wenn auch auf indirektem Wege, die Zielproteine, die an der Membran gebunden sind. Die ECL-Färbung ist eine nichtradioaktive, aber dennoch sensitive Methode, bei der die an die Antikörper gekoppelte Peroxidase in einer chemischen Reaktion die Substrate  $H_2O_2$  und Luminol unter Photonenemission reduziert bzw. oxidiert. Die Photoreaktion wurde mit einem Kamerasystem aufgezeichnet. Die gewaschene Membran wurde für 5 min mit einer Substratmischung inkubiert, die Lichtemission mit der Kamera detektiert.

## 2.13 Zellbiologische Techniken

### 2.13.1 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (C-LSM)

Die Verwendung eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops erlaubt es dreidimensionale Bilder einer biologischen Probe aufzunehmen. Proteine oder Strukturen einer Zelle, die mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden, können sichtbar gemacht werden, indem man die Farbstoffe mit Licht entsprechender Wellenlänge anregt und das emittierte Licht detektiert. Ein dreidimensionales Bild ergibt sich schließlich dadurch, dass virtuelle Schnittebenen einzeln aufgenommen werden und die Einzelbilder der übereinander liegenden Ebenen zusammengesetzt werden. Technisch wird das realisiert indem ein Laser monochromatisches Licht in einer Ebene fokussiert und die Fluoreszenzfarbstoffe anregt. Streulicht aus anderen Ebenen der Probe wird effektiv durch eine Lochblende gefiltert.

Die DNA in Zellkernen wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt, welcher dann mit Licht der Wellenlänge 408 nm (blau) angeregt wurde. Proteine wie Tight Junction-Proteine wurden mit fluorophorgekoppelten Antikörpern markiert. Abhängig vom verwendeten Antikörper (vgl. 2.3.2) wurde Licht der Wellenlänge 488 nm (grün) oder 594 nm (rot) zur Anregung verwendet.

### 2.13.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Die heterologe Expression von Proteinen erfordert stets einen Nachweis der korrekten Lokalisation des Fremdproteins. Claudine sind Komponenten der Tight Junction und müssen dafür in das richtige Kompartiment, die Zellmembran, transportiert werden. Insbesondere nach gezielter Veränderung der Aminosäuresequenz ist die korrekte Lokalisation zu überprüfen, da viele Proteine eine Signalsequenz tragen, die wie eine Postleitzahl für den richtigen Ort kodieren. Zudem ist bei Claudinen bekannt, dass Punktmutationen die Lokalisation beeinflussen. In Claudin-5 führen eine Reihe von Mutationen im zweiten extrazellulären Loop (ECL2) zu einer Retention im Zytosol (Piontek et al., 2008). Diese intensive Studie von Piontek et al. verwendete HEK293-Zellen als Kulturmodell. In einer späteren Studie mit MDCK II-Zellen wurden alle der getesteten Claudin-5 Mutanten in der Plasmamembran nachgewiesen (Piehl et al., 2010). In dieser Arbeit wurden ebenfalls HEK293- und MDCK (C7)-Zellen verwendet und deshalb sorgfältig die Lokalisation der heterolog exprimierten Mutanten geachtet.

Die Zellen wurden auf Deckgläschen in 24-Well Platten ausgesät und für 5 Tage zur vollständigen Differenzierung bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> wachsen gelassen. Zur Fixierung der Zellen wurde das Medium entfernt, zweimal mit PBS gewaschen, eiskaltes Methanol zugegeben und für 10 min bei -20 °C gestellt. Danach wurde das Methanol entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 7 min bei RT in 0,5% Triton-X 100 inkubiert, um die Plasmamembran zu permeabilisieren. Um unspezifische Bindungsstellen abzublocken wurden die Zellen

für mindestens 1 h mit Blockierlösung (5% goat serum in PBS) behandelt. Nach Entfernen der Blockierlösung wurden die Primärantikörper zugegeben (vgl. 2.3.2.1; z. B. FLAG M2 & Occludin) und für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Antikörperlösung verworfen und durch dreimaliges Waschen mit Blockierlösung vollständig entfernt. Anschließend wurden die fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (vgl. 2.3.2.2; Alexa Fluor594 & DyLight488) für 1 h bei RT zugegeben. Auch diese Antikörper wurden nach der Inkubationszeit durch dreimaliges Waschen mit Blockierlösung vollständig entfernt. Die Deckgläser wurden dann in Wasser und absolutem Alkohol gespült, vorsichtig an der Luft getrocknet und abschließend auf einen Objektträger in einen Tropfen ProTaq<sup>®</sup> MountFluor gelegt und bis zum Mikroskopieren im Dunkeln gelagert.

Nach Aushärten wurden die Proben mit Hilfe eines Zeiss LSM 510 Meta Laser Scanning Mikroskops analysiert. Die Datenverarbeitung und -analyse erfolgte mit der zugehörigen Software (Version 3.2) und FIJI (Schindelin et al., 2012).

### 2.13.3 Fluoreszenz-Live-Cell-Imaging

Für einige Anwendungen ist es geeignet die Zellen in lebendem Zustand zu analysieren. Durch Fusion fluoreszierender Proteine (GFP, CFP, YFP; green-, cyan-, yellow-fluorescent protein) an die zu untersuchenden Zielproteine und Überexpression in Zellen nach vorheriger Transfektion können Eigenschaften des Zielproteins, wie z. B. die Lokalisation, direkt untersucht werden.

Zur Analyse der *trans*-Interaktion des Claudin-17 und der Mutanten des ECL2 wurden HEK293-Zellen mit den entsprechenden CFP-Cldn17-Expressionsplasmiden (siehe 2.6.1) transfiziert. Nach 24 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> wurde das Labtek<sup>®</sup> mit den Zellen zur Mikroskopie vorbereitet. Dazu wurde das Medium entfernt, wurden die Zellen mit HEPES-Ringer + Glukose gewaschen, dann mit 500 µl HEPES-Ringer + Glukose überschichtet und das Labtek<sup>®</sup> in eine auf 37 °C temperierte Kammer gestellt und diese schließlich über dem Objektiv des Mikroskops platziert. Zur Markierung der Zellmembran wurden 100 µl des Farbstoff Trypanblau zugegeben.

Wie für die indirekte Immunfluoreszenz wurde das LSM 510 Meta Laser Scanning Mikroskop der Firma Zeiss mit zugehöriger Software verwendet.

### 2.13.4 Gefrierbruchelektronenmikroskopie

Die Auflösungsgrenze eines Lichtmikroskops ist limitiert durch die Wellenlänge des eingesetzten Lichts. Bei der Elektronenmikroskopie werden schnelle Elektronen mit kleiner Wellenlänge verwendet, wodurch in biologischen Präparaten einzelne Zellstrukturen und Kompartimente untersucht werden können. Im Gefrierbruchverfahren entstehen zwei unterschiedliche Membranseiten, eine exoplasmatische E-Seite und eine protoplasmatisch P-Seite. Diese kommen dadurch zustande, da die Bruchlinie entlang des hydrophoben Membraninneren verläuft. Durch

Bedampfen mit Platin und einer dünnen Kohlenstoffschicht können die Bruchflächen konserviert und Kontraste erzeugt werden. Auf diese Weise lässt sich die Tight Junction analysieren, die auf der protoplasmatischen Seite als erhabene Stränge, auf der exoplasmatischen Seiten als Vertiefungen (Rinnen) zu erkennen ist.

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf Transwell-Filter bis zur Konfluenz wachsen gelassen und nach Waschen mit PBS fixiert. Dazu wurden die Filter für 30 min bei Raumtemperatur mit Glutaraldehydpuffer inkubiert. Zur Vorbereitung des Bruchs wurden die Präparate zunächst mit 10% Glycerol für 30 min und anschließend mit 30% Glycerol für 30 min behandelt um den Proben Wasser zu entziehen. Die so fixierten Zellen wurden dann vom Filter in die Gefrierbruchhalterung gebracht und mit gekühltem Chloridfluormethan (Freon22) eingefroren. Anschließend wurde die Halterung in die Clamping Nut des Gefrierbruchgeräts, welches durch flüssigen Stickstoff auf  $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$  vorgekühlt war, eingesetzt. Das Öffnen der Gefrierbruchhalterung erfolgte sobald ein stabiles Vakuum von  $2 \cdot 10^{-7}$  Torr und  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$  erreicht war und hatte zur Folge, dass die Zellmembran brach. In diesem kalten Vakuum erfolgte auch das Bedampfen mit Platin und um einen Winkel von  $45^{\circ}$  versetzt mit Kohlenstoff. Die so konservierten Repliken wurden zum Entfernen organischer Reste für 1 h mit Natriumhypochlorit inkubiert, danach auf Kupfernetze überführt und schließlich mit Amylacetat gewaschen.

Zur Analyse der Gefrierbruchpräparate wurde ein Zeiss 902 Transmissionselektronenmikroskop mit angeschlossener Videokamera und dazugehöriger Software (iTEM Olympus Soft Imaging Solution, Veleta) verwendet. Zur Auswertung morphometrischer Parameter wurde eine Vergrößerung von 51.000x eingestellt. In einem Netzgitter mit 200 nm-Intervallen, welches an dem am weitesten apikal gelegen Tight Junction-Strang angelegt wurde, wurde die vertikale Netzausdehnung und die Zahl der horizontalen Stränge ermittelt. Zudem wurde die Tight Junction-Stränge hinsichtlich ihrer Kontinuität bewertet, wobei zwischen kontinuierlichen und partikelartigen Strängen unterschieden wurde.

## 2.14 Elektrophysiologische Techniken

### 2.14.1 Ussing-Kammer-Technik

Mit Hilfe der Ussing-Kammer-Technik können elektrophysiologische Parameter wie der trans-epitheliale Widerstand (TER), die Leitfähigkeit und der aktive Ionentransport (Kurzschlussstrom  $I_{sc}$ ) *in vitro* gemessen werden.

Der prinzipielle Aufbau ist in Abb. 15 dargestellt, kann aber durch Modifikationen durch den Experimentator verändert werden. Das Epithel (ob Zellmonolayer auf einem Filterinsert oder ein aufgespanntes Gewebe aus Versuchstieren) trennt die beiden flüssigkeitsgefüllten Kammern. Aufgrund der Polarität des Epithels ergibt sich daraus eine apikale und eine basolaterale Seite. Zur Erhaltung physiologischer Bedingungen wird die Flüssigkeit (Ringer-Lösung) bei kon-

stant 37 °C gehalten und durch Puffersysteme in der Ringer-Lösung ein pH von 7,4 eingestellt. Die Begasung mit Carbogen (95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) dient unter anderem der Einstellung des pH-Wertes, und der Durchmischung der Ringer-Lösung. Innerhalb jeder Halbkammer befindet

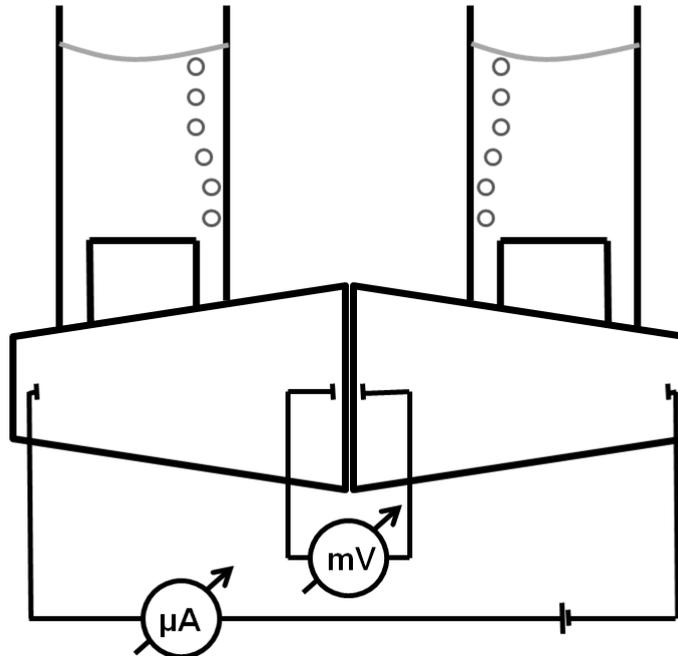


Abbildung 15: **Schematischer Aufbau einer Ussing-Kammer** zur Messung von Dilutionspotentialen

sich je eine Spannungs- und Stromelektrode, die mit einer computergesteuerten Kontrolleinheit (Mehrkanal AD-Wandler, Messverstärker) verbunden sind. Zur Bestimmung des transepithelialen Widerstands (TER) wird ein Rechteckstrom appliziert, was zu einer Spannungsänderung führt, die direkt proportional zum Widerstand ist. Mit Hilfe des Ohm'schen Gesetz ( $R = \frac{U}{I}$ ) kann der transepitheliale Widerstand berechnet werden.

Neben dem Widerstand, den ein Epithel darstellt, ist auch der aktive Ionentransport ein wichtiger Parameter, der die Eigenschaften des Epithels bestimmt. Der Ionentransport über das Epithel erzeugt einen Strom, der ausgeglichen werden muss, wenn man durch die Messeinheit die Spannung des Systems auf 0 mV einstellt (klemmt). Der dazu notwendige applizierte Kurzschlussstrom  $I_{sc}$  entspricht dem aktiven Ionentransport.

### Badkorrektur

Vor jeder Messung wurden Leerwerte von Spannung, Strom und Widerstand der einzelnen Kammer aufgenommen und anschließend von den Messwerten nach Einbau des Epithels subtrahiert. Diese Korrekturen sind notwendig, da beispielsweise die Position der Elektroden die Messwerte beeinflussen kann.

Zur Einstellung der Messparameter und Datenaufnahme diente eine eigens entwickelte Software (Analogon, Ing. grad. Detlef Sorgenfrei).

### 2.14.2 Messung von Dilutionspotentialen

Zur Bestimmung der partiellen, parazellulären Leitfähigkeit von Natrium- und Chloridionen werden Dilutionspotentialmessungen durchgeführt. Dabei wird unter Gewährleistung eines osmotischen Ausgleichs durch Mannitol die Ionenkonzentration in einer Kammerhälfte reduziert. Durch passiven Transport über das Epithel stellt sich ein Diffusionspotential ein, welches man als Dilutionspotential bezeichnet und über die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (1) berechnet werden kann:

$$U_m = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{P_{Na} \cdot [Na]^{ap} + P_{Cl} \cdot [Cl]^{bl}}{P_{Na} \cdot [Na]^{bl} + P_{Cl} \cdot [Cl]^{ap}} \quad (1)$$

$U_m$	Dilutionspotential
$R$	universelle Gaskonstante
$T$	Temperatur
$F$	Faradaykonstante
$P_{Na}, P_{Cl}$	Permeabilität für Natrium- bzw. Chloridionen
$[Na]^{ap}, [Cl]^{ap}$	Konzentration von Natrium- bzw. Chloridionen in apikaler Lösung
$[Na]^{bl}, [Cl]^{bl}$	Konzentration von Natrium- bzw. Chloridionen in basolateraler Lösung

Um das Verhältnis der Permeabilitäten von Natrium- und Chloridionen zu berechnen oder die absoluten Permeabilitäten zu bestimmen, muss die Gleichung durch mathematische Umformungen umgestellt (2, 3) oder im Falle der absoluten Permeabilitäten um die Größe der Leitfähigkeit, welche dem Kehrwert des elektrischen Widerstands entspricht, erweitert werden (4, 5). Zudem muss durch die unterschiedliche Ionenkonzentration die Entstehung eines Liquid Junction-Potentials berücksichtigt werden.

$$\frac{P_{Na}}{P_{Cl}} = \frac{e^{\frac{U_m \cdot F}{R \cdot T}} \cdot [Cl]^{ap} - [Cl]^{bl}}{[Na]^{ap} - e^{\frac{U_m \cdot F}{R \cdot T}} \cdot [Na]^{bl}} \quad (2)$$

$$\frac{P_{Na}}{P_{Cl}} = \frac{10^{\frac{\Delta E}{s}} \cdot a_{Cl-ap} - a_{Cl-bl}}{a_{Na-ap} - 10^{\frac{\Delta E}{s}} \cdot a_{Na-bl}} \quad (3)$$

$$P_{Na} = \frac{R \cdot T}{F^2} \cdot \frac{G^t}{[NaCl]} \cdot \frac{1}{1 + \frac{P_{Na}}{P_{Cl}}} \cdot \frac{P_{Na}}{P_{Cl}} \quad (4)$$

$$P_{Cl} = \frac{R \cdot T}{F^2} \cdot \frac{G^t}{[NaCl]} \cdot \frac{1}{1 + \frac{P_{Na}}{P_{Cl}}} \quad (5)$$

$G^t$	Gesamtleitfähigkeit des Epithels
$\Delta E$	$E_{bl} - E_{ap}$ , mit Korrektur für das Liquid Junction-Potential; $s = 2,303 \cdot \frac{R \cdot T}{F}$
$a_{Na-ap}, a_{Cl-ap}$	apikale Ionenaktivität, berechnet über modifizierte Debye-Hückel-Formalismus und Konstanten aus Meier 1982
$a_{Na-bl}, a_{Cl-bl}$	basolaterale Ionenaktivität, berechnet über modifizierte Debye-Hückel-Formalismus und Konstanten aus Meier 1982

Die Messung der Dilutionspotentiale erfolgte in Ussing-Kammer mit Natrium-Ringer für monovalente Anionen unter Sauerstoffbegasung. Nach Einbau der Filtersupports mit dem Zellmonolayer wurden je 5 ml der Natrium-Ringer in beide Kammerhälften gefüllt. Nachdem sich die Zellen äquilibriert hatten und sich ein konstanter Widerstand eingestellt hatte (nach ~30 min), wurde auf apikaler Seite weitere 5 ml der Mannitol-Ringer eingefüllt, auf basolateraler Seite wurden 5 ml Natrium-Ringer für monovalente Anionen zugegeben. Das Dilutionspotential stellte sich bereits innerhalb der ersten Minute nach dem Lösungswechsel ein, die Aufnahme der Messwerte wurde über mindestens 5 Minuten durchgeführt.

Um möglichst exakte Werte für die Chloridpermeabilität zu erzielen, wurde bei der Zusammensetzung der Ringerlösung darauf geachtet möglichst keine weiteren Anionen einzubringen. Als Puffersystem wurde daher HEPES anstelle des sonst üblichen Bicarbonats verwendet. Bei Begasung mit Carbogen (95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) und Zugabe von NaHCO<sub>3</sub> kann eine Ringerlösung im physiologischen pH-Bereich (7,4) gepuffert werden. Bei Einführung eines parazellulären Anionenkanals könnte dieser jedoch auch Bicarbonat-Ionen passieren lassen, was zu einer Potentialänderung beitragen würde. Der Einsatz von HEPES als Puffersystem reduziert diesen Störfaktor, da HEPES aufgrund seiner Größe (238,3 g/mol) und seiner zweifach negativen Ladung in deutlich geringerem Maße transportiert wird.

### 2.14.3 Messung biionischer Potentiale

#### Monovalente Anionen

Das experimentelle Vorgehen ist bei der Messung für monovalente Anionen das gleiche wie für Dilutionspotentiale mit NaCl. Es sind jedoch einige Modifikationen zu beachten. Die eingesetzten Ringer-Lösungen sind unter 2.4.4 angegeben und unterscheiden sich von dem üblichen Natrium-Ringer für monovalente Anionen. Die Permeabilität für Anionen Y ergibt sich aus (6).

$$\frac{P_Y}{P_{Cl}} = \frac{\frac{P_{Na}}{P_{Cl}} \cdot a_{Na-ap} + a_{Cl-bl} - 10^{\frac{\Delta E}{s}} \cdot \left( \frac{P_{Na}}{P_{Cl}} \cdot a_{Na-bl} + a_{Cl-ap} \right)}{10^{\frac{\Delta E}{s}} \cdot a_{Y-ap} - a_{Y-bl}} \quad (6)$$

#### 2.14.4 Fluxmessung parazellulärer Größenmarker

##### Fluoreszein

Fluoreszein ist ein 332 Da großes Molekül, das fast ausschließlich parazellulär transportiert wird, da es von den Transportern, die in der Plasmamembran der MDCK C7-Zellen exprimiert sind, nicht aktiv transportiert wird. Aus diesem Grund eignet sich Fluoreszein als Markermolekül für den Transport von Makromolekülen. Zudem kann es aufgrund seiner Fluoreszenzeigenschaften auf einfache Weise mit Hilfe eines Spektralphotometers quantifiziert werden.

Die Fluxmessungen wurden in Ussing-Kammern durchgeführt um zeitgleich physiologische Parameter wie den Widerstand aufzuzeichnen. Zudem wurde in den Ussing-Kammern eine Spannungsklemme angelegt um Potentialänderungen auszuschalten. Weiterhin wurden die entnommenen Volumen bei der Probenentnahme durch frische Badlösung ersetzt um einen hydrostatischen Effekt zu vermeiden.

Für die Messung wurden die Zellen auf Filtersupports kultiviert und nach 5 Tagen in die Ussing-Kammer eingebaut, die anschließend mit 10 ml Standard-Ringerlösung befüllt wurde. Es wurde die Spannungsklemme aktiviert und nach einer Äquilibrierungsphase von etwa 45 min wurden 10 µl Fluoreszein (100 mM) apikal zugegeben und basolateral eine Probe (Nullwert,  $t=0$ ) abgenommen. Weitere Probenentnahmen (300 µl) erfolgten in Intervallen von 30 min über einen Zeitraum von 2,5 h. Zur Konzentrationsbestimmung wurden die Proben, sowie eine Eichreihe, bei 520 nm mit einem Photometer vermessen.

Der Fluoreszeinflux ( $J$ ) und daraus folgend die Permeabilität ( $P$ ) wurden über die nachstehenden Gleichungen berechnet:

$$J = \frac{(c_1 - c_2) \cdot V_{Kammer}}{\Delta t \cdot A_{Filter} \cdot \left( \frac{V_{Zugabe}}{V_{Kammer}} \right)} \quad (7)$$

$$P = \frac{J}{\Delta c} \quad (8)$$

J	Flux
P	Permeabilität
$c_1, c_2$	Konzentration zu den Zeitpunkten 1, 2
$\Delta t$	Zeitintervall
V	Kammervolumen, Zugabevolumen des Solut
A	Fläche des Epithels
$\Delta c$	Konzentrationsdifferenz

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Molekulare Basis der Claudin-17-Anionenpore

Das Tight Junction-Protein Claudin-17 wurde als parazellulärer Kanal für Anionen beschrieben (Krug et al., 2012). Das Überexpressionssystem aus pCMV10-Expressionsvektor und der hochohmigen epithelialen MDCK C7-Zelllinie wurde bei der Erstbeschreibung als das geeignetste Modell erachtet, da MDCK C7-Zellen endogen kein Claudin-17 oder andere kanalbildende Claudine exprimieren, und auch erfolgreich eingesetzt. Zur einfachen Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde das Modell auch für diese Arbeit verwendet. Zudem konnte auf die bereits existierende Claudin-17-Überexpressionszelllinie zugegriffen und diese als Positivkontrolle mitgeführt werden.

#### 3.1.1 Generierung der stabilen Überexpressionsklone

Nach erfolgreicher Einführung einer Mutation in die Claudin-17-cDNA (Chromatogramme siehe Anhang 10.4, Abb. 40) wurde diese durch Ligation in den Expressionsvektor pCMV10 eingebracht. N-terminal ist das Claudin-17 somit 3×FLAG markiert, wodurch sich die Möglichkeit ergibt, einen spezifischen monoklonalen anti-FLAG-Antikörper zum Proteinnachweis zu verwenden.

Überexpressionsklone, die durch Transfektion von MDCK C7-Zellen mit den verschiedenen Plasmiden (vgl. 2.6.1) gewonnen wurden, wurden auf Expression und Lokalisation des getagten Claudin-17 untersucht (Abb. 16 bis 20).

Das unterschiedliche Laufverhalten der Proteine im SDS-Gel erklärt sich durch ein abweichendes Molekulargewicht aufgrund unterschiedlicher Klonierungsstrategien (wtClaudin-17 ~25 kDa, mClaudin-17 und mutierte Claudin-17-Proteine ~24 kDa). Das humane Wildtyp-Claudin-17, welches als Positivkontrolle jeweils mitgeführt wurde, wurde ursprünglich in einen GFP-Vektor kloniert und anschließend in den pCMV10-Vektor umkloniert. Dadurch ist die Linker-Sequenz zwischen dem FLAG-Tag und dem Startcodon des Claudin-17 verlängert. Die Claudin-17-Mutanten sowie das murine Claudin-17 (mCldn-17) enthalten diese zusätzliche Linker-Sequenz aus dem GFP-Vektor nicht. Die Klonierung erfolgte wie in 2.11.9.2 beschrieben.

Die korrekte Lokalisation in der Tight Junction wurde mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie untersucht (Abb. 17 bis 20). Alle untersuchten mutierten Claudin-17-Proteine und das murine Claudin-17-Protein kolokalisieren mit den Tight Junction-Markern Occludin oder ZO-1. Die Punktmutationen beeinflussen somit den Transport zur Zellmembran nicht. Lediglich für die Mutanten K65R und Y149A wurde zusätzlich eine Färbung in intrazellulären Kompartimenten beobachtet. Dies könnte auf eine Retention im Endoplasmatischen Retikulum aufgrund einer Fehlfaltung hindeuten. Ebenso könnte eine starke Expressionsrate zu einem Verbleib im Zytoplasma führen, wenn Claudin-17 nicht vollständig zur Membran transportiert wurde.

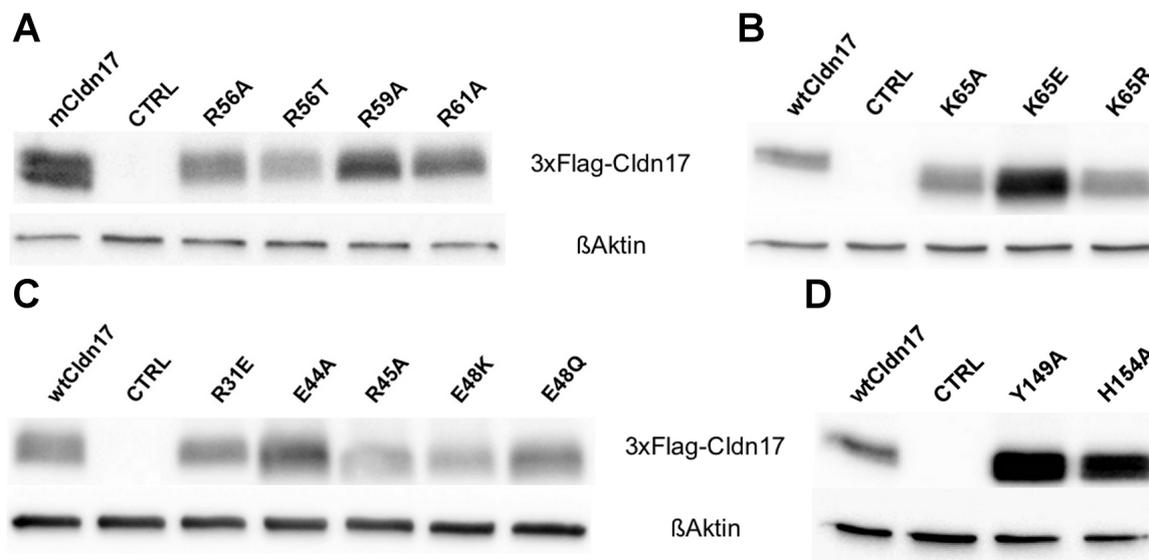


Abbildung 16: **Western Blot zur Überexpression verschiedener Claudin-17-Mutanten in MDCK C7-Zellen.** Die Claudin-17-Mutanten wurden in mehrere Gruppen aufgrund der Position des Aminosäureaustausches zusammengefasst. In mit Leervektor transfizierte Kontrollen (CTRL) konnte kein FLAG-Signal detektiert werden. Der Überexpressionsklon Cldn17#10 (wtClaudin-17, ~25 kDa) wurde als positiv Kontrolle mitgeführt.  $\beta$ -Aktin (~42 kDa) diente als Ladekontrolle. **A** Murines Claudin-17 und die Mutanten der Arginine an Positionen 56, 59 und 61. **B** Austausch der Aminosäure Lysin an Position 65. **C** Austausch verschiedener geladener Aminosäuren in der N-terminalen Hälfte des ECL1. **D** Claudin-17-Mutanten nach Aminosäureaustausch in ECL2.

Zusätzlich zur korrekten Lokalisation des exogenen Claudin-17 wurde auch die Lokalisation endogener Claudine auf Änderungen hin untersucht (Abb. 21 bis 24). Während die Western Blot-Analyse leichte Schwankungen bei der Expression endogener Claudine anzeigte, waren diese in Immunfluoreszenzfärbungen weiter in der Tight Junction mit den Markerproteinen Occludin oder ZO-1 kolokalisiert. Dabei konnte für Claudin-4 häufig eine Ausbreitung in laterale Richtung beobachtet werden. Dies ist ein allgemein auftretendes Verhalten des Claudin-4, das auch in anderen Zellkultursystemen, z. B. IPEC-J2-Zellen, beobachtet werden kann.

### 3.1.2 Einfluss des Aminosäureaustausch auf die Eigenschaften des Claudin-17

#### 3.1.2.1 Tight Junction-Ultrastruktur

Das Tight Junction-Netzwerk wurde mittels Gefrierbruchelektronenmikroskopie analysiert. MDCK C7-Zellen besitzen ein sehr ausgeprägtes Netzwerk von Tight Junction-Strängen, das sich durch Transfektion von Claudin-17 nicht veränderte (Krug et al., 2012, supplementary material). Um zu untersuchen, ob Punktmutationen in Claudin-17 die Strangbildung beeinflussen, wurde für die Mutanten Cldn-17K65A, Cldn17K65E und Cldn17K65R die Morphologie des Tight Junction-Netzwerks auf Veränderungen hin untersucht. Abb. 25 zeigt Tight Junctions in repräsentativen elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Gefrierbrüchen. Dabei waren kei-

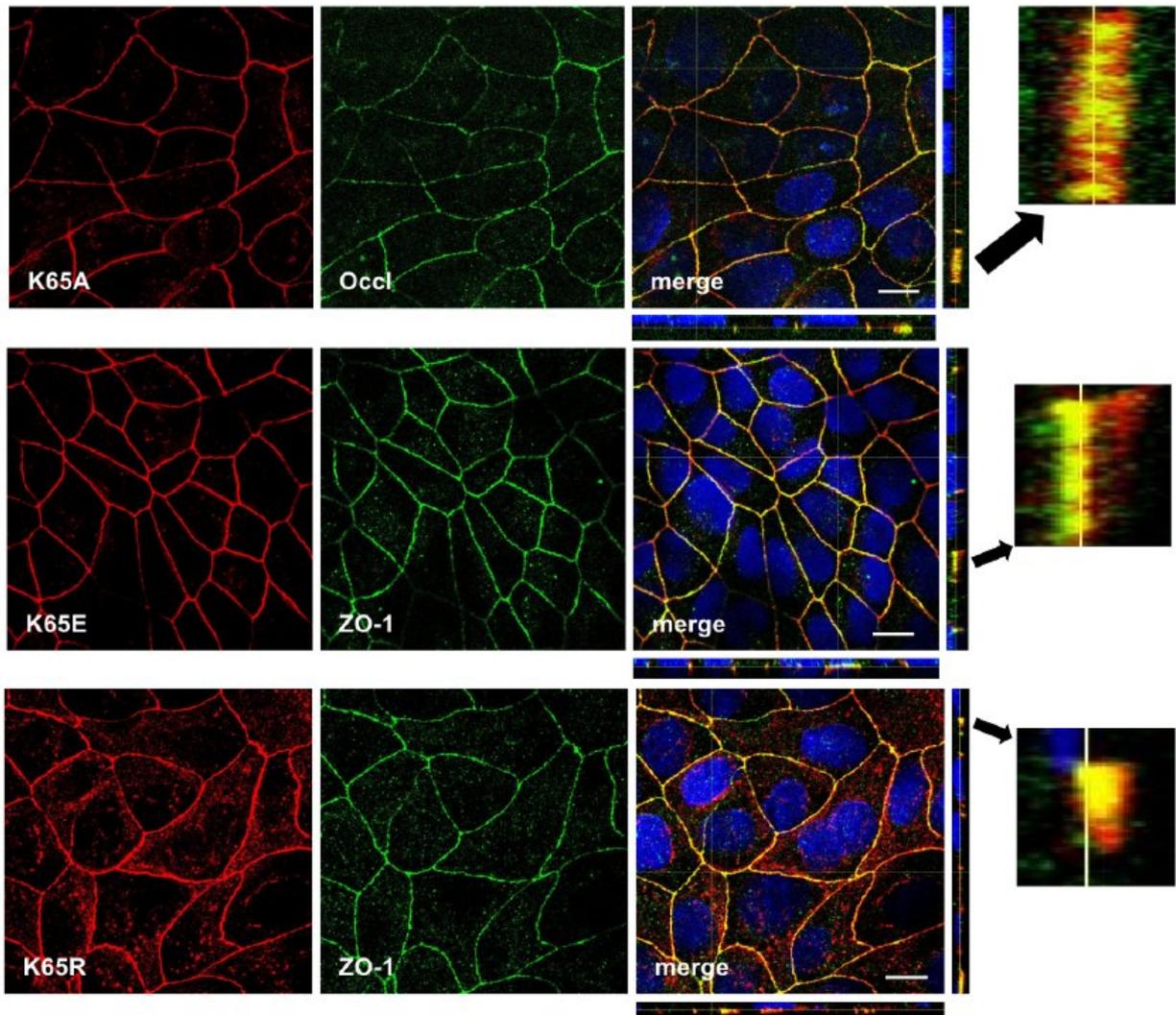


Abbildung 17: **Konfokale Fluoreszenzmikroskopie zur korrekten Lokalisation des mutierten Claudin-17 in MDCK C7-Zellen.** In den Überexpressionsklonen K65A#1103, K65E#0604 und K65R#1205 wurde das mutierte Claudin-17 (M2-anti-FLAG-AK, jeweils rot) und Occludin oder ZO-1 (grün) als TJ-Marker gefärbt. Aus der lateralen Ansicht in YZ-Richtung sind zudem vergrößerte Ausschnitte dargestellt. Die Mutante K65R verblieb stärker im Zytoplasma als Cldn17K65A oder K65E, wurde jedoch erfolgreich in die Plasmamembran eingebaut, wo es mit ZO-1 kolokalisierte. Balken = 10  $\mu$ m

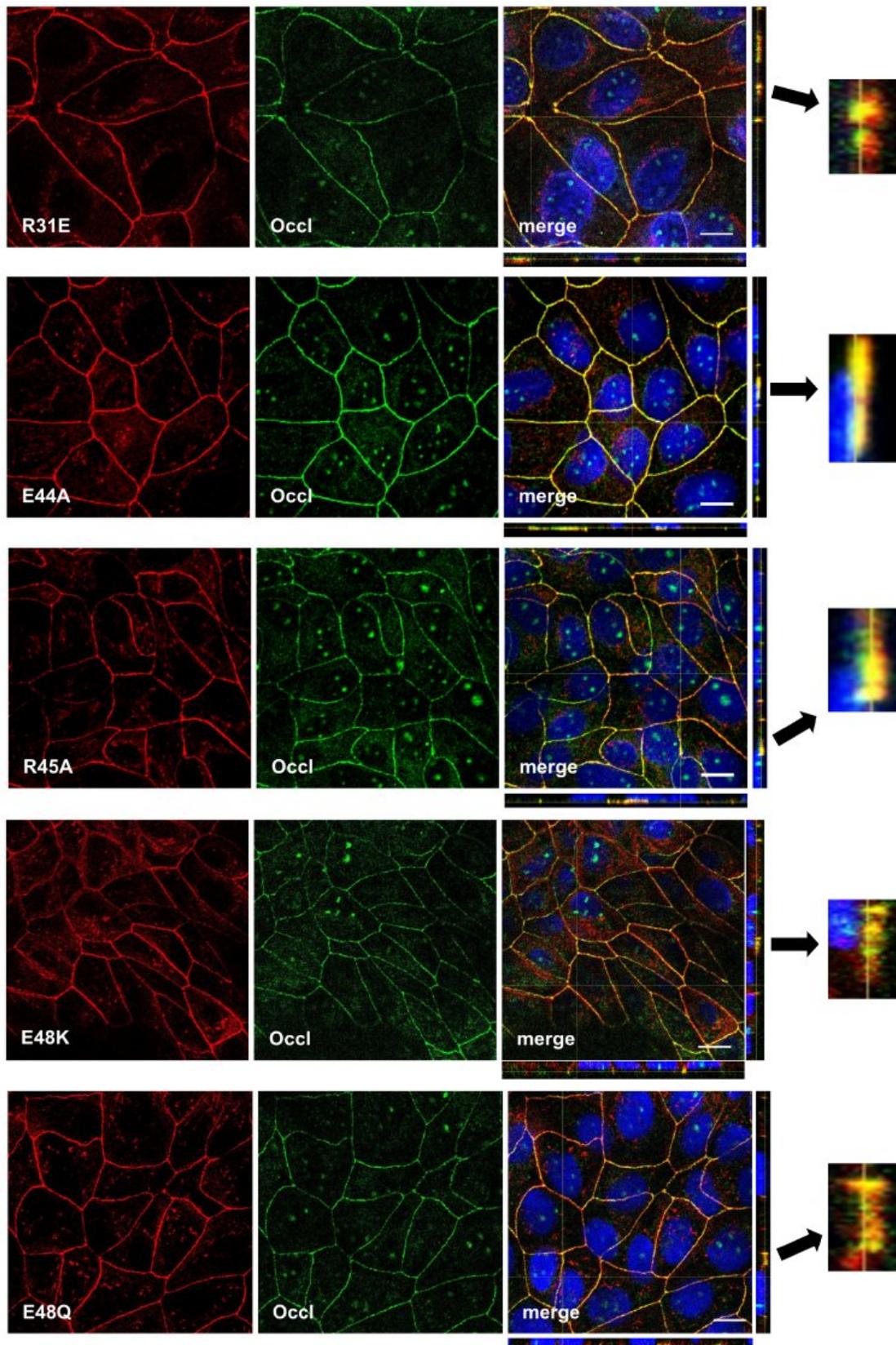


Abbildung 18: **Konfokale Fluoreszenzmikroskopie zur korrekten Lokalisation des mutierten Claudin-17 in MDCK C7-Zellen.** In den Überexpressionsklonen R31E#0110, E44A#0405, R45A#0413, E48K#20 und E48Q#21 wurde das mutierte Claudin-17 (M2-anti-FLAG-AK, jeweils rot) und Occludin (grün) als TJ-Marker gefärbt. Aus der lateralen Ansicht in YZ-Richtung sind vergrößerte Ausschnitte dargestellt. Balken = 10  $\mu\text{m}$

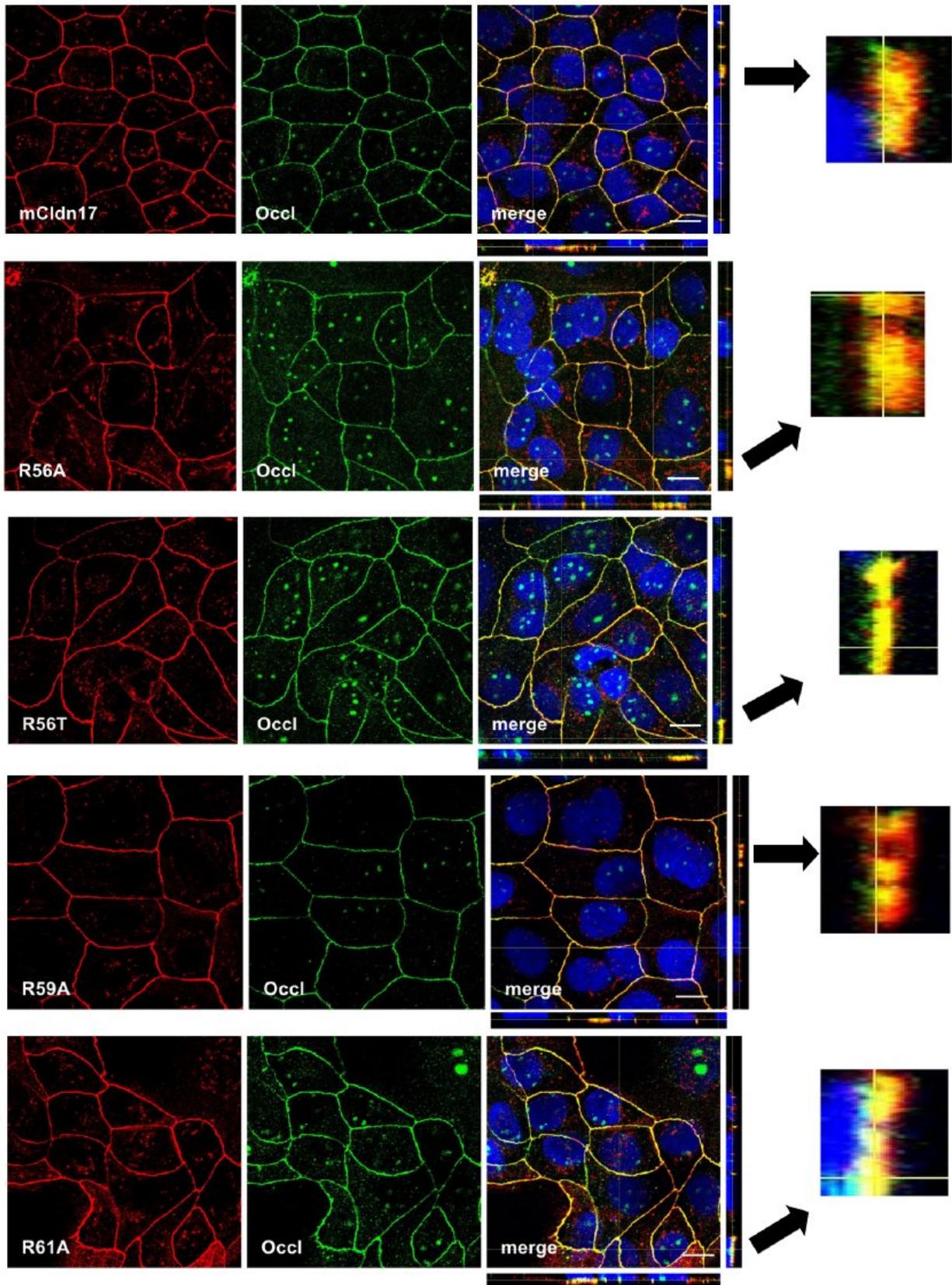


Abbildung 19: **Konfokale Fluoreszenzmikroskopie zur korrekten Lokalisation des murinen oder mutierten humanen Claudin-17 in MDCK C7-Zellen.** In den Überexpressionsklonen mCldn17#0602, R56A#12, R56T#3, R59A#1003, und R61A#0305 wurde das murine oder das mutierte humane Claudin-17 (M2-anti-FLAG-AK, jeweils rot) und Occludin (grün) als TJ-Marker gefärbt. Aus der lateralen Ansicht in YZ-Richtung sind vergrößerte Ausschnitte dargestellt. Balken = 10 µm

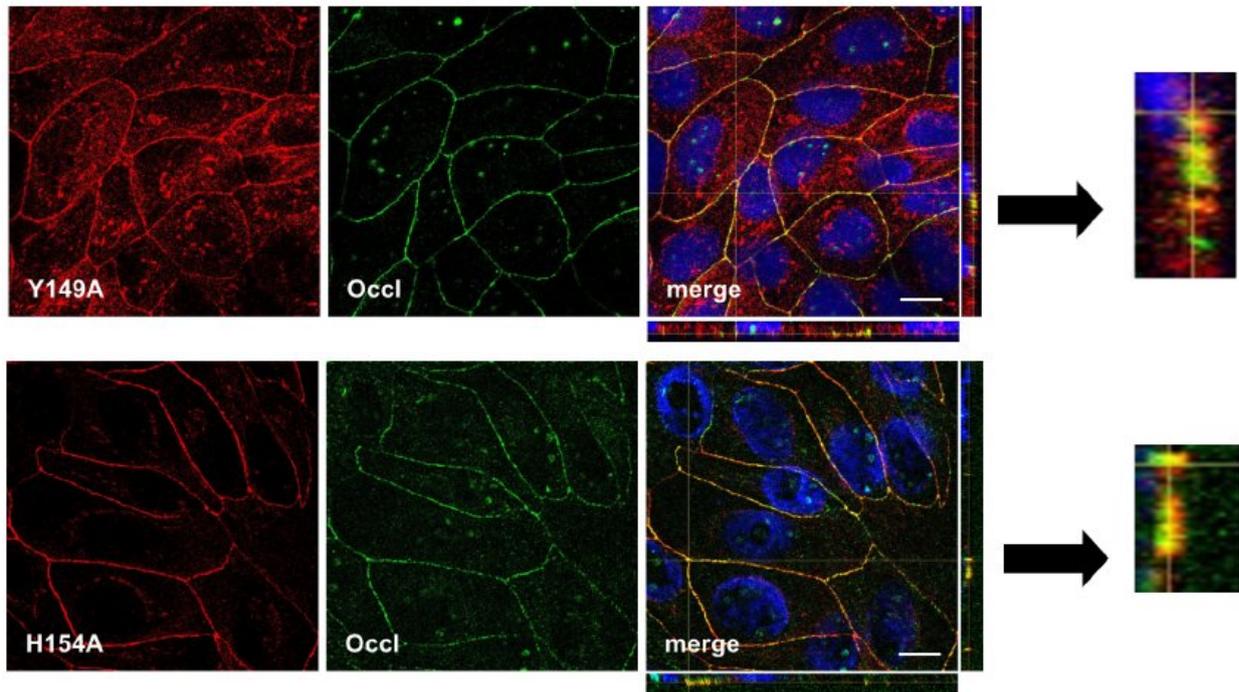


Abbildung 20: **Konfokale Fluoreszenzmikroskopie zur korrekten Lokalisation des mutierten Claudin-17 in MDCK C7-Zellen.** In den Überexpressionsklonen Y149A#0814 und H154A#0305 wurde mutiertes Claudin-17 (M2-anti-FLAG-AK, jeweils rot) und Occludin (grün) als TJ-Marker gefärbt. Aus der lateralen Ansicht in YZ-Richtung sind vergrößerte Ausschnitte dargestellt. Die Mutante Cldn17Y149A zeigte, neben dem korrekten Einbau in die Plasmamembran, eine stärkere intrazelluläre Färbung als Cldn17H154A. Dies könnte auf eine Retention im Endoplasmatischen Retikulum aufgrund einer Fehlfaltung hindeuten. Balken = 10  $\mu\text{m}$

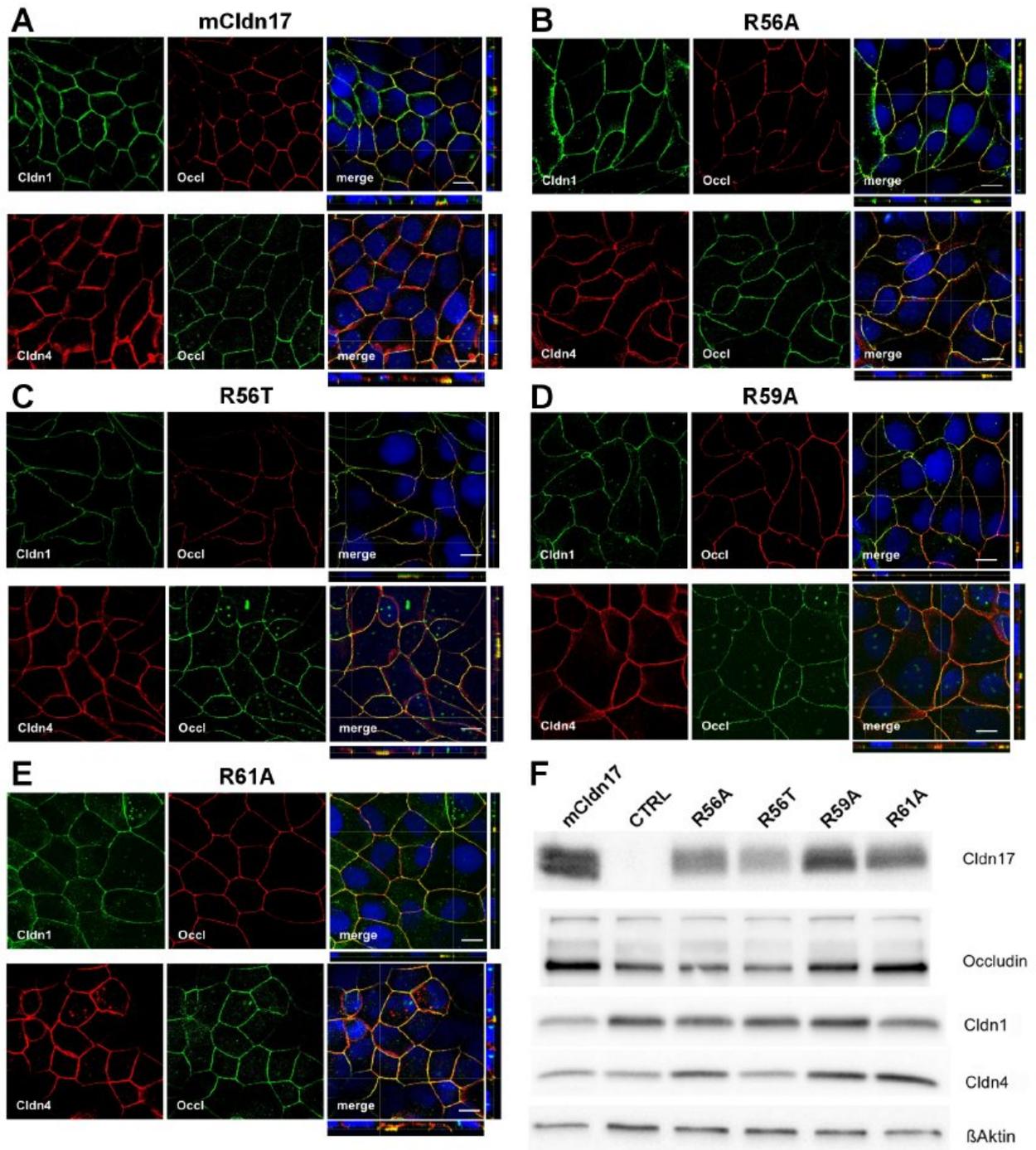


Abbildung 21: **Konfokale Fluoreszenzmikroskopie und Western Blot-Analyse zur Lokalisation und Expression endogener TJ-Proteine.** A-E Die Überexpressionsklone mCldn17#0602, R56A#12, R56T#3, R59A#1003 und R61A#0305 zeigten Kolokalisation der Claudine-1 und -4 mit dem TJ-Marker Occludin. Claudin-4 war zusätzlich in weiter lateralen Bereichen lokalisiert. Balken = 10  $\mu$ m. F Western Blot-Analyse der verschiedenen TJ-Proteine.

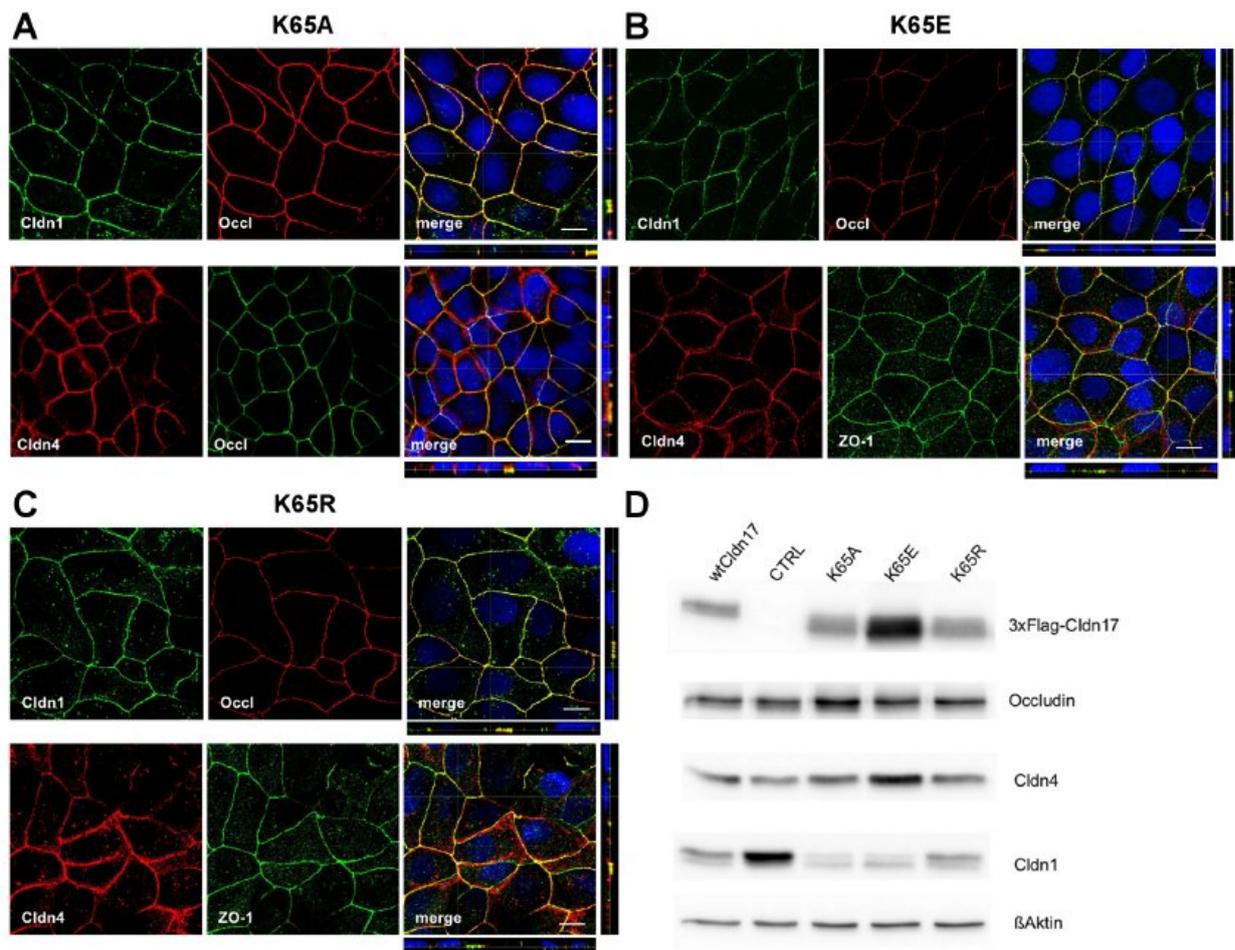


Abbildung 22: **Konfokale Fluoreszenzmikroskopie und Western Blot-Analyse zur Lokalisation und Expression endogener TJ-Proteine.** A-C Überexpressionsklone der Claudin-17-Mutanten an Position K65 zeigten Kolokalisation der Claudine-1 und -4 mit den TJ-Markern Occludin oder ZO-1. Claudin-4 war häufig in lateraler Richtung ausgebreitet. Balken = 10  $\mu$ m. D Western Blot-Analyse der verschiedenen TJ-Proteine.

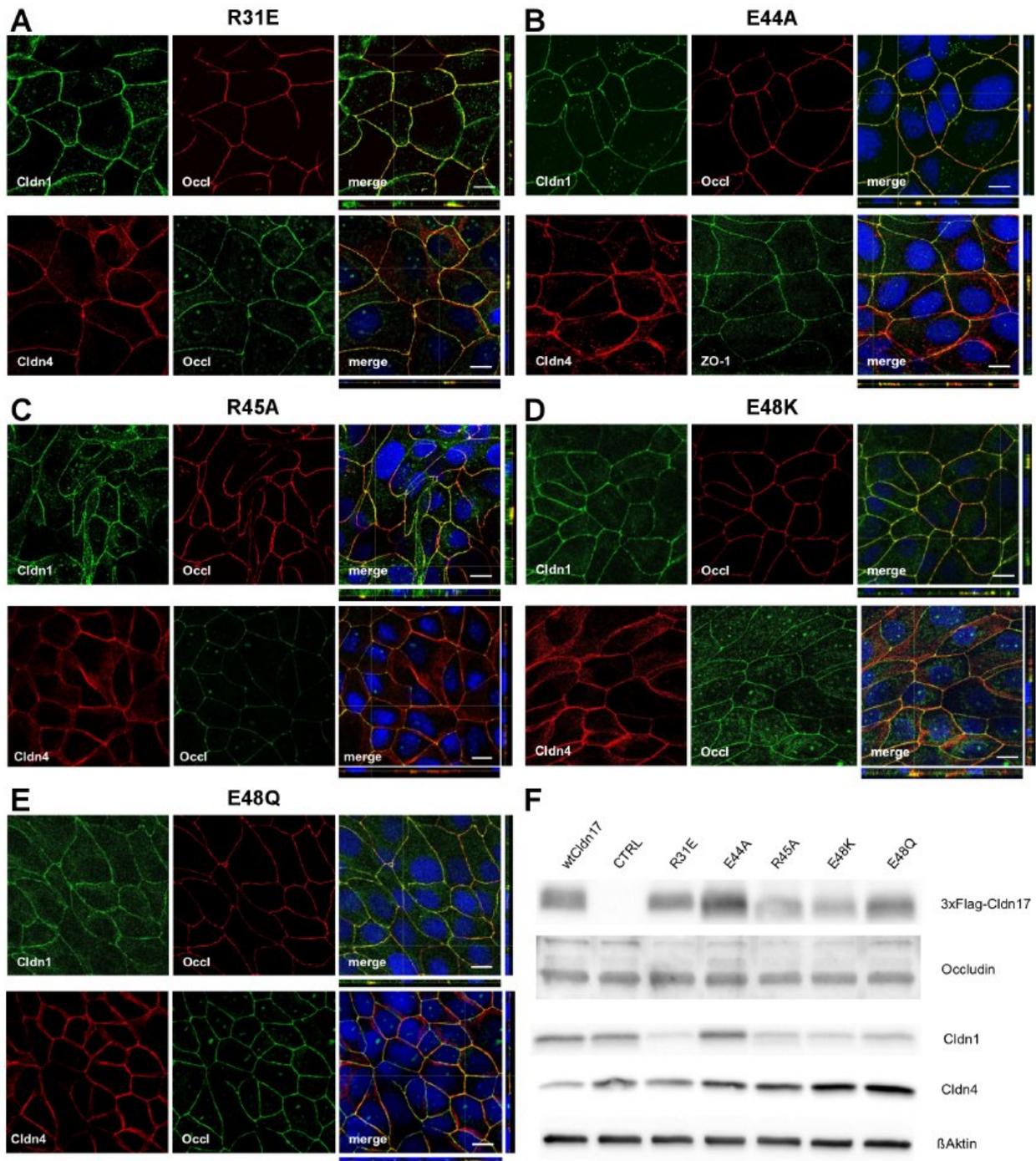


Abbildung 23: **Konfokale Fluoreszenzmikroskopie und Western Blot-Analyse zur Lokalisation und Expression endogener TJ-Proteine.** A-E Kolokalisation der Claudine-1 und -4 mit den TJ-Markern Occludin oder ZO-1 in den Überexpressionsklonen R31E#0108, E44A#0405, R45A#0413, E48K#20 und E48Q#21. Claudin-4 war häufig in lateraler Richtung ausgebreitet. Balken = 10  $\mu$ m. F Western Blot-Analyse der verschiedenen TJ-Proteine.

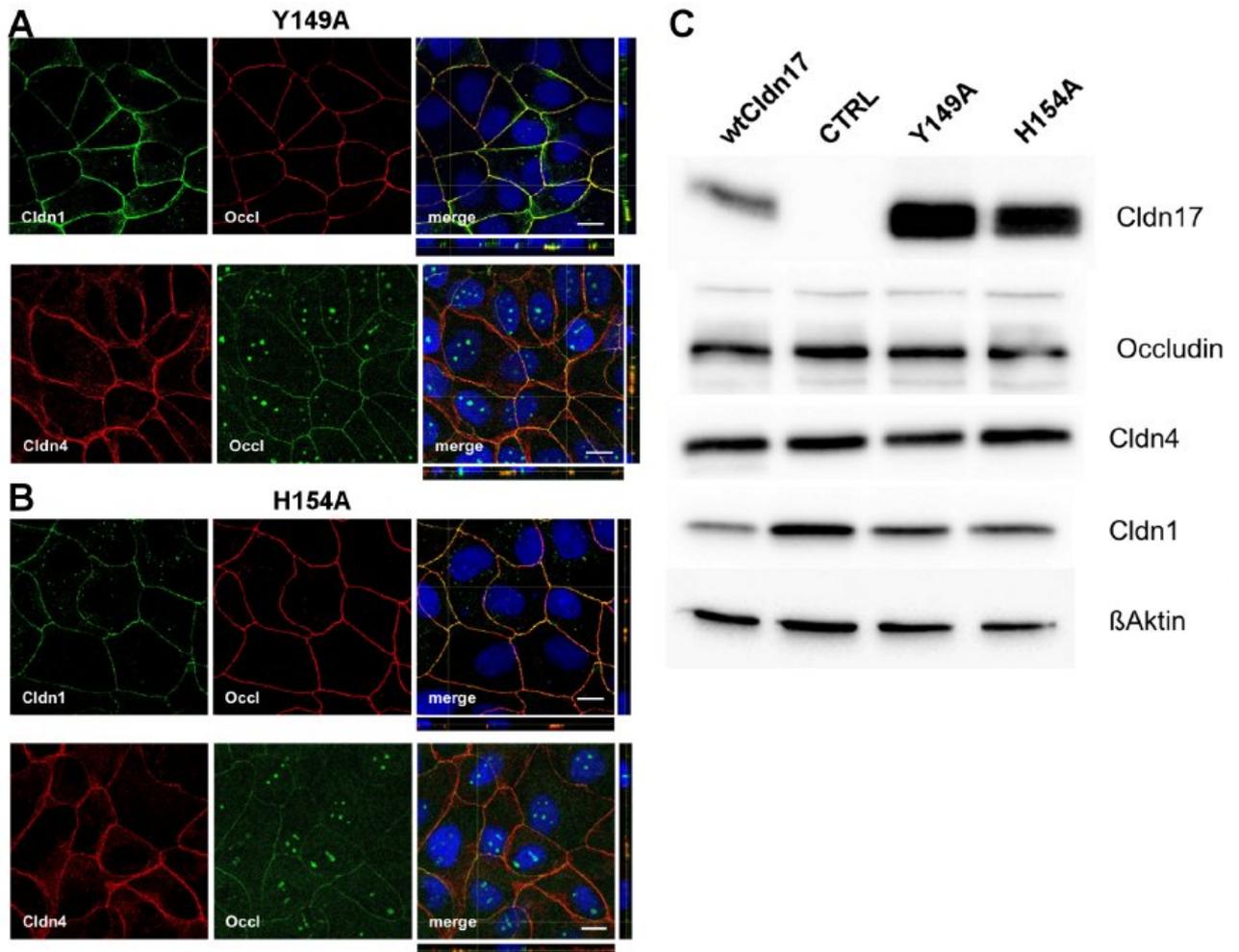


Abbildung 24: **Konfokale Fluoreszenzmikroskopie und Western Blot-Analyse zur Lokalisation und Expression endogener TJ-Proteine.** **A-B** In den Überexpressionsklonen Y149A#0814 und H154A#0305 waren die Claudine-1 und -4 mit dem TJ-Marker Occludin kolokalisiert. Claudin-4 zeigte häufig eine Ausbreitung in lateraler Richtung. Balken = 10  $\mu$ m. **C** Western Blot-Analyse der verschiedenen TJ-Proteine.

ne Unterschiede zwischen den Claudin-17-Mutanten sowie den vektortransfizierten Zellen oder mit wtClaudin-17-transfizierten Zellen zu erkennen. Die verschiedenen Punktmutationen im Claudin-17 verursachten keine Veränderung der allgemeinen Tight Junction-Ultrastruktur.

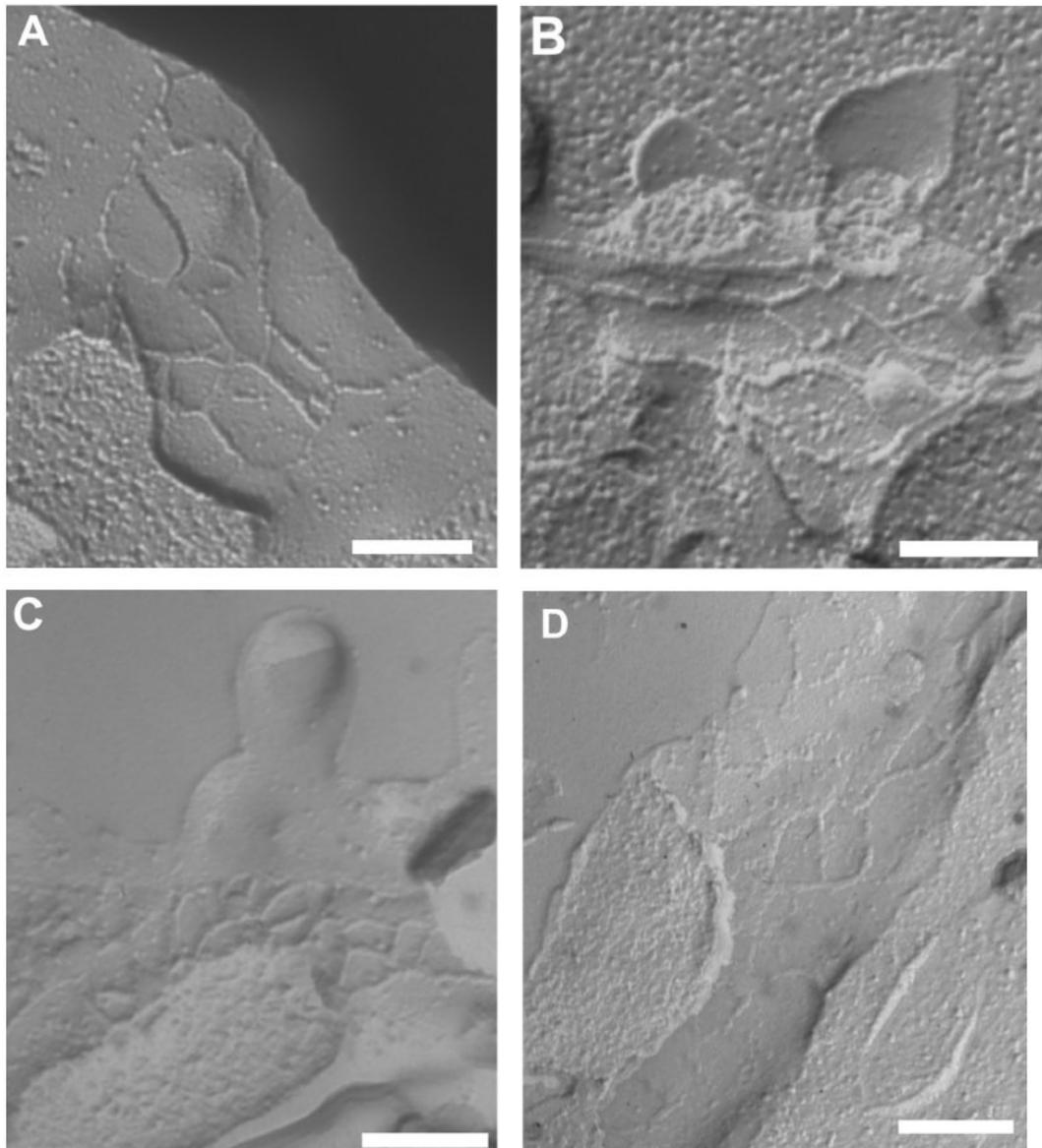


Abbildung 25: **Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Tight Junction von Cldn17K65A, Cldn17K65E und Cldn17K65R in MDCK C7-Zellen.** Es ist jeweils eine exemplarische Aufnahme der Tight Junction eines Überexpressionsklons gezeigt. Balken = 200 nm. **A** TJ-Netzwerk in vektortransfizierten MDCK C7-Zellen; Aufbau und Komplexität der TJ wie zuvor veröffentlicht (Krug et al., 2012). **B** Die Überexpression des Cldn17K65A hatte keinen Einfluss auf die TJ-Ultrastruktur. **C** Auch in MDCK C7-Zellen, die Cldn17K65E exprimieren, war das TJ-Netzwerk unverändert. **D** Die Überexpression des Cldn17K65R zeigt keine Unterschiede der TJ-Struktur im Vergleich zur Vektorkontrolle. Die verschiedenen mutierten Claudin-17-Proteine hatten wie wtCldn17 keinen Einfluss auf die TJ-Ultrastruktur (Krug et al., 2012)

### 3.1.2.2 Einfluss auf die Permeabilität für Natrium- und Chloridionen

Die Permeabilität für Chloridionen ist eine entscheidende funktionelle Besonderheit von Claudin-17. Um zu analysieren, welche der geladenen Aminosäuren des ersten und zweiten extrazellulären Loops für diese Eigenschaft verantwortlich ist, wurden Dilutionspotentialmessungen durchgeführt und die Permeabilitäten für Natrium- und Chloridionen berechnet.

#### **mCldn17, R56, R59 und R61**

Murines Claudin-17 wurde bislang nicht charakterisiert, es wird jedoch angenommen, dass es aufgrund der hohen Sequenzhomologie die gleichen funktionellen Eigenschaften wie humanes Claudin-17 besitzt. Überexpressionsklone mit muriner Claudin-17-cDNA zeigen in Dilutionspotentialmessungen deutliche Anionenselektivität. Das Verhältnis der Permeabilitäten für Chlorid- und Natriumionen war im Vergleich zu Vektorkontrollen signifikant erhöht ( $P_{Cl}/P_{Na}$ : Vektorkontrolle  $0,85 \pm 0,01$   $n=13$ ; mCldn17#0602  $1,28 \pm 0,09$   $n=6$  und  $p=0,2$  n. s. [Getestet wurde nachfolgend immer gegen wtClaudin-17; der p-Wert zeigt keine Veränderung gegen wtClaudin-17 an.]), gegenüber Überexpressionsklonen mit humanem Claudin-17 jedoch unverändert (hCldn17  $1,43 \pm 0,09$ ;  $n=9$ ). Die Änderung des Quotienten der Einzelpermeabilitäten beruhte dabei auf einer signifikanten Erhöhung der Chloridpermeabilität ( $P_{Cl}[10^{-3}cm/h]$ : Vektorkontrolle  $2,0 \pm 0,2$   $n=13$ ; mCldn17#0602  $2,9 \pm 0,3$   $n=6$ ), bei unveränderter Permeabilität für Natriumionen ( $P_{Na}[10^{-3}cm/h]$ : Vektorkontrolle  $2,3 \pm 0,2$   $n=13$ ; mCldn17#0602  $2,3 \pm 0,3$ ;  $n=6$ ). Daraus ergibt sich, dass die Claudin-17-Proteine der Maus und des Menschen gleiche Eigenschaften aufweisen und einen Kanal für Anionen wie Chlorid, jedoch nicht für Kationen bilden.

In den Mutanten Cldn17R56A, Cldn17R59A und Cldn17R61A wurden die positiven Ladungen der Arginine (R), die sich zwischen den konservierten Cysteinen der Konsensussequenz befinden, durch die Aminosäure Alanin (A), welche eine ungeladene Seitenkette trägt, neutralisiert. An diesen Positionen unterscheidet sich die Sequenz des humanen und murinen Claudin-17, welches keine geladenen Aminosäuren in der Sequenz zwischen den Cysteinen (C54 und C64) trägt. Zusätzlich wurde die Mutante R56T erzeugt, die ebenfalls die positive Ladung des Arginins an Position 56 neutralisiert. Es wurde die Aminosäure Threonin (T) verwendet, die ein größeres Molekulargewicht als Alanin besitzt.

Überexpressionsklone dieser Mutanten wurden ebenfalls zur Messung von Dilutionspotentialen in die Ussing-Kammer eingebaut.

Das Verhältnis der Permeabilitäten für Chlorid- und Natriumionen betrug für Cldn17R56A#12  $1,2 \pm 0,1$  ( $n=8$ ,  $p=0,13$  n. s.), für Cldn17R56T#3  $1,2 \pm 0,1$  ( $n=6$ ,  $p=0,13$  n. s.), für Cldn17R59A#1003  $1,9 \pm 0,1$  ( $n=9$ ,  $p=0,02$ ) und für Cldn17R61A#0305  $1,2 \pm 0,1$  ( $n=9$ ,  $p=0,19$  n. s.). Alle Mutanten zeigten demnach eine deutliche Anionenselektivität und verhielten sich wie das humane und murine Claudin-17 (Abb. 26). Die Mutante R59A zeigte dabei ein signifikant höheres  $P_{Cl}/P_{Na}$ -Verhältnis, befand sich dabei im Rahmen der bereits publizierten  $P_{Cl}/P_{Na}$ -

Verhältnisse, die für weitere hCldn17-Klone gemessen wurden (Krug et al., 2012). Die positiven Ladungen der Arginine an den Positionen 56, 59 und 61 im humanen Claudin-17 spielen demnach keine Rolle für die Ladungselektivität der Anionenpore. Es war bei der Aminosäuresubstitution nicht von Bedeutung, ob Arginin an Position 56 durch Alanin oder durch die größere und einer Hydroxylgruppe ausgestattete (und dadurch polare) Aminosäure Threonin ersetzt wurde. Beide Formen behielten die Anionenselektivität des Claudin-17 bei.

Der transepitheliale Widerstand der MDCK C7-Zellen mit murinem Claudin-17 und den verschiedenen mutierten Claudin-17-Proteinen war tendenziell höher als in hCldn17-transfizierten Zellen (TER [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]: mCldn17#0602:  $1408,1 \pm 168,1$  n= 6; p= 0,06 n. s.; Cldn17R56A#12:  $1211,9 \pm 168,3$ ; n= 8; p= 0,42 n. s.; Cldn17R56T#3:  $1034,2 \pm 72,8$ ; n= 6; p= 0,56 n. s.; Cldn17R61A#0305:  $1352,9 \pm 206,2$ ; n= 9; p= 0,42 n. s.), für die Mutante Cldn17R59A war der Anstieg signifikant (Cldn17R59A#1003:  $1322,3 \pm 73,8$ ; n= 9; p= 0,0075). Diese mäßige Erhöhung des transepithelialen Widerstands könnte darauf hindeuten, dass sowohl das murine Claudin-17 als auch die einzelnen Punktmutationen im Vergleich zum humanen Wildtyp-Claudin-17 eine geringere Leitfähigkeit als Anionenpore besitzen.

Wurden die Einzelpermeabilitäten für Natrium und Chlorid aus den Dilutionspotentialmessungen berechnet, zeigten sich für das murine Claudin-17 und die Mutante Cldn17R59A Besonderheiten im Vergleich zu dem humanen Claudin-17. Zwar wiesen sowohl mCldn17 als auch Cldn17R59A eine erhöhte Permeabilität für Chlorid im Vergleich zur vektortransfizierten Kontrolle auf, die Permeabilität für Chlorid des humanen Cldn17 war jedoch signifikant höher ( $P_{\text{Cl}}[10^{-3}\text{cm/h}]$ : Vektorkontrolle  $2,0 \pm 0,2$  n= 13; hCldn17#10  $4,1 \pm 0,2$  n= 9; mCldn17#0602  $2,9 \pm 0,3$  n= 6 und p= 0,02). Die Permeabilitäten für Chlorid der weiteren Claudin-17-Mutanten unterschieden sich nicht signifikant von der des humanen Claudin-17 ( $P_{\text{Cl}}[10^{-3}\text{cm/h}]$ : Cldn17R56A#12  $3,7 \pm 0,6$  n= 8 und p= 0,5; Cldn17R56T#3  $3,7 \pm 0,3$  n= 6 und p= 0,6; Cldn17R61A#0305  $3,4 \pm 0,6$  n= 9 und p= 0,6), waren tendenziell etwas geringer aufgrund des größeren transepithelialen Widerstands.

Die Permeabilität für Natrium war außer in dem Klon Cldn17R59A#1003 gegenüber der des hCldn17 unverändert ( $P_{\text{Na}}[10^{-3}\text{cm/h}]$ : Vektorkontrolle  $2,3 \pm 0,2$  n= 13 und p= 0,2; hCldn17#10  $4,1 \pm 0,2$  n= 9; mCldn17#0602  $2,3 \pm 0,3$ ; n= 6 und p= 0,5; Cldn17R56A#12  $3,1 \pm 0,6$  n= 8 und p= 1,5; Cldn17R56T#3  $3,1 \pm 0,3$  n= 6 und p= 2,0; Cldn17R59A#1003  $1,9 \pm 0,2$  n= 9 und p= 0,008; Cldn17R61A#0305  $2,9 \pm 0,5$  n= 9 und p= 0,9). Die geringe Permeabilität für Natrium, die die Mutante Cldn17R59A zeigte, war dabei sogar geringfügig niedriger als in vektortransfizierten Kontrollen und trug somit zu der großen Präferenz für Anionen bei, die durch das Verhältnis  $P_{\text{Cl}}/P_{\text{Na}}$  ausgedrückt wird.

### **N-terminale Hälfte des ECL1: R31, E44, R45 und E48**

In der N-terminalen Hälfte des ersten extrazellulären Loop befinden sich je zwei positiv und zwei negativ geladene Aminosäuren. Die Position 31 ist hoch konserviert und in fast allen Clau-

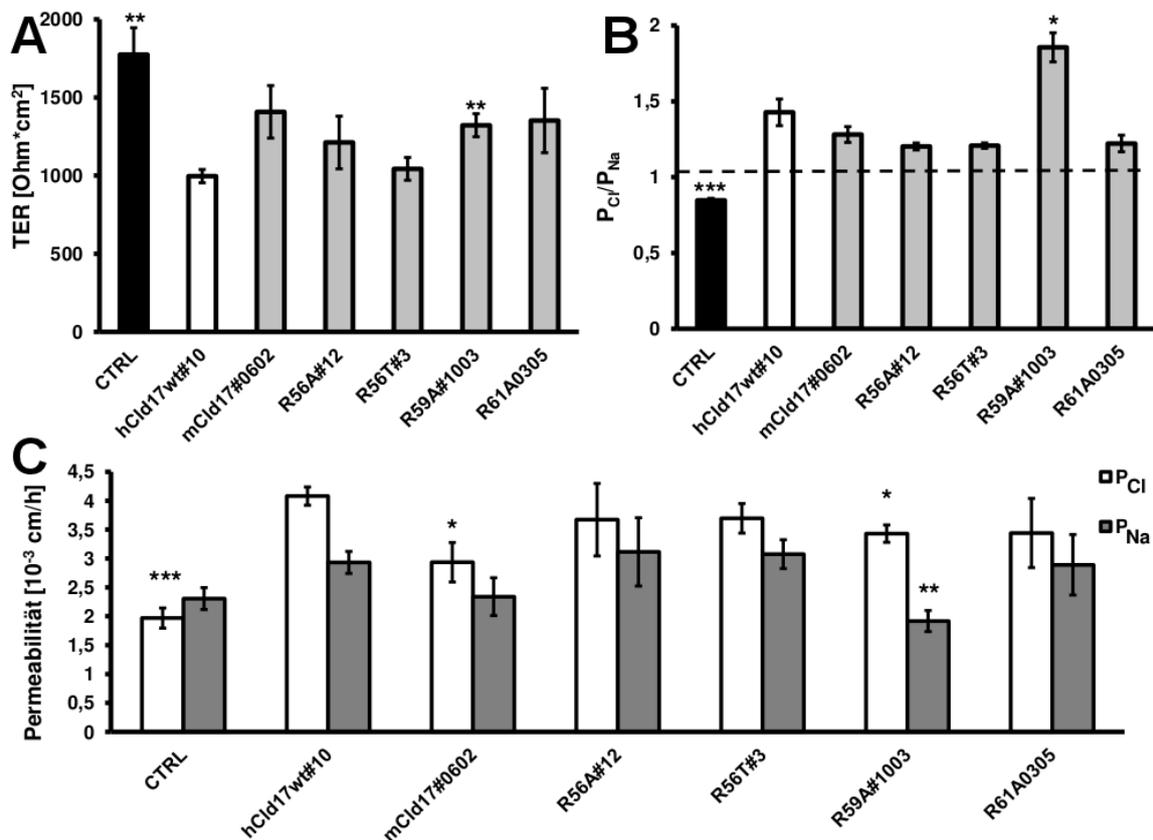


Abbildung 26: **Dilutionspotentialmessungen für Natrium und Chlorid nach Überexpression von mCldn17, Cldn17R56A, Cldn17R56T, Cldn17R59A und Cldn17R61A in MDCK C7-Zellen.** Elektrophysiologische Messungen an den Überexpressionsklonen mit murinen Claudin-17 und den Mutanten R56A/T, R59A und R61A des humanen Claudin-17. **A** Der transepitheliale Widerstand, **B** das Verhältnis  $P_{Cl}/P_{Na}$  und **C** die absoluten Permeabilitäten für Natrium und Chlorid ergaben jeweils anionenselektive Poreneigenschaften, mit Leervektor transfizierte Kontrollzellen zeigten dagegen abdichtende Funktion und Kationenselektivität (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  und \*\*\*  $p < 0,001$ ).

dinen (außer Claudin-2, vgl. Abb. 5) befindet sich hier ein Arginin. Die benachbarten Positionen 44 und 45 tragen unterschiedliche Ladungen (E44 und R45). Durch Neutralisation (Substitution durch Alanin) jeweils einer Ladung sollte deren Bedeutung für die Claudin-17-Pore bestimmt werden. Die Aminosäure Glutaminsäure, welche sich an Position 48 befindet, wurde durch Mutagenese zu Glutamin (E48Q) nur wenig verändert, zusätzlich wurde auch eine Ladungsumkehr zu Lysin (E48K) durchgeführt. Mit allen Mutanten wurde in Ussing-Kammern Dilutionspotentialmessungen durchgeführt, um etwaige Veränderungen des transepithelialen Widerstandes und des Verhältnisses der Ionenpermeabilität zu detektieren.

Hierbei zeigte sich, dass lediglich der Aminosäureaustausch an Position R45 ohne Auswirkung auf die Ionenselektivität von Claudin-17 bleibt. MDCK C7-Zellen, die Cldn17R45A exprimierten, zeigten wie MDCK C7-Zellen nach Überexpression des humanen Wildtyp-Claudin-17 Anionenselektivität ( $P_{Cl}/P_{Na}$  Cldn17R45A#0413  $1,3 \pm 0,1$   $n=9$  und  $p=0,4$ ). Dabei war die absolute Permeabilität für Natrium unverändert ( $P_{Na}[10^{-3}cm/h]$ : Cldn17R45A#4013  $2,5 \pm 0,6$   $n=9$  und  $p=1,8$ ), die Permeabilität für Chlorid war gegenüber der vektortransfizierten Kontrolle erhöht, erreichte jedoch nicht das Niveau des Wildtyp-Claudin-17 ( $P_{Cl}[10^{-3}cm/h]$ : Cldn17R45A#0413  $3,0 \pm 0,6$   $n=9$  und  $p=0,08$ ), ohne dass die Unterschiede zu wtCldn17 statistische Signifikanz erreichten. Die tendenziellen Unterschiede der Einzelpermeabilitäten waren dabei möglicherweise eine Folge des größeren transepithelialen Widerstands ( $TER [\Omega \cdot cm^2]$ : Cldn17R45A#0413  $1561,4 \pm 196,1$   $n=9$  und  $p=0,05$ ). Der signifikant erhöhte transepitheliale Widerstand könnte darauf hindeuten, dass die Leitfähigkeit der Claudin-17-Pore durch die Mutation R45A reduziert war. Allerdings könnte auch eine klonale Variation eine Rolle spielen, da weitere klonale Linien mit der Mutation Cldn17R45A niedrigere Widerstandswerte aufwiesen, das  $P_{Cl}/P_{Na}$ -Verhältnis unveränderte Anionenselektivität anzeigte ( $TER [\Omega \cdot cm^2]$ : Cldn17R45A#0412  $1266,0 \pm 185,0$   $n=7$ ;  $P_{Cl}/P_{Na}$  Cldn17R45A#0412  $1,5 \pm 0,1$   $n=7$ ).

Unmittelbar benachbart zu R45 befindet sich die negativ geladene Aminosäure Glutaminsäure (E44). Eine Ladungsneutralisation durch Aminosäuresubstitution zu Alanin (E44A) bewirkte eine Reduktion der parazellulären Leitfähigkeit (Reziprok des transepithelialen Widerstands,  $TER[\Omega \cdot cm^2]$ : Cldn17E44A#0405  $1778,8 \pm 134,7$   $n=6$  und  $p=0,0006$ ), sowie ein Verlust der Anionenselektivität des Claudin-17. Das  $P_{Cl}/P_{Na}$ -Verhältnis betrug  $0,85 \pm 0,06$  ( $n=6$  und  $p=0,001$ ). Das gegenüber dem wtClaudin-17 veränderte Permeabilitätsverhältnis beruhte auf einer signifikant geringeren Permeabilität für Chlorid ( $P_{Cl}[10^{-3}cm/h]$ : Cldn17E44A#0405  $1,8 \pm 0,2$   $n=6$  und  $p=0,0004$ ); die Permeabilität für Natrium war unverändert ( $P_{Na}[10^{-3}cm/h]$ : Cldn17E44A#0405  $2,2 \pm 0,2$   $n=6$  und  $p=0,07$ ).

Ebenso wie die Mutante E44A zeigten auch die zwei weiteren geladenen Aminosäuren Arginin 31 und Glutaminsäure 48 in der N-terminalen Hälfte des ECL1 nach Aminosäuresubstitution Einfluss auf die Ionenselektivität. Das  $P_{Cl}/P_{Na}$ -Verhältnis zeigte für R31E sowie für E48K und E48Q eine leichte Präferenz für Kationen an ( $P_{Cl}/P_{Na}$ : Cldn17R31E#0108  $0,97 \pm 0,01$   $n=4$  und  $p=0,01$ ; Cldn17E48K#20  $0,92 \pm 0,01$   $n=19$  und  $p=0,0004$ ; Cldn17E48Q#21

0,95 ± 0,02 n= 8 und p= 0,0004). Dies deutet darauf hin, dass die Anionenselektivität von Claudin-17 nach Substitution der Aminosäuren an diesen Positionen verloren ging. An Position 48, an der sich die Aminosäure Glutaminsäure befindet, spielte es keine Rolle, ob der Aminosäureaustausch nur geringfügig ausfiel, d. h. ein Austausch der Hydroxylgruppe durch eine Aminogruppe (Substitution von Glutaminsäure zu Glutamin) oder ob eine Ladungsumkehr zur positiv geladenen Aminosäure Lysin erfolgte. Das veränderte  $P_{Cl}/P_{Na}$ -Verhältnis gegenüber des Wildtyp-Claudin-17 kam jeweils durch eine signifikant geringere Permeabilität für Chlorid zustande ( $P_{Cl}[10^{-3}cm/h]$ : Cldn17R31E#0108 2,8 ± 0,3 n= 4 und p= 0,004; Cldn17E48K#20 2,5 ± 0,2 n= 19 und p= 0,0005; Cldn17E48Q#21 2,8 ± 0,3 n= 8 und p= 0,006), während die Permeabilität für Natrium unverändert blieb ( $P_{Na}[10^{-3}cm/h]$ : Cldn17R31E#0108 2,9 ± 0,3 n= 4 und p= 1,8; Cldn17E48K#20 2,7 ± 0,2 n= 19 und p= 1,6; Cldn17E48Q#21 2,9 ± 0,3 n= 8 und p= 1,0). Der transepitheliale Widerstand der klonalen Linien Cldn17R31E, E48K und E48Q war gegenüber MDCK C7-Zellen, die wtCldn17 exprimieren erhöht, im Falle der Mutationen der Glutaminsäure jedoch nicht signifikant (TER [ $\Omega \cdot cm^2$ ]: Cldn17R31E#0108 1255,0 ± 139,2 n= 4 und p= 0,04; Cldn17E48K#20 1551,8 ± 151,8 n= 19 und p= 0,06; Cldn17E48Q#21 1292,1 ± 126,4 n= 8 und p= 0,07).

### Die Position K65

Wie beschrieben spielt die Position 65 in allen bisher untersuchten kanalbildenden Claudinen eine bedeutende Rolle für die Ionenselektivität und wird häufig als Selektivitätsfilter bezeichnet. In Rahmen dieser Arbeit wurden Aminosäuresubstitutionen durchgeführt, bei denen die positive Ladung des Lysin durch die neutrale Aminosäure Alanin (K65A) ausgetauscht wurde. Zudem wurde die Ladung umgekehrt - Lysin wurde durch Glutaminsäure (K65E) ersetzt. Schließlich wurde ein Aminosäureaustausch unter Beibehaltung der Ladung vorgenommen. Dazu wurde die ebenfalls positiv geladene Aminosäure Arginin (K65R) verwendet, die ein größeres Molekulargewicht aufgrund einer größeren Seitenkette besitzt.

Durch Dilutionspotentialmessungen in Ussing-Kammern wurde der Effekt der Aminosäuresubstitutionen auf die Eigenschaften von Claudin-17 analysiert. Dabei zeigte sich für alle drei Mutanten eine Verschiebung des  $P_{Cl}/P_{Na}$ -Verhältnisses hin zu Kationenselektivität. Nach Ladungsneutralisation im Klon Cldn17K65A#1103 betrug das  $P_{Cl}/P_{Na}$ -Verhältnis 0,98 ± 0,004 (n= 4 und p= 0,006), nach Ladungsumkehr im Klon Cldn17K65E#0604 betrug das  $P_{Cl}/P_{Na}$ -Verhältnis 0,74 ± 0,04 (n= 7 und p= 0,0002). Auch nach Aminosäuresubstitution unter Beibehaltung der Nettoladung wurde ein  $P_{Cl}/P_{Na}$ -Verhältnis kleiner 1 (und damit kationenselektiv) gemessen, für den Klon Cldn17K65R#1205 war  $P_{Cl}/P_{Na}$  0,97 ± 0,01 (n= 12 und p= 0,0003). Dabei verursacht die Ladungsumkehr zur negativ geladenen Glutaminsäure die größte Veränderung im  $P_{Cl}/P_{Na}$ -Verhältnis zu einer stärkeren Kationenselektivität, während nach Ladungsneutralisation und Ladungsbeibehaltung das  $P_{Cl}/P_{Na}$ -Verhältnis knapp unter 1 sinkt. Dies deutet zum einen darauf hin, dass die Veränderungen der Claudin-17-Pore durch Einbringen einer negativen Ladung die Selektivität hin zu Kationen verstärkt, möglicherweise durch eine direkte

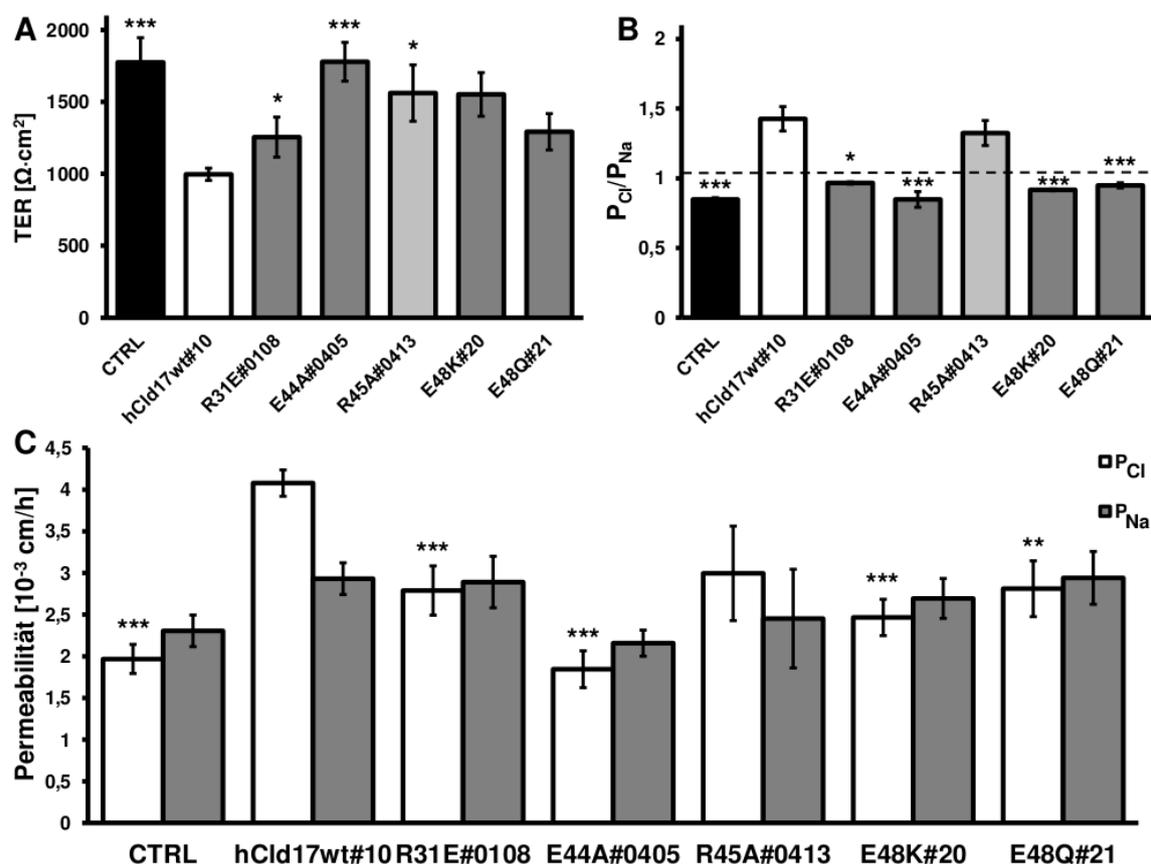


Abbildung 27: **Dilutionspotentialmessungen für Natrium und Chlorid.** Elektrophysiologische Messungen an den Überexpressionsklonen mit den Claudin-17-Mutanten R31E, E44A, R45A, E48K und E48Q. **A** Der transepitheliale Widerstand, **B** das Verhältnis  $P_{\text{Cl}}/P_{\text{Na}}$  und **C** die absoluten Permeabilitäten für Natrium und Chlorid ergaben lediglich für die Mutante R45A anionenselektive Poreneigenschaften wie in wtClaudin-17. Die weiteren Mutanten und mit Leervektor transfizierte Kontrollzellen zeigten keine Veränderung des  $P_{\text{Cl}}/P_{\text{Na}}$ -Verhältnisses, was zeigte, dass diese Mutanten des Claudin-17 keine Anionenpore ausbilden (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  und \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Interaktion der geladenen Seitenkette mit dem passierenden Ion. Zum anderen lassen die Veränderungen des  $P_{Cl}/P_{Na}$ -Verhältnis durch die Mutationen K65A und K65R die Vermutung zu, dass auch sterische Effekte der Position 65 zur Ladungsselektivität beitragen.

Wegen des großen Einfluss dieser Aminosäureposition auf die Eigenschaften des Claudin-17 wurden Dilutionspotentialmessungen mit modifizierten Ringerlösungen durchgeführt um die Permeabilität für die Anionen Nitrat, Thiocyanat und Pyruvat im Verhältnis zu Natrium zu bestimmen.

Das Permeabilitätsverhältnis  $P_{NO_3}/P_{Na}$  betrug in vektortransfizierten Kontrollzellen  $0,93 \pm 0,008$  (Vec#8,  $n=12$  und  $p=0,0004$ ) und war damit signifikant geringer als in MDCK C7-Zellen, die wtCldn17 exprimierten ( $P_{NO_3}/P_{Na}$ : Cldn17#10  $1,6 \pm 0,04$   $n=4$ ; Abb. 28C). Die verschiedenen Mutationen des Lysin 65 verursachten eine gegenüber wtCldn17 signifikante Reduktion des  $P_{NO_3}/P_{Na}$ -Verhältnis: Cldn17K65A#1103  $1,3 \pm 0,03$  ( $n=6$  und  $p=0,0002$ ), Cldn17K65E#0604  $0,97 \pm 0,01$  ( $n=12$  und  $p=0,0002$ ) und Cldn17K65R#1205  $1,15 \pm 0,03$  ( $n=12$  und  $p=0,0003$ ). Auffällig ist, dass die Ladungsumkehr K65E den größten Effekt verursachte, was darauf hindeutet, dass auch Nitrationen wie Chlorid mit der positiven Ladung wechselwirken. Die Mutationen K65A und K65R, die die positive Ladung neutralisieren bzw. konservieren, übten einen geringeren Einfluss auf die Nitratpermeabilität aus.

Dilutionspotentialmessungen mit dem Anion Thiocyanat als Gegenion zu Natrium wurden durchgeführt, da Thiocyanat aufgrund seiner atomaren Zusammensetzung keine Kugelform annimmt, über der die negative Ladung gleichmäßig verteilt ist, sondern ein lineares Molekül darstellt. Die negative Ladung ist im NCS<sup>-</sup>-Molekül annähernd gleichmäßig zwischen dem Stickstoff- und Schwefelatom verteilt. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abb. 28D dargestellt und ergaben folgende  $P_{SCN}/P_{Na}$ -Verhältnisse: Vec#8  $1,1 \pm 0,09$  ( $n=2$  und  $p=0,0002$ ), Cldn17#10  $1,9 \pm 0,05$  ( $n=6$ ), Cldn17K65A#1103  $1,4 \pm 0,06$  ( $n=6$  und  $p=0,0002$ ), Cldn17#K65E#0604  $1,1 \pm 0,02$  ( $n=6$  und  $p=0,0003$ ) und Cldn17K65R#1205  $1,4 \pm 0,04$  ( $n=6$  und  $p=0,0004$ ). Wie schon zuvor bewirkte die Mutation zur Ladungsumkehr (K65E) die größte Veränderung des  $P_{SCN}/P_{Na}$ -Verhältnisses, während die Mutationen K65A und K65R ebenfalls signifikante Reduzierungen des  $P_{SCN}/P_{Na}$ -Verhältnisses verursachten, dieses jedoch nicht wie die Mutation K65E auf das Niveau der Kontrollzellen änderten. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine negative Ladung durch den Aminosäureaustausch K65E einen größeren Einfluss auf die Thiocyanatpermeabilität ausübt, als die Aminosäuresubstitutionen K65A und K65R, die vor allem stereochemische Veränderungen in der Claudin-17-Pore verursachen.

Weiterhin wurden Dilutionspotentialmessungen mit dem organischen Anion Pyruvat durchgeführt. Abbildung 28E zeigt die Ergebnisse dieser Messungen; die  $P_{Pyr}/P_{Na}$ -Verhältnisse ergaben: Vec#8  $0,8 \pm 0,004$  ( $n=2$  und  $p=0,2$ ), Cldn17#10  $1,0 \pm 0,07$  ( $n=4$ ), Cldn17K65A#1103  $0,7 \pm 0,02$  ( $n=6$  und  $p=0,0074$ ), Cldn17#K65E#0604  $0,6 \pm 0,09$  ( $n=6$  und  $p=0,002$ ) und Cldn17K65R#1205  $0,7 \pm 0,02$  ( $n=6$  und  $p=0,005$ ). Die Quotienten  $P_{Pyr}/P_{Na}$  waren für alle Klone 1 oder kleiner 1, was darauf hindeutet, dass Pyruvat nur schwach die Claudin-17-Pore

passieren kann. Die verschiedenen Lysin 65-Mutanten verursachten jedoch eine leichte Reduzierung des  $P_{\text{Pyr}}/P_{\text{Na}}$ -Verhältnisses, so dass auch der Einfluss der Aminosäure Lysin 65 für dieses Anion gezeigt wurde. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Mutationen ist dabei weniger deutlich als bei den Anionen Nitrat oder Thiocyanat. Dies könnte an den unterschiedlichen Molekulargewichten (Nitrat 62 Da; Thiocyanat 58 Da; Pyruvat 88 Da), an Unterschieden in der Molekülgeometrie (Nitrat: trigonal planar, Thiocyanat: linear, Pyruvat: unregelmäßige Form) und der verschiedenen Verteilung der negativen Ladung über dem Molekül liegen. Auffällig ist jedoch, dass die Abstufung für die verschiedenen Anionen mit der Expressionsstärke der unterschiedlichen Mutanten korreliert.

Die Widerstandsmesswerte der einzelnen Klonen sind in Abbildung 28A dargestellt. Die Klone Cldn17K65A#1103 (TER [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]:  $1054,8 \pm 108,9$   $n=22$  und  $p=0,5$ ) und Cldn17K65E#0604 (TER [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]:  $1156,9 \pm 67,0$   $n=31$  und  $p=0,1$ ) zeigten keine veränderten transepithelialen Widerstände gegenüber des wtClaudin-17 (TER [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]:  $969,6 \pm 61,1$   $n=23$ ). Die transepithelialen Widerstände der Kontrollzellen und des Klons Cldn17K65R#1205 waren hingegen signifikant erhöht (TER [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]: Vec#8  $1533,1 \pm 122,2$   $n=20$  und  $p=0,0003$ ; Cldn17K65R#1205  $1979,4 \pm 133,7$   $n=42$  und  $p=0,0004$ ).

### **ECL2: Y149 und H154**

Der Einfluss zweier Aminosäuren im ECL2 auf die Permeabilität für Natrium und Chlorid wurde ebenfalls analysiert. Die in vielen Claudinen konservierte Aminosäure Tyrosin an Position 149 und Histidin an Position 154 wurden durch Alanin ersetzt.

In Ussing-Kammer-Experimenten wurde der Einfluss dieser Aminosäuresubstitutionen auf die Permeabilität für Natrium und Chlorid mit Hilfe von Dilutionspotentialmessungen untersucht. Es zeigte sich, dass beide Mutationen zu einer Erhöhung des transepithelialen Widerstands führen (TER [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]: Cldn17Y149A#0814  $2232,0 \pm 294,1$   $n=4$  und  $p=0,0003$ ; Cldn17H154A#0305  $1665,5 \pm 147,7$   $n=6$  und  $p=0,0004$ ; Abb. 29), was darauf hindeutet, dass die Leitfähigkeit der Claudin-17-Pore verringert ist. MDCK C7-Zellen, die Cldn17Y149A exprimieren, zeigten Anionenselektivität; das  $P_{\text{Cl}}/P_{\text{Na}}$ -Verhältnis lag bei  $1,2 \pm 0,04$  ( $n=4$  und  $p=0,18$ ) und unterschied sich nicht von dem der wtClaudin-17-exprimierenden Zellen ( $P_{\text{Cl}}/P_{\text{Na}} 1,4$ ; s. o.). Das  $P_{\text{Cl}}/P_{\text{Na}}$ -Verhältnis nach Mutation H154A war  $0,9 \pm 0,02$  (Cldn17H154A#0305:  $n=6$  und  $p=0,001$ ) und zeigte wie die Kontrollen Kationenselektivität an.

Entsprechend des erhöhten transepithelialen Widerstands waren die absoluten Permeabilitäten von Natrium und Chlorid verringert. Im Überexpressionsklon Cldn17H154A#0305 war die Permeabilität für Natrium unverändert, die Permeabilität für Chlorid reduziert ( $P_{\text{Na}} [10^{-3} \text{cm/h}]$ : Cldn17H154A#0305  $2,3 \pm 0,2$   $n=6$  und  $p=0,08$ ;  $P_{\text{Cl}} [10^{-3} \text{cm/h}]$ : Cldn17H154A#0305  $2,1 \pm 0,2$   $n=6$  und  $p=0,0003$ ). Gegenüber dem Überexpressionsklon mit wtClaudin-17 waren für Cldn17Y149A#0814 die Chlorid- und die Natriumpermeabilität reduziert ( $P_{\text{Na}} [10^{-3} \text{cm/h}]$ : Cldn17Y149A#0814  $1,5 \pm 0,2$   $n=4$  und  $p=0,002$ ;  $P_{\text{Cl}} [10^{-3} \text{cm/h}]$ : Cldn17Y149A#0814  $1,8 \pm 0,2$   $n=4$

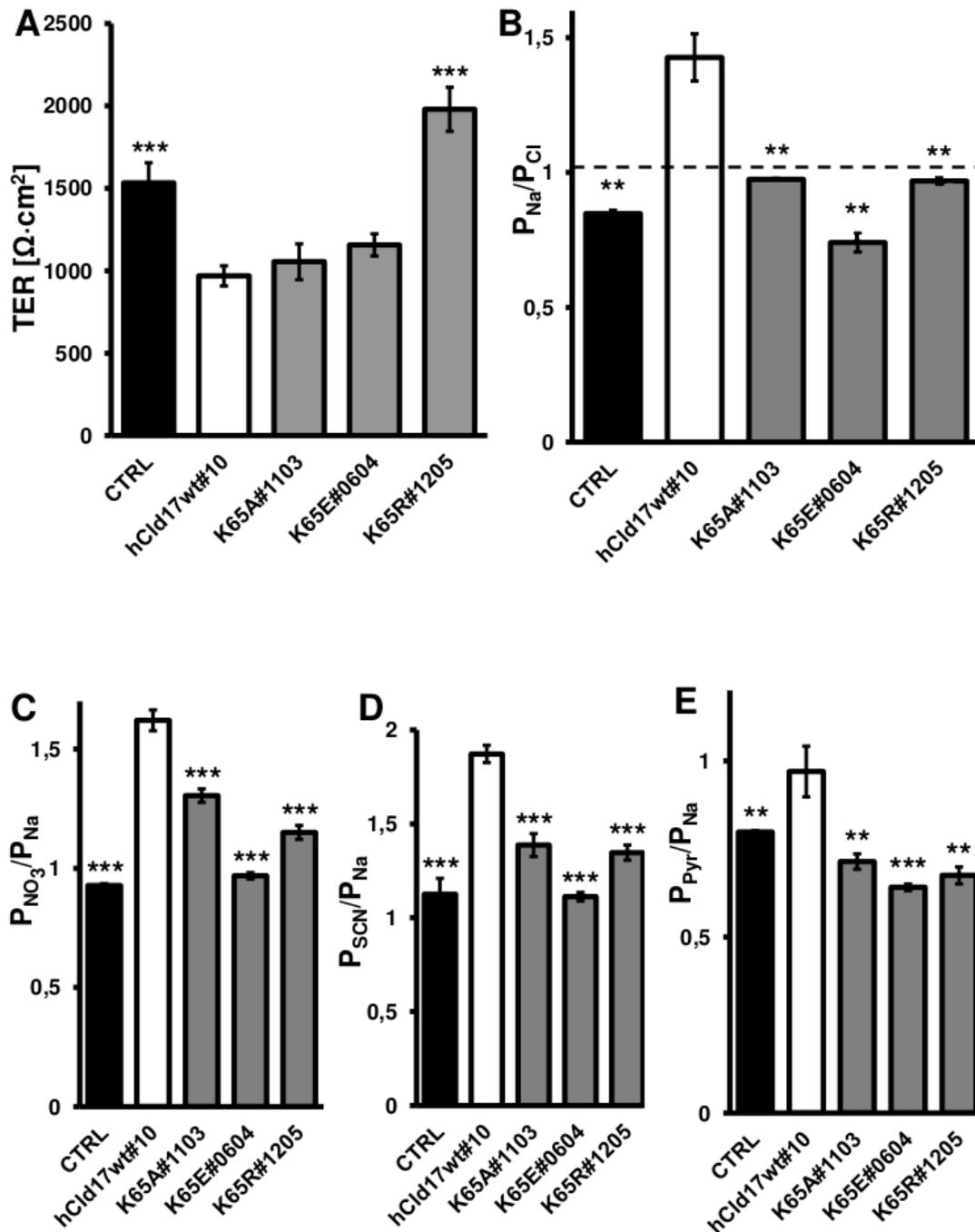


Abbildung 28: **Dilutionspotentialmessungen für Natrium und Chlorid, sowie die Anionen Nitrat, Thiocyanat und Pyruvat.** Elektrophysiologische Messungen an den Überexpressionsklonen mit den verschiedenen Claudin-17-Mutanten an Position K65: K65A, K65E und K65R. **A** Der transepitheliale Widerstand war für die Mutanten K65A und K65E gegenüber des wtClaudin-17 unverändert, die Mutation K65R führte zu einem erhöhten TER. **B** Das Verhältnis  $P_{\text{Cl}}/P_{\text{Na}}$  war für alle Mutanten der Position K65 reduziert. Die Ladungsumkehr K65E erzeugte die stärkste Verringerung des Verhältnis  $P_{\text{Cl}}/P_{\text{Na}}$ . Die Permeabilitätsverhältnisse **C**  $P_{\text{NO}_3}/P_{\text{Na}}$  **D**  $P_{\text{SCN}}/P_{\text{Na}}$  und **E**  $P_{\text{Pyr}}/P_{\text{Na}}$  zeigten ebenfalls eine Verringerung im Vergleich mit wtClaudin-17 an. Entsprechend der Beobachtung im Verhältnis  $P_{\text{Cl}}/P_{\text{Na}}$  sorgte die Mutante K65E jeweils für die größte Änderung (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  und \*\*\*  $p < 0,001$ ).

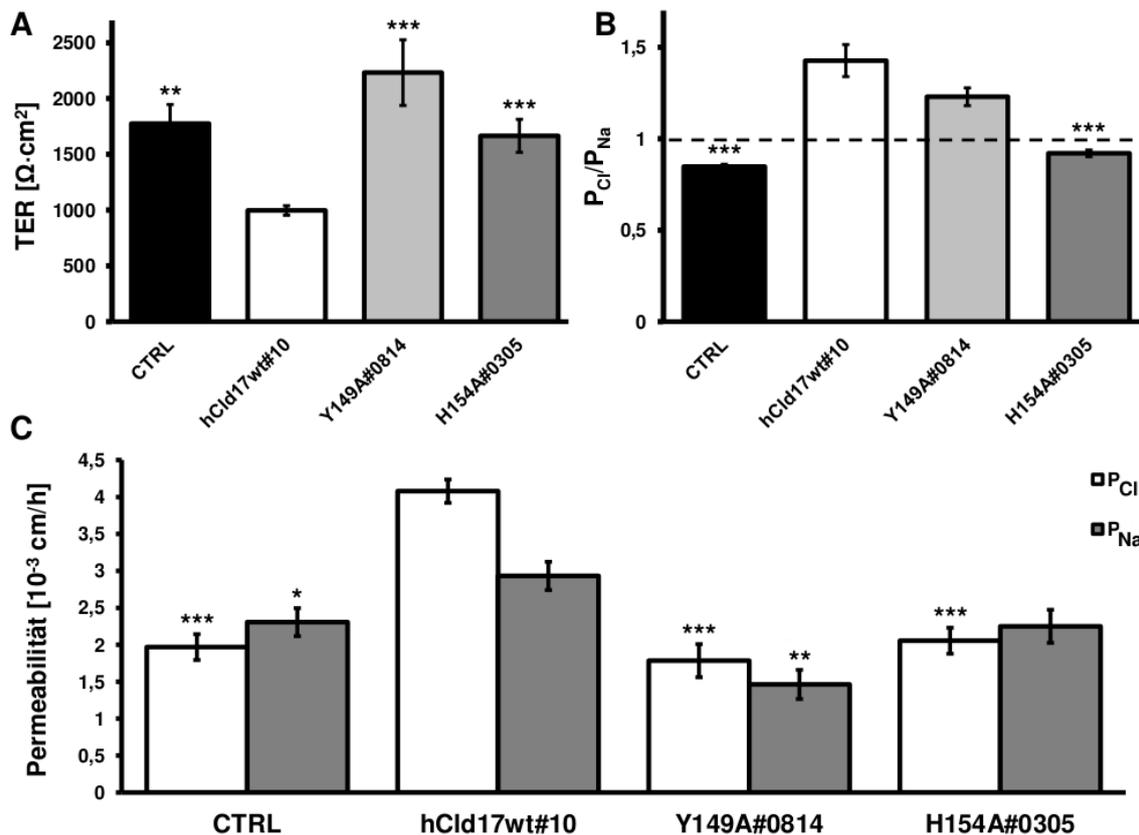


Abbildung 29: **Dilutionspotentialmessungen für Natrium und Chlorid.** Elektrophysiologische Messungen an den Überexpressionsklonen mit den Claudin-17-Mutanten des ECL2: Y149A und H154A. **A** Der transepitheliale Widerstand war gegenüber des wtClaudin-17 erhöht, **B** das Verhältnis  $P_{\text{Cl}}/P_{\text{Na}}$  zeigte für Y149A Anionenselektivität, für H154A Kationenselektivität an, **C** die absoluten Permeabilitäten für Natrium und Chlorid ergaben niedrigere Werte für die Mutanten Y149A und H154A als für wtClaudin-17, Y149A wies dabei eine höhere Permeabilität für Chlorid als für Natrium auf (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  und \*\*\*  $p < 0,001$ ).

und  $p = 0,0002$ ). Der hohe transepitheliale Widerstand und die verringerte Permeabilität für Natrium legen nahe, dass es sich um sekundäre Effekte handelt. Allerdings konnte in einem zweiten unabhängigen Überexpressionsklon mit der Claudin-17-Mutante Y149A ebenfalls ein  $P_{\text{Cl}}/P_{\text{Na}}$ -Verhältnis größer 1 (siehe Tabelle in 10.1) gemessen werden, was den Erhalt der Anionenselektivität bestätigt.

### 3.1.2.3 Einfluss der Mutationen im ECL2 auf den Fluoreszeinflux

Die Permeabilität für den parazellulären Größenmarker Fluoreszein (332 Da) war nach Claudin-17-Überexpression nicht verändert (Krug et al., 2012). Die Mutationen des ECL2 waren jedoch von Interesse, da bekannt war, dass Mutationen im ECL2 von Claudin-5 für Veränderungen der Permeabilität von Größenmarkern aufgrund gestörter Fähigkeit zu *trans*-Interaktion verantwortlich sind (Piehl et al., 2010).

In Fluxmessungen in Ussing-Kammern konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zu

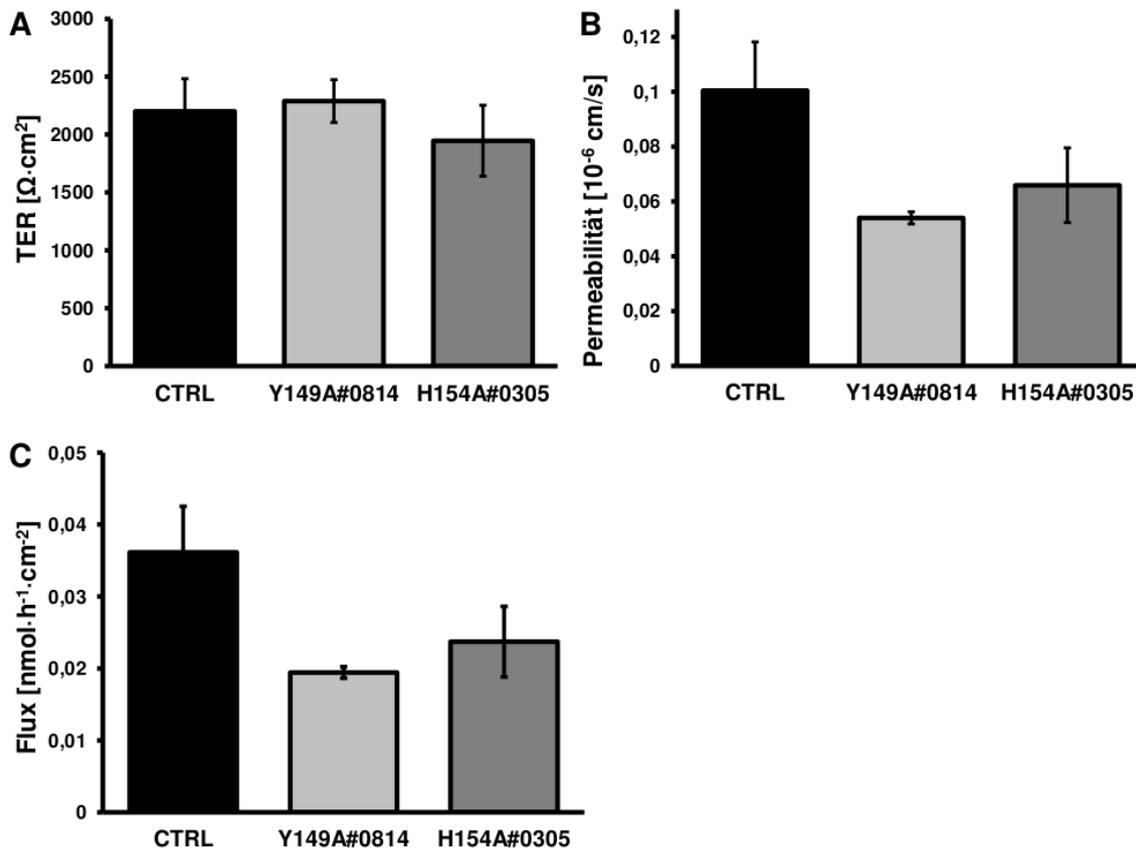


Abbildung 30: **Permeabilität des parazellulären Fluxmarkers Fluoreszein.** Elektrophysiologische Messungen wurden unter Klemmstrombedingungen durchgeführt. **A** Der transepitheliale Widerstand (TER) der Mutanten des ECL2 war gegenüber mit Leervektor transfizierten Kontrollzellen nicht signifikant verändert. **B** Die Fluoreszeinpermeabilität und **C** der Fluoreszeinflux war gegenüber Kontrollen unverändert, tendenziell sogar verringert. Dies ist in Übereinstimmung mit dem Befund, dass Claudin-17 keinen Kanal für große Solute bildet (Krug et al., 2012).

vektortransfizierten Kontrollen festgestellt werden. Tendenzuell waren die absolute Permeabilität ( $P_{\text{Fl}}$  [ $10^{-6} \text{ cm/s}$ ]: CTRL  $0,1 \pm 0,02$   $n=7$ ; Cldn17Y149A#0814  $0,05 \pm 0,002$   $n=6$  und  $p=0,07$ ; Cldn17H154A#0305  $0,07 \pm 0,01$   $n=6$  und  $p=0,16$ ) und der Fluoreszeinflux ( $J_{\text{Fl}}$  [ $\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ]: CTRL  $0,04 \pm 0,006$   $n=7$ ; Cldn17Y149A#0814  $0,02 \pm 0,0008$   $n=6$  und  $p=0,07$ ; Cldn17H154A#0305  $0,02 \pm 0,005$   $n=6$  und  $p=0,16$ ) verringert, ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Der transepitheliale Widerstand war zwischen den verschiedenen Klonen unverändert (TER [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]: CTRL  $2200,2 \pm 282,2$   $n=7$ ; Cldn17Y149A#0814  $2288,5 \pm 185,1$   $n=6$  und  $p=0,8$ ; Cldn17H154A#0305  $1946,4 \pm 306,5$   $n=6$  und  $p=1,1$ ). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Interaktionsfähigkeit von Claudin-17 erhalten bleibt.

### 3.1.2.4 Homophile *trans*-Interaktionen des wtClaudin-17, Cldn17Y149A und Cldn17H154A

Direkte Hinweise auf die Fähigkeit zur *trans*-Interaktion von wtClaudin-17 und den Mutanten des ECL2 wurden mit Hilfe eines etablierten fluoreszenzmikroskopischen Ansatzes (Piontek

et al., 2008) gewonnen. Dazu wurde wtClaudin-17 und die beiden Mutanten des ECL2 in einen CFP-Vektor umkloniert und die Konstrukte anschließend in TJ-freie HEK293-Zellen transfiziert. Eine mögliche *trans*-Interaktion konnte mikroskopisch festgestellt werden, wenn die gemeinsame Membran benachbarter Zellen ein Fluoreszenzsignal mit doppelter Intensität besaß als ein Membranabschnitt, der nicht an eine weitere Claudin-17-exprimierende Zelle grenzte.

### **Live-Cell Imaging**

24 h nach Transfektion der HEK293-Zellen wurden diese zur Mikroskopie vorbereitet und untersucht.

Das wtClaudin-17 mit N-terminalem CFP-Tag wurde zur Plasmamembran transportiert und dort eingebaut. Es reichte sich an gemeinsamen Kontakten mit einer benachbarten Zelle an (Abb. 31A). Dies deutet darauf hin, dass Claudin-17 in der Lage ist, mit anderen Claudin-17-Molekülen in der Membran benachbarter Zellen zu interagieren. Die erzeugten Claudin-17-Mutanten Y149A und H154A waren ebenfalls in der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 31B und C) und in Membranen benachbarter Zellen angereichert. Die Fähigkeit zur *trans*-Interaktion war durch die Mutationen nicht beeinflusst, was im Einklang mit den Ergebnissen der Fluoreszenzflussmessungen ist. Die Unterschiede in den Dilutionspotentialmessungen können nicht mit Veränderungen der Interaktionsfähigkeit erklärt werden.

### **3.1.3 Einfluss endogener Claudine auf den Widerstand und die Permeabilität von Natrium- und Chloridionen**

Das MDCK C7-Zellmodell besitzt ein ausgeprägte Tight Junctions, deren Permeabilitätseigenschaften durch die endogen exprimierten Claudine bestimmt werden. Kanalbildende Claudine wie Claudin-2, Claudin-10a oder -10b werden in MDCK C7-Zellen nicht exprimiert (Amashah et al., 2005). Vorwiegend lassen sich barrierebildende Claudine im Western Blot- und auf Immunfluoreszenzebene nachweisen.

#### **3.1.3.1 Effekte von Claudin-4**

Insbesondere Claudin-4 ist hier von Interesse, da beschrieben ist, dass Claudin-4 in M1- und mIMCD3-Zellen einen parazellulären Anionenkanal bilden kann, wozu auch Claudin-8 benötigt wird (Hou et al., 2010). Dem gegenüber stehen Untersuchungen in MDCK II-Zellen, die keinen Effekt von Claudin-4 auf die parazelluläre Chloridpermeabilität beobachteten (Van Italie et al., 2001; Colegio et al., 2002). Aus diesem Grund wurde Claudin-4 in dem in dieser Arbeit verwendeten MDCK C7-Zellkulturmodell überexprimiert und bezüglich der Chloridpermeabilität untersucht. Zusätzlich wurden die hier erzeugten stabilen Überexpressionsklone zur Analyse der Lumenformation im 3D-Zellkulturmodell verwendet (vgl. 3.2).

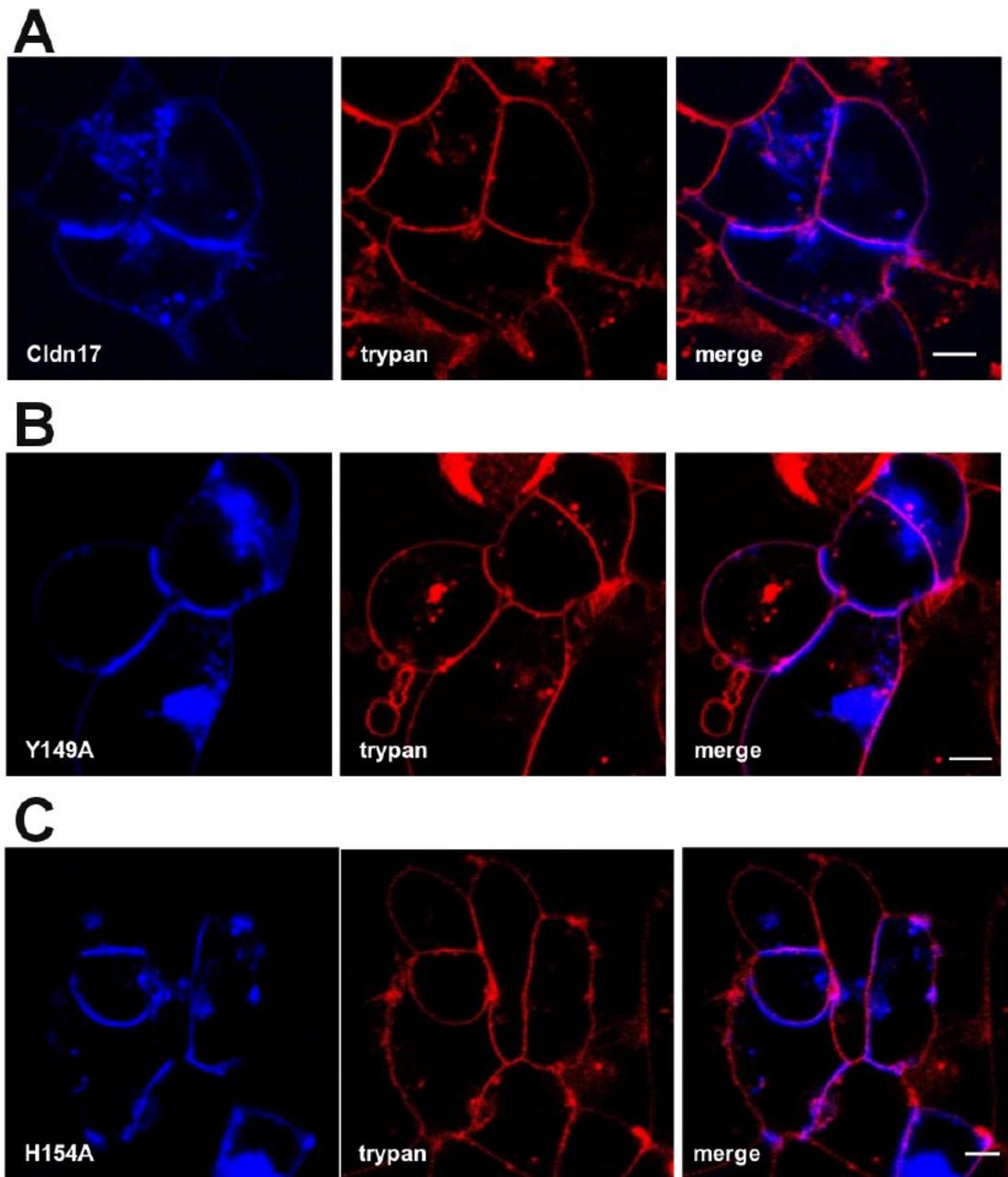


Abbildung 31: **Subzelluläre Lokalisation von Claudin-17 und Claudin-17-Mutanten.** Lebendzellfärbung von HEK293-Zellen. Balken = 5  $\mu$ m. **A** HEK293-Zellen exprimierten nach Transfektion CFP-Cldn17 (blau). Trypanblaufärbung visualisiert die Plasmamembran (rot). **B** In HEK293-Zellen wurde durch Transfektion CFP-Cldn17Y149A (blau) eingebracht. Trypanblaufärbung visualisiert die Plasmamembran (rot). **C** HEK293-Zellen exprimierten nach Transfektion CFP-Cldn17H154A (blau). Trypanblaufärbung visualisiert die Plasmamembran (rot).

### 3.1.3.1.1 Generierung stabiler Überexpressionsklone

Durch stabile Transfektion mit dem Expressionsvektor pCMV10-Cldn4 wurden Überexpressionsklone erzeugt, die hinsichtlich der Lokalisation und Expression des exogenen und endogenen Claudin-4 ausgewählt wurden (Abb. 32B).

Weiterhin wurde die Expression weiterer Tight Junction-Proteine im Vergleich mit vektortransfizierten Zellen analysiert. Dabei zeigten sich, dass barrierebildende Tight Junction-Protein Claudin-1 weniger stark exprimiert ist als in den vektortransfizierten Zellen (Abb. 32A).

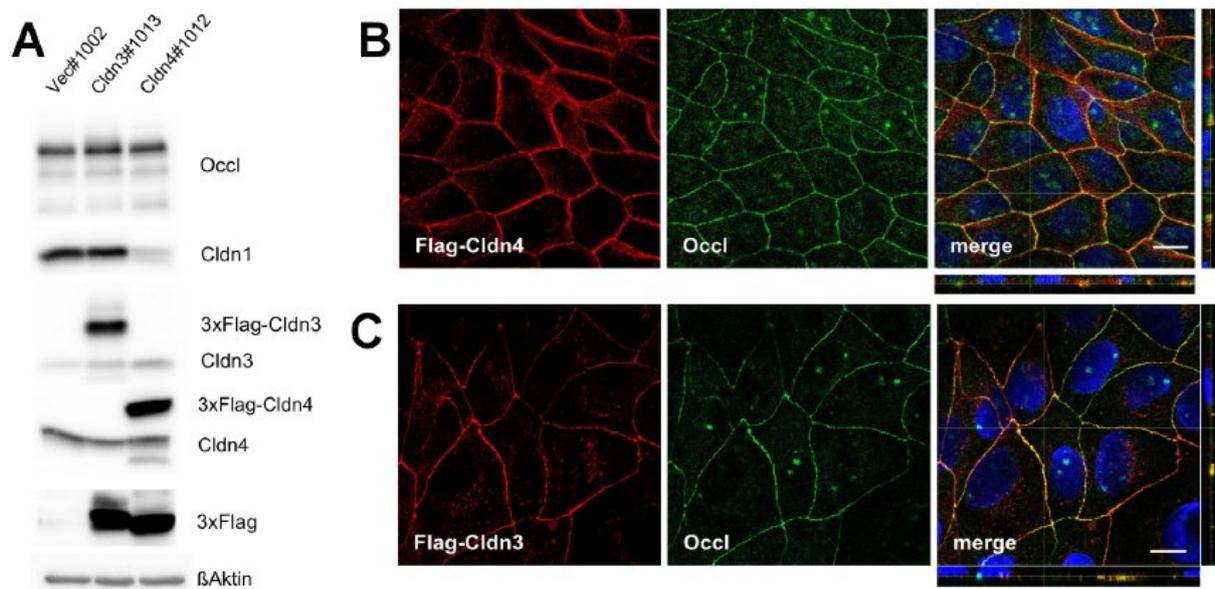


Abbildung 32: **Überexpression der bereits endogen exprimierten Claudine-3 und -4 in MDCK C7-Zellen.** **A** Western Blot-Analyse verschiedener Tight Junction-Proteine der Überexpressionsklone Cldn4#1012 und Cldn3#1013. Für Cldn4 bzw. Cldn3 existierte jeweils eine höher laufende Bande, die das 3×FLAG-getaggte Claudin darstellt und stärker exprimiert ist, als die darunter laufende endogene Form. **B** Konfokale Fluoreszenzmikroskopie der Überexpressionsklone Cldn4#1012 und Cldn3#1013. Mit Hilfe des M2-anti-FLAG-Antikörper konnte die Kolokalisation des exogenen Claudins (rot) mit dem TJ-Marker Occludin (grün) gezeigt werden. Balken = 10 µm.

### 3.1.3.1.2 Claudin-4 und Claudin-8 werden koexprimiert und sind kolokalisiert.

Die Überexpressionsklone wurden weiterhin hinsichtlich der Koexpression und Kolokalisation von Claudin-4 und -8 charakterisiert, was eine Voraussetzung für einen Anionenkanal wäre. Dazu wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt und mittels C-LSM analysiert (Abb. 33). In MDCK C7 waren Claudin-4 und Claudin-8 in der Tight Junction kolokalisiert (Abb. 33A). Auch nach Überexpression von Claudin-4 (Abb. 33B), Claudin-17 (Abb. 33C) oder der Mutante K65A (Abb. 33D) waren Claudin-4 und -8 gemeinsam in der Membran vorhanden.

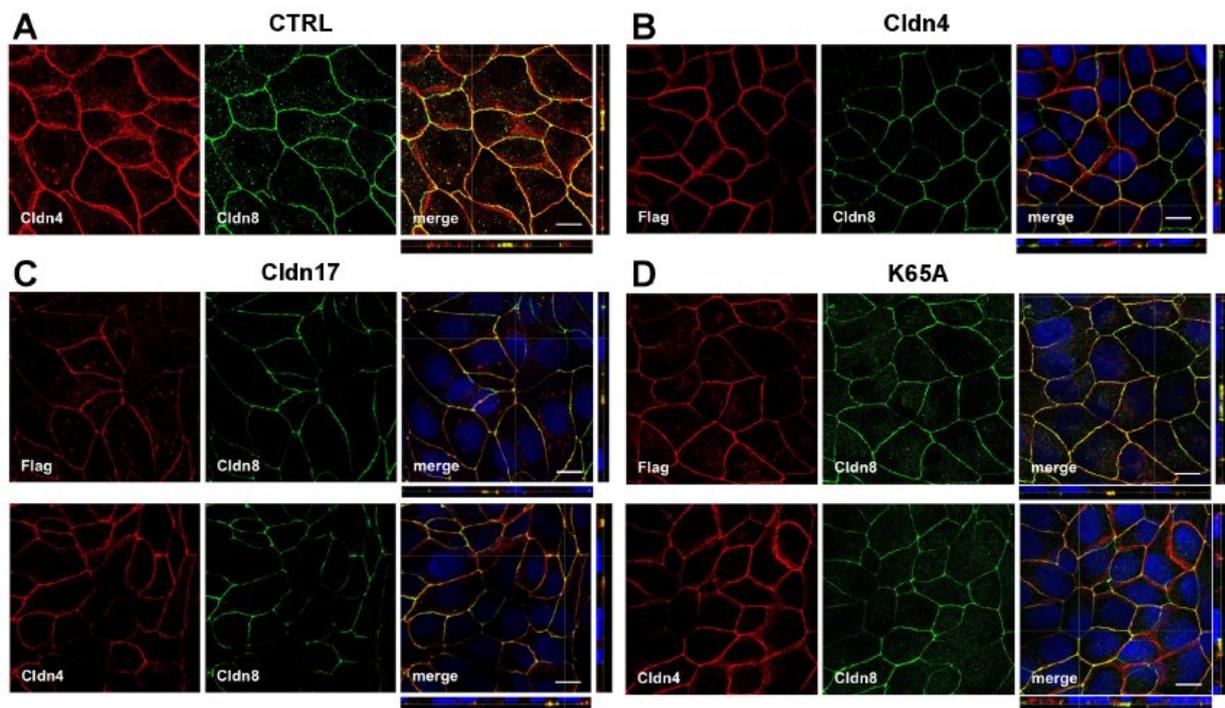


Abbildung 33: **Konfokale Fluoreszenzmikroskopie zur Koexpression und Lokalisation von Claudin-4 und Claudin-8 in MDCK C7-Zellen.** Abgebildet sind die Einzelaufnahmen von Claudin-4 (rot) und Claudin-8 (grün), sowie die laterale Ansicht. Balken = 10  $\mu\text{m}$ . **A** Die vektortransfizierten Kontrollzellen zeigten Koexpression und Lokalisation von Claudin-4 und Claudin-8. **B** Im Claudin-4-Überexpressionsklon Cldn4#1012 wurde das exogene Claudin-4 mittels anti-M2-FLAG-AK angefärbt. Dieses kolokalisierte mit Claudin-8 in der Tight Junction. **C** In MDCK C7-Zellen mit wtClaudin-17 kolokalisierten Claudin-17 (über das FLAG-Epitop nachgewiesen, rot) und Claudin-4 (rot) mit Claudin-8 (grün). **D** Im Klon Claudin-17K65A kolokalisierten Claudin-17 (über das FLAG-Epitop nachgewiesen, rot) und Claudin-4 (rot) mit Claudin-8 (grün).

### 3.1.3.1.3 Einfluss auf den transepithelialen Widerstand und die Permeabilität für Natrium und Chlorid

Die Überexpression von Claudin-4 in MDCK C7-Zellen hatte keinen signifikanten Effekt auf den transepithelialen Widerstand. Es war lediglich ein Trend zu einem erhöhten TER gemessen worden (TER [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]: CTRL  $1545,3 \pm 191,1$  n= 8; Cldn4#1012  $2067,6 \pm 184,5$  n= 8 und  $p= 0,08$ ). Möglicherweise spielte dabei die geringere Claudin-1-Expression eine Rolle, da Claudin-1 ebenfalls zum transepithelialen Widerstand beiträgt.

Ein tendenziell erhöhter transepithelialer Widerstand lässt dabei auf eine abdichtende Funktion des Claudin-4 schließen. Bei einer kanalbildenden Funktion wäre ein verminderter Widerstand erwartet worden, wie es andere kanalbildende Claudine (Claudin-2: Amasheh et al., 2002; Claudin-17: Krug et al., 2012) im MDCK C7-Zellmodell bewirkten.

In Dilutionspotentialmessungen wurden die Permeabilitätseigenschaften des Claudin-4-Überexpressionsklons untersucht. Im Vergleich zu den Vektorkontrollen waren die Permeabilitäten

für Chlorid und Natrium reduziert ( $P_{Cl}$ [ $10^{-3}$ cm/h]: CTRL  $2,3 \pm 0,3$  n= 8; Cldn4#1012  $1,7 \pm 0,1$  n= 14 und  $p= 0,03$ ;  $P_{Na}$ [ $10^{-3}$ cm/h]: CTRL  $2,6 \pm 0,3$  n= 13; Cldn4#1012  $1,9 \pm 0,1$  n= 14 und  $p= 0,03$ ). Die tendenzielle Erhöhung des transepithelialen Widerstands führte schließlich zu signifikanten Unterschieden der Einzelpermeabilitäten. Auffällig war dabei, dass das Verhältnis der Permeabilitäten von Natrium und Chlorid durch die Überexpression nicht verändert wurde ( $P_{Cl}/P_{Na}$ : CTRL  $0,87 \pm 0,01$  n= 8; Cldn4#1012  $0,88 \pm 0,01$  n= 14 und  $p= 0,7$  n. s.).

Claudin-4 zeigte in MDCK C7-Zellen keine kanalbildenden Eigenschaften. Es trug zu einer stärkeren Abdichtung des Epithels bei und verringerte gleichermaßen die Permeabilität für Natrium und Chlorid.

### 3.1.3.2 Effekte von Claudin-3

In MDCK C7-Zellen wird Claudin-3 endogen auf einem niedrigen Level exprimiert und besitzt abdichtende Funktion (Milatz et al., 2010), die intensiv in MDCK II-Zellen untersucht wurde.

#### 3.1.3.2.1 Generierung stabiler Überexpressionsklone

Durch stabile Transfektion mit dem Expressionsvektor pCMV10-Cldn3 wurden Überexpressionsklone erzeugt, die hinsichtlich der Lokalisation und Expression des exogenen und endogenen Claudin-3 ausgewählt wurden (Abb. 32B).

Weiterhin wurde die Expression weiterer Tight Junction-Proteine im Vergleich mit vektortransfizierten Zellen analysiert. Dabei zeigten sich keine Unterschiede (Abb. 32A).

#### 3.1.3.2.2 Einfluss auf den transepithelialen Widerstand und die Permeabilität für Natrium und Chlorid

Die Überexpression von Claudin-3 in MDCK C7-Zellen führte wie die Überexpression von Claudin-4 zu einer Erhöhung des transepithelialen Widerstands (TER [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]: CTRL  $1545,3 \pm 191,1$  n= 8; Cldn3#1013  $2577,1 \pm 306,8$  n= 5 und  $p= 0,01$ ). Die weitere Erhöhung des transepithelialen Widerstands durch Claudin-3 steht im Einklang mit den Ergebnissen, die in niederohmigen Epithelzellen gewonnen wurden (Milatz et al., 2010). Mit Hilfe von Dilutionpotentialmessungen in Ussing-Kammern konnte gezeigt werden, dass sich das Verhältnis  $P_{Cl}/P_{Na}$  nicht veränderte ( $P_{Cl}/P_{Na}$ : CTRL  $0,87 \pm 0,01$  n= 8; Cldn3#1013  $0,89 \pm 0,02$  n= 5 und  $p= 0,3$  n. s.), wohl aber die absolute Permeabilität sowohl für Chlorid als auch für Natrium verringert war ( $P_{Cl}$ [ $10^{-3}$ cm/h]: CTRL  $2,3 \pm 0,3$  n= 8; Cldn3#1013  $1,3 \pm 0,2$  n= 5 und  $p= 0,02$ ;  $P_{Na}$ [ $10^{-3}$ cm/h]: CTRL  $2,6 \pm 0,3$  n= 13; Cldn3#1013  $1,5 \pm 0,2$  n= 5 und  $p= 0,02$ ; Abb. 34). Dies bestätigt die abdichtende Funktion von Claudin-3, die gleichermaßen für Kationen wie Anionen gilt.

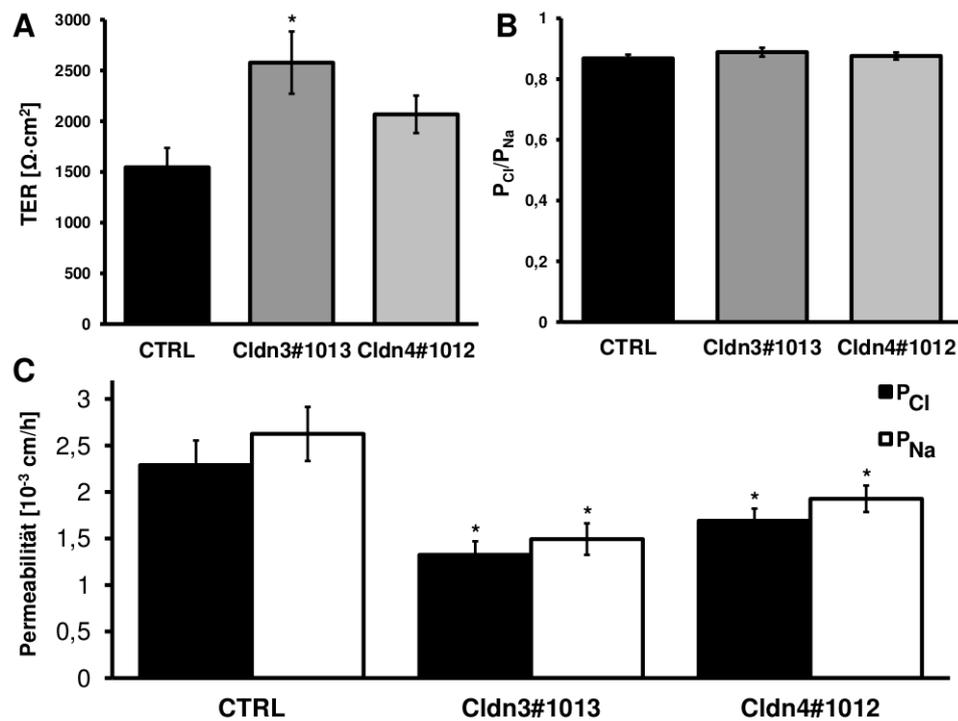


Abbildung 34: **Dilutionspotentialmessungen für Natrium und Chlorid.** Elektrophysiologische Messungen an klonalen Linien nach Überexpression von Claudin-3 und -4. **A** Der transepitheliale Widerstand, **B** das Verhältnis  $P_{\text{Cl}}/P_{\text{Na}}$  und **C** die absoluten Permeabilitäten für Natrium und Chlorid zeigten Messwerte, die auf eine abdichtende Funktion beider Claudine hinweisen. Gegenüber mit Leervektor transfizierten Kontrollzellen konnte keine Veränderung des  $P_{\text{Cl}}/P_{\text{Na}}$ -Verhältnisses festgestellt werden, was zeigte, dass diese Claudine gleichermaßen gegen Natrium und Chlorid abdichten (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  und \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## 3.2 Einfluss kanal- und barrierebildender Claudine auf die Lumenformation im epithelialen Zystenmodell

Epithelien sind Gewebe aus polarisierten Zellen, die äußere (Haut) und innere Oberflächen eines Organismus auskleiden und diesen somit in verschiedene Kompartimente unterteilt. Solche flüssigkeitsgefüllte Hohlräume (Lumen) trennen verschiedene Funktionen (z. B. Verdauung) und erlauben es Stoffe oder ganze Zellen innerhalb des Organismus zu verteilen. Für die Entwicklung dieser Lumen sind verschiedene Mechanismen bekannt, z. B. Einfaltung, Ein- oder Ausstülpung, die abhängig vom Zeitpunkt und Entwicklungsstadium zum Tragen kommen.

Für die Analyse der *de novo* Lumenformation auf molekularer Ebene existieren Zellkulturmodelle, die hier Anwendung fanden.

### 3.2.1 Überexpression kanal- und barrierebildender Claudine in MDCK C7-Zellen

Um den Einfluss der Permeabilitätseigenschaften von Claudinen auf die Lumenformation (Mechanismen der Lumenbildung vgl. 1.5) im epithelialen Zystenmodell zu untersuchen, wurden verschiedene Claudine in MDCK C7-Zellen überexprimiert. Die Claudine-2 (Amasheh et al., 2002), -10b (Günzel et al., 2009) und -15, die alle Kationenselektivität aufweisen, waren im Institut für Klinische Physiologie bereits Überexpressionsklone vorhanden. Das gleiche galt für die anionenselektiven Kanalbildner Claudin-10a (Günzel et al., 2009) und Claudin-17 (Krug et al., 2012). Andere MDCK C7-Überexpressionsklone wurden im Rahmen dieser Arbeit angefertigt, z. B. für das barrierebildende Protein Claudin-4 (vgl. 3.1.3).

Abbildung 35 zeigt die exogene Expression der Claudine im Western-Blot. Claudin-10a und -10b besitzen keinen Tag (Nachweis mit Cldn10-AK), Claudine-2 und -15 wurden mit den jeweiligen anti-Claudin-Antikörpern nachgewiesen, die Claudine-4 und -17 besitzen einen dreifachen FLAG-Tag (Nachweis mit M2 Anti-FLAG-AK).

### 3.2.2 Nachweis der kanal- und barrierebildenden Eigenschaften

Die kanal- und barrierebildenden Eigenschaften sowie die Ladungsselektivität der einzelnen Claudine wurde erneut mittels Dilutionspotentialmessungen überprüft, da leicht veränderte Ringerlösungen als in den Publikationen eingesetzt wurden. Für Claudin-17 (vgl. 3.1.2.2 und Krug et al., 2012) und Claudin-4 (vgl. 3.1.3.1.2) wurden die Ergebnisse bereits aufgeführt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 36 dargestellt und bestätigen die bekannten Veränderungen in den elektrophysiologischen Parametern TER und  $P_{Cl}/P_{Na}$  der untersuchten Claudine. Der unveränderte transepitheliale Widerstand in Zellen mit Claudin-10a (Cld10-1) kann dabei möglicherweise auf die im Western Blot beobachtete geringe Expressionsstärke des exogenen Claudin-10

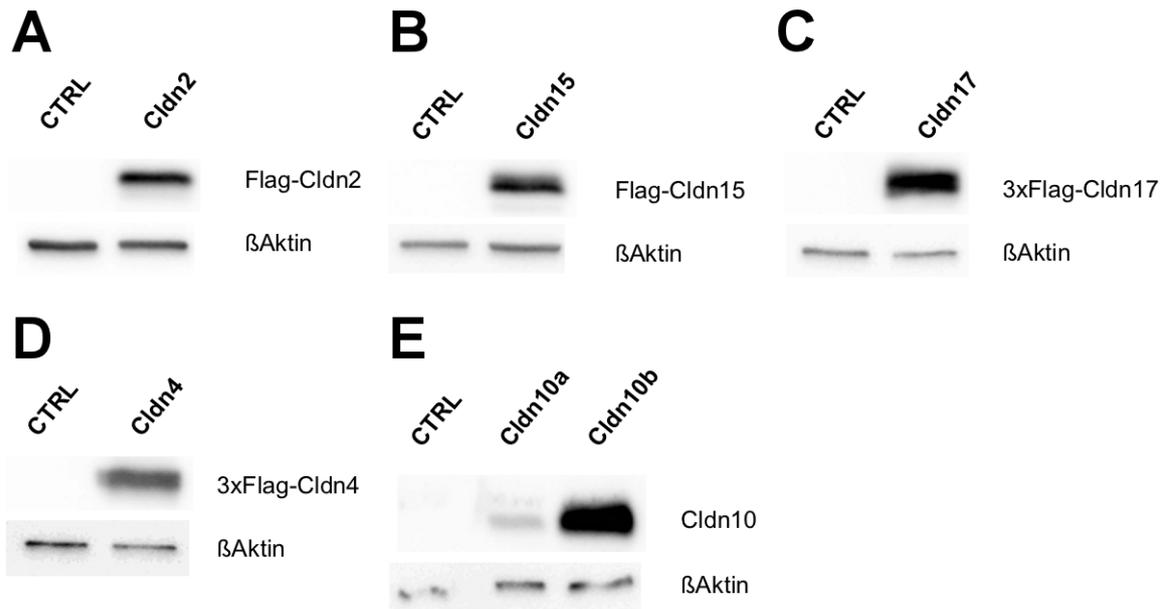


Abbildung 35: **Expression exogen exprimierter Claudine in MDCK C7-Zellen.** In vektortransfizierten Kontrollzellen kann das heterolog exprimierte Claudin nicht nachgewiesen werden. **A** Überexpression von Claudin-2 (Nachweis mit anti-Cldn2-AK). **B** Überexpression von Claudin-15 (Nachweis mit anti-Cldn15-AK). **C** Überexpression von Claudin-17 (Nachweis mit anti-FLAG-M2-AK). **D** Überexpression von Claudin-4 (Nachweis mit M2 anti-FLAG-AK). Kontrollzellen exprimieren endogen Claudin-4 (siehe Abb. 32A). **E** Überexpression von Claudin-10a und -10b (Nachweis mit anti-Cldn10-AK). Claudin-10a ist deutlich schwächer exprimiert als -10b.

zurückgeführt werden. Zudem wurde auch in Günzel et al. ein hoher transepithelialer Widerstand beobachtet und ein unverändertes Verhältnis der Permeabilitäten von Natrium und Chlorid (Günzel et al., 2009).

### 3.2.3 Einfluss auf die Größe des Zystenlumens

Zystenformation in 3D-Zellkultur ist ein häufig verwendetes Modell zur Analyse der Zellpolarität. Der Erhalt der Polarität wurde mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie bestätigt (Abb. 37A). Nach Färbung konnte E-Cadherin im basolateralen Kompartiment detektiert werden, Aktin bildete einen Ring an der apikalen Membran, die das Lumen begrenzt (Abb. 37A, B).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Claudine auf die Ausbildung und Größe des Zystenlumens, des flüssigkeitsgefüllten Inneren, untersucht.

MDCK C7-Zellen wurden nach 5 Tagen im Matrigel fixiert, gefärbt und mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Anschließend wurde der Durchmesser des Zystenlumens gemessen (repräsentative Abbildung für Kontroll- und Claudin-10b-transfizierte Zellen, Abb. 37B). MDCK C7-Zellen, die kanalbildende Claudine überexprimieren, zeigen dabei vergrößerte Innendurchmesser des Zystenlumens gegenüber vektortransfizierten Kontrollen oder Zellen, die

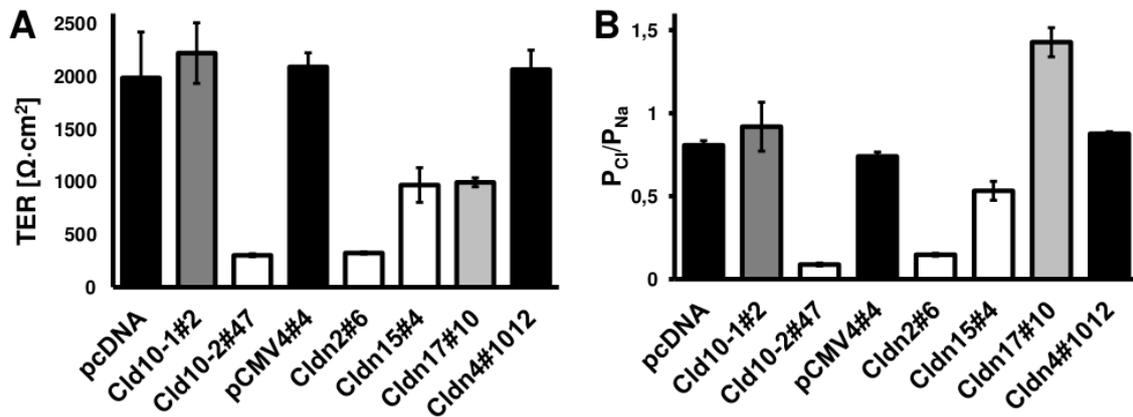


Abbildung 36: **Dilutionspotentialmessungen für Natrium und Chlorid.** Elektrophysiologische Messungen an den Überexpressionsklonen mit den Claudinen-2, -4, -10a/b (entspricht Cld10-1 und Cld10-2), -15, und 17, sowie zugehöriger mit Leervektor transfizierter Kontrollzellen. **A** Der transepitheliale Widerstand war in MDCK C7-Zellen mit den kanalbildenden Claudin-2, -10b (Cld10-2), -15 und -17 gegenüber Kontrollzellen (pcDNA, pCMV4, schwarze Säulen) oder Überexpressionsklonen von Claudin-10a (Cld10-1, dunkelgraue Säule) und Claudin-4 (schwarze Säule) verringert. **B** Das Verhältnis  $P_{\text{Cl}}/P_{\text{Na}}$  betrug in mit Leervektor transfizierten Kontrollzellen  $\sim 0,85$  und war bei den Überexpressionsklonen von Claudin-10a (Cld10-1) und Claudin-4 unverändert. Die Expression der Kationenkanäle Claudin-2, -10b (Cld10-2) und -15 (weiße Säulen) reduzierten das Verhältnis  $P_{\text{Cl}}/P_{\text{Na}}$  stark, in MDCK C7-Zellen mit Claudin-17 (hellgraue Säule) war  $P_{\text{Cl}}/P_{\text{Na}}$  erhöht.

das barrierebildende Claudin-4 exprimieren (Abb. 37), mit Ausnahme der Claudin-10a exprimierenden Zellen. Der Innendurchmesser der MDCK C7-Zellen, die den Kationenkanal Claudin-2 überexprimieren, war auf  $177,0\% \pm 4,7$  ( $n= 104$  und  $p= 0,0001$ ) gegenüber der Kontrolle erhöht. In Zysten mit den Kationenkanälen Claudin-10b bzw. Claudin-15 war der Innendurchmesser auf  $145,2\% \pm 3,1$  ( $n= 103$  und  $p= 0,0001$ ) bzw.  $158,9\% \pm 4,4$  ( $n= 84$  und  $p= 0,0001$ ) erhöht. Die Steigerung des Zystendurchmesser in MDCK C7-Zellen mit Claudin-17 betrug  $145,1\% \pm 2,5$  ( $n= 100$  und  $p= 0,0001$ ). Die beobachtete starke Zunahme des Zystenlumen könnte darauf hinweisen, dass eine durch Claudine vermittelte Ionenpassage zur Lumenexpansion beiträgt, unabhängig ob kationen- oder anionenselektive Claudinkanäle exprimiert waren. Überexpression von Claudin-4 hatte keinen Einfluss auf das Zystenlumen, Claudin-10a verursachte eine Verringerung des Zystenlumens, die Innendurchmesser betragen  $88,1\% \pm 4,3$  ( $n= 84$  und  $p= 0,6$  n. s. Claudin-4) und  $80,6\% \pm 5,1$  ( $n= 97$  und  $p= 0,005$  Claudin-10a) gegenüber vektortransfizierten Kontrollen. Diese Beobachtungen korrelieren mit den durch Dilutionspotentiale erzielten Messdaten, die einen hohen transepithelialen Widerstand und unveränderte Permeabilitätseigenschaften des Epithels anzeigen.

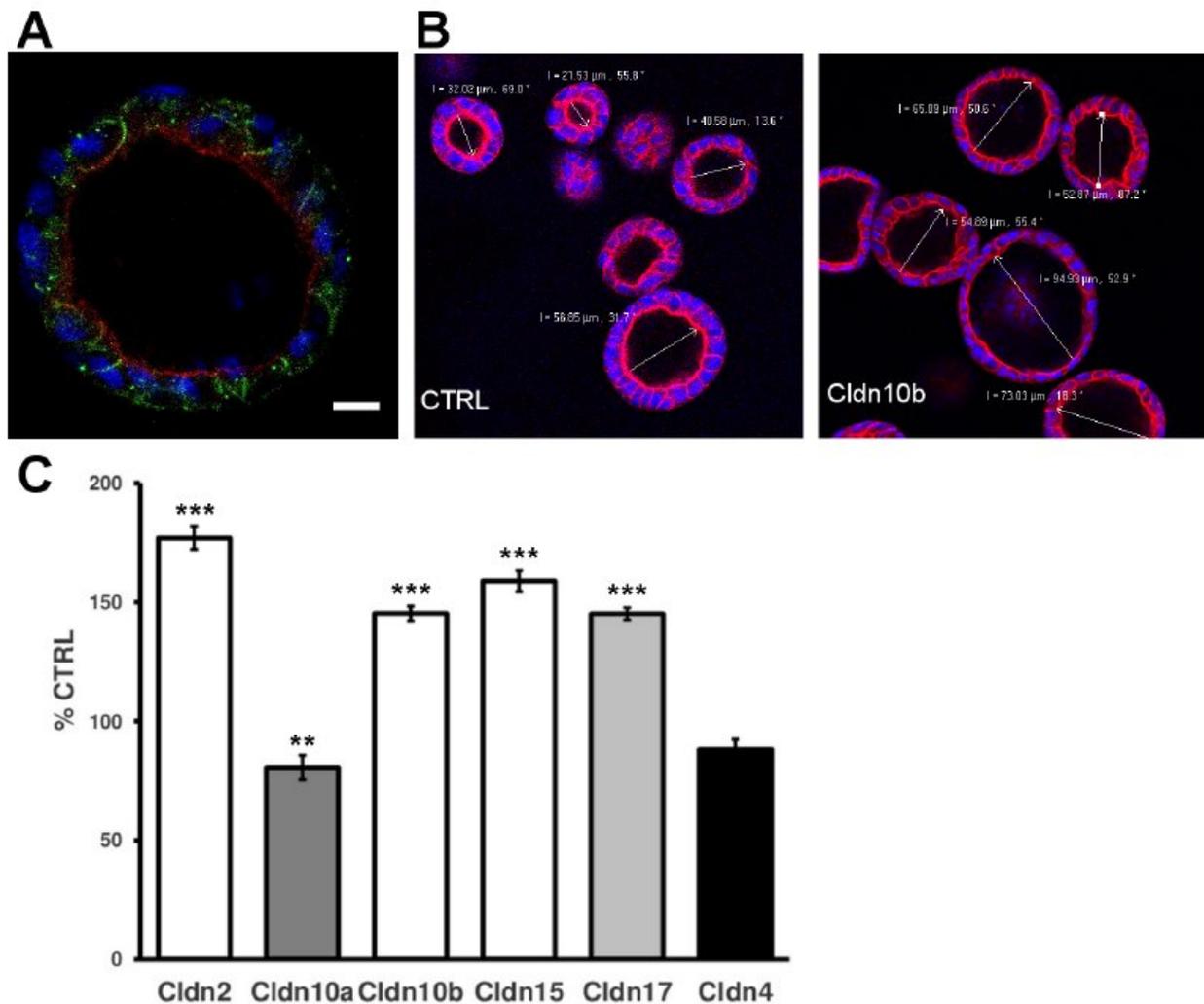


Abbildung 37: **Veränderung des Innendurchmesser nach Überexpression verschiedener Claudine in MDCK C7-Zellen.** **A** Die Zellen in Matrigel behalten ihre Polarität bei. Immunfluoreszenzfärbung zeigte E-Cadherin (grün) im basolateralen Kompartiment, Aktin (rot) war apikal lokalisiert (Zellkerne, blau). Balken = 10 μm **B** Die Analyse des Lumendurchmesser erfolgte mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie. Zur Messung wurde der Aktinring (rot) in der Ebene mit größter Ausbreitung fokussiert (Zellkerne, blau). Mit Leervektor transfizierte Kontrollzellen und mit Claudin10b-transfizierte MDCK C7-Zellen unterschieden sich im Lumendurchmesser. **C** Quantifizierung der Lumenänderung relativ zu Kontrollzellen. Die Kationenkanäle Claudin-2, -10b und -15 (weiße Säulen) und die Anionenpore Claudin-17 (hellgraue Säule) vergrößern den Lumendurchmesser. Claudin-4 (schwarze Säule) und Claudin-10a führen zu einer Verringerung des Innendurchmesser (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  und \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## 4 Diskussion

### 4.1 Claudin-17-Mutagenese

#### 4.1.1 MDCK C7-Zellmodell

Zur Analyse der funktionellen Eigenschaften des Claudin-17 wurden verschiedene epitheliale Zelllinien als potentielle Zellkultursysteme untersucht (Krug et al., 2012). Die renalen Zelllinien MDCK II und MDCK C11, sowie LLC-PK<sub>1</sub> zeigten endogen eine starke Claudin-17-Expression. LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen wurden schließlich ausgewählt um in Knockdown-Experimenten nach Transfektion von siRNAs gegen Claudin-17 die Verringerung der Anionenpermeabilität zu zeigen (Krug et al., 2012).

Die ausführliche funktionelle Charakterisierung des Claudin-17 erfolgte nach stabiler Transfektion und Überexpression in MDCK C7-Zellen. Diese Zellen stellen ein sehr dichtes Epithel dar, mit Widerständen von mehr als  $1500 \Omega \cdot \text{cm}^2$  und sind präferentiell kationenselektiv. Endogen werden barrierebildende Claudine wie Claudin-1, Claudin-3 und Claudin-5 exprimiert. Kanalbildende Claudine wie Claudin-17, Claudin-2, Claudin-10 oder Claudin-15 fehlen (Abb. 35). Dies war bei der Wahl eines geeigneten Zellkultursystems von Bedeutung, da Expressionsänderungen eben solcher kanalbildender Claudine einen möglichen porenbildenden, ladungsselektiven Effekt eines exogen eingebrachten Claudins maskieren könnten. Eine veränderte Expression der endogen exprimierten abdichtenden Claudine hat jedoch keinen Einfluss auf die Ladungsselektivität. So bildet der stabile Klon Claudin-17#10, welcher in Krug et al. zur Analyse der funktionellen Eigenschaften des Claudin-17 verwendet wurde, trotz einer stärkeren Expression von Claudin-3 im Vergleich zu Kontrollzellen einen anionenselektiven Kanal (Krug et al., 2012). Zudem konnte nach Überexpression von Claudin-3 und -4 mit Hilfe von Dilutionpotentialmessungen gezeigt werden, dass die Ladungsselektivität unverändert bleibt, sich ein erhöhtes Expressionsniveau dieser abdichtenden Claudine auf den transepithelialen Widerstand auswirkt. Die Rolle von Claudin-4 in diesem Zellkultursystem zu verstehen, ist besonders wichtig, da Claudin-4 in mIMCD3- und M-1-Zellen eine Funktion als anionenselektiver Kanal zugewiesen werden konnte (Hou et al., 2010). Dabei untersuchten die Autoren die parazelluläre Pore mittels Aminosäuresubstitutionen, bestimmten als Orte der Ladungsselektivität die Aminosäuren Lysin 65 (K65) sowie Arginin 81 (R81) und arbeiteten auch die Rolle des Claudin-8 heraus, welches für die Rekrutierung des Claudin-4 zur Plasmamembran notwendig ist (Hou et al., 2010). In MDCK C7-Zellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, bildete Claudin-4 jedoch keinen Anionenkanal aus, obwohl auch in MDCK C7-Zellen Claudin-8 exprimiert wird und beide Claudine kolokalisieren (vgl. Abb. 33). Auch in MDCK II-Zellen, in denen nach Überexpression von Claudin-8 beide Claudine zur Bildung des von Hou et al. postulierten Anionenkanals vorlagen, wurde keine erhöhte Permeabilität für Chlorid gemessen (Yu et al., 2003). In MDCK-Zellen (ob MDCK C7 oder MDCK II) bildet Claudin-4 keine parazelluläre, anionen-

selektive Pore aus. Der Ursprung der MDCK-Zellen ist der proximale Tubulus der Niere, die von Hou et al. verwendeten mIMCD3- und M1-Zellen stammen aus dem distalen Sammelrohr der Niere. Möglicherweise ist das unterschiedliche Verhalten des Claudin-4 auf bislang unbekannte Unterschiede in den Zelllinien verschiedenen Ursprungs zu begründen. Die Änderung der Expression barrierebildender Claudine, wie Claudin-1, -3 und -4, hatte keinen Einfluss auf die Ionenselektivität des MDCK C7-Monolayers und führte insbesondere im Fall von Claudin-4 auch nicht zu einer veränderten Anionenpermeabilität.

Zur Analyse kanalbildender Claudine hat sich die Zelllinie MDCK C7 als robustes und wertvolles System herausgestellt, mit dem die Eigenschaften der verschiedenen Mutanten des Claudin-17 untersucht werden konnten. Der Einfluss heterolog exprimierter Claudine kann nach Überexpression auf einfache Weise analysiert werden, da das endogene Claudinprofil ausschließlich abdichtende und keine kanalbildende Claudine umfasst.

Des Weiteren lassen sich MDCK C7-Zellen in 3D-Zellkultur halten, was die Analyse weiterer Effekte kanalbildender Claudine (siehe 3.2 und 4.2) ermöglichte.

#### **4.1.2 Aminosäuresubstitutionen im ECL1**

Um die molekularen Grundlagen der Claudin-17-Anionenpore besser zu verstehen, wurden Aminosäuren durch ortsgerichtete Mutagenese ausgetauscht und nach Überexpression in MDCK C7-Zellen untersucht. So konnten Aminosäuren identifiziert werden, die die Anionenselektivität der Claudin-17-Pore verändern. Da bereits eine Reihe von Mutagenesestudien an kanal- und barrierebildenden Claudinen durchgeführt wurden, werden die verschiedenen Aminosäuren gruppiert und anhand der bekannten Literatur diskutiert.

##### **4.1.2.1 Die Position Lysin 65 (K65)**

In den meisten bisher untersuchten Claudinen führte eine Mutation der geladenen Aminosäure, die benachbart zum zweiten konservierten Cystein des ECL1 ist, zu einer Veränderung der Ladungsselektivität und wird daher häufig als Selektivitätsfilter bezeichnet (siehe 1.3.1 und Günzel & Yu, 2013). Die unterschiedlichen Studien an verschiedenen Claudinen verwendeten dabei unterschiedliche Strategien beim Aminosäureaustausch. Während Yu et al. für Claudin-2 ladungsneutralisierende Mutationen verwendete (z. B. D65N, Yu et al., 2009), wurde zur Mutagenese der Claudine-4, -10a und -15 die Ladung jeweils umgekehrt (Colegio et al., 2002, Van Itallie et al., 2006, Hou et al., 2010). Eine Ladungsumkehr gibt allerdings nicht allein Auskunft über die nativ vorliegende und schließlich ersetzte Aminosäure, sondern erzeugt durch die Einführung der entgegengesetzten Ladung eine neu zu interpretierende Situation. Die physikochemischen Eigenschaften kehren sich an dieser Position um, die Wechselwirkungen mit anderen Aminosäuren im Protein und mit der Umgebung ändern sich. Eine Neutralisierung der Ladung durch eine Aminosäure mit ungeladener Seitenkette stellt einen geringeren Eingriff in

die Ladungsverteilung im ECL1 des Claudins dar. Jedoch müssen auch stereochemische Effekte berücksichtigt werden. Während Glutaminsäure (147,1 g/mol) und Lysin (146,2 g/mol) fast gleich groß sind, hat die Aminosäure Alanin (89,1 g/mol) eine weitaus kürzere Seitenkette, die weniger Platz beansprucht. Daher ergeben sich andere sterische Möglichkeiten innerhalb des gesamten Moleküls. Für Claudin-17 wurden beide Strategien verwendet, die Ladungsumkehr von Lysin zu Glutaminsäure und die Neutralisierung der Ladung durch Substitution zu Alanin. Zudem wurde eine Mutation unter Beibehaltung der Ladung eingefügt. Der Aminosäureaustausch von Lysin zu Arginin konserviert die positive Ladung der Seitenkette, wodurch die Nettoladung der Pore erhalten bleibt. Arginin (174,2 g/mol) ist jedoch größer als Lysin und aufgrund der größeren Seitenkette kamen auch stereochemische Effekte zum Tragen, vermutlich war die Pore durch die größere Seitenkette stärker verengt. Durch den Aufbau der Pore aus mindestens zwei einander gegenüber liegenden Claudin-17-Molekülen wird die Verengung noch verstärkt. Da alle durchgeführten Aminosäuresubstitutionen zu einem Verlust der Anionenselektivität von Claudin-17 führten, kann angenommen werden, dass sowohl elektrostatische wie stereochemische Effekte beteiligt sind. Die ladungsumkehrende Mutation K65E erzielte für alle gemessenen Ionen (Chlorid, Nitrat, Thiocyanat und Pyruvat) die stärkste Veränderung des Permeabilitätsverhältnisses  $P_X/P_{Na}$  gegenüber des wtClaudin-17, was darauf hindeutet, dass die positive Ladung der Aminosäureseitenkette mit der Ladung des Ions wechselwirkt. Auffällig war, dass die Expressionsstärke von K65E am größten war.

Da für die Funktion von Claudin-17 als Anionenpore weitere Aminosäuren neben K65 von Bedeutung sind, ist die Bezeichnung „Selektivitätsfilter“ hier nicht geeignet.

#### **4.1.2.2 Einfluss der geladenen Aminosäuren der N-terminale Hälfte des ECL1 (Positionen R31, E44, R45 und E48)**

Arginin 31 ist im ECL1 der meisten Claudine konserviert und befindet sich am Übergang von der Transmembrandomäne 1 zum ECL1. Nach Ladungsumkehr an Position 31 konnte der ECL1 nicht die Anionenpore ausbilden. In anderen Claudinen wurde der Einfluss der positiven Ladung auf die Claudinfunktion bislang kaum untersucht. Hou et al. fanden nach Aminosäuresubstitution von Arginin zu Threonin (R31T) in Claudin-4 keinen Effekt auf die Ionenselektivität (Hou et al., 2010), wie er für Claudin-17R31E gemessen wurde.

Glutaminsäure oder andere Aminosäuren mit geladener Seitenkette sind in der Primärstruktur der meisten kanal- und barrierebildenden Claudine an Position 48 konserviert und für deren Funktion nicht von Bedeutung (Hou et al., 2010; Wen et al., 2005; Colegio et al., 2002 und Hou et al., 2006). Für Claudin-17 konnte erstmals eine Beteiligung dieser Position an den Permeabilitätseigenschaften gezeigt werden. Umkehr der Ladung, E48K, führte wie der konservative Aminosäureaustausch, E48Q, zu einer Reduktion der Permeabilität für Chlorid, einem funktionell inaktiven Claudin-17-Protein.

Mögliche Ursachen für die veränderte Claudin-17-Funktion nach den Aminosäuresubstitutionen

an Position 48 könnte eine veränderte Fähigkeit zur Interaktion mit anderen Tight Junction-Proteinen sein. Claudin-1, welches ein barrierebildendes Claudin darstellt, ist außerdem ein Korezeptor für das Hepatitis-C-Virus. In diesem Zusammenhang wurde der Effekt einzelner Aminosäuren, u. a. R31 und E48, untersucht. Substitution der Aminosäure Glutaminsäure 48 (E48K) reduzierte die Infektionsrate (Evans et al., 2007). Die Mutation R31A zeigte keine Auswirkung auf den Viruseintritt (Cukierman et al., 2009). Da sich diese Fragestellungen der Ionenpermeabilität und Ausbildung eines Korezeptors für HCV sehr voneinander unterscheiden, können Rückschlüsse auf gemeinsame Struktureigenschaften nur bedingt gezogen werden. Insbesondere, da Claudin-1 mit dem Tetraspaninmolekül CD81 interagiert (Davis et al., 2012), ist nicht anzunehmen, dass die Faltung des ECL1 derjenigen entspricht, die in Tight Junction-Strängen angenommen wird. Es kann jedoch argumentiert werden, dass sich die entsprechenden Aminosäuren zugänglich und an der Proteinoberfläche befinden, nicht eingeschlossen im Proteininneren.

Die direkt benachbarten und entgegengesetzt geladenen Aminosäuren Glutaminsäure an Position 44 und Arginin an Position 45 zeigten einander entgegengesetzte Effekte. Die positive Ladung von R45 spielt für die Claudin-17-Funktion keine Rolle, wohl aber die negative Ladung von E44, da nach Neutralisation die Anionenselektivität verloren ging. Dies könnte darauf hindeuten, dass Glutaminsäure 44 direkt mit dem Anion interagiert. Inwiefern die negative Ladung der Glutaminsäure zur Interaktion mit negativ geladenen Anionen notwendig ist, ist unbekannt. Insofern könnte auch eine Rolle bei der *trans*-Interaktion mit anderen Claudinen in Betracht gezogen werden, wie sie von Daugherty et al. beschrieben wurde (Daugherty et al., 2007). In dieser Studie konnte die Aminosäure Asparagin an Position 44 im ECL1 von Claudin-3 als entscheidend für die *trans*-Interaktion mit Claudin-4 identifiziert werden. Wurde Asparagin zu Threonin mutiert (N44T), der Aminosäure, die in Claudin-4 an Position 44 kodiert ist, konnte eine Interaktion von Claudin-3N44T mit Claudin-4 festgestellt werden (Daugherty et al., 2007). Die Rolle der Position 44 könnte somit auch im Claudin-17 die Regulation der Interaktion mit weiteren Claudinen sein. Die Position E44 in Claudin-17 konnte in Abgrenzung zur unmittelbar benachbarten Aminosäure R45 als entscheidend zur Ionenselektivität der Claudin-17-Anionenpore identifiziert werden. Der exakte Effekt der Aminosäure lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht endgültig bestimmen.

Aufgrund elektrophysiologischer Messungen in Mutagenesestudien an anderen kanalbildenden Claudinen war zunächst nicht zu erwarten, dass Aminosäuren der N-terminalen Hälfte des ECL1 einen Einfluss auf die Permeabilitätseigenschaften ausüben. Für Claudin-17 konnte jedoch erstmals ein Beitrag zur korrekten Anionenselektivitätsfunktion gezeigt werden.

#### 4.1.2.3 Die Positionen R56, R59 und R61

Der Vergleich der Aminosäuresequenz des ECL1 von Claudin-17 verschiedener Spezies (Abb. 9) zeigt weitgehende Konservierung der Primärstruktur. In den Modellorganismen Maus

(*Mus musculus*) und Ratte (*Rattus norvegicus*) sind jedoch die Positionen 56, 59 und 61, an denen sich im humanen Claudin-17 jeweils die positiv geladene Aminosäure Arginin befindet, durch die ungeladenen Aminosäuren Glutamin (Q56), Methionin (M59) und Threonin (T61) kodiert (Abb. 9).

Die Ergebnisse zeigen, dass das murine Claudin-17 wie das humane Claudin-17 einen anionen-selektiven, parazellulären Kanal ausbildet. Nach Ladungsneutralisation der Arginine R56, R59 und R61 im humanen Claudin-17 konnte gezeigt werden, dass diese positiven Ladungen keinen Einfluss auf die Ausbildung der Pore nehmen. Durch die Effekte der nun bekannten Variationen an der Position 56, die im humanen Claudin-17 zu Alanin und Threonin mutiert wurde und im murinen Claudin-17 ein Glutamin kodiert, kann ausgeschlossen werden, dass diese Position unmittelbar an der Koordination der Anionenpassage durch die ausgebildete Pore beteiligt ist. Auch eine Beteiligung der weiteren geladenen Aminosäuren an den Positionen 59 und 61 ist nicht zu erwarten. Da sich diese Aminosäuren in dem Sequenzcluster zwischen den konservierten Cysteinen befinden, wäre eine mögliche Erklärung dafür, dass dieser Sequenzbereich keinen Einfluss auf die Porenbildung hat, dass die Cysteine eine Disulfidbrücke ausbilden, die eine Faltung des Proteins verursacht, in der die zwischen den Cysteinen liegenden Aminosäuren aus dem Porenbereich ausgeschlossen sind. In Claudin-2 konnte nach Aminosäureaustausch an Position 57 (H57C) kein Effekt auf die Ionenpermeabilität gemessen werden. Angelow et al. positionierten diese Aminosäure in ihrem Modell am Eingang der Pore (Angelow & Yu, 2009). Zudem sind auch in anderen Claudinen verschiedene Aminosäuren zwischen den konservierten Cysteinen an der Porenbildung beteiligt. So zeigten Colegio et al., dass die Aminosäure Glutaminsäure (D55R) an der Ionenselektivität des Claudin-15-Kanals beteiligt ist (Colegio et al., 2002). Die Punktmutation Q57E in Claudin-19 führt zu FHHNC (familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis) und verursacht in Dilutionspotentialmessungen eine Veränderung der Ionenpermeabilität (Hou et al., 2008).

Die Aminosäuren zwischen den konservierten Cysteinen können also durchaus einen Einfluss auf die Permeation von Ionen durch die parazelluläre Pore, die Claudine bilden, ausüben. Im Falle der untersuchten Positionen von Claudin-17 trifft dies jedoch nicht zu. Daraus kann jedoch nicht abgeleitet werden, dass dies auf unterschiedlichen Strategien der Porenbildung beruht. Vielmehr zeigt dies die Notwendigkeit hochauflösender Strukturdaten auf atomarem Level, da z. B. auch die angenommene Disulfidbrücke unbestätigt ist (Günzel & Yu, 2013).

#### 4.1.3 Theorie der Porenbildung von Claudin-17

An der Ausbildung parazellulärer Kanäle über den interzellulären Spalt sind mindestens zwei Claudinmoleküle beteiligt, die in einander gegenüberliegender Zellmembranen integriert sind. Die genaue Stöchiometrie von Claudinen konnte bisher nicht experimentell bestimmt werden. Für Claudin-2, das am intensivsten untersuchte Claudin, wird angenommen, dass zwei Moleküle die Pore ausbilden (Angelow & Yu, 2009; Yu et al., 2009). Die exakte Anzahl von

Claudinmolekülen zu bestimmen, die die Pore ausbilden, wird jedoch dadurch erschwert, dass Claudin-2 zusätzlich in *cis* interagieren kann und Homodimere ausbildet (Van Itallie et al., 2011). Für Claudin-17 wurden solche Experimente bislang nicht durchgeführt. Eine homophile *trans*-Interaktion konnte in dieser Arbeit erstmals mit fluoreszenzoptischen Methoden im Live-Cell-Imaging gezeigt werden.

Der Beitrag einzelner Aminosäuren an der Porenbildung kann in vier Kategorien eingeteilt werden (nach Prof. A. Yu, Tight Junction Konferenz 2011, Berlin):

- Auskleidung der Pore am Selektivitätsfilter (D65 in Claudin-2, entsprechend K65 in Claudin-17)
- Eingang der Pore (Y35 und H57 in Claudin-2, möglicherweise R56, R59 und/oder R61 in Claudin-17)
- Ausbildung einer „Intermolekularen Schnittstelle“
- Erhalt der korrekten Faltung des ECL (möglicherweise R31 in Claudin-17)

Der Selektivitätsfilter direkt benachbart zum zweiten konservierten Cystein im ECL1 wurde für die meisten kanalbildenden Claudine gezeigt (Tabelle 1).

Aminosäuren am Eingang der Claudin-2-Pore konnten Angelow und Yu durch Cystein-Scanning-Mutagenese und den Einsatz thiolreaktiver Reagenzien identifizieren und entsprechend lokalisieren (Angelow & Yu, 2009). Da diese Methoden hier nicht angewandt wurden, können äquivalente Positionen nicht exakt bestimmt werden. Möglicherweise befinden sich die Aminosäuren an den Positionen 56, 59 und 61 am Eingang oder außerhalb der Pore. Eine unveränderte Anionenselektivität der Mutationen R56A/T, R59A und R61A deutet darauf hin, dass die positiven Ladungen der Arginine nicht direkt mit dem passierenden Chloridion interagieren oder zur Koordination der Passage mit dem Anion interagieren.

Die genaue Einteilung der geladenen Aminosäuren der N-terminalen Hälfte des ECL1 in eine der oben genannten Kategorien kann nicht zweifelsfrei vorgenommen werden. Der Verlust der Anionenselektivität, der nach den Substitutionen R31E, E44A, E48K oder E48Q auftritt, könnte auf einer Fehlfaltung des ECL1 beruhen. Der Aminosäureaustausch könnte auch zu einer Veränderung der „Intermolekularen Schnittstelle“ oder einer Fehlfunktion der Pore führen. Für die Annahme, dass Arginin an Position 31 zur korrekten Faltung des ECL1 beiträgt, sprechen die hohe Konservierung innerhalb der Claudinfamilie und die Lokalisierung am Übergang von der Transmembrandomäne 1 zum ECL1.

Der Sequenzvergleich mit dem evolutionär verwandten Claudin-8 zeigte viele Gemeinsamkeiten im ECL1, jedoch auch einige Unterschiede. An den Positionen 45 und 59, die im Claudin-17 die positiv geladene Aminosäure Arginin kodieren, ist im Claudin-8-Protein keine geladene

Aminosäure kodiert. Wie in dieser Arbeit nun gezeigt werden konnte, spielen diese Aminosäuren jedoch keine Rolle für die Funktion als Anionenpore und können somit nicht den Unterschied zu Claudin-8 ausmachen. Alle anderen hier untersuchten Aminosäuren mit geladener Seitenkette sind in Claudin-17 und -8 identisch. Dies deutet darauf hin, dass es für die Anionenselektivität weitere Schlüsselpositionen im ECL1 geben muss. In Claudin-2 und -10b sind kürzlich Aminosäuren mit aromatischer Seitenkette in den Fokus gerückt, die Kationenselektivität modulieren (Li et al., 2013). Diese Aminosäuren sind dem Selektivitätsfilter an Position 65 benachbart, wo sich im Claudin-17 zwei Aminosäuren mit aromatischer Seitenkette (F66 und Y67) befinden. In Claudin-8 ist Tyrosin 67 konserviert. Inwiefern diese Positionen die Anionenselektivität von Claudin-17 beeinflussen und ob diese den Unterschied zu Claudin-8 ausmachen, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

In der nachfolgenden Tabelle sind die untersuchten Aminosäuren im ECL1 und ECL2 und ihr Effekt auf die Chloridpermeabilität aufgelistet.

**Tabelle 2: Effekte verschiedener Aminosäuresubstitutionen in Claudin-17 auf Permeabilitätseigenschaften und die trans-Interaktion.**

Die phänotypischen Eigenschaften der Mutanten sind in dieser Tabelle zusammengefasst. +: anionenselektiv; —: nicht anionenselektiv.

<b>Aminosäuresubstitutionen</b>	<b>Anionenselektivität</b>
wt	+
mClaudin-17	+
R31E	—
E44A	—
R45A	+
E48K	—
E48Q	—
R56A	+
R56T	+
R59A	+
R61A	+
K65E	—
K65A	—
K65R	—
Y149A	+
H154A	—

#### 4.1.4 Die Rolle des zweiten extrazellulären Loops

Der Einfluss des ECL2 auf die Permeabilitätseigenschaften für Ionen ist wenig untersucht. Alexandre et al. zeigten durch ortsgerichtete Mutagenese, dass negativ geladene Aminosäuren im ECL2 von Claudin-7 (D147R und E160K) keinen Einfluss auf die Claudinfunktion haben (Alexandre et al., 2007). Mutationen im ECL2 von Claudin-16 behielten die Funktion zumindest teilweise bei, solange das mutierte Claudin-16 in die Tight Junction eingebaut wurde. Es wurden auch Mutationen beschrieben, die eine Retention im Endoplasmatischen Retikulum bewirken (Hou et al., 2006).

Obwohl die Überexpression der beiden mutierten Claudin-17-Proteine Y149A und H154A nicht zu einer Verminderung des transepithelialen Widerstands führte, konnte für Claudin-17Y149A eine Anionenselektivität festgestellt werden, nicht aber für Claudin-17H154. Eine veränderte homophile und heterophile Interaktion in *cis* mit benachbarten Claudinen könnte dabei eine Rolle spielen. Diese Art der Interaktion wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht untersucht. Die Rolle von Aminosäuren des ECL2 für die *cis*-Interaktion wurde in Claudin-5 beobachtet. Die Mutante Claudin-5Y158A reduzierte die *cis*-Interaktion mit wtClaudin-5 in FRET-Messungen (Piontek et al., 2008). So könnte H154 für die *cis*-Interaktion von Claudin-17 mit benachbarten Claudinen von Bedeutung sein.

Die Permeabilität für Größenmarker wie Fluoreszein (332 Da), Mannitol, FITC-Dextran-4000 oder -10000 (FD-10) wird nach Überexpression kanalbildender Claudine, wie Claudin-2 oder Claudin-17, nicht verändert (Amasheh et al., 2002, Krug et al., 2012), da diese Moleküle zu groß für die Passage durch die Pore sind. Für Claudin-5, welches eine Barriere bildet und die Permeabilität für Fluoreszein reduziert, sind Mutationen im ECL2 bekannt, die die Permeabilität für Fluoreszein und FD-10 aufgrund einer gestörten *trans*-Interaktion erhöhen können (Piehl et al., 2010). Messungen der Fluoreszeinpermeabilität mit Überexpressionsklonen der Claudin-17-Mutanten des ECL2 zeigten keine Erhöhung der Fluoreszeinpermeabilität. Diese funktionell intakte Barriere gegen Fluoreszein konnte durch die bestehende Fähigkeit zur *trans*-Interaktion belegt werden. Nach Transfektion von HEK293-Zellen mit CFP-wtClaudin-17, CFP-Y149A oder CFP-H154A wurden die überexprimierten Fusionsproteine in der Plasmamembran detektiert. Für alle Claudin-17-Konstrukte konnte eine deutliche Anreicherung an gemeinsamen Membranen festgestellt werden, wie es für Claudin-1, -2, -3 und Claudin-5 (eigene Kontrollexperimente, Piontek et al., 2011) beschrieben wurde. Für die beiden ECL2-Mutanten war dies überraschend, insbesondere für die Substitution Y149A, da es sich hier um eine stark konservierte Aminosäure handelt, deren Substitution in Claudin-5 zu einem Verlust der Kontaktanreicherung und *trans*-Interaktion führte (Piontek et al., 2008). In Claudin-17 scheint der Aminosäure Y149, anders als in Claudin-5, keine entscheidende Rolle für die Funktion des ECL2 und der Claudin-17-Anionenpore zuzukommen. Die Veränderungen, die H154A bedingt, konnten nicht vollständig aufgeklärt werden. Sie beruhen jedoch nicht auf einer Fehlfaltung, da sowohl der Transport zur und Einbau in die Tight Junction und die *trans*-Interaktion

möglich war.

Erstmals wurde hier der Einfluss einer Aminosäure im ECL2 eines kanalbildenden Claudins auf dessen Selektivitätseigenschaften gezeigt. Die Rolle des Histidin 154 konnte nicht exakt bestimmt werden. Die *trans*-Interaktion mit Molekülen der gegenüberliegenden Membran ist nicht beeinflusst.

Mit Hilfe ortsgerichteter Mutagenese konnten Determinanten der Claudin-17-Anionenselektivität identifiziert und erstmals gezeigt werden, dass sowohl Aminosäuren im ECL1 als auch im ECL2 für die Permeabilitätseigenschaften eines kanalbildenden Claudins verantwortlich sind.

Allgemein können die Kenntnis und das Verständnis der molekularen Basis der Ionenselektivität von therapeutischem Interesse sein. Die Expression von Claudin-17 im proximalen Tubulus der Niere, dem Ort an dem etwa zwei Drittel der renalen NaCl Resorption stattfindet, macht Claudin-17 zu einem interessanten Target zur Modulation von parazellulären Transportprozessen für Anionen (siehe 1.4.2). In dieser Arbeit identifizierte exponierte und relevante Aminosäuren könnten als Angriffspunkt für einen möglichen Claudin-17-Modulator dienen.

## 4.2 Effekte kanal- und barrierebildender Claudine im 3D-Zellkulturmodell

### 4.2.1 Lumenbildung in Abhängigkeit der Claudinausstattung

In Zysten aus MDCK C7-Zellen hängt die Lumenexpansion vom *trans*- und parazellulären Transport von Ionen und Wasser ab. In dem hier verwendeten systematischen Ansatz wurde der parazelluläre Transportweg durch Transfektion kanal- oder barrierebildender Claudine manipuliert. Die Kanalbildner Claudin-2, -10b, -15 und -17, die eine Reduktion des transepithelialen Widerstands bewirkten und eine spezifische Veränderung des Permeabilitätsverhältnis für Natrium und Chlorid herbeiführten, trugen zu einer starken Expansion des Lumens bei. Die Ergebnisse für Claudin-15 bestätigen Beobachtungen, die bereits von Bagnat et al. gemacht wurden, und konnten hier quantifiziert werden (Bagnat et al., 2007). Dass auch andere kanalbildende Claudine zur Lumenexpansion beitragen, konnte hier erstmals beschrieben werden. Nennenswert ist dabei, dass die Ladungsselektivität der parazellulären Kanäle keine Rolle spielt.

Ein möglicher Mechanismus der Lumenexpansion ist der Transport von Chlorid in das entstehende Zystenlumen durch den apikalen Chloridkanal CFTR und den passiven Transport von Kationen durch die Claudinkanäle in der Tight Junction. Zusätzlich folgt Wasser auf *trans*- und/oder parazellulärem Weg und das Lumen füllt sich. Die Rolle des CFTR wurde experimentell an MDCK-Zysten bereits untersucht: Steviol, ein natürliches Diterpen, inhibiert direkt die Chloridkanalaktivität und bewirkt eine Reduktion der Proteinmenge des CFTR an der apikalen Membran. MDCK-Zysten, die mit Steviol behandelt wurden, zeigten daraufhin einen verringerten Durchmesser (Yuajit et al., 2013). Die Überexpression der funktionell inaktiven

CFTR-Mutante F508del (Deletion des Phenylalanin an Position 508) führt ebenfalls zu Zysten mit verkleinertem Volumen (Li et al., 2012). Umgekehrt führte die Stimulation des CFTR durch Forskolin zu einer Vergrößerung des Zystenvolumens (Buchholz et al., 2011).

Der passive Transport der Gegenionen erfolgte effizienter, wenn sich die Kationenkanäle Claudin-2, -10b oder -15 in der Tight Junction befanden. Dieser Mechanismus lässt sich jedoch nicht auf den Anionenkanal Claudin-17 anwenden, dessen Überexpression ebenfalls eine Lumenexpansion zur Folge hat, so dass hier andere Transportprozesse eine Rolle spielen könnten.

Von den bislang untersuchten Claudinen konnte bisher nur für Claudin-2 die Fähigkeit zum Transport von Wasser beschrieben werden (Rosenthal et al., 2010). Diese Eigenschaft führt jedoch nicht zu einer verstärkten Lumenexpansion im Vergleich zu den anderen Claudinen, denen diese Eigenschaft fehlt, sodass der parazelluläre Wassertransport keine treibende Kraft bei der Lumenexpansion darstellt. Messungen des Wassertransport wurden von Dr. Rosenthal parallel zu den Zystenexperimenten wiederholt und bestätigten die bereits veröffentlichten Ergebnisse, dass Claudin-2, jedoch nicht Claudin-10b und Claudin-17, für Wasser permeabel sind (Rosenthal et al., 2010; Krug et al., 2012).

Claudin-4 und murines Claudin-10a führen nach Überexpression in MDCK C7-Zellen nicht zu einer Reduktion des transepithelialen Widerstands und veränderten die Permeabilität für Chlorid nicht (siehe 3.1.3.1 und 3.2.2, sowie Günzel et al., 2009). Diese unverändert große parazelluläre Barriere, im Vergleich zu MDCK C7-Zellen, die ein kanalbildendes Claudin überexprimieren, korreliert mit dem beobachteten verringerten Zystendurchmesser. In einer Studie, die den Einfluss des Transkriptionsfaktor Grainyhead-like 2 (Grhl2) auf die Lumenformation untersucht, wurde aufgrund einer verstärkten Expression von Claudin-4 ein größeres Zystenlumen beobachtet (Senga et al., 2012). Die Studie verwendete dazu ein Zellsystem aus embryonalen Progenitorzellen der Leber, die auch kanalbildende Claudine (z. B. Claudin-10) exprimieren, aber deren Rolle unvollständig untersucht war. Zudem waren sowohl Claudin-4 und Claudin-8 gleichermaßen in ihrer Genexpression durch Grhl2 erhöht und könnten zu dem von Hou et al. beschriebenen Claudin-4-Anionenkanal führen (Hou et al., 2010).

Somit konnten die bekannten Permeabilitätseigenschaften verschiedener kanal- und barrierebildender Claudine in einem 3D-Zellkulturmodell abgebildet werden. Dabei spielte die Fähigkeit ein leckes Epithel zu bilden die entscheidende Rolle, nicht jedoch die Ionenselektivität und der Transport von Wasser.

#### 4.2.2 Potential des Zystenmodells und Ausblick

Zur Analyse der Lumenexpansion musste sichergestellt werden, dass Kultivierungsbedingungen verwendet werden, die eine korrekte Polarisierung der Zellen erlauben. Wie Martin-Belmonte et al. zeigten, führt eine hohe Zelldichte im Matrigel zu einer verlangsamten Polarisierung,

was die Art der *de novo*-Lumenentstehung von „Hollowing“ (durch Exozytose) zu „Cavitation“ (durch Apoptose) verschob (Martin-Belmonte et al., 2008). Die erfolgreiche Polarisierung konnte durch Färbung mit Aktin und E-Cadherin bestätigt werden (Abb. 37A). Die Färbung der apikalen Membran könnte in MDCK C7-Zellen verbessert werden, indem das Protein Podocalyxin/gp135 anstelle von Aktin gefärbt wird. Die Markierung des Podocalyxin/gp135 würde auch die Dokumentation von Zysten mit multiplen Lumen erleichtern, welche mit der Aktinfärbung in Grenzfällen schwierig war. Allerdings ist die Anwendung von Antikörpern gegen Podocalyxin/gp135 auf MDCK-Zellen beschränkt. Die ebenfalls im Institut verwendeten CaCo-2-Zellen könnten in 3D-Zellkulturexperimenten nicht gefärbt werden, da diese kein Podocalyxin/gp135 in der apikalen Membran exprimieren.

Wie bereits erwähnt (4.2.1), wurden multiple Lumen dokumentiert und aufgezeichnet, sind im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht quantitativ ausgewertet worden, weil die Identifikation mehrerer Lumen mit der Aktinfärbung nicht immer zweifelsfrei gelang. Es konnten außerdem bereits Hinweise auf Cavitation-Prozesse beobachtet werden, wenn kondensierte Zellkerne im Lumen vorhanden waren. Aufgrund der geringen optischen Vergrößerung der Aufnahmen und einer fehlenden spezifischen Färbung für Apoptosemarker (z. B. Caspase-3) wurden diese Beobachtungen nicht näher verfolgt, auch weil der Fokus auf der Veränderung des Zystenlumens durch Manipulation des parazellulären Transportweges lag. Für zukünftige Untersuchungen können diese Beobachtungen als Grundlage dienen.

Trotz dieser Einschränkungen wurde das 3D-Zellkultursystem erfolgreich als Modell zur Analyse des Effekts kanal- und barrierebildender Claudine auf die Lumenexpansion eingesetzt. Eine weitere Optimierung und detaillierte Aufzeichnung zusätzlicher Effekte könnte dieses System als vereinfachtes Modell für die Rolle von Claudinen auf entwicklungsbiologische Prozesse, wie z. B. Neuralrohrentwicklung (Zhang et al., 2010), etablieren und somit ein potentes *in vitro*-System darstellen.

Während die experimentellen Ansätze immer komplexer und detaillierter dokumentiert werden, entstehen eine Vielzahl von Daten. Dies führte bereits dazu, dass zur Zystogenese Computersimulationen entwickelt wurden (Engelberg et al., 2011). *In vitro*-Experimente dienten als Vorlage zur Generierung von „*in silico* MDCK cell analogues“. Diese Simulation bildet sehr potent die *in vitro*-Situation ab, indem eine Vielzahl von experimentell bestimmten Parametern, wie Zellfläche, Zellzahl pro Zyste und Zysten- und Lumenfläche, verrechnet werden. Weiterhin können auch multiple Lumen berücksichtigt und in der Simulation fusioniert werden, wozu die Autoren auch die Tight Junction implementierten, sowohl als Markierung der Polarität als auch für Reorganisationsprozesse bei der Verschmelzung der Lumen (Engelberg et al., 2011). Die hier gezeigte Korrelation des Zystendurchmessers mit der Claudinausstattung in der Tight Junction könnte möglicherweise in einer Erweiterung der Computersimulation Berücksichtigung finden. So wird die Komplexität der Simulation um eine weitere Komponente erhöht, wodurch die Vorhersage der Zystogenese als Beispiel für Entwicklungsprozesse verbessert wird.

## 5 Zusammenfassung

Tight Junctions regulieren den Transport von Soluten und Wasser über den parazellulären Weg von Epithelien und Endothelien. Claudine bilden eine große Familie von Tight Junction-Proteinen, die funktionell in kanal- und barrierebildende Proteine unterteilt werden. Die bisher bekannten kanalbildenden Claudine sind entweder selektiv für Kationen, Anionen und/oder Wasser. Claudine enthalten zwei extrazelluläre Loops (ECL1 und -2), bei denen vor allem die Aminosäuresequenz des ECL1 als determinierend für die Selektivität gilt.

Claudin-17 ist eins von zwei bekannten Claudinen mit eindeutiger Anionenselektivität. Es ist hauptsächlich im proximalen Tubulus der Niere exprimiert. Die molekularen Grundlagen der Anionenselektivität von Claudin-17 waren bisher unbekannt und wurden daher in dieser Arbeit untersucht.

Dazu wurden verschiedene Aminosäuren im ersten und zweiten extrazellulären Loop (ECL1 und ECL2) mittels ortsgerichteter Mutagenese und Generierung stabiler Überexpressionsklone untersucht, indem ihr Einfluss auf die Anionenselektivität gemessen wurde.

Die analysierten Aminosäuren lassen sich in verschiedene Gruppen zusammenfassen:

- Ein Sequenzvergleich mit murinem Claudin-17 wies drei prominente Unterschiede in der Primärstruktur des ECL1 auf. Nach Mutation der im humanen Claudin-17 geladenen Aminosäure Arginin an den Positionen 56, 59 und 61 zu Aminosäuren mit ungeladener Seitenkette konnte keine Veränderung der Anionenselektivität beobachtet werden.
- Von der in kanalbildenden Claudinen am intensivsten untersuchten Position des ECL1, der als Selektivitätsfilter fungiert, wurden die ladungsneutralisierende Mutante K65A, die Mutante zur Ladungsumkehr K65E und die Mutante unter Beibehaltung der Ladung K65R erzeugt und charakterisiert. Jede elektrostatische und strukturelle Veränderung an dieser Position führte dabei zu einem Verlust der anionenselektiven Eigenschaften von Claudin-17.
- Die geladenen Aminosäuren Arginin 31, Glutaminsäure 44, Arginin 45 und Glutaminsäure 48 befinden sich in der N-terminalen Hälfte des ECL1. Eine Ladungsneutralisierung an Position 45 beeinflusste die Claudin-17-Eigenschaften nicht, die Neutralisation der Ladung an den anderen Positionen bewirkte dagegen einen Verlust der Anionenselektivität.
- Zwei Aminosäuren im ECL2 wurden ebenfalls untersucht. Dabei führte die Mutation H154A zu einem Verlust der Kanaleigenschaften von Claudin-17, während die Mutation Y149A weiterhin Anionenselektivität zeigte.

In einem kleineren zweiten Teil der Arbeit wurden die Effekte von Claudin-17 auf die Lumenbildung in einem 3D-Zellkulturmodell mit anderen kanal- und barrierebildenden Claudinen

verglichen. Überexpressionsklone von Claudin-17 wurden in einer Gelmatrix kultiviert, die ein Entstehen dreidimensionaler Strukturen (Zysten) ermöglicht. MDCK C7-Zellen, die Claudin-17 exprimierten, wiesen ein signifikant größeres Zystenlumen auf, als vektortransfizierte Kontrollen. In anderen Ansätzen wurden weitere MDCK C7-Zellen, die kanal- oder barrierebildende Claudine überexprimierten, untersucht. Die Überexpressionsklone der kanalbildenden Claudine-2, -10b und -15, nicht jedoch die des abdichtenden Claudin-4 und des kanalbildenden Claudin-10a zeigten dabei ebenfalls ein vergrößertes Zystenlumen, so dass geschlussfolgert wird, dass Lumenexpansion mit einem niedrigen transepithelialen Widerstand korreliert.

Zusammenfassend stellt das im Rahmen dieser Studie etablierte 3D-Zellkultursystem ein einfaches Modell zur Zystogenese dar, das zur Untersuchung der Effekte von kanal- und barrierebildenden Claudinen auf die Lumenexpansion genutzt werden kann.

Die Befunde des Hauptteils dieser Arbeit lassen sich in den folgenden Kernaussagen zusammenfassen:

Für die Anionenselektivität von Claudin-17 sind im ECL1 die Positionen R31, E44 und E48, sowie die auch für andere kanalbildende Claudine essentielle Position 65 ausschlaggebend.

Entgegen der gängigen Annahme, dass nur der ECL1 die Ladungsselektivität von Claudin-Poren bestimmt, konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass auch eine Aminosäure des ECL2, nämlich H154A, die Ladungsselektivität determiniert. Aus dem Befund, dass beide ECLs für die Kanalselektivität von Claudin-17 ausschlaggebend sind, ergibt sich der Ansatzpunkt für Studien zur Generalisierung dieser Aussage für andere kanalbildende Claudine.

## 6 Summary

Tight junctions regulate the transport of solutes and water through the paracellular pathway of epithelia and endothelia. Claudins are a large family of tight junction proteins which can functionally be categorized in channel- and barrier-forming claudins. Channel-forming claudins exhibit selectivity for anions, cations and/or water. All claudins have two extracellular loops (ECL1 and -2) and it is suggested that amino acid sequence of ECL1 determines selectivity.

Claudin-17 is one of two known claudins with distinct anion selectivity. Its main abundance is in the proximal nephron. The molecular determinants of its anion selectivity are yet unknown and were characterized in this study.

Using site-directed mutagenesis single amino acid substitutions were introduced in ECL1 and ECL2 of claudin-17 to analyze their effect on anion selectivity.

The analyzed amino acids can be grouped as followed:

- Sequence alignment of human and mouse claudin-17 revealed three prominent differences in ECL1 primary structure. Mutating the charged amino acid arginine in the human claudin-17 at positions 56, 59 and 61 to an amino acid with an uncharged side chain had no effect on anion selectivity.
- The most intensively investigated amino acid in channel-forming claudins is position K65 within ECL1. In claudin-17 three different mutants were generated and analyzed. Mutation K65A neutralized the charge, mutation K65E introduced the opposite charge and mutation K65R maintained net charge. Any of these electrical and structural changes lead to a loss of anion-selective properties of claudin-17.
- The charged amino acids arginine 31, glutamic acid 44, arginine 45 and glutamic acid 48 are located in the N-terminal half of ECL1. Charge-neutralizing mutation at position 45 had no effect on claudin-17 properties. However, loss of charge on any other of these positions abolished anion selectivity.
- Two amino acids in ECL2 were investigated as well. Only mutation H154A but not Y149A lead to a loss of anion selectivity of claudin-17.

In a smaller second part of this study, effects of claudin-17-overexpression on cyst lumen expansion were compared with other channel- and barrier-forming claudins. MDCK C7 cells overexpressing claudin-17 were cultured in a gel, which enables the formation of three-dimensional structures (cysts). MDCK C7 cells overexpressing claudin-17 showed significantly enlarged cyst lumen compared to empty vector transfected controls. Additionally, MDCK C7 cells overexpressing channel- or barrier-forming claudins were analyzed. Individual clones overexpressing channel-forming claudins-2, -10b and -15, but not barrier-forming claudin-4 and channel-forming claudin-10a, showed enlarged cyst lumen, hence correlating cyst expansion and low

transepithelial resistance. In summary, the 3D cell culture system used in this study can be considered as a simple model for cystogenesis and is suitable to analyze the effects of channel- and barrier-forming claudins on lumen expansion.

The results of the main part of this study can be comprehended as followed:

Besides position 65 which has been shown to determine charge selectivity in other channel-forming claudins, positions R31, E44 and E48 are also crucial for anion selectivity in claudin-17. Contrary to the assumption that only ECL1 establishes charge selectivity, this study for the first time shows that H154 within ECL2 determines charge selectivity as well. Outgoing from the finding that both ECLs are required for charge selectivity, new aspects for further studies in other channel-forming claudins develop to generalize these results to describe a new concept.

## 7 Literaturverzeichnis

Aijaz, S.; Balda, M. S. & Matter, K. (2006), 'Tight junctions: molecular architecture and function.', *Int Rev Cytol* **248**, 261-298.

Alexandre, M. D.; Jeansonne, B. G.; Renegar, R. H.; Tatum, R. & Chen, Y.-H. (2007), 'The first extracellular domain of claudin-7 affects paracellular Cl<sup>-</sup> permeability.', *Biochem Biophys Res Commun* **357**(1), 87-91.

Alexandre, M. D.; Lu, Q. & Chen, Y.-H. (2005), 'Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl<sup>-</sup> conductance and increases the paracellular Na<sup>+</sup> conductance in LLC-PK1 cells.', *J Cell Sci* **118**(Pt 12), 2683-2693.

Alpern, R. J.; Howlin, K. J. & Preisig, P. A. (1985), 'Active and passive components of chloride transport in the rat proximal convoluted tubule.', *J Clin Invest* **76**(4), 1360-1366.

Amasheh, S.; Fromm, M. & Günzel, D. (2011), 'Claudins of intestine and nephron - a correlation of molecular tight junction structure and barrier function.', *Acta Physiol (Oxf)* **201**(1), 133-140.

Amasheh, S.; Meiri, N.; Gitter, A. H.; Schöneberg, T.; Mankertz, J.; Schulzke, J.-D. & Fromm, M. (2002), 'Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells.', *J Cell Sci* **115**(Pt 24), 4969-4976.

Amasheh, S.; Schmidt, T.; Mahn, M.; Florian, P.; Mankertz, J.; Tavalali, S.; Gitter, A. H.; Schulzke, J.-D. & Fromm, M. (2005), 'Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells.', *Cell Tissue Res* **321**(1), 89-96.

Angelow, S.; Ahlstrom, R. & Yu, A. S. L. (2008), 'Biology of claudins.', *Am J Physiol Renal Physiol* **295**(4), F867-F876.

Angelow, S. & Yu, A. S. L. (2009), 'Structure-function studies of claudin extracellular domains by cysteine-scanning mutagenesis.', *J Biol Chem* **284**(42), 29205-29217.

Angelow, S. & Yu, A. S. L. (2007), 'Claudins and paracellular transport: an update.', *Curr Opin Nephrol Hypertens* **16**(5), 459-464.

Apodaca, G. (2010), 'Opening ahead: early steps in lumen formation revealed.', *Nat Cell Biol* **12**(11), 1026-1028.

Aronson, P. S. & Giebisch, G. (1997), 'Mechanisms of chloride transport in the proximal tubule.', *Am J Physiol* **273**(2 Pt 2), F179-F192.

Baala, L.; Hadj-Rabia, S.; Hamel-Teillac, D.; Hadchouel, M.; Prost, C.; Leal, S. M.; Jacquemin, E.; Sefiani, A.; Prost, Y. D.; Courtois, G.; Munnich, A.; Lyonnet, S. & Vabres, P. (2002), 'Homozygosity mapping of a locus for a novel syndromic ichthyosis to chromosome 3q27-q28.', *J Invest Dermatol* **119**(1), 70-76.

Bagnat, M.; Cheung, I. D.; Mostov, K. E. & Stainier, D. Y. R. (2007), 'Genetic control of single lumen formation in the zebrafish gut.', *Nat Cell Biol* **9**(8), 954-960.

Balda, M. S. & Matter, K. (2008), 'Tight junctions at a glance.', *J Cell Sci* **121**(Pt 22), 3677-3682.

Balda, M. S.; Whitney, J. A.; Flores, C.; González, S.; Cerejido, M. & Matter, K. (1996), 'Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein.', *J Cell Biol* **134**(4), 1031-1049.

Balkovetz, D. F. (2009), 'Tight junction claudins and the kidney in sickness and in health.', *Biochim Biophys Acta* **1788**(4), 858-863.

Balkovetz, D. F. (2006), 'Claudins at the gate: determinants of renal epithelial tight junction paracellular permeability.', *Am J Physiol Renal Physiol* **290**(3), F572-F579.

Blasig, I. E.; Bellmann, C.; Cording, J.; Vecchio, G. D.; Zwanziger, D.; Huber, O. & Haseloff, R. F. (2011), 'Occludin protein family: oxidative stress and reducing conditions.', *Antioxid Redox Signal* **15**(5), 1195-1219.

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.', *Eur J Cell Biol* **81**(5), 253-263.

Bryant, D. M.; Datta, A.; Rodríguez-Fraticelli, A. E.; Peränen, J.; Martín-Belmonte, F. & Mostov, K. E. (2010), 'A molecular network for de novo generation of the apical surface and lumen.', *Nat Cell Biol* **12**(11), 1035-1045.

Buchholz, B.; Teschemacher, B.; Schley, G.; Schillers, H. & Eckardt, K.-U. (2011), 'Formation of cysts by principal-like MDCK cells depends on the synergy of cAMP- and ATP-mediated fluid secretion.', *J Mol Med (Berl)* **89**(3), 251-261.

Capaldo, C. T. & Nusrat, A. (2009), 'Cytokine regulation of tight junctions.', *Biochim Biophys Acta* **1788**(4), 864-871.

Chiba, H.; Osanai, M.; Murata, M.; Kojima, T. & Sawada, N. (2008), 'Transmembrane proteins of tight junctions.', *Biochim Biophys Acta* **1778**(3), 588-600.

Claude, P. (1978), 'Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens.', *J Membr Biol* **39**(2-3), 219-232.

Colegio, O. R.; Itallie, C. M. V.; McCrea, H. J.; Rahner, C. & Anderson, J. M. (2002), 'Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells.', *Am J Physiol Cell Physiol* **283**(1), C142-C147.

Colegio, O. R.; Itallie, C. V.; Rahner, C. & Anderson, J. M. (2003), 'Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture.', *Am J Physiol Cell Physiol* **284**(6), C1346-C1354.

Coyne, C. B.; Gambling, T. M.; Boucher, R. C.; Carson, J. L. & Johnson, L. G. (2003), 'Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability.', *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**(5), L1166-L1178.

Cukierman, L.; Meertens, L.; Bertaux, C.; Kajumo, F. & Dragic, T. (2009), 'Residues in a highly conserved claudin-1 motif are required for hepatitis C virus entry and mediate the formation of cell-cell contacts.', *J Virol* **83**(11), 5477-5484.

Dani, J. A. (1986), 'Ion-channel entrances influence permeation. Net charge, size, shape, and binding considerations.', *Biophys J* **49**(3), 607-618.

Datta, A.; Bryant, D. M. & Mostov, K. E. (2011), 'Molecular regulation of lumen morphogenesis.', *Curr Biol* **21**(3), R126-R136.

Daugherty, B. L.; Ward, C.; Smith, T.; Ritzenthaler, J. D. & Koval, M. (2007), 'Regulation of heterotypic claudin compatibility.', *J Biol Chem* **282**(41), 30005-30013.

Davis, C.; Harris, H. J.; Hu, K.; Drummer, H. E.; McKeating, J. A.; Mullins, J. G. L. & Balfe, P. (2012), 'In silico directed mutagenesis identifies the CD81/claudin-1 hepatitis C virus receptor interface.', *Cell Microbiol* **14**(12), 1892-1903.

DeBenedetto, A.; Rafaels, N. M.; McGirt, L. Y.; Ivanov, A. I.; Georas, S. N.; Cheadle, C.; Berger, A. E.; Zhang, K.; Vidyasagar, S.; Yoshida, T.; Boguniewicz, M.; Hata, T.; Schneider, L. C.; Hanifin, J. M.; Gallo, R. L.; Novak, N.; Weidinger, S.; Beaty, T. H.; Leung, D. Y. M.; Barnes, K. C. & Beck, L. A. (2011), 'Tight junction defects in patients with atopic dermatitis.', *J Allergy Clin Immunol* **127**(3), 773-86.e1-7.

Diamond, J. M. (1977), 'Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence.', *Physiologist* **20**(1), 10-18.

Dörfel, M. J. & Huber, O. (2012), 'Modulation of tight junction structure and function by kinases and phosphatases targeting occludin.', *J Biomed Biotechnol* **2012**, 807356.

Engelberg, J. A.; Datta, A.; Mostov, K. E. & Hunt, C. A. (2011), 'MDCK cystogenesis driven by cell stabilization within computational analogues.', *PLoS Comput Biol* **7**(4), e1002030.

Evans, M. J.; von Hahn, T.; Tscherne, D. M.; Syder, A. J.; Panis, M.; Wölk, B.; Hatzioannou, T.; McKeating, J. A.; Bieniasz, P. D. & Rice, C. M. (2007), 'Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry.', *Nature* **446**(7137), 801-805.

Farquhar, M. G. & Palade, G. E. (1963), 'Junctional complexes in various epithelia.', *J Cell Biol* **17**, 375-412.

Feldman, G. J.; Mullin, J. M. & Ryan, M. P. (2005), 'Occludin: structure, function and regulation.', *Adv Drug Deliv Rev* **57**(6), 883-917.

Feldmeyer, L.; Huber, M.; Fellmann, F.; Beckmann, J. S.; Frenk, E. & Hohl, D. (2006), 'Confirmation of the origin of NISCH syndrome.', *Hum Mutat* **27**(5), 408-410.

Fromm, M. (2010), Kapitel 3 'Transport in Membranen und Epithelien.', in: *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*, Schmidt, R. F.; Lang, F.; Heckmann, M. (Hrsg.), 31 Auflage, Springer Medizin, Heidelberg, S. 36-48 und 895-897.

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.', *J Cell Biol* **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.', *J Cell Biol* **156**(6), 1099-1111.

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 Pt 2), 1777-1788.

Furuse, M. & Tsukita, S. (2006), 'Claudins in occluding junctions of humans and flies.', *Trends Cell Biol* **16**(4), 181-188.

Gekle, M.; Wunsch, S.; Oberleithner, H. & Silbernagl, S. (1994), 'Characterization of two MDCK-cell subtypes as a model system to study principal cell and intercalated cell properties.', *Pflugers Arch* **428**(2), 157-162.

González-Mariscal, L.; Betanzos, A.; Nava, P. & Jaramillo, B. E. (2003), 'Tight junction proteins.', *Prog Biophys Mol Biol* **81**(1), 1-44.

Guillemot, L.; Paschoud, S.; Pulimeno, P.; Foglia, A. & Citi, S. (2008), 'The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center.', *Biochim Biophys Acta* **1778**(3), 601-613.

Günzel, D.; Amasheh, S.; Pfaffenbach, S.; Richter, J. F.; Kausalya, P. J.; Hunziker, W. & Fromm, M. (2009), 'Claudin-16 affects transcellular Cl<sup>-</sup> secretion in MDCK cells.', *J Physiol* **587**(Pt 15), 3777-3793.

Günzel, D. & Fromm, M. (2012), 'Claudins and other tight junction proteins.', *Compr Physiol* **2**(3), 1819-1852.

Günzel, D.; Stuver, M.; Kausalya, P. J.; Haisch, L.; Krug, S. M.; Rosenthal, R.; Meij, I. C.; Hunziker, W.; Fromm, M. & Müller, D. (2009), 'Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function.', *J Cell Sci* **122**(Pt 10), 1507-1517.

Günzel, D. & Yu, A. S. L. (2013), 'Claudins and the modulation of tight junction permeability.', *Physiol Rev* **93**(2), 525-569.

Günzel, D. & Yu, A. S. L. (2009), 'Function and regulation of claudins in the thick ascending limb of Henle.', *Pflugers Arch* **458**(1), 77-88.

Hartsock, A. & Nelson, W. J. (2008), 'Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton.', *Biochim Biophys Acta* **1778**(3), 660-669.

Heller, F.; Florian, P.; Bojarski, C.; Richter, J.; Christ, M.; Hillenbrand, B.; Mankertz, J.; Gitter, A. H.; Bürgel, N.; Fromm, M.; Zeitz, M.; Fuss, I.; Strober, W. & Schulzke, J.-D. (2005), 'Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution.', *Gastroenterology* **129**(2), 550-564.

Hou, J.; Gomes, A. S.; Paul, D. L. & Goodenough, D. A. (2006), 'Study of claudin function by RNA interference.', *J Biol Chem* **281**(47), 36117-36123.

Hou, J.; Paul, D. L. & Goodenough, D. A. (2005), 'Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions.', *J Cell Sci* **118**(Pt 21), 5109-5118.

Hou, J.; Renigunta, A.; Konrad, M.; Gomes, A. S.; Schneeberger, E. E.; Paul, D. L.; Waldegger, S. & Goodenough, D. A. (2008), 'Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex.', *J Clin Invest* **118**(2), 619-628.

Hou, J.; Renigunta, A.; Yang, J. & Waldegger, S. (2010), 'Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(42), 18010-18015.

Hu, Y.-H.; Warnatz, H.-J.; Vanhecke, D.; Wagner, F.; Fiebitz, A.; Thamm, S.; Kahlem, P.; Lehrach, H.; Yaspo, M.-L. & Janitz, M. (2006), 'Cell array-based intracellular localization screening reveals novel functional features of human chromosome 21 proteins.', *BMC Genomics* **7**, 155.

Ikenouchi, J.; Furuse, M.; Furuse, K.; Sasaki, H.; Tsukita, S. & Tsukita, S. (2005), 'Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells.', *J Cell Biol* **171**(6), 939-945.

Ikenouchi, J.; Sasaki, H.; Tsukita, S.; Furuse, M. & Tsukita, S. (2008), 'Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin.', *Mol Biol Cell* **19**(11), 4687-4693.

Inai, T.; Kobayashi, J. & Shibata, Y. (1999), 'Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells.', *Eur J Cell Biol* **78**(12), 849-855.

Kausalya, P. J.; Amasheh, S.; Günzel, D.; Wurps, H.; Müller, D.; Fromm, M. & Hunziker, W. (2006), 'Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg<sup>2+</sup> transport function of Claudin-16.', *J Clin Invest* **116**(4), 878-891.

Kirschner, N.; Rosenthal, R.; Furuse, M.; Moll, I.; Fromm, M. & Brandner, J. M. (2013), 'Contribution of tight junction proteins to ion, macromolecule, and water barrier in keratinocytes.', *J Invest Dermatol* **133**(5), 1161-1169.

Kiuchi-Saishin, Y.; Gotoh, S.; Furuse, M.; Takasuga, A.; Tano, Y. & Tsukita, S. (2002), 'Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments.', *J Am Soc Nephrol* **13**(4), 875-886.

Krause, G.; Winkler, L.; Mueller, S. L.; Haseloff, R. F.; Piontek, J. & Blasig, I. E. (2008), 'Structure and function of claudins.', *Biochim Biophys Acta* **1778**(3), 631-645.

Krug, S. M.; Amasheh, M.; Dittmann, I.; Christoffel, I.; Fromm, M. & Amasheh, S. (2013), 'Sodium caprate as an enhancer of macromolecule permeation across tricellular tight junctions of intestinal cells.', *Biomaterials* **34**(1), 275-282.

Krug, S. M.; Amasheh, S.; Richter, J. F.; Milatz, S.; Günzel, D.; Westphal, J. K.; Huber, O.; Schulzke, J.-D. & Fromm, M. (2009), 'Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability.', *Mol Biol Cell* **20**(16), 3713-3724.

Krug, S. M.; Günzel, D.; Conrad, M. P.; Lee, I.-F. M.; Amasheh, S.; Fromm, M. & Yu, A. S. L. (2012), 'Charge-selective claudin channels.', *Ann N Y Acad Sci* **1257**, 20-28.

Krug, S. M.; Günzel, D.; Conrad, M. P.; Rosenthal, R.; Fromm, A.; Amasheh, S.; Schulzke, J.

D. & Fromm, M. (2012), 'Claudin-17 forms tight junction channels with distinct anion selectivity.', *Cell Mol Life Sci* **69**(16), 2765-2778.

Lee, D. B. N.; Huang, E. & Ward, H. J. (2006), 'Tight junction biology and kidney dysfunction.', *Am J Physiol Renal Physiol* **290**(1), F20-F34.

Li, C. & Naren, A. P. (2010), 'CFTR chloride channel in the apical compartments: spatiotemporal coupling to its interacting partners.', *Integr Biol (Camb)* **2**(4), 161-177.

Li, H.; Yang, W.; Mendes, F.; Amaral, M. D. & Sheppard, D. N. (2012), 'Impact of the cystic fibrosis mutation F508del-CFTR on renal cyst formation and growth.', *Am J Physiol Renal Physiol* **303**(8), F1176-F1186.

Li, J.; Zhuo, M.; Pei, L. & Yu, A. S. L. (2013), 'Conserved aromatic residue confers cation selectivity in claudin-2 and claudin-10b.', *J Biol Chem* **288**(31), 22790-22797.

Li, Y.; Fanning, A. S.; Anderson, J. M. & Lavie, A. (2005), 'Structure of the conserved cytoplasmic C-terminal domain of occludin: identification of the ZO-1 binding surface.', *J Mol Biol* **352**(1), 151-164.

Loh, Y. H.; Christoffels, A.; Brenner, S.; Hunziker, W. & Venkatesh, B. (2004), 'Extensive expansion of the claudin gene family in the teleost fish, *Fugu rubripes*.', *Genome Res* **14**(7), 1248-1257.

Lubarsky, B. & Krasnow, M. A. (2003), 'Tube morphogenesis: making and shaping biological tubes.', *Cell* **112**(1), 19-28.

Mankertz, J.; Waller, J. S.; Hillenbrand, B.; Tavalali, S.; Florian, P.; Schöneberg, T.; Fromm, M. & Schulzke, J.-D. (2002), 'Gene expression of the tight junction protein occludin includes differential splicing and alternative promoter usage.', *Biochem Biophys Res Commun* **298**(5), 657-666.

Mao, Z.; Streets, A. J. & Ong, A. C. M. (2011), 'Thiazolidinediones inhibit MDCK cyst growth through disrupting oriented cell division and apicobasal polarity.', *Am J Physiol Renal Physiol* **300**(6), F1375-F1384.

Martin-Belmonte, F.; Gassama, A.; Datta, A.; Yu, W.; Rescher, U.; Gerke, V. & Mostov, K. (2007), 'PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42.', *Cell* **128**(2), 383-397.

Martín-Belmonte, F.; Yu, W.; Rodríguez-Fraticelli, A. E.; Ewald, A. J.; Ewald, A.; Werb, Z.; Alonso, M. A. & Mostov, K. (2008), 'Cell-polarity dynamics controls the mechanism of lumen formation in epithelial morphogenesis.', *Curr Biol* **18**(7), 507-513.

Masuda, S.; Oda, Y.; Sasaki, H.; Ikenouchi, J.; Higashi, T.; Akashi, M.; Nishi, E. & Furuse, M. (2011), 'LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells.', *J Cell Sci* **124**(Pt 4), 548-555.

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.', *J Cell Sci* **109**( Pt 9), 2287-2298.

Meier, P. (1982), 'Two-parameter debye-hückel approximation for the evaluation of mean activity coefficients of 109 electrolytes', *Analytica Chimica Acta* **136**(0), 363-368.

Milatz, S.; Krug, S. M.; Rosenthal, R.; Günzel, D.; Müller, D.; Schulzke, J.-D.; Amasheh, S. & Fromm, M. (2010), 'Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes.', *Biochim Biophys Acta* **1798**(11), 2048-2057.

Mineta, K.; Yamamoto, Y.; Yamazaki, Y.; Tanaka, H.; Tada, Y.; Saito, K.; Tamura, A.; Igarashi, M.; Endo, T.; Takeuchi, K. & Tsukita, S. (2011), 'Predicted expansion of the claudin multigene family.', *FEBS Lett* **585**(4), 606-612.

Muto, S.; Hata, M.; Taniguchi, J.; Tsuruoka, S.; Moriwaki, K.; Saitou, M.; Furuse, K.; Sasaki, H.; Fujimura, A.; Imai, M.; Kusano, E.; Tsukita, S. & Furuse, M. (2010), 'Claudin-2-deficient mice are defective in the leaky and cation-selective paracellular permeability properties of renal proximal tubules.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(17), 8011-8016.

Nelson, K. S.; Furuse, M. & Beitel, G. J. (2010), 'The Drosophila Claudin Kune-kune is required for septate junction organization and tracheal tube size control.', *Genetics* **185**(3), 831-839.

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.', *J Cell*

*Biol* **161**(3), 653-660.

O'Brien, L. E.; Jou, T. S.; Pollack, A. L.; Zhang, Q.; Hansen, S. H.; Yurchenco, P. & Mostov, K. E. (2001), 'Rac1 orientates epithelial apical polarity through effects on basolateral laminin assembly.', *Nat Cell Biol* **3**(9), 831-838.

Piehl, C.; Piontek, J.; Cording, J.; Wolburg, H. & Blasig, I. E. (2010), 'Participation of the second extracellular loop of claudin-5 in paracellular tightening against ions, small and large molecules.', *Cell Mol Life Sci* **67**(12), 2131-2140.

Piontek, J.; Fritzsche, S.; Cording, J.; Richter, S.; Hartwig, J.; Walter, M.; Yu, D.; Turner, J. R.; Gehring, C.; Rahn, H.-P.; Wolburg, H. & Blasig, I. E. (2011), 'Elucidating the principles of the molecular organization of heteropolymeric tight junction strands.', *Cell Mol Life Sci* **68**(23), 3903-3918.

Piontek, J.; Winkler, L.; Wolburg, H.; Müller, S. L.; Zuleger, N.; Piehl, C.; Wiesner, B.; Krause, G. & Blasig, I. E. (2008), 'Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins.', *FASEB J* **22**(1), 146-158.

Planelles, G. (2004), 'Chloride transport in the renal proximal tubule.', *Pflugers Arch* **448**(6), 561-570.

Poliak, S. & Peles, E. (2003), 'The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier.', *Nat Rev Neurosci* **4**(12), 968-980.

Rachow, S.; Zorn-Kruppa, M.; Ohnemus, U.; Kirschner, N.; Sy, S. V.; von den Driesch, P.; Börnchen, C.; Eberle, J.; Mildner, M.; Vettorazzi, E.; Rosenthal, R.; Moll, I. & Brandner, J. M. (2013), 'Occludin is involved in adhesion, apoptosis, differentiation and Ca<sup>2+</sup>-homeostasis of human keratinocytes: implications for tumorigenesis.', *PLoS One* **8**(2), e55116.

Rahner, C.; Mitic, L. L. & Anderson, J. M. (2001), 'Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut.', *Gastroenterology* **120**(2), 411-422.

Riazuddin, S.; Ahmed, Z. M.; Fanning, A. S.; Lagziel, A.; ichiro Kitajiri, S.; 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.', *Am J Hum Genet* **79**(6), 1040-1051.

Rosenthal, R.; Milatz, S.; Krug, S. M.; Oelrich, B.; Schulzke, J.-D.; Amasheh, S.; Günzel, D. & Fromm, M. (2010), 'Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel.', *J Cell Sci* **123**(Pt 11), 1913-1921.

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.', *Mol Biol Cell* **11**(12), 4131-4142.

Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; Tinevez, J.-Y.; White, D. J.; Hartenstein, V.; Eliceiri, K.; Tomancak, P. & Cardona, A. (2012), 'Fiji: an open-source platform for biological-image analysis.', *Nat Methods* **9**(7), 676-682.

Schneeberger, E. E. & Lynch, R. D. (2004), 'The tight junction: a multifunctional complex.', *Am J Physiol Cell Physiol* **286**(6), C1213-C1228.

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.', *Biochim Biophys Acta* **1669**(1), 34-42.

Senga, K.; Mostov, K. E.; Mitaka, T.; Miyajima, A. & Tanimizu, N. (2012), 'Grainyhead-like 2 regulates epithelial morphogenesis by establishing functional tight junctions through the organization of a molecular network among claudin3, claudin4, and Rab25.', *Mol Biol Cell* **23**(15), 2845-2855.

Shen, L.; Weber, C. R.; Raleigh, D. R.; Yu, D. & Turner, J. R. (2011), 'Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo.', *Annu Rev Physiol* **73**, 283-309.

Shen, L.; Weber, C. R. & Turner, J. R. (2008), 'The tight junction protein complex undergoes rapid and continuous molecular remodeling at steady state.', *J Cell Biol* **181**(4), 683-695.

Staehein, L. A.; Mukherjee, T. M. & Williams, A. W. (1969), 'Freeze-etch appearance of the tight junctions in the epithelium of small and large intestine of mice.', *Protoplasma* **67**(2), 165-

184.

Tamura, A.; Kitano, Y.; Hata, M.; Katsuno, T.; Moriwaki, K.; Sasaki, H.; Hayashi, H.; Suzuki, Y.; Noda, T.; Furuse, M.; Tsukita, S. & Tsukita, S. (2008), 'Megaintestine in claudin-15-deficient mice.', *Gastroenterology* **134**(2), 523-534.

Tournaire-Roux, C.; Sutka, M.; Javot, H.; Gout, E.; Gerbeau, P.; Luu, D.-T.; Bligny, R. & Maurel, C. (2003), 'Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins.', *Nature* **425**(6956), 393-397.

Tsukita, S. & Furuse, M. (1998), 'Overcoming barriers in the study of tight junction functions: from occludin to claudin.', *Genes Cells* **3**(9), 569-573.

Tsukita, S.; Furuse, M. & Itoh, M. (2001), 'Multifunctional strands in tight junctions.', *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(4), 285-293.

VanItallie, C. M. & Anderson, J. M. (2006), 'Claudins and epithelial paracellular transport.', *Annu Rev Physiol* **68**, 403-429.

VanItallie, C. M. & Anderson, J. M. (2004), 'The molecular physiology of tight junction pores.', *Physiology (Bethesda)* **19**, 331-338.

VanItallie, C. M. & Anderson, J. M. (1997), 'Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts.', *J Cell Sci* **110**(Pt 9), 1113-1121.

VanItallie, C. M.; Fanning, A. S. & Anderson, J. M. (2003), 'Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins.', *Am J Physiol Renal Physiol* **285**(6), F1078-F1084.

VanItallie, C. M.; Gambling, T. M.; Carson, J. L. & Anderson, J. M. (2005), 'Palmitoylation of claudins is required for efficient tight-junction localization.', *J Cell Sci* **118**(Pt 7), 1427-1436.

VanItallie, C. M.; Mitic, L. L. & Anderson, J. M. (2011), 'Claudin-2 forms homodimers and is a component of a high molecular weight protein complex.', *J Biol Chem* **286**(5), 3442-3450.

VanItallie, C. M.; Rahner, C. & Anderson, J. M. (2001), 'Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability.', *J Clin Invest* **107**(10), 1319-1327.

VanItallie, C. M.; Rogan, S.; Yu, A.; Vidal, L. S.; Holmes, J. & Anderson, J. M. (2006), 'Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities.', *Am J Physiol Renal Physiol* **291**(6), F1288-F1299.

Veshnyakova, A.; Krug, S. M.; Mueller, S. L.; Piontek, J.; Protze, J.; Fromm, M. & Krause, G. (2012), 'Determinants contributing to claudin ion channel formation.', *Ann N Y Acad Sci* **1257**, 45-53.

Veshnyakova, A.; Protze, J.; Rossa, J.; Blasig, I. E.; Krause, G. & Piontek, J. (2010), 'On the interaction of Clostridium perfringens enterotoxin with claudins.', *Toxins (Basel)* **2**(6), 1336-1356.

Watson, R. E. B.; Poddar, R.; Walker, J. M.; McGuill, I.; Hoare, L. M.; Griffiths, C. E. M. & O'Neill, C. A. (2007), 'Altered claudin expression is a feature of chronic plaque psoriasis.', *J Pathol* **212**(4), 450-458.

Weber, C. R. (2012), 'Dynamic properties of the tight junction barrier.', *Ann N Y Acad Sci* **1257**, 77-84.

Wen, H.; Watry, D. D.; Marcondes, M. C. G. & Fox, H. S. (2004), 'Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: role of the first extracellular domain of claudin-5.', *Mol Cell Biol* **24**(19), 8408-8417.

Wolburg, H.; Wolburg-Buchholz, K.; Kraus, J.; Rascher-Eggstein, G.; Liebner, S.; Hamm, S.; Duffner, F.; Grote, E.-H.; Risau, W. & Engelhardt, B. (2003), 'Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme.', *Acta Neuropathol* **105**(6), 586-592.

Yamauchi, K.; Rai, T.; Kobayashi, K.; Sohara, E.; Suzuki, T.; Itoh, T.; Suda, S.; Hayama, A.; Sasaki, S. & Uchida, S. (2004), 'Disease-causing mutant WNK4 increases paracellular chloride permeability and phosphorylates claudins.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(13), 4690-4694.

- Yamazaki, Y.; Tokumasu, R.; Kimura, H. & Tsukita, S. (2011), 'Role of claudin species-specific dynamics in reconstitution and remodeling of the zonula occludens.', *Mol Biol Cell* **22**(9), 1495-1504.
- Yu, A. S. L.; Cheng, M. H.; Angelow, S.; Günzel, D.; Kanzawa, S. A.; Schneeberger, E. E.; Fromm, M. & Coalson, R. D. (2009), 'Molecular basis for cation selectivity in claudin-2-based paracellular pores: identification of an electrostatic interaction site.', *J Gen Physiol* **133**(1), 111-127.
- Yu, A. S. L.; Cheng, M. H. & Coalson, R. D. (2010), 'Calcium inhibits paracellular sodium conductance through claudin-2 by competitive binding.', *J Biol Chem* **285**(47), 37060-37069.
- Yu, A. S. L.; Enck, A. H.; Lencer, W. I. & Schneeberger, E. E. (2003), 'Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation.', *J Biol Chem* **278**(19), 17350-17359.
- Yuajit, C.; Homvisasevongsa, S.; Chatsudthipong, L.; Soodvilai, S.; Muanprasat, C. & Chatsudthipong, V. (2013), 'Steviol reduces MDCK Cyst formation and growth by inhibiting CFTR channel activity and promoting proteasome-mediated CFTR degradation.', *PLoS One* **8**(3), e58871.
- Zeissig, S.; Bürgel, N.; Günzel, 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.
- Zhang, J.; Piontek, J.; Wolburg, H.; Piehl, C.; Liss, M.; Otten, C.; Christ, A.; Willnow, T. E.; Blasig, I. E. & Abdelilah-Seyfried, S. (2010), 'Establishment of a neuroepithelial barrier by Claudin5a is essential for zebrafish brain ventricular lumen expansion.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(4), 1425-1430.

## 8 Verzeichnis der eigenen Publikationen

Krug, S. M.; Günzel, D.; **Conrad, M. P.**; Rosenthal, R.; Fromm, A.; Amasheh, S.; Schulzke, J.-D. und Fromm M. (2012), 'Claudin-17 forms tight junction channels with distinct anion selectivity.', *Cell Mol Life Sci* **69**(16), 2765-2778

Krug, S. M.; Günzel, D.; **Conrad, M. P.**; Lee, IM.; Amasheh, S.; Fromm, M. und Yu, A. S. L. (2012), 'Charge-selective claudin channels.', *Ann N.Y. Acad Sci* **1257**, 20-28

**Conrad, M. P.**; Fromm, M.; Schulzke, J.-D. und Krug, S. M. (2011), 'Barrier function of the tight junction protein tricellulin.', *Z. Gastroenterologie* **49**, S12-S14 (extended congress abstract)

Heyne, K.; Armbruster, V.; Schneider, J.; **Conrad, M.**; Raulf, N.; Schüle, R. und Römer, K. (2010), 'NIR, an inhibitor of histone acetyltransferases, regulates transcription factor TAp63 and is controlled by the cell cycle.', *Nucl Acids Res* **38**(10), 3159-3171

Heyne, K.; **Conrad, M.**; Dohmen, D.; Huwer, J.; Assmann, G. und Römer, K. (2010), 'Differential basal levels of MDM-2 transcription induced by p53-P72 and p53-R72.', *Cell Cycle* **9**(19), 4028-4030

### **Kongressbeiträge (Vortrag):**

25<sup>th</sup> Meeting European Intestinal Transport Group (EITG), Bad Herrenalb, 11.04.- 14.04.2013

Conrad MP., Günzel D., Fromm M., Krug SM. (2013). Molecular determinants of claudin-17 anion-selective channel function

### **Kongressteilnahmen:**

III. Kloster Arnsburg -Meeting Intestinale Mucosafunktion, 9./10. Juli 2010

2. International Conference on „Barriers and channels formed by tight junction proteins“, Berlin, 22.09.- 24.09.2011

## **9 Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## 10 Anhang

### 10.1 Claudin-17-Überexpressionklone

Klon	$P_{Cl}/P_{Na}$	SEM	TER [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]	SEM
K65E#0604	0,74	0,004	783,16	140,35
K65E#13	0,82	0,03	1166,19	163,09
K65E#0601	0,67	0,03	1688,54	79,82
K65A#1103	0,98	0,004	1037,18	195,45
K65A#6	0,93	0,02	1944,30	188,40
K65A#14	0,95	0,01	1284,40	203,81
K65A#18	0,94	0,03	1300,98	121,23
K65R#1205	0,97	0,01	1701,81	135,31
K65R#1204	0,89	0,01	1360,87	190,40
R31E#0108	0,97	0,01	1255,03	139,17
R31E#0514	0,94	0,01	809,96	112,12
R31E#0110	0,96	0,01	1021,20	250,75
E44A#0405	0,85	0,06	1778,84	134,71
E44A#0904	0,80	0,07	2289,66	196,65
R45A#0413	1,33	0,09	1561,40	196,06
R45A#0412	1,49	0,09	1265,96	185,02
E48K#20	0,92	0,006	1551,83	151,81
E48Q#21	0,95	0,02	1292,08	126,37
E48Q#2	1,04	-	730,34	-
mClaudin17#0602	1,28	0,05	1408,12	168,10
mClaudin-17#0814	1,23	0,07	1724,54	42,01
R56A#12	1,20	0,02	1211,91	168,27
R56T#3	1,21	0,02	1043,24	72,82
R56T#4	1,11	0,02	1143,21	159,00
R56T#6	1,18	-	688,60	-
R59A#1003	1,86	0,10	1322,32	73,83
R61A#0305	1,22	0,06	1352,86	206,19
R61A#0303	1,19	0,02	925,08	87,70
R61A#0914	1,26	0,03	1443,07	165,56
Y149A#0814	1,23	0,05	2231,99	294,12
Y149A#0204	1,12	0,02	1016,07	164,81
H154A#0305	0,92	0,02	1665,51	147,73
H154A#308	0,91	0,01	1944,65	570,23

## 10.2 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère oder Alanin oder Fläche
Abb	Abbildung
Amp	Ampicillin
ap	apikal
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp, kb	Basenpaar, Kilobasen
bl	basolateral
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovine serum albumine
°C	Grad Celsius
c	Konzentration
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CFP	„cyan fluorescent protein“
Cldn	Claudin
C-LSM	konfokale Laser Scanning Mikroskopie
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Δ	Delta, „Differenz“
d	Schichtdicke
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„Desoxyribonucleinacid“, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	„double-strand“, Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Extracellular loop, „enhanced chemoluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ε	Extinktionskoeffizient
F	Faradaykonstante oder Phenylalanin
FKS	Fötales Kälberserum
for, forw	„forward“
g	Gramm, Fallbeschleunigung
G	Glycin oder Guanin oder Leitfähigkeit

h	Stunde
HCO <sub>3</sub>	Bicarbonat, Hydrogencarbonat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HEK	„human embryonal kidney“
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	bidestilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
I <sub>sc</sub>	Kurzschlussstrom
IF	Immunfluoreszenz
J	Flux
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
λ	Lambda, „Wellenlänge“
LB	„lysogeny broth“
LJP	Liquid Junction Potential
μ	mikro
l	Liter
m	Milli
M	Molar, Methionin
MAGUK	Membrane-associated guanylate kinase homologues
MDCK	„Madin-Darby canine kidney“
MEM	„minimum essentiell medium“
min	Minute
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MW	„molecular weight“, Molekulargewicht
n	nano
n. a.	nicht analysiert
NaAc	Natriumacetat
NaAz	Natriumazid
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaNO <sub>3</sub>	Natriumnitrat
NaOH	Natriumhydroxid
NaSCN	Natriumthiocyanat
n. s.	nicht signifikant
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
Ω	Ohm
o/n	„over night“, über Nacht
Occl	Occludin

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PVDF	Polyvinylidenefluorid
P <sub>X</sub>	Permeabilität (für einen Stoff X)
R	Widerstand oder Arginin oder universelle Gaskonstante
rcf	„relative centrifugal force“
RIPA	„radioimmunoprecipitation assay“
RNA	„ribonucleinacid“, Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease A
rpm	„rotations per minute“, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
rev	„reverse“
S	Siemens, Serin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	„standard error of the mean“, Standardfehler
s	Sekunde
SNP	„single nucleotide polymorphism“
SOC	„super optimal broth“
ss	„single-strand“, Einzelstrang
t	Zeit
T	Temperatur oder Threonin
TAE	Tris Acetat EDTA
TBST	„Tris buffered saline“, Tris-gepufferte Salzlösung, mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TER	transepithelialer Widerstand
TJ	Tight Junction
Tric	Tricellulin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	„Unit“, Einheit oder Spannung
UV	Ultraviolett
V	Volt, Valin
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
WB	Western Blot
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
ZO	Zonula Occludens

<b>Aminosäure, DNA-Base</b>	<b>Dreibuchstabencode</b>	<b>Einbuchstabencode</b>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
Adenin	-	A
Cytosin	-	C
Guanin	-	G
Thymin	-	T

### 10.3 Vektorkarten

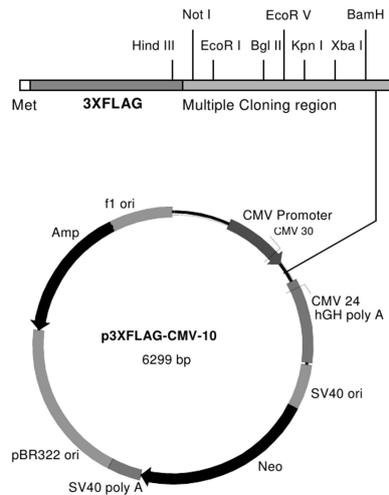


Abbildung 38: **Vektorkarte des Expressionsvektor pCMV10.** Ausschnitt der Multiple Cloning region und schematische Darstellung des Expressionsvektor pCMV10 (im Vektor pCMV4 ist der FLAG-Tag nur einmal statt dreimal vorhanden).

CMV promoter: bases 209-863  
 T7 promoter: bases 864-882  
 Polylinker: bases 889-994  
 Sp6 promoter: bases 999-1016  
 BGH poly A: bases 1018-1249  
 SV40 promoter: bases 1790-2115  
 SV40 origin of replication: bases 1984-2069  
 Neomycin ORF: bases 2151-2945  
 SV40 poly A: bases 3000-3372  
 ColE1 origin: bases 3632-4305  
 Ampicillin ORF: bases 4450-5310

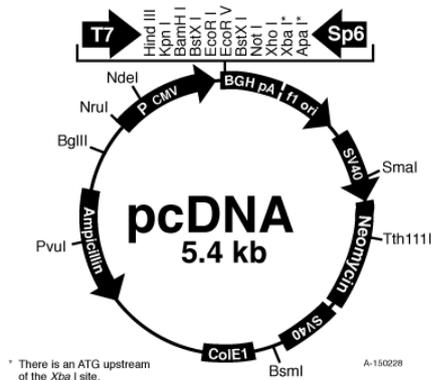


Abbildung 39: **Vektorkarte des Expressionsvektor pcDNA.** Informationen zum Expressionsvektor pcDNA und schematische Darstellung. Dieser Vektor stellte die Grundlage für den pCFP-Vektor dar. Der pCFP-Vektor leitet sich von pcDNA ab und enthält N-terminal zu dem Insert ein CFP-Gen.

## 10.4 Sequenzierungen

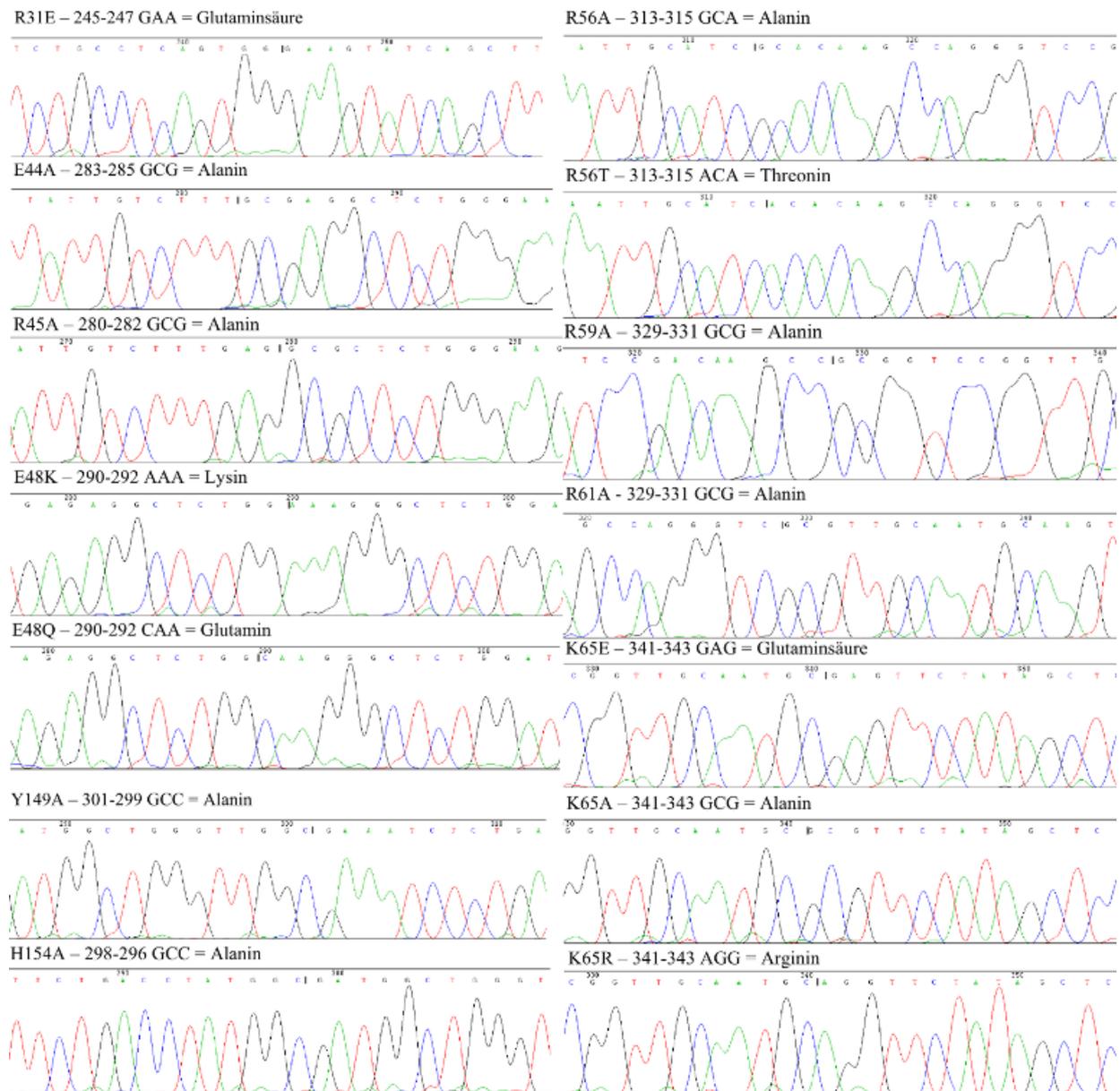


Abbildung 40: **Bestätigung der Punktmutationen im Claduin-17 mittels DNA-Sequenzierung.** Chromatogramme der Sequenzierungen der verwendeten Plasmid-DNA. Der Sequenzabschnitt zeigt den Basenaustausch an. Die Plasmide mit den Mutationen des ECL2 wurden unter Verwendung des reverse Primer sequenziert und müssen daher von rechts nach links gelesen und in die komplementären Basen übersetzt werden.