
Tricellulin und seine Funktion in der trizellulären Tight Junction von Epithelzellen

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

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

vorgelegt von

Susanne M. Krug

aus Berlin

Juli, 2009

Die Dissertation wurde in der Zeit vom 1. August 2006 bis 30. Juli 2009 unter der Leitung von Prof. Dr. med. Michael Fromm angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Fromm
Institut für Klinische Physiologie
Charité, Campus Benjamin Franklin
Freie Universität Berlin und Humboldt-Universität zu Berlin

2. Gutachter: Prof Dr. med. Rudolf Tauber
Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie
Charité, Campus Benjamin Franklin
Freie Universität Berlin und Humboldt-Universität zu Berlin

Disputation am: 30.11.2009

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Prof. Dr. Michael Fromm und Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke für die Möglichkeit, in ihren Arbeitsgruppen meine Doktorarbeit anzufertigen. Gefördert wurde diese Arbeit im Rahmen der DFG-Forschergruppe 721 und durch die Sonnenfeld-Stiftung Berlin.

Herrn Prof. Dr. Rudolf Tauber möchte ich für die freundliche Bereitschaft, die gutachterliche Tätigkeit für diese Arbeit zu übernehmen, danken.

Prof. Dr. Michael Fromm danke ich zudem für die Vergabe des Themas, die ausgezeichnete Betreuung und für die sehr gute und enge Zusammenarbeit.

Weiterhin danke ich Dr. Dorothee Günzel für ihre ausgezeichnete Betreuung und Ansprechbarkeit bei elektrophysiologischen Fragestellungen, insbesondere bei der Zusammenarbeit zur Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie. Dr. Jan F. Richter danke ich für die Einführung am Laser Scanning-Mikroskop sowie für sein Engagement dieses betreffend. Dr. Salah Amasheh danke ich für die fachlichen Gespräche und sein Fähigkeit, jemanden auch bei Rückschlägen aufmuntern zu können. Besonderer Dank gilt auch Susanne Milatz, die mich oft beraten und unterstützt hat. Prof. Dr. Otmar Huber und Julie K. Westphal danke ich für die Entwicklung und Bereitstellung des Tricellulin-Antikörpers, ohne den wesentliche Punkte meiner Arbeit nicht möglich gewesen wären.

Des Weiteren danke ich herzlich allen technischen Angestellten, Anja Fromm für ihre stete Ansprechbarkeit bei methodischen Problemen, Susanna Schön für die Hilfe bei der Gefrierbruchelektronenmikroskopie und Detlef Sorgenfrei für seine Unterstützung bei jeglichen technischen Problemen.

Der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit danken.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie sowie meinen Freunden für ihr Verständnis und die Unterstützung auch in anstrengenden Phasen danken.

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG	1
INHALTSVERZEICHNIS	2
1 EINLEITUNG	5
1.1 Epithelien	5
1.2 Tight Junctions	7
1.3 Tight Junction-Proteine	8
1.3.1 Occludin	9
1.3.2 JAM (Junctional adhesion molecule)	10
1.3.3 Claudine	11
1.3.4 Tricellulin	13
1.3.5 Tight Junction-assoziierte Proteine	16
1.4 Bi- und trizelluläre Tight Junction	17
2 ZIELSETZUNG	19
3 MATERIAL UND METHODEN	20
3.1 Materialien	20
3.1.1 Geräte	20
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	21
3.1.3 Chemikalien	21
3.1.4 Zelllinien	24
3.1.6 Puffer und Lösungen	25
3.2 Molekularbiologische Methoden	30
3.2.1 Membranproteinextraktion aus Zellkulturen	30
3.2.2 Gesamtproteinextraktion	30
3.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Pierce	30
3.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli	31
3.2.4 Western Blot	32
3.2.5 Immunfluoreszenz	34
3.2.6 Fluoreszenz-Live-Cell-Imaging	36
3.2.7 TUNEL-Färbung	36
3.2.8 cDNA-Herstellung	37
3.2.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	38
3.2.10 Agarosegelelektrophorese	41
3.2.11 Ligation in einen Klonierungsvektor	42
3.2.12 Transformation	43
3.2.13 Plasmidisolation	44
3.2.14 Sequenzierung	45
3.2.15 Umklonierung in einen Expressionsvektor	47
3.2.16 Colony PCR	49

3.2.17 Glycerolstocks	50
3.3 Zellkultur	51
3.3.1 Zellkultur allgemein	51
3.3.2 Passagieren der Zellen	51
3.3.3 Transfektion	52
3.3.4 Gefrierbruch und Elektronenmikroskopie	53
3.4 Elektrophysiologische Messungen	55
3.4.1 Ussing-Kammer	55
3.4.2 Badkorrektur und Elektrodenasymmetrie	56
3.4.3 Widerstandsmessung	56
3.4.4 Dilutionspotentialmessung	56
3.4.5 Biionische Potentialmessungen	58
3.4.6 Fluxmessungen parazellulärer Größenmarker	60
3.4.7 HRP-Fluxmessungen	62
3.5 Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie	64
3.5.1 Prinzip der Impedanzmessung	64
3.5.2 Prinzip der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie	67
3.5.3 Methode der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie	69
3.5.4 Ermittlung des trans- und des parazellulären Widerstandes	70
3.5.5 Limitierende Faktoren	77
3.5.6 Anwendung und Ausblick	79
3.5 Auswertung und Statistik	80
4 ERGEBNISSE	81
4.1 Expression von TRIC-a in tri- und bizellulären Tight Junctions	81
4.2 Effekte von TRIC-a auf die parazelluläre Barriere und die Ionenpermeabilität	87
4.3 Permeabilität von parazellulären Größenmarkern	93
4.4 Untersuchung der Transzytose- und Apoptoserate	98
4.5 Visualisierung des makromolekularen Durchtritts an bi- und trizellulären Tight Junctions	99
4.6 Ultrastrukturelle Analyse der bi- und trizellulären Tight Junctions	100
5 DISKUSSION	105
5.1 Expressionsabhängige Lokalisation von TRIC-a	105
5.2 Verringerung der Ionenpermeabilität bizellulärer Tight Junctions ohne Änderung der Ladungsselektivität durch TRIC-a	106
5.3 Reduktion des Auftretens von Strangdiskontinuitäten innerhalb der bizellulären Tight Junction nach TRIC-a-Überexpression	107
5.4 Beteiligung der trizellulären Zentralpore an der Gesamtleitfähigkeit	108
5.5 Die trizelluläre Zentralpore als Durchtrittsstelle für Makromoleküle	110
5.6 Zwei Komponenten machen die parazelluläre Barriere aus	112
5.7 Ausblick	113
6 ZUSAMMENFASSUNG	115
7 SUMMARY	117
8 LITERATURVERZEICHNIS	119

9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	126
10	VERZEICHNIS DER EIGENEN PUBLIKATIONEN	129
11	LEBENS LAUF	131

1 Einleitung

1.1 Epithelien

Epithelien sind Gewebe, die als zelluläre Grenzschichten die inneren und äußeren Oberflächen des Körpers auskleiden. Sie gehören neben Muskel-, Nerven- und Bindegewebe zu den vier Grundgewebetypen und besitzen unterschiedliche Funktionen und Formen der Differenzierung.

Epithelien sind vom Bindegewebe abgegrenzt und besitzen keine Blutgefäße. Morphologisch werden sie nach der Anzahl der Zellschichten und der Zellform der obersten Epithelzellschicht in einschichtige einfache, einschichtige mehrreihige und mehrschichtige Epithelien sowie Übergangsepithelien (Urothel) unterteilt. Funktionell werden sie nach ihrer Permeabilität für Ionen in lecke, dichte und undurchlässige Epithelien unterteilt (Fromm, 2007).

Neben dem Schutz vor mechanischer Schädigung, Mikroorganismeneintritt und Feuchtigkeitsverlust sind die Hauptfunktionen von Epithelien Transport in resorptiver oder sekretorischer Richtung und dessen Regulation, aber andererseits auch Barrierebildung zwischen Kompartimenten. Die Gesamtfunktion der Epithelien wird über das Zusammenwirken beider Funktionen reguliert. Für Endothelien gilt dies in gleicher Weise, wobei bei den an „Schranken“ beteiligten Endothelien (z.B. Blut-Hirnschranke) die Barrierefunktion besonders ausgeprägt ist.

Epithelien bestehen aus polarisierten Zellen, deren Plasmamembranen funktionell in eine apikale, dem Lumen bzw. der Oberfläche zugewandte, und eine basolaterale Seite unterteilt werden. Die Zellen der Epithelien liegen meist dicht beieinander und sind reich an Zell-Zell-Kontakten, welche sich in drei Gruppen einteilen lassen (Denker et al., 1998) (Abb. 1).

Die Adherens Junctions (*Zonula adherens*), die sich als gürtelförmige Verdichtungen um den Interzellularraum der Epithelzellen ziehen und den mechanischen Zusammenhalt der Zellkontakte ermöglichen, gehören zu den Haftverbindungen. Im Basalraum des interzellulären Spalts kommt eine weitere Haftwirkung durch Desmosomen (*Macula adherens*) zustande.

Die Kommunikation benachbarter Zellen wird über kommunizierende Verbindungen, den Gap Junctions (*Nexus; Konnexon*), vermittelt. Hierbei handelt es sich um Kanäle, die sich

aus jeweils sechs Konnexinen, Membranproteinen, die vier Transmembranbereiche besitzen, zusammensetzen. Diese verbinden Zellen untereinander und ermöglichen einen Austausch von kleinen Molekülen wie ATP, kleinen Anionen und Kationen, Glukose oder Aminosäuren, wobei ein Größenlimit von 1 kDa vorliegt.

Die dritte Gruppe stellen die Schlussleisten (Tight Junction, *Zonula occludens*) dar. Diese umgürten Epithelzellen netzartig im apikolateralen Bereich, wodurch sie eine Grenze zwischen dem apikalen und dem basolateralen Bereich der Zellmembran bilden. Die Tight Junction bildet hierbei gleichzeitig zwei Barrieren, die anschaulich als „Fence“ und „Gate“ bezeichnet wurden (Diamond, 1977).

Die „Fence“-Funktion verhindert die Diffusion transmembranärer Proteine innerhalb der Zellmembran zwischen apikaler und basolateraler Seite. Dadurch wird gewährleistet, dass seitenspezifisch exprimierte Transportproteine in ihrer Lokalisation verbleiben – als Beispiel sei hier der ausschließlich apikal nachweisbare epitheliale Na^+ -Kanal ENaC genannt (Ziera et al., 2009).

Die „Gate“-Funktion verhindert die freie Diffusion von Soluten und Wasser zwischen den Zellen hindurch. Diese für die parazelluläre Barriere entscheidende Eigenschaft wird über die Hauptbestandteile der Tight Junction, die Tight Junction-Proteine, reguliert.

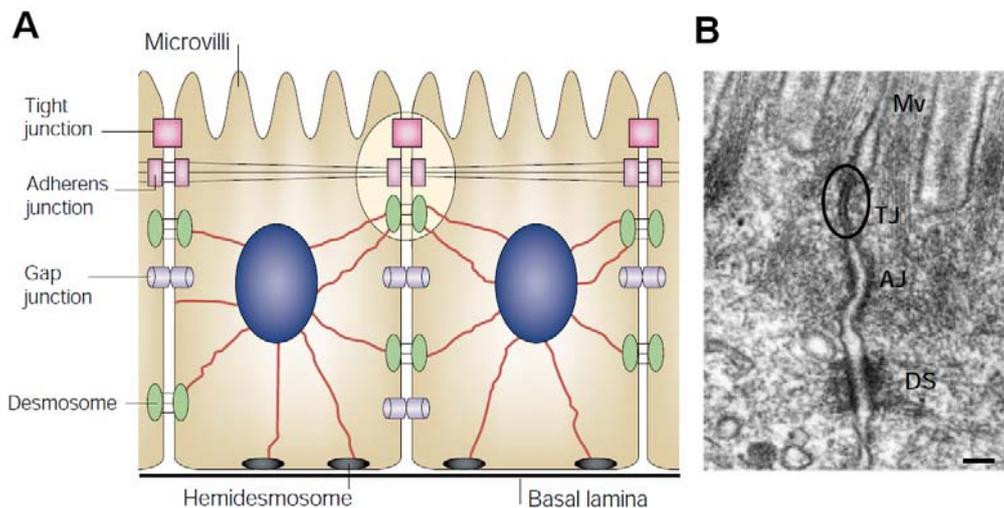


Abb. 1 Junktionaler Komplex. **A** Schematische Darstellung intestinaler Epithelzellen. Der apikale junktionale Komplex ist durch eine helles Oval markiert. **B** Elektronenmikroskopische Aufnahme des junktionalen Komplexes muriner intestinaler Epithelzellen. Balken = 200 nm (Mv = Mikrovilli; TJ = Tight Junction, durch Oval markiert; AJ = Adhärenz Junction; DS = Desmosom) (Tsukita et al., 2001).

1.2 Tight Junctions

Das netzartige Strangsystem der Tight Junction (TJ) an den Kontaktstellen der Zellmembranen benachbarter Zellen konnte mittels Gefrierbruchelektronenmikroskopie bereits Jahrzehnte vor seiner molekularen Identifikation nachgewiesen werden (Staehein et al., 1969; Staehein, 1973). Die Tight Junction-Stränge sind hierbei auf beiden Seiten der Gefrierbruchebene erkennbar. Auf der P-Fläche, der protoplasmatischen Seite des Bruchs, hebt sich die Tight Junction deutlich ab, während auf der E-Fläche, der exoplasmatischen Seite, zu den Strängen komplementäre Rinnen erkennen lassen (Abb. 2).

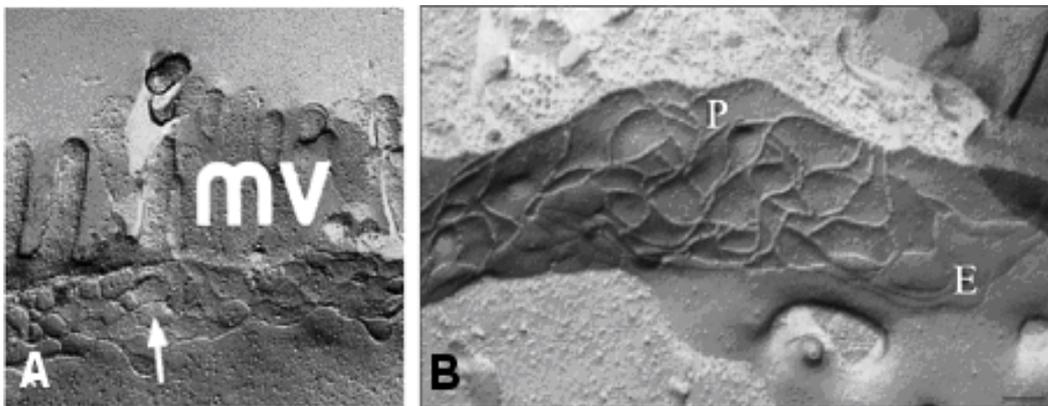


Abb. 2 Gefrierbruchelektronenmikroskopische Aufnahmen. **A** Netzwerk der TJ (Pfeil) von HT-29/B6-Zellen im apikalen Bereich der Zelle (mv: Mikrovilli; Schmitz et al., 1999). **B** Netzwerk der TJ einer epithelialen Einzelschicht: Die miteinander verknüpften Stränge sind deutlich auf der P-Fläche erkennbar (P), während auf der E-Fläche komplementäre Rinnen zu erkennen sind (Gonzalez-Mariscal et al., 2003).

Es gibt zwei zelluläre Transportwege: Der transzelluläre Weg führt durch die Zelle, wobei die apikalen und die basolateralen Zellmembranen durchquert werden, während der parazelluläre Weg zwischen den Zellen durch die Tight Junction hindurch verläuft. Der Interzellularspalt ist Bestandteil beider Wege.

Während der transzelluläre Weg für viele Solute durch Kanäle der apikalen Zellmembran kontrolliert wird, wird der parazelluläre Weg durch die Tight Junction reguliert („Gate“-Funktion). Hierbei fungiert die Tight Junction einerseits als Barriere, ermöglicht aber andererseits auch den selektiven Transport über selektive, parazelluläre Kanäle.

Die Barriere- bzw. Kanalfunktion der Tight Junction ist in unterschiedlichen Epithelien verschieden stark ausgeprägt. So ist der parazelluläre Widerstand, der durch die Tight Junction erhalten wird, in den proximalen Segmenten von röhrenförmigen Epithelien

(z.B. Dünndarm, proximaler Nierentubulus) geringer als derjenige der Zellmembranen („lecke Epithelien“). In distalen Segmenten (z.B. distales Colon, Sammelrohr) dagegen ist er weitaus höher als dieser („dichte Epithelien“). In der Harnblase ist die Tight Junction sogar extrem dicht („undurchlässiges Epithel“; Fromm, 2007).

Dieses Spektrum der Tight Junction-Eigenschaften wird durch die Zusammensetzung von Tight Junction-Proteinen festgelegt. Diese können physiologischen Bedingungen entsprechend reguliert und auch durch zahlreiche pathologische Einflüsse verändert werden (Schneeberger & Lynch, 2004; Beyenbach, 2003).

So sind beispielsweise für chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa starke Änderungen in der Tight Junction-Proteinzusammensetzung (betroffen ist die Proteinfamilie der Claudine) bekannt, die durch die resultierende Schädigung der Barriere zur Verstärkung der Symptome und auch vermehrter Abgabe von Wasser und Soluten (Leckflux-Diarrhoe) führen (Zeissig et al., 2007).

Auch bei einer Vielzahl anderer Erkrankungen spielt die Tight Junction eine ausschlaggebende Rolle und wird immer häufiger als mitverursachender oder sogar primärer Mechanismus erkannt.

Die Abdichtung, bzw. Durchlässigkeit der Tight Junction wird somit stark durch ihre molekulare Zusammensetzung bestimmt.

1.3 Tight Junction-Proteine

Die Tight Junction besitzt eine komplexe Proteinzusammensetzung, die letztendlich ihre große Variabilität begründet. Bisher konnten vier Klassen von Transmembranproteinen, welche die Tight Junction bilden, identifiziert werden: Occludin, die Proteinfamilie der Claudine und Tricellulin sind dabei maßgeblich am Aufbau der epithelialen Barriere beteiligt, während die vierte Klasse, die Junctional adhesion molecules (JAM) neben Funktionen in der Tight Junction-Neubildung auch die Translokation von Immunzellen ermöglicht.

Jedoch sind neben diesen vier Klassen noch viele weitere Proteine am Aufbau und der Regulation der Tight Junction beteiligt. Sie sind allerdings nicht transmembranär in den Tight Junction-Strängen zu finden, sondern intrazellulär mit den Tight Junction-Proteinen assoziiert.

1.3.1 Occludin

Das als erstes identifizierte Tight Junction-Protein war Occludin (Furuse et al., 1993). Dieses integrale Membranprotein der Tight Junction weist drei Isoformen auf, die Größen zwischen 62 und 83 kDa besitzen (Mankertz et al., 2002). Occludin besitzt vier Transmembranbereiche, zwei extrazelluläre Schleifen und drei intrazelluläre Bereiche, die aus einer kurzen Schleife sowie einem kurzen N-terminalen und einem langen C-terminalen Bereich bestehen (Abb. 5). Die extrazellulären Bereiche können mit anderen Tight Junction-Proteinen der gegenüberliegenden Zellen in sogenannter *trans*-Interaktion wechselwirken (Stevenson et al., 1998; Furuse et al., 1998).

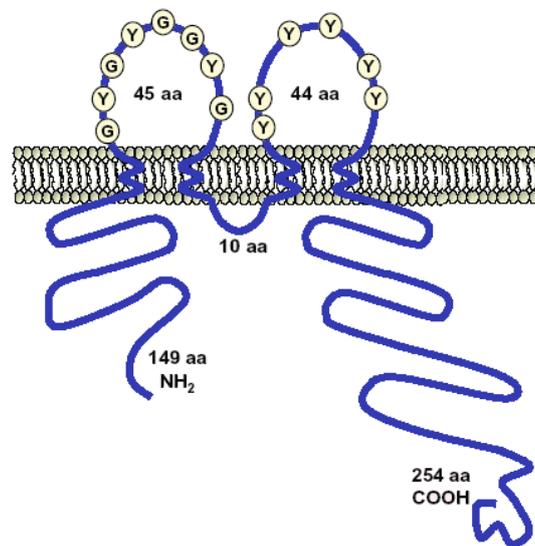


Abb. 5 Schematische Darstellung von Occludin (modifiziert nach González-Mariscal et al., 2003).

Der erste extrazelluläre Loop ist reich an Tyrosin und Glycin und spielt eine Rolle bei der Zell-Zell-Verbindung, während der zweite extrazelluläre Loop an der Ausbildung der parazellulären Barriere beteiligt ist (Citi et al., 1998).

Der C-Terminus besitzt eine ELL-Domäne, die aus einer antiparallelen coiled-coiled Hairpin-Struktur besteht. Diese konservierte Domäne ist ursprünglich bei dem RNA-Polymerase II-Elongationsfaktor ELL gefunden worden. Occludin kann darüber mit anderen Proteinen, die der MAGUK-Familie (*membrane associated guanylate kinase homologues*) angehören, interagieren (Li et al., 2005). Zu diesen gehören die Proteine ZO-1, ZO-2 und ZO-3 sowie F-Aktin des Cytoskeletts (Tsukita et al., 1998).

Occludin liegt oft am Serin- und Threonin-Rest phosphoryliert vor, was vermutlich eine Rolle bei der Tight Junction-Regulation spielt (Tsukita et al., 1998; Citi et al., 1998). Inwieweit

Occludin für die Tight Junction essentiell ist, ist umstritten. Einerseits zeigen Knockout-Mäuse keine Beeinträchtigung der Barrierefunktion (Saitou et al., 2000), andererseits steigt der transepitheliale Widerstand bei Überexpression von Occludin, was mit einer Zunahme der Tight Junction-Stränge um 30-40% einhergeht (McCarthy et al., 1996).

Darüber hinaus ist Occludin an der Differenzierung von bestimmten Epithelzellen beteiligt: So zeigt die Occludin-Knockout-Maus eine Veränderung der Morphologie und der sekretorischen Eigenschaften des Magenepithels (Schulzke 2005).

1.3.2 JAM (Junctional adhesion molecule)

JAM-Proteine durchspannen, im Gegensatz zu den Tetraspan-Proteinen der Tight Junction, die Zellmembran nur einmal (Martin-Padura et al., 1998) und sind außer in der Tight Junction von Epi- und Endothelien auch in Leuko- und Thrombozyten vorhanden. Trotz einiger anderer Funktionen, wie der Bildung von Zell-Zellkontakten zwischen Leuko-, bzw. Thrombozyten und dem Endothel oder aber der Bindung von Viren oder der Angiogenese, wird JAM noch zu den Tight Junction-Proteinen gezählt und ist dort unter anderem auch an der Neubildung von Tight Junctions beteiligt (Ebnet et al., 2004).

Abhängig von ihrer Homologie werden die JAM-Proteine in zwei Untergruppen unterteilt, wobei eine JAM-A, JAM-B und JAM-C umfasst und CAR (coxsackie and adenovirus receptor), ESAM (endothelial cell-selective adhesion molecule) und JAM-4 die zweite Gruppe bilden (Ebnet et al., 2004; [Abb. 6](#)). Die beiden Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich der Länge der cytoplasmatisch gelegenen C-Termini sowie ihrer Bindungsmotive.

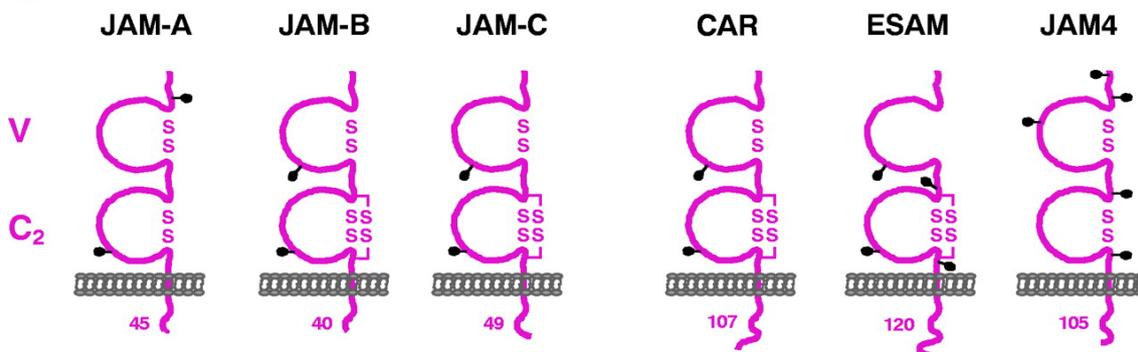


Abb. 6 Zusammenstellung der JAM-Proteine (Ebnet et al., 2004).

1.3.3 Claudine

Die Familie der Claudine bildet die größte Gruppe der Tight Junction-Proteine und umfasst bei Säugetieren und Vögeln 24 Mitglieder (Tsukita et al., 2001), während für Fische weitaus mehr Claudine gefunden worden sind, wie beispielsweise 56 für den Kugelfisch (Loh et al., 2004). Claudine gehören zu den Tetraspan-Proteinen, besitzen somit vier Transmembrandomänen, intrazellulär einen kurzen N-terminalen, einen längeren C-terminalen Bereich und eine kleine Schleife, extrazellulär zwei Loops, wovon der erste größer als der zweite ist (Abb. 7).

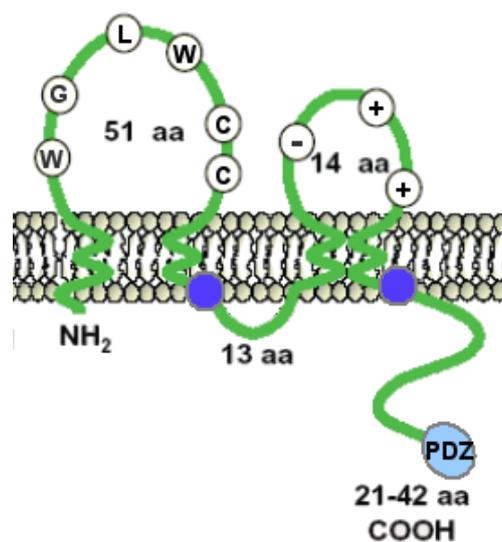


Abb. 7 Schematischer Aufbau der Claudine. Eingezeichnet sind neben den konservierten Aminosäuren des ersten extrazellulären Loops, Beispielladungen des zweiten extrazellulären Loops, die Palmitoylierungsstellen (dunkelblau) und das C-terminale PDZ-Bindemotiv (modifiziert nach González-Mariscal et al., 2003 und Van Itallie 2006).

Zu Occludin oder auch Tricellulin liegt trotz der relativ ähnlich erscheinenden Struktur keinerlei Sequenzhomologie vor. Untereinander reichen die Sequenzhomologien der Claudine von 12,5% bis zu 69,7%, wobei in allen Claudinen im ersten extrazellulären Loop ein Aminosäuremotiv (WWCC) konserviert vorliegt und der C-Terminus bei den Claudinen bis auf wenige Ausnahmen mit einem PDZ-Bindemotiv endet. Die Claudine werden aufgrund ihrer Ähnlichkeit untereinander in klassische und nicht-klassische Claudine unterteilt (Abb. 8, Krause et al., 2008). Die Größen der Claudine variiert zwischen 20 und 36 kDa.

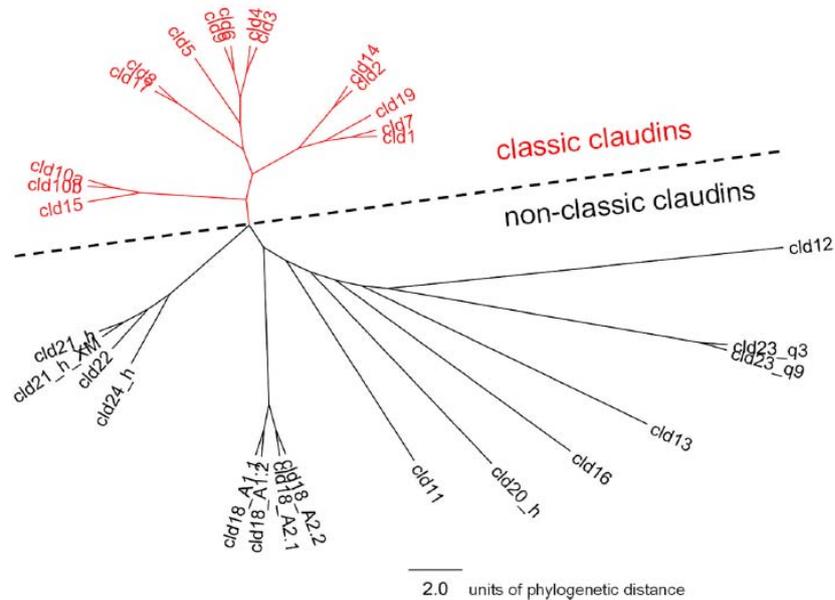


Abb. 8 Phylogenetischer Baum der Vollängensequenzen der Claudine mit Unterteilung in klassische und nicht-klassische Claudine (Krause et al., 2008).

Obwohl bisher nur wenige Claudine in ihrer Funktion charakterisiert worden sind, konnte bereits festgestellt werden, dass sie ein weites Funktionsspektrum besitzen.

So konnte für einige Claudine, wie Claudin-1, Claudin-4 oder Claudin-5, eine abdichtende Funktion innerhalb der Tight Junction gefunden werden:

Claudin-1 ist ein für die Abdichtung unabdingbarer Bestandteil der Epidermis. Im Knock-out-Modell konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen von Claudin-1 zu massivem, tödlichem Wasserverlust führt (Furuse et al., 2002).

Claudin-4 führt bei Überexpression zu einem starken Abfall der Kationendurchlässigkeit, während die Permeabilität für Anionen unverändert bleibt (Van Itallie et al., 2001). Gleichzeitig erhöht die Anwesenheit von Claudin-4 die Tight Junction-Komplexität (Colegio et al., 2002).

Claudin-5 ist wichtiger Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke. Seine barrierebildende Funktion konnte im Knockout und durch stabile Transfektion von Zelllinien nachgewiesen werden (Nitta et al., 2003; Amasheh et al., 2005).

Für einige andere Claudine dagegen konnte eine Funktion als parazelluläre Pore nachgewiesen werden:

Für Claudin-2 konnte gezeigt werden, dass es den transepithelialen Widerstand verringert (Furuse et al., 2001), indem es parazelluläre Kanäle für kleine Kationen ausbildet (Amasheh et al., 2002). Es wird typischerweise in lecken, proximalen Segmenten röhrenförmiger

Epithelien wie proximalem Tubulus (Kiuchi-Saishin et al., 2002) und Dünndarm (Markov et al., 2007) stark exprimiert.

Daneben ist die Regulation von Claudin-2 eng mit chronischen Darmerkrankungen verknüpft (Heller et al., 2005, Zeissig et al., 2007), wobei es unter anderem durch pro-inflammatorische Cytokine wie TNF- α reguliert wird (Mankertz et al., 2009).

Claudin-6, das gleichzeitig als embryonaltypisches Claudin gilt, führt bei Überexpression zu einer erhöhten Wasserpermeabilität (Tang et al., 2003).

Claudin-10 existiert in mehreren Spleißvarianten und ist abhängig vom Expressions-hintergrund als porenbildendes Claudin mit anionenselektiven (Van Itallie et al., 2006) oder kationenselektiven (Günzel et al., 2009a) Eigenschaften beschrieben worden.

Auch Claudin-16 konnte als kanalbildendes Claudin identifiziert werden, das Poren für Mg²⁺ ausbildet (Simon et al., 1999). Mutationen von Claudin-16 sind eng mit der familiären Hypomagnesämie, die mit Hypercalciurie und Nephrocalcinose einhergeht (FHHNC), verknüpft (Simon et al., 1999; Kausalya/Amasheh et al., 2006; Günzel et al., 2009b).

Dieses große Funktionsspektrum der Claudine spiegelt sich auch in spezifischen Expressionsmustern in den verschiedenen Endo- und Epithelien wider. Die Claudine bestimmen somit maßgeblich deren Eigenschaften und Funktionen.

Zudem scheinen die extrazellulären Loops einiger Claudine auch wichtige Regulationsfunktionen durch Interaktionen mit Loops gegenüberliegender Claudine zu haben. So konnten Wechselwirkungen zwischen Claudin-3 und Claudin-1 oder aber Claudin-2 beobachtet werden, jedoch nicht zwischen Claudin-1 und Claudin-2 (Furuse et al., 1999).

1.3.4 Tricellulin

Das gegenwärtig jüngste Mitglied der Tight Junction-Proteine, Tricellulin, wurde Ende 2005 erstmals beschrieben (Ikenouchi et al., 2005). Die Besonderheit dieses Membranproteins ist, dass es im Vergleich mit anderen Tight Junction-Proteinen bevorzugt in der trizellulären Tight Junction, dem Kontaktpunkt dreier benachbarter Zellen, vorkommt (Abb. 9). Allerdings ist es auch in geringem Maße in bizellulären Tight Junctions nachweisbar.

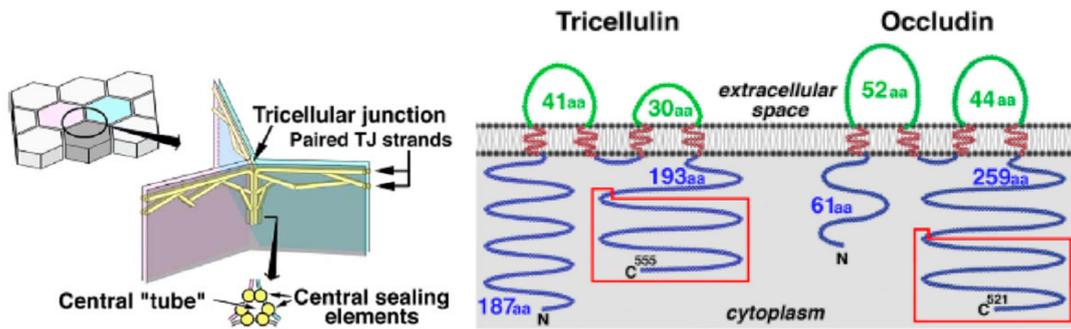


Abb. 9 Ansicht der trizellulären Junction und Vergleich von Tricellulin und Occludin; rot umrandet ist der konservierte C-Terminus beider Proteine (Ikenouchi et al., 2005).

Bisher sind vier humane Isoformen von Tricellulin beschrieben worden (Abb. 10, Riazuddin et al., 2006):

Tricellulin-a (TRIC-a) ist mit 558 Aminosäuren (64 kDa) die längste Form und ist in der Regel gemeint, wenn in anderen Studien von Tricellulin die Rede ist. TRIC-a besitzt vier Transmembranbereiche, zwei extrazelluläre Loops und drei intrazelluläre Bereiche, die aus einer kurzen Schleife sowie einem kurzen N-terminalen und einem langen C-terminalen Bereich bestehen. Es setzt sich aus sieben Exons zusammen und besitzt eine C-terminale ELL-Domäne, die zu 32% mit der des Occludin identisch ist (insgesamt ist sie zu 51% dieser ähnlich, Abb. 9). Der erste extrazelluläre Loop ist ähnlich wie bei Occludin reich an Glycin und Tyrosin (49,5%), so dass angenommen werden kann, dass er ebenfalls wie bei diesem zur Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte nötig ist.

Mutationen innerhalb von TRIC-a führen zu nichtsyndromaler Taubheit (DFNB49, Riazuddin et al., 2006; Chishti et al., 2008).

Die Isoform Tricellulin-a1 (TRIC-a1 mit 62 kDa) ist dem TRIC-a sehr ähnlich, es fehlt ihr jedoch das dritte der sieben Exons.

Bei Tricellulin-b (TRIC-b) handelt es sich um eine kürzere Isoform (458 Aminosäuren, 51 kDa), die sich deutlich im C-Terminus von TRIC-a unterscheidet. Es wird vermutet, dass TRIC-b in der basalen Zellschicht von Keratinozyten lokalisiert ist (Schlüter et al., 2007).

Die vierte Isoform, Tricellulin-c (TRIC-c, 442 Aminosäuren und 52 kDa) unterscheidet sich am stärksten von den übrigen Tricellulin-Varianten, da ihr zwei der hypothetischen Transmembranbereiche fehlen.

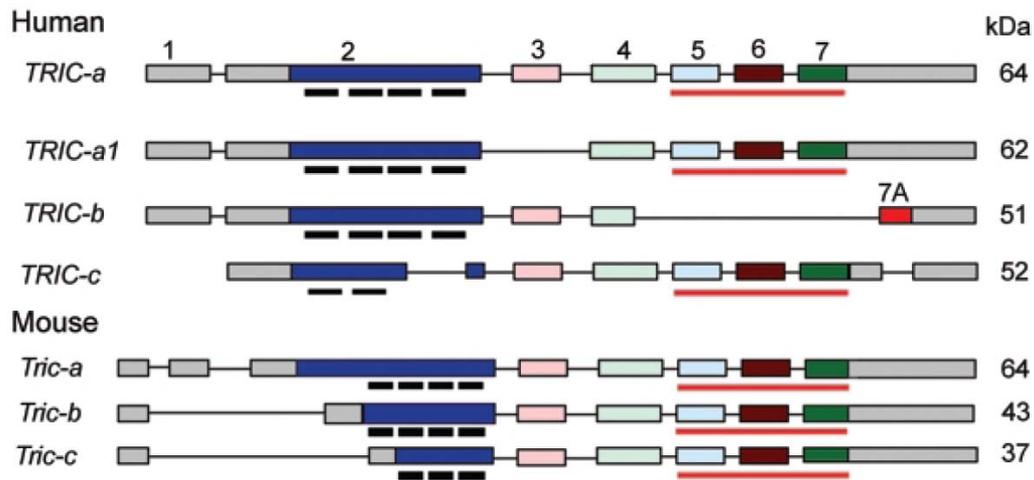


Abb. 10 Humane und murine Isoformen von Tricellulin. Die schwarzen Balken unter Exon 2 markieren die vorhergesagten Transmembranhelices, die rote Linie markiert die Occludin-ELL-Domäne und die grauen Bereiche stellen die untranslatierten Bereiche dar (Riazuddin et al., 2006).

Über die Funktion von Tricellulin ist bisher wenig bekannt, Charakterisierungen waren auf die Beschreibung von Phänotypen, die bei Mutation auftreten, beschränkt.

Mittels RNA-Interferenz wurde im Zellkulturmodell versucht, erste Aussagen über die Funktion von Tricellulin (TRIC-a) zu treffen (Ikenouchi et al., 2005). In der epithelialen Zelllinie Eph4 wurde bei Unterdrückung der Tricellulinexpression beobachtet, dass es im Verlauf der Zellmonolayer-Differenzierung nicht zur Ausprägung des für diese Zellen typischen transepithelialen Widerstands (R^t), der häufig als Indikator für die parazelluläre Barriere dient, kam. Gleichzeitig wurde eine erhöhte Permeabilität für den parazellulären Flux-Marker FITC-Dextran-4000 (mit einer Größe von 4 kDa) beobachtet. Die Permeabilität für ein weitaus größeres FITC-Dextran mit 250 kDa blieb jedoch unverändert, was zeigte, dass der Zellmonolayer an sich intakt war. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass Tricellulin eine barrierebildende Funktion innerhalb der Tight Junction, speziell in den trizellulären Kontakten, besitzt.

Untersuchung der Ultrastruktur der Tight Junction mittels Freeze Fracture-Elektronenmikroskopie zeigte jedoch, dass die gesamte Tight Junction nur in Ansätzen vorhanden und größtenteils fragmentiert war, so dass sich die beobachteten Ereignisse auch auf diesen Zusammenbruch des Tight Junction-Netzwerks zurückführen ließen. Es konnte somit nur gezeigt werden, dass Tricellulin eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Tight Junction spielt, wobei es auch die bizelluläre Tight Junction beeinflusst.

Beobachtungen in Occludin-Knockout-Mäusen, die zeigten, dass Tricellulin bei Fehlen von Occludin auch stark in der bizellulären Tight Junction lokalisiert ist, ließen darauf schließen,

dass eventuell abstoßende Wechselwirkungen zwischen Occludin und Tricellulin dessen hauptsächlich trizelluläre Lokalisation begründen und Tricellulin aufgrund seiner Ähnlichkeit mit Occludin dessen Funktion im Knockout größtenteils übernehmen kann (Ikenouchi et al., 2008).

1.3.5 Tight Junction-assoziierte Proteine

Neben den eigentlichen Tight Junction-Proteinen sind viele weitere Proteine, die mit diesen interagieren, an dem Aufbau und der Funktion der Tight Junction beteiligt. Die Tight Junction-assoziierten Proteine sind intrazellulär lokalisiert und meist mit den Tight Junction-Proteinen über ihre PDZ-Domäne (*PSD-95/Discs Large/ZO-1-Domäne*) verbunden.

Die PDZ-Domäne ist eine modular aufgebaute Proteininteraktionsdomäne, die sequenzspezifisch mit der C-terminalen Sequenz Glu-Ser/Thr-Asp-Val interagiert. Neben dieser Sequenz werden aber auch einige andere Sequenzen aus vier Aminosäuren erkannt, wobei der C-Terminus eine hydrophobe Aminosäure, in der Regel Valin, ist. Die meisten Claudin-Sequenzen enden mit dieser Aminosäure und wechselwirken so mit PDZ-Domänen (Roh et al., 2003). Eine Ausnahme bilden hier Claudin-12, das mit Threonin endet, und Claudin-22, das mit Lysin und Histidin endet.

Häufig sind die mit der Tight Junction assoziierten Proteine regulatorisch aktiv oder erfüllen Gerüstfunktionen als sogenannte Gerüstproteine (*scaffolding proteins*), wobei sie Verbindungen mit dem Zytoskelett herstellen, indem sie mit Aktin- und Myosinfibrillen assoziieren.

Zu der Gruppe der Tight Junction-assoziierten Proteine zählen unter anderem die Proteine der MAGUK-Familie ZO-1 bis ZO-3 (*Zonula occludens*; Stevenson et al., 1986; Jesaitis et al., 1994; Haskins et al., 1998), aber auch PAR (*partitioning defective*), MAGI (*membrane-associated guanylate kinase with an inverted arrangement of protein-protein interaction domains*) und MUPP1 (*multiple PDZ domain protein 1*). Neben diesen gibt es noch zahlreiche weitere zu den Tight Junction-assoziierten Proteinen zählende Proteine (González-Mariscal et al., 2003).

1.4 Bi- und trizelluläre Tight Junction

Nicht nur die Komposition einzelner Tight Junction-Proteine beeinflusst die Durchlässigkeit und Barriere der Tight Junction, auch die Komplexität ihres Maschenwerks auf ultrastruktureller Ebene hat einen Einfluss.

Die Tight Junction-Barriere wird zwischen den lateralen Kontaktstellen des interzellulären Spalts benachbarter Zellen gebildet. Diese Art des Tight Junction-Netzwerks lässt sich dementsprechend als bizellulär bezeichnen und macht den Großteil der Tight Junctions aus, da sie die gesamte Zelle in dem bereits beschriebenen Netzwerk umspannen. Charakterisiert werden bizelluläre Tight Junctions (bTJs) über die senkrechte Ausdehnung des Tight Junction-Netzwerks, die Anzahl der Tight Junction-Stränge, der damit einhergehenden Strangdichte und dem allgemeinen Erscheinungsbild der Tight Junctions. Dieses wird zunächst näher durch das Auftreten von Strangbrüchen („breaks“), Lücken innerhalb der Strangstruktur mit einer Mindestgröße von 20 nm, sowie der Unterscheidung in kontinuierliche („continuous type“) und partikelartige („particle type“) Stränge, die sich durch Punktartigkeit auszeichnen, beschrieben (Abb. 3).

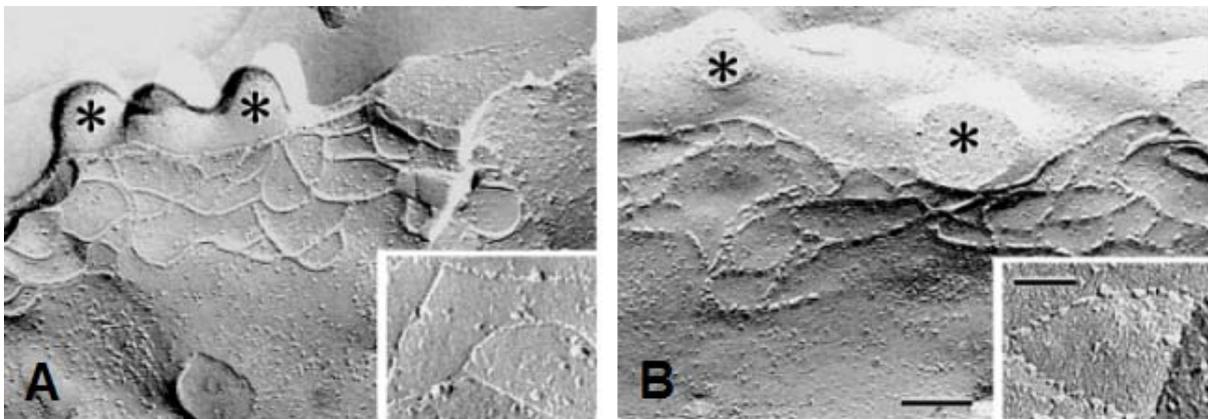


Abb. 3 Gefrierbruchelektronenmikroskopische Aufnahmen. Balken = 100 nm, Sternchen = Mikrovilli. **A** Beispiel für kontinuierliche TJ-Stränge (MDCK I). **B** Beispiel für partikelartige TJ-Stränge (MDCK II) (Furuse et al., 2001).

Die trizelluläre Tight Junction (tTJ), die aus Tight Junction-Strängen an den Kontaktpunkten dreier Zellen gebildet wird, weist strukturelle Unterschiede zur bizellulären Tight Junction auf. Bereits in frühen elektronenmikroskopischen Studien von Gefrierbruch-Replicas wurde beobachtet, dass an diesen Kontaktpunkten das bizelluläre Tight Junction-Netzwerk der drei aufeinander treffenden Zellen sich in basolateraler Richtung ausdehnt, wobei sich ein

ca. 1 μm langes „central tube“, also eine trizelluläre Zentralpore mit vertikal orientierten Strängen ausgebildet. (Abb. 4; Staehelin, 1973; Wade & Karnovsky, 1974; Walker et al., 1994). Ausgehend von dieser röhrenartigen Struktur wird angenommen, dass die trizelluläre Tight Junction einen Ort erhöhter Permeabilität für verschiedene Solute darstellt (Staehelin et al., 1969; Walker et al., 1985; Ikenouchi et al., 2005).

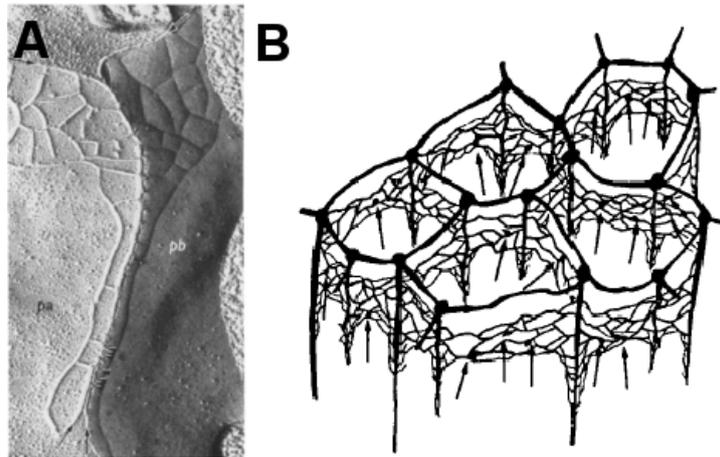


Abb. 4 **A** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer trizellulären Tight Junction (Staehelin, 1973). **B** Schematische Darstellung von bi- und trizellulären TJs. Die tTJs sind an den Kontaktpunkten dreier Zellen als vertikale Ausdehnung der bTJ erkennbar (Menco, 1988).

2 Zielsetzung

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der humanen Tricellulin-Variante TRIC-a hinsichtlich ihrer Barrierefunktion für Solute unterschiedlicher Größe und in Abhängigkeit von der Lokalisation dieses Proteins in der Tight Junction.

Über die Funktion von Tricellulin war bisher nur wenig bekannt. In ersten RNA-Interferenz-Studien, in denen es durch Ausschalten von TRIC-a zum strukturellen Zusammenbruch der Tight Junction und der durch sie ausgebildeten parazellulären Barriere kam, wurde vermutet, dass Tricellulin eine abdichtende Funktion habe und essentiell für die Ausbildung der Tight Junction sei.

Um genauere Aussagen treffen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit experimentell der entgegengesetzte Weg beschritten, indem zwei unterschiedliche Überexpressionsklone kreiert und in ihren Eigenschaften beschrieben wurden.

In elektronenmikroskopischen Untersuchungen sollten eventuelle ultrastrukturelle Veränderungen der Tight Junction geprüft werden, während in funktionellen Untersuchungen Permeabilitätsassays für ein- und zweiwertige Kationen und Anionen sowie für größere Solute von 332 bis 44.000 Da durchgeführt wurden. Da Ionen sowohl transzellulär als auch parazellulär transportiert werden, war es erforderlich, um eindeutige Aussagen über den Beitrag der Tight Junction erzielen zu können, den parazellulären elektrischen Widerstand separat zu bestimmen.

Dieser kann mit konventionellen Techniken nicht unabhängig vom transzellulären Widerstand gemessen werden, so dass eine zweite Aufgabenstellung dieser Arbeit darin bestand, eine Methode zur direkten Messung des parazellulären Widerstands zu entwickeln. Ausgangspunkt war die bereits etablierte Technik der Ein-Wege-Impedanzspektroskopie, die der Unterscheidung von epithelalem und subepithelalem Widerstand dient. Die hieraus hervorgegangene Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie war in ersten Ansätzen schon bei anderen Fragestellungen verwendet worden und sollte im Rahmen dieser Arbeit zu einer vielseitig einsetzbaren, experimentell validierten Technik entwickelt werden.

Da die Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie eine Neuentwicklung darstellt, wird sie in der vorliegenden Arbeit innerhalb des Methodenteils gesondert beschrieben und im Detail dargestellt.

Aus den Erkenntnissen dieser beiden Projekte entstanden zwei Publikationen, eine erste über die Funktionen von TRIC-a (Krug et al., 2009a) und eine weitere über die neue Technik der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie (Krug et al., 2009b).

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

1286 Electrochemical Interface	Solartron-Schlumberger, Farnborough, UK
402 Frequency Response Analyzer	Beran Instruments, Gilching
Agarosegel-Elektrophoresekammern	Biorad, München
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Elektronenmikroskop Zeiss 902	Zeiss, Berlin
Fluoreszenz-Spektrometer Spektramax Gemini	Molecular Devices, Ismaning
Gefrierbruchgerät Denton DV-502	Denton Vacuum, Moorestown, NJ
GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer, Weiterstadt
Heizblock	Grant, Berlin
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 Meta	Zeiss, Berlin
Liquid Scintillation Counter Tri-Carb 2100TR	Packard, Dreieich
Lumineszenzbild-Analysator (LAS 1000)	Fuji, Düsseldorf
Magnetrührer	Ika-Combimag, München
Mini Trans-Blot-Transferzelle	Biorad, München
Mini-Protean 3 Elektrophoresesystem	Biorad, München
Sequenziergerät AbiPrism Model 310	Perkin Elmer, Weiterstadt
Speed Vac	Uniequip, Martinsried
Ussing-Kammern	Institut für Klinische Physiologie, CBF, Charité Berlin
Videokamera (Elektronenmikroskop) Olympus iTEM	Olympus Veleta, Hamburg
Vortexgerät	Pharmacia, Freiburg
Widerstandsmessgerät	Institut für Klinische Physiologie, CBF, Charité Berlin
Zentrifugen	Hermle z233MK, Wehingen Eppendorf 5414C, Köln Beckman Avanti J25, Unterschleißheim, Lohhof

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

15 ml PPN-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
50 ml PPN-Röhrchen	Nunc, Karlsruhe
Centriflex-Säulchen	Edge Bio Systems, Göttingen
Kryo-Röhrchen	Brand, Wertheim
Kupfernetzgrids	Ted Pella Inc., Redding, CA
Magnetrührfische	Merck, Berlin
Mikrotiterplatte 96 Loch	Sarstedt, Nümbrecht
Objektträger	Menzel/Glaser, Braunschweig
Pipetten	Eppendorf, Köln
PVDF-Transfer-Membranen	Perkin Elmer, Weiterstadt
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Köln
Sequenzierröhrchen mit Septum	Applied Biosystems, Mannheim
Standardtips 20, 10, 1000 µl	Eppendorf, Köln
Transwellfilter (Millicell-HA, 0,6 cm ²)	Millipore, Schwalbach
Transwellfilter (invers)	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Zell- und Gewebekulturschalen	Nunc, Karlsruhe
Zellkulturflaschen	Nunc, Karlsruhe
Zellschaber	Coster, Corning, NY, USA

3.1.3 Chemikalien

³ H-gelabelte PEGs (400, 900 kDa)	Biotrend, Köln
50× TAE-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor Antikörper	MoBiTec, Göttingen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Taufkirchen
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm
Anti-Claudin-Antikörper	Zymed, San Francisco, CA, USA
Anti-FLAG M2 Antikörper (mouse)	Sigma, Taufkirchen
Anti-Occludin-Antikörper	Zymed, San Francisco, CA, USA
Anti-Rb-IgG-POD-Antikörper	Roche, Mannheim

3 Material und Methoden

Anti-ZO-1-Antikörper	Zymed, San Francisco, CA, USA
Bacto Agar	Difco, Heidelberg
BCA-Protein Assay Reagenz A + B	Pierce, Rockford, Illinois
BigDye Terminator Sequencing Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
β-Mercaptoethanol	Clontech, Heidelberg
Bromphenolblau (Laemmli)	Amersham, München
BSA	NEB, Beverly, MA, USA
Chloroform	Roth, Karlsruhe
dNTPs	Perkin Elmer, Weiterstadt
Dulbecco's PBS mit Mg/Ca	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Dulbecco's PBS ohne Mg/Ca	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
EGTA	Serva, Heidelberg
Ethanol	J.T. Backer, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Invitrogen, Karlsruhe
FITC-gelabelte Dextrane (4, 10, 20 kDa)	Sigma, Taufkirchen
FKS	Biochrom, Berlin
Fluoreszein	Sigma, Taufkirchen
Glutaraldehyd für Elektronenmikroskopie (25%)	Serva, Heidelberg
Glycerol	Invitrogen, Karlsruhe
HotStart Taq DNA-Polymerase Kit	Qiagen, Hilden
HRP type VI	Sigma, Taufkirchen
IPTG	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	J.T. Backer, Deventer, Niederlande
Lipofectamin-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Liquid-Scintillation Cocktail Ultima Gold high flashpoint	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim
Low Melt Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Lumilight Western Blotting Kit	Roche, Mannheim
Magnesiumchlorid	Merck, Berlin
Methanol	Merck, Berlin
Minimum Essential Medium mit Earl's Salts	Biochrom, Berlin
Molekulargewichtsmarker 100bp	Invitrogen, Karlsruhe
Molekulargewichtsmarker λ/HindIII	Invitrogen, Karlsruhe
Molekulargewichtsmarker LowMass	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumchlorid	Serva, Heidelberg
OG-Dextran 70 kDa	Invitrogen, Karlsruhe
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden
PBS-Tabletten	Life Technologies, Karlsruhe

3 Material und Methoden

Peroxidasesubstrat QuanteBlue	Pierce, Rockford, Illinois
Pfu-Polymerase + Puffer	Stratagene, La Jolla, CA 92037
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
Plus-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Protein-Marker PageRuler	Fermentas, Leon-Rot
Restriktionsendonucleasen	NEB, Beverly, MA, USA
RNAzol	WAK-Chemie, Bad Soden
SDS	Merck, Berlin
SOC	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNA Ligase + Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
TAE 50×	Serva, Heidelberg
TEMED	Life Technologies
TMR-Dextran 3kDa	Invitrogen, Karlsruhe
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Tris	Merck, Berlin
Tris Base	Calbiochem, Bad Soden
Tris-HCl 1,5M, pH 8,8 / 0,5, pH 6,8	Biorad, München
Triton X-100	Roche, Mannheim
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
TSR Sequenzierungsreagenz	Perkin Elmer, Weiterstadt
TUNEL-Assay (TdT-mediated X-dUTP nick end labeling)	Roche, Mannheim
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Vektor (pCR 2.1 TOPO)	Invitrogen, Karlsruhe
Vektor (pFLAG-CMV-10)	Sigma, Taufkirchen
Wasser	Fluka, Seelze
X-Gal	Life Technologies, Karlsruhe

3.1.4 Zelllinien

Für die durchgeführten Experimente wurden epitheliale Zellkulturmodelle der Niere und des Colons verwendet:

1. MDCK-Zellen:

MDCK-Zellen stammen aus der Niere des Hundes. Die Zelllinie wurde 1953 von Madin und Darby gewonnen und beschrieben. Von der MDCK-Zelllinie gibt es einige Subzelllinien (Richardson et al., 1981, Gekle et al., 1994), die sich genetisch voneinander unterscheiden und dadurch auch unterschiedliche morphologische und funktionelle Eigenschaften aufweisen.

MDCK II und MDCK C11 ähneln Zwischenzellen des Sammelrohrs und gehören zu den niederohmigen Zelllinien mit transepithelialen Widerständen zwischen 30 - 150 $\Omega \cdot \text{cm}^2$.

Bei MDCK I und MDCK C7 handelt es sich dagegen um hochohmige, sehr dichte Epithelzellen, deren transepitheliale Widerstände mindestens 800 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ betragen.

2. CaCo-2-Zellen:

Die CaCo-2-Zelllinie ist eine aus einem humanen colorektalen Adenokarzinom stammende Zelllinie, die häufig bei Absorptionsratenmessungen verschiedener Substanzen verwendet wird und als Modell für die intestinale Barriere dient. Die Zelllinie hat große Ähnlichkeit mit gesundem Colonepithel und zeichnet sich durch langes Ausdifferenzieren aus. CaCo-2-Zellen haben nach dreiwöchiger Differenzierung transepitheliale Widerstände zwischen 300 und 500 $\Omega \cdot \text{cm}^2$.

3. HT-29/B6-Zellen:

HT-29/B6-Zellen sind ein aus der humanen Colonkarzinom-Zelllinie HT-29 erzeugter konfluent wachsender Subklon mit einem transepithelialen Widerstand von ca. 400 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (Kreusel et al., 1991). Diese Zellen repräsentieren damit ein dichtes Epithel. Sie wurden unter anderem als cDNA-Quelle für die später beschriebene Klonierung von Tricellulin (TRIC-a) verwendet.

3.1.6 Puffer und Lösungen

BSA-Blockierungslösung

5	g	BSA
0,02	g	Natriumazid
ad 100 ml		PBS/Tween

6×DNA Probenpuffer:

40	%	Sucrose
0,25	%	Bromphenolblau
5	mM	EDTA pH 8,0

Elektrophoresepuffer

500	ml	10×Westpuffer
50	ml	10% SDS
ad 5 l		Wasser

EtBr-Lösung:

10	mg	Ethidiumbromid
1	ml	H ₂ O

Fixierungspuffer für Gefrierbruch:

5,05	g	Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O
671,4	mg	KH ₂ PO ₄
ad 500 ml		Wasser
4,5	ml	versetzt mit 0,5 ml Glutaraldehyd (25%)

Gesamtlysepuffer:

10	mM	Tris-Cl pH 7,5
150	mM	NaCl
0,5	%	Triton X-100
0,1	%	SDS

pro 10 ml Zugabe einer Tablette Complete (Roche)

3 Material und Methoden

IPTG-Lösung:

1	g	Isopropylthio- β -galactosid
---	---	------------------------------------

LB-Medium (flüssig):

10	g/l	Bacto-Trypton
5	g/l	Bacto-Yeast extract
5	g/l	NaCl
100	μ g/ml	Ampicillin (Zugabe nach dem Autoklavieren)

LB-Medium (fest)

10	g/l	Bacto-Trypton
5	g/l	Bacto-Yeast extract
5	g/l	NaCl
		Agar
100	μ g/ml	Ampicillin (Zugabe nach dem Autoklavieren)

Mannitol-Ringer (Anionen)

280	mM	Mannitol
5,4	mM	KCl
1	mM	MgSO ₄
1.2	mM	CaCl ₂
10	mM	HEPES
10	mM	Glucose
pH 7,4		

Mannitol-Ringer (Eisenman)

21	mM	NaHCO ₃
238	mM	Mannitol
5,4	mM	KCl
1	mM	MgSO ₄
1.2	mM	CaCl ₂
3	mM	HEPES
10	mM	Glucose
pH 7,8		

3 Material und Methoden

Mannitol-Ringer (Sherry)

20	mM	NaCl
240	mM	Mannitol
5,4	mM	KCl
1	mM	MgSO ₄
1.2	mM	CaCl ₂
10	mM	HEPES
10	mM	Glucose
pH 7,4		

Membranlysepuffer

2	ml	1 M Tris-Cl, pH 7,4
500	µl	1 M MgCl ₂
200	µl	0,5 M EDTA
120	µl	0,5 M EGTA

ad 100 ml Wasser

pro 10 ml Zugabe einer Tablette Complete (Roche)

modifizierte Ringer (Anionen)

140	mM	NaBr / NaI / NaF
5,4	mM	KCl
1	mM	MgSO ₄
1.2	mM	CaCl ₂
10	mM	HEPES
10	mM	Glucose
pH 7,4		

modifizierte Ringer (Eisenman)

21	mM	NaHCO ₃
119	mM	LiCl / KCl / RbCl / CsCl
5,4	mM	KCl
1	mM	MgSO ₄
1.2	mM	CaCl ₂
3	mM	HEPES
10	mM	Glucose
pH 7,8		

3 Material und Methoden

modifizierte Ringer (Sherry)

93,33	mM	MgCl ₂ / CaCl ₂ / SrCl ₂ / BaCl ₂
5,4	mM	KCl
1	mM	MgSO ₄
1.2	mM	CaCl ₂
10	mM	HEPES
10	mM	Glucose
pH 7,4		

PBS/Tween

2	Stück	PBS-Tabletten
1	ml	Tween 20
ad 1 l		Wasser

Standard-Ringer (Sherry / Anionen)

140	mM	NaCl
5,4	mM	KCl
1	mM	MgSO ₄
1.2	mM	CaCl ₂
10	mM	HEPES
10	mM	Glucose
pH 7,4		

Standard-Ringer (Eisenman)

21	mM	NaHCO ₃
119	mM	NaCl
5,4	mM	KCl
1	mM	MgSO ₄
1.2	mM	CaCl ₂
3	mM	HEPES
10	mM	Glucose
pH 7,8		

Sammelgel

9,8	ml	Sammelgellösung (bereits vorgemischt)
100	µl	10 % SDS
100	µl	APS
10	µl	TEMED

3 Material und Methoden

1× TAE:

40	mM	Tris-Acetat pH 8,3
1	mM	EDTA

Transferpuffer

100	ml	10× Westpuffer
100	ml	Methanol abs.
ad 1 l		Wasser

Trenngel (8,5%)

5,6	ml	Acrylamidlösung
10,1	ml	Wasser
4,7	ml	1,5 M Tris, pH 8,8
200	µl	10% SDS
200	µl	10% APS
10	µl	TEMED

Trenngel (12,5%)

8,2	ml	Acrylamidlösung
7,1	ml	Wasser
4,7	ml	1,5 M Tris, pH 8,8
200	µl	10% SDS
200	µl	10% APS
10	µl	TEMED

10× Westpuffer

144	g	Glycin
30,4	g	Tris
ad 1 l		Wasser

pH: 8,1 - 8,4

X-Gal-Lösung:

20	mg	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid
1	ml	Dimethylformamid

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Membranproteinextraktion aus Zellkulturen

Um Membranproteine aus Zellkulturen zu extrahieren, wurden diese zunächst mit calcium- und magnesiumhaltigem PBS gewaschen und dann je nach Zellkulturflaschengröße mit kaltem Membranlysepuffer versetzt (klein: 750 µl; groß: 1 ml). Dann wurden die Zellen mit einem Zellscraper abgeschabt und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die so erhaltene Zellsuspension wurde durch Insulinnadeln gezogen, bis sie homogen war. Nach einer kurzen Zentrifugation (5 min, 200×g, 4 °C) wurden die Überstände in Safelock-Eppendorfgefäße überführt und einer 30-minütigen Zentrifugation bei 43000×g (4 °C) unterzogen. Die dabei erhaltenen Pellets enthielten die membranständigen Proteine und wurden je nach Pelletgröße in ca. 100 µl Membranlysepuffer resuspendiert. Die Überstände enthielten die gelösten Membranfraktionen. Die so gewonnenen Proteine wurden bei –80 °C gelagert.

3.2.2 Gesamtproteinextraktion

Zur Gesamtproteinextraktion wurden die Zellmonolayer zunächst mit PBS gewaschen und dann in PBS mit einem Zellscraper zusammengeschaabt (kleine Zellkulturflasche: 1 ml). Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1000×g für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Zellpellet mit 500 µl kaltem Gesamtlysepuffer versetzt und resuspendiert. Nach 30-bis 60-minütiger Inkubation bei 4 °C und zwischenzeitlichem Vortexen wurde bei 15000×g, 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand enthielt den Gesamtproteinextrakt und wurde bei –80 °C gelagert.

3.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Pierce

Das Prinzip der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Pierce ist die Reaktion von Proteinen mit Kupfer bei alkalischem pH-Wert, wodurch ein farbiger Kupferkomplex entsteht, der durch Absorptionsmessung bei 562 nm zur Berechnung der enthaltenen Proteinkonzentration verwendet wird. Hierbei wird mit einer Eichreihe bekannter

Proteinkonzentrationen abgeglichen. Diese Methode wird auch BCA-Assay genannt (Bicinchoninic Acid Assay).

Die Ansatzvorbereitung erfolgte in Mikrotiterplatten, wobei in Doppelansätzen gearbeitet wurde. Eine Eichreihe aus je 10 µl BSA-Lösungen der Konzentrationen 0,2 mg/ml, 0,8 mg/ml und 1,2 mg/ml und ebenfalls 10 µl des jeweiligen Lysepuffers wurden ebenso vorgelegt wie die zu vermessenden Proben. Von diesen wurden 10 µl verwendet, wobei unter Umständen zunächst in geeigneter Weise mit Lysepuffer verdünnt worden war.

Nach Vorlage der Proteinproben wurden zu jedem Ansatz 190 µl der BCA-Gebrauchslösung hinzupipettiert und die gesamte Mikrotiterplatte 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur konnte die Platte im Tecan Spectra-Photometer bei 562 nm vermessen und die Konzentration ermittelt werden.

3.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli

Bei der SDS-Polyacrylamidelektrophorese handelt es sich um eine diskontinuierliche Gelelektrophorese von Proteinen. Hierbei besteht das Polyacrylamidgel aus zwei unterschiedlichen Gelteilen. Das obere, in dem sich die Taschen für den Probenauftrag befinden, ist das Sammelgel. Es ist weitmaschig, weil es einen geringeren Acrylamidgehalt besitzt (4%). Zudem besitzt es einen pH-Wert, der sich im Neutralbereich befindet, während das darunter liegende Trenngel einen basischen pH-Wert (8,8) besitzt und durch einen höheren Acrylamidanteil (in den durchgeführten Experimenten 8,5% und 12,5%) engmaschiger ist.

Das Wanderungsverhalten ist stark von diesem pH-Wertunterschied abhängig.

Bei basischem pH liegt das im Puffer enthaltene Glycin als Anion vor, weswegen es bei der Elektrophorese wie die durch SDS linearisierten und negativ geladenen Proteine und die Puffer-Chloridionen in Richtung der Anode wandert.

Im Sammelgel kommt es zur pH-Wertänderung, der dem isoelektrischen Punkt des Glycins entspricht. Dieses liegt nun als Zwitterion im Gleichgewicht vor. Es ist nach außen hin neutral geladen, wird also nicht mehr durch den angelegten Strom beeinflusst.

Dadurch kommt im Sammelgel eine geringere Menge an Ladungsträgern vor, was zur Folge hat, dass die Feldstärke und auch der elektrische Widerstand dort zunimmt, was sich aus dem Zusammenhang $U = R \cdot I$ herleiten lässt. Durch diese steigende Feldstärke werden die übrigen Anionen stärker beschleunigt. Es kommt zur Aufkonzentration, d.h. es entstehen

schärfere Banden. Im Trenngel herrscht dann wieder der basischere pH-Wert vor, Glycin ist wieder negativ geladen und läuft aufgrund seiner geringen Masse an den Proteinen vorbei aus dem Gel heraus.

SDS (Sodiumdodecylsulfate, Natriumdodecylsulfat) kommt hierbei eine wichtige Funktion zu. Dieses Detergenz denaturiert Proteine und lagert sich an deren Oberfläche. Dadurch wird einerseits der Einfluss der Struktur auf die Laufgeschwindigkeit vermieden und andererseits eine negative Ladung an den Proteinen stabilisiert, so dass sie in Richtung der Anode wandern.

Für die Gelelektrophorese wurde zunächst ein ca. 6 cm hohes Trenngel gegossen und mit einer geringen Menge Ethanol überschichtet, um ein glattes Gel zu erhalten. Nachdem dieses auspolymerisiert war, wurde der Alkohol entfernt, das Sammelgel gegossen und der Kamm für die Probenaschen gesteckt. Wenn auch dieses Gel auspolymerisiert war, wurde der Kamm gezogen und die Gelkammer mit dem Gel in die Gelkammer eingebaut. Die Kammer wurde mit Elektrolysepuffer gefüllt, die Probenaschen wurden mit diesem gespült und die Proben und ein Marker wurden aufgetragen. Die Proteinproben enthielten gleiche Gesamtmengen an Protein (10 µg) und waren mit 5×-Laemmli-Probenpuffer und Lysepuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert worden, bevor sie aufgetragen wurden.

Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V bis die gewünschte Laufweite, erkennbar an der Lauffront des im Probenpuffer enthaltenen Bromphenolblaus, erreicht war.

Dann wurde das Gel aus der Kammer und den Glasplatten ausgebaut und konnte weiterbehandelt werden.

3.2.4 Western Blot

Bei einem Western Blot werden Proteine über Bindung eines Primärantikörpers gegen das Protein und eines Sekundärantikörpers gegen den Primärantikörper nachgewiesen. Der Sekundärantikörper ist hierbei an eine Peroxidase gekoppelt, die mit geeigneten Substraten eine detektierbare Fluoreszenz hervorruft.

Zunächst wurden für einen Western Blot die Proteine einer SDS-PAGE auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dazu wurde zunächst die Membran in absolutem Ethanol inkubiert und dann in Transferpuffer äquilibriert.

Bei der Sandwich-Technik wurde folgender Aufbau verwendet:

klares Panel
Schwamm
Whatman-Filter
Membran
Gel
Whatman-Filter
Schwamm
schwarzes Panel

Alle Komponenten wurden zunächst in Transferpuffer equilibriert und dann luftblasenfrei zusammengesetzt. Anschließend wurden diese Sandwiches in einem Transfereinsatz für Elektrophoresekammern eingesetzt (schwarzes Panel zu schwarzer Seite) und zusammen mit einem -80 °C - kaltem Kühlakku und einem Rührfisch in die Kammer eingebaut. Die Kammer wurde dann vollständig mit Transferpuffer gefüllt und unter Rühren auf einem Magnetrührer für eine Stunde an eine Spannung von 100 Volt angeschlossen.

Die Proteine wanderten hierbei ähnlich wie bei der Elektrophorese zur Anode, also hier zu der Membran.

Nach dem Transfer erfolgte der eigentliche Western Blot. Die Membran wurde nach kurzem Spülen in PBS/Tween in einer BSA-Blockierungslösung für zwei Stunden bei Raumtemperatur (alternativ o/n 4 °C) geschwenkt. BSA besetzte hierbei freie Proteinbindungsstellen auf der Membran und verringerte dadurch die unspezifische Bindung der Antikörper sowie anderer Proteine. Nach diesem Blockierungsschritt wurde die Membran mit dem Primärantikörper gegen das zu untersuchende Protein inkubiert. Meist wurde dieser in einer Verdünnung von 1:2000 in BSA-Blockierungslösung angesetzt. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur (alternativ o/n 4 °C) wurde die Membran zweimal für je zehn Minuten in PBS/Tween und dann einmal für ebenfalls zehn Minuten in TBS/Tween gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet war. Dieser Antikörper wurde in einer 1:1000-Verdünnung in einer Blockierungslösung aus 1%-Blockingreagenz (Lumilight) in TBS/Tween angesetzt. Nach

einer ca. 70-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Membran wiederum zweimal in PBS/Tween (je 10 min) und einmal in TBS/Tween (10 min) gewaschen.

Anschließend wurde die Membran für fünf Minuten in einer Lumilight-Lösung (1:1 Mischung von Lösung 1 und 2) im Dunkeln inkubiert, dann zwischen zwei Transparentfolien gelegt und die entstehende Fluoreszenz im LAS-1000 detektiert.

Die Intensitäten der Fluoreszenz ermöglichten die quantitative Analyse vorhandener Menge des zu untersuchenden Proteins und konnten mit geeigneter Software (AIDA) ausgewertet werden.

3.2.5 Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz lassen sich Proteine in Gewebsschnitten oder Zellkulturen visualisieren und somit lokalisieren. Hierbei werden in zwei Schritten spezifisch Antikörper gebunden. Der Primärantikörper richtet sich gegen das zu untersuchende Protein, während der Sekundärantikörper gegen den Primärantikörper, bzw. dessen Ursprungsorganismus, z.B. Kaninchen oder Maus, gerichtet ist. An den Sekundärantikörper ist ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, der durch Licht bestimmter Wellenlängen zur Fluoreszenz angeregt wird. Bei Verwendung von Primärantikörpern aus zwei verschiedenen Spezies und Sekundärantikörpern mit Fluoreszenzfarbstoffen verschiedener Anregungswellenlängen können gleichzeitig zwei Proteine untersucht und verglichen werden.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die auf Deckgläschen gewachsenen Zellen zunächst zweimal mit PBS, das Mg^{2+} und Ca^{2+} enthielt, gewaschen und dann für 10 min bei -20 °C mit absolutem Ethanol (-20 °C) fixiert. Es folgte ein weiteres zweimaliges Waschen mit PBS und dann ein Permeabilisieren der Membran durch Inkubation mit 0,5% Triton X-100 (in PBS, 7 min, RT). Danach wurden für zehn Minuten bei Raumtemperatur freie Proteinbindungsstellen auf dem Deckglas mit einer Blockierungslösung (5%-Goatserum in PBS) blockiert. Die Zellen wurden daraufhin mit dem ersten Primärantikörper inkubiert (1 h bei RT, alternativ 45 min bei 37 °C), wobei es sich empfahl, hier zunächst den monoklonalen Antikörper (aus der Maus oder dem Meerschweinchen) zu verwenden, da der polyklonale (Kaninchen) eventuell auch Bindungsstellen des spezifischeren monoklonalen Antikörpers besetzen könnte. Nach der ersten Inkubation wurde zweimal mit der Blockierungslösung gewaschen und dann mit dem zweiten Primärantikörper inkubiert (1 h bei RT, alternativ

45 min bei 37 °C). Es wurde danach wiederum zweimal mit Blockierungslösung gewaschen. Es folgte Inkubation im Dunkeln mit den Sekundärantikörpern (1 h, bei RT) und anschließend zweimaliges Waschen mit Blockierungslösung. Dann wurden die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt (10 min bei RT, im Dunkeln). Die Deckgläschen wurden anschließend kurz in Wasser, dann in absolutes Ethanol getaucht und nach Trocknung mit der bewachsenen Seite nach unten auf einen Objektträger mit einem Tropfen ProTaq-Mounting-Lösung luftblasenfrei eingedeckt.

Die Antikörper wurden folgendermaßen mit Blockierungslösung verdünnt:

- Claudin-Antikörper:	1:100
- Occludin-Antikörper:	1:200
- FLAG-M2-Antikörper:	1:600
- Tricellulin-Antikörper:	1:1000
- Sekundärantikörper Anti-Rabbit 594 nm:	1:500
- Sekundärantikörper Anti-Mouse 488 nm:	1:500
- Sekundärantikörper Anti-Guinea pig 488 nm:	1:2000
- DAPI (1mg / ml)	1:1000

Nach Aushärtung über Nacht konnten die Objekte unter dem konfokalen Laser Scanning-Mikroskop (Zeiss LSM 510 Meta) analysiert und aufgenommen werden.

Entsprechend den Sekundärantikörpern wurden die Wellenlängen 594 nm (rot) und 488 nm (grün) sowie 408 nm (blau für DAPI) verwendet. Die Aufnahmen erfolgten unter Verwendung von 40× und 63× NA 1,4 Plan-Apochromat Plan-Neofluor-Objektiven. Zur Auswertung und Aufnahme der Färbungen wurde die zugehörige LSM-Software (IM Version 3.2, Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen, Germany) verwendet.

Für Z-Scans wurden mehrere XY-Aufnahmen gemacht, die übereinander gelegt eine Seitenansicht der Z-Achse ermöglichen.

Intensityplot-Auswertungen ermöglichen die Untersuchung der Signalstärken einer XY-Aufnahme. Die Z-Achse gibt dabei die Intensität der Signale an, wobei gleichzeitig auch eine Farbkodierung (rot = hohe Intensität, blau = geringe bis keine Intensität) verwendet wird.

3.2.6 Fluoreszenz-Live-Cell-Imaging

Zur Visualisierung von Prozessen innerhalb von Zellen ist es von Vorteil, diese am lebenden System zu untersuchen.

Dazu wurden Zellen invers auf Hängefiltern ausgesät, um eine geeignete Nähe zum Objektiv des Mikroskops zu gewährleisten. Das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop war derartig modifiziert worden, dass sich der Zellkulturfilter in einer temperierten mit HEPES-gepufferter Badlösung gefüllten Kammer befand. Vor Einbau des Filters wurde dieser apikal mit 5%iger Low Melt-Agarose bedeckt, um Diffusion von Molekülen oberhalb der Zellen zu verringern und gleichzeitig diese zu akkumulieren. Nach Einbau und Ausrichtung des Filters wurden markierte Dextrane mit Größen von 3 kDa (TMR-Dextran, 4 μ M) und 70 kDa (OG-Dextran, 4 μ M) basolateral gegeben und der Durchtritt über die Zellschicht in der XZ-Ebene über die Zeit visualisiert.

3.2.7 TUNEL-Färbung

Über einen TUNEL-Assay (*terminal transferase dUTP nick end labeling*) werden Zellen, die sich in Apoptose befinden, spezifisch angefärbt. Bei der Apoptose durch Endonucleasenaktivität entstehende DNA-Fragmente werden hierbei mit fluoreszenzmarkierten dUTP-Nucleotiden markiert, die durch eine Terminal-Transferase an die 3'-OH-Bruchenden geknüpft werden. Die Zellen können dann am Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar gemacht und gezählt werden.

Die zu analysierenden Zellmonolayer wurden für 20 min bei Raumtemperatur in 1% Paraformaldehyd fixiert. Nach ebenfalls 20-minütiger Inkubation mit 25 mM Glycin wurden die Zellen in Paraffin eingebettet, geschnitten, entparaffiniert und mit dem TUNEL-Assay-Kit gefärbt. Die in Apoptose befindlichen Zellen wurden dann am Fluoreszenz-Mikroskop ausgezählt und ins Verhältnis zu ungefärbten, nicht-apoptotischen Zellen gesetzt.

3.2.8 cDNA-Herstellung

3.2.8.1 RNA-Extraktion

Bei der Extraktion von RNA musste äußerst vorsichtig und sauber gearbeitet werden, da RNA um einiges instabiler als DNA ist. Um sie aus Zellkultur zu erhalten, wurden die Zellen, die auf Schalen gewachsen waren, zunächst mit PBS gewaschen und dann mit 1,5 ml RNAzol (WAK-Chemie) versetzt. Dann wurden die Zellen mit Hilfe von Zellscrapern abgelöst und das erhaltene Homogenat in zwei Eppendorftubes aufgeteilt, dort mit je 75 µl Chloroform versetzt und für 15 s gründlich gevortext und anschließend für 5 min bei 4 °C inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation (4 °C, 12 000×g) wurde die wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit einem Volumen Isopropanol vermischt, was ein Ausfällen der RNA bewirkte. Nach Inkubation für 30 min bei 4 °C wurde wiederum zentrifugiert (4 °C, 12000×g, 15 min) und der Überstand verworfen. Das RNA-Pellet wurde 5 min in der Speed Vac getrocknet und dann in 50 µl Wasser (Fluka) resuspendiert (30 min, 4 °C). Anschließend wurden die Ansätze wieder vereinigt und bei –80 °C aufbewahrt. Für die photometrische RNA-Quantifizierung wurde die RNA im Verhältnis 1:100 verdünnt.

3.2.8.2 Reverse Transkription

Die Reverse Transkriptase ist ein RNA-abhängiges Enzym, das bei der retroviralen Replikation benötigt wird. Anwendung findet sie bei der cDNA-Herstellung aus mRNA. cDNA gibt im Gegensatz zu genomischer eukaryotischer DNA die Nucleotidsequenz des fertig prozessierten Informationsträgers für die Biosynthese des eigentlichen Proteins wieder.

Die cDNA wurde von der Reversen Transkriptase unter Verwendung eines Oligo-d(T)-Primers, der an den Poly-A-Schwanz der mRNA bindet, synthetisiert.

RT-Ansatz (Omniscript RT-Kit, Qiagen):

2 µl	10× RT-Puffer
2 µl	dNTP-Mix (je 5 mM)
2 µl	Oligo-d(T) ₁₆ -Primer
1 µl	RNase-Inhibitor (10 U/µl)
1 µl	Omniscript Reverse Transkriptase
≤ 4 µg	Gesamt-RNA
ad 20 µl	RNase-freies H ₂ O

Es folgte eine Inkubation für eine Stunde bei 37°C und eine Hitzeinaktivierung der Reversen Transkriptase für 5 min bei 93°C. Die so erhaltene cDNA wurde bei –80 °C gelagert.

3.2.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ermöglicht es, DNA zu replizieren, wobei das Prinzip der Replikation in Organismen genutzt, bzw. vereinfacht wird. Durch Erhitzen der DNA auf 95 °C kommt es zur Denaturierung in Einzelstränge, an die bei einer geringeren Temperatur (Annealing temperature) spezifische Primer durch Hybridisierung binden. Diese dienen der bei der PCR eingesetzten DNA-Polymerase als Startpunkt für eine anschließende Neusynthese des Gegenstrangs.

Aufgrund der hohen Temperaturen, bei denen gearbeitet wird, muss die DNA-Polymerase hitzestabil sein, um nicht bereits nach einem Zyklus denaturiert zu werden. Sie müsste dann immer wieder neu dazugegeben werden. Es werden deswegen im Allgemeinen Polymerasen aus hyperthermophilen Archeen verwendet.

Weitere Faktoren, die sich auf die Ausbeute der PCR auswirken, sind neben der Temperatur auch die Magnesiumionenkonzentration des Puffers, die als Co-Faktor die dNTPs aktiviert und die Tertiärstruktur der Polymerase stabilisiert. Zudem sollte die Templatekonzentration, obwohl zunächst exponentiell amplifiziert wird, am Anfang nicht zu gering sein, da nach ca. 30 Zyklen ein Plateau erreicht wird, wodurch bei einer zu geringen Startmenge nicht ausreichend DNA synthetisiert wird. Dieses Plateau wird dadurch erklärbar, dass sich die Reaktionsparameter im Verlauf der PCR verändern. So nimmt von Synthese zu Synthese die Nucleotidmenge sowie die Primermenge ab, das Enzym kann durch das ständige Erhitzen und Abkühlen auch trotz seiner Archeenherkunft irgendwann doch seine Aktivität einbüßen

und auch der pH-Wert des Puffers ändert sich, was sich auch auf die Stabilität der Substanzen auswirken kann.

Die verwendeten Ansätze und PCR-Programme werden, da sie durch die Verwendung jeweiliger Primer, Templates und Polymerasen stark in ihrer Zusammensetzung und den Anforderungen schwanken, in den einzelnen Verfahren aufgeführt.

3.2.9.1 Taq-PCR

Um zunächst ein Screening nach erfolgversprechenden Templates durchzuführen und auch die idealen Temperaturbedingungen für die Amplifizierung des gewünschten Fragments herauszufinden, falls sich diese von den theoretischen Erwartungen unterscheiden, wurde ein PCR mit *Taq*-Polymerase durchgeführt.

Die *Taq*-Polymerase stammt aus dem Organismus *Thermophilus aquaticus* und erfüllt somit die an für die PCR verwendeten Polymerasen gestellten Anforderungen. Da sie jedoch keine Proofreading-Aktivität besitzt, ist sie nicht für Klonierungen geeignet, da sich Basenaustausche eventuell in Aminosäureaustauschen bemerkbar machen können, die die richtige Faltung und somit auch Funktion des ursprünglichen Proteins verändern oder gar deaktivieren.

Zur Klonierung der kompletten TRIC-a-Sequenz wurden dabei folgende Primer verwendet:

Sense (for):

5'- GCG GGT ACC CAA GCT TGC CGC CAT GTC AAA TGA TGG AAG ATC C-3'

Antisense (rev):

5'- GCG GGT ACC AAG CTT TTA AGA ATA ACC TTG TAC ATC C-3'

PCR-Ansatz (25 µl):

2,5 µl	10× Pfu-Puffer
1,5 µl	25 mM MgCl ₂
1,4 µl	dNTP-Mix (je 2,5 mM)
0,5 µl	Template (RT)
1,3 µl	10 µM Primer (for)
1,3 µl	10 µM Primer (rev)
0,5 µl	Taq-Polymerase (Qiagen)
16 µl	H ₂ O

PCR-Programm:

5 min	95 °C
35×: 30 s	95 °C
30 s	(T _m -Primer – 5) °C
120 s	72 °C
7 min	72 °C
∞	4 °C

3.2.9.2 Pfu-PCR

Nach erfolgreicher *Taq*-PCR konnte eine PCR mit der *Pfu*-Polymerase durchgeführt werden. Diese Polymerase, die aus *Pyrococcus furiosus* stammt, verfügt über eine Proofreading-Aktivität, so dass sie für fehlerfreie Klonierungen eingesetzt werden konnte.

PCR-Ansatz (50 µl):

5 µl	10× Pfu-Puffer
2,8 µl	dNTP-Mix (je 2,5 mM)
1 µl	Template (RT)
2,6 µl	10 µM Primer (for)
2,6 µl	10 µM Primer (rev)
1 µl	Pfu-Polymerase (Stratagene)
35 µl	H ₂ O

PCR-Programm:

15 min	95 °C
25×: 30 s	95 °C
30 s	58 °C
120 s	72 °C
7 min	72 °C
∞	4 °C

3.2.10 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe von Agarosegelen lassen sich DNA-Fragmente aufgrund der negativen Ladungen der Phosphatgruppen in einem elektrischen Feld trennen. Agarosegele haben ein hohes Auflösungsvermögen und werden bei Fragmentgrößen bis zu 20 kb verwendet. Das Wanderungsverhalten der DNA wird durch mehrere Faktoren beeinflusst:

1. Die Größe der DNA: Lineare DNA-Fragmente bewegen sich durch Agarosegele mit einer zum Logarithmus ihrer Größe umgekehrt proportionalen Geschwindigkeit, was bedeutet, dass kleinere Fragmente schneller durch das Gel wandern als größere.
2. Die Konformation der DNA: Ringförmige superhelikale DNA wandert im elektrischen Feld schneller als die gleichgroße, ringförmig, relaxierte DNA. Lineare DNA gleicher Größe wandert mit einer Geschwindigkeit, die zwischen denen der beiden anderen Konformationen liegt.
3. Die Agarose-Konzentration: Je höher der prozentuale Anteil der Agarose im Gel ist, desto schwerer wird es für die DNA-Fragmente, dieses zu durchqueren, wodurch sich mit höherprozentigen Agarosegelen eine gute Trennung kleinerer Fragmente ergibt. Bei Größen, die sich zwischen 1000 bis 15000 Basenpaaren bewegen, werden meist Konzentrationen zwischen 0,5 und 1% verwendet.
4. Die angelegte Stromstärke: Je stärkere Spannungen angelegt werden, desto schneller wandern die DNA-Fragmente Richtung Anode.
5. Pufferbedingungen: Die Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers beeinflusst die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA, was sich auf Vorhandensein von verschiedenen Ionen und dem pH-Wert, bzw. dessen Pufferung zurückführen lässt.

Für Agarosegele werden häufig TAE-Puffer oder TBE-Puffer verwendet. Der Tris-Acetat enthaltende TAE-Puffer hat eine niedrigere Pufferkapazität als TBE, der neben Tris auch Borsäure enthält, ermöglicht allerdings doppelsträngiger, linearer DNA ein um ca. 10% schnelleres Durchlaufen des Gels, wobei die Auflösung dieselbe bleibt. Bei supercoiled vorliegender DNA bietet TAE jedoch eine bessere Auftrennung als TBE.

Die DNA-Fragmente werden bei Anwesenheit von Ethidiumbromid, das sich durch Interkalation zwischen die Basepaarungen schiebt, unter UV-Licht sichtbar und können über Vergleich der Größen mit bekannten DNA-Fragmenten eines Markers analysiert werden. Einige Marker können zudem, wenn der DNA-Gehalt der einzelnen Banden bekannt ist, auch zur Abschätzung der ungefähren DNA-Menge einer Bande verwendet werden, indem Intensitäten verglichen werden.

Agarose wurde mit 1× TAE / 0,5 µg/ml Ethidiumbromid aufgeköcht und nach Abkühlen auf ca. 50 °C in einen eingegrenzten Gelschlitten gegossen. Taschen zur Probenaufnahme wurden über Einsetzen eines Kammes erhalten. Nach Erstarren des Gels wurde dieses in eine Elektrophoresekammer gelegt und diese dann mit 1× TAE / 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gefüllt bis das Gel vollständig bedeckt war.

Die DNA-Proben wurden mit einem Sechstel des gesamten Auftragevolumens 6× Probenpuffer vermischt und nach Ziehen des Kammes aufgetragen. Der Probenpuffer ermöglichte durch einen hohen Glyceringehalt das Einsinken der Proben in die Tasche und enthielt Bromphenolblau, das durch sein Laufverhalten als blaue Lauffront diente.

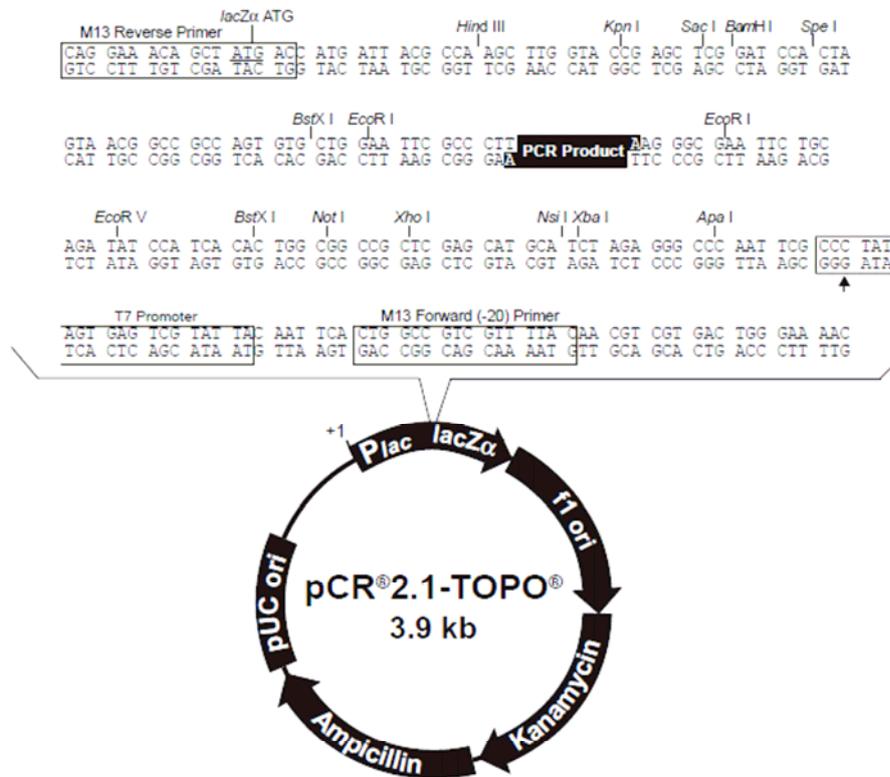
Dann wurde eine Spannung angelegt, die die Wanderung der DNA Richtung Anode ermöglichte.

3.2.11 Ligation in einen Klonierungsvektor

Um ein Genfragment analysieren zu können, wurde es, bevor eine genaue Sequenzierung möglich war, in einen Klonierungsvektor ligiert.

Der verwendete Vektor war in diesem Fall der Klonierungsvektor pCR 2.1-TOPO (Invitrogen, [Abb. 11](#)). Dieser war für eine schnelle und effiziente Ligation bereits mit DNA-Topoisomerase I linearisiert und kovalent an dieses Enzym, das ebenfalls als Ligase fungierte, über eine 3'-Phosphatgruppe gebunden. 4 µl der zu ligierenden DNA wurden mit 1 µl Salt Solution

(Invitrogen) und 1 µl pTOPO-Vektor gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde der Ansatz auf Eis gestellt und konnte in kompetente Zellen transformiert werden.



Comments for pCR^{2.1}-TOPO[®]
3931 nucleotides

Abb. 11 Vektorkarte und Informationen über die Multiple Cloning Site (MCS) des Klonierungsvektors pCR 2.1-TOPO (Invitrogen).

3.2.12 Transformation

Kompetente Zellen sind zur Aufnahme von Plasmiden geeignete Bakterien, d.h. sie sind äußerst permeabel. Das hat allerdings auch zur Folge, dass sie ebenfalls sehr empfindlich gegen mechanische Einflüsse sind.

Für die Transformation in OneShot TOP10F' wurden zunächst die bei -80 °C gelagerten kompetenten Zellen vorsichtig auf Eis aufgetaut und mindestens 10 min auf diesem vorinkubiert. Dann folgte die Zugabe des Ligationsansatzes, im Falle des Klonierungsvektor-Ligationsansatzes waren es 6 µl, und vorsichtiges Vermischen. Die Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde ein 30-sekündiger Hitzeschock bei 42 °C induziert und die Zellen

sofort wieder auf Eis gestellt. Nach ca. 2 min auf diesem wurden 250 µl SOC-Medium (RT) zu den Zellen gegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37 °C bei 225 rpm auf dem Schüttler inkubiert.

Anschließend wurden zwischen zehn und 200 µl des Transformationsansatzes auf LB-/50 µg-Amp-Platten ausgestrichen. Da der Klonierungsvektor pTOPO über eine LacZ α -Sequenz verfügte, die durch erfolgreiche Ligation mit Fremd-DNA unterbrochen wurde, konnte mittels gleichzeitiger Anwesenheit von X-Gal (40 µl) und IPTG (4 µl) eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt werden. Zellen, die zwar die Antibiotika-Resistenz erhalten hatten, aber kein Insert besaßen, konnten ungehindert X-Gal verstoffwechseln, so dass ein blauer Indigo-Farbstoff durch X-Gal-Hydrolyse gebildet wurde. Weiße Kolonien enthielten folglich Vektor und Insert.

3.2.13 Plasmidisoliation

Zur Plasmidisoliation wurde das Plasmid Miniprep Quick Kit von Qiagen verwendet. Dabei wurde zunächst eine 4 ml-Übernachtskultur der Bakterienkultur, deren Plasmid isoliert werden sollte, in Ampicillin-haltigem LB-Flüssigmedium angesetzt.

Von dieser wurden nach Inkubation bei 37 °C über Nacht und 225 rpm im Schüttler am nächsten Tag 1,5 ml für die Miniprep entnommen und für eine Minute (Hermle z233MK - Zentrifuge, 5000 rpm) zentrifugiert. Die sich als Pellet sammelnden Bakterien wurden nach Abgießen des Überstands in 300 µl P1-Puffer (Qiagen), der die Zellwand der Bakterien lysierte, resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl P2-Puffer (Qiagen) wurde vorsichtig invertiert und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurde jegliche in den Bakterien enthaltene DNA denaturiert. Dann wurden 300 µl P3-Puffer dazugegeben, wodurch durch den in ihm enthaltenen Acetatpuffer die Plasmide renaturierten, während andere DNA quervernetzt wurde und ausfiel. Nach Inkubation bei 4 °C für 15 min wurde die ausgefallene DNA abzentrifugiert (15 min, Top Speed). 800 µl des Überstands wurden entnommen und mit 400 µl Isopropanol vermischt. Dadurch wurden die Plasmide gefällt und konnten abzentrifugiert werden (15 min, Top Speed). Das so erhaltene Plasmidpellet wurde mit 250 µl Ethanol (70 %) gewaschen und nochmals zentrifugiert (5 min, Top Speed). Das Pellet wurde dann in der Speed Vac getrocknet und 50 µl Wasser resuspendiert.

Die Plasmidisoliation wird je nach Ansatzgröße als Miniprep, Midiprep etc. bezeichnet. Bei der Midiprep wurden 30 ml LB / 50-100 µg/ml Ampicillin mit 30 µl o/n Kultur der Miniprep

angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 225 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Die Schritte der Isolation waren ähnlich, auch wenn der Maßstab hier ein größerer war.

3.2.14 Sequenzierung

Mit Hilfe der Sequenzierungsmethode nach Sanger konnte die Gensequenz des unbekanntes Fragments erschlossen, bzw. die erwartete Sequenz bestätigt werden.

Zunächst wurde hierbei das Fragment in die MCS eines Plasmids eingebaut. Die Plasmide besaßen angrenzend an die MCS bekannte Sequenzen, die als Primeransatzstellen genutzt wurden.

Es folgte eine PCR mit nur einem dieser Primer und einer besonderen dNTP-Zusammensetzung. Diese enthielt zu einem bestimmten Anteil Didesoxynucleosidtriphosphate der vier Nucleoside Adenin, Guanin, Thymin oder Cytosin, die unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe, die der späteren Detektion dienen, gebunden hatten.

Wenn bei Didesoxyribonucleinsäuren die 3'-Hydroxylgruppe fehlte, brach bei der Synthese neuer DNA an dieser Stelle der Strang ab, weil diese Gruppe für die Verknüpfung benötigt worden wäre, aber nicht vorhanden war.

Somit bildeten sich im Laufe der PCR verschieden lange DNA-Stücke, die alle an dem markierten 2',3'-Didesoxynucleosidtriphosphat abgebrochen waren. Dieser PCR-Ansatz wurde nach Aufreinigung gelelektrophoretisch in einem Sequencer aufgetrennt. Die Gele wurden dabei auslaufen gelassen und die fluoreszierenden Banden mit Hilfe eines Lasers detektiert.

Der Sequencer, in dem dieses Gel lief, konnte nun aus den erhaltenen Banden die Sequenz des Genfragments errechnen, die zur weiteren Analyse geeignet war. Ein weiterer Unterschied zur herkömmlichen PCR war das Verwenden nur eines Primers, was eine lineare Vervielfachung der DNA zur Folge hatte. Dadurch waren auch alle entstehenden Fragmente als Template für den nächsten Schritt der PCR verwendbar.

Für die Sequenzierung wurde folgender PCR-Ansatz (10 µl) verwendet:

2 µl	5× Sequenzierungspuffer
2 µl	Premix-Lösung
5 µl	Miniprep-Ansatz (bzw. Midi-Prep)
1 µl	Primer der zu sequenzierenden Richtung

PCR-Programm:

5 min	96 °C
25×: 10 s	96 °C
5 s	55 °C, bzw. (T _m -5) °C
4 min	60 °C
∞	4 °C

Nach der PCR wurden die Sequenzierungsansätze über Centriflex-Tubes aufgereinigt. Dazu wurden die bei 4 °C gelagerten Tubes zunächst leer zentrifugiert (3 min, 850 ×g, 4 °C), das Collecting-Tube gewechselt, der PCR-Ansatz auf die Gelbettmitte aufgetragen und dann wiederum zentrifugiert (2 min, 850 ×g, 4 °C). Das erhaltene Eluat wurde in Sequencing Vials überführt und bei Bedarf auf 5-10 µl in der Speed Vac eingeengt (ca. 15 min). Es wurden anschließend 20 µl TSR (Template Suppression Reagent) zugegeben. Das Vial wurde mit einem Septum gut verschlossen, für drei Minuten bei 96 °C inkubiert und sofort danach auf Eis gestellt. Nach Entfernen von Luftblasen durch kurze Zentrifugation konnten die Sequenzierungsansätze im ABI 310 sequenziert werden.

Die Auswertung der erhaltenden Sequenzen erfolgte über Abgleich mit Datenbanken (BLAST) und einem Programm zur Darstellung der Peakfolge (Chromas).

3.2.15 Umklonierung in einen Expressionsvektor

Nach erfolgreicher Klonierung des gewünschten DNA-Fragments in den Klonierungsvektor konnte das Fragment in den Expressionsvektor pFLAG-CMV-10 (Abb. 12) umkloniert werden, um es dann in einem Zellmodell das dazugehörige Protein exprimieren zu lassen und dessen Eigenschaften weiter zu charakterisieren.

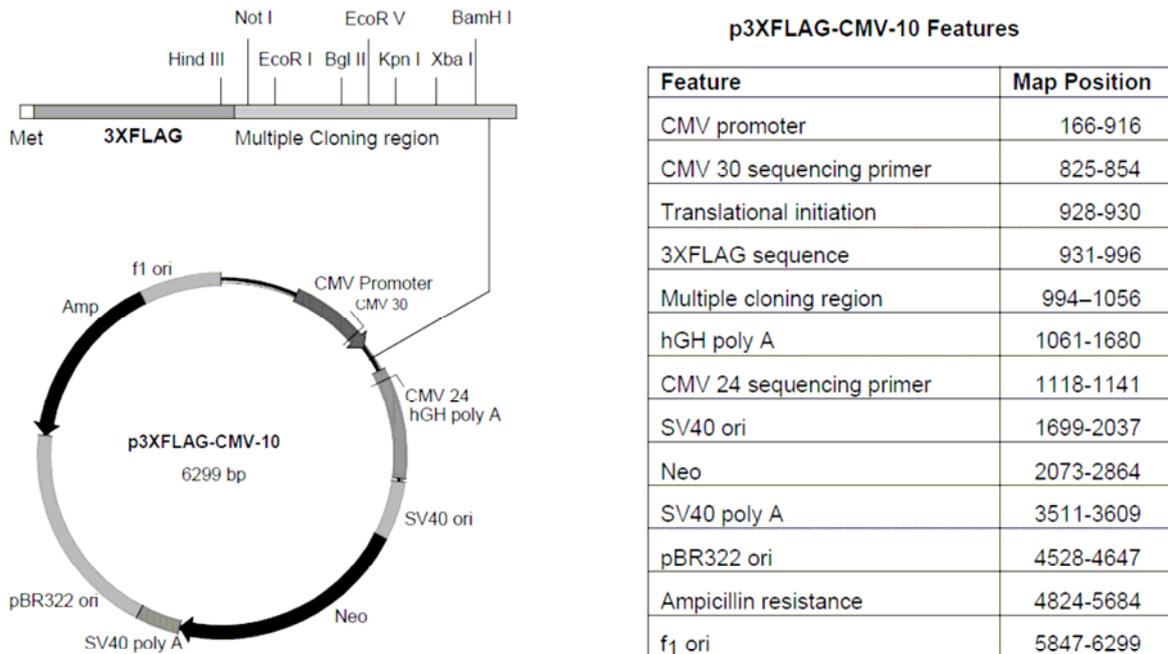


Abb. 12 Vektorkarte und einige Informationen zum Expressionsvektor pFLAG-CMV-10 (Sigma).

3.2.15.2 Restriktionsverdau

Um in den Expressionsvektor ligiert werden zu können, wurde das Insert mit geeigneten Restriktionsenzymen aus dem Klonierungsvektor herausgeschnitten. Hierbei wurden unterschiedliche überhängende Sequenzen geschaffen, um eine korrekte Orientierung des Inserts innerhalb des Expressionsvektors zu erhalten (die *Bam HI*-Schnittstelle innerhalb von TRIC-a war mutiert worden, ohne jedoch eine Änderung der Aminosäuresequenz zu bewirken).

Restriktionsenzyme sind Endonucleasen bakterieller Herkunft, die in diesen die Funktion haben, Fremd-DNA, z.B. aus Viren, aus dem Genom des Bakteriums herauszuschneiden.

Sie erkennen bestimmte Sequenzen, die meist palindromartig angeordnet sind, und zerschneiden diese spezifisch, wobei überhängende Enden (sticky ends) oder aber glatte Schnitte (blunt ends) entstehen. Die bakterielle DNA ist gegen diesen Endonucleaseverdau durch Methylierung geschützt.

Restriktionsverdau-Ansatz (je 20 µl):

1. Insert:

10 µl	Miniprep (Insert in Klonierungsvektor)
1 µl	Restriktionsenzym <i>Bam HI</i>
1 µl	Restriktionsenzym <i>Hind III</i>
2 µl	10× BSA (NEB)
2 µl	10× Puffer 2 (NEB)
6 µl	H ₂ O

2. Expressionsvektor (CMV-10)

4 µl	CMV-4-Vektor (Midi 635)
1 µl	Restriktionsenzym <i>BamHI</i>
1 µl	Restriktionsenzym <i>Hind III</i>
2 µl	10× Puffer 2 (NEB)
2 µl	10× BSA (NEB)
10 µl	H ₂ O

Die Restriktionsverdau-Ansätze wurden mindestens zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Hitzeinaktivierung bei 65 °C für 20 min und eine Überprüfung des erfolgreichen Verdau über Auftrag einer Probe auf ein 1%-Agarosegel.

3.2.15.3 Ligation

Nach Erzeugung überhängender Enden wurden Vektor und Insert in gleichen Stoffmengen zusammengegeben, nachdem ihre Konzentration über ein Gel und Abgleich mit einem Konzentrationsmarker abgeschätzt worden waren, und durch eine Ligase verknüpft.

Ansatz (10 µl):

1 µl	10× T4-DNA-Ligase-Puffer (mit ATP)
1 µl	T4-DNA-Ligase
50 ng	TRIC-a-Insert
50 ng	CMV-10-Vektor
ad 10 µl	H ₂ O

Die Ligation konnte über Nacht bei 14 °C ablaufen. Es folgte eine Hitzeinaktivierung der Ligase bei 65 °C für 10 min.

Mit dem so erhaltenen Plasmid wurden analog zu 3.2.12 kompetente Zellen transformiert, wobei jedoch maximal 4 µl des Ansatzes verwendet wurden. Bei der Ausplattierung wurde zudem auf X-Gal und IPTG verzichtet, da der CMV-10-Vektor über keine Galactosidase-Aktivität verfügte.

3.2.16 Colony PCR

Wenn nach einer Klonierung die Orientierung des Inserts überprüft werden muss oder aber keine farbliche Selektion mittels X-Gal-Spaltung durchgeführt werden kann, identifiziert man positive Klone mittels Colony PCR. Dies ist beispielsweise der Fall, wenn Expressionsvektoren vorliegen. Hier würde eine Sequenz, die für die β-Galactosidase-reaktion nötig ist und in der MCS liegt, die spätere Expression in Eukaryoten nicht möglich machen.

Für die Colony PCR wurden einzelne Bakterienkolonien nach erfolgter Transformation mittels einer Eppendorfpipettenspitze auf eine neue Agarplatte, die später als Masterplatte, eine Klonbibliothek, diente, und dann in 5 µl 1% Triton X-100 enthaltende PCR-Tubes überführt. Triton X permeabilisierte die Bakterienzellen, so dass ihre DNA, bzw. das enthaltene Plasmid als Template für eine anschließend erfolgende PCR dienen konnte.

Bei dieser wurden ein vektorspezifischer und ein insertspezifischer Primer verwendet. Dadurch wurde nur dann ein Amplifikat erhalten, wenn das Insert korrekt in den Vektor ligiert worden war.

Von den PCR-Ansätzen wurden jeweils 10 µl mit 2 µl 6× Probenpuffer versetzt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Kolonien, aus denen ein Fragment erfolgreich amplifiziert

worden war, wurden für die anschließende Plasmidisolierung mittels Mini-Prep (3.2.13) verwendet.

PCR-Ansatz (45 µl):

5 µl	PCR-Puffer II (PE)
3 µl	25 mM MgCl ₂
0,2 µl	AmpliTaq (PE)
2,8 µl	dNTP-Mix (je 2,5mM)
1 µl	10 µM Vektor Primer
1 µl	10 µM Insert-spezifischer Primer
32 µl	H ₂ O

Dieser Ansatz entsprach einer Probe.

PCR-Programm:

2 min	95 °C
25x: 30 s	95 °C
30 s	55 °C
90 s	72 °C
10 min	72 °C
∞	4 °C

3.2.17 Glycerolstocks

Für eine dauerhafte Aufbewahrung von Bakterienkulturen wurden Glycerolstocks angefertigt. Hierzu wurde zu den im Medium befindlichen Bakterien Glycerol gegeben, welches die Bakterien vor Eiskristallbildung des Mediums, die diese beschädigen könnten, schützte. 150 µl einer Über-Nacht-Bakterienkultur wurden mit 850 µl sterilem Glycerol in einem Kryoröhrchen gemischt, dann in flüssigem Stickstoff tiefgekühlt und bei -80 °C gelagert.

3.3 Zellkultur

3.3.1 Zellkultur allgemein

Die eukaryotischen Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ in Begasungsbrutschränken gehalten. Zur Kultivierung der Zellen wurden sterile Kulturgefäße aus Kunststoff verwendet, die Zellen befanden sich in einem Nährmedium, das eine zelltypspezifische Zusammensetzung hatte und mit 10% FKS sowie 100 U/ml Penicillin / 100 µg/ml Streptomycin versetzt worden war. Für MDCK-Zellen wurde MEM (Minimal essential Medium) mit Earl's Salzen verwendet. Jeden zweiten bis dritten Tag wurde das Medium gewechselt. Ein Verbrauch der Nährstoffe ließ sich auch an einem Farbwechsel des im Medium enthaltenem pH-Indikators erkennen.

3.3.2 Passagieren der Zellen

Um Zellen aus Kulturflaschen umzusetzen, wurden diese zunächst einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsinlösung versetzt, die ein Anlösen der Zellen vom Gefäßboden bewirkte. Die Einwirkung von Trypsin erfolgte bei 37 °C, bis sich alle Zellen vom Boden gelöst hatten (ca. 15–30 min). Dann wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und mit einer Pipette aufgeschwemmt. Das im Medium enthaltene FKS hemmte dabei das Trypsin.

Je nach Bedarf wurden die Zellen dann in bestimmten Zellzahlen, die durch Auszählen eines Aliquots in einer Neubauer-Zählkammer auf das benötigte Volumen umgerechnet worden waren, in neue Gefäße ausgesät oder aber, wenn die Zellzahl von geringer Bedeutung war, entsprechend folgender Volumina überführt:

- | | |
|--|--------------------------|
| - Kleine Flaschen (25 cm ²) | 1,5 ml auf 5,5 ml Medium |
| - Mittelgroße Flaschen (75 cm ²) | 4,5 ml auf 15 ml Medium |
| - Schalen (56,7 cm ²) | 1,5 ml auf 8,5 ml Medium |
| - 24-Well-Platten | 200 µl auf 2 ml/Well |
| - HA-Filter (0,6 cm ²) | 150 – 350 µl |

Danach wurden die Zellen wieder im Brutschrank bei 37 °C / 5% CO₂ kultiviert.

3.3.3 Transfektion

Unter einer Transfektion versteht man das Übertragen von DNA in eukaryotische Zellen. Es gibt mehrere Transfektionsmethoden (Mikroinjektion, Calciumphosphat-Präzipitation, Elektroporation, Liposomen, DEAE-Dextran), die sich in Handhabung und Transfektionseffizienz zum Teil sehr stark unterscheiden.

Für die Transfektion mit TRIC-a/CMV-10 wurde Lipofectamin verwendet. Dieses Transfektionsreagenz besteht aus Liposomen, welche die DNA in sich verpacken und dann in die Zelle über hydrophobe Wechselwirkung mit der Membran transportieren. In der Zelle wird die DNA transkribiert und translatiert.

Für die Transfektion wurde bei der LipofectaminPLUS-Methode zunächst ein Transfektions-Mix vorbereitet. Dazu wurde ein Ansatz aus 900 µl serumfreien Medium und 54 µl Lipofectamin und ein Ansatz aus 900 µl serumfreien Medium, 90 µl Plus-Reagenz und 9 µg zu transfizierender DNA (Vektorkontrolle: pCMV-10; Klon: TRIC-a/CMV-10) verwendet, jeweils 15 min vorinkubiert, dann vermischt und weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Dann wurden je 645 µl des Transfektions-Mixes auf Schalen, in denen einen Tag zuvor 20.000 Zellen ausgesät worden waren und die sich nach einmaligem Waschen in 2,4 ml serumfreien Medium befanden, pipettiert. Der Mix wurde gründlich verteilt und der Ansatz dann vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und gegen 8,5 ml FKS- (Fetales Kälberserum) und P/S- (Penicillin und Streptomycin) haltiges Medium ausgetauscht.

Um eine stabile Transfektion zu erhalten, wurde nach einem verdünnenden Aussäen der Ansätze nach zwei Tagen (aus einer Schale wurden vier) eine Selektion erfolgreich transfizierter Zellen durchgeführt. Hierzu wurde Geneticin-haltiges Medium (G418; Dosis: 600 µg/ml) anstelle des normalen Mediums zu den Zellen gegeben. Da der CMV10-Vektor ein Neomycin-Resistenzgen besitzt, dessen Expressionsprodukt, die Neomycinphosphotransferase, sowohl gegen Neomycin als auch gegen das ähnliche Geneticin, wirkt, wurden nur untransfizierte Zellen vom G418 abgetötet. Dieses wirkt dabei als Aminoglycosidase, die spezifisch eukaryotische Ribosomen inhibiert, so dass es zum Erliegen der Proteinexpression kommt.

Nachdem die untransfizierten Zellen unter dem Antibiotikumeinfluss komplett abgestorben waren, konnten sich bildende Zellinseln auf den transfizierten Schalen auf andere Gefäße

umgesetzt werden. Dort wurden sie bis zur Konfluenz wachsen gelassen und weiter kultiviert.

Wenn genügend Zellmaterial von einem Klon vorhanden war, wurde die Transfektion mittels Immunfluoreszenzfärbung und Western Blot auf Expression und Lokalisation des überexprimierten Proteins hin untersucht. Von erfolgreich transfizierten Klonen wurden Aliquots für spätere Analysen in Stickstoff eingefroren.

Ausgewählte Klone wurden dann zur Charakterisierung verwendet.

3.3.4 Gefrierbruch und Elektronenmikroskopie

Zur Untersuchung der Ultrastruktur von Membranen wurden Gefrierbruchpräparate am Transmissionselektronenmikroskop untersucht. Beim Gefrierbruch entstehen zwei Membranflächen, deren Bruchlinie durch das hydrophobe Membraninnere einer gefrorenen Probe verläuft: Auf der P-Fläche, der protoplasmatischen Seite des Bruchs, ist die Tight Junction deutlich abgehoben, während auf der E-Fläche, der exoplasmatischen Seite, zu den Tight Junction-Strängen komplementäre Rinnen verlaufen.

Die Bruchflächen werden durch Bedampfung mit Platin konserviert und durch um 45° zur Probe versetztes Bedampfen mit Kohlenstoff kontrastiert, um Strukturen besser erkennen zu lassen.

Die zu brechenden auf Zellkulturfiltern konfluent gewachsenen Zellen wurden in glutaraldehydhaltigem Fixierungspuffer für ca. 1 h bei Raumtemperatur fixiert und vor Durchführen des Gefrierbruchs je 30 min mit 10% und anschließend 30% Glycerol entwässert. Mit einem Skalpell wurden die Zellen vorsichtig vom Filter entfernt und in einen aufklappbaren Gefrierbruchhalter überführt. Der gefüllte und geschlossene Halter wurde dann in mit flüssigem Stickstoff gekühlten Freon 22 eingefroren und anschließend in flüssigem Freon 22 in einer Halterung, der Clamping Nut, befestigt. Diese wurde in das auf -180 °C vorgekühlte Gefrierbruchgerät eingebaut und dort unter einem Vakuum von $2 \cdot 10^{-7}$ Torr bei -100 °C geöffnet, wodurch das Zellepithel brach. Ebenfalls unter Vakuum und Kühlung erfolgte die Herstellung der Replica durch Bedampfung mit Platin und um 45° versetzt mit Kohlenstoff. Die Replica wurde zur Entfernung der organischen Reste für 60 min in Natriumhypochlorit inkubiert, danach auf Kupfernetze übertragen und letztlich mit Amylacetat gespült.

Die elektronenmikroskopische Analyse erfolgte an einem mit Videokamera ausgestatteten Zeiss 902 Elektronenmikroskop unter Verwendung der dazugehörigen Software (iTEM,

Olympus Soft Imaging Solution, Veleta). Die morphometrische Auswertung erfolgte bei einer 51.000-fachen Vergrößerung. Dazu wurde dabei ein Netzgitter mit 200 nm-Intervallen an den am weitesten apikal gelegenen Tight Junction-Strang angelegt. Die Zahl der horizontal orientierten Stränge wurde an Schnittpunkten des Gitters gezählt und die vertikale Netzwerkausdehnung gemessen.

Es wurden zwei Arten von Strangdiskontinuitäten definiert und alle Proben diesbezüglich ausgewertet:

- Als Strangbrüche („breaks“) wurden >20 nm lange Unterbrechungen im Verlauf eines Stranges bezeichnet und als Anzahl pro μm horizontal orientierter Stränge angegeben.
- Die Stränge jeder untersuchten Tight Junction wurden insgesamt entweder als kontinuierliche Stränge („continuous type strands“) oder als partikelartige Stränge („particle type strands“) klassifiziert.

3.4 Elektrophysiologische Messungen

3.4.1 Ussing-Kammer

Die Ussing-Kammer stellt eine *in vitro*-Technik dar, die es erlaubt, den aktiven Ionentransport (Kurzschlussstrom, I_{SC} , $\mu\text{mol/h/cm}^2$) sowie die Leitfähigkeit, bzw. den Widerstand an Gewebe oder Zellkultur Layern zu bestimmen (Ussing et al., 1951).

Prinzipiell ist der Versuchsaufbau derart, dass eine Membran mit ihrer serosalen und mukosalen Seite zwischen zwei flüssigkeitsgefüllten temperierten Kammern, die durch Begasung kontinuierlich durchmischt werden, eingespannt ist. An beide Kammern können eine Spannung und verschiedene Messapparaturen angelegt werden (Abb. 13). Je nach Modifikation der Ussing-Kammer können unterschiedliche Gewebe oder Zellkulturfiltergrößen verwendet werden (Kreusel et al., 1991).

Über einen mit einem Mehrkanal-AD Wandler ausgestatteten Computer werden sowohl die Spannung über dem Epithel (U^e) gemessen als auch die Elektroden im „open“ bzw. „closed circuit“ gesteuert. Ein ebenfalls angeschlossener Messverstärker generiert einen Rechteckstrom zur Erfassung des über dem Epithel liegenden transepithelialen Widerstandes (R^t). Um den Kurzschlussstrom (I_{SC}) im „closed circuit“-Betrieb zu bestimmen, wird dann das Epithel auf 0 mV geklemmt. Eine entsprechende Software (Analogon, Ing. grad. D. Sorgenfrei) zur Steuerung und Registrierung des Programms dient dabei zur Messung in vorgegebenen Zeitintervallen sowie zur Anzeige der Messwerte.

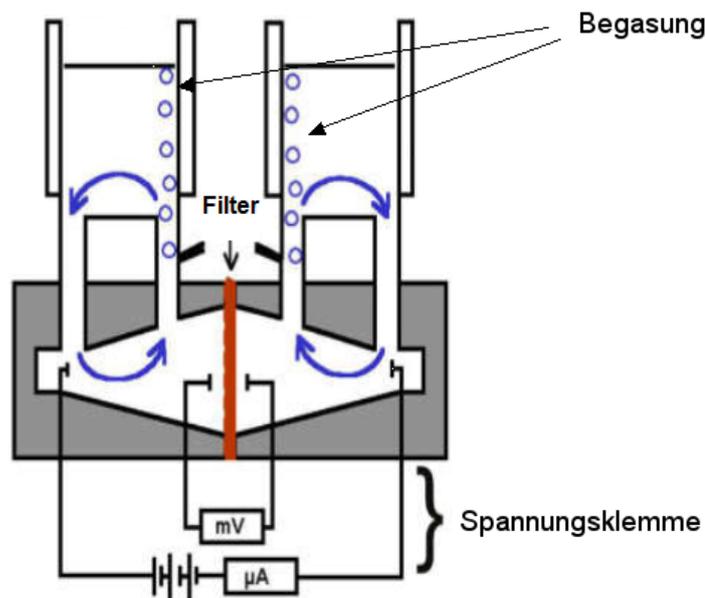


Abb. 13 Schematischer Aufbau der Ussing-Kammer.

3.4.2 Badkorrektur und Elektrodenasymmetrie

Bereits durch die Badlösung, die sich zwischen dem eingespannten Epithelpräparat und den Elektroden befindet, kommt es zu Änderungen in der Spannung und des Widerstandes, so dass eine Korrektur der Messungen nötig ist.

Zur Korrektur wurden deswegen vor Einbau der konfluent bewachsenen Zellkulturfilter der Badwiderstand und das Asymmetriepotential der Spannungselektroden gemessen, indem die Kammer mit der im Experiment zu verwendenden Ringerlösung befüllt und dann registriert wurde. Die so ermittelten Leerwerte wurden von den späteren Messwerten abgezogen.

3.4.3 Widerstandsmessung

Nach Bestimmen des Leerwiderstands und der Elektrodenasymmetrie wurden die Zellkulturfilter in die Kammer eingebaut und die Kammerhälften wurden synchron mit der gleichen Badlösungsmenge befüllt.

Durch Applikation des Stroms I über den Rechteckgenerator stellte sich die Potentialdifferenz aus U_1 und U_2 ein, die zur Ermittlung des transepithelialen Widerstands (R^t) über Anwendung des Ohm'schen Gesetzes $R = U / I$ verwendet wurde.

Aus dem berechneten transepithelialen Widerstand und der direkt gemessenen transepithelialen Spannung (U^e) ließ sich auch der Kurzschlussstrom (I_{sc}) als Quotient aus Spannung und Widerstand bestimmen.

3.4.4 Dilutionspotentialmessung

Mit Hilfe von Dilutionspotentialmessungen lassen sich die partielle, parazelluläre Leitfähigkeit von Na^+ und Cl^- ermitteln. Hierzu werden beide Ionen auf einer Kammerhälfte unter Gewährleistung des osmotischen Ausgleichs durch Mannitol ersetzt, wodurch sich ein Diffusionspotential, welches das Dilutionspotential darstellt, einstellt.

Das Dilutionspotential kann über die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung berechnet werden:

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

U_m	Dilutionspotential (basolateral gegen apikal)
R	allgemeine Gaskonstante
T	absolute Temperatur
F	Faradaykonstante
P_{Na}, P_{Cl}	Permeabilität der Ionen Natrium bzw. Chlorid
$[Na]^{ap}$	apikale Konzentration für Natrium bzw. Chlorid ($[Cl]^{ap}$)
$[Na]^{bl}$	basolaterale Konzentration für Natrium bzw. Chlorid ($[Cl]^{bl}$)

Durch Umformung der Permeabilitätsgleichung wird die relative Leitfähigkeit für Na^+ (P_{Na}) und Cl^- (P_{Cl}) berechnet:

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

Da beide Kammerhälften unterschiedlich zusammengesetzte Badlösung enthalten (normale und durch Mannitol in der NaCl-Konzentration reduzierte Ringer) entsteht ein Potential, das sich nur durch die ungleiche Zusammensetzung einstellt. Dieses Elektrodenpotential wird in weiteren Rechnungen berücksichtigt.

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

ΔE $\Delta E = E_{bl} - E_{ap}$, mit Korrektur für das Liquid Junction-Potentials

$$s = 2,303 \cdot \frac{R \cdot T}{F}$$

a_{Na-ap} apikale Ionenaktivität für Natrium, bzw. Chlorid (a_{Cl-ap}), berechnet über modifizierten Debye-Hückel-Formalismus und Konstanten aus Meier 1982

$a_{\text{Na-bl}}$ basolaterale Ionenaktivität für Natrium, bzw. Chlorid ($a_{\text{Cl-bl}}$), berechnet über modifizierten Debye-Hückel-Formalismus und Konstanten aus Meier 1982

Die absolute Permeabilität für Na^+ (P_{Na}) wird aus der relativen Permeabilität für Na^+ und der Gesamtleitfähigkeit des Epithels (G^t) berechnet, wobei diese dem Kehrwert des direkt gemessenen transepithelialen Widerstands entspricht:

$$P_{\text{Na}} = \frac{R \cdot T}{F^2} \cdot \frac{G^t}{[\text{NaCl}]} \cdot \frac{1}{1 + P_{\text{Na}} / P_{\text{Cl}}} \cdot \frac{P_{\text{Na}}}{P_{\text{Cl}}}$$

$$P_{\text{Cl}} = \frac{R \cdot T}{F^2} \cdot \frac{G^t}{[\text{NaCl}]} \cdot \frac{1}{1 + P_{\text{Na}} / P_{\text{Cl}}}$$

Zur Messung des Dilutionspotentials wurden die konfluent bewachsenen Zellkulturfilter in die Kammer eingespannt und die Kammerhälften wurden mit je 10 ml Standard-Ringer befüllt und begast. Nach Einstellen eines konstanten Widerstands (15-20 min) wurden serosal, bzw. mukosal 5 ml der Standard-Ringer gegen Mannitol-Ringer ausgetauscht und abgewartet bis sich ein Potentialplateau eingestellt hatte.

3.4.5 Biionische Potentialmessungen

Das experimentelle Vorgehen war für biionischen Dilutionspotentiale ähnlich dem der Dilutionspotentialmessung. Anstelle der Mannitol-Ringer wurden modifizierte Ringer-Lösungen verwendet, die das jeweils zu messende Ion zum Austausch von Na^+ , bzw. Cl^- enthielten.

3.4.5.1 Monovalente Kationen

Die relativen Permeabilitäten der monovalenten Kationen X^+ wurden über den Austausch von NaCl durch das jeweilige Chlorid des Kations erhalten. Dazu wurden zusätzlich die über Dilutionspotentialmessungen erhaltenen Werte für $P_{\text{Na}} / P_{\text{Cl}}$ zur Berechnung benötigt:

$$\frac{P_X}{P_{Na}} = \frac{a_{Na-ap} + P_{Cl}/P_{Na} \cdot a_{Cl-bl} - 10^{\frac{\Delta E}{s}} \cdot (a_{Na-bl} + P_{Cl}/P_{Na} \cdot a_{Cl-ap})}{10^{\frac{\Delta E}{s}} \cdot a_{x-bl} - a_{x-ap}}$$

3.4.5.2 Divalente Kationen

Zur Bestimmung der Permeabilitäten divalenter Kationen X^{2+} wurden die Versuchsbedingungen abgeändert. Um Präzipitation der Carbonatsalze der divalenten Kationen zu vermeiden wurde bicarbonatfreie Lösung verwendet, sowie nur mit Sauerstoff begast. Für jede Messung wurde das Dilutionspotential auf der basolateralen Seite neu bestimmt und für die Berechnung des jeweiligen Potentials benutzt, das über apikalen Austausch der Ringer-Lösungen gemessen wurde. Die relativen Ionenpermeabilitäten berechneten sich wie folgt:

$$\frac{P_X}{P_{Na}} = \frac{-n_{Na} - P_{Cl}/P_{Na} \cdot n_{Cl} \cdot z_{Cl}}{n_x \cdot z_x} \quad \text{mit} \quad n = z \cdot \frac{\Delta E}{s} \cdot \frac{a_{bl} \cdot 10^{z \cdot \frac{\Delta E}{s}} - a_{ap}}{10^{z \cdot \frac{\Delta E}{s}} - 1}$$

z Ladungszahl des jeweiligen Ions

3.4.5.3 Monovalente Anionen

Zur Bestimmung der relativen Permeabilitäten für monovalente Anionen Y^- wurde wie bei den divalenten Kationen unter bicarbonatfreien Bedingungen verfahren. Ähnlich wie bei den monovalenten Kationen wurde NaCl der Ringer-Lösung gegen das Natriumsalz des zu messenden Anions ausgetauscht und dann mit Hilfe des Dilutionspotentials, das unter gleichen Bedingungen erhalten worden war, die Permeabilität berechnet:

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

3.4.6 Fluxmessungen parazellulärer Größenmarker

Die Fluxmessungen unterschiedlich großer Moleküle, die Epithelien über den parazellulären Weg passieren, dienten der Permeabilitätsbestimmung für diese und wurden allesamt in Ussing-Kammern durchgeführt, da in diesen durch die Begasung kontinuierliche Vermischung der Badlösungen erfolgt und entstehende Grenzschichten höherer Konzentrationen an den Durchtrittsstellen, die den weiteren Flux beeinflussen, vermieden werden. Zudem konnten die Zellkulturen während des Experiments in ihrem Widerstand überprüft werden.

3.4.6.1 Fluoreszein-Fluxmessungen

Nach Einbau des Zellkulturfilters wurden die beiden Kammerhälften mit je 10 ml Ringerlösung befüllt. Nach Erreichen konstanter Widerstände wurden die Leerwert-Probe (300 µl, basolateral gegen neue Ringer ausgetauscht) abgenommen, die Klemme („closed circuit“-Betrieb) eingeschaltet und apikal 10 µl Fluoreszein (100 mM) hinzugegeben. Zu den Zeitpunkten von 10, 20, 30 und 40 min nach Zugabe wurden jeweils neue 300 µl-Proben abgenommen und gegen frische Ringerlösung ersetzt. Die Fluoreszein-Konzentration der Proben wurde photometrisch am Spektrometer bei 520 nm ermittelt und zur Berechnung der Fluxe verwendet:

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

J	Flux
c ₁ , c ₂	Konzentrationen zum Zeitpunkt 1, bzw.2

Δt	Zeitdifferenz von t_1 zu t_2
V	Volumen der Kammer; Zugabevolumen
A	zugängliche Fläche (Filterfläche)

Da der Flux über den Zusammenhang der Konzentration die Permeabilität ergibt, konnte dann die Permeabilität für Fluoreszein bestimmt werden:

$$P = \frac{J}{\Delta c}$$

Δc	Konzentrationsdifferenz
------------	-------------------------

3.4.6.2 Fluxe FITC-markierter Dextrane

Zur Bestimmung der Permeabilität von FITC-Dextranen wurde ähnlich wie für Fluoreszein vorgegangen. Jedoch wurden die Kammerhälften hierbei mit 5 ml Ringerlösung befüllt, die zudem 10 mM des jeweiligen unmarkierten Dextrans gleicher Größe enthielt. Die FITC-Dextrane (4, 10 und 20 kDa) wurden vor Versuchsbeginn dialysiert, um kleinere FITC-Dextranfragmente nicht fälschlicherweise mit zu analysieren. Für die Experimente wurden 100 μ l der dialysierten FITC-Dextrane (10 mM) verwendet. Proben wurden anders als beim Fluoreszein zu den Zeitpunkten 0, 30, 60, 90 und 120 min abgenommen. Die Konzentrationen an FITC-Dextran wurden photometrisch am Spektrometer bei 520 nm ermittelt und zur Berechnung der Fluxe und Permeabilitäten analog zu 3.4.6.1 verwendet.

3.4.6.3 Fluxe ^3H -markierter PEGs

Da Moleküle mit Größen unter 1 kDa nicht fluoreszenzmarkiert erhältlich sind, wurden radioaktive Fluxmessungen für PEG-400 und PEG-900 durchgeführt.

Nach Einbau der Zellkulturfilter wurden die Ussing-Kammerhälften mit je 10 ml Badlösung, die 10 mM unmarkiertes PEG der jeweiligen Größe enthielt, befüllt.

Nach Erreichen konstanter Widerstände wurde die Leerwert-Probe (1 ml, basolateral gegen neue Ringer ausgetauscht) abgenommen, die Klemme („closed circuit“-Betrieb) ein-

geschaltet und apikal 100 µl des markierten PEGs (10 mM) gegeben. Nach 10 min wurden von der Donorseite 100 µl entnommen und mit 900 µl Ringer versetzt. Basolateral wurden je 1 ml-Proben nach 0, 30, 60, 90, and 120 min gegen Ringer ausgetauscht und mit je 900 µl Ringer versetzt. Alle Proben wurden mit 4 ml Scintillation cocktail versetzt und im Liquid Scintillation counter vermessen. Anhand der Zerfälle (cpm) konnte auf den Flux rückgerechnet werden:

$$J = \frac{c_{S \text{ tan dard}} \cdot (V_{Kammer} / V_{hP}) \cdot V_{Kammer} \cdot (z_{kalt2} - z_{leer}) - (V_{Kammer} - V_{kP}) \cdot (z_{kalt1} - z_{leer})}{z_{heiß} \cdot \Delta t \cdot A_{Filter}}$$

$c_{Standard}$	verwendete Konzentration
V_{hP}	Volumen der heißen Probe (Donorseite), bzw. der kalten (Abnahme; V_{kP})
z_{kalt2}	Zählrate der zweiten kalten Probe, bzw. der ersten (z_{kalt1}), des Leerwerts (z_{leer}) oder der heißen Probe ($z_{heiß}$)

Aus dem so erhaltenen Flux wurde über die verwendete Konzentration die Permeabilität berechnet.

3.4.7 HRP-Fluxmessungen

Die Meerrettich-Peroxidase (*Horseradish peroxidase*, HRP) ist ein ca. 44 kDa großes Protein, das nur in geringem Maße Epithelien über den parazellulären Weg passiert. Viel stärker durchquert es diese transzellulär, weswegen die Fluxmessung dieses Proteins zur Untersuchung der Endozytose-, bzw. Transzytoserate diene.

Wie auch die Fluxmessungen der parazellulären Größenmarker wurden die Experimente in Ussing-Kammern durchgeführt. Die Kammerhälften wurden mit je 5 ml Ringerlösung befüllt und nach Einschalten der Klemme („closed circuit“-Betrieb) wurden 100 µl HRP-Lösung (20 µM) apikal appliziert. Basolateral wurden 300 µl-Proben zu den Zeitpunkten –10, 10, 40, 70, 100 und 130 min vor, bzw. nach Zugabe abgenommen und gegen frische Ringerlösung ersetzt. Die Proben wurden parallel zu bekannten Standards mit einem fluorogenen Peroxidase-Substrat für 30 min im Dunkeln inkubiert und dann mit einer die Reaktion stoppenden Lösung versetzt, 10 min inkubiert und schließlich am Spektrometer unter Nutzung der Wellenlängen 325 nm (Excitation) und 420 nm (Emission) vermessen.

Anhand der bestimmten Konzentrationen, konnte der Flux und folglich auch die Permeabilität berechnet werden.

3.5 Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie

3.5.1 Prinzip der Impedanzmessung

Mit Hilfe der Impedanzspektroskopie kann zwischen epithelialem und subepithelialem Widerstand unterschieden werden, wodurch es ermöglicht wird, diese beiden Komponenten des Gesamtwiderstands (transepithelialer Widerstand R^t) zu diskriminieren. Im Fall von Geweben spiegelt der epitheliale Widerstand (R^{epi}) dabei die Impedanzeigenschaften des Epithels wider, während der subepitheliale Widerstand (R^{sub}) die weiteren Widerstandskomponenten, wie beispielsweise das durch Collagenfasern dichte Bindegewebe und Muskelschichten, darstellt. Auch in Bezug auf epitheliale Zellkulturen existiert neben dem epithelialen Widerstand, den der Zellmonolayer ausmacht, ein subepithelialer Widerstand. Dieser wird hierbei durch den Zellkulturfilter, auf welchem sich der Zelllayer befindet, verursacht.

Der transepitheliale Widerstand setzt sich dementsprechend aus der Summe der Einzelwiderstände zusammen:

$$R^t = R^{epi} + R^{sub}$$

R^t	transepithelialer (Gesamt-)Widerstand („TER“)
R^{epi}	epithelialer Widerstand
R^{sub}	subepithelialer Widerstand

Der Ein-Wege-Impedanzspektroskopie liegt dabei ein Ersatzschaltkreis eines aus drei Parametern bestehenden Epithelmodells zugrunde.

Der epitheliale Widerstand entspricht einem Ohm'schen Widerstand, der parallel zu einem Kondensator und in Reihe zum subepithelialen Widerstand, der ebenfalls ein Ohm'scher Widerstand ist, geschaltet ist. Die apparente Kapazität des Kondensator-Glieds repräsentiert die kapazitiven Eigenschaften der apikalen und basolateralen Zellmembranen (Abb. 14).

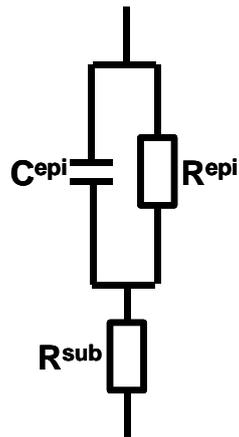


Abb. 14 Ersatzschaltkreis des epithelialen Zellmodells, das in der einfachen Impedanzanalyse (Ein-Wege-Impedanzspektroskopie) verwendet wird.

Appliziert man Wechselströme in unterschiedlichen Frequenzen, so ist der kapazitive Blindwiderstand bei einer Frequenz von 0 unendlich groß, da der gesamte Strom über den dem epithelialen Widerstand entsprechenden R-Teil des RC-Gliedes und den in Serie geschalteten fließt. Dadurch gibt der erhaltene Wert dieser Frequenz den Gesamtwiderstand R^t wieder.

Bei sehr hohen Frequenzen (Extrapolation gegen Frequenz ∞) dagegen tendiert er gegen Null, da in diesem Fall der gesamte Strom über den Kondensator kurzgeschlossen am Parallelwiderstand vorbei- und durch den folgenden Serienwiderstand hindurchfließt, so dass der dann gemessene Widerstand dem subepithelialen Anteil des Gesamtwiderstandes entspricht.

Die graphische Darstellung der erhaltenen Messwerte erfolgt in einem Nyquist-Diagramm (Cole-Cole-Plot, der Phasenwinkel von -90° des kapazitiven Stroms gegenüber dem Strom durch einen Ohm'schen Widerstand wird durch die um 90° gedrehten Achsen der Zahlenebene repräsentiert). Die Imaginärteile der komplexen Impedanzen, die die kapazitiven Eigenschaften des Epithels darstellen, werden auf der Ordinate gegen die Realteile der komplexen Impedanzen, die dem Ohm'schen Widerstand entsprechen, auf der Abzisse aufgetragen ([Abb. 15](#)).

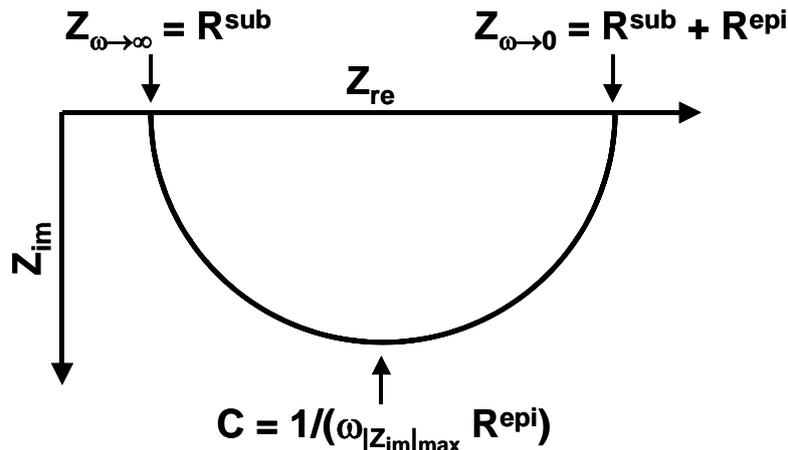


Abb. 15 Nyquist-Diagramm einer Modellmessung. Impedanzwerte, die bei verschiedenen AC-Frequenzen erhalten werden, führen in der graphischen Auftragung zu einem Halbkreis. Bei hohen Frequenzen ($\omega \rightarrow \infty$) ergibt der Realteil Z_{re} den subepithelialen Widerstand R^{sub} , während er bei niedrigen Frequenzen ($\omega \rightarrow 0$) den transepithelialen Widerstand $R^t = R^{sub} + R^{epi}$ erreicht. Die Kapazität C kann anhand der Frequenz des Kreisbogenminimums berechnet werden.

Die Impedanzmessung findet in der Regel bei Wechselstromfrequenzen zwischen 1,3 Hz (entsprechend der Extrapolation gegen 0) und 65 kHz (entsprechend der Extrapolation gegen ∞) statt, wodurch sich neben den oben beschriebenen Extremen viele Messpunkte ergeben, die aufgetragen und miteinander verbunden ein Kreissegment ergeben. Der Schnittpunkt dieses Kreissegments mit der x-Achse bei der Frequenz 0 gibt den Gesamtwiderstand R^t an, der Schnittpunkt bei der Frequenz 65 kHz den subepithelialen Widerstand R^{sub} . Die Differenz beider entspricht R^{epi} , dem epithelialen Widerstand.

Die Kapazität C , welche die Eigenschaften der Membranen widerspiegelt, lässt sich dagegen nicht direkt ablesen, sondern wird über den imaginären Teil der Impedanz berechnet.

Die komplexe Impedanz Z einer Parallelschaltung aus Ohm'schen Widerstand R und einem Kondensator mit der Kapazität C (d.h. mit dem Blindwiderstand $C = \frac{1}{\omega \cdot R}$ mit $i = \sqrt{-1}$) setzt

sich aus dem Realteil Z_{re} und dem Imaginärteil Z_{im} zusammen:

$$Z_{re} = \frac{R}{1 + \omega^2 \cdot R^2 \cdot C}$$

$$Z_{im} = \frac{R^2 \cdot C \cdot \omega}{1 + \omega^2 \cdot R^2 \cdot C^2}$$

ω Kreisfrequenz der Wechselspannung $v = v_0 \cdot \sin(\omega \cdot t)$; $\omega = 2 \cdot \pi \cdot f$

Im Minimum des Imaginärteils (Nullsetzung der ersten Ableitung) ergibt sich die Formel zur Berechnung der Kapazität C, so dass in diesem Punkt des Kreisbogens die Kapazität unter Verwendung des Ohm'schen Widerstandes R und der dazugehörigen Kreisfrequenz, bzw. der Messfrequenz f, bestimmt werden kann.

$$Z_{im}' = \frac{R^2 \cdot C \cdot (1 + \omega^2 \cdot R^2 \cdot C^2 - 2 \cdot R^2 \cdot C^2 \cdot \omega^2)}{1 + 2 \cdot \omega^2 \cdot R^2 \cdot C^2 + \omega^4 \cdot R^4 \cdot C^4}$$

$$C = \frac{1}{\omega \cdot R} = \frac{1}{2 \cdot \pi \cdot f \cdot R}$$

Das erhaltene Kreissegment der Impedanzmessung stellt genau genommen die Überlagerungen zweier Kreissegmente dar, welche die Eigenschaften der apikalen und der basolateralen Membran widerspiegeln. Wenn diese gleiche Zeitkonstanten aufweisen, überlagern sie sich zu einem Kreissegment. Veränderte Eigenschaften einer Membranseite lassen sich somit bereits durch den Kurvenverlauf erkennen.

3.5.2 Prinzip der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie

Die einfache Impedanzanalyse erlaubt die direkte Bestimmung der drei Parameter, welche die elektrische Eigenschaften eines Epithels beschreiben: Die Kapazität C, den epithelialen Widerstand R^{epi} und den subepithelialen Widerstand R^{sub} (Schifferdecker et al., 1978; Fromm et al., 1985). Wie im folgenden dargestellt, ist es jedoch ohne zusätzliche Information nicht möglich, R^{epi} in seinen transzellulären und parazellulären Anteil zu differenzieren (Abb. 16). Da sie hierbei zu einem Weg, bestehend aus der Serienschaltung von R^{epi} und R^{sub} , zusammengefasst werden, bezeichnen wir diese Art der Impedanzanalyse als Ein-Wege-Impedanzspektroskopie.

Erweitert man nun das Modell, indem man den epithelialen Widerstand in zwei Wege aufgliedert, so lassen sich die Zellmembraneigenschaften als Kondensator mit parallel geschaltetem Widerstand (der transzelluläre Anteil, R^{trans}) darstellen, während parallel dazu der parazelluläre Weg als Widerstand (R^{para}) angegeben wird. Auch hier schließt sich in Serie der subzelluläre Widerstand (R^{sub}) an.

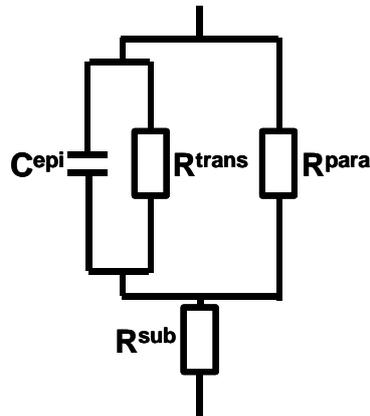


Abb. 16 Ersatzschaltkreis des epithelialen Zellmodells, das in der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie verwendet wird.

Die Impedanzdaten liefern jedoch für sich allein zu wenig Information, um die vier Variablen des Schaltkreises von Abb. 16 aufzulösen – das System ist unterbestimmt. Es müssen daher weitere Parameter bestimmt werden. Das Problem ist seit langem bekannt und deshalb wurden schon in der Vergangenheit unterschiedliche Messmethoden entwickelt. Neben der intrazellulären Bestimmung des Plasmamembranwiderstands über Mikroelektroden (Kottra & Frömter, 1984a und b), wurde versucht, durch hochauflösendes Conductance Scanning den para- und transzellulären Widerstand zu analysieren (Gitter et al., 1997; Frömter & Diamond, 1972; Cereijdo et al., 1980). Auch wurde durch komplette Permeabilisierung einer Zellmembran mittels Ionophorapplikation versucht, das Modell zu charakterisieren und zu berechnen (Lewis et al., 1977; Wills et al., 1979; Clausen et al., 1979). Nachteil der genannten Methoden ist, dass sie zum Teil aufwendig in der Durchführung sind und die Berechnung auf komplexen und daher anfälligen Modellen beruht oder auf Voraussetzungen aufbaut, die nur für bestimmte Epithelien gelten.

Die Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie nutzt neben der herkömmlichen Impedanzmessung die reversible Modifizierung des parazellulären Widerstands zur Bestimmung der einzelnen Parameter des Ersatzschaltkreises. Der parazelluläre Weg, begrenzt durch die Tight Junction, wird hierbei spezifisch geöffnet, indem EGTA als Calciumchelator gegeben

wird (Calciumswitch; Martinez-Palomo et al., 1980). Zwar wird auch die Adherens Junction beeinflusst, doch trägt diese nichts zum parazellulären Widerstand bei.

Parallel zur Widerstandsänderung durch Tight Junction-Öffnung wird der Flux eines parazellulären Markers gemessen. Mit Hilfe der erhaltenen Fluxverhältnisse vor und nach EGTA-Behandlung kann aus den Impedanzmessungen vor und nach Öffnung der Tight Junction der parazelluläre Widerstandsanteil vom transzellulären unterschieden werden.

Die Anwendbarkeit der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie wurde an mehreren epithelialen Zelllinien überprüft. Es zeigte sich, dass die Methode zuverlässig ist und zu gut reproduzierbaren Ergebnissen führt, jedoch an jedem Zellsystem zunächst validiert werden muss.

3.5.3 Methode der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie

3.5.3.1 Impedanzmessung

Konfluent bewachsene Zellkulturfilter wurden entweder direkt in Ussing-Kammern eingebaut oder aber, wenn es sich um niederohmige Zelllinien handelte, auf kleine Plastikringe mit Histoacrylkleber aufgeklebt und in spezielle Impedanzkammern eingebaut. Diese Kammern besitzen gut abgeschirmte Elektroden, die auch bei hohen Messfrequenzen kaum Störpotentiale aufweisen und somit für die Messung niedriger Widerstände geeignet sind (Stockmann et al., 1999; Gitter et al., 1997a).

Die beiden Kammerhälften wurden mit je 10 ml Standardringer befüllt und mit Carbogen begast. Zwischen den eigentlichen Impedanzmessungen wurden die transepithelialen Potentiale auf 0 mV geklemmt. Während der Impedanzmessung wurde sequentiell sinusförmiger Wechselstrom ($35 \mu\text{A}/\text{cm}^2$) mit 48 verschiedenen Frequenzen zwischen 1,3 Hz und 65 kHz angelegt. Da die normalen Ussing-Kammern stark auf hohe Frequenzen antworten, wurde bei Benutzung dieser Kammern nur bis 16 kHz gemessen (42 Datenpunkte). Die durch den Strom erhaltenen Spannungsänderungen wurden mit phasensensitiven Verstärkern (402 frequency response analyzer, Beran Instruments; 1286 electrochemical interface; Solartron Schlumberger) gemessen und die resultierenden Impedanzwerte (Z_{re} , Z_{im}) wurden aufgezeichnet.

Nach Einbau der Zellkulturfilter wurden im 10-minütigen Abstand (bei hochohmigen Zellen wie MDCK C7 30-minütige Intervalle) Impedanzspektren aufgenommen, wobei nach einer

ersten Messung die Zugabe des Fluxmarkers Fluoreszein und die regelmäßige Abnahme von Proben erfolgte (siehe näheres unter 3.5.3.2). Nach der dritten Messung nach Fluoreszein-Gabe wurde beidseits EGTA in einer Endkonzentration von 1,3 mM zugegeben, wodurch es zu einem Widerstandsabfall kam. Danach wurden ebenfalls in 10-minütigen Messintervallen Impedanzspektren aufgenommen.

3.5.3.2 Fluxmessung und Calciumswitch

Parallel zu den Impedanzmessungen erfolgten ähnlich wie unter 3.4.6 beschriebene Messungen parazellulärer Fluxe. Da die Probenabnahmen nicht die Impedanzmessung beeinflussen sollten, erfolgten sie zwischen zwei Impedanzmessungen.

Der Donorseite der Ussing-Kammer wurden nach Abnahme eines Leerwerts unter Potentialklemme die jeweils zu messenden parazellulären Marker hinzugefügt (Fluoreszein: Endkonzentration 10 μ M, apikal oder basolateral; ^{36}Cl : Endkonzentration 10 kBq/ml, apikal; ^{22}Na : Endkonzentration 2.4 kBq/ml, apikal oder basolateral) und wie unter 3.4.6.3 beschrieben, Proben auf der Akzeptorseite genommen. Die Abnahmen erfolgten dabei für hochohmige Zellen (MDCK C7) bei $t = 30, 60$ und 90 min, während sie für die restlichen Zelllinien bei $t = 10, 20$ und 30 min erfolgten.

Nach Abnahme der dritten Probe wurde beidseitig EGTA gegeben, um Calciumionen zu chelatisieren und somit eine Öffnung des parazellulären Wegs zu erreichen. Es erfolgten weitere vier Probenabnahmen im 10-Minutenintervall.

Die Konzentrationen der Marker in den abgenommenen Proben wurden wie in 3.4.6 beschrieben bestimmt und zur Fluxberechnung verwendet.

3.5.4 Ermittlung des trans- und des parazellulären Widerstandes

3.5.4.1 Fluoreszein als parazellulärer Fluxmarker

Für die Ermittlung des para- und transzellulären Widerstands ist es von großer Bedeutung, dass Perturbationen nur einen dieser beiden Parameter betreffen, um korrekte Berechnungen durchführen zu können. Fluoreszein gilt zwar gemeinhin als parazellulärer Fluxmarker, doch ist für CaCo-2-Zellen ein wahrscheinlich pH-Wert-abhängiger, aktiver Transport beschrieben

worden (Kuwayama et al., 2002; Konishi et al., 2002; Berginc et al., 2007), wodurch in dieser Zelllinie ein großer Anteil auch transzellulär das Epithel passiert.

Um zu untersuchen, ob die Voraussetzungen für die folgenden Berechnungen erfüllt sind, wurde zunächst überprüft, ob der Flux von Fluoreszein in der jeweiligen Zelllinie tatsächlich auf den parazellulären Weg beschränkt ist. Dazu wurden Fluoreszein-Fluxmessungen mit Calciumswitch bei 37, 25 und 15 °C durchgeführt.

Hierbei zeigte sich an HT-29/B6-Zellen zunächst, dass der EGTA-Effekt auf den Widerstand durch Ca^{2+} -Chelatisierung temperaturabhängig ist und bei 15 °C nicht mehr nachweisbar ist (Abb. 17).

Ein transepithelialer Flux (J) sollte, wenn er rein parazellulärer Natur ist, direkt proportional zur parazellulären Leitfähigkeit G^{para} sein:

$$G^{\text{para}} = k \cdot J$$

k Konstante

Daraus ergibt sich für die epitheliale Leitfähigkeit G^{epi} :

$$G^{\text{epi}} = G^{\text{trans}} + G^{\text{para}} = G^{\text{trans}} + k \cdot J \quad \text{mit} \quad G^{\text{epi}} = \frac{1}{R^{\text{epi}}} = \frac{1}{R^{\text{t}} - R^{\text{sub}}}$$

Bei dieser Gleichung handelt es sich um eine Geradengleichung mit der Steigung k und dem y-Achsenabschnitt G^{trans} . Bei allen Temperaturen ließ sich der gleiche lineare Zusammenhang zwischen Fluoreszeinflux und der epithelialen Leitfähigkeit erkennen, woraus sich schließen ließ, dass Fluoreszein nicht aktiv über das Epithel transportiert wird, weil Transzytose oder Carrier-vermittelte Transportmechanismen stark temperaturabhängige Prozesse sind.

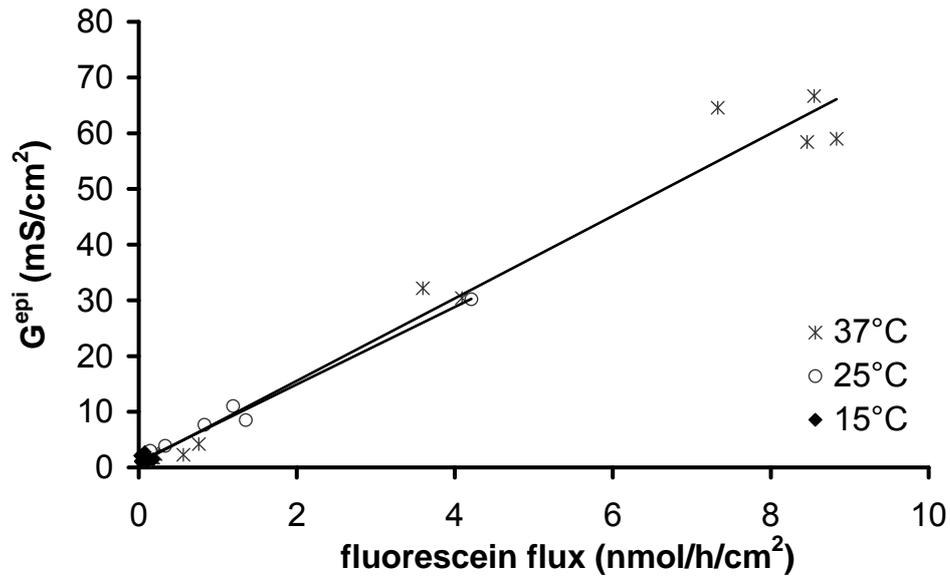


Abb. 17 Auftragung der epithelialen Leitfähigkeit G^{epi} gegenüber dem Fluoreszeinflux vor und nach EGTA-Behandlung von HT-29/B6-Zellen bei unterschiedlichen Temperaturen (37 °C, 25 °C und 15 °C). Da sich für alle drei Temperaturen der gleiche lineare Zusammenhang ergibt, ist der Fluoreszeinflux temperaturunabhängig, wird also nicht durch transzelluläre Transportmechanismen wie Transzytose oder Carrier vermittelt.

Am Beispiel der CaCo-2-Zellen dagegen zeigte sich, dass sich keine direkt-lineare Proportionalität zwischen Fluoreszeinflux und Leitfähigkeit erkennen lässt (Abb. 18). Der für diese Zelllinie beschriebene transzelluläre Fluoreszeintransport (Kuwayama et al., 2002; Konishi et al., 2002; Berginc et al., 2007), ließ sich deutlich aus diesem Zusammenhang erkennen. Für CaCo-2-Zellen müssten dementsprechend andere parazelluläre Fluxmarker verwendet werden oder aber der transzelluläre Fluoreszeintransporter inhibiert werden.

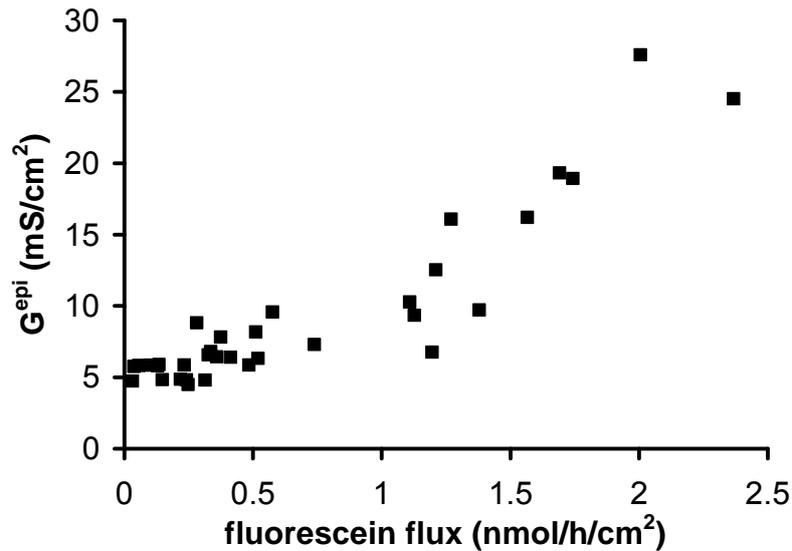


Abb. 18 Auftragung der epithelialen Leitfähigkeit G^{epi} gegenüber dem Fluoreszeinflux einer Messung an CaCo-2-Zellen vor und nach EGTA-Applikation. Es lässt sich kein linearer Zusammenhang zwischen Leitfähigkeit und Flux darstellen, wodurch Fluoreszein hier nicht als parazellulärer Flux-Marker verwendet werden kann.

3.5.4.2 Der transzelluläre Widerstand R^{trans}

Da sich die epitheliale Leitfähigkeit (G^{epi}) wie folgt als linearer Zusammenhang $G^{epi} = G^{trans} + G^{para} = G^{trans} + k \cdot J$ darstellen lässt, kann G^{trans} aus den Messwerten direkt als Schnittpunkt mit der y-Achse abgelesen werden. Veränderungen in G^{trans} führen dementsprechend zur Verschiebung der Geraden entlang der y-Achse. Über den Zusammenhang $G^{trans} = \frac{1}{R^{trans}}$ kann R^{trans} bestimmt werden (Abb. 19).

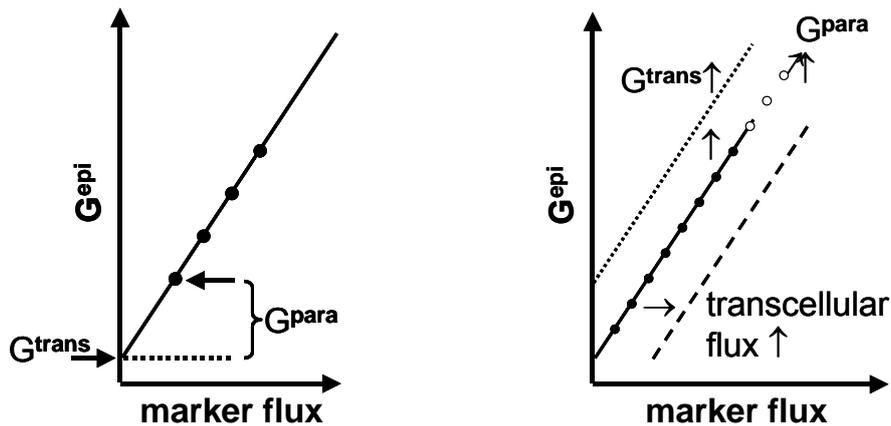


Abb. 19 Auftragung der epithelialen Leitfähigkeit G^{epi} gegen den Flux eines parazellulären Markers. Die transzelluläre Leitfähigkeit G^{trans} kann aus dem Schnittpunkt mit der y-Achse abgelesen werden, während die parazelluläre Leitfähigkeit aus der Steigung bestimmt wird. Eine Verschiebung entlang der y-Achse zeigt folglich eine Änderung der transzellulären Leitfähigkeit an. Das Auftreten eines transzellulären Fluxes verursacht dagegen eine Verschiebung des Graphen entlang der x-Achse.

3.5.4.3. Der parazelluläre Widerstand R^{para}

Der parazelluläre Widerstand R^{para} lässt sich mit den erhaltenen Daten auf mehrere Arten berechnen. Einerseits könnte aus den erhaltenen Werten für die epitheliale und die transepitheliale Leitfähigkeit die parazelluläre Leitfähigkeit als Differenz beider angegeben werden:

$$G^{para} = G^{epi} - G^{trans}$$

Der Kehrwert ergibt dementsprechend den parazellulären Widerstand.

Diese Art der Berechnung ist allerdings stark für Ausreißer anfällig und damit fehlerbehaftet.

Andererseits kann aus den ermittelten Fluxen des parazellulären Markers vor und nach EGTA-Behandlung die Konstante k , die die Steigung darstellt, bestimmt werden und dann über die parazelluläre Leitfähigkeit G^{para} der parazelluläre Widerstand berechnet werden (**Abb. 20**):

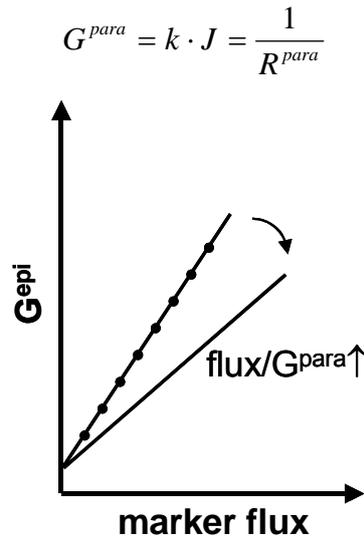


Abb. 20 Auftragung der epithelialen Leitfähigkeit G^{epi} gegen den Flux eines parazellulären Markers. Die parazelluläre Leitfähigkeit R^{para} ergibt sich aus der Steigung des Graphen. Eine Änderung von G^{para} resultiert in einer Verschiebung der Datenpunkte auf der Graphenlinie, während Permeabilitätsänderungen die Steigung beeinflussen.

Unter Verwendung der Fluxverhältnisse des parazellulären Markers vor und nach EGTA-Gabe und der Informationen aus der Impedanzanalyse kann der parazelluläre Widerstand aber auch über den Vergleich der Widerstandsänderung in Bezug zur Fluxänderung berechnet werden (Abb. 21).

$$R^{para} = \frac{R^{epi}_{vor} \cdot R^{epi}_{nach} \cdot (1 - J_{vor}/J_{nach})}{J_{vor}/J_{nach} \cdot (R^{epi}_{vor} - R^{epi}_{nach})}$$

R^{epi}_{vor} epithelialer Widerstand vor, bzw. nach EGTA-Gabe (R^{epi}_{nach})

J_{vor} Flux vor, bzw. nach EGTA-Gabe (J_{nach})

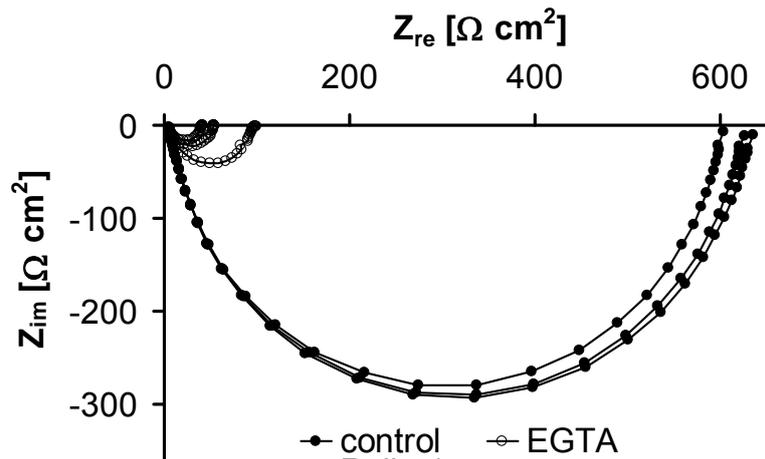


Abb. 21 Nyquist-Diagramm einer Zwei-Wege-Impedanzmessung von HT-29/B6-Zellen. Vor EGTA-Gabe spiegelten große Halbkreise einen hohen epithelialen Widerstand von $615,5 \pm 9,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ wider. Nach EGTA-Applikation verringerte sich dieser stark, so dass kleine Kreisbögen entstanden ($R^{\text{epi}} = 56 \Omega \cdot \text{cm}^2$). Der subepitheliale Widerstand und die Kapazität blieben unverändert ($R^{\text{sub}} = 5,8 \pm 0,13 \Omega \cdot \text{cm}^2$; $C^{\text{epi}} = 4,63 \pm 0,03 \mu\text{F}/\text{cm}^2$). Der gleichzeitig gemessene Fluoreszeinflux erhöhte sich von $0,10 \pm 0,01 \text{ nmol}/\text{h}/\text{cm}^2$ um den Faktor 20, woraus sich für R^{trans} $1300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ und für R^{para} vor EGTA-Gabe $1170 \Omega \cdot \text{cm}^2$ und nach EGTA-Gabe $58,5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ errechnen ließen.

3.5.4.4 Einfluss des subzellulären Widerstands R^{sub}

Der subepitheliale Widerstand R^{sub} lässt sich direkt aus dem Schnittpunkt des Kreisbogens mit der x-Achse ablesen. Im Zellkulturmodell stellt dieser Widerstand die Eigenschaften des Filters, auf dem die Zellen gewachsen sind, dar. Jedoch kann dies nicht mit einem normalen, unbewachsenen Filter gleichgesetzt werden. Viele Faktoren können den subepithelialen Widerstand beeinflussen, so dass hier kein konstanter Wert für jede Berechnung angegeben werden sollte. So können die Zellen in die Porenstruktur des Filters hineinwachsen oder aber durch sezernierte Matrixproteine die Interaktion mit der Filterfläche ändern.

Auch die Verteilung des elektrischen Feldes über dem Filter kann ungleichmäßig sein und somit eine Rolle spielen. Bei hochohmigen Zellen sind Schwankungen in der Angabe des subepithelialen Widerstands fast vernachlässigbar, doch bei Messungen in niederohmigen Bereichen, entweder niederohmigen Zelllinien oder aber nach EGTA-Behandlung, wodurch es zur Widerstandsabnahme kommt, kann der Fehler durch ungenaue Angabe von R^{sub} einen großen Effekt haben.

Nimmt man beispielsweise einen subepithelialen Widerstand von $10 \Omega\text{-cm}^2$ an, so kann, wenn er bei der Kalkulation der epithelialen Leitfähigkeit G^{epi} nicht berücksichtigt wird, ein Fehler von 3% bei einem Widerstand von $300 \Omega\text{-cm}^2$ zustande kommen, während bei einem niedrigen Widerstand von $30 \Omega\text{-cm}^2$ der Fehler mit 30% anzusetzen ist (Abb. 23). Somit ist die exakte Bestimmung des subepithelialen Widerstands von immenser Bedeutung.

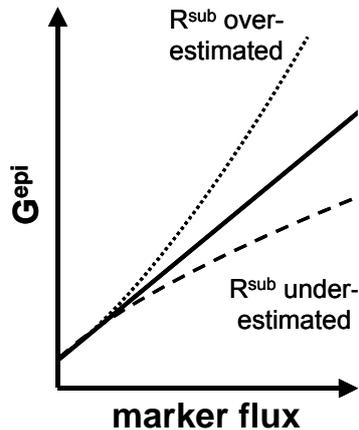


Abb. 22 Effekt von R^{sub} auf den Zusammenhang zwischen der epithelialen Leitfähigkeit G^{epi} und dem Flux eines parazellulären Markers. Sowohl Über- als auch Unterschätzung des subepithelialen Widerstands führt zu einer Verzerrung des realen Zusammenhangs beider Parameter, wodurch sich falsche Werte für den parazellulären Widerstand ergeben.

3.5.5 Limitierende Faktoren

Zum aktuellen Entwicklungsstand ist die Zwei-Wege-Impedanztechnik zwar eine schnelle und einfache Methode zur Bestimmung des trans- und parazellulären Anteils des transepithelialen Widerstands, doch müssen einige limitierende Faktoren berücksichtigt werden. Die drei wichtigsten sind dabei:

1. Der Einfluss des subepithelialen Widerstands: Eine ungenaue Bestimmung des subepithelialen Widerstands führt zu großen Abweichungen in der Ermittlung der transepithelialen Widerstandskomponenten (3.3.4.4).
2. Die Streuung der Fluxwerte: Besonders bei hochohmigen Epithelien mit hohen parazellulären Widerständen werden die Fluxe leicht an der Auflösungsgrenze bestimmt, so dass schon kleine Schwankungen und Ungenauigkeiten einen großen Einfluss gewinnen.

3. Die Eigenschaften des parazellulären Fluxmarkers: Dieser ist für jedes Modell zu validieren, da es eventuell zur nicht rein-parazellulären Passage kommen kann, so wie es beispielsweise bei CaCo-2-Zellen beobachtet wurde (3.3.4.1). Nimmt man zudem an, dass es zwei Arten von parazellulären Poren gibt (Van Itallie et al., 2008; vorliegende Arbeit), könnten auch die Fluxmarker durch diese in ihrer Passage beeinflusst werden, ohne, dass es sich beispielsweise am Widerstand bemerkbar machte. Die Größe des parazellulären Fluxmarkers ist zudem limitiert, da er die kleinporige parazelluläre Barriere, die sich proportional zum parazellulären Widerstand verhält, passieren muss.

Des Weiteren kann die komplette Auswertung der Impedanzkurven nicht immer stattfinden. Wenn man den Einfluss anderer Substanzen auf den para- und transzellulären Widerstand untersucht, sind dementsprechend Validierungen des Systems nötig, da sie aufgrund diverser Wechselwirkungen mit dem Epithel die Impedanzeigenschaften soweit verändern können, dass es zu Überlagerungen zweier Impedanzkurven kommt.

So führte die Applikation von Forskolin im Gegensatz zu EGTA zu einer Abnahme des transzellulären, nicht des parazellulären Widerstands: Forskolin aktiviert apikale Chlorid-Kanäle (Kreusel et al., 1991), wodurch es zur Widerstandsabnahme durch Änderung des transzellulären Eigenschaften und somit R^{trans} kommt.

Über die Eckpunkte der Impedanzkurve, die R^{sub} und R^{epi} angeben, und durch die gleichzeitige Messung von Leitfähigkeits- und Fluxänderungen unter EGTA-Einfluss kann man zwar auch hier R^{trans} und R^{para} ermitteln, jedoch ist durch die veränderte Kurvenform, die zwei Minima besitzt, dabei keine Bestimmung der Kapazität C möglich (Abb. 23).

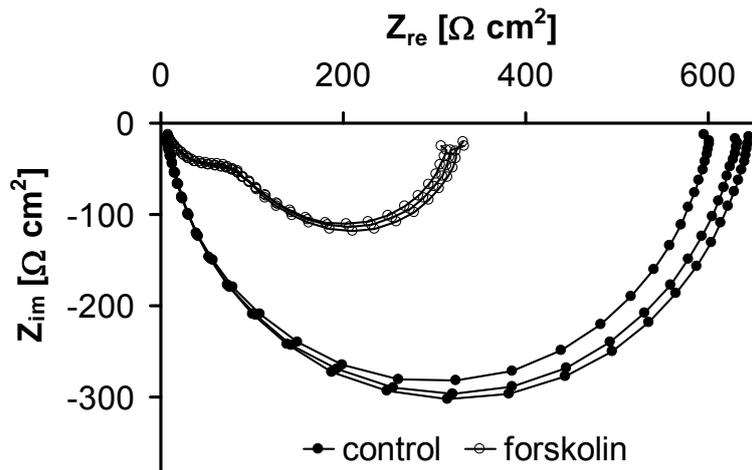


Abb. 23 Nyquist-Diagramm einer Impedanzmessung von HT-29/B6-Zellen bei Forskolin-Gaben. Vor Forskolin-Gabe spiegelten große Halbkreise R^{epi} von $618,5 \pm 12,8 \Omega \cdot \text{cm}^2$, R^{sub} von $6,90 \pm 0,11 \Omega \cdot \text{cm}^2$ und C^{epi} von $3,93 \pm 0,04 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ wider. Der Fluoreszein-Flux vor und nach Forskolin-Applikation war ähnlich (vor: $0,31 \pm 0,05 \text{ nmol}/(\text{h} \cdot \text{cm}^2)$; nach: $0,26 \pm 0,03 \text{ nmol}/(\text{h} \cdot \text{cm}^2)$). Nach Forskolin-Gabe waren keine einfachen Kreisbögen mehr messbar und dementsprechend konnten auch nicht R^{trans} und R^{para} bestimmt werden.

3.5.6 Anwendung und Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellte Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie ist entwickelt worden, um widerstandsbezogene Veränderungen, die sich auf Tight Junction-Ebene abspielen, in Zellkulturexperimenten quantitativ zu bestimmen und von transzellulären Effekten zu differenzieren. Bisher war es nur bedingt und unter großem Aufwand möglich, diese beiden Routen widerstandstechnisch aufzulösen. Zudem ließen sich durch die reine Messung des transepithelialen Widerstands kleine Änderungen dessen aufgrund von Änderungen im trans- oder parazellulären Anteil nicht erkennen, was nun durch die Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie ermöglicht wird.

Aufgrund ihrer leichten Durchführung ist die Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie auch eine schnelle Methode, die sich beispielsweise auch zum Screenen von stabil-transfizierten Zellen eignet. Häufig können transfizierte Zellen neben den beabsichtigten Veränderungen auch auf transzellulärer, bzw. parazellulärer Ebene verändert sein und somit nicht für funktionelle Untersuchungen taugen. Hier bietet es sich an, schnelle und einfache Selektion der Klone über die Zwei-Wege-Impedanztechnik durchzuführen.

Wie bereits in 3.5.1 und 3.5.5 beschrieben lassen sich auch transzelluläre Effekte, wie beispielsweise die Aktivierung von Kanälen von Substanzen, über die Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie erkennen, da sie die Eigenschaften der behandelten apikalen oder basolateralen Membran verändern, so dass sich statt des überlagerten einen zwei in-einander übergehende Kreisbögen ergeben. Diese Änderungen sind weitaus komplexer auszuwerten, benötigen neben der Annahme eines erweiterten Modells, das die transzelluläre Komponente weiter unterscheidet, auch weitere Messung eines Parameters.

Aus den gleichzeitigen Fluxmessungen und der gezielten Veränderung des parazellulären Widerstands durch EGTA kann allerdings gezeigt werden, ob eine Substanz, wie z.B. Forskolin, nur den transzellulären Widerstand verändert oder auch den parazellulären Widerstand beeinflusst. Die Effekte können dementsprechend quantifiziert werden.

Eine Weiterentwicklung der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie wird eine Ermittlung aller Komponenten des epithelialen Zellkulturmodells ermöglichen und somit weitere Anwendungsgebiete eröffnen.

Jedoch ermöglicht sie auf ihrem aktuellen Entwicklungsstand erstmals die leichte Differenzierung zwischen trans- und parazellulärem Widerstand.

3.5 Auswertung und Statistik

Die Herstellung der Dateitabellen, Abbildungen und die statistische Auswertung erfolgten mit den Programmen Microsoft Excel, Microsoft Word, Microsoft Powerpoint und Gimp 2.6.6.

Die Angabe der Messwerte erfolgte als arithmetischer Mittelwert \pm SEM (standard error of the *mean*). Zur Berechnung von Signifikanzen wurde der Student's t-Test mit anschließender Bonferroni-Holm-Korrektur bei Mehrfachtestung verwendet. Ein p-Wert von $p < 0,05$ wurde als signifikant gewertet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4 Ergebnisse

4.1 Expression von TRIC-a in tri- und bizellulären Tight Junctions

Die Untersuchung verschiedener epithelialer Zelllinien, einschließlich der intestinalen Zelllinien HT-29/B6, CaCo-2 und T84, sowie der Nierenzelllinien MDCK I, MDCK II und M-1 und der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT in Bezug auf die Expression von Tricellulin zeigte, dass dieses Tight Junction-Protein in allen der verwendeten Zelllinien endogen exprimiert wurde (Abb. 24). Da als Ansatz der detaillierten Charakterisierung eine Überexpression angestrebt wurde, wurden MDCK II-Zellen als die für die Transfektion am besten geeignete Zelllinie ausgewählt. Neben der vergleichsweise geringen endogenen Tricellulin-Expression zeichneten sich MDCK II-Zellen durch einen relativ niedrigen transepithelialen Widerstand aus, der nach Transfektion anstiege, wenn Tricellulin-a die von Ikenouchi et al. (2005) vermutete barrierestärkende Funktion besäße.

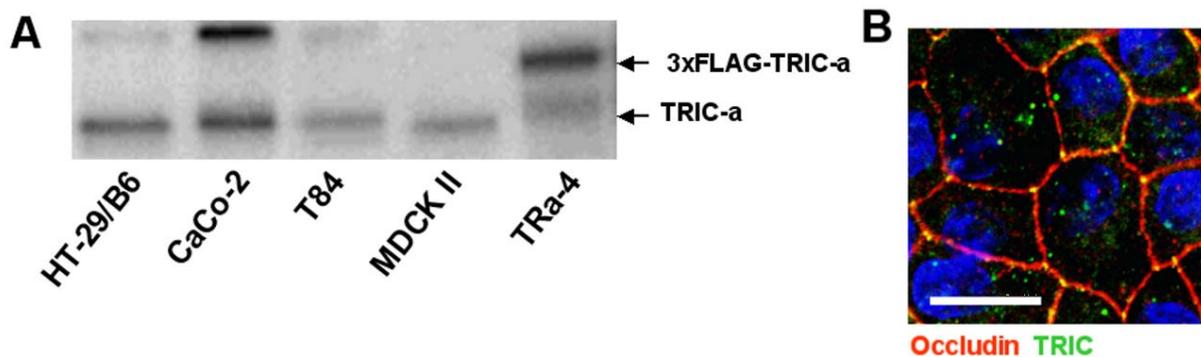


Abb. 24 Endogene Expression von Tricellulin in epithelialen Zelllinien. **A** Western Blot der Membranproteinfraktionen einiger epithelialer Zelllinien und einem Überexpressionsklon (TRa-4). Das humane TRIC-a lief auf einer Höhe von ca. 64 kDa, während das canine (MDCK II) etwas niedriger bei ca. 62 kDa nachweisbar war. Aufgrund des 3×FLAG-tags befand sich das überexprimierte TRIC-a bei 72 kDa. Eine bei ca. 80 kDa nachweisbare Bande wurde bereits von Riazuddin et al. (2006) beschrieben, jedoch nicht weiter charakterisiert. **B** Immunfluoreszenzaufnahme der endogenen Lokalisation von Tricellulin (grün) und Occludin (rot) in MDCK II-Zellen (Balken = 20 µm). Tricellulin war in den trizellulären Zell-Zell-Kontakten mit Occludin kolokalisiert.

Die cDNA des humanen Tricellulin-a wurde aus HT-29/B6-Zellen gewonnen und durch die Ligation in den eukaryotischen Expressionsvektor pCMV10 N-terminal mit einem dreifachen FLAG-Tag versehen.

Die bei stabiler Transfektion erhaltenen Klone wurden auf die Expression ([Abb. 25](#)) und Lokalisation des überexprimierten getaggten Tricellulin hin untersucht ([Abb. 26, 27](#)), wobei sich zwei Arten von Klonen finden ließen. Die erste Gruppe von Klonen zeigte moderate Expression des Konstrukts und wies eine Lokalisation innerhalb der trizellulären Tight Junction auf, wie sie auch hauptsächlich für das endogene Tricellulin beschrieben worden war. Die zweite Gruppe von Klonen besaß weitaus stärkere Überexpression und das überexprimierte TRIC-a war in seiner Lokalisation nicht nur auf die trizelluläre Tight Junction begrenzt, sondern war auch in hohem Maße innerhalb der bizellulären Tight Junction lokalisiert.

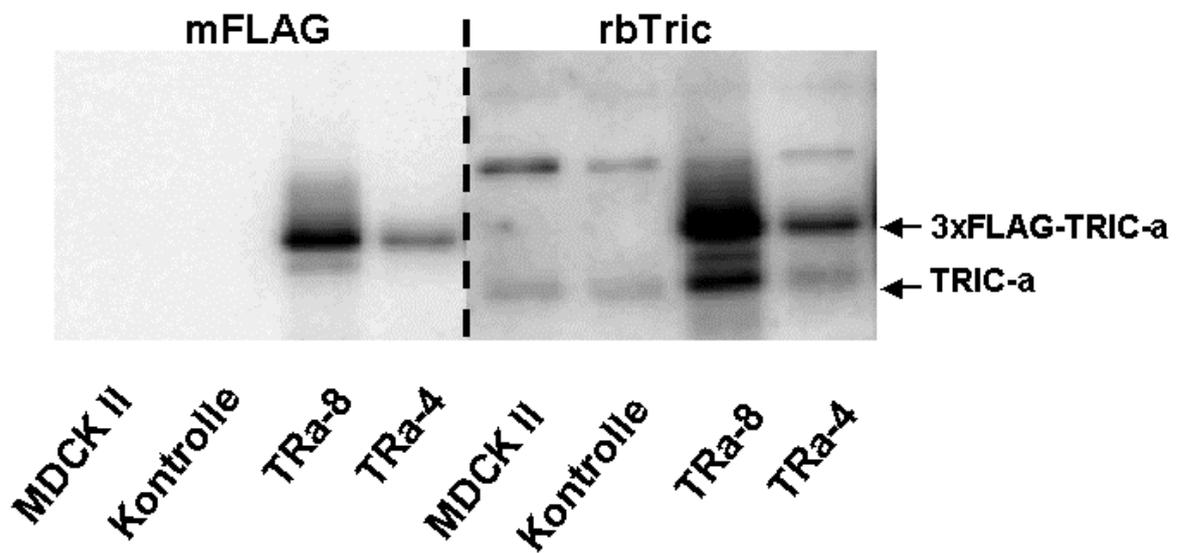


Abb. 25 Western Blots zur Überexpression von TRIC-a. Klon TRa-8 und TRa-4 unterschieden sich in der Stärke der Expression des 3×FLAG-TRIC-a (72 kDa), das weder in MDCK II noch der Vektorkontrolle nachweisbar war. Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen Tricellulin wies neben 3×FLAG-TRIC-a in TRa-8 und TRa-4 auch das endogene, canine Tricellulin in allen vier Zelltypen nach.

Die Klone wurden daraufhin in trizelluläre und bizelluläre Überexpressionsklone unterteilt und parallel untersucht. Hierbei wurde je Typ ein Klon detailliert charakterisiert, während zwei weitere zur Bestätigung der Hauptbefunde herangezogen wurden.

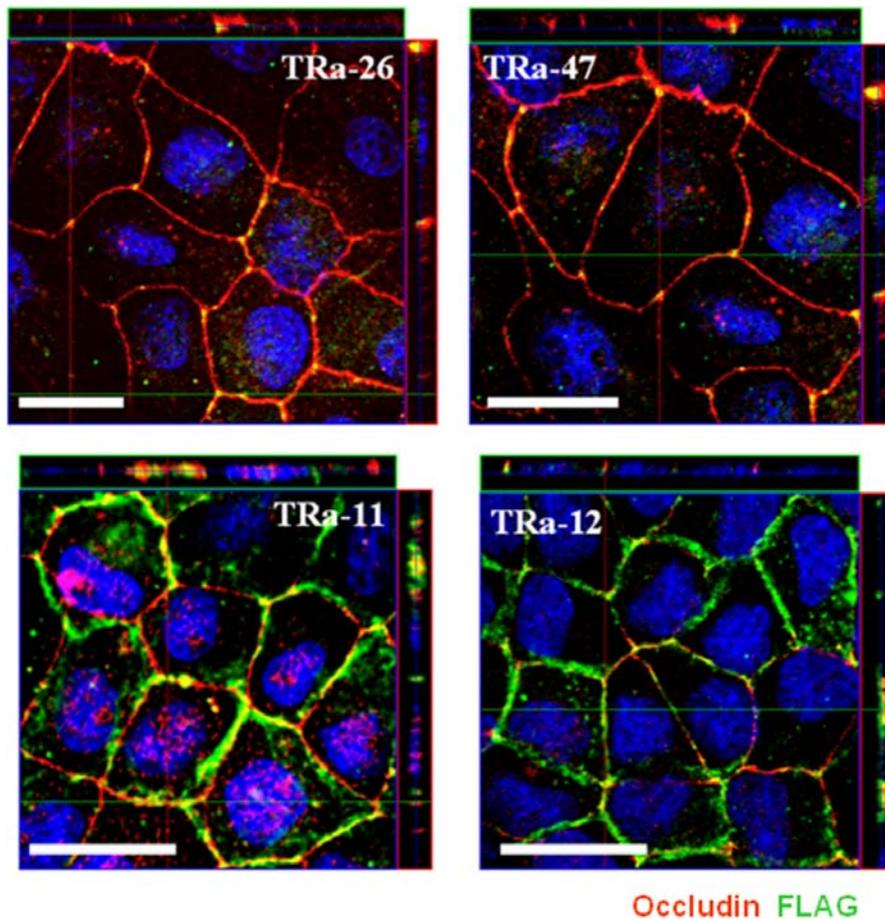


Abb. 26 Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Lokalisation von 3xFLAG-Tricellulin (grün) und Occludin (rot). Balken = 20 μ m. Z-Scans der Klone TRa-26 und TRa-47 als weitere Klone mit trizellulärer Überexpression und der Klone TRa-11 und TRa-12 als weitere Klone mit bizellulärer Lokalisation des überexprimierten 3xFLAG-Tricellulins.

Als Beispiel für trizellulär überexprimierenden Klone wurde TRa-4 ausgewählt, das dieser Klon im Vergleich mit den humanen Colonzelllinien HT-29/B6 und CaCo-2 eine ähnliche starke Expression von Tricellulin aufwies (252 ± 26 % im Vergleich zur Vektorkontrolle, $n = 4$, [Abb. 28](#), Vergleich mit HT-29/B6: [Abb. 24 A](#)) und somit gut die natürlichen Bedingungen der trizellulären Tight Junction im humanen Colon widerspiegelte.

In Immunfluoreszenzfärbungen wies die Vektorkontrolle die typisch trizellulär-lokalisierten Signale für Tricellulin auf ([Abb. 27](#)). Doch auch in der bizellulären Tight Junction ließen sich in Colokalisation mit Occludin schwache Tricellulinsignale detektieren. Im Vergleich zeigte sich im Klon TRa-4 eine deutliche Intensitätszunahme der Signale für Tricellulin innerhalb der trizellulären Kontakte, während die bizellulären Signale weiterhin nur sehr schwach nachweisbar waren.

Klon TRa-8 wurde als Beispiel für die bizellulär überexprimierenden Klone ausgewählt, da er eine sehr starke Überexpression aufwies (1086 ± 72 % im Vergleich zur Vektorkontrolle, $n = 4$) die selbst kleinste Effekte durch Tricellulin nachweisbar machen sollte (Abb. 28). Zudem zeigte sich in der Immunfluoreszenzfärbung, dass im Vergleich zur Vektorkontrolle nun nicht nur wie bei Klon TRa-4 in trizellulären Kontakten eine Signalzunahme zu verzeichnen war, sondern auch in den bizellulären Tight Junctions ein Signal des stark überexprimierten Tricellulins auftrat (Abb. 27).

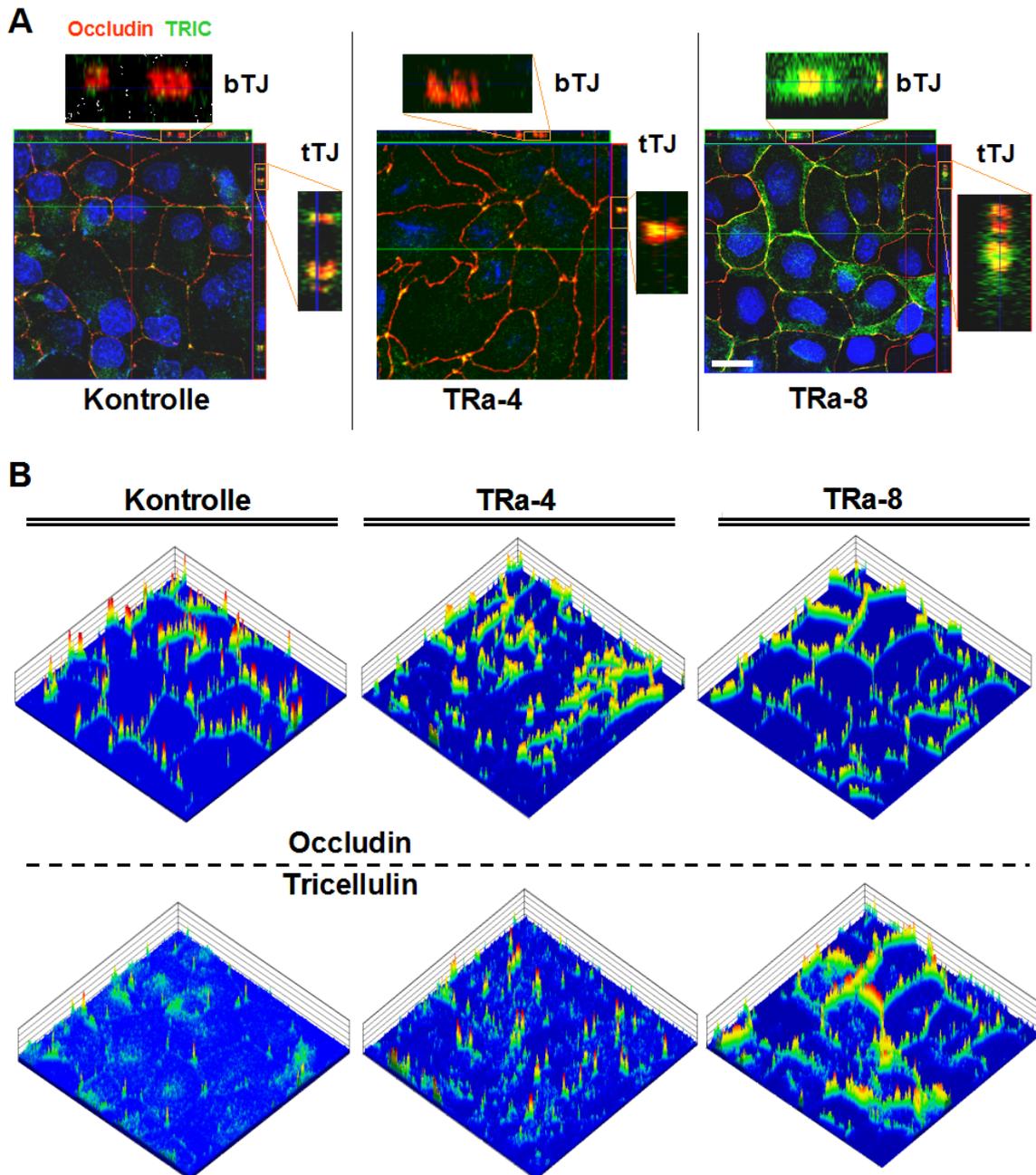


Abb. 27 Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Lokalisation von Tricellulin (grün) und Occludin (rot). Balken = 20 μm . **A** Z-Scans der Vektorkontrolle zeigten die endogene Tricellulin-Lokalisation hauptsächlich an trizellulären Kontakten in Colokalisation (gelb) mit Occludin (grün) war. In Klon TRa-4 zeigte sich eine vergleichbare Lokalisation. Klon TRa-8 zeigte neben den Signalen in der tTJ auch starke Signale in der bTJ, die mit Occludin colokalisiert vorlagen. **B** Intensity plot-Analysen der Immunfluoreszenzaufnahmen zeigten eine durchgängige Occludin-Lokalisation in allen drei Klonen. Tricellulin wurde bevorzugt in tTJs lokalisiert, aber auch schwach in bTJs, nachgewiesen. Die Signalstärke innerhalb der tTJ nahm mit steigender Überexpression von TRIC-a zu. In Klon TRa-8 waren zudem starke Signale in der bizellulären Tight Junction nachweisbar. (Fläche 115 \times 115 μm^2).

Da durch Transfektionen und anschließende Selektion die resultierenden Klone häufig in der Expression anderer endogen vorhandener Proteine verändert sein können, wurde die Expression und Lokalisation einiger anderer Tight Junction-Proteine analysiert. Für Occludin, und die Claudine 1, 3 und 4 wurde in keinem der analysierten Klone eine Expressions- oder Lokalisationsänderung beobachtet. Für Claudin-2 war in Klon TRa-4 jedoch eine starke Erhöhung der Expression (562 ± 110 % im Vergleich zur Vektorkontrolle, $n = 4$, [Abb. 28](#)) vorhanden.

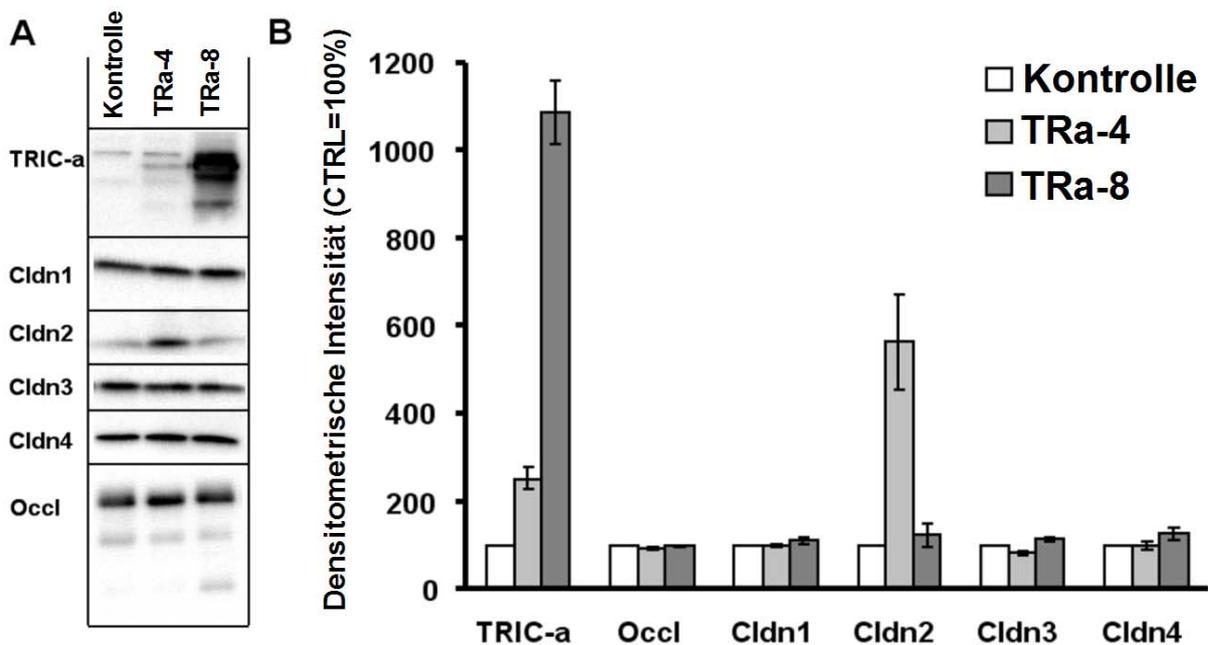


Abb. 28 Expression von Occludin, Tricellulin und den Claudinen 1 - 4. **A** Western Blots der Vektorkontrolle und zwei repräsentativer Überexpressionsklone. **B** Densitometrische Auswertung. 3×FLAG-TRIC-a war stark überexprimiert in Klon TRa-8 und moderat überexprimiert in Klon TRa-4. Die Expression von Occludin und den Claudinen -1, -3, -4 war unverändert, während sich in Klon TRa-4 eine starke Zunahme von Claudin-2 beobachten ließ.

In Immunfluoreszenzfärbungen konnte jedoch gezeigt werden, dass sich das zusätzlich exprimierte Claudin-2 hauptsächlich in den intrazellulären Kompartimenten befand und somit nicht zur parazellulären Barriere beitrug ([Abb. 29](#)). Des Weiteren besaßen andere Klone des trizellulären Typs (TRa-26, TRa-47) diese Überexpression nicht, zeigten aber fast gleiche Resultate in den durchgeführten Experimenten, so dass diese Änderung in der Claudin-2-Expression also keine Auswirkungen auf die Eigenschaften von Klon TRa-4 besaß.

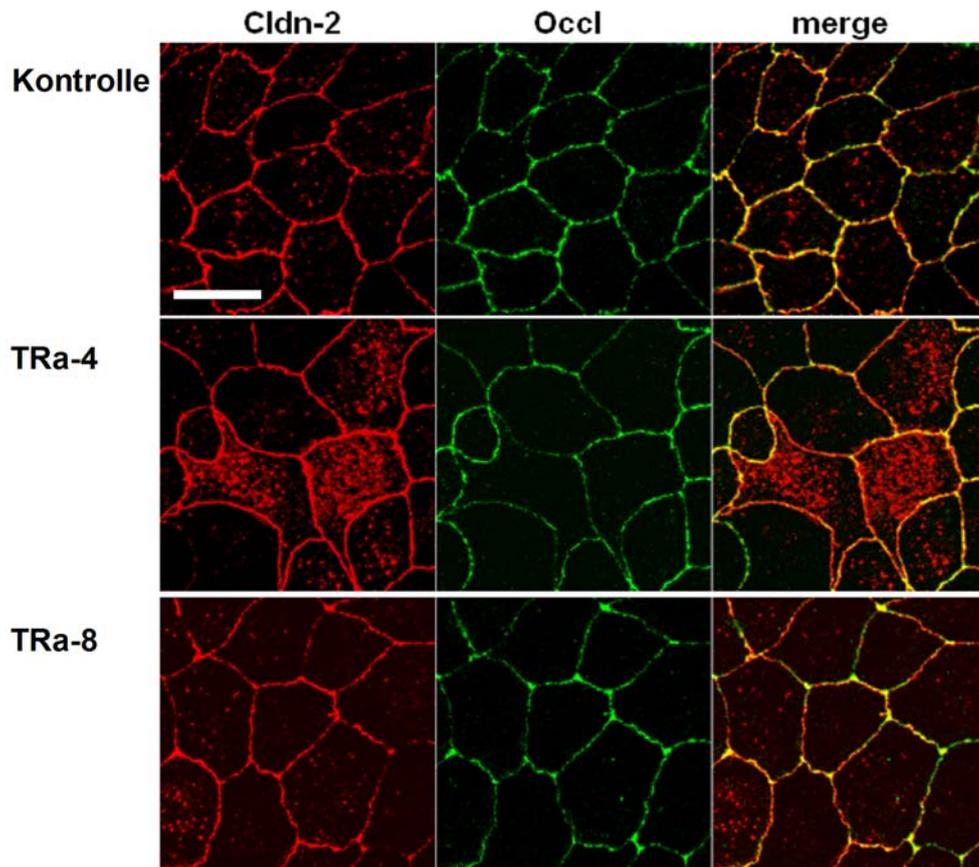


Abb. 29 Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Lokalisation von Claudin-2. Balken = 20 µm. Das im Klon TRa-4 mittels Western Blot zusätzlich nachgewiesene Claudin-2 ließ sich überwiegend innerhalb intrazellulärer Kompartimente nachweisen, während das in der TJ lokalisierte Claudin-2 unverändert war. Klon TRa-8 zeigte dagegen eine der Vektorkontrolle ähnliche Signalstärke.

4.2 Effekte von TRIC-a auf die parazelluläre Barriere und die Ionenpermeabilität

Um einen Effekt von Tricellulin auf den parazellulären Widerstand, der durch die Barriereigenschaften der Tight Junction charakterisiert wird, zu untersuchen, wurden zwei-Wege-impedanzspektroskopische Analysen durchgeführt. Auf diese Methode wird im Detail im Methodenteil 3.5 eingegangen.

Mit dieser Methode werden der parazelluläre Widerstand (R^{para}) und der transzelluläre Widerstand (R^{trans}), der die Widerstandseigenschaften der apikalen und der basolateralen

Zellmembranen widerspiegelt, gemessen. Aus der Parallelschaltung dieser beiden Widerstände ergibt sich der Widerstand des gesamten Epithels (R^{epi}).

Für die Vektorkontrolle wurde ein transzellulärer Widerstand von $69 \pm 19 \Omega \cdot \text{cm}^2$ gemessen, während der parazelluläre Widerstand nur $44 \pm 15 \Omega \cdot \text{cm}^2$ betrug (Abb. 30). Es handelt sich demnach um ein „leckes“ Epithel, was dadurch definiert ist, dass der parazelluläre Widerstand kleiner ist als der transzelluläre. Der resultierende epitheliale Widerstand war $21 \pm 3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n = 6$).

Messungen an dem trizellulär überexprimierenden Klon TRa-4 zeigten keine signifikanten Änderungen der drei Widerstände (R^{para} $45 \pm 15 \Omega \cdot \text{cm}^2$, R^{trans} $51 \pm 9 \Omega \cdot \text{cm}^2$, R^{epi} $25 \pm 4 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n = 7$), was vermuten ließ, dass eine trizelluläre Überexpression keinen Effekt auf die Ionenpermeabilität hatte. Im Gegensatz dazu zeigte sich in Klon Tra-8 ein dreifach erhöhter epithelialer Widerstand, dessen Ursache in einer 14-fachen Erhöhung des parazellulären Widerstands lag (R^{epi} : $72 \pm 9 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $**p < 0.01$; R^{para} : $612 \pm 141 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $**p < 0.01$, $n = 6$). Der transzelluläre Widerstand blieb unverändert, wodurch eine Änderung transzellulärer Eigenschaften durch die Tricellulin-Überexpression ausgeschlossen werden konnte. Die beobachtete starke Zunahme des parazellulären Widerstands deutete somit darauf hin, dass Tricellulin in der bizellulären Tight Junction eine Barrierefunktion ausübte, indem es die Ionenpermeabilität verringerte und so ein „dichtes“ Epithel schuf.

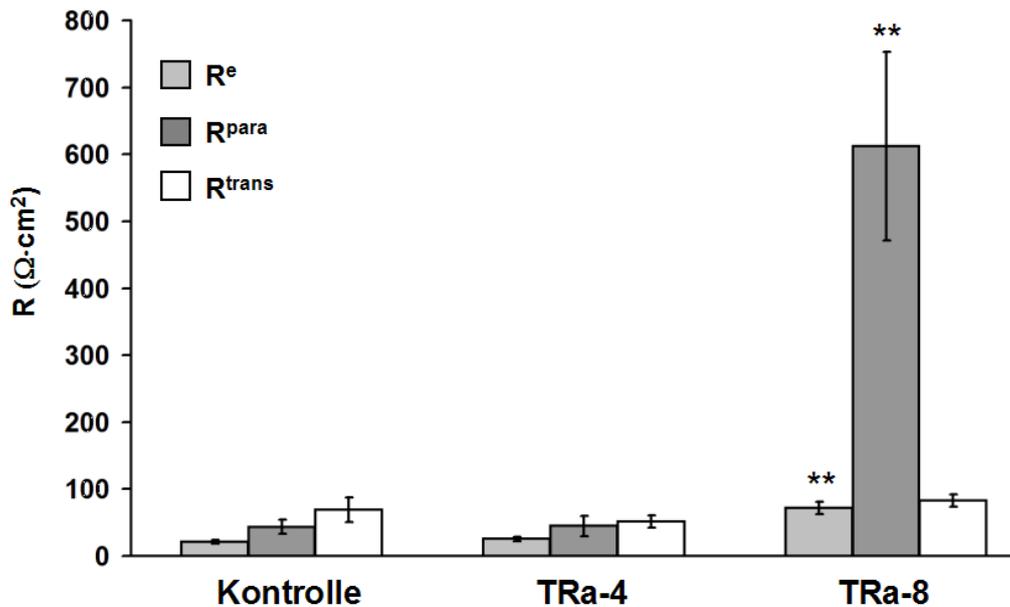


Abb. 30 Daten der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie: Die trizelluläre Überexpression von TRIC-a in Klon TRa-4 führte im Vergleich zur Vektorkontrolle zu keiner Veränderung des epithelialen Widerstands R^{epi} , während dieser im bizellulär überexprimierenden Klon TRa-8 um den Faktor drei erhöht war (** $p < 0,01$; $n = 6, 7$ und 6). Dieser Widerstandsanstieg wurde durch einen 14-fachen Anstieg des parazellulären Widerstands (R^{para} , ** $p < 0,01$), während der transzelluläre Widerstand R^{trans} nicht signifikant unterschiedlich war.

Die beobachteten Änderungen im Widerstand von Klon TRa-8 ließen Vermutungen über die Permeabilitätsänderungen für Ionen zu und wurden deshalb weiter analysiert. Dazu wurden Dilutionspotentiale und biionische Potentialmessungen für verschiedene Ionen durchgeführt. Im Vergleich mit der Vektorkontrolle zeigten sich für Na^+ und Cl^- , die zu den physiologischen Mengenelementen zählen, für Klon TRa-4 keine Unterschiede in den gemessenen Permeabilitäten (Na^+ : Kontrolle: $43,3 \pm 3,3 \cdot 10^{-6}$ cm/s; TRa-4 $39,0 \pm 0,4 \cdot 10^{-6}$ cm/s, $n = 6$; Cl^- : Kontrolle: $13,8 \pm 2,1 \cdot 10^{-6}$ cm/s; TRa-4 $13,1 \pm 1,7 \cdot 10^{-6}$ cm/s; $n = 6$; Abb. 31 A). Für TRa-8 zeigte sich dagegen eine signifikante Reduktion beider Permeabilitäten (Na^+ : $12,7 \pm 0,8 \cdot 10^{-6}$ cm/s; Cl^- : $4,2 \pm 0,3 \cdot 10^{-6}$ cm/s; beide $n = 5$ und *** $p < 0,001$).

Das Verhältnis beider Permeabilitäten zueinander war in allen drei Gruppen dagegen unverändert (Kontrolle: $3,14 \pm 0,28$; TRa-4: $3,00 \pm 0,39$; TRa-8: $3,03 \pm 0,03$; $n = 5-6$, n.s., Abb. 31 B). Somit lag bei der beobachteten Abdichtung in TRa-8 keine Änderung der Ionenselektivität vor, das überexprimierte Tricellulin dichtete gegen Anionen und Kationen gleichermaßen ab.

Dass die Ionenselektivität unverändert war, hatte auch für Klon TRa-4 besondere Bedeutung. Da hier eine Überexpression von Claudin-2 beobachtet worden war, hätte

dieses, wenn es einen Einfluss gehabt hätte, das Permeabilitätsverhältnis zugunsten der Kationen verschoben, da Claudin-2 eine parazelluläre Pore für mono- und divalente Kationen darstellt (Amasheh et al., 2002). Somit konnte durch die Dilutionspotentialmessung nochmals unterstrichen werden, dass das zusätzliche Claudin-2 keinen Effekt für die Barriereigenschaften von Klon TRa-4 hatte.

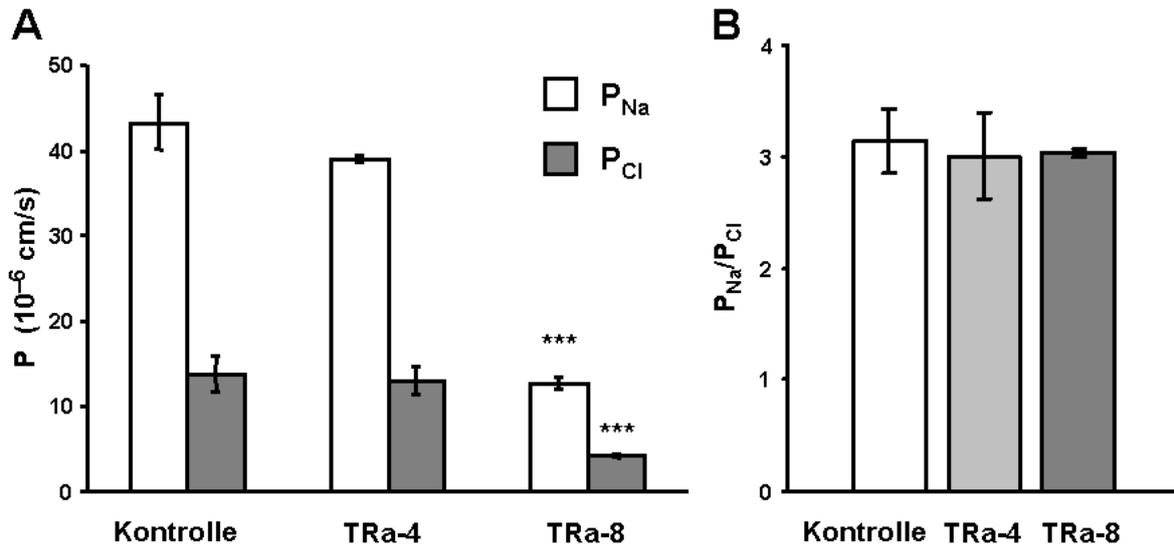


Abb. 31 Dilutionspotentialmessungen für Na^+ und Cl^- . **A** Die aus den Dilutionspotentialmessungen erhaltenen Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- zeigten keine Unterschiede zwischen der Vektorkontrolle und dem trizellulär überexprimierenden TRIC-a-Klon TRa-4 ($n = 6$ und 6). Klon TRa-8 zeigte reduzierte Permeabilitäten für beide Ionen (P_{Na} : *** $p < 0,001$; P_{Cl} : *** $p < 0,001$; $n = 5$). **B** Die Änderung der Permeabilitäten für Natrium- und Chloridionen hatten keinen Effekt auf das Verhältnis beider zueinander, was zeigte, dass sich die Ladungselektivität nicht durch TRIC-a-Überexpression veränderte ($n = 6, 6$ und 5).

Auch die Messung weiterer TRIC-a trizellulär überexprimierender Klone bestätigte den Befund, dass es keine Permeabilitätsänderungen für Na^+ und Cl^- im Vergleich zur Vektorkontrolle gab, wenn TRIC-a nur in den tri-zellulären Kontakten überexprimiert wurde (Kontrolle 1: P_{Na} : $38,6 \pm 3,9 \cdot 10^{-6}$ cm/s; P_{Cl} : $13,3 \pm 1,9 \cdot 10^{-6}$ cm/s; $n = 8$; Kontrolle 2: P_{Na} : $43,3 \pm 3,8 \cdot 10^{-6}$ cm/s; P_{Cl} : $14,0 \pm 0,7 \cdot 10^{-6}$ cm/s; $n = 6$; TRa-26: P_{Na} : $39,9 \pm 2,9 \cdot 10^{-6}$ cm/s; P_{Cl} : $12,4 \pm 3,2 \cdot 10^{-6}$ cm/s; $n = 5$; TRa-47: P_{Na} : $35,3 \pm 5,2 \cdot 10^{-6}$ cm/s; P_{Cl} : $12,1 \pm 2,4 \cdot 10^{-6}$ cm/s; $n = 5$; Abb. 32 A). Dagegen zeigten weitere Klone mit bizellulärer TRIC-a-Überexpression ebenfalls eine Reduktion der Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- (TRa-11: P_{Na} : $18,3 \pm 1,4 \cdot 10^{-6}$ cm/s; P_{Cl} : $5,3 \pm 0,8 \cdot 10^{-6}$ cm/s; $n = 5$; TRa-12: P_{Na} : $17,4 \pm 2,8 \cdot 10^{-6}$ cm/s; P_{Cl} : $6,8 \pm 0,8 \cdot 10^{-6}$ cm/s; $n = 5$).

Das Verhältnis von P_{Na}/P_{Cl} blieb dabei wie auch schon in Klon TRa-8 unverändert (Kontrollen: $3,0 \pm 0,3$, $n = 14$; tTJ-Klone: $3,1 \pm 0,4$, $n = 10$; bTJ-Klone: $3,0 \pm 0,4$, $n = 10$; Abb. 32 B).

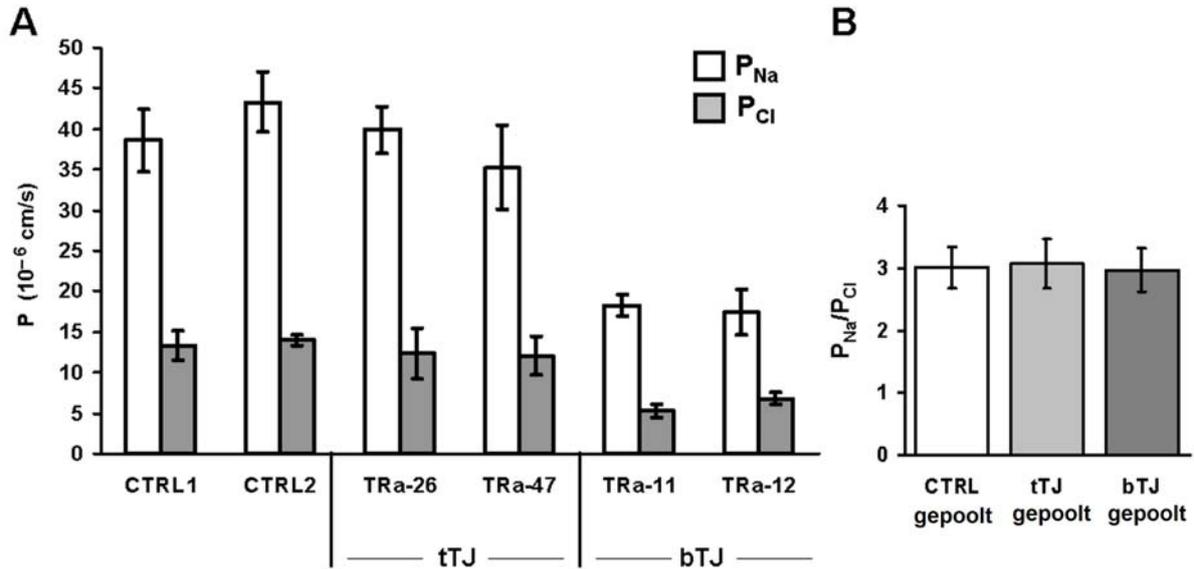


Abb. 32 Dilutionspotentialmessungen anderer Überexpressionsklone für Na^+ und Cl^- . **A** Die Dilutionspotentialmessungen ergaben keine Unterschiede in den Permeabilitäten der Vektorkontrollen und der trizelluläre überexprimierenden Klone, während sie ähnlich stark reduziert für die bizelluläre überexprimierenden Klone war ($n = 8, 6, 5, 5, 5, 5$). **B** Das Verhältnis P_{Na}/P_{Cl} war sowohl in den trizellulär als auch den bizelluläre überexprimierenden Klonen unverändert ($n = 14, 10, 10$).

Um eventuelle Aussagen über die Art der Wechselwirkung von Ionen mit Tricellulin machen zu können, wurden die Ionenpermeabilitäten weiterer Ionen detailliert gemessen. Neben monovalenten Kationen und Anionen (Eisenman-Sequenzen) wurden hierbei auch divalente Kationenpermeabilitäten (Sherry-Sequenz) ermittelt. Die so erhaltenen Sequenzen werden normalerweise zur Beschreibung der Wechselwirkungen von Ionen mit leitfähigen Poren verwendet.

Da sich in der Dilutionspotentialmessung für die trizellulär überexprimierenden Klone keine Änderungen der Ionenpermeabilität ergaben, wurde sich bei den Sequenzmessungen auf den bizellulär überexprimierenden Klon TRa-8 und die Vektorkontrolle beschränkt.

Für die Eisenman-Sequenz der monovalenten Kationen (Abb. 33 A) ergab sich für die Vektorkontrolle die Reihenfolge $Na^+ \geq K^+ > Li^+ > Rb^+ > Cs^+$ (Sequenz IX), während diese für TRa-8 $Na^+ > Li^+ > K^+ > Rb^+ > Cs^+$ war, was der Sequenz X entsprach. Die Wechselwirkungen der Ionen mit der Tight Junction waren dementsprechend nur minimal verändert. Die

Permeabilitäten für die einzelnen Alkalimetallionen waren jedoch in allen Fällen durch die bizelluläre Überexpression in etwa um den Faktor vier reduziert.

Die Messung der divalenten Kationen (Abb. 33 B) ergab Sherry-Sequenz III mit $\text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ für die Kontrolle und eine Änderung in Sherry-Sequenz V mit $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+}$ für TRa-8, wobei gleichzeitig die Permeabilitäten auf etwa die Hälfte reduziert worden waren.

Die Verschiebung der Sherry-Sequenz von Sequenz III zu V deutete, ebenso wie die Änderung der kationischen Eisenman-Sequenz von Sequenz IX zu X, an, dass durch Tricellulin die Interaktion zwischen den Kationen und der Tight Junction stärker als zuvor aufgrund des Ionenradius stattfand, während die Wechselwirkungen mit der Hydrathülle abnahmen.

Die anionische Eisenman-Sequenz (Abb. 33 C) konnte leider nicht vollständig bestimmt werden, da die zur Messung benötigte F^- -Konzentration sich als für die Zellen toxisch herausstellte, so dass auf die Bestimmung der Permeabilität für F^- verzichtet wurde. Nichtsdestotrotz ließ sich auch hier eine Sequenzverschiebung hin zur leicht erhöhten Interaktion mit positiver Ladung, im Fall der Anionen also mit der Hydrathülle, beobachten. Aufgrund der Folge $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$ in den Kontrollen wurde die Eisenman-Sequenz zwischen IV und VII angenommen, während sich mit $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^-$ für TRa-8 eindeutig Sequenz III ergab. Zudem waren die Permeabilitäten für die gemessenen Anionen ähnlich wie bei den divalenten Kationen bei bizellulärer Überexpression von Tricellulin auf die Hälfte reduziert.

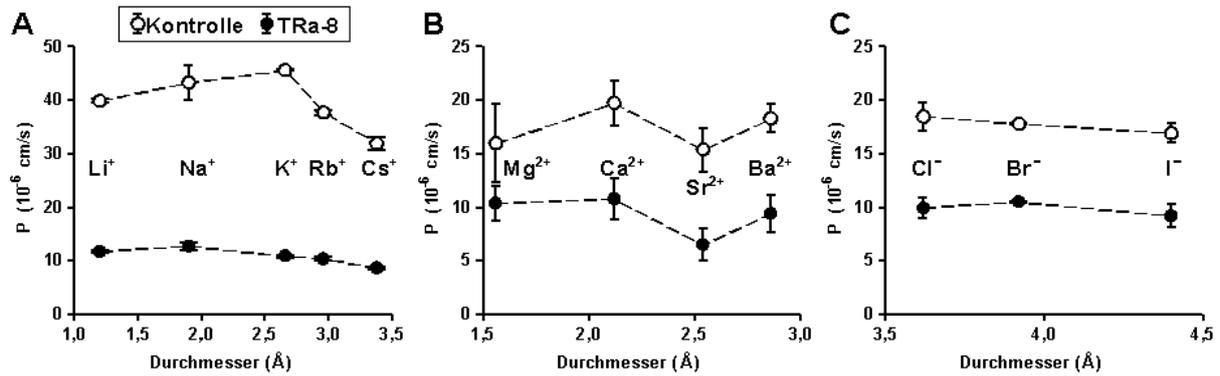


Abb. 33 Permeabilitäten für verschiedene Ionen. **A** Monovalente Kationen. Die Reihung der Permeabilitäten ergab für die Vektorkontrolle Eisenman-Sequenz IX, während sich für Klon TRa-8 Sequenz X ergab. Gleichzeitig ließ sich für alle monovalenten Kationen eine Permeabilitätssenkung in Klon TRa-8 beobachten (P_{Li} : $n = 4$ und 7 , $***p < 0,001$; P_K : $n = 6$ und 9 , $***p < 0,001$; P_{Na} : $n = 6$ und 5 , $***p < 0,001$; P_{Rb} : $n = 5$ und 8 , $***p < 0,001$; P_{Cs} : $n = 6$ und 15 , $***p < 0,001$). **B** Divalente Kationen. Die Reihung der Permeabilitäten ergab für die Vektorkontrolle Sherry-Sequenz III, während sich für Klon TRa-8 Sequenz V ergab. Auch hier zeigte sich eine allgemeine Verminderung der Permeabilitäten in Klon TRa-8, mit Ausnahme von Mg^{2+} (P_{Mg} : $n = 9$, 9 ; P_{Ca} : 7 , 7 , $**p < 0,01$; P_{Sr} : $n = 5$, 5 , $**p < 0,01$; P_{Ba} : $n = 8$ und 7 , $**p < 0,01$). **C** Monovalente Anionen. Die Reihung der Permeabilitäten ergab für die Vektorkontrolle Eisenman-Sequenz IV-VII, während sich für Klon TRa-8 Sequenz III ergab. Allgemein ließ sich für alle monovalenten Anionen eine Permeabilitätssenkung in Klon TRa-8 beobachten (P_{Cl} : $n = 29$ und 28 , $***p < 0,001$; P_{Br} : $n = 10$ und 8 , $***p < 0,001$; P_I : $n = 5$, 5 , $***p < 0,001$).

4.3 Permeabilität von parazellulären Größenmarkern

Fluxe parazellulärer Größenmarker mit Molekulargewichten zwischen 332 Da und 20 kDa wurden gemessen, um die maximale Durchtrittsgröße von Molekülen, welche die Tight Junction passieren, zu ermitteln. Hier war dabei besonders der trizellulär überexprimierende Klon TRa-4 von Interesse, da sich anhand seiner Datenlage auch Rückschlüsse auf die Beschaffenheit der trizellulären Tight Junction ziehen lassen könnten.

In Vektorkontrollen ergaben sich für Fluoreszein (332 Da, [Abb. 34 A](#)), ein mittelgroßes, zweifach negativ geladenes Anion, Permeabilitäten von $4,80 \pm 1,21 \cdot 10^{-6}$ cm/s ($n = 6$). Bei trizellulärer Lokalisation des überexprimierten TRIC-a blieben diese unbeeinflusst (TRa-4: $4,58 \pm 1,03 \cdot 10^{-6}$ cm/s, $n = 9$), wogegen sich eine Permeabilitätsabnahme bei

bizellulärer Lokalisation beobachten ließ (TRa-8: $1,85 \pm 0,21 \cdot 10^{-6}$ cm/s, n = 10, *p<0,05). Fluxmessungen eines ungeladenen Molekül ähnlicher Größe, PEG-400 (400 Da, [Abb. 34 B](#)), führten zu ähnlichen Resultaten, womit ein Einfluss von Ladungen ausgeschlossen werden konnte (Kontrolle: $5,11 \pm 0,29 \cdot 10^{-6}$ cm/s, n = 9; TRa-4: $5,63 \pm 0,33 \cdot 10^{-6}$ cm/s, n = 12, n.s. vs. Kontrolle; TRa-8: $3,92 \pm 0,12 \cdot 10^{-6}$ cm/s, n = 11, **p<0,01).

Die Permeabilitätsbestimmung für PEG-900 (900 Da, [Abb. 34 C](#)) ergab, dass in diesem Größenbereich nicht nur in TRa-8 die Permeabilität reduziert war, sondern auch bei rein trizellulärer Überexpression in TRa-4 eine Abnahme der Durchlässigkeit nachweisbar war (Kontrolle: $4,78 \pm 0,48 \cdot 10^{-6}$ cm/s, n = 4; TRa-4: $3,42 \pm 0,19 \cdot 10^{-6}$ cm/s; n = 6, *p<0,05; TRa-8: $2,76 \pm 0,28 \cdot 10^{-6}$ cm/s; n = 7; **p<0,01).

Im makromolekularen Bereich von 4 kDa (FITC-Dextran 4000, [Abb. 34 D](#)) lag die Permeabilität bereits eine Dekade niedriger angesiedelt als noch bei den mittelgroßen Molekülen ($0,48 \pm 0,10 \cdot 10^{-6}$ cm/s, n = 6). Bei trizellulärer Überexpression von Tricellulin kam es nun zu einer dramatischen Abnahme der Permeabilität, die nur noch 15 % der Permeabilität in Vektorkontrollen ausmachte ($0,07 \pm 0,02 \cdot 10^{-6}$ cm/s, n = 6, **p<0,01). Diese Abnahme wurde in Klon TRa-8 noch etwas weiter gesteigert ($0,02 \pm 0,03 \cdot 10^{-6}$ cm/s, n = 8; ***p<0,001).

Für FITC-Dextran 10.000 (10 kDa, [Abb. 34 E](#)) wurde bei Vektorkontrollen eine Permeabilität von $0,13 \pm 0,03 \cdot 10^{-6}$ cm/s (n = 5) ermittelt, die für Klon TRa-4 auf ca. 23 % reduziert wurde ($0,03 \pm 0,01 \cdot 10^{-6}$ cm/s, n = 5 **p<0,01) und für Klon TRa-8 sogar gegen Null lief ($0,00 \pm 0,01 \cdot 10^{-6}$ cm/s, n = 5; **p<0,01).

Diese Beobachtungen ließen den Schluss zu, dass die Überexpression von Tricellulin innerhalb der trizellulären Tight Junction die Durchlässigkeit für Makromoleküle ab ungefähr 1 kDa, nicht aber für kleine und mittelgroße Moleküle stark beeinflusst.

Bestimmungen der Permeabilität für FITC-Dextran 20.000 (20 kDa, [Abb. 34 F](#)) waren ähnlich für alle Gruppen und konnten als vernachlässigbar angesehen werden, da sie sich im Vergleich zum 10 kDa-Molekül in kaum nachweisbaren Größenordnungen befanden (Kontrolle: $6,1 \pm 1,3 \cdot 10^{-9}$ cm/s, n = 6; TRa-4: $3,0 \pm 1,1 \cdot 10^{-9}$ cm/s, n = 5; TRa-8: $3,8 \pm 0,6 \cdot 10^{-9}$ cm/s, n = 6). Somit schien das obere Limit des parazellulären makromolekularen Durchtritts über die Tight Junction für MDCK II-Zellen in einem Bereich um 20 kDa zu liegen.

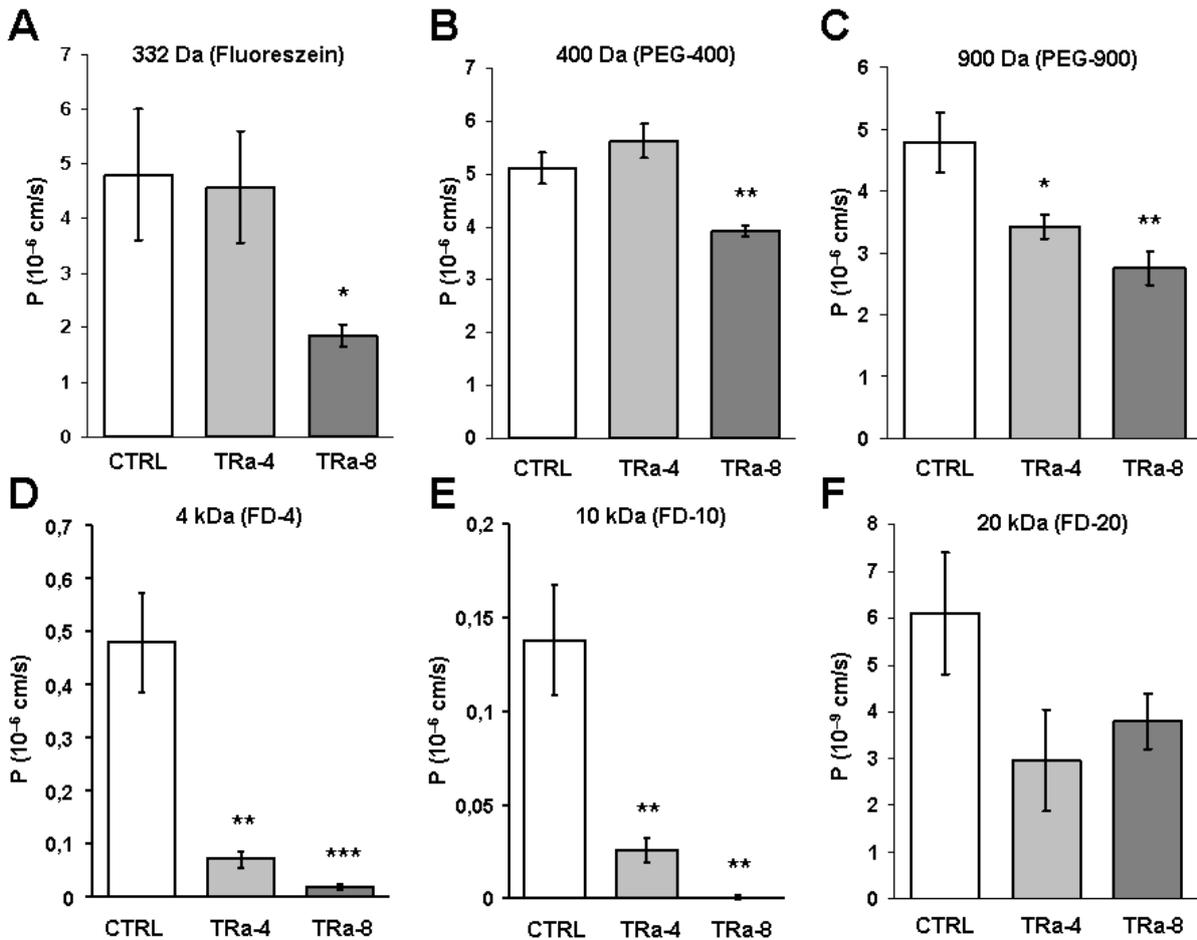


Abb. 34 Permeabilitäten parazellulärer makromolekularer Marker. **A** Die Permeabilität für Fluoreszein als zweifach negativ geladener Marker mit 332 Da war in Klon TRa-8 reduziert, während sich Klon TRa-4 und die Vektorkontrolle nicht in der Permeabilität unterschieden ($n = 6, 9$ und 10 ; $**p < 0,01$). **B** Die Permeabilität für das ungeladene PEG-400 war in der Vektorkontrolle und Klon TRa-4 gleich, aber für TRa-8 vermindert ($n = 9, 12$ und 11 ; $**p < 0,01$). **C** Die Permeabilität für PEG-900 war in TRa-8 im Vergleich zur Vektorkontrolle vermindert. Aber auch für TRa-4 ließ sich eine Permeabilitätsabnahme beobachten ($n = 4$ und 6 ; $*p < 0,05$; TRa-8: $n = 7$; $**p < 0,01$). **D** Für FITC-Dextran 4000 (4 kDa) war die Permeabilität bereits in TRa-4 im Vergleich zur Vektorkontrolle stark vermindert und war in Klon TRa-8 noch weiter erniedrigt ($n = 6$ und 6 ; $**p < 0,01$; TRa-8: $n = 8$; $***p < 0,001$). **E** Die Permeabilität für FITC-Dextran 10.000 (10 kDa) zeigte ähnliche Permeabilitätsverhältnisse der Klone zur Vektorkontrolle wie FITC-Dextran 4, wobei allerdings die Permeabilität in TRa-8 noch weiter erniedrigt war ($n = 5$; $**p < 0,01$). **F** Die Permeabilität für FITC-Dextran 20.000 (20 kDa) war in Kontrollen ca. 20-mal niedriger als für 10 kDa und war in beiden Klonen unverändert ($n = 6, 5, 6$).

Die Beobachtung, dass Makromoleküle in ihrem Durchtritt bereits durch trizelluläre Überexpression von TRIC-a beeinflusst wurden, während kleinere Moleküle wie Fluoreszein

unbeeinflusst blieben, ließ die Vermutung zu, dass die trizelluläre Zentralpore eine wichtige Rolle im epithelialen Makromoleküldurchtritt spielt. Als Schlüsselexperimente wurden deswegen diese beiden Substanzen hinsichtlich der Permeabilität auch an anderen Klonen beider Überexpressionstypen wiederholt.

Für Fluoreszein blieben die Permeabilitäten auch in den anderen Klonen mit trizellulärer Überexpression unverändert (Kontrolle: $5,2 \pm 0,8 \cdot 10^{-6}$ cm/s, $n = 4$; TRa-26: $4,5 \pm 0,8 \cdot 10^{-6}$ cm/s, $n = 3$; TRa-47: $4,8 \pm 1,1 \cdot 10^{-6}$ cm/s, $n = 3$; Pool der tTJ-Klone bestehend aus TRa-26, -47 und zwei anderen tTJ-Klonen: $4,9 \pm 0,5 \cdot 10^{-6}$ cm/s, $n = 9$), während sich die Permeabilitätsminderung bei bizellulärer Überexpression auch in anderen Klonen beobachten ließ (TRa-11: $2,9 \pm 0,5 \cdot 10^{-6}$ cm/s, $n = 3$; TRa-12: $3,1 \pm 1,1 \cdot 10^{-6}$ cm/s, $n = 3$; Pool der bTJ-Klone bestehend aus TRa-11, -12 und drei weiteren bTJ-Klonen: $3,3 \pm 0,4 \cdot 10^{-6}$ cm/s, $n = 11$, [Abb. 35 A](#)).

Für das Makromolekül FITC-Dextran 4000 (FD-4, 4 kDa) wurde auch in weiteren trizellulär überexprimierenden Klonen eine starke Abnahme der Permeabilität beobachtet. Diese war vergleichbar mit der des zuerst untersuchten Klons TRa-4. Auch weitere bizellulär überexprimierende Klone zeigten die bereits gefundene starke Permeabilitätsreduktion (Kontrolle: $0,57 \pm 0,11 \cdot 10^{-6}$ cm/s, $n = 4$; TRa-26: $0,08 \pm 0,02 \cdot 10^{-6}$ cm/s, $n = 3$; TRa-47: $0,11 \pm 0,07 \cdot 10^{-6}$ cm/s, $n = 4$; Pool der tTJ-Klone bestehend aus TRa-26, -47 und einem weiteren tTJ-Klon: $0,09 \pm 0,04 \cdot 10^{-6}$ cm/s, $n = 8$; TRa-11: $0,05 \pm 0,02 \cdot 10^{-6}$ cm/s, $n = 3$; TRa-12: $0,02 \pm 0,01 \cdot 10^{-6}$ cm/s, $n = 3$; Pool der bTJ-Klone bestehend aus TRa-11, -12 und einem weiteren bTJ-Klon: $0,03 \pm 0,01 \cdot 10^{-6}$ cm/s, $n = 7$; [Abb. 35 B](#)). Somit konnte bestätigt werden, dass bereits trizelluläre Überexpression von TRIC-a zu einer Abdichtung gegenüber Makromolekülen führte.

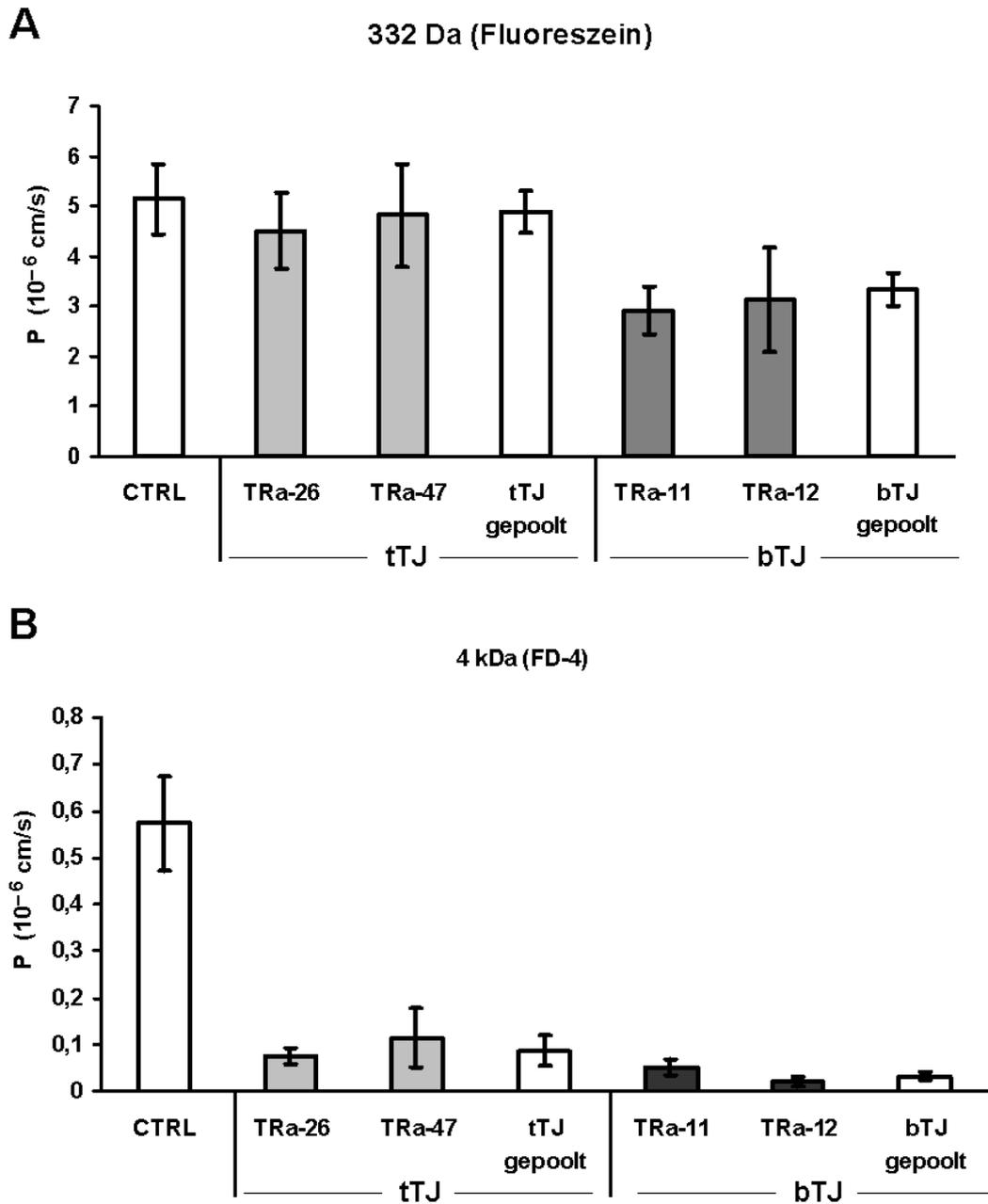


Abb. 35 Permeabilitäten für Fluoreszein und FITC-Dextran 4000 (4 kDa) in weiteren mit Klonen bi- und trizellulärer Überexpression von TRIC-a. **A** Die Permeabilität für Fluoreszein war in den bizellulär überexprimierenden Klonen vermindert, während sich für trizelluläre Überexpression kein Unterschied zur Vektorkontrolle ergab. ($n = 4, 3, 3, 9, 3, 3, 11$). **B** Die Permeabilität für FITC-Dextran 4000 war sowohl in bi- als auch trizellulären Überexpressionsklonen gegenüber der Vektorkontrolle stark erniedrigt ($n = 4, 3, 8, 4, 4, 7$).

4.4 Untersuchung der Transzytose- und Apoptoserate

Der transzytotische Durchtritt von Makromolekülen wurde durch HRP-Fluxmessungen bestimmt. Die gemessenen Permeabilitäten für dieses ca. 44 kDa große Molekül waren um einige Größenordnungen kleiner als für die bereits genannten parazellulären Größenmarker und unterschieden sich nicht signifikant in Vektorkontrollen, Klon TRa-4 und -8 (Kontrolle: $2,35 \pm 0,47 \cdot 10^{-12}$ cm/s, $n = 4$; TRa-4: $1,79 \pm 0,67 \cdot 10^{-12}$ cm/s, $n = 5$; TRa-8: $1,92 \pm 0,49 \cdot 10^{-12}$ cm/s, $n = 4$, [Abb. 36 A](#)). Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass die oben erhaltenen Permeabilitäten durch transzelluläre Passage über eventuell veränderte Transzytose zustande kamen.

Auch veränderte Apoptoseraten hätten die makromolekulare Permeabilität beeinflussen können, weswegen sie ebenfalls an den Klonen im Vergleich zur Kontrolle untersucht wurden. Dazu wurden TUNEL-gefärbte Zellmonolayer histologisch analysiert. Die Apoptoserate war für Kontrollen $0,83 \pm 0,34$ %, $0,87 \pm 0,35$ % in TRa-4-Zellen und $0,67 \pm 0,27$ % in Klon TRa-8 ($n = 6$, n.s., [Abb. 36 B](#)). Daraus ergab sich, dass auch die Apoptoserate unverändert war, wodurch sonst die veränderte Makromolekülpermeabilität nach Tricellulin-Überexpression hätte hervorgerufen werden können.

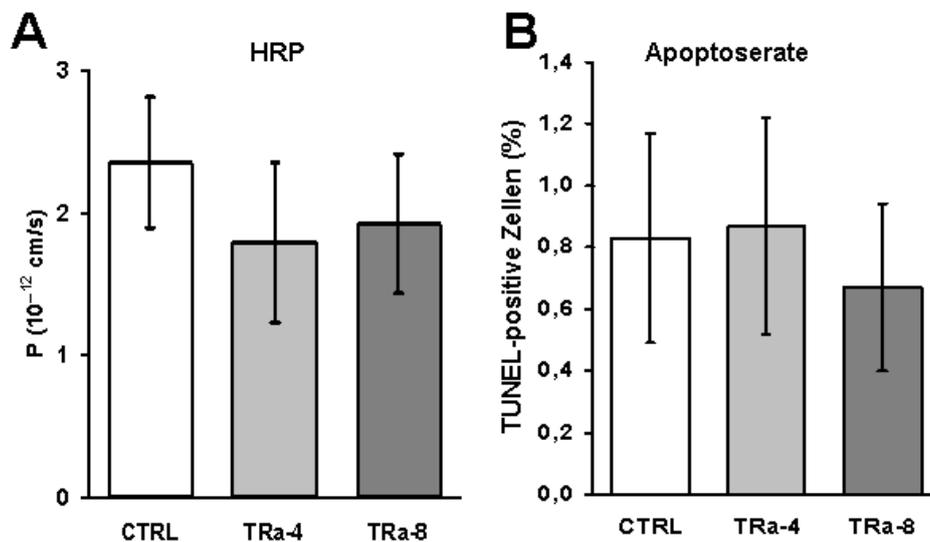


Abb. 36 Permeabilitätsmessung für HRP und Bestimmung der Apoptoserate. **A** Die Permeabilität für HRP war in der Vektorkontrolle und beiden Typen von Überexpressionsklonen unverändert, wodurch Transzytose als Grund für die Permeabilitätsänderung anderer Marker durch TRIC-a ausgeschlossen werden konnte ($n = 4, 5$ und 4). **B** Die Apoptoserate war in allen drei Gruppen unverändert ($n = 6$).

4.5 Visualisierung des makromolekularen Durchtritts an bi- und trizellulären Tight Junctions

Der Durchtritt von Makromolekülen wurde mittels Fluorescence Live Cell Imaging visualisiert und lokalisiert. Es handelt sich dabei um eine neue, gerade in der Entwicklung befindliche Methode (gemeinsames Projekt mit Dr. Jan F. Richter, Institut für Klinische Physiologie). Hierzu wurden Zellmonolayer der Vektorkontrolle, die auf speziell für das konfokale Laserscanning-Mikroskop geeigneten Filtern gewachsen waren, apikal mit einer Agarosegelschicht bedeckt, um die durchtretenden fluoreszenzmarkierten Moleküle nach Passage des Monolayers am Durchtrittsort zu fokussieren und die normalerweise auftretende schnelle Verteilung innerhalb des apikalen Milieus zu verlangsamen. Die gleichzeitige basolaterale Applikation 3 kDa großer (rot markiertes Dextran) und 70 kDa großer (grün markiertes Dextran) Moleküle zeigte, dass das 70 kDa große Molekül wie erwartet den Zellmonolayer nicht durchdrang, während Signale für das 3 kDa große Molekül über der apikalen Oberfläche mit der Zeit zunahm. Das 70 kDa-Dextran diente somit als Kontrolle der Integrität der Zellfläche über die gesamte Versuchsdauer hinweg.

Die Signale für das 3 kDa-Dextran nahmen mit der Zeit über den Zell-Zellverbindungen stetig zu und begannen bald, sich mit Signalen benachbarter Zellen zu vermischen. XZ-Scans zeigten, dass die Signalzunahme sowohl oberhalb der bizellulären als auch der trizellulären Tight Junction lokalisiert war. Somit konnte bestätigt werden, dass der Durchtritt des FITC-Dextrans durch den Zellmonolayer über den parazellulären Weg stattfand.

Eine Videosequenz über 64 min ist als Supplement zu Krug et al., 2009a, hinterlegt und unter www.molbiolcell.org/content/vol0/issue2009/images/data/E09-01-0080/DC1/SupVideo01.mov abrufbar.

In einer exemplarischen Aufnahme aus dieser Videosequenz, die 23 Minuten nach Zugabe der fluoreszenzmarkierten Substanzen erfolgte, ließ sich eine Signalzunahme über zwei benachbarten trizellulären Kontakten beobachten, während die Signalstärke oberhalb der bizellulären Tight Junction noch schwach war (Abb. 37).

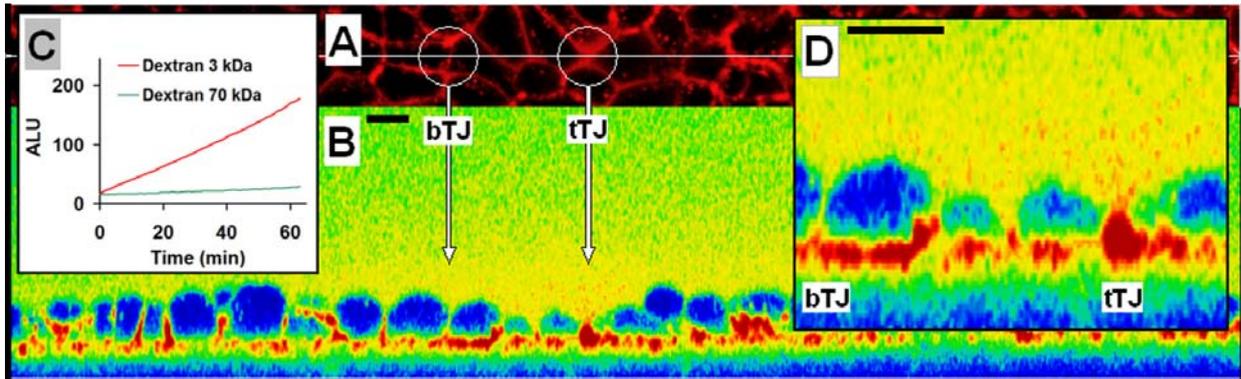


Abb. 37 Fluorescence Live Cell Imaging des molekularen Durchtritts. Balken = 10 μm . **A** XY-Bild eines Vektorkontrollzellmonolayers, der basolateral mit TMR-Dextran (3kDa, rot) und OG-Dextran (70 kDa, grün) überschwemmt worden war. Die weiße Linie markiert die Schnittebene der XZ-Scans. **B** Line Scan-Bild des Kanals für das 3 kDa-Dextran 23 min nach Dextrangabe. Die Pfeile bezeichnen die dazugehörigen TJ-Strukturen (bTJ und tTJ). **C** Vergleich der Signalintensitäten (als ALU = arbitrary light units) für das 3 kDa- und das 70 kDa-Dextran aufgetragen gegenüber dem Zeitverlauf. Die untersuchte Region befand sich über der Zellmonolayerschicht. Das 3 kDa-Dextran passierte diesen mit der Zeit, während die Signalstärke für das 70 kDa-Dextran in diesem Zeitraum unverändert blieb. **D** Detailansicht des Line Scans. Der Durchtritt des 3 kDa-Dextrans war bereits 23 min nach Zugabe über den tTJs erkennbar, während zu diesem Zeitpunkt über den bTJs nur geringe Signale detektiert wurden.

4.6 Ultrastrukturelle Analyse der bi- und trizellulären Tight Junctions

Die Analyse der Ultrastruktur der Tight Junction sollte zeigen, ob und inwiefern Tricellulin-a die Barriereigenschaften der Tight Junction beeinflusst. Hierzu wurden Gefrierbruchstudien der bizellulären und trizellulären Tight Junctions von Vektorkontrollen und beiden Überexpressionsklonen durchgeführt.

Ein Vergleich der Vektorkontrollen mit Klon TRa-4 und -8 zeigte, dass sich keine Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung horizontal orientierter Stränge ([Abb. 38](#)), die senkrecht zum parazellulären Transportweg verlaufen, oder der absoluten Strangzahl (Kontrolle: $4,36 \pm 0,24$, $n = 11$; TRa-4: $4,61 \pm 0,31$, $n = 11$; TRa-8: $4,81 \pm 0,30$, $n = 10$, n.s., [Abb. 39 A](#)) ergaben.

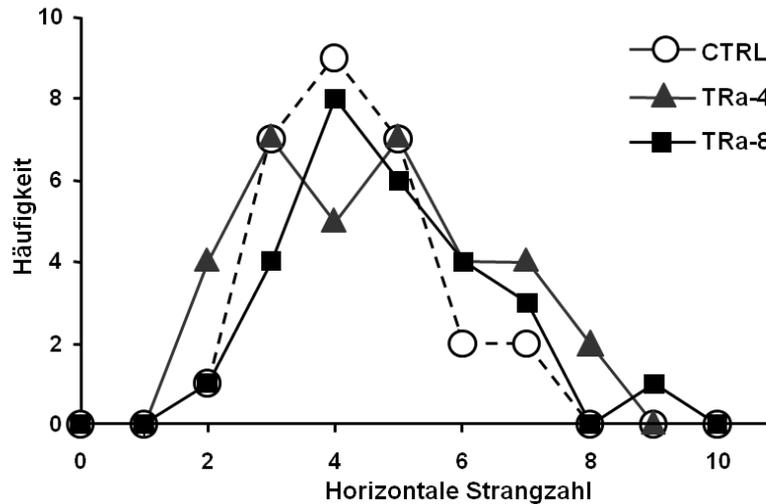


Abb. 38 Häufigkeitsverteilung der TJ-Strangzahlen. Die Überexpression von TRIC-a führt zu keiner Veränderung der Strangzahlhäufigkeit.

Die Netzwerktiefe war ebenfalls in allen drei Gruppen unverändert (Kontrolle: 246 ± 17 nm; TRa-4: 277 ± 25 nm; TRa-8: 298 ± 25 nm, [Abb. 39 B](#)). Das Auftreten von >20 nm großen Strangbrüchen („Breaks“) pro μm horizontaler Stranglänge unterschied sich nicht signifikant zwischen Kontroll- und TRa-4-Zellen (Kontrolle: $1,60 \pm 0,15$; TRa-4: $1,40 \pm 0,09$, [Abb. 39 C](#)). Im bizellulär überexprimierenden Klon TRa-8 dagegen war die Zahl der Breaks pro μm stark reduziert ($0,40 \pm 0,10$, $***p < 0.001$).

Noch weitaus auffälliger war, dass das allgemeine Erscheinungsbild der Tight Junction-Stränge sich in TRa-8 deutlich von dem der Vektorkontrolle und TRa-4 unterschied. Während diese in etwas weniger als der Hälfte der analysierten Proben partikelartige Stränge zeigten, war in keinem der untersuchten TRa-8-Proben dieses Strukturmerkmal vorhanden ([Abb. 39 D](#), [Abb. 40](#)).

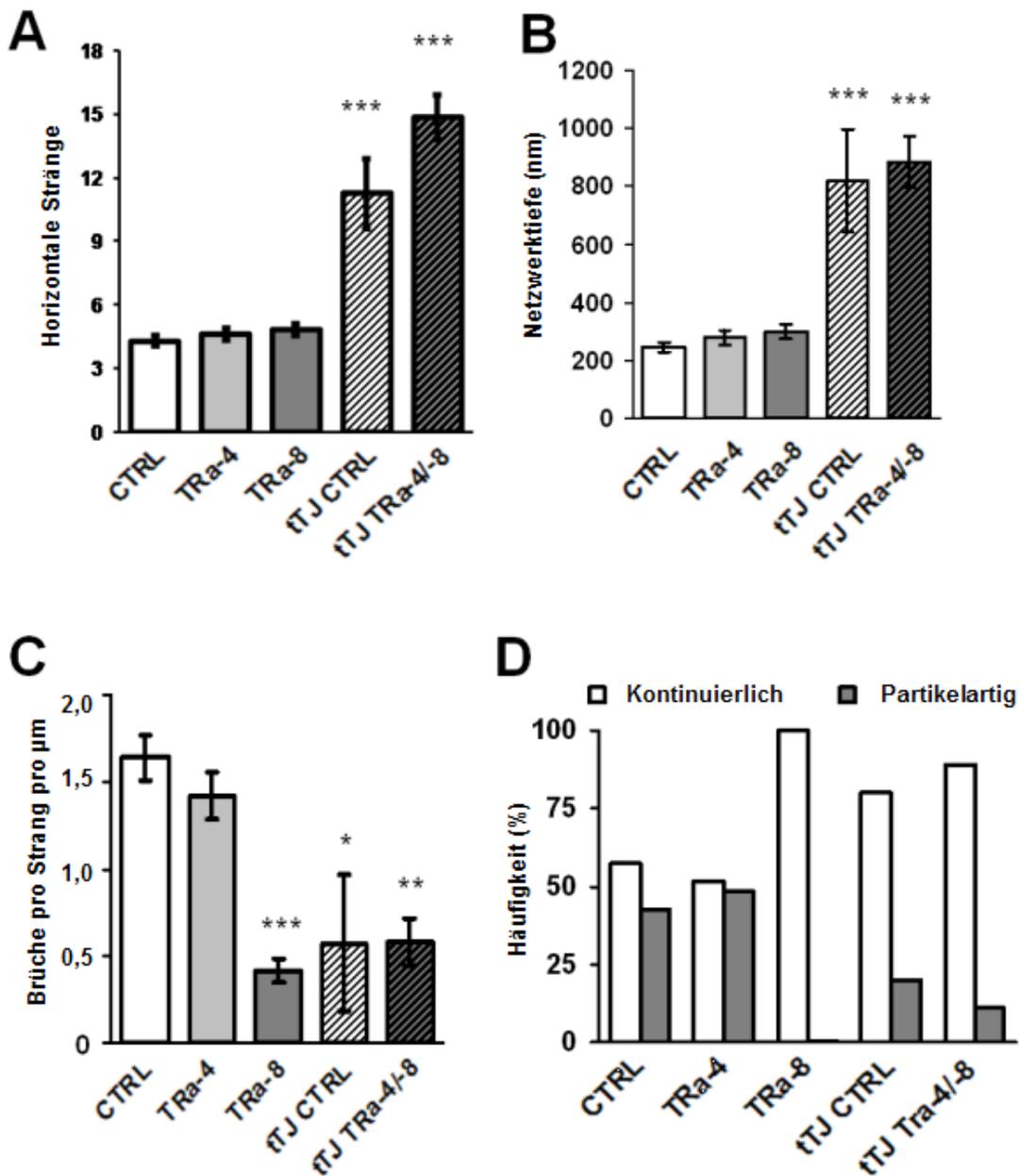


Abb. 39 Morphometrische Analyse der TJ-Ultrastruktur. **A** In bTJs zeigte sich kein Unterschied in der Strangzahl nach TRIC-a-Überexpression. Im Vergleich hatten jedoch die tTJs ungefähr viermal so viele Stränge wie bTJs (beide TRIC-a-überexprimierenden Klone wurden zu einer Gruppe vereint; $n = 11, 11, 10, 4, 9$; $***p < 0,001$). **B** Die vertikale Strangdichte veränderte sich nicht nach Einfügen zusätzlichen TRIC-as. tTJs wiesen im Vergleich zu bTJs ein ausgedehntes TJ-Netzwerk auf ($***p < 0,001$). **C** Häufigkeit von Strangbrüchen >20 nm pro μm horizontaler Stranglänge. Die bizelluläre Überexpression von TRIC-a führte zu einer dreifach kleineren Häufigkeit von Strangbrüchen in Klon TRa-8, ähnlich der Strangbruchhäufigkeit, die auch in tTJs zu finden war ($***p < 0,001$). **D** Häufigkeit von kontinuierlichen und partikelartigen Strängen. Die bizelluläre Überexpression von TRIC-a führte zur vollständigen Abwesenheit von partikelartigen Strängen in Klon TRa-8. Auch in tTJs waren keine partikelartigen TJs auffindbar.

Alle bizellulären Tight Junctions zeichneten sich durch durchgängige, lineare Stränge aus (Kontrolle: 57% durchgängig linear; TRa-4: 52% durchgängig linear; TRa-8: 100% durchgängig linear). Dieses auffällige Erscheinungsbild der bizellulären Tight Junction konnte auch in einem anderen bizellulär überexprimierenden Klon, TRa-12, beobachtet werden (Abb. 40 D). Dementsprechend konnte geschlossen werden, dass TRIC-a die bizelluläre Ultrastruktur der Tight Junction verändert, indem es die strukturelle Integrität der Stränge erhöht und dadurch eine Änderung hin zu einem durchgängigen Erscheinungsbild hervorruft.

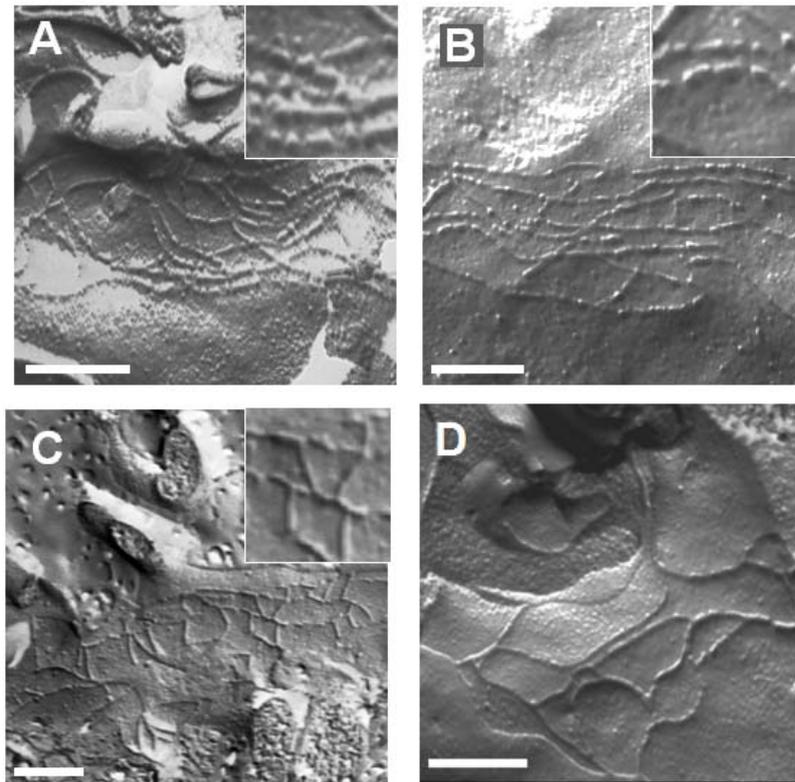


Abb. 40 Gefrierbruchelektronenmikroskopische Aufnahmen bizellulärer Tight Junctions. Balken = 200 nm. **A** Die Vektorkontrolle wies ein gleichmäßiges TJ-Netzwerk auf, das größtenteils partikelartig aufgebaut war, was sich in der Detailansicht deutlich erkennen ließ. **B** Das TJ-Netzwerk des TRIC-a trizellulär überexprimierenden Klons TRa-4 wies im Vergleich zur Vektorkontrolle keine Unterschiede auf. **C** Im Unterschied zur Vektorkontrolle und TRa-4 waren die Tight Junction-Stränge in Klon TRa-8 durchgängig und besaßen keinerlei Partikelstruktur. **D** Ein weiterer TRIC-a bizellulär überexprimierender Klon, TRa-12, zeigte ebenso wie TRa-8 nur kontinuierliche, partikellose Tight Junction-Stränge.

Die Ultrastrukturen der analysierten trizellulären Tight Junctions von Kontrollen, TRa-4 und TRa-8 unterschieden sich in keinem der untersuchten Merkmale, was sich eventuell auf

bereits endogen vorhandenes Tricellulin zurückführen ließe. Allgemein ließen sich die trizellulären Tight Junctions als vertikal auslaufende längliche Röhrenstruktur, der trizellulären Zentralpore, beschreiben, die durch im trizellulären Kontakt aufeinandertreffende bizelluläre Tight Junction-Stränge geformt wurde, und eine Gesamtlänge von 1025 ± 135 nm besaß (Abb. 39 B). Durch weitere horizontal verlaufende Stränge ergab sich eine fischgrätenartige Struktur (Abb. 41). Die Strangzahl der trizellulären Tight Junction war dadurch etwa viermal so hoch wie bei den untersuchten bizellulären Tight Junctions (Abb. 39 A). Zudem ergab sich eine ca. 3,5-mal weitere vertikale Ausdehnung des trizellulären Tight Junction-Netzwerks als für das Netzwerk bizellulärer Tight Junctions. Die Netzwerkdichte, die sich aus dem Verhältnis von Strangzahl zur Netzwerktiefe errechnete, unterschied sich jedoch nicht zwischen bizellulärer und trizellulärer Tight Junction. Auffällig im Vergleich mit bizellulären Tight Junctions war zudem die geringe Anzahl von Breaks. Das allgemeine Erscheinungsbild entsprach hingegen dem kontinuierlichen Strangtyp, so wie es auch für die bizellulären Tight Junctions des Klons TRa-8 beobachtet worden war (Abb. 39 C, D; Abb. 41).

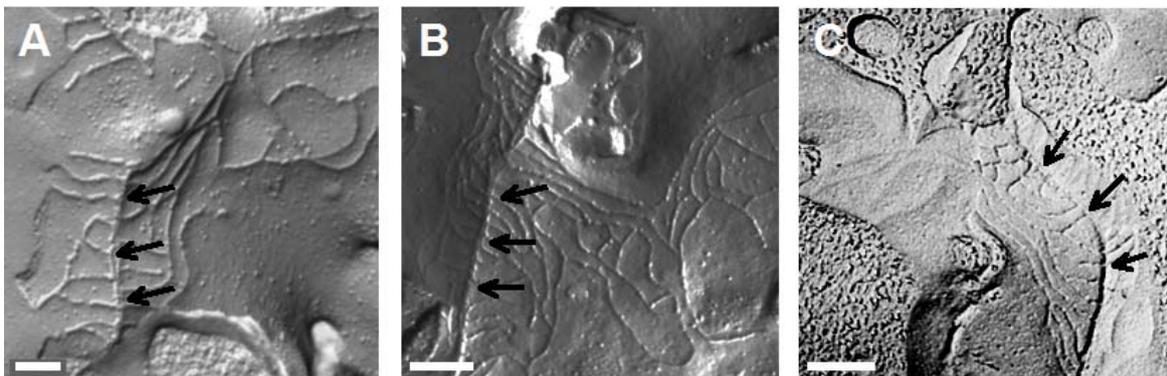


Abb. 41 Gefrierbruchelektronenmikroskopische Aufnahmen trizellulärer Tight Junctions. Die Pfeile markieren die trizelluläre Zentralpore. Balken = 200 nm. **A** Die tTJs der Vektorkontrolle zeichneten sich durch kontinuierliche Stränge aus und dehnte sich in vertikaler Richtung aus. **B** Zwischen den tTJs der Vektorkontrolle und des trizellulär TRIC-a überexprimierenden Klons TRa-4 gab es keine erkennbaren Unterschiede auf ultrastruktureller Ebene. **C** Die tTJ des Klons TRa-8 unterschied sich nicht von der Vektorkontrolle oder TRa-4.

5 Diskussion

5.1 Expressionsabhängige Lokalisation von TRIC-a

Trizelluläre Tight Junctions sind bereits vor vierzig Jahren auf ultrastruktureller Ebene als vertikal orientierte Ausdehnung dreier bizellulärer Tight Junctions, die an den Kontaktpunkten dreier Zellen aufeinanderstoßen und eine röhrenartige Struktur ausbilden, beschrieben worden (Staehein et al., 1969; Wade & Karnovsky, 1974). Obwohl es keine Möglichkeit direkter Messungen gab, wurden sie allgemein als Schwachpunkt der parazellulären Barriere angesehen und in ihnen ein Ort höherer Durchlässigkeit vermutet (Wade & Karnovsky, 1974; Walker et al., 1994).

Erst 2005 wurde ein Tight Junction-Protein entdeckt, das bevorzugt in der trizellulären Tight Junction, lokalisiert ist und deshalb die Bezeichnung Tricellulin erhielt (Ikenouchi et al., 2005). Von diesem Protein sind bisher vier humane Isoformen beschrieben worden, wobei für Mutationen der längsten, TRIC-a, berichtet wurde, dass sie zu nichtsyndromaler Taubheit (DFNB49) führen (Riazuddin et al., 2006). Aufgrund dieses sehr begrenzten Phänotyps lag die Vermutung nahe, dass TRIC-a eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des im Innenohrs vorhandenen K^+ -Potentials spielt.

Erste Versuche TRIC-a in seiner Funktion mittels RNAi zu charakterisieren führten zu Verlust der parazellulären Barrierefunktion und der Desorganisation sowohl trizellulärer als auch bizellulärer Tight Junctions (Ikenouchi et al., 2005). Dadurch konnte zwar angenommen werden, dass TRIC-a eine wichtige Funktion beim Aufbau der Tight Junction und der damit einhergehenden parazellulären Barriere besitzt, jedoch konnte keine Aussage darüber gemacht werden, welche funktionellen Eigenschaften TRIC-a in der Barriere selbst hat, da diese nicht mehr vorhanden war.

In dieser Arbeit wurde der entgegengesetzte Weg zur Charakterisierung von TRIC-a gewählt. TRIC-a wurde in einem epithelialen Zellkulturmodell überexprimiert, das Tricellulin zwar bereits endogen, aber im Vergleich mit anderen Zelllinien schwach, exprimiert.

Abhängig von der Expressionsstärke wurden zwei Typen von Klonen erhalten, die sich in der Lokalisation von TRIC-a unterschieden. Klone, die TRIC-a moderat überexprimierten, wurden aufgrund der rein trizellulären Lokalisation von TRIC-a zur Charakterisierung der trizellulären Tight Junction herangezogen.

Ein Vergleich der Expression von TRIC-a zwischen den Klonen und den humanen intestinalen Zelllinien CaCo-2 und HT-29/B6 zeigte, dass nach trizellulärer Überexpression in Klon TRa-4 die Expressionsstärke mit der beider Zelllinien vergleichbar ist. Da CaCo-2 und

HT-29/B6 etablierte Zellmodelle für das humane Colonepithel sind, können die durch Klon TRa-4 erhaltenen Aussagen als Modell für die trizelluläre Tight Junction des humanen Colons herangezogen werden, während die Leervektorkontrolle ein Modell für herunterreguliertes TRIC-a darstellen könnte. Die hieraus erhaltenen Ergebnisse könnten somit auch als Modell für pathologische Zustände, bei denen TRIC-a in seiner Expression oder trizellulären Lokalisation vermindert ist, dienen.

Stark überexprimierende Klone, die neben der trizellulären auch eine starke bizelluläre Lokalisation von TRIC-a aufwiesen, wurden zur Funktionsanalyse von TRIC-a innerhalb der bizellulären Tight Junction verwendet.

5.2 Verringerung der Ionenpermeabilität bizellulärer Tight Junctions ohne Änderung der Ladungsselektivität durch TRIC-a

Bei tri- und bizellulärer Lokalisation des überexprimierten TRIC-a kam es zu einem Anstieg des transepithelialen Widerstands, während dieser bei trizellulär überexprimierenden Klonen im Vergleich zur Vektorkontrolle unverändert blieb.

Mit Hilfe der neuentwickelten Technik der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie konnte der Widerstandsanstieg in Klon TRa-8 spezifiziert werden. Während der transzelluläre Widerstand (R^{trans}) unverändert blieb und somit gleichzeitig zeigte, dass konduktive Transportproteine der apikalen und basolateralen Zellmembran nicht verändert waren, war der parazelluläre Widerstand (R^{para}), der durch die Barriereigenschaften der Tight Junction bestimmt wird, stark erhöht. Da andere Tight Junction-Proteine im Klon TRa-8 in ihrer Expression unverändert waren, konnte der beobachtete Widerstandsanstieg auf die Anwesenheit von TRIC-a zurückgeführt werden. Somit konnte die Vermutung, dass TRIC-a eine abdichtende Funktion hat, bestätigt werden.

Zur Beschreibung dieser Barriere wurden zunächst Dilutionspotentiale und bionische Potentialmessungen durchgeführt, um die Beeinflussung verschiedener Ionen zu untersuchen.

Die Dilutionspotentialmessungen zeigten eine Permeabilitätsminderung für Na^+ und Cl^- in den bizellulär überexprimierenden Klonen, während trizellulär überexprimierende Klone unveränderte Permeabilitäten aufwiesen. Da jedoch bei allen drei Gruppen das Verhältnis der Na^+ - zur Cl^- -Permeabilität unverändert blieb, verminderte TRIC-a die Durchlässigkeit nicht ladungsselektiv.

In Lösungen sind Ionen von Hydrathüllen solvatisiert, wobei die umgebenden Wassermoleküle entsprechend der Ionenladung orientiert sind. Bindungs-, bzw. Interaktionspunkte von Poren und Kanälen werden über elektrostatische Wechselwirkungen beschrieben, bei denen die Hydrathülle auch teilweise oder völlig entfernt wird. Diese Interaktionen können über die Bestimmung der Eisenman- und Sherry-Sequenzen genauer analysiert werden (Eisenman, 1962; Diamond & Wright, 1962). Diese Sequenzen aus Permeabilitätsreihenungen der Ionen sind so angeordnet, dass niedrige Sequenznummern für bevorzugte Interaktion über die Hydrathülle stehen, während mit steigenden Sequenznummern die Interaktion über den Ionenradius zunimmt.

Die Permeabilität für alle gemessenen Ionen war durch die bizelluläre TRIC-a-Überexpression vermindert, doch zeigten sich nur kleine Änderungen der Eisenman- und Sherry-Sequenzen. Diese deuteten auf eine leicht verminderte Interaktion über die Hydrathülle hin. Das bedeutet, dass TRIC-a nur wenig Einfluss auf die parazelluläre Selektivität von Ionen hat.

Da weder die Expression aller anderen untersuchten Tight Junction-Proteine noch Transzytose- oder Apoptoseraten durch TRIC-a verändert waren, wurde eine mechanistische Erklärung für die beobachtete Veränderung der Barriere auf ultrastruktureller Ebene gesucht.

5.3 Reduktion des Auftretens von Strangdiskontinuitäten innerhalb der bizellulären Tight Junction nach TRIC-a-Überexpression

In RNAi-Experimenten führte der Verlust von TRIC-a zu einer instabilen Ultrastruktur der Tight Junction, wodurch der junktionale Komplex letztlich völlig zusammenbrach (Ikenouchi et al., 2005). Die Überexpression von TRIC-a in der bizellulären Tight Junction führte zu einem gegenteiligen Effekt. Im Vergleich zu Vektorkontrolle blieben die Netzwerktiefe sowie die Strangzahl unverändert, während die Häufigkeit von Strangbrüchen >20 nm vermindert war und die partikelartigen Strangstrukturen nahezu vollständig in kontinuierliche Tight Junction-Stränge umgewandelt wurden.

Dass hierin die durch TRIC-a verstärkte parazelluläre Barriere durchaus begründet sein könnte, zeigt sich an einem klinischen Beispiel. Im Colon von Morbus Crohn-Patienten nahm die Expression von Claudin-2 stark zu, wodurch es einerseits zur Widerstandabnahme und andererseits auf ultrastruktureller Ebene zum gehäuften Auftreten von Strangbrüchen und partikelartigen Strangstrukturen kam (Zeissig et al., 2007). Hierbei war allerdings nicht klar,

ob diese Abnahme der Stranglinearität Ursache oder nur Begleitphänomen einer allein durch die Kanaleigenschaften von Claudin-2 verursachten Barrierestörung war.

Das Auftreten von Strangdiskontinuitäten wurde auf die Ab- bzw. Anwesenheit von Claudin-2 zurückgeführt (Furuse et al., 1999), allerdings wurde nicht genau zwischen Strangbrüchen und dem Auftreten von partikelartigen Strängen unterschieden. Die in der vorliegenden Studie beobachteten ultrastrukturellen Veränderungen sind jedenfalls nicht durch Claudin-2 verursacht, da hierbei die Expression von Claudin-2 nicht vermindert war.

Eine quantitative Betrachtung ergibt, dass Strangbrüche >20 nm vermutlich keinen wesentlichen Einfluss auf die parazelluläre Permeabilität haben.

So wird zwar durch vereinzelte Strangbrüche die Zahl der Netzwerkmaschen um eine Masche reduziert (z.B. von 4 auf 3), dies führt jedoch nicht zur Öffnung eines kompletten vertikalen Durchtrittswegs. Demzufolge kann die Verminderung von vorher bereits selten auftretenden Strangbrüchen als Ursache für die Permeabilitätsminderung nahezu ausgeschlossen werden.

TRIC-a induziert bei bizellulärer Überexpression eine linear-kontinuierliche Strangstruktur, die sich auf die Gesamtheit des bizellulären Tight Junction-Netzwerks auswirkt. Eine Verminderung der Permeabilität könnte sich eventuell durch diese, nicht nur auf einzelne Stränge begrenzte Veränderung erklären. Allerdings ist bisher nicht bekannt, ob die Stranglinearität einen direkten Zusammenhang zur Durchlässigkeit besitzt oder eher eine Änderung der Proteinausstattung der Tight Junction anzeigt. Obwohl es bereits erste Untersuchungen zur homophilen Interaktion einzelner Claudine gibt (Yu et al., 2009; Piontek et al., 2008), ist die molekulare Basis der Strangausbildung bisher nicht bekannt.

Nach Abwägung aller Möglichkeiten wird daher die Schlussfolgerung gezogen, dass die durch TRIC-a induzierte generelle Steigerung der bizellulären Stranglinearität als Ursache für die in bizelluläre Permeabilitätsabnahme für Ionen und größere Solute am wahrscheinlichsten ist.

5.4 Beteiligung der trizellulären Zentralpore an der Gesamtleitfähigkeit

Der Befund, dass bei trizellulärer Überexpression von TRIC-a die Permeabilität für Makromoleküle stark reduziert wird, während sie für mittelgroße Solute und Ionen unverändert bleibt, erscheint zunächst widersprüchlich. Schätzt man jedoch die Leitfähigkeit der trizellulären Tight Junction ab und berücksichtigt ihre Auftrittshäufigkeit, so lässt sich dies durchaus erklären.

Die morphometrischen Parameter fluoreszenzgefärbter MDCK II-Zellen wurden zur Berechnung des trizellulären Einflusses unter Verwendung des MBF-Partikelanalyse-Plugins des Programms ImageJ bestimmt. Auf einer analysierten Zellfläche von $51.200 \mu\text{m}^2$ befanden sich 515 Zellen, was eine durchschnittliche Zelloberfläche von ca. $100 \mu\text{m}^2$ und einer Zelldichte von 10^6 Zellen/ cm^2 bedeutet. Die ermittelte Gesamtlänge der Tight Junctions auf der analysierten Zellfläche betrug $10.550 \mu\text{m}$. Hieraus ergibt sich eine Länge der bizellulären Tight Junctions von $20,6 \text{ m}/\text{cm}^2$. Pro Zelle ergibt sich unter Berücksichtigung, dass sich zwei benachbarte Zellen je eine bizelluläre Tight Junction teilen, somit eine Tight Junctionlänge von $41 \mu\text{m}$.

Innerhalb der analysierten Fläche wurden 820 trizelluläre Tight Junctions ($1,6 \cdot 10^6 / \text{cm}^2$) gezählt. Da sich drei Zellen einen trizellulären Kontakt teilen, ergibt sich eine Zahl von 4,8 trizellulären Kontakten pro Zelle.

Um die Leitfähigkeit trizellulärer Tight Junctions abzuschätzen, wurden Berechnungen für ein minimales und ein maximales Limit dieser angestellt.

Um die minimale Leitfähigkeit zu errechnen, wurden bereits verfügbare Daten für die kleine, mit Ionen interagierende Claudin-2-Pore zur Hilfe genommen (Yu et al., 2009). Die Claudin-2-Pore wurde mit einer Länge von $3,2 \text{ nm}$ und einem Durchmesser von $0,75 \text{ nm}$ angegeben. Mittels Brownscher Dynamiksimulation wurde ihre Leitfähigkeit auf 70 bis 100 pS bestimmt.

Unter der Annahme, dass eine zylinderartige trizelluläre Pore aus Einheiten, die diese Dimensionen und Leitfähigkeiten besitzen, besteht, benötigte man 178 parallel angeordnete Einheiten für die Kreisfläche dieser Pore. Diese müssten dann noch 313 -mal in Serie für die Porenlänge geschaltet sein.

Da sich parallele Leitfähigkeiten aufsummieren, während es in Serie die Widerstände tun, ergibt sich unter Verwendung der Leitfähigkeiten für Claudin-2, eine minimale Leitfähigkeit der trizellulären Pore zwischen 40 und 60 pS :

$$G_{TJ} = \frac{177}{\left(\frac{313}{G_{Clon-2}} \right)}$$

Die Annahme der maximal möglichen Leitfähigkeit setzt voraus, dass sich Ionen wie in einer freien Lösung unbeeinflusst durch die trizelluläre Pore bewegen können. Aufgrund der Dimensionen der trizellulären Zentralpore ist dies wahrscheinlich näher an der realen Leitfähigkeit als die minimale Abschätzung über Claudin-2.

Die spezifische Leitfähigkeit der Badlösung, die in den Ussing-Kammerversuchen verwendet wurde, beträgt 18,6 mS/cm (= mS·cm/cm²). Ausgehend von den Dimensionen der trizellulären Pore, die aus den Gefrierbruchanalysen erhalten wurden, errechnet sich dementsprechend eine Einzelporenleitfähigkeit von 146 pS:

$$G_{tj} = \frac{\pi \cdot 25 \text{ nm}^2 \cdot 1.862 \cdot 10^{-9} \text{ pS}}{1000 \text{ nm} \cdot 10^{-12} \text{ nm}}$$

Diese Ober- und Untergrenzen der Leitfähigkeit einer trizellulären Pore ergeben unter Verwendung der trizellulären Porendichte mit $1,6 \cdot 10^6$ /cm², dass eine Leitfähigkeit von 60 bis 240 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$ innerhalb des MDCK II-Monolayers durch trizelluläre Tight Junctions vorliegt.

Die parazelluläre Leitfähigkeit von MDCK II-Zellen (Vektorkontrolle), über den in der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie bestimmten parazellulären Widerstand errechnet, beträgt 23 mS/cm². Berücksichtigt man nun die abgeschätzte trizelluläre Leitfähigkeit, so ergibt sich, dass diese nur in etwa 1% zur Gesamtleitfähigkeit beitragen. Das bedeutet, dass selbst wenn die Leitfähigkeit der trizellulären Pore durch TRIC-a-Überexpression auf Null herunterreguliert wäre, sich dieser Effekt nicht in der Gesamtleitfähigkeit wiedergeben ließe.

Somit lässt sich feststellen, dass TRIC-a innerhalb der trizellulären Tight Junction die Gesamtionenpermeabilität nicht messbar beeinflusst, da deren Anteil im Vergleich zum Beitrag der bizellulären Tight Junction und der Zellmembranen vernachlässigbar gering ist.

5.5 Die trizelluläre Zentralpore als Durchtrittsstelle für Makromoleküle

Die für die trizelluläre Zentralpore abgeschätzte maximale Leitfähigkeit mit 146 pS ist mit denen großer Membrankanäle, z.B. der des Maxi-K⁺-Kanals, vergleichbar. Derartige Kanäle erlauben jedoch keinen Durchtritt von Makromolekülen. Die Erklärung für diese Diskrepanz ist, dass die trizelluläre Zentralpore zwar eine vergleichbare Leitfähigkeit besitzt, diese aber durch eine andere räumliche Struktur zustande kommt. Sie ist erheblich länger als jeder Membrankanal, besitzt aber auch einen erheblich größeren Radius. Der Vergleich des Stoke'schen Radius von 10 kDa-Dextran mit 2,3 nm mit dem angenommenen Radius von 5 nm der trizellulären Zentralpore (Staehein et al., 1973) zeigt, dass ein Molekül dieser

Größe leicht die trizelluläre Tight Junction passieren kann und wahrscheinlich dabei nicht viel stärker in seiner Bewegung beeinflusst wird als Ionen.

Insgesamt wird geschlussfolgert, dass bei geringer TRIC-a-Expression Makromoleküle epitheliale Schichten hauptsächlich über die trizelluläre Zentralpore durchqueren. Wenn man die eingangs erwähnten TRIC-a-Expressionsstärken des tTJ-Klons TRa-4 mit denen in den epithelialen Colonzelllinien HT-29/B6 und T84 vergleicht, so kann man TRa-4 als Modell für deren TRIC-a-Level betrachten, während die Leervektorkontrolle eine geringe TRIC-a-Expression darstellt. Diese kann folglich modellhaft bisher noch nicht beschriebene pathologische Reduktionen von TRIC-a widerspiegeln.

Da keine sichtbare Veränderung der Ultrastruktur der trizellulären Tight Junction bei Überexpression von TRIC-a beobachtet wurde, kann noch keine Aussage darüber gemacht werden, wie TRIC-a die trizelluläre Tight Junction in ihren Permeabilitätseigenschaften genau modifiziert. Auch hier könnte, ähnlich wie in der bizellulären Tight Junction beobachtet, die Integrität der Stränge stabilisiert worden sein, indem TRIC-a für kontinuierlich-lineare Stränge sorgt. Da aber bereits endogenes canines Tricellulin in der trizellulären Tight Junction vorliegt, wäre der Effekt auf ultrastruktureller Ebene nicht auflösbar. Bereits in Vektorkontrollen sind alle trizellulären Tight Junctions aus kontinuierlichen Strängen aufgebaut.

Zudem konnten auch die Dimensionen der trizellulären Zentralpore bisher nur grob angegeben werden. Dabei wurden aber schmalere Bereiche innerhalb der trizellulären Zentralpore bereits von Staehelin (1973) postuliert, so dass spekuliert werden kann, dass TRIC-a derart in den Strängen lokalisiert ist, dass sich der Durchmesser dieser Punkte verringert und dadurch den Makromoleküldurchtritt beeinflusst.

Zur direkten Beobachtung des makromolekularen Durchtritts der Tight Junction wurde erstmals versucht, diesen mittels Fluorescence Live Cell Imaging unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Dextrane zu visualisieren. Die Technik befindet sich noch in der Entwicklung und hat bisher eine für diesen Zweck gerade noch ausreichende Auflösung. Trotzdem konnte in Vektorkontrollen der Durchtritt von 3 kDa-Dextran über die parazelluläre Barriere eindeutig beobachtet werden. Dieser trat verstärkt an trizellulären Tight Junctions auf, wurde aber auch an bizellulären Tight Junctions beobachtet. Somit konnte der Durchtritt von 3 kDa-FITC-Dextran über den parazellulären Weg und darüber hinaus über die trizelluläre Tight Junction bestätigt werden.

5.6 Zwei Komponenten machen die parazelluläre Barriere aus

Für Tight Junctions ist bekannt, dass sie aufgrund ihres Claudin-Expressionsprofils, die Passage von Ionen spezifisch beeinflussen können. Gleichzeitig wurde für die Tight Junction aber auch eine größenabhängige Selektivität beobachtet, die einen Bereich von ca. 4 bis 40 Å abdeckt (Diamond, 1978). Der molekulare Hintergrund hierfür war lange Zeit unbekannt und wurde bisher unter der Annahme diskutiert, dass sich die physikalische Barriere für Ionen und andere Solute unterscheidet, da selbst bei hohen Widerständen größere Solute die Tight Junction passieren können.

Ein hierzu angenommenes Modell zur Beschreibung der parazellulären Barriere für ungeladene Solute beschreibt diese als aus zwei Komponenten bestehend, die nicht nur unterschiedlich, sondern auch unabhängig voneinander sind (Watson et al., 2001; Van Itallie et al., 2004, Van Itallie et al., 2008). Aus Fluxmessungen von PEG-Gemischen eines weiten Größenspektrums wurden einerseits häufige, größenlimitierte „kleine Poren“ mit einem Radius von ungefähr 0,4 nm, und andererseits größenunabhängige „große Poren“, die den Transport größerer Solute erlauben, postuliert. Hierbei wurde angenommen, dass sich die Permeabilität für kleine Solute proportional zu Porenanzahl und dem Expressionsprofil der Tight Junction-Proteine verhält.

Eine vertiefende Betrachtung dieses Modells (Anderson et al., 2004) beschreibt die Ionenleitfähigkeit als durch die Summe der Claudinselektivität innerhalb aller Stränge, wobei sie innerhalb kurzer Zeit über die elektrische Leitfähigkeit bestimmt werden kann. Der Flux von Soluten dagegen wurde als über reversibel und zufällig auftretende Strangbrüche innerhalb einzelner Tight Junction-Stränge erfolgend angenommen. Die Passage erfolge dadurch schrittweise und vergleichsweise langsam, da größere Solute erst nach Auftreten von Unterbrechungen im nachfolgenden Strang diesen passieren könnten.

Mit Hilfe dieses Modells wurde versucht zu erklären, warum selbst bei dichten Epithelien mit hohen elektrischen Widerständen immer noch die Passage von großen ungeladenen Soluten auftreten kann.

Die Befunde der vorliegenden Arbeit ermöglichen erstmals eine Lokalisation der postulierten Poren und stützen dadurch zum Teil dieses Modell. Die „kleinen Poren“ sind integraler Bestandteil der bizellulären Tight Junction und regulieren aufgrund ihrer Häufigkeit ungefähr 99% der parazellulären Ionenpermeabilität. Die Durchlässigkeit für größere Moleküle ist dabei jedoch stark begrenzt.

Die größenunabhängigen „große Poren“ können durch die trizellulären Zentralporen dargestellt werden. Diese sind weit genug, um die Passage großer Substanzen zu erlauben, sind gleichzeitig aber selten genug, um nur 1% der parazellulären Ionenpermeabilität auszumachen.

TRIC-a spielt dabei eine regulierende und abdichtende Rolle für beide Wege des Modells. Expressionen oberhalb des endogenen Levels dichten beide Wege je nach Lokalisation in der tri- oder bizellulären Tight Junction ab.

Somit konnte nicht nur TRIC-a in seinen Eigenschaften charakterisiert werden, sondern auch die trizelluläre Tight Junction als Ort der bisher nur postulierten „großen Poren“ für den Durchtritt ungeladener größerer Solute charakterisiert werden.

5.7 Ausblick

Neben der Aufklärung der Funktion von TRIC-a konnte die trizelluläre Zentralpore als Ort des Makromoleküldurchtritts identifiziert werden. Hieraus ergeben sich völlig neue Ansätze für die weitere Tight Junction-Forschung, da der trizellulären Tight Junction nun eine weitaus wichtigere Rolle innerhalb der Tight Junction zugeordnet werden kann. Lange galt sie als Schwachpunkt des Tight Junction-Netzwerks, doch zeigen die Untersuchungen der Überexpression von TRIC-a, dass dieser Bereich durchaus abgedichtet sein kann und anscheinend eine Regulation der Passage größerer Solute an dieser Stelle erfolgt.

Von Interesse ist dabei neben der allgemeinen Untersuchung des Makromoleküldurchtritts an der trizellulären Tight Junction das Verständnis dieser Regulation. Hierbei könnten die anderen für Tricellulin beschriebenen Isoformen spezifische Funktionen besitzen, so dass eine Charakterisierung dieser ebenfalls erstrebenswert wäre.

Auch die Interaktion mit anderen Tight Junction-Proteinen, bzw. den Gerüstproteinen, könnte hier eine wichtige Rolle spielen.

Als klinische Manifestation von TRIC-a-Mutationen ist bisher nur das Auftreten nichtsyndromaler Taubheit (DFNB49) bekannt (Riazuddin et al., 2006; Chishti et al., 2008). Im Innenohr wird ein starker K^+ -Gradient benötigt, ein Zusammenbruch dessen führt zu Hörverlust. TRIC-a scheint zur Aufrechterhaltung dieses Gradienten eine wichtige Rolle zu spielen (Riazuddin et al., 2006). Dies ist kein Widerspruch zu unserem Befund einer anteiligen trizellulären Ionenpermeabilität von lediglich ~1%, da sich dieser Wert auf ein

leckes Epithel bezieht, die betroffenen Innenohrstrukturen jedoch sehr dichte Epithelien darstellen, für die der trizelluläre Anteil somit bedeutsam ist.

Dieser stark begrenzte Phänotyp ist, wenn man bedenkt, dass Tricellulin in den meisten epithelialen Geweben exprimiert wird, eigentlich überraschend. Eine Erklärung könnte darin bestehen, dass in anderen Organen das Fehlen von funktionellem TRIC-a kompensierbar zu sein scheint. Ob hierbei andere Tricellulin-Isoformen die Funktion von TRIC-a ersetzen, ist nicht bekannt, könnte aber vermutet werden. Auch gibt es Hinweise dafür, dass Occludin hier eine Rolle spielen könnte. Dies lässt sich im Umkehrschluss aus dem Befund ableiten, dass ein Fehlen von Occludin in der bizellulären Tight Junction eine Ausbreitung von Tricellulin verursachte und vermutet wurde, dass Tricellulin die Funktion von Occludin einnehmen könne (Ikenouchi et al., 2008).

Die trizelluläre Tight Junction und ihr Hauptprotein Tricellulin tragen entscheidend zur epithelialen Barrierefunktion für Makromoleküle bei. Zukünftige Fragestellungen zielen im Grundlagenbereich auf die weitere Aufklärung der Funktionsmechanismen von Tricellulin und seinen Varianten und im klinischen Bereich auf die Erforschung der Rolle von Tricellulin bei pathologischen Zuständen mit gestörter Permeabilität ab.

Die Interaktion von Tricellulin mit anderen Tight Junction-Proteinen und auch sich selbst könnte nicht nur in diesem Fall, sondern auch bei anderen pathologischen Situationen von Bedeutung sein.

Folglich könnten die trizelluläre Tight Junction und Tricellulin in allen seinen Varianten wichtige Funktionen innerhalb der Epi- und Endothelfunktion an sich und auch in pathologischer Situation einnehmen und somit zukünftig wichtige Untersuchungsgegenstände sein.

6 Zusammenfassung

Barriere- und Permeabilitätseigenschaften von Epithelien werden durch die Tight Junction (TJ) bestimmt. Hinsichtlich ihrer Lokalisation können zwei Arten unterschieden werden, die bizelluläre Tight Junction (bTJ) an den Zell-Zell-Kontakten zweier benachbarter Epithelzellen und die eine Zentralpore ausbildende trizelluläre Tight Junction (tTJ) an den Kontaktstellen dreier Zellen.

Tricellulin ist ein kürzlich entdecktes TJ-Protein, das in vielen Epithelien nachweisbar und vorwiegend in der tTJ lokalisiert ist. Für die längste Isoform, Tricellulin-a (TRIC-a), wurde bisher eine TJ-stabilisierende Rolle vermutet, doch war seine genaue Funktion bisher unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Barrierefunktion von TRIC-a in Abhängigkeit von seiner Lokalisation für Solute unterschiedlicher Größe charakterisiert. Hierzu wurde es kloniert und stabil in Nierentubuluszellen (MDCK II) überexprimiert, und zwar entweder (A) in der bTJ und der tTJ, oder (B) nur in der tTJ. Der Vergleich erfolgte mit Vektorkontrollen, die bei diesem Zelltyp eine nur geringe genuine TRIC-a-Expression aufwiesen.

Zeitgleich war im Rahmen dieser Dissertation eine neue Messmethode entwickelt worden, die Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie, mit der der trans- und parazelluläre Widerstand an epithelialen Zelllinien gemessen werden kann. Die Methode wurde durch experimentelle Bestimmung der Bereiche und Limitationen ihrer Anwendbarkeit validiert.

(A) Überexpression von TRIC-a in der tTJ und der bTJ führte zu einer 3-fachen Zunahme des transepithelialen Widerstands. Mittels Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie konnte spezifiziert werden, dass dies durch eine 14-fache Zunahme des parazellulären, also TJ-bestimmten Widerstands bei unverändertem transzellulärem Widerstand verursacht wurde. Die Widerstandszunahme basierte auf einer gleichstarken Abnahme der Permeabilität für Kationen und Anionen. Zugleich kam es zu einer Permeabilitätsabnahme für Solute bis zu 10 kDa. Die Permeabilität für noch größere Solute war minimal und nicht signifikant verändert. Ultrastrukturell zeigte sich als einzige Veränderung der bTJ eine Zunahme der Stranglinearität, während die Ultrastruktur der tTJ unverändert war.

(B) Überexpression von TRIC-a nur in der tTJ führte zu keiner Veränderung der Permeabilität für Ionen oder kleinere Solute. Im Gegensatz hierzu kam es für Makromoleküle zwischen 4 und 10 kDa zu einer starken Permeabilitätsabnahme. Dieser zunächst paradox

erscheinende Befund ließ sich damit erklären, dass die trizelluläre Zentralpore weit genug für die Passage von Makromolekülen ist, aber im Vergleich zur bTJ zu selten ist, um einen messbaren Einfluss auf die Ionenleitfähigkeit zu haben. Die Ultrastruktur von bTJ und tTJ war in keinem Parameter verändert.

Zusammenfassend ergeben sich drei Aspekte aus den Resultaten dieser Arbeit: Zum einen ergibt sich eine neue Betrachtungsweise des bisher nicht experimentell erklärbaren Phänomens, dass die Permeabilitäten für Ionen und für Makromoleküle in Epithelien unabhängig voneinander variieren können. Zum anderen zeigt sich, dass die tTJ bei niedriger TRIC-a-Expressionsrate einen potentiell bedeutenden Weg für die Makromolekülpassage darstellt und sich insofern funktionell klar von der bTJ abgrenzt. Schließlich konnte gezeigt werden, dass TRIC-a ein funktionell entscheidender Bestandteil der tTJ für die Abdichtung gegenüber Makromolekülen ist.

7 Summary

Epithelial barrier and permeability properties are maintained by the tight junction (TJ). Dependent on their localization, two different types of TJ can be distinguished: the bicellular tight junction (bTJ) at cell-cell contacts of neighboring cells and the tricellular tight junction (tTJ) at the meeting point of three cells, leading three pairs of bTJs to form a central tube. Tricellulin is a recently discovered TJ protein, which is expressed in many epithelia and is predominantly localized within the tTJ. Its longest isoform, tricellulin-a (TRIC-a) was supposed to have a stabilizing role for the TJ, but its exact function was not known yet.

In the present study the barrier function of TRIC-a dependent on its localization was characterized for solutes of different sizes. For this, TRIC-a was cloned and stably overexpressed in the kidney tubule cell line MDCK II, either in (A) bTJs and tTJs or in (B) only in tTJs. The resulting clones were compared with cells transfected with the empty vector, which represented a tissue exhibiting low endogenous TRIC-a expression.

In parallel, this study introduces a new method, the *two-path impedance spectroscopy*, which allows differentiation between paracellular and transcellular resistances of epithelial cell lines. This method was validated in respect to its range of application and limitations in its use.

(A) Overexpression of TRIC-a within bTJs and tTJs resulted in a threefold increase of the transepithelial resistance. Two-path impedance spectroscopy revealed this increase to be a result of a 14-fold increase of the paracellular resistance, which is maintained by the TJ, while the transcellular resistance remained unchanged. The increase of resistance was matched by a permeability decrease for cations and anions. At the same time, permeabilities for solutes with sizes up to 10 kDa were reduced. For even larger molecules permeabilities were minimal and not significantly different to those of controls. On ultrastructural level the only change was an increased strand linearity of bTJs, while the tTJ was unchanged.

(B) Overexpression of TRIC-a restricted to the tTJ did neither change permeabilities for ions nor for smaller solutes. In contrast, a strong decrease of permeability for macromolecules in a range of 4 to 10 kDa occurred. This paradox was explained by properties of the tTJ central tube which is wide enough for passage of macromolecules, but compared to bTJs is too rare

to contribute significantly to ion permeability. Here, the ultrastructure of both, bTJ and tTJ, remained unchanged.

In conclusion, the results of this study lead to three major ideas. First, a new view of the so far not explained experimental phenomenon that epithelial permeabilities for ions and for macromolecules may vary independently from each other is presented. Second, the tTJ central tube at low TRIC-a expression rate may represent a significant way for macromolecular passage and so far is clearly functional different from bTJs. Finally, it has been shown that TRIC-a is a crucial component of the tTJ barrier against macromolecular passage.

8 Literaturverzeichnis

- Amasheh, S., Meiri, N., Gitter, A.H., Schöneberg, T., Mankertz, J., Schulzke, J.D., and Fromm, M. (2002). Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J. Cell Sci.* *115*, 4969–4976.
- Amasheh, S., Schmidt, T., Mahn, M., Florian, P., Mankertz, J., Tavalali, S., Gitter, A.H., Schulzke, J.D., and Fromm, M. (2005). Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell Tissue Res.* *321*, 89–96.
- Anderson, J.M., Van Itallie, C.M., and Fanning, A.S. (2004). Setting up a selective barrier at the apical junction complex. *Curr Opin Cell Biol.* *16*, 140–145.
- Berginc, K., Zakelj, S., Levstik, L., Ursic, D., and Kristl, A. (2007). Fluorescein transport properties across artificial lipid membranes, Caco-2 cell monolayers and rat jejunum. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* *66*, 281–285.
- Beyenbach, K.W. (2003). Regulation of tight junction permeability with switch-like speed. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* *12*, 543–550.
- Chishti, M.S., Bhatti, A., Tamim, S., Lee, K., McDonald, M.L., Leal, S.M., and Ahmad, W. (2008). Splice-site mutations in the TRIC gene underlie autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment in Pakistani families. *J. Hum. Genet.* *53*, 101–105.
- Citi, S., and Cordenosi, M. (1998). Tight junction proteins. *Biochim. Biophys. Acta* *1448*, 1–11.
- Clausen, C., Lewis, S.A., and Diamond, J. M. (1979). Impedance analysis of a tight epithelium using a distributed resistance model. *Biophys. J.* *26*, 291–318.
- Colegio, O.R., Van Itallie, C.M., McCrea, H.J., Rahner, C., and Anderson, J.M. (2002). Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *283*, C142–C147.
- Denker, B.M., Nigam, S.K. (1998). Molecular structure and assembly of the tight junction. *Am. Phys. Society F1-F9*.
- Diamond, J.M., and Wright, E.M. (1969). Biological membranes: The physical basis of ion and nonelectrolyte selectivity. *Annu. Rev. Physiol.* *31*: 581–656.
- Diamond, J.M. (1977). Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence. *Physiologist* *20*, 10–18.
- Diamond, J.M. (1978). Channels in epithelial cell membranes and junctions. *Fed. Proc.* *37*, 2639-2644

- Ebnet, K., Schulz, C.U., Meyer, Zu Brickwedde M.K., Pendl, G.G., and Vestweber, D. (2000). Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. *J. Biol. Chem.* *275*(36), 27979–27988.
- Ebnet, K., Suzuki, A., Ohno, S., and Vestweber, D. (2004). Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J. Cell Sci.* *117*, 19–29.
- Eisenman, G. (1962). Cation selective glass electrodes and their mode of operation. *Biophys. J.* *2*, 259–323.
- Fromm, M. (2007). Transport in Membranen und Epithelien, In: *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Schmidt, R.F., Lang, F. (Hrsg.), 30. Auflage, Kap. 3, S. 41–54 und 971–973. Springer Medizin, Heidelberg
- Fromm, M., Palant, C.E., Bentzel, C.J., and Hegel, U. (1985). Protamine reversibly decreases paracellular cation permeability in *Necturus gallbladder*. *J. Membr. Biol.* *87*, 141–150.
- Frömter, E., and Diamond, J. (1972). Route of passive ion permeation in epithelia. *Nat. New Biol.* *235*, 9–13.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* *123*, 1777–1788.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.* *141*, 1539–1550.
- Furuse, M., Sasaki, H., and Tsukita, S. (1999). Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J. Cell Biol.* *147*, 891–903.
- Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., and 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*, 236–272.
- Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A., and 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.
- Gekle, M., Wunsch, S., Oberleithner, H., and Silbernagl, S. (1994). Characterization of two MDCK-cell subtypes as a model system to study principal cell and intercalated cell properties. *Pflügers Arch.* *428*, 157–162.
- Gitter, A.H., Bertog, M., Schulzke, J.D., and Fromm, M. (1997). Measurement of paracellular epithelial conductivity by conductance scanning. *Pflügers Arch.* *434*, 830–840.

- Gitter, A.H., Schulzke, J. D., Sorgenfrei, D., and Fromm, M. (1997). Ussing chamber for high-frequency transmural impedance analysis of epithelial tissues. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **35**, 81–88.
- González-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., and Jaramillo, B.E. (2003). Tight Junction Proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **81**, 1–44.
- Günzel, D., Stuiver, M., Kausalya, P.J., Haisch, L., Rosenthal, R., Krug, S.M., Meij, I.C., Hunziker, W., Fromm, M., and Müller, D. (2009a). Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms which exhibit distinct localization and function. *J. Cell Sci.* **122**, 1507–1517.
- Günzel, D., Amasheh, S., Pfaffenbach, S., Richter, J.F., Kausalya, P.J., Hunziker, W., and Fromm, M. (2009b). Claudin-16 affects transcellular Cl⁻ secretion in MDCK cells. *J. Physiol.* **587**, 3777–3793.
- Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J.F., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A.H., Bürgel, N., Fromm, M., Zeitz, M., Fuss, I., Strober, W., and 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**, 550–564.
- Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S., and Tsukita, S. (2005). Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J. Cell Biol.* **171**, 939–945.
- Ikenouchi, J., Sasaki, H., Tsukita, S., Furuse, M., and Tsukita, S. (2008). Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. *Mol. Biol. Cell* **19**, 4687–4693.
- Kausalya, P.J., Amasheh, S., Günzel, D., Wurps, H., Müller, D., Fromm, M., and Hunziker, W. (2006). Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg transport function of claudin-16. *J. Clin. Invest.* **116**, 878–891.
- Kiuchi-Saishin, Y., Gotoh, S., Furuse, M., Takasuga, A., Tano, Y., and Tsukita, S. (2002). Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**, 875–886.
- Konishi, Y., Hagiwara, K., and Shimizu, M. (2002). Transepithelial transport of fluorescein in Caco-2 cell monolayers and use of such transport in in vitro evaluation of phenolic acid availability. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 2449–2457.
- Kotra, G., and Frömter, E. (1984a). Rapid determination of intraepithelial resistance barriers by alternating current spectroscopy: experimental procedures. *Pflügers Arch.* **402**, 409–420.

- Kotra, G., and Frömter, E. (1984b). Rapid determination of intraepithelial resistance barriers by alternating current spectroscopy: test of model circuits and quantification of results. *Pflügers Arch.* 402, 421–432.
- Krause, G., Winkler, L., Mueller, S.L., Haseloff, R.F., Piontek, J., and Blasig, I.E. (2008). Structure and functions of claudins. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 631–645.
- Kreusel, K.M., Fromm, M., Schulzke, J.D., and Hegel, U. (1991). Cl⁻ secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6). *Am. J. Physiol.* 261, C574–C582.
- Krug, S.M., Amasheh, S., Richter, J.F., Milatz, S., Günzel, D., Westphal, J.K., Huber, O., Schulzke, J.D., and Fromm, M. (2009a). Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol. Biol. Cell* 20, 3713–3724.
- Krug, S.M., Fromm, M., and Günzel, D. (2009). Two-path impedance spectroscopy for measurement of paracellular and transcellular epithelial resistance. *Biophys. J.* 378 (1): 45-50.
- Kuwayama, K., Miyauchi, S., Tateoka, R., Abe, H., and Kamo, N. (2002). Fluorescein uptake by a monocarboxylic acid transporter in human intestinal Caco-2 cells. *Biochem. Pharmacol.* 63, 81–88.
- Lewis, S.A., Eaton, D.C., Clausen, C., and Diamond, J.M. (1977). Nystatin as a probe for investigating the electrical properties of a tight epithelium. *J. Gen. Physiol.* 70, 427–440.
- Li ,Y., Fanning, A.S., Anderson, J.M., and Lavie, A. (2005). Structure of the conserved cytoplasmic C-terminal domain of occludin: identification of the ZO-1 binding surface. *J Mol Biol.* 352,151–164.
- Loh, Y.H., Christoffels, A., Brenner, S., Hunziker, W., and Venkatesh, B. (2004). Extensive expansion of the claudin gene family in the teleost fish, *Fugu rubripes*. *Genome Res.* 14,1248–1257.
- Mankertz, J.*, Amasheh, M.*, Krug, S.M., Fromm, A., Hillenbrand, B., Tavalali, S., Amasheh, S., Fromm, M., and Schulzke, J.D. (2009). Tumour necrosis factor alpha up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Cell Tissue Res.* 336, 67–77. (*equally contributing)
- Markov, A.G., Veshnyakova, A., Krug, S.M., and Milatz, S. (2007). Expression of tight junction proteins in the epithelium of small intestine of the rat. *Russ. J. Physiol.* 93, 1043–1054.

- Martinez-Palomo, A., Meza, I., Beaty, G., and Cereijido, M. (1980). Experimental modulation of occluding junctions in a cultured transporting epithelium. *J. Cell Biol.* *87*, 736–745.
- Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., Simmons, D., and Dejana, E. (1998). Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J. Cell Biol.* *142*, 117–127.
- McCarthy, K.M., Skare, I.B., Stankewich, M.C., Furuse, M., Tsukita, S., Rogers, R.A., Lynch, R.D., and Schneeberger, E.E. (1996). Occludin is a functional component of the tight junction. *J. Cell Sci.* *109*, 2287–2298.
- Meier, P.C. (1982). Two parameter Debye-Hückel approximation for the evaluation of mean activity coefficients of 109 electrolytes. *Anal. Chim. Acta* *136*, 363–368.
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J. Cell Biol.* *161*, 653–660.
- Piontek, J., Winkler, L., Wolburg, H., Müller, S.L., Zuleger, N., Piehl, C., Wiesner, B., Krause, G., and Blasig, I.E. (2008). Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J.* *22*, 146–158.
- Riazuddin, S., Ahmed, Z.M., Fanning, A.S., Ramzan, K., Lagziel, A., Shaikh, R.S., Chattaraj, R.J., Morell, P., Friedman, P.L., Anderson, J.M., Belyantseva, I.A., Forge, A., Riazuddin, S., and Friedman, T.B. (2006). Tricellulin: a novel tight junction protein necessary for hearing. *Am. J. Hum. Genet.* *79*, 1040–1051.
- Richardson, J.C., Scalera, V., and Simmons, N.L. (1981). Identification of two strains of MDCK cells which resemble separate nephron tubule segments. *Biochim. Biophys. Acta* *673*, 26–36.
- Roh, M.H., and Margolis, B. (2003). Composition and function of PDZ protein complexes during cell polarization. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* *285*, F377F3387.
- Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., and Tsukita, S. (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol. Biol. Cell.* *11*, 4131–4142.
- Schifferdecker, E., and Frömter, E. (1978). The AC impedance of Necturus gallbladder epithelium. *Pflügers Arch.* *377*, 125–133.
- Schlüter, H., Moll, I., Wolburg, H., and Franke, W.W. (2007). The different structures containing tight junction proteins in epidermal and other stratified epithelial cells, including squamous cell metaplasia. *Eur. J. Cell Biol.* *86*, 645–655.

- Schneeberger, E.E., and Lynch, R.D. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **286**, C1213–C1228.
- Schulzke, J.D., Gitter, A.H., Mankertz, J., Spiegel, S., Seidler, U., Amasheh, S., Saitou, M., Tsukita, S., and Fromm, M. (2005). Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim. Biophys. Acta* **1669**, 34–42.
- Simon, D.B., Lu, Y., Choate, K.A., Velazquez, H., Al-Sabban, E., Praga, M., Casari, G., Bettinelli, A., Colussi, G., Rodriguez-Soriano, J., McCredie, D., Milford, D., Sanjad, S., and Lifton, R.P. (1999). Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg^{2+} resorption. *Science*: **285**: 103–106.
- Staehein, L.A., Mukherjee, T.M., and Williams, A.W. (1969). Freeze-etch appearance of tight junctions in the epithelium of small and large intestine of mice. *Protoplasma* **67**, 165–184.
- Staehein, L.A. 1973. Further observations of the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J. Cell Sci.* **13**: 763–786.
- Stevenson, B.R., Siliciano, J.D., Mooseker, M.S., and Goodenough, D.A. (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J. Cell Biol.* **103**, 755–766.
- Stevenson, B.R., Anderson, J.M., Goodenough, D.A., and Mooseker, M.S. (1998). Tight junction structure and ZO-1 content are identical in two strains of Madin-Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance. *J. Cell Biol.* **107**, 2401–2408.
- Stockmann, M., Gitter, A.H., Sorgenfrei, D., Fromm, M., and Schulzke, J.D. (1999). Low edge damage container insert that adjusts intestinal forceps biopsies into Ussing chamber systems. *Pflügers Arch.* **438**, 107–112.
- Tang, V.W., and Goodenough, D.A. (2003). Paracellular ion channel at the tight junction. *Biophys. J.* **84**, 1660–1673.
- Tsukita, S., and Furuse, M. (1998). Overcoming barriers in the study of tight junction functions: from occludin to claudin. *Genes to Cells* **3**, 569–573.
- Tsukita, S., Furuse, M., and Itoh, M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 285–293.
- Ussing, H.H., and Zerahn, K. (1951). Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuit isolated frog skin. *Acta Physiol. Scand.* **23**, 110–127.
- Van Itallie, C., Rahner, C., and Anderson, J.M. (2001). Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J. Clin. Invest.* **107**, 1319–1327.
- Van Itallie, C.M., and Anderson, J.M. (2004). The molecular physiology of tight junction pores. *Physiology (Bethesda)* **19**, 331–338.

- Van Itallie, C.M., Rogan, S., Yu, A., Vidal, L.S., Holmes, J., and 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, F1288–F1299.
- Van Itallie, C.M., Holmes, J., Bridges, A., Gookin, J.L., Coccaro, M.R., Proctor, W., Colegio, O.R., and Anderson, J.M. (2008). The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2. *J. Cell Sci.* 121, 298–305.
- Wade, J.B., and Karnovsky, M.J. (1974). The structure of the zonula occludens. A single fibril model based on freeze-fracture. *J. Cell Biol.* 60, 168–180.
- Walker, D.C., MacKenzie, A., Hulbert, W.C., and Hogg, J.C. (1985). A re-assessment of the tricellular region of epithelial cell tight junctions in trachea of guinea pig. *Acta. Anat.* 122, 35–38.
- Walker, D.C., MacKenzie, A., and Hosford, S. (1994). The structure of the tricellular region of endothelial tight junctions of pulmonary capillaries analyzed by freeze fracture. *Microvasc. Res.* 48, 259–281.
- Watson, C.J., Rowland, M., and Warhurst, G. (2001). Functional modeling of tight junctions in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281, C388–C397.
- Wills, N.K., Lewis, S.A., and Eaton, D.C. (1979). Active and passive properties of rabbit descending colon: a microelectrode and nystatin study. *J. Membr. Biol.* 45, 81–108.
- Yu, A.S.L., Cheng, M.H., Angelow, S., Günzel, D., Kanzawa, S.A., Schneeberger, E.E., Fromm, M., and 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, 111–127.
- Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J.F., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A.J., Zeitz, M., Fromm, M., and 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, 61–72.
- Ziera, T., Irlbacher, H., Fromm, A., Latouche, C., Krug, S.M., Fromm, M., Jaisser, F., and Borden, S.A. (2009). Cnksr3 is a direct mineralocorticoid receptor target gene and plays a key role in the regulation of the epithelial sodium channel. *FASEB J.* 23 (11): 3936-3946.

9 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AJ	Adherens Junction
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine
bTJ	bizelluläre Tight Junction, d.h. Tight Junction zwischen zwei Zellen
C	Kapazität (Einheit $\mu\text{F}/\text{cm}^2$)
c	Konzentration
Cldn	Claudin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DFNB49	Nonsyndromic deafness locus 48
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DS	Desmosom
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
et al.	et alii, und andere
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
G	Leitfähigkeit (Einheit mS/cm^2)
$\times g$	Gravitationskraft
Hz	Hertz
I	Stromstärke (Einheit A)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
I_{sc}	Kurzschlussstrom
J	Flux (Einheit $\text{nmol}/(\text{h}\cdot\text{cm}^2)$)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kHz	Kilohertz
MAGUK	Membrane-associated guanylate kinase homologues
MCS	Multiple Cloning Site
MDCK	Madin-Darby canine kidney
min	Minute

9 Abkürzungsverzeichnis

ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mv	Mikrovilli
n.s.	nicht signifikant
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
o/n	over night, über Nacht
Occl	Occludin
P	Permeabilität (Einheit cm/s ²)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction; Polymerasenkettenreaktion
PDZ	PSD-95/Discs Large/ZO-1-Domäne
PEG	Polyethylenglykol
PKC	Proteinkinase C
R	Widerstand (Einheit Ω)
RC	Resistor-Capacitor; Parallelschaltung aus Widerstand und Kondensator
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
R ^{epi}	Epithelialer Widerstand (Einheit Ω·cm ²)
R ^{para}	Parazellulärer Widerstand (Einheit Ω·cm ²)
R ^{sub}	Subepithelialer Widerstand (Einheit Ω·cm ²)
R ^t	Transepithelialer Widerstand (Einheit Ω·cm ²)
RT	Raumtemperatur oder reverse Transkription
R ^{trans}	transzellulärer Widerstand (Einheit Ω·cm ²)
S	Siemens
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
TAE	Tris-Acetate/EDTA
TBS	Tris-buffered Saline
TJ	Tight Junction
TRa-#	TRIC-a-Überexpressionsklon #

9 Abkürzungsverzeichnis

TRIC-a	humanes Tricellulin-a
tTJ	trizelluläre Tight Junction, d.h. Tight Junction zwischen drei Zellen
U	Unit oder Spannung (Einheit V)
V	Volt
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactosid
Z	Impedanz
ZO	Zonula occludens

10 Verzeichnis der eigenen Publikationen

- Krug, S.M., Amasheh, S., Richter, J.F., Milatz, S., Günzel, D., Westphal, J.K., Huber, O., Schulzke, J.D., and Fromm, M. (2009). Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol. Biol. Cell* 20, 3713–3724.
- Krug, S.M., Fromm, M., and Günzel, D. (2009). Two-path impedance spectroscopy for measurement of paracellular and transcellular epithelial resistance. *Biophys. J.* 378 (1): 45-50.
- Amasheh, S.* , Milatz, S.* , Krug, S.M., Bergs, M., Amasheh, M., Schulzke, J.D., and Fromm, M. (2009). Na⁺ absorption defends from paracellular back-leakage by claudin-8 up-regulation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 378: 45-50. (*equally contributing)
- Amasheh, S., Milatz, S., Krug, S.M., Markov, A.G., Günzel, D., Amasheh, M., and Fromm, M. (2009). Tight junction proteins as channel formers and barrier builders: claudin-2, -5, and -8. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1165: 211-219.
- Fromm, M., Krug, S.M., Zeissig, S., Richter, J.F., Rosenthal, R., Schulzke, J.D., and Günzel, D. (2009). High resolution analysis of barrier function. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1165: 74-81.
- Günzel, D., Haisch, L., Pfaffenbach, S., Krug, S.M., Milatz, S., Amasheh, S., Hunziker, W., and Müller, D. (2009). Claudin function in the thick ascending limb of Henle's loop. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1165: 152-162.
- Günzel, D., Stuver, M., Kausalya, P.J., Haisch, L., Krug, S.M., Rosenthal, R., Meij, I.C., Hunziker, W., Fromm, M., and Müller, D. (2009). Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms which exhibit distinct localization and function. *J. Cell Sci.* 122: 1507-1517.
- Mankertz, J.* , Amasheh, M.* , Krug, S.M., Fromm, A., Hillenbrand, B., Tavalali, S., Amasheh, S., Fromm, M., and Schulzke, J.D. (2009). Tumour necrosis factor alpha up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Cell Tissue Res.* 336: 67-77. (*equally contributing)
- Ziera, T., Irlbacher, H., Fromm, A., Latouche, C., Krug, S.M., Fromm, M., Jaisser, F., and Borden, S.A. (2009). Cnksr3 is a direct mineralocorticoid receptor target gene and plays a key role in the regulation of the epithelial sodium channel. *FASEB J.* 23 (11): 3936-3946.

Markov, A.G., Veshnyakova, A., Krug, S.M., and Milatz, S. (2007). Expression of tight junction proteins in the epithelium of small intestine of the rat. Russ. J. Physiol. 93: 1043-1054.

11 Lebenslauf

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