

Aus dem Institut für Klinische Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung molekularer und elektrophysiologischer
Effekte von Protamin an Nierenepithelzellen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ilya I. Christoffel

aus Salzburg

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. S. Amasheh

2. Prof. Dr. rer. nat. J. Brandner

3. Priv.-Doz. Dr. H. Rittner

Datum der Promotion: 23.06.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1. Einleitung	6
1.1. Eigenschaften von Epithelien	6
1.2. Die Tight Junction	7
1.2.1. Claudine	8
1.2.1.1. Bedeutung einzelner Claudine	9
1.2.2. TAMP	10
1.2.2.1. Occludin	10
1.2.2.2. Tricellulin	11
1.2.2.3. MarvelD3	12
1.2.3. Junctional adhesion molecules (JAM)	12
1.2.4. Zytoplasmatische Tight Junction-assoziierte Proteine	13
1.2.5. Regulation der Tight Junction	13
1.3. Protamin	14
1.3.1. Medizinische Verwendungen von Protamin	15
1.3.2. Effekte von Protamin	15
1.3.3. Effekte von Protamin an Epithelien	16
2. Fragestellung	18
3. Material und Methoden	19
3.1. Material und Geräte	19
3.1.1. Protamin und Heparin	19
3.1.2. Antikörper	19
3.1.3. Inhibitoren	20
3.1.4. Kits	20
3.1.5. Zelllinien	20
3.1.6. Chemikalien	22
3.1.7. Gebrauchslösungen	23
3.1.8. Ringerlösungen	25
3.1.9. Materialien	26
3.1.10. Geräte	26
3.1.11. Software	27
3.2. Methoden	27
3.2.1. Übersicht	27
3.2.2. Zellkultur	28
3.2.3. Ussingkammerexperimente	29
3.2.3.1. Prinzip der Ussingkammerexperimente	29

3.2.3.2. Durchführung der Ussingkammerexperimente	30
3.2.3.3. Messung von Dilutionspotentialen in der Ussingkammer.....	31
3.2.3.4. Ermittlung der Permeabilität für monovalente Kationen.....	32
3.2.3.5. Durchführung von Inhibitorenexperimenten in der Ussingkammer	33
3.2.4. Immunfluoreszenz und konfokale Laserscanningmikroskopie	34
3.2.5. SDS-PAGE und Western Blot	35
3.2.5.1. Präparation in Triton X-100-lösliche und -unlösliche Fraktionen.....	36
3.2.5.2. Phosphoblots	36
3.2.5.3. Proteinquantifizierung	37
3.2.5.4. SDS-PAGE	38
3.2.5.5. Western Blot	39
4. Ergebnisse.....	41
4.1. Elektrophysiologische Effekte von Protamin auf MDCK-Zellen	41
4.1.1. Effekte von Protamin auf Wildtypen und Vektorkontrollen.....	42
4.1.2. Effekte von Protamin auf Claudin-10a-transfizierte Zellklone	43
4.1.3. Effekte von Protamin auf Claudin-16-transfizierte Zellklone	44
4.1.4. Effekte von Protamin auf Claudin-2- und Claudin-10b-transfizierte Zellklone	45
4.1.5. Effekte von Protamin bei 4° C.....	46
4.1.6. Einfluss von Inhibitoren auf den Protamineffekt	47
4.1.6.1. Einfluss von Inhibitoren auf den Protamineffekt an MDCK C11-Zellen	47
4.1.6.2. Einfluss von Inhibitoren auf den Protamineffekt an MDCK II-Zellen.....	48
4.1.6.3. Einfluss weiterer Inhibitoren auf den Protamineffekt.....	50
4.1.7. Einfluss von Protamin auf Ionenleitfähigkeiten	51
4.2. Immunfluoreszenzfärbungen	52
4.2.1. Betrachtete Zelltypen und Proteine	52
4.2.2. Qualitative Beurteilung.....	52
4.3. Wirkung von Protamin auf die Proteinzusammensetzung von Membran und	
Tight Junction.....	55
4.3.1. Triton X-100-lösliche Fraktion	55
4.3.2. Triton X-100-unlösliche Fraktion	56
4.4. Wirkung von Protamin auf intrazelluläre Signalwege	58
5. Diskussion	60
5.1. Übersicht.....	60
5.2. Elektrophysiologische Effekte von Protamin	60
5.3. Abhängigkeit des Protamineffektes von der Claudinexpression.....	61
5.4. Strukturelle Effekte von Protamin	61
5.5. Protamin und Signaltransduktion.....	63

5.6. Duales Wirkprinzip von Protamin.....	65
5.7. Vergleich von Protamin mit Absorptionenhancern	66
6. Zusammenfassung.....	67
7. Abkürzungsverzeichnis	69
8. Abbildungsverzeichnis	72
9. Literaturverzeichnis	75
Danksagung.....	85
Erklärung	86
Lebenslauf	87
Verzeichnis der eigenen Publikationen	89

1. Einleitung

1.1. Eigenschaften von Epithelien

Diese Arbeit setzt sich mit dem Verhalten von Epithelien auseinander. Epithelien sind Zellverbände, die im Körper Grenzschichten bilden. Dabei können die Grenzen sowohl zwischen Innen und Außen, wie an der Haut, im Darm und in der Lunge, als auch zwischen „Innen und Innen“ sein, nämlich dann, wenn innerhalb des Körpers ein Abschnitt gegen den anderen abgegrenzt wird (z.B. Liquorflüssigkeit gegen Hirnparenchym, in der Bauchhöhle, am Herzbeutel und in der Brusthöhle, zwischen zirkulierendem Blut und den durchflossenen Organsystemen).

Die Grenzbildung ist jedoch nur dadurch möglich, dass die Zellen aneinanderhaften und somit geschlossene Verbände bilden und eine Trennung der einzelnen Kompartimente erfolgen kann. Das Aneinanderhaften wiederum wird von besonderen Proteinen bewerkstelligt, welche die Membranen benachbarter Zellen miteinander verbinden. Einige dieser Proteine dienen dem mechanischen Halt und bilden durch Verbindung zu intrazellulären Filamenten ein mechanisch belastbares Netzwerk (Zonula Adhaerens, engl. Adherens Junction, sowie Macula Adhaerentes bzw. Desmosomen), andere Proteine und Proteinkomplexe ermöglichen „Kommunikation“ und Stoffaustausch benachbarter Zellen untereinander (Connexone, Nexus, engl. Gap Junctions) und wieder andere sorgen (Zonula occludens, Schlussleisten, engl. Tight Junctions) dafür, dass die Grenze zwischen apikaler und basolateraler Epithelseite für Solute und Wasser mehr oder weniger (siehe unten) abgedichtet bleibt.

Grenzen dienen auch auf Zellebene vor allem der Kontrolle. Als Wächter zwischen Innen und Außen erfüllen Epithelien wichtige Aufgaben: Schutz vor Mikroorganismen, und Umweltantigenen, Minimieren von Flüssigkeitsverlusten durch Verdunstung oder Diffusion, in Niere und Darm die kontrollierte Resorption von Kohlenhydraten, Aminosäuren, Salzen und Wasser und die Regulation des inneren Milieus. Dazu sind Epithelzellen an ihren Membranen mit Ionenpumpen, Carriern, Transportern und Enzymen ausgestattet. Das Epithel des kardiovaskulären Systems, das Endothel, verhindert dass Blutbestandteile ungehindert ins Gewebe diffundieren, es reguliert den Muskeltonus der umgebenden glatten Gefäßmuskulatur und damit den Blutdruck, produziert bei Entzündungen Interleukine, zeigt Entzündungszellen durch spezielle Proteine den Ort der Entzündung an und reguliert die Gerinnungskaskade.

Histologisch erscheinen Epithelien meist als Zellrasen, oft zylindrisch in ihrer Zellform (Darm), mehrreihig und mit Kinozilien belegt im Respirationstrakt, mehrschichtig und verhornend an der Haut. Dadurch, dass Epithelien Kompartimente voneinander abtrennen entsteht eine Polarität, wobei ein Pol apikal (zur Lumenseite oder Oberfläche hin) und der

andere basolateral (nach Innen zeigend) genannt wird. Embryologisch können Epithelien von allen drei Keimblättern abstammen. So ist die Haut ektodermalen, das Epithel der Körperhöhlen (Mesothel) sowie des kardiovaskulären Systems (Endothel) mesodermalen und das Epithel des Magen-Darm-Trakts entodermalen Ursprungs.

Dass die Zellen eine stabile Schicht bilden können, liegt an ihrer Fähigkeit zu Zell-Zell-Verbindungen. Der mechanische Halt wird – wie bereits erwähnt - von Adhaerens Junctions und Desmosomen gewährleistet. Diese sind mit den intrazellulär verlaufenden Intermediärfilamenten in Kontakt. Die eigentliche Grenzbildung der Epithelien kommt jedoch durch Tight Junctions zustande. Diese durchzieht netzartig und in mehreren Strängen die Plasmamembran und verbindet die beiden sich gegenüberliegenden Nachbarmembranen. Sie regelt die Passage von gelösten Stoffen, indem sie nicht nur verschließt, sondern selektiv Kanäle bildet. Außerdem verhindert sie, dass Membranproteine aus dem basolateralen Bereich durch Lateraldiffusion nach apikal gelangen. Erst dadurch ist es sinnvoll von „Grenze“ und apikal und basolateral zu sprechen.

1.2. Die Tight Junction

Die Tight Junction ist ein Netzwerk von Proteinen der Zellmembran, die in mehreren Strängen benachbarte Zellen verbinden. Der Abschnitt des Epithels, der die Tight Junction enthält, erscheint in der Elektronenmikroskopie als Berührungsleiste benachbarter Zellmembranen (Farquhar et al., 1963). Die morphologische Struktur der Tight Junction konnte zunächst mit der Gefrierbruchtechnik nachgewiesen werden (Staehein, 1973). Es sind derzeit drei Hauptgruppen bzw. Familien von Proteinen bekannt, die als Transmembranproteine an der Tight Junction beteiligt sind: Claudine, Tight Junction-assoziierte MARVEL-Proteine (TAMP) und Junctional adhesion molecules (JAM).

Mit diesen sind noch zahlreiche andere Proteine intrazellulär auf der Zytoplasmaseite assoziiert. Zu diesen assoziierten Proteinen gehört beispielsweise das Protein ZO-1, einem 220 kDa großen Protein, dessen Nachweis zum ersten Mal den Proteincharakter der Tight Junction beweisen konnte (Stevenson et al., 1986). Wie bereits angedeutet, bestehen die beiden Hauptfunktionen der Tight Junction darin, erstens die parazelluläre Permeabilität für Ionen, weitere Solute und Wasser zu regulieren und organspezifisch zu variieren (Gate-Funktion) sowie die Polarität der Zelle in apikal und basolateral aufrechtzuerhalten, indem die Lateraldiffusion von Lipiden und Proteinen verhindert wird (Fence-Funktion; Ebnet, 2008).

1.2.1. Claudine

Claudine besitzen als größte Gruppe der Tight Junction-Proteine 24 Isoformen (Säugetiere), sie sind 20 – 27 kDa groß (Tsukita et al., 1999; Tsukita et al., 2000; Tsukita et al., 2001). Wie Occludin und Tricellulin verfügen Claudine über vier Transmembrandomänen, zwei extrazelluläre Schleifen und intrazellulär lokalisierte N- und C-Termini. Obwohl diese Strukturmerkmale Occludin und Tricellulin ähneln, gibt es keine Sequenzhomologie mit den Marvel-Proteinen (Steed et al., 2009).

In Fibroblasten sind Claudine in der Lage, selbstständig Tight Junction-Stränge auszubilden (Furuse et al., 1998). Sie bestimmen insbesondere die parazelluläre Ionen- und Wasserpermeabilität der epithelialen Barriere (van Itallie et al., 2006; Rosenthal et al., 2010). Claudine enthalten eine PDZ-Bindungsdomäne am C-terminalen Ende und können so MAGUK-Proteine wie z.B. ZO-1 binden und mit dem Zytoskelett interagieren (Itoh et al., 1999). Den beiden extrazellulären Loops der Claudine werden unterschiedliche Aufgaben zugeschrieben. Der erste Loop enthält geladene Aminosäuren. Es wird vermutet, dass hierüber die Ladungs- und Größenselektivität der parazellulären Passage gesteuert wird (Angelow et al., 2008). Der zweite extrazelluläre Loop wird für die interzelluläre Interaktion (trans-Interaktion) der Claudine verantwortlich gemacht. Diese sollen durch die dort vorherrschenden aromatischen Aminosäuren mittels hydrophober van der Waals-Kräfte zustande kommen (Piontek et al., 2008).

Für die Ausbildung der Tight Junction-Stränge sind mehrere Teilaspekte wichtig. Zum einen müssen die Claudine einer Zelle in der selben Zellmembran interagieren (cis-Interaktion). So bildet Claudin-4 in Perfluorooktansäure gelöst Komplexe, welche eine Größe von Hexameren erreichen (Mitic et al., 2003). Zum anderen müssen die Claudine an entsprechende Proteine der benachbarten Zellen gebunden werden (trans-Interaktion), wofür wie oben beschrieben der zweite extrazelluläre Loop verantwortlich gemacht wird. Außerdem können Claudine nicht nur mit der selben Isoform oligomerisieren (homophile Interaktion), sondern auch mit anderen (heterophile Interaktion). Die heterophile Interaktion ist jedoch nicht beliebig. So oligomerisiert Claudin-1 zwar mit Claudin-3, nicht jedoch mit Claudin-2, -4 oder -5 (Furuse et al., 2001; Coyne et al. 2003; Daugherty et al., 2007).

Viele Claudine besitzen ausschließlich Barrierefunktion, andere dagegen bilden parazellulär verlaufende Kanäle und bei wieder anderen ist die Funktion noch nicht endgültig geklärt (Günzel und Fromm, 2012). Ausschließlich abdichtend wirken die Claudine 1, 3, 4, 5, 8, 11, 14 und 19. Parazelluläre Kanäle mit Selektivität für Kationen werden von den Claudinen 2, 10b und 15 gebildet. Parazelluläre Kanäle mit Selektivität für Anionen werden von den Claudinen 10a und 17 gebildet (Günzel und Yu, 2012).

Somit bestimmt das Expressionsmuster von Claudinen – Durchlässigkeit versus Abdichtung – entscheidend die Gewebeeigenschaften von Organen (Furuse et al., 1999).

1.2.1.1. Bedeutung einzelner Claudine

Claudin-1 ist ein abdichtendes Claudin und kommt dementsprechend in dichten Epithelien vor (Haut, Gallenblase, Endothel der Hirnkapillaren, Innenohr). Damit spielt es für die Wasserretention des Körpers eine entscheidende Rolle. Claudin-1-Knock-out-Mäuse sterben nach der Geburt an massivem Flüssigkeitsverlust über die Haut (Furuse et al., 2002). Beim Menschen führt ein nicht funktionsfähiges Claudin-1 zum äußerst seltenen NISCH-Syndrom (neonatal ichthyosis sclerosing cholangitis syndrome), das mit Ichthyosis, vernarbender Alopezie, Kopfhauthypotrichose und sklerosierender Cholangitis einhergeht (Feldmeyer et al., 2006).

Claudin-2 dagegen bildet Kanäle für kleine Kationen und kommt in lecken Epithelien wie im proximalen Tubulus und den Krypten des Dünndarms vor (Amasheh et al., 2002). Es ist das erste und bisher einzige Tight Junction-Protein, für das gezeigt werden konnte, dass es auch als parazellulärer Wasserkanal fungiert (Rosenthal et al., 2010). Bei Entzündungen wie z.B. im Rahmen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn wird Claudin-2 durch proinflammatorische Zytokine vermehrt exprimiert (Heller et al., 2005).

Claudin-3 wird vorwiegend in dichten Epithelien exprimiert und dichtet die TJ gegenüber Anionen, Kationen und ungeladenen Soluten ab (Milatz et al., 2010). Sein zweiter extrazellulärer Loop bindet spezifisch an das Enterotoxin von *Clostridium perfringens*, einer Lecithinase mit zellmembranzerstörender Eigenschaft (Sonoda et al., 1999).

Claudin-4 hat abdichtende Effekte und kommt ebenfalls in dichten Epithelien vor, beispielsweise im Sammelrohr der Niere. Anders als Claudin-2, das in den Darmkrypten vorkommt, findet sich Claudin-4 an den Villi des Darmes (Holmes et al. 2006). In überexprimierenden Zellen sinkt die Permeabilität für Kationen sehr stark, während die Permeabilität für Anionen gleich bleibt (Van Itallie et al., 2001).

Claudin-5 ist ebenfalls ein abdichtendes Tight Junction-Protein. Neben seiner Expression im Gefäßendothel konnte u.a. auch eine abdichtende Wirkung in Darmepithel gezeigt werden (Amasheh et al., 2005).

Claudin-7 ist anders als andere Claudine im Darm eher im basolateralen Abschnitt des Epithels zu finden, wo es mit dem Zell-Zell-Adhäsionsprotein EpCAM assoziiert. Die basolaterale Lokalisation könnte ferner ein Hinweis auf eine Poolfunktion sein (Chiba et al., 2007).

Claudin-8 wird im distalen Tubulus exprimiert und hat für Kationen eine abdichtende Funktion. Induktion von Claudin-8-Expression führte zu einer Abnahme von Claudin-2 in der TJ, so dass eine komplementäre Funktion und Expression dieser beiden Claudine diskutiert wird (Yu et al., 2003). Im Colon konnte eine synergistische Regulation von Claudin-8 und der

Aldosteron-vermittelten Induktion des Epithelialen Na⁺ Kanals (ENaC) nachgewiesen werden, welche einen parazellulären Rückstrom von Na⁺ verhindert (Amasheh et al., 2009).

Claudin-10 kommt in zwei Splice-Varianten vor: Claudin-10a und Claudin-10b. Beide kommen in der Niere vor, unterscheiden sich jedoch in ihrer Ladungsselektivität. Während Claudin-10a eher Anionen passieren lässt, sind es bei Claudin-10b eher Kationen (Van Itallie et al., 2006; Günzel et al., 2009b).

Claudin-15 bildet – ähnlich wie Claudin-2 – Kanäle mit Selektivität für Kationen und spielt eine bedeutende Rolle im Dünndarmepithel (Tamura et al., 2011).

Claudin-16 findet sich im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und spielt eine Rolle beim Krankheitsbild FHHNC (familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis), einer autosomal rezessiv vererbten Krankheit mit Mutation im für Claudin-16 kodierenden Genabschnitt. Es kommt zu einem Calcium- und Magnesiumverlust (Simon et al. 1999; Kausalya et al., 2006). Es bildet aber offenbar nicht – wie ursprünglich angenommen – Kanäle für Mg²⁺ und Ca²⁺, sondern interagiert mit Cl⁻-Kanälen der apikalen Membran und mit Calcium-sensing-Rezeptoren, die dann indirekt die Reabsorption divalenter Kationen antreiben (Günzel et al., 2009a; Ikari et al., 2008).

Claudin-17 bildet Anionen-selektive Kanäle und ist hauptsächlich im proximalen Nephron lokalisiert (Krug et al., 2012b).

1.2.2. TAMP

Die im folgenden dargestellte Gruppe der Tight Junction-assozierten Marvel-Proteine (TAMP) besteht aus den drei Proteinen Occludin, Tricellulin (auch MarvelD2 genannt) und MarvelD3 (Raleigh et al., 2010).

1.2.2.1. Occludin

Occludin war das zuerst entdeckte Transmembran-Protein der Tight Junction (Furuse et al., 1993). Es durchzieht die Zellmembran viermal und besitzt zwei extrazellulären Schleifen, die mit anderen Tight Junction-Proteinen wechselwirken (Furuse et al., 1993; Tsukita et al., 1996). Sechs Spleißvarianten des Occludin wurden bisher beschrieben; insgesamt zwei enthalten eine sogenannte MARVEL-Domäne (Myelin and lymphocyte and related proteins for vesicle trafficking and membrane link). Diese ist u.a. entscheidend für die Invasion des Hepatitis C-Virus in Hepatozyten (Kohaar et al., 2010; Ploss et al., 2009).

Der C-Terminus dient der Kommunikation mit dem Zytoplasma und verbindet sich mit Proteinen, die der MAGUK-Familie (*membrane associated guanylate kinase homologues*)

angehören: ZO-1, ZO-2, ZO-3 und F-Aktin aus dem Zytoskelett (Ebnet, 2008). Anders als andere Tight Junction-Proteine kann Occludin auch direkt an das Zytoskelett binden ohne Vermittlung von Adapterproteinen (Wittchen et al., 1999). Zudem kann Occludin an seinen Serin- und Threoninresten von Proteinkinasen phosphoryliert werden, was für seine regulatorische Rolle spricht (Tsukita et al., 1998). Zwar verläuft die Differenzierung occludindefizienter embryonaler Stammzellen in polare Epithelzellen normal und Knockout-Mäuse für Occludin sind lebensfähig und ohne Störung der Barrierefunktion (Saitou et al., 1998 und 2000, Schulzke et al., 2005). Dennoch nahmen bei Überexpressionsexperimenten mit Occludin die Anzahl der Tight Junction-Stränge, deren Komplexität sowie die Breite der Tight Junction insgesamt zu (McCarthy et al., 1996). Zusammenfassend ergibt sich, dass in Occludin-Überexpressionsstudien die Barriereabdichtung erfolgte (McCarthy et al. 1996; van Itallie et al., 2010), während beim gegenteiligen Ansatz, nämlich in Occludin-Knock-Out- oder -Knock-down-Studien kein Effekt auf die Barrierefunktion auftrat (Saitou et al., 2000; Schulzke et al., 2005; van Itallie et al., 2010; Yu et al., 2005). Dies lässt vermuten, dass Occludin zwar eine abdichtende Funktion besitzt, jedoch ein Occludin-Mangel durch andere barrierebildende Tight Junction-Proteine kompensiert wird (Günzel und Fromm, 2012).

1.2.2.2. Tricellulin

Tricellulin ist mit einem Molekulargewicht von etwa 64 kDa und 4 Transmembrandomänen dem Occludin ähnlich. Wie Occludin weist auch Tricellulin 2 extrazelluläre Schleifen auf, die allerdings kleiner sind. Von Tricellulin gibt es beim Menschen zwei Spleißvarianten, Tric- α und Tric- β . Seinen Namen trägt das Protein deshalb, weil es sich dort befindet, wo drei Zellen mit ihren Membranen aufeinandertreffen. Im Ergebnis entsteht dadurch im dreidimensionalen Raum eine vertikale Röhre an den Anknüpfungspunkten dreier Epithelzellen. Bei RNA-Interferenz-Experimenten führte fehlendes Tricellulin jedoch auch zu einer Perturbation der bizellulären – also zwischen zwei Epithelzellen gebildeter - Tight Junction (Ikenouchi et al. 2005). Durch seine Lokalisation in den trizellulären Tight Junctions verfügt Tricellulin über eine Barrierefunktion für Makromoleküle (Krug et al., 2009; Krug et al., 2013). Trotz seiner ubiquitären Verteilung in den Epithelien des Organismus ist die einzige klinische Manifestation einer Mutation in diesem Gen eine nichtsyndromale Taubheit (Chiba et al., 2008).

1.2.2.3. MarvelD3

Das jüngste entdeckte Tight Junction Protein MarvelD3 weist MARVEL-Domänen auf, die typisch sind für cholesterinreiche Membranabschnitte. Da Occludin und Tricellulin ebenfalls über diese Domänen verfügen, wurde vorgeschlagen diese zu einer neuen Gruppe zusammenzufassen. Vermutlich können Occludin, Tricellulin und MarvelD3 durch redundante Funktionen ein defizientes, verwandtes Protein untereinander kompensieren (Steed et al., 2009; Raleigh et al., 2010).

1.2.3. Junctional adhesion molecules (JAM)

Junctional adhesion molecules (JAM) gehören zur Immunglobulinsuperfamilie mit zwei extrazellulären Ig-Domänen, einer Transmembrandomäne und einem intrazellulären C-Terminus (Martin-Padura et al. 1998) und sind auch in Endothelien, Leukozyten und Thrombozyten vorhanden. Die JAM-Familie hat nach Homologiekriterien zwei Untergruppen, einerseits mit JAM-A, JAM-B und JAM-C, und andererseits mit CAR (coxsackie and adenovirus receptor), ESAM (endothelial cell-selective adhesion molecule) und JAM-4 (Ebnet et al. 2000; 2004). Diese unterscheiden sich vor allem in ihrer PDZ-Domäne (PSD-95/Discs Large/ZO-1-Domäne): Erstere besitzt eine Klasse II PDZ-Domäne und bindet beispielsweise ZO-1 und PAR-3 (*partitioning defective*), Letztere eine Klasse I PDZ-Domäne und bindet beispielsweise LNX1 (Ligand-of-Numb protein X 1) (Chiba et al., 2008).

JAM haben innerhalb der Tight Junction eine Sonderstellung, da es die Entstehung von Tight Junctions fördert und reguliert, da es Adhäsion und Migration von Thrombozyten und Leukozyten am Endothel vermittelt, sowie die Bindung von Viren und Angiogenese ermöglicht (Ebnet et al. 2000 und 2004). So können JAMs mit β 1- und β 2-Integrinen sowie den JAMs anderer Zellen (Endothelien, Thrombozyten, Leukozyten) interagieren (Chiba et al., 2008). Unterschiedliche JAMs an Endothelien fördern die Transmigration unterschiedlicher Leukozyten: JAM-A kontrolliert die Transmigration von Neutrophilen, nicht jedoch von Monozyten oder Lymphozyten. Dendritische Zellen ohne JAM-A sind mobiler und migrieren entsprechend schneller in Lymphknoten (Chiba et al., 2008). Coxsackie and adenovirus receptor (CAR) dient Coxsackieviren als Angriffspunkt für die Invasion von Epithelien. Ferner verhinderte die Blockade der JAM durch Antikörper die Erholung des transepithelialen Widerstandes wie er z.B. nach Wiederauffüllen einer Calciumdepletion auftritt (Liu et al., 2000).

1.2.4. Zytoplasmatische Tight Junction-assozierte Proteine

Die membranständigen Tight Junction-Proteine interagieren mit zytoplasmatischen Proteinen. Dabei sind die Tight Junction-assozierten Proteine von Bedeutung, welche mit den Transmembranproteinen über ihre sogenannten PDZ-Domänen verbunden sind (PSD-95/Discs Large/ZO-1-Domäne). Sie bilden unterhalb der Transmembranproteine ausgedehnte Proteinkomplexe.

Es finden sich Scaffolding-Proteine und Adapterproteine (die mit dem Aktinzytoskelett verbunden sind) der MAGUK-Familie ZO-1 bis ZO-3 (Stevenson et al. 1986, Haskins et al. 1998), PAR (partitioning defective), MAGI (membrane-associated guanylate kinase with an inverted arrangement of protein-protein interaction domains) und MUPP1 (multiple pDZ domain protein 1) ferner GTPasen, G-Proteine, Phosphatasen, Kinasen, Transkriptionsfaktoren (z.B. ZONAB) und Proteine, die in die RNA-Prozessierung eingeschaltet sind. Die Protein-Protein-Interaktionen verlaufen über Protein-Protein-Interaktionsdomänen: PDZ-Domänen, GuK-Domänen, SH2- und SH3-Domänen (Ebnet 2008).

Ein wichtiger Proteinkomplex der Tight Junction ist der ZO-Komplex, der aus ZO-1, ZO-2 und ZO-3 besteht und direkt an JAM, Claudine und Occludine bindet. Er verankert die Transmembranproteine in der Tight Junction und stellt die wichtige Verbindung zum Aktinzytoskelett her (Ebnet 2008).

1.2.5. Regulation der Tight Junction

Die Tight Junction unterliegt einer komplexen Regulation. Bekannt ist der Einfluss der extrazellulären Calciumkonzentration auf die Dichtigkeit der Tight Junction, die Interaktion mit dem Aktinzytoskelett sowie multiple Angriffspunkte für Phosphorylierungen.

Die Barrierefunktion der Tight Junction wird entscheidend vom extrazellulärem Calcium bestimmt. So führte eine calciumfreie Nährlösung dazu, dass Tight Junctions gar nicht erst gebildet werden, während sie bei reifen Zellen zu starker Permeabilitätssteigerung führte (Gonzalez-Mariscal et al., 1990). Zugleich kam es zu einem Anstieg der parazellulären Permeabilität an Caco-2-Zellen. Morphologisch kam es zu einer schnellen zentripetalen Retraktion der Tight Junction-Marker ZO-1 und Occludin. ML-7, der Inhibitor der MLCK (Myosin-Light-Chain-Kinase) war in der Lage den Widerstandsverlust und die Aktin-Myosin-Retraktion zu verringern (Ma et al., 2000).

Calciumdepletion führte zu einer konzertierten Internalisierung sowohl von TJ-Proteinen (Occludin, ZO-1, Cldn-1, Cldn-4, JAM-1), als auch von Proteinen der Adherens Junctions (E-

Cadherin, p120-Catenin, beta-Catenin) über den Clathrin-Weg (Clathrin, alpha-Adaptin). Diese gingen in die Early Endosomes und dann in Organellen, die mit Synthaxin-4 kolokalisieren, über (Ivanov et al., 2004).

Caveolinabhängige Internalisierung von Occludin konnte für die Toxine von *Clostridium difficile* gezeigt werden (Nusrat et al., 2001).

Oxidativer Stress führte zur Umverteilung von Occludin und ZO-1 und Störung der Barrierefunktion (Basuroy et al., 2003). Dabei scheint auch die Proteinphosphatase 2A eine wichtige Rolle zu spielen, welche durch oxidativen Stress mit Occludin assoziiert und vermutlich zu Dephosphorylierungen am C-Terminus führte (Sheth et al., 2009).

Weiterhin spielen Phosphorylierungen von Claudinen für die Eigenschaften der TJ eine wichtige Rolle. Die Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert Claudin-3 und führt an einer Ovarialkarzinomzelllinie zu einem Abfall des transepithelialen Widerstandes (transepithelial resistance, TER), die Phosphorylierung von Claudin-5 an Endothelien hingegen zu einer Zunahme des TER. Die durch die PKA phosphorylierte Form des Claudin-16 führt zu einer Steigerung der Magnesiumresorption, in dephosphoryliertem Zustand wird Claudin-16 ins Lysosom verlagert (Angelow et al., 2008). Die Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert Claudin-1. Ebenso phosphoryliert die PKC Claudin-4 und führt an Ovarialkarzinomzelllinien bei Aktivierung durch Phorbol ester zu einer verminderten Abdichtung der Tight Junction sowie zu einer veränderten Claudin-4-Verteilung (Angelow et al., 2008).

Die Barrierefunktion der Epithelien wird auch vom Aktinzytoskelett und seinen kontraktile Elementen bestimmt. Die Myosin light chain kinase (MLCK) führt über Phosphorylierung zu Erhöhung der Permeabilität sowie zur Redistribution von ZO-1 und Occludin. Da das proinflammatorische Zytokin TNF- α ebenfalls die MLCK aktiviert, ist eine Beteiligung bei entzündlichen Diarrhoen in der Pathogenese möglich (Shen et al., 2006).

1.3. Protamin

Protamin ist ein polykationisches Protein, dessen Molekulargewicht zwischen 2,8 und 8 kDa liegt. Dabei ist die Hauptkomponente 5,1 kDa groß. Die variable Größe hängt damit zusammen, dass es mehrere Protamine unterschiedlicher Größe gibt. Beim Menschen existieren zwei Protamingene, beim Lachs elf. Protamine enthalten 50-110 Aminosäuren, wovon Arginin bis zu 70 % ausmacht (Balhorn, 2007).

Beim Menschen sind zwei Protamingene bekannt, die in der Spermiogenese von Bedeutung sind (PRM 1 und 2) (Balhorn, 2007). Als Spermiogenese wird der Reifungsprozess von der Spermatide zum Spermatozoon genannt, der nach der 2. Reifeteilung stattfindet. Dabei werden - neben anderen Prozessen - die Histonkomplexe zunächst von Transitionsproteinen und schließlich von den Protaminen in ihrer DNA-Bindung ersetzt (Miller et al., 2010). Sie werden direkt nach der Synthese an mehreren Stellen phosphoryliert. Nach der DNA-Bindung werden sie wieder dephosphoryliert und untereinander durch Disulfidbrücken vernetzt (Balhorn, 2007). Der Vorteil von Protamin gegenüber den Histonen für das Spermatozoon liegt einerseits in der kompakteren Verpackung (Histone schaffen eine DNA-Kondensation von 10^{-5} , Protamine jedoch mit 10^{-6} das Zehnfache) (Miller et al., 2010). Andererseits ist dabei nicht so sehr der „Transportvorteil“ entscheidend, vielmehr ist es die Verhinderung von Erbgutschäden, die während Reifungsprozess und Aszension im weiblichen Genitaltrakt auftreten können. So wurden bei protamindefizienten Individuen deutlich mehr Doppelstrangbrüche gefunden, wobei letztlich solche Protaminmutationen zu männlicher Infertilität führen. Ein Einfluss von Protamin auf epigenetische Prozesse wird ebenfalls diskutiert (Miller et al., 2010).

1.3.1. Medizinische Verwendungen von Protamin

Die bekannteste Verwendung des Protamins ist die als Antidot des Heparins, wobei der antikoagulative Effekt des Heparins aufgehoben wird (Cowley et al., 1948). Dadurch findet es Verwendung in gefäß- und kardiochirurgischen Operationen und bei Heparinüberdosierungen. Dabei ist zu beachten, dass Heparin (komplementär zum Protamin) negativ geladen ist, da es vielfach sulfatiert ist.

Weiterhin wird Protamin als Zusatz zu Insulin für die subkutane Injektion verwendet (NPH-Insulin, Neutral Protamin Hagedorn Insulin), da es durch verzögerte Freisetzung die Wirkdauer erhöht.

1.3.2. Effekte von Protamin

Als eines der wenigen positiv geladenen Proteine überhaupt hat Protamin auch im experimentellen Bereich breite Anwendung gefunden.

Protamin wirkt antibakteriell, was neben seiner membrandestabilisierenden Wirkung (Vaara et al., 1983) auf bakterizide Effekte durch Inhibition der Atmungskette und darauffolgenden ATP-Mangel beruht. Dies trifft auch auf Mitochondrien zu (über die Hemmung der Cytochrom C-Oxidase) (Machinist et al., 1965). Außerdem bindet Protamin das LPS gram-negativer

Bakterien (Helander et al., 1987). Ferner blockiert Protamin ebenso wie das ebenfalls positiv geladene Poly-L-Lysin die sPLA2 der Thrombozyten (lösliche Typ 2-Phospholipase A), die als sezernierte Form vermutlich die Aufgabe hat, bakterielle Membranen zu lysieren und verhindert seine Freisetzung (Emadi et al, 1996).

Weiterhin hat Protamin inhibitorische Effekte auf Verdauungsenzyme: auf Pepsin (Mekras, 1989), sowie auf die pankreatische Lipase. Dabei ist für die Stimulierung bzw. Hemmung die Zusammensetzung der Phospholipide entscheidend. Bei vorherrschendem Phosphatidylcholin kann die pankreatische Lipase effektiv gehemmt werden, bei Phosphatidat hingegen kam es sogar zu einer leichten Stimulation (Tsujita et al, 1996).

Protamin ist ein Agonist am Calcium-Sensing-Rezeptor (welcher auch in Darmepithelien vorkommt) und führt hierüber zu einem Calciumeinstrom in die Zelle (Gama et al., 1997). Werden Endothelzellen mechanisch gestreckt, so führt Protamin zu einer Verstärkung der intrazellulären Calciumkonzentrationserhöhung (Murase et al., 2001). Außerdem führt Protamin an Podozyten zu einer Retraktion der Ausläufer. Dieser Prozess ist ebenfalls mit einem Anstieg des intrazellulären Calciums verbunden (Rüdiger et al., 1999).

Protamin führt bei systemischer Anwendung in der Blutbahn (beispielsweise bei Operationen) zu Hypotension. Dabei spielt die Stimulation der iNOS in Endothelien mit nachfolgender NO-Produktion und Relaxation der glatten Muskulatur eine Rolle (Takahura et al., 2006).

Protamin ist zudem ein Agens, das in der Urologie für ein Modell der Zystitis verwendet wird und am Urothel die Permeabilität erhöht (Parsons, 2007).

1.3.3. Effekte von Protamin an Epithelien

Widerstandsmessungen an der Gallenblase von *Necturus* (einem Furchenmolch) haben gezeigt, dass sich der epitheliale Widerstand unter Protamin verdoppelt, der subepitheliale dagegen unbeeinflusst bleibt. Der Effekt ist unter Antagonisierung durch Heparin voll reversibel, nicht jedoch durch Auswaschen mit Ringer-Lösung. Auch andere Anionen wie Na₂SO₄-Ringer führen zum Ausfällen von Protamin und zur Inaktivierung des Effekts. Ferner wirkt Protamin nur von der mukosalen (apikalen) Seite aus, durch einen hydrostatischen Druckgradienten von serosal nach mukosal kann der Effekt um 43 % abgeschwächt werden. Ouabain, welches unspezifisch den aktiven Ionentransport inhibiert, führt zu keiner Veränderung des Protamineffektes (Fromm et al., 1985). Oberhalb einer Dosis von 10 µg/ml steigt der Protamineffekt nicht mehr signifikant an. Die Ionenpermeabilitäten für K⁺ und Na⁺ verringern sich um den Faktor drei, während die Permeabilität für Chlorid nicht beeinflusst

wird. Der Nettowassertransport von der Mukosa zur Serosa nimmt um 60 % zu (Fromm et al., 1985).

Morphologisch hat sich unter Protamin eine Krümmung der Mikrovilli, v.a. in der Nähe der Tight Junctions gezeigt. Dort sind auch die Mikrofilamente nicht mehr deutlich zu erkennen gewesen. Gefrierbruchschnitte der Tight Junctions haben gezeigt, dass sich die Anzahl von Tight Junction-Strängen erhöht, sich vertikal verbreitert und sich vereinzelt Stränge unterhalb der geschlossenen Stränge bilden. Unter Heparin wird das Netzwerk wieder schmaler und in der Anzahl geringer, jedoch finden sich wieder vermehrt Stränge unter dem geschlossenen Netzwerk (Bentzel et al., 1987).

Auch hohe Konzentrationen von Protamin (250 µg/ml) haben keinen zytotoxischen Effekt (Peixoto et al., 2005). Eine Desorganisation des Aktinzytoskeletts bei MDCK I- und II-Zellen ist nach zwei Stunden apikaler Inkubation mit Protamin beobachtet worden. Bei einer Protaminkonzentration von 250 µg/ml hat sich nach 30 Minuten eine Verarmung der TJ an Occludin in MDCK I- und II-Zellen sowie eine Abnahme von Claudin-1 bei MDCK II-Zellen eingestellt. ZO-1 weist bei MDCK II-Zellen unter Protamin eine inhomogenere Verteilung auf (Peixoto et al., 2005).

Experimente an hochohmigen MDCK I-Zellen haben – anders als bei niederohmigen lecken Epithelien - eine Widerstandsabnahme unter Protamin bei wiederum rein apikaler Auslösbarkeit des Effekts ergeben (Peterson et al., 1990). Mittels Mannitolflux-Messungen ist zudem die Parazellularität des Effektes gezeigt worden. Der Höhepunkt der Permeabilität ist nach zwei bis vier Stunden erreicht. Die Mannitolpermeabilität nimmt auch unter Poly-L-Lysin zu. Zudem zeigen MDCK I-Zellen nach Protamin strukturelle Inhomogenitäten im Aktinband (Peterson et al., 1990).

2. Fragestellung

Die Wirkungen und Verwendungen von Protamin sind vielschichtig und bereits an mehreren Geweben und Bereichen der Medizin untersucht worden. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie das polykationische Protein Protamin auf molekularer und morphologischer Ebene auf ausgewählte Nierenepithelzellen wirkt. Dabei wurden Madin-Darby-Canine-Kidney (MDCK)-Zellen, ein etabliertes canines Nierenepithelzellmodell, verwendet. Besonderes Gewicht lag dabei auf der Untersuchung folgender Aspekte:

1. Elektrophysiologische Analyse
 - a) des Protamineffekts auf unterschiedliche Zellklone und deren Barrierefunktion. Besonderes Gewicht lag dabei auf der Differenzierung des Effektes nach Zelltyp (Epithelien des distalen oder proximalen Tubulus) und der Abhängigkeit vom Expressionsmuster von Tight Junction-Proteinen.
 - b) der zum Tragen kommenden Veränderungen der Ionenleitfähigkeiten unter Berücksichtigung von Größe und Ladung.

2. Analyse des Protamineffekts auf Proteinebene
 - a) Quantitativ (Western Blots): Kommt es zu Veränderungen der Zusammensetzung der Tight Junction oder der Membranzusammensetzung unter Protamin. Wurden unter Protamin bestimmte Proteine (Claudine, Occludin, E-Cadherin, ZO-1) verstärkt in die Plasmamembran eingebaut oder abgebaut?
 - b) Qualitativ (Immunfluoreszenz und konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie): Strukturelle Veränderungen der Zellform, Proteinverteilung und Zell-Zell-Kontakte. Besonderes Gewicht lag dabei auf der Untersuchung der Tight Junction und ihrer Zusammensetzung.

3. Analyse regulatorischer Aspekte
 - a) Signalwege: Gibt es Hinweise auf intrazelluläre Signalwege ausgelöst durch Protamin, lassen sich diese durch spezifische Inhibitoren blockieren oder abschwächen? Gibt es Hinweise auf Aktivierung bestimmter Signalwege durch Protamin und stehen diese im Zusammenhang mit dem beobachteten elektrophysiologischen Effekt (Phosphoblots)?
 - b) Temperatur: Besteht eine Temperaturabhängigkeit und lässt sich der elektrophysiologische Effekt auch bei niedrigen Temperaturen reproduzieren?

3. Material und Methoden

3.1. Material und Geräte

3.1.1. Protamin und Heparin

Es wurde Protamin-Chlorid vom Lachs (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und Heparin-Natrium aus Schweinedarm-Mukosa (5000 I.E je 5 ml, Rotexmedica, Trittau) verwendet.

3.1.2. Antikörper

Antikörper	Hersteller
Alexa Fluor Antikörper (Goat-Anti-Mouse Alexa Fluor® 488 und Goat-Anti-Rabbit Alexa Fluor® 594)	MoBiTec, Göttingen
Anti-Claudin-Antikörper (Cldn-1, -2, -3, -4, -7, -8)	Zymed, San Francisco, USA
Anti-Occludin-Antikörper	Zymed, San Francisco, USA
Anti-E-Cadherin-Antikörper	BD Transduction Laboratories, USA
Anti-ZO-1-Antikörper	BD Transduction Laboratories, USA
Rabbit Anti-Phospho-Myosin Light Chain 2 (Ser19) und Anti-MLC 2	Cell Signaling Technology, Inc., USA
Rabbit Anti-Phospho-Akt (Ser473) und Anti-Akt	Cell Signaling Technology, Inc., USA
Rabbit Anti-Phospho-p38 (Thr180Tyr182) und Anti-p38	Cell Signaling Technology, Inc., USA
Rabbit Anti-Phospho-p42/44 MAPK (Thr 202Tyr204) und Anti-p42/44	Cell Signaling Technology, Inc., USA

3.1.3. Inhibitoren

Name	Inhibition	Hersteller	Zielkonzentration
ML-7	MLCK	Calbiochem, USA	0,2 – 3 μ M
H-8 (Hydrochlorid)	PKA, PKG	Research Biochemicals International, Natick, MA, USA	20 – 80 μ M
BAPTA-AM	Chelator von Ca^{2+} (intrazellulär)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	8 – 10 μ M
Ly294004	PI3-Kinase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	20 – 30 μ M
L-NAME Hydrochlorid	NO-Synthasen	Calbiochem®, USA	100 – 200 μ M
SB212090	p38-MAP-Kinase	Calbiochem, USA	20 μ M
UO126	MEK-1 und -2	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	4 μ M
Chlorpromazin	Clathrin-vermittelte Endozytose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	37 – 74 μ M
Nystatin	Caveolin-vermittelte Endozytose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	6 – 25 μ g/ml

3.1.4. Kits

BCA Protein Assay Reagenz A + B (Proteinquantifizierung)	Pierce, Rockford, USA
Lumi-Light Western Blotting Kit	Roche Diagnostics, Mannheim

3.1.5. Zelllinien

Die Effekte von Protamin auf Epithelien wurden an MDCK-Zellen (Madin-Darby-Canine-Kidney-Zellen) untersucht. MDCK-Zellen sind Zelllinien, die aus dem Sammelrohr der Niere weiblicher Cocker Spaniel-Hunde stammen. Isoliert wurden sie zuerst von Madin und Darby 1958 (Madin et al., 1958) Es existieren mehrere Subtypen von MDCK-Zellen (Richardson et

al., 1981, Gekle et al., 1994). Dabei sind MDCK I und MDCK C7 dichte Epithelien mit hohem transepithelialelem Widerstand (über 1000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$) und geringer Permeabilität. Sie ähneln den Hauptzellen des Sammelrohrs. Dagegen sind MDCK II und MDCK C11 Epithelien vom lecken Typ mit niedrigem transepithelialelem Widerstand (25 – 150 $\Omega \cdot \text{cm}^2$). Sie ähneln den Zwischenzellen des Sammelrohrs.

Weiterhin wurden Zellklone von MDCK C7 verwendet, die mit verschiedenen Claudinen transfiziert sind. Die betrachteten Claudine waren Claudin-2, Claudin-10a, Claudin-10b und Claudin-16. Dazu wurden humane und murine Sequenzen verwendet, sowie bei Claudin-10a Sequenzen mit deletiertem Anteil eines extrazellulären Loops, Klon Claudin-10a $\Delta 57$. Als Kontrolle zu den mit kationenkanalbildenden Claudinen transfizierten Klonen dienten einerseits die in anderen Versuchen betrachteten Wildtypen der dichten Epithelien MDCK I und C7 sowie eine Vektorkontrolle, bei der nur der Vektor transfiziert wurde: CMV4.

Zelltyp und Klon, ggf. mit Vektor und Claudin	Herkunft
MDCK C7	AG Oberleithner, Institut für Physiologie der Universität Münster
MDCK C11	AG Oberleithner, Institut für Physiologie der Universität Münster
MDCK I	American Type Culture Collection, AG Blasig Leibniz-Institut für molekulare Pharmakologie
MDCK II	American Type Culture Collection, AG Blasig Leibniz-Institut für molekulare Pharmakologie
MDCK C7/pFlagCMV4/Claudin2 #6 (human)	Institut für Klinische Physiologie, Charité Berlin
MDCK C7/pcDNA3.1/Claudin10a-V1 #2 (murin)	Institut für Klinische Physiologie, Charité Berlin
MDCK C7/pcDNA3.1/Claudin10a #57-26 (murin)	AG Hunziker, Institute of Molecular and Cell Biology, National University of Singapore
MDCK C7/pcDNA3.1/Claudin10a #57-30 (murin)	AG Hunziker, Institute of Molecular and Cell Biology, National University of Singapore
MDCK C7/pFlagCMV4/Claudin10b #1 (human)	Institut für Klinische Physiologie, Charité Berlin

MDCK C7/pFlagCMV4/ Claudin10b #47 (murin)	Institut für Klinische Physiologie, Charité Berlin
MDCK C7/pcDNA3.1/Claudin10b #48 (murin)	Institut für Klinische Physiologie, Charité Berlin
MDCK C7/pFlagCMV4/Claudin16-II-11 (human)	Institut für Klinische Physiologie, Charité Berlin
MDCK C7/pcDNA3/Claudin16-63 (human)	Institut für Klinische Physiologie, Charité Berlin
MDCK C7/pcDNA3/Claudin16-63 (murin)	Institut für Klinische Physiologie, Charité Berlin

3.1.6. Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
APS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau (Laemmlis)	Amersham, München
Bovines Serum-Albumin (BSA)	New England BioLabs, Frankfurt a.M.
Complete Proteaseinhibitor Tabletten	Roche, Mannheim
DAPI	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco's Minimum Essential Medium	PAA Laboratories, Cölbe
Dulbecco's PBS mit Mg/Ca	PAA Laboratories, Cölbe
Dulbecco's PBS ohne Mg/Ca	PAA Laboratories, Cölbe
DTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA 0,5 M	Serva, Heidelberg
EGTA 0,5 M	Serva, Heidelberg
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
FCS	Biochrom, Berlin
Glycerol	Invitrogen, Karlsruhe
Glycin	Serva, Heidelberg
HEPES	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaleidoskope Marker	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid (MgCl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Methanol	Merck, Berlin
Minimum Essential Medium mit Earl's Salts	Biochrom, Berlin
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumacetat, -Fluorid	Merck, Berlin
Natriumchlorid	Serva, Heidelberg
Natriumorthovanadat	Sigma, Taufkirchen
Natriumpyrophosphat	Merck, Berlin
Page-Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS-Tabletten (Phosphate buffered saline)	Life Technologies, Karlsruhe
PMSF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SDS	Merck, Berlin
TEMED	Life Technologies, Karlsruhe
TRIS	Merck, Berlin
TRIS-HCL	Bio-Rad, München
Triton X-100	Roche, Mannheim
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Wasser	Fluka, Seelze

3.1.7. Gebrauchslösungen

10× West-Puffer:	1,9 M Glycin 0,25 M TRIS
5×Laemmli-Probenpuffer:	125 mM TRIS pH 6,8 500 mM DTT 50% Glycerol 10% SDS 0,001% Bromphenolblau
BSA-Blockierungslösung:	5% BSA 0,02% Natriumazid ad PBST

Lysepuffer für Phosphoblots	20 mM TRIS 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 % Triton X-100 2,5 mM Natrium Pyrophosphat 1 mM β -Glycerophosphat 1 mM Na_3VO_4 1 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin 1 mM PMSF
Membran-Lysepuffer:	20 mM TRIS 5 mM MgCl_2 1 mM EDTA 0,3 mM EGTA pro 10 ml Zugabe einer Tablette Complete Proteaseinhibitor (Roche)
PBST:	PBS-Tabletten (Gibco) 0,1% Tween 20
Puffer für Triton X-100-lösliche Proteine	120 mM NaCl 25 mM HEPES (pH 7,6) 2 mM EDTA 25 mM NaF 1 % Triton X-100 pro 10 ml Zugabe einer Tablette Complete Proteaseinhibitor (Roche)
Puffer für Triton X-100-unlösliche Proteine - RIPA (<i>Radio Immuno Precipitation Assay</i>)	25 mM HEPES (pH 7,6) 2 mM EDTA 25 mM NaF 1% SDS pro 10 ml Zugabe einer Tablette Complete Proteaseinhibitor (Roche)

Sammelgel :	5,1% Acrylamid 0,125 M TRIS pH 6,8 0,1% SDS 0,1% APS 0,1% TEMED
SDS-Elektrophoresepuffer:	10 % 10×West-Puffer 0,1% SDS
Transferpuffer:	10% 10×West-Puffer 10% Methanol
Trenngel	12,5 % Acrylamid 0,35 M TRIS, pH 8,8 0,1% SDS 0,1% APS 0,1% TEMED

3.1.8. Ringerlösungen

Ringer Nr. 111	113,6 mM NaCl 21 mM NaHCO ₃ 5,4 mM KCl 2,4 mM Na ₂ HPO ₄ 1,2 mM MgCl ₂ 1,2 mM CaCl ₂ 0,7 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Glukose
HEPES-Ringer	134,6 mM NaCl 2,4 mM Na ₂ HPO ₄ 0,6 mM NaH ₂ PO ₄ 5,4 mM KCl 1,2 mM MgCl ₂ 1,2 mM CaCl ₂ 10,6 mM HEPES 10 mM Glukose pH 7,4

Mannitol-Ringer	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 Glukose pH 7,8
modifizierte Ringer (monovalente Kationen Li ⁺ , K ⁺ , Rb ⁺ , Cs ⁺)	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 Glukose pH 7,8

3.1.9. Materialien

Zellkulturfilter Millicell HA 0,6 cm ²	Millipore, Schwalbach
Magnetrührstäbchen	Merck, Berlin
Objekträger	Menzel, Braunschweig
Pipetten	Eppendorf, Köln
Poly Screen PVDF-Transfer Membran	NEN, Köln
ProTaq MountFluor	Biocyc, Luckenwalde
Zellkulturflaschen	Nunc, Karlsruhe
Zellschaber	Costar, Corning, NY

3.1.10. Geräte

Agarosegel-Elektrophoreskammern	Bio-Rad, München
Begasungsbrutschrank, B5060 EC/CO ₂	Heraeus, Hanau
Konfokales Laserscanning-Mikroskop LSM 510 Meta	Carl Zeiss AG, Berlin
Heizblock	Grant, Berlin
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf, Köln

Luminiszenzbild Analysator (LAS 1000)	Fuji, Düsseldorf
Magnetrührer	Ika-Combimag, München
Elektrophoresesystem	Biorad, München
Transferzelle Trans-Blot Cell	Biorad, München
HI 9017 Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments, Kehl
Plattenlesegerät Tecan Spectra Classic	Tecan, Grödig (Österreich)
Spannungsgerät Power Pac 300	Biorad, München
Ultraschallprozessor UP50H	Hielscher, Teltow
Ussingkammer	Institut für Klinische Physiologie, Charité Berlin
Vortex-Geräte	Pharmacia Biotech, Freiburg
Wasserwärmebad SW 21/TWB 5	Julabo, Selbach
Widerstandsmessgerät	Institut für Klinische Physiologie, Charité Berlin
Schwenker	Fröbel Labortechnik, Lindau
Zentrifugen Qualitron Mini Centrifuge Microcentrifuge Z233 MK Avanti-J25 Centrifuge	MS Laborgeräte, Wiesloch Hermle Labortechnik, Wehingen Beckman Instruments, München

3.1.11. Software

Für Ussingexperimente wurde die Software Analogon (Dipl. Ing. grad. D. Sorgenfrei) verwendet, für die densitometrische Auswertung von Westernblots wurde das Programm Multigauge verwendet. Die quantitative Aufarbeitung erfolgte in Microsoft Excel (Office 2000), die graphische Ausarbeitung in Microsoft Powerpoint (Office 2000).

3.2. Methoden

3.2.1. Übersicht

Die in dieser Arbeit angewandten Methoden waren Ussingkammerexperimente (an Monolayern von Epithelzellen aus Zellkulturen), Western Blots, Phosphoblots und Immunfluoreszenz mit konfokaler Laserscanningmikroskopie.

Dabei dienten die Experimente in der Ussingkammer der Echtzeiterfassung elektrophysiologischer Parameter der betrachteten Zellverbände wie beispielsweise Widerstand und Leitfähigkeit. In Variationen dieser Experimente wurden die Leitfähigkeit für bestimmte Ionen, der zeitliche Verlauf des Protamineffektes (meist in Betrachtung des Widerstandes) oder die Wirkung von Inhibitoren auf die Elektrophysiologie der Epithelzellen bestimmt.

Die Methode des Western Blot dient dazu, die sich unter Protamin verändernde Proteinausstattung der Tight Junction im Speziellen und der Zellmembranen im Generellen aufzuzeigen. Als besondere Präparation, die Proteine in der Zellmembran von solchen am Zytoskelett gebundenen differenziert, dient die Präparation in Triton X-100-lösliche und Triton X-100-unlösliche Fraktionen.

In Phosphoblots werden Proteine detektiert, die phosphoryliert und damit beispielsweise aktiviert wurden. Dies ermöglicht den Nachweis intrazellulär ablaufender Signalwege.

Die Immunfluoreszenz und die angeschlossene konfokale Laserscanningmikroskopie löst qualitativ morphologische Veränderungen farblich und räumlich auf.

3.2.2. Zellkultur

Grundlage aller durchgeführten Experimente waren intakte Epithelmonolayer von auf Filtern gewachsenen Zellverbänden, welche aus Zellkulturen stammten. Alle Zellen wurden in Zellkulturflaschen in einer 5 % CO₂-Umgebung bei 37° C in Kultur gehalten. Das Kulturmedium bestand aus Dulbecco's Minimum Essential Medium (MEM) mit 10 % FCS und Zusatz von 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin.

Dieses Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Ferner wurden die Zellen - nach wöchentlich einmaliger (MDCK I und II) oder zweimaliger (MDCK C7 und C11) mikroskopischer Kontrolle - mittels Trypsin, welches die Zelladhäsionen enzymatisch auflöst, neu ausgesät. Dazu sollten in der mikroskopischen Kontrolle die Zellen konfluent gewachsen sein, damit überschüssige Zellen entfernt und die Zellen selektiert werden, die feste Verbände formen.

Dabei wurde nach einem Waschschrift in PBS zunächst mit 3 ml Trypsinlösung 5 Minuten inkubiert. Nach Abschütten und nochmaliger Zugabe von 1 ml Trypsinlösung wurden (nach mikroskopischer Kontrolle der Ablösung) 10 ml Medium hinzugegeben, von denen wiederum 1,5 ml in eine neue Flasche bzw. 200 – 250 µl in einen Filter gelangen. Der Rest wurde mit Medium aufgefüllt, so dass die apikale Seite 0,5 ml enthielt, während die basolaterale Seite (Schale) 10 ml enthielt.

3.2.3. Ussingkammerexperimente

3.2.3.1. Prinzip der Ussingkammerexperimente

Mit der Ussingkammertechnik – benannt nach dem dänischen Physiologen Hans Ussing – lassen sich die elektrophysiologischen Eigenschaften und Reaktionen von Epithelzellverbänden in Echtzeit untersuchen.

Die in den Versuchen verwendete Ussingkammer bestand aus zwei Kammerhälften, zwischen die die zellbewachsenen Filter so eingespannt und durch Gummiringe abgedichtet wurden, dass als einzige Kommunikationsmöglichkeit der beiden Kammerhälften der Epithelrasen des Filters verblieb. So war es möglich, dass die gemessenen elektrophysiologischen Parameter - transepithelialer Widerstand R^l und die über diesen Widerstand abfallende Spannung U^e – allein von den Eigenschaften des Epithelverbands abhingen, wenn zuvor der Leerwiderstand des Kammerbades ermittelt worden war.

Die Kammer verfügte über je ein Paar von Spannungs- und Stromelektroden, so dass sich auf der apikalen und der basolateralen Seite je eine Spannungs- und eine Stromelektrode befand. Es wurden nun von einem Stromeinspeisegerät Rechteckimpulse erzeugt und über die Stromelektrode in die Kammer abgegeben, die ihrerseits zu einen Stromfluss I durch die Kammer führten. Mit den Spannungselektroden, die sich zu beiden Seiten – also apikal und basolateral – nahe am Epithel befanden, wurde dann die Spannung U^e gemessen. Nach dem Ohm'schen Gesetz $R = U / I$ ergibt sich daraus der transepitheliale Widerstand R^l , der von der Epithelschicht erzeugt wird. Die zuvor gemessenen Leerwiderstände der Kammern, die mit Ringerlösung Nr. 111 befüllt waren, wurden von den im Experiment ermittelten Werten abgezogen.

Die verwendete Ringer-Lösung hatte eine physiologische Osmolalität, wurde zusätzlich mit 2g/l Glucose versetzt und besaß Puffereigenschaften. Ein physiologischer pH von 7,4 wurde durch kontinuierliche Begasung mit Carbogen (95 % O_2 und 5 % Co_2) erreicht. Ferner erzeugten die aufsteigenden Blasen eine Zirkulation innerhalb der Kammer, so dass ein homogenes Milieu gewährleistet werden konnte.

In dieser Arbeit wurde der „open-circuit“-Modus der Ussingkammer verwendet. Dabei wurden von einem Impulsgenerator definierte Rechteckstrompulse erzeugt und die Spannungsänderung über dem Epithel erfasst, wobei das Potential vor und während des Rechteckimpulses abgerechnet wurden.

Nach

$$R = \Delta U / \Delta I$$

ergibt sich der transepitheliale Widerstand. Die Strom- und Spannungselektroden waren an das CVC6-Interface (FA Fiebig, Berlin) angeschlossen. Dieses war wiederum mit einem

Mehrkanal-AD-DA-Wandler an einen PC (Siemens, PCD 2) angeschlossen, über den die Steuerung und Registrierung mit der Software Analogon (Ing. grad. D. Sorgenfrei) erfolgte. Die Auswertung der Analogon-Daten erfolgte im Programm Microsoft Excel (Office 2000). Als Einheit des transepithelialen Widerstandes R^l wurde $[\Omega \cdot \text{cm}^2]$ verwendet. Für die Auswertung wurden die Widerstände vor und nach Protaminzugabe (Endkonzentration 100 $\mu\text{g/ml}$) zu verschiedenen Zeitpunkten gemittelt erhoben: bei 0, <1, 1, 3, 5, 7 und 15 Minuten. Die Werte zu diesen Zeitpunkten waren Mittelwerte aus 10 konsekutiven Werten, die im 10-Sekunden-Abstand bestimmt worden waren.

3.2.3.2. Durchführung der Ussingkammerexperimente

Die Ussingkammer wurde mithilfe eines Wärmebads auf 37 °C erwärmt. Vor jedem Versuch erfolgte die Bestimmung des Asymmetriepotentials, das sich aus Unregelmäßigkeiten der Spannungselektroden selbst ergibt und des Badwiderstandes bei Befüllung mit Ringerlösung, welcher dann von den späteren Messwerten abgezogen wurde. Nachdem die Filter eingebaut worden waren, wurden beide Kammerhälften gleichmäßig mit Ringerlösung Nr. 111 befüllt. Eventuell vorhandene Luftblasen wurden entfernt.

Betrachtet wurden die oben beschriebenen Wildtypen, Vektorkontrollen und transfizierten Zellklone. Die Ermittlung der Ausgangswiderstände erfolgte nach Erreichen eines konstanten Niveaus. Dieser bestand aus dem Mittelwert von zehn konsekutiven Widerständen im 10 s-Abstand vor Protaminapplikation. Das Experiment wurde begonnen, wenn die Widerstandswerte der Kammern ein konstantes Niveau erreicht hatten. Die konfluent bewachsenen Filter wurden nur in die Auswertung eingeschlossen, wenn die Ausgangswiderstände höher als 25 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ waren. Zu einem bestimmten Zeitpunkt erfolgte die Zugabe von Protamin (meist 100 $\mu\text{g/ml}$). Nach erneutem Einstellen eines konstanten Widerstandsplateaus erfolgte ggf. die Zugabe von Heparin 2 I.E. pro μg Protamin. Da oberhalb einer Dosis von 10 $\mu\text{g/ml}$ der Protamineffekt nicht mehr signifikant ansteigt (Fromm et al., 1985) und auch bei Dosierungen von 250 $\mu\text{g/ml}$ waren keine zytotoxischen Protamineffekte nachweisbar waren (Peixoto et al., 2005), konnten Dosierungen von 100 $\mu\text{g/ml}$ sicher verwendet werden.

Der Widerstand nach Protaminapplikation wurde fünf Minuten nach Applikation analog zum Ausgangswiderstand ermittelt („Referenzwiderstand“ des Protamineffektes nach fünf Minuten). Die Widerstände zu diesen beiden Zeitpunkten wurden in jedem Experiment ermittelt und zum Vergleich der Protamineffekte herangezogen. Es erfolgte weiterhin die Bestimmung des SEM (standard error of the mean). Das Signifikanzniveau der Widerstandsveränderung wurde mithilfe des ungepaarten t-Testes ermittelt. Die Darstellung erfolgte – zur besseren Vergleichbarkeit bei variablen Ausgangswiderständen je nach

Zellklon – als relative Veränderung des Widerstandes bezogen auf einen auf 100 % normierten Ausgangswiderstand. Entsprechend mussten auch die SEM umgerechnet werden.

3.2.3.3. Messung von Dilutionspotentialen in der Ussingkammer

Mittels Dilutionspotentialen kann die Permeabilität von Na^+ und Cl^- bestimmt werden. Dies wird dadurch erreicht, dass ein osmotisch neutraler Ausgleich von NaCl durch Mannitol erfolgt. Die unterschiedlich hohen Konzentrationen von Na^+ und Cl^- führen zu einem Gradienten, der wiederum die betroffenen Ionen durch das Epithel treten lässt und das Dilutionspotential erzeugt.

Das Dilutionspotential wird durch die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung beschrieben:

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

Hierbei sind:

U_m	Dilutionspotential (basolateral gegen apikal)
R	allgemeine Gaskonstante
T	Temperatur
F	Faraday'sche Konstante
$P_{\text{Na}}, P_{\text{Cl}}$	Permeabilität für Chlorid oder Natrium
[X]	Konzentration der Ionen (Chlorid oder Natrium)

„ap“ steht für apikal, „bl“ für basolateral.

Diese Gleichung wird aufgelöst nach

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

Nach Berücksichtigung des Liquid-Junction-Potentials, das an den Elektrodenbrücken allein durch die unterschiedlichen Konzentrationen entsteht, ergibt sich folgende Gleichung:

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

Hierbei sind:

ΔE Potentialdifferenz $E(\text{basolateral})$ gegen $E(\text{apikal})$ korrigiert für das Liquid-Junction-Potential

s $s = 2,303 \cdot RT / F$
 a Ionenaktivitäten (apikal oder basolateral, Chlorid oder Natrium)

Es können mithilfe der Leitfähigkeit (G) des Epithels – dem Kehrwert des transepithelialen Widerstandes – die einzelnen Ionenpermeabilitäten für Na^+ und Cl^- berechnet werden:

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

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

Das praktische Vorgehen entsprach dem bei allen Ussingversuchen. In beide Kammerhälften kamen zunächst je 10 ml Ringer Nr. 111. Nach der Äquilibrierungsphase erfolgte die Zugabe von Protamin. Wenn sich ein konstantes Widerstandsniveau unter Protamin gebildet hatte, erfolgte der Austausch gegen 5 ml der Mannitol-Lösung (s.o.) Es musste dabei darauf geachtet werden, dass der hydrostatische Druck gleichmäßig blieb und keinesfalls basolateral höher als apikal wurde. Die Dilutionspotentiale wurden sowohl bei apikaler, als auch bei basolateraler Zugabe von Mannitol-Lösung ermittelt.

3.2.3.4. Ermittlung der Permeabilität für monovalente Kationen

Werden die Permeabilitäten für die Kationen Li^+ , K^+ , Rb^+ und Cs^+ ermittelt, kann bestimmt werden, ob die Ionenleitfähigkeit von der Größe oder dem Hydratisierungszustand des Ions abhängt. Dies wiederum lässt Rückschlüsse auf die beteiligte Pore und deren Proteine zu. Die Permeabilität für Natrium ist im vorangegangenen Abschnitt dargestellt worden.

Die Permeabilitäten für die oben genannten Kationen wurden über biionische Potentiale ermittelt, indem wiederum auf einer Badseite 5 ml der Ringer-Lösung gegen eine Lösung, bei der ein Teil des Na^+ mit einem oben angeführten Kation ersetzt wurde, getauscht wurde. In der unten gezeigten Gleichung entspricht X^+ den eingesetzten Kationen, die Permeabilität wird als Quotient zur Permeabilität für Natrium errechnet:

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

Die Versuchsdurchführung entsprach der der Ussingexperimente und der Messung der Dilutionspotentiale. Auch hier erfolgte der Austausch der Lösungen zunächst apikal und dann basolateral.

3.2.3.5. Durchführung von Inhibitorenexperimenten in der Ussingkammer

Mit dem Einsatz von Inhibitoren sollte festgestellt werden, ob bestimmte intrazelluläre Signalwege den funktionellen Protamineffekt erklären und sich inhibieren lassen. Die Versuche fanden in der Ussingkammer statt und entsprachen in Vorbereitung und Aufzeichnung den oben dargestellten Ussingkammerversuchen. Die Filter mit den Inhibitoren wurden für mindestens 30 Minuten in der Kammer mit dem Inhibitor inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µg/ml Protamin apikal. Die Konzentrationen wurden bis an die Toxizitätsgrenze des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO), welche bei 1 ‰ liegt, gesteigert. Die Konzentrationen wurden variiert. Deshalb wurden in der Auswertung Konzentrationsbereiche angegeben.

In der Auswertung wurden die bereits oben beschriebenen Zeitintervalle mit Ermittlung von Mittelwerten und Standardfehler genutzt. Zu jedem Inhibitorenversuch wurde ein Kontrollversuch durchgeführt. Um die Inhibitoreffekte zu vergleichen, wurden die Widerstände zum Zeitpunkt „Null“ (unmittelbar vor Protaminzugabe) und fünf Minuten nach Protaminzugabe verglichen.

Betrachtet wurden folgende Inhibitoren: ML-7 (inhibiert MLCK), H-8 (inhibiert Proteinkinasen, vornehmlich PKA und PKG), BAPTA-AM (chelatiert Calcium), Ly294004 (inhibiert die PI3-Kinase), L-NAME (inhibiert NO-Synthasen), PMA (Aktivator von PKC), SB212090 (inhibiert die p38-MAP-Kinase), UO126 (inhibiert MEK-1/2), Chlorpromazin (inhibiert die clathrinabhängige Endozytose) und Nystatin (inhibiert die caveolinabhängige Endozytose). Die Auswertung erfolgte durch Vergleich der Mittelwerte 5 Minuten nach Protamingabe mit denen der Kontrollen, der Berechnung der SEM und des ungepaarten t-Tests zur Signifikanzbestimmung.

3.2.4. Immunfluoreszenz und konfokale Laserscanningmikroskopie

In der Immunfluoreszenzmikroskopie werden Antikörper dazu verwendet Zellproteine aufzuspüren und durch angekoppelte Fluoreszenzstoffe darzustellen. Dazu werden benötigt: erstens ein Antikörper der das Zielprotein erkennt (Primärantikörper), zweitens ein Antikörper mit Farbstoff, der wiederum den ersten Antikörper erkennt und bindet (Sekundärantikörper) und drittens Licht einer bestimmten Wellenlänge, das den Farbstoff zum Leuchten bringt. Die Primärantikörper stammen aus immunisierten Mäusen oder Kaninchen. Die Sekundärantikörper stammen aus der Ziege, welche ihrerseits gegen Antikörperbestandteile des Kaninchens oder der Maus immunisiert worden war. Da beide Sekundärantikörper mit unterschiedlichen Leuchtstoffen (488 nm und 594 nm) gekoppelt sind, können nun die vom Mausantikörper gebundenen Strukturen in der einen und die vom Kaninchenantikörper gebundenen in einer anderen Farbe erscheinen.

Es wurden folgende Proteine untersucht: Cldn-1, Cldn-2, Cldn-3, Cldn-4, Cldn-7, Cldn-8, Occludin, ZO-1, E-Cadherin, F-Aktin. Die Färbungen fanden an konfluent bewachsenen Deckgläsern oder Filtern statt. Es wurde eine Kontrollgruppe, eine Gruppe die nur Protamin und schließlich eine Gruppe, die zunächst Protamin und anschließend Heparin ausgesetzt worden war, betrachtet. Die Inkubationszeiten sowohl für Protamin als auch Heparin betragen 5 – 7 Minuten. Die verwendeten Konzentrationen waren 100 µg/ml für Protamin und 2 I.E. Heparin pro 1 µg Protamin.

Die Deckgläser wurden nach Inkubation in eiskalter PBS (mit Mg^{2+}/Ca^{2+}) gewaschen und danach mindestens 10 Minuten in Paraformaldehyd 4% bei Raumtemperatur oder Methanol bei $-20^{\circ} C$ fixiert und dehydriert. Nach zweimaligem Waschen in PBS erfolgte die Permeabilisierung der Zellmembranen mit 0,5 % Triton X-100 in PBS für 10 Minuten. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (mit Mg^{2+}/Ca^{2+}) erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 5 % Ziegen Serum in PBS (Blockierungslösung, BS) für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Hiernach enthielten alle zugegebenen Lösungen BS als Ausgangslösung. Vor und nach der Applikation der Antikörper erfolgten jeweils zwei Waschschrte in BS. Dadurch wurden nicht gebundene Antikörper entfernt und Störsignale sowie ein übermäßiger Verbrauch des Sekundärantikörpers verhindert. Zunächst wurde der erste Primärantikörper (Mouse), dann der zweite Primärantikörper (Rabbit) jeweils für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Diese waren in folgenden Verdünnungen verwendet worden:

Anti-Claudin-Antikörper (Cldn-1, -2, -3, -4, -7, -8):	1:100
Anti-Occludin-Antikörper:	1:200
Anti-E-Cadherin-Antikörper:	1:1000

Anti-ZO-1-Antikörper:

1:500.

Darauf wurden beide Sekundärantikörper (Goat-Anti-Mouse und Goat-Anti-Rabbit) für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur hinzugegeben (Konzentration: 1:500 auf BS). Dann wurde 10 Minuten in DAPI abgedunkelt inkubiert, um die Zellkerne sichtbar zu machen. Es folgte das Waschen in Aqua dest. und 100 % Ethanol. Schließlich wurden auf beschriftete Objektträger unter Benutzung eines Tropfens ProTaq MountFluor® (Biocyc, Luckenwalde) die Deckgläser aufgebracht. Die mikroskopische Beurteilung erfolgte im konfokalen Laserscanning-Mikroskop Zeiss LSM 510 Meta. Die Auswertung erfolgte qualitativ.

3.2.5. SDS-PAGE und Western Blot

Mittels SDS-PAGE und Western Blot können Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt und quantitativ beurteilt werden. Dazu werden sie in einem elektrischen Feld in einem Gel durch ihre unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit durch die Poren des Gels aufgetrennt. Auf Zellulosemembranen werden die Proteine mittels eines weiteren Schrittes durch ein elektrisches Feld aufgebracht (Blotten) und können anschließend wieder mit Antikörpern (Primärantikörper, Sekundärantikörper) markiert werden und schließlich in einer enzymatischen Reaktion gefärbt werden. Das Ergebnis wird mit einer Kamera aufgezeichnet. Als Ausgangsmaterial für den Western Blot, dienen wiederum Zellkulturen, die entweder von Filtern mit oder ohne angeschlossenen Ussingversuch stammten oder von Kulturflaschen. Letztere erlauben zwar eine höhere Ausbeute, bieten aber keine elektrophysiologische Bestätigung des Protamineffektes. Durch gleichzeitiges Mitführen von Filtern, die elektrophysiologisch gemessen wurden, sowie die morphologische Kontrolle wurde versucht diesen Nachteilen zu begegnen.

Ferner wurden unterschiedliche Präparationen verwendet, je nachdem, welche Proteine betrachtet werden sollten. So kann mit der Gesamtlysate-Präparation der Proteingehalt der gesamten Zelle untersucht werden, mit der Präparation in Triton X 100-lösliche und -unlösliche Fraktionen schließlich kann zwischen Proteinen, die an der Zellmembran und solchen, die mit dem Zytoskelett verbunden sind, unterschieden werden. Im Phosphoblot schließlich werden phosphorylierte Formen von Proteinen spezifisch dargestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Trennung in Triton X 100-lösliche und -unlösliche Fraktionen sowie der Phosphoblot durchgeführt.

3.2.5.1. Präparation in Triton X-100-lösliche und -unlösliche Fraktionen

Bei der Bestimmung von Triton X-100-löslichen und Triton X-100-unlöslichen Fraktionen wird getrennt zwischen Proteinen, die sich in der Zellmembran und im Zytoplasma befinden und denjenigen die mit dem Zytoskelett verbunden sind, beispielsweise Vesikel (Gilbert und Fulton 1985). Wegen zu geringer Ausbeute aus einzelnen Filtern, wurden kleine Kulturflaschen benutzt. Zur Kontrolle wurden zum einen gleichzeitig Filter verwendet und deren Widerstand überprüft oder zum anderen unter dem Mikroskop die Dichte und Struktur des Zellrasens beurteilt.

Waren die Zellen nach den oben genannten Kriterien verwendbar, wurden sie 30 Minuten in 5 ml Glucose-HEPES-Ringer bei 37° Grad inkubiert. Es wurden 3 Flaschen verwendet: eine Kontrollflasche, eine Flasche nur nach Protamininkubation, eine Flasche mit Protamin- und nachfolgender Heparininkubation.

Protamin und Heparin wurden in den oben beschriebenen Konzentrationen verwendet und jeweils 5 Minuten inkubiert, die Kontrollflasche blieb unangetastet. Dann wurde in eiskalter PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml des Puffers für Triton X-100-lösliche Proteine in die Kulturflasche hinzugegeben und mit einem Zellschaber die Zellen abgeschabt. Diese wurden sorgfältig mit einer Pipettenspitze resuspendiert und anschließend 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 13000 g für 30 Minuten bei 4° C. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und enthielt nun die Triton X-100-lösliche Proteinfraction. Das Pellet wurde in RIPA-Puffer resuspendiert und mit Ultraschall (UP50H, FA Hielscher) homogenisiert. Die Proben konnten weiterverarbeitet oder bei -80 °C asserviert werden.

3.2.5.2. Phosphoblots

Die Aktivität intrazellulärer Signaltransduktionswege wird u.a. durch den Phosphorylierungsgrad der daran beteiligten Proteine bestimmt. Zur Darstellung dieses phosphorylierten Zustandes sind Antikörper notwendig, die diese Proteine in diesem Zustand binden. Daher unterscheiden sich Phosphoblots von den anderen Blots in Präparation und Weiterverarbeitung.

Zunächst mussten die Zellen vor Benutzung 4 Stunden in MEM ohne Zusatz von FCS inkubiert werden. Anschließend erfolgte die Zugabe von Protamin, welches seinerseits 5, 15, 30, 60 und 120 Minuten inkubiert wurde.

Nach dem Experiment wurden die Zellen zunächst in eiskalter PBS gewaschen um ihren biochemischen Zustand zu konservieren. Dann wurde auf die Filter 100 µl eines speziellen Lysepuffers für Phosphoblots gegeben, die Zellen mithilfe eines Schabers abgeschabt und in

den nächsten Filter bzw. in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis, wurde die Probe im Ultraschallgerät UP50H (FA Hielscher, Teltow) 5 Minuten sonifiziert. Anschließend wurde in der Tischzentrifuge 15 Minuten bei 18620 x g zentrifugiert und der Überstand entnommen und bei -80° C asserviert.

Es wurde keine Proteinquantifizierung durchgeführt, sondern 20 μ l Probe mit 5 μ l 5x Laemmli-Puffer auf das Gel der PAGE aufgetragen. Im weiteren Verlauf des Blottens wurde das phosphatfreie TBST zum Waschen und in der Antikörperlösung verwendet um nachträgliche artifizielle Phosphorylierungen zu vermeiden. Außerdem wurden die Phospho-Antikörper über Nacht inkubiert (Konzentrationen: 1:1000 Anti-Phospho-p38 und Anti-Phospho-MLCK2, 1:2000 Anti-Phospho-Akt und Anti-Phospho-p42/44). Zur Probe wurden auch die nicht phosphorylierten Anteile der betrachteten Proteine detektiert. Dazu wurden die Blots nach der ersten Detektion gestrippt, d.h. die Antikörper entfernt. Dies geschah mit dreimaligem Verwenden von siedendheißem Wasser, und anschließendem Waschen in TBST. Nach der zweiten Detektion war noch eine dritte notwendig um mittels der Bestimmung des ubiquitär vorhandenen β -Actin Rückschlüsse auf den Gesamtproteingehalt zu erhalten.

3.2.5.3. Proteinquantifizierung

Die Proteinquantifizierung der Zellmaterialien, die später für den Western Blot verwendet werden sollten, soll garantieren, dass die verwendeten Proteinmengen aus jeder Probe gleich und etwaige Unterschiede in der Menge einzelner Proteine nicht auf allgemeine Proteinvermehrung zurückzuführen ist. Dazu wurde die Methode von Pierce angewandt, bei der Proteinbestandteile in alkalischer Lösung zweiwertige Kupferionen reduzieren und chelatieren (Biuret-Reaktion) und anschließend mittels BCA (bichionnic acid) einen violetten Komplex formen, der bei 562 nm detektiert werden können. Je mehr Protein vorhanden ist, desto stärker die Färbung und desto höher die Absorption. Da gleichzeitig zu den zu untersuchenden Proben auch eine Reihe aufsteigender, bekannter Proteinkonzentrationen bestimmt wurde, kann die genaue Konzentration ermittelt werden.

Auf 96-well-Mikrotiterplatten wurden die Proben jeweils gedoppelt aufgetragen. Dies ermöglichte eine Mittelwertbildung und somit Reduktion des Fehlers. Die Proben wurden mit der BCA-Gebrauchslösung 1:20 gemischt. Dabei bestand die BCA-Gebrauchslösung selbst aus 20:1 Lösung A (Pierce BCA Protein Assay Reagent) und Lösung B (Pierce BCA Protein Reagent). Als Standards wurden definierte Proteinmengen in Form einer aufsteigenden Konzentration von BSA (0, 0.2, 0.8 und 1.2 mg/ml) wieder als Doppelwerte aufgetragen, ferner ein Doppelfeld nur mit dem vorher verwendeten Lysepuffer. Die Absorptionsmessung erfolgte nach 30-minütiger Inkubation bei 37° C am Photometer Tecan Spectra bei 562 nm.

3.2.5.4. SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) dient dem größenabhängigen Auftrennen der Proteine im elektrischen Feld. Hierbei führt das SDS einerseits zur Denaturierung der Proteine und andererseits durch die Sulfatgruppen zur Anlagerung von negativen Ladungen an die Proteine (deren Eigenladung dadurch gleichsam „vernebelt“ wird). Dadurch hängt die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld nicht mehr von der Konformation oder der Ausgangsladung des Proteins durch die unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung ab, sondern nur von seiner Größe. Das Polyacrylamidgel bildet Poren, durch die die Proteine auf ihrer Wanderung zur Anode hindurchtreten müssen: Je größer das Protein, desto geringer seine Wanderungsgeschwindigkeit und umgekehrt. Es wird zwischen dem Trenngel, welches die Proteine nach seiner Größe differenziert und dem Sammelgel, in welches die Proben hineingegeben werden, unterschieden. Das Trenngel kann in seiner Zusammensetzung so variiert werden, dass es in einem bestimmten Größenbereich die höchste Trennschärfe hat. So eignet sich ein 7,5 %- oder 8,5 %-Gel für größere Proteine (> 200 kDa), während sich 12,5 %-Gele eher für kleinere Proteine, z.B. Claudine mit ca. 26 kDa eignen. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil des Polyacrylamids.

Zuerst erfolgte die Herstellung des Trenngels. Nach Ethanolüberschichtung wurde das Gel für 30 Minuten polymerisiert. Das Gel befand sich zwischen Glasscheiben (Abstand 1,5 mm). Anschließend wurde das Ethanol abgegossen und das Sammelgel darüber gegossen (4 % Polyacrylamidanteil). Dabei wurde ein Kamm während der wiederum 30-minütigen Polymerisation belassen, der nach dem Herausziehen die Taschen für die Proben bildete. Danach wurden die Gele in die Elektrophoresekammer verbracht und dort in Elektrophoresepuffer getaucht. Die Proben wurden aufgetragen. Dabei war zu beachten, dass die Proben den gleichen Proteingehalt (meist 5 µg) aufwiesen (in Proteinquantifizierung bestimmt), was bedeutete, dass die Volumina des Proteinanteils variieren konnten. Diese wurden durch Zusatz des Lysepuffers aufgefüllt und ausgeglichen. 1/5 des Gesamtvolumens der Probe entfallen auf 5x Laemmli (meist 4 µl auf insgesamt 20 µl).

Vor Auftrag wurden die Proben 5 Minuten bei 96° C gekocht, damit die Proteine denaturieren. Neben den Banden der zu bestimmenden Proteine wurde für die spätere Zuordnung der Proteingröße eine Markerspür (Kaleidoskope Marker, Sigma) aufgetragen. Die Elektrophorese fand bei 100 V statt. Das im 5x Laemmli-Puffer enthaltene Bromphenolblau bildete dabei die vorderste Lauffront und diente neben den Markerspuren der Orientierung über das Fortschreiten der Elektrophorese.

3.2.5.5. Western Blot

Beim Blotten von Proteinen wurden diese nun aus dem Gel, in dem sie in der SDS-PAGE aufgetrennt worden waren, auf eine Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF-Membran) verbracht. Dies dient der besseren Zugänglichkeit für Antikörper, der durch die Dünne der Membran bedingte höhere Konzentration, die feste Bindung und damit anders als im Gel reduzierte Diffusionsbereitschaft und schließlich der besseren Weiterverarbeitung mit einem deutlich stabileren und handlicherem Träger für die nachfolgenden Manipulationen.

Die Membran wurde zunächst in Ethanol mindestens fünf Minuten inkubiert, um die Oberflächenspannung zu nehmen. Dann erfolgte die Äquilibration in Transferpuffer. Anschließend wurden Membran und Gel aneinandergestellt, auf beide Seiten jeweils ein Filterpapier und eine Schwammplatte, welche dann mithilfe einer verriegelbaren Kunststoffpresse geschlossen wurden. Die Anordnung war wie folgt:

Klares Kunststoffpanel
Schwamm
Filter
PVDF-Membran
Gel
Filter
Schwamm
Schwarzes Kunststoffpanel.

Etwaige Luftblasen wurden mithilfe von Glaspipetten ausgestrichen. Das Blot-Sandwich wurde in die Blottingkammer (Biorad) eingesetzt, so dass die PVDF-Membran zur Anode zeigte. Anschließend wurde unter Kühlung mittels Eisakku (durch suffiziente Kühlung wird die thermische Bewegung der Proteine reduziert, wodurch die Banden schärfer dargestellt werden) und unter Durchmischung mittels Magnetrührer bei 100 V für 1 Stunde geblottet.

Nach dem Blot wurde durch einen Waschschrift Transferpuffer mittels PBST (PBS plus 0,1 % ml/ml Tween 20) entfernt. Dabei war Tween 20 ein Detergens. Anschließend fand der Blockierungsschritt mit einer Lösung aus 5 % BSA und 0,02 % NaAzid in PBST für mindestens 2 h statt. Der Erstantikörper wurde in der gerade beschriebenen Lösung in Küvetten auf die Membranen unter Schütteln verbracht und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (alternativ bei 4 ° C über Nacht. Die Konzentrationen (auf 5 % BSA-Lösung) waren dabei folgende:

Rabbit Anti-Cldn-1 1:1000

Rabbit Anti-Cldn-2	1:1000
Rabbit Anti-Cldn-3	1:2000
Mouse Anti-Cldn-4	1:1000
Rabbit Anti-Cldn-7	1:1000
Rabbit Anti-Cldn-8	1:1000
Rabbit Anti-Occludin	1:2000
Mouse Anti-ZO-1	1:1000
Mouse Anti-E-Cadherin	1:1000.

Danach erfolgte zweimaliges zehnminütiges Waschen in PBST und anschließend einmaliges zehnminütiges Waschen in TBST.

Der Zweitantikörper (Konzentration 1:10000, in 1% Blocking Reagenz von Lumilight, Roche in TBST) wurde 60 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte nochmalig der oben beschriebene dreimalige Waschvorgang. Die Antikörper waren mit Meerrettichperoxidase markiert und somit in der Lage in der Substratlösung (1:1 Lösung A „Luminol/Enhancer Solution“ und Lösung B „stable peroxide solution“, Lumilight®) nach fünfminütiger Inkubation im Dunkeln einen Farbstoff auszufällen, der dann die betrachteten Banden mit einer Emissionswellenlänge von 425 nm angab. Diese wurden dann mit dem Lumineszenzbildanalysator Fujifilm LAS 1000 mittels einer CCD-Kamera aufgenommen und gespeichert. Zudem wurde ein Bild der Markerspuren aufgenommen, um die Proteingröße nachzuvollziehen.

Die gespeicherten Bilder wurden densitometrisch mithilfe der Programme AIDA Raytest® oder Multigauge® quantitativ ausgewertet. Dies geschah, indem digital die Dichte und Schwärze der einzelnen Banden verglichen wurde. Anschließend erfolgte die statistische Mittelwert- und Standardfehlerbestimmung sowie die Normierung der Kontrollbande auf 100 %.

4. Ergebnisse

4.1. Elektrophysiologische Effekte von Protamin auf MDCK-Zellen

Das Verhalten der einzelnen Zellklone war je nach Zellklon unterschiedlich. Es wurden MDCK-Wildtypen sowie Klone des Typs MDCK C7 betrachtet, welche mit unterschiedlichen Claudinen transfiziert worden waren. Bei der Betrachtung der folgenden Ergebnisse ist zu beachten, dass durch die Transfektion mit porenbildenden Claudinen die Widerstände meist unterhalb von $1000 \Omega\text{-cm}^2$ lagen und zudem je nach Klon variierten. Die folgende Beschreibung der Widerstandsveränderung unter Protamin legt die Ausgangswiderstände vor Protamingabe und das Widerstandsniveau fünf Minuten nach Protamingabe zugrunde. Es werden die n-Zahlen sowie zu beiden Werten die Standardfehler („standard error of the mean“, SEM) angegeben. In den Graphiken wurden die Ausgangswiderstände auf 100 % festgelegt. Die SEM wurden auf diese relativen Werte umgerechnet. Die Widerstandswerte wurden auf zwei Dezimalstellen genau angegeben. Das Signifikanzniveau wurde mithilfe des ungepaarten t-Tests ermittelt. Die p-Werte werden auf drei Dezimalstellen genau angezeigt.

4.1.1. Effekte von Protamin auf Wildtypen und Vektorkontrollen

Betrachtet man die Wildtypen der hochohmigen Zellen MDCK I und C7 sowie die Vektorkontrollen, so ließen sich keine signifikanten Widerstandsveränderungen feststellen. Tendenziell nahm der Widerstand im Beobachtungszeitraum sogar ab.

Bei MDCK I-Zellen wurde vor Protaminzugabe ein Widerstand von $1655,37 \pm 137,12 \Omega\cdot\text{cm}^2$ gemessen. Nach Protaminzugabe betrug dieser $1369,00 \pm 116,88 \Omega\cdot\text{cm}^2$ (n=10, n.s.).

Bei MDCK C7-Zellen betrug der Ausgangswiderstand $2049,69 \pm 249,17 \Omega\cdot\text{cm}^2$, nach Protaminzugabe betrug der Widerstand $1613,46 \pm 175,68 \Omega\cdot\text{cm}^2$ (n=9, n.s.).

Bei den MDCK C7-CMV4-Vektorkontrollen betrug der Ausgangswiderstand $2227,01 \pm 170,99 \Omega\cdot\text{cm}^2$, nach Protaminapplikation war der Widerstand $2233,32 \pm 119,34 \Omega\cdot\text{cm}^2$ (n=8, n.s.).

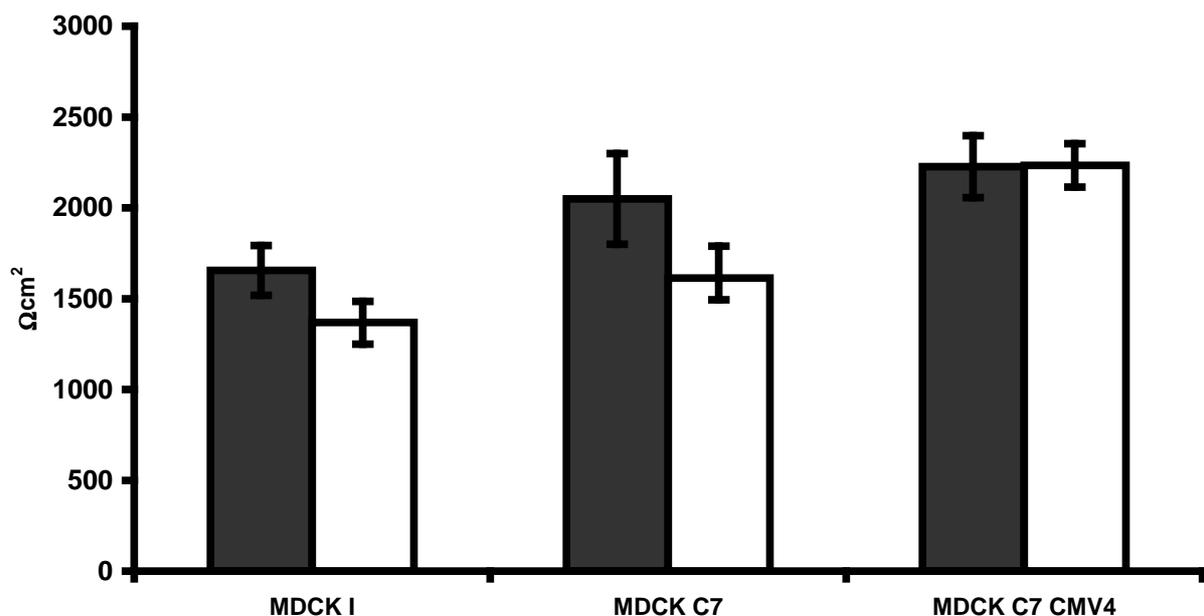


Abb.1 Transepithelialer Widerstand (TER) konfluenter Monolayer der Zelltypen MDCK I, MDCK C7 und MDCK CMV4 (Mock-transfizierte Vektorkontrolle). Die dunkle Säule repräsentiert das Widerstandsniveau vor, die helle Säule das Widerstandsniveau fünf Minuten nach Protaminapplikation. Dabei zeigten sich keine signifikanten Veränderungen.

4.1.2. Effekte von Protamin auf Claudin-10a-transfizierte Zellklone

Die mit Claudin-10a transfizierten MDCK C7-Zellen (MDCK C7 Cldn-10a-v1, murin) hatten Ausgangswiderstände von $2488,46 \pm 448,79 \Omega \cdot \text{cm}^2$, nach Protaminapplikation zeigten sich Widerstände von $2638,64 \pm 483,19 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (n=4, n.s.).

Die mit Claudin-10a $\Delta 57$ transfizierten MDCK C7-Zellen (MDCK C7 Cldn-10a $\Delta 57$ Nr. 26, murin) hatten Ausgangswiderstände von $2202,69 \pm 141,99 \Omega \cdot \text{cm}^2$, nach Protaminzugabe zeigten sich Widerstände von $2301,30 \pm 149,94 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (n=8, n.s.).

Claudin-10a $\Delta 57$ transfizierte MDCK C7-Zellen (MDCK C7 Cldn-10a $\Delta 57$ Nr. 30, murin) zeigten Ausgangswiderstände von $4282,3 \pm 567,02 \Omega \cdot \text{cm}^2$, nach Protaminapplikation betragen die Widerstände $4462,58 \pm 525,35 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (n=4, n.s.).

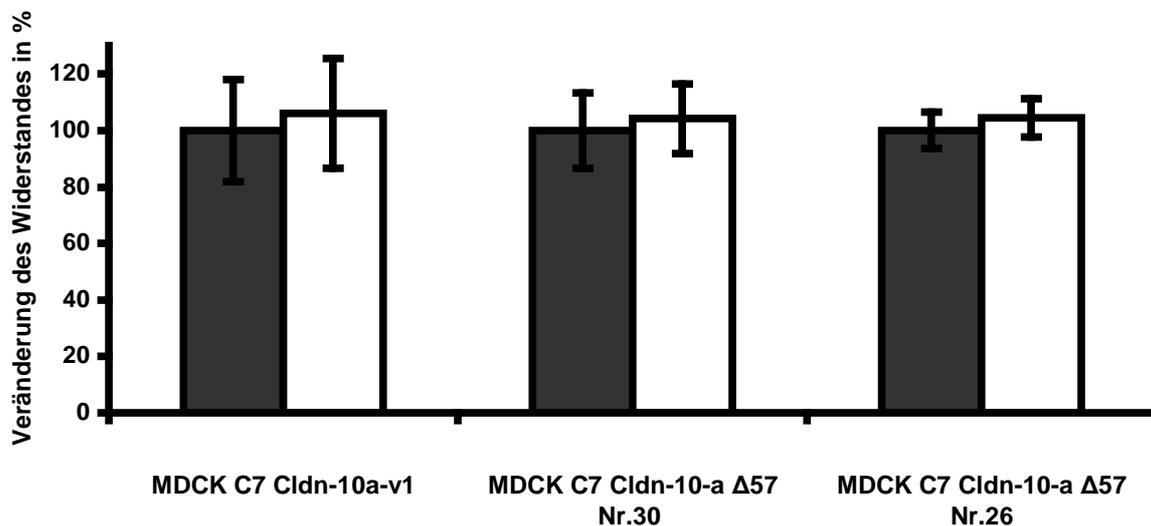


Abb. 2 Relative Veränderung des transepithelialen Widerstandes (TER) konfluenter Monolayer Claudin-10a-transfizierter MDCK C7-Zellen. Die dunkle Säule repräsentiert das Widerstandsniveau vor, die helle Säule das Widerstandsniveau fünf Minuten nach Protaminapplikation. Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen.

4.1.3. Effekte von Protamin auf Claudin-16-transfizierte Zellklone

Bei Claudin-16 wurden ebenfalls drei unterschiedliche Subtypen betrachtet. Der Klon MDCK C7 Claudin-16-2-11 (murin) zeigte vor Protaminapplikation Widerstände von $2331,13 \pm 300,25 \Omega\cdot\text{cm}^2$, nach Protaminapplikation betragen diese $2442,04 \pm 233,40 \Omega\cdot\text{cm}^2$ ($n=6$, n.s.). Der Klon MDCK C7 Claudin-16-63 (murin) zeigte initial Widerstände von $463,65 \pm 85,84 \Omega\cdot\text{cm}^2$, nach Protaminapplikation betragen diese $520,80 \pm 104,30 \Omega\cdot\text{cm}^2$ ($n=3$, n.s.). Der Klon MDCK C7 Claudin 16-63 (human) zeigte initial Widerstände von $570,49 \pm 34,26 \Omega\cdot\text{cm}^2$, nach Protaminapplikation betragen diese $602,87 \pm 38,23 \Omega\cdot\text{cm}^2$ ($n=6$, n.s.).

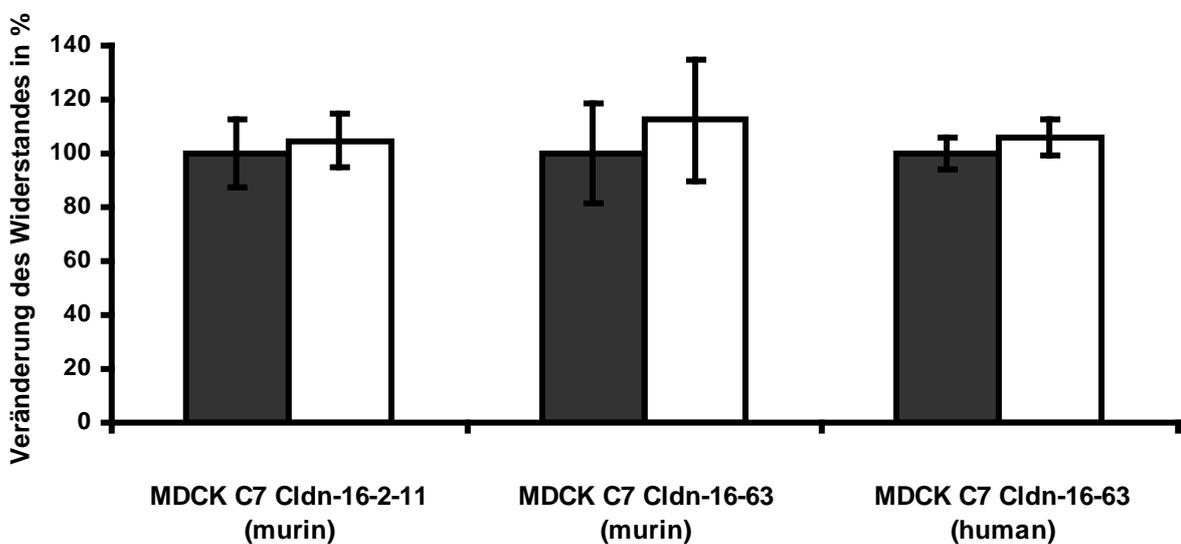


Abb. 3 Relative Veränderung des transepithelialen Widerstandes (TER) konfluenten Monolayer Claudin-16-transfizierter MDCK C7-Zellen. Die dunkle Säule repräsentiert das Widerstandsniveau vor, die helle Säule das Widerstandsniveau fünf Minuten nach Protaminapplikation. Dabei zeigten sich keine signifikanten Veränderungen.

4.1.4. Effekte von Protamin auf Claudin-2- und Claudin-10b-transfizierte Zellklone

Zu deutlichen Widerstandszunahmen kam es hingegen bei Klonen, welche mit Claudin-2 oder Claudin-10b transfiziert wurden. Klone von Claudin-2 und Claudin-10b haben die höchsten Widerstandszunahmen von bis über 50 % gegenüber den Ausgangswerten. Im Einzelnen:

Die mit Claudin-2 transfizierten MDCK C7-Zellen (MDCK C7 Cldn-2 Nr.6 CMV4, human) veränderten dabei unter Protamin ihren Widerstand von $221,84 \pm 9,32 \Omega \cdot \text{cm}^2$ auf $258,42 \pm 8,69 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n=6$, $p=0,017$). Die Veränderung war statistisch signifikant (*).

Bei mit Claudin-10b transfizierten MDCK C7-Zellen wurden zwei Klone betrachtet. Der Klon MDCK C7 Cldn-10b Nr.1 CMV4 (human) zeigte vor Protaminzugabe Widerstände von $174,4 \pm 6,69 \Omega \cdot \text{cm}^2$, nach Protaminapplikation betragen diese $261,55 \pm 9,80 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n=5$, $p<0,001$). Die Veränderung war damit statistisch extrem signifikant (***).

Der Klon MDCK C7 Claudin-10b Nr.47 CMV4 (murin) zeigte vor Protaminzugabe Widerstände von $814,87 \pm 66,88 \Omega \cdot \text{cm}^2$, nach Protamingabe stiegen die Widerstände auf $1247,62 \pm 93,77 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n=5$, $p=0,006$). Die Widerstandszunahme war damit statistisch sehr signifikant (**). Von der Größenordnung her war der Effekt bei Claudin-10b transfizierten Zellklone fast dreimal stärker als bei Claudin-2 transfizierten Zellklonen.

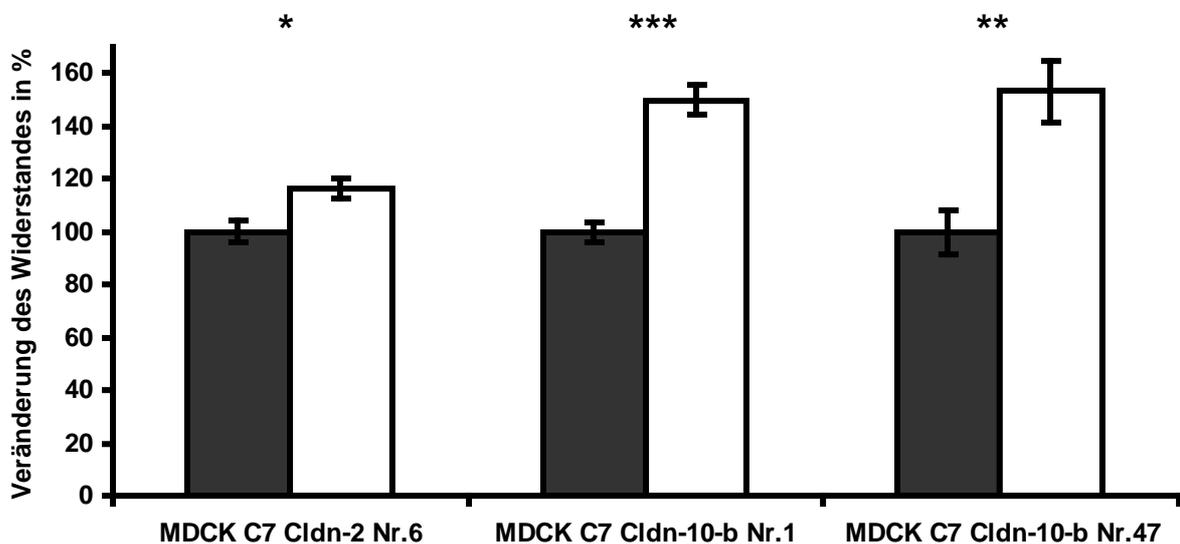


Abb. 4 Relative Veränderung des transepithelialen Widerstandes (TER) konfluenter Monolayer Claudin-2- und Claudin-10b-transfizierter Zellklone (MDCK C7-Zellen). Die dunkle Säule repräsentiert das Widerstandsniveau vor, die helle Säule das Widerstandsniveau fünf Minuten nach Protaminapplikation. Es zeigten sich statistisch signifikante Zunahmen der Widerstände von bis über 50 % (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

4.1.5. Effekte von Protamin bei 4° C

Die protaminbedingte Widerstandszunahme zeigte sich auch bei Temperaturen von 4° C. Betrachtet wurden MDCK II-Zellen sowie mit Claudin-2 (Nr. 6, CMV4, human) und Claudin-10b (Nr. 47, CMV4, murin) transfizierte MDCK C7-Zellen.

Bei MDCK II-Zellen lagen die Ausgangswiderstände bei $83,06 \pm 4,42 \Omega \cdot \text{cm}^2$, nach Protaminapplikation betragen die Widerstände $101,92 \pm 6,24 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n=4$, $p=0,048$,).

Claudin-2-transfizierte Zellen zeigten Ausgangswiderstände von $770,18 \pm 35,91 \Omega \cdot \text{cm}^2$, nach Protaminzugabe lagen die Widerstände bei $912,89 \pm 47,51 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n=6$, $p=0,038$).

Claudin-10b-transfizierte MDCK C7-Zellen wiesen Ausgangswiderstände von $1747,06 \pm 46,91 \Omega \cdot \text{cm}^2$ auf, nach Protamingabe zeigten sich Widerstände von $2012,88,5 \pm 65,50 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n=5$, $p=0,011$). Damit waren die beobachteten Widerstandserhöhungen bei 4° C für alle betrachteten Zelltypen statistisch signifikant.

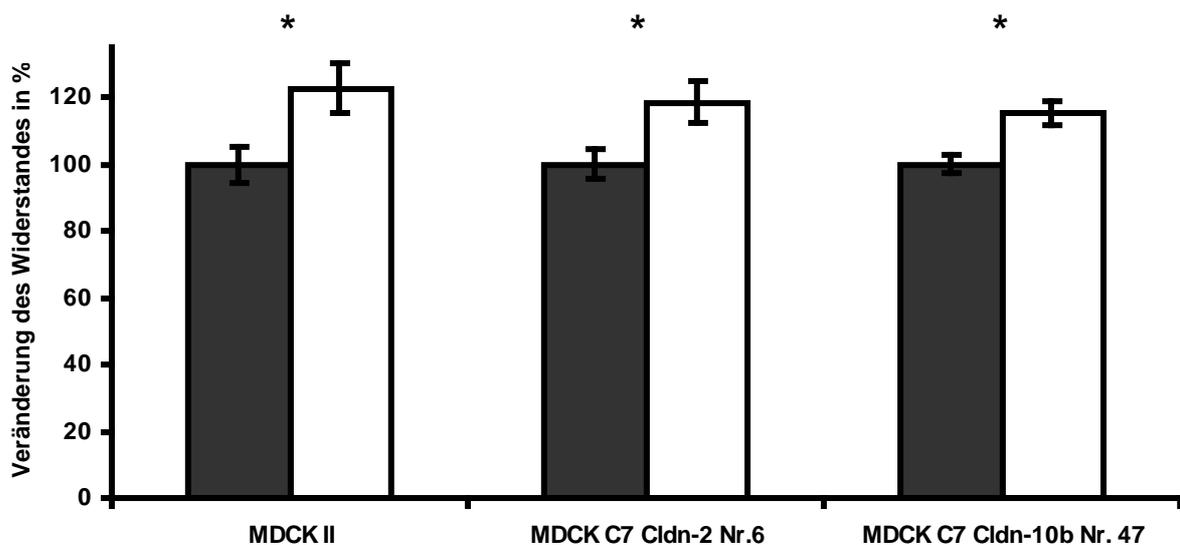


Abb. 5 Relative Veränderung des transepithelialen Widerstandes (TER) konfluenter Monolayer Claudin-2- und Claudin-10b-transfizierter MDCK C7-Zellen und MDCK II-Zellen bei 4 °C. Die dunkle Säule repräsentiert wiederum das Widerstandsniveau vor, die helle Säule das Widerstandsniveau fünf Minuten nach Protaminapplikation. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme des Widerstandes unter Protamin auch unter Bedingungen von 4 °C bei allen betrachteten Zelltypen (* $p < 0.05$).

4.1.6. Einfluss von Inhibitoren auf den Protamineffekt

Zur Detektion eventuell beteiligter Signalwege wurden Inhibitorenexperimente durchgeführt. Betrachtet wurden hierfür MDCK II- und MDCK C11-Zellen und die Inhibitoren Ly294004, BAPTA-AM, H-8, ML-7, L-NAME, SB212090, UO126. Da oberhalb der wirksamen Konzentration verschiedene Konzentrationen verwendet wurden, werden im folgenden Konzentrationsbereiche angegeben. Dies gilt ebenso für die Kontrollexperimente, da weder bei Leerkontrollen noch bei DMSO Effekte auf den Widerstand zu erkennen waren. Zur Ermittlung statistischer Unterschiede zwischen Protamineffekten bei Inhibitoren und Kontrollen, wurde die Differenz vor und nach Protaminapplikation gebildet und Kontrollen und Inhibitoren mithilfe des ungepaarten t-Tests verglichen. Die SEM wurden wieder auf die relativen Werte umgerechnet.

4.1.6.1. Einfluss von Inhibitoren auf den Protamineffekt an MDCK C11-Zellen

Unter Einsatz von Ly294004, BAPTA-AM, H-8, ML-7, L-NAME kam es zu keiner Hemmung des Protamineffekts. Im Einzelnen:

Unter Ly292040 (30 μM , n=3) betragen die Ausgangswiderstände $107,43 \pm 5,01 \Omega \cdot \text{cm}^2$, nach Protaminzugabe $137,90 \pm 9,50 \Omega \cdot \text{cm}^2$. In der Kontrollgruppe (0 – 0,06 % DMSO, n=3) betragen die Ausgangswiderstände $83,02 \pm 16,76 \Omega \cdot \text{cm}^2$, nach Protaminzugabe betragen die Widerstände $107,33 \pm 23,56 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Der Unterschied zwischen beiden Protamineffekten war statistisch nicht signifikant ($p=0,502$).

Unter BAPTA-AM (10 μM , n=7) betragen die Ausgangswiderstände $53,55 \pm 4,15 \Omega \cdot \text{cm}^2$, nach Protaminapplikation zeigten sich Widerstände von $72,66 \pm 5,66 \Omega \cdot \text{cm}^2$. In der Kontrollgruppe (0 – 0,1 % DMSO, n=7) betragen die Ausgangswiderstände $44,94 \pm 4,30 \Omega \cdot \text{cm}^2$, nach Protaminapplikation zeigten sich Widerstände von $57,53 \pm 6,93 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p=0,079$).

Unter H-8 (20-80 μM , n=7) betragen die Ausgangswiderstände $58,17 \pm 5,29 \Omega \cdot \text{cm}^2$, nach Protaminapplikation zeigten sich Widerstände von $69,61 \pm 6,50 \Omega \cdot \text{cm}^2$. In der Kontrollgruppe (0 – 0,1 % DMSO, n=9) betragen die Ausgangswiderstände $48,63 \pm 2,75 \Omega \cdot \text{cm}^2$, nach Protaminapplikation zeigten sich Widerstände von $57,07 \pm 4,03 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p=0,177$).

Unter ML-7 (1 - 2 μM , n=7) betragen die Ausgangswiderstände $41,50 \pm 3,31 \Omega \cdot \text{cm}^2$, nach Protaminapplikation zeigten sich Widerstände von $47,74 \pm 4,33 \Omega \cdot \text{cm}^2$. In der Kontrollgruppe (0,06 – 0,1 % DMSO, n=8) kam es zu einem Anstieg von $38,44 \Omega \cdot \text{cm}^2 \pm 1,79 \Omega \cdot \text{cm}^2$ auf $44,37 \Omega \cdot \text{cm}^2 \pm 2,20 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p=0,805$).

Unter L-NAME (300 μ M, n=4) betragen die Ausgangswiderstände $67,73 \pm 5,64 \Omega\cdot\text{cm}^2$, nach Protaminapplikation zeigten sich Widerstände von $101,36 \pm 13,32 \Omega\cdot\text{cm}^2$. In der Kontrollgruppe (kein Lösungsmittel, n=3) betragen die Ausgangswiderstände $79,01 \pm 4,50 \Omega\cdot\text{cm}^2$, nach Protaminapplikation zeigten sich Widerstände von $109,46 \pm 7,71 \Omega\cdot\text{cm}^2$. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant (p=0,776).

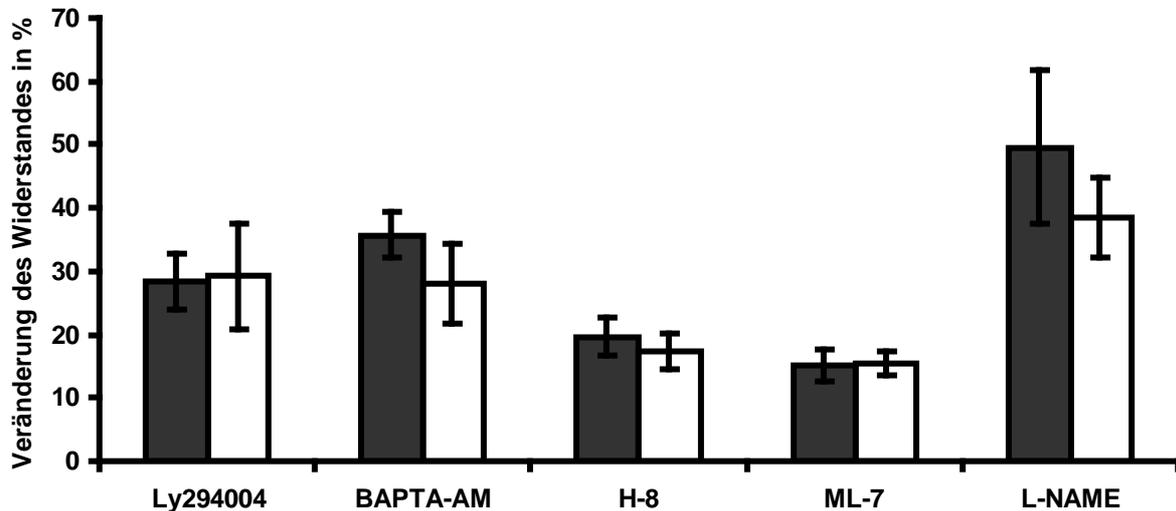


Abb. 6 Vergleich der relativen Veränderung des transepithelialen Widerstandes (TER) konfluenter Monolayer von MDCK C11-Zellen mit und ohne Inhibitorzusatz unter Protaminapplikation. Die dunkle Säule repräsentiert die Widerstandsveränderung mit Inhibitor, die helle Säule die Widerstandsveränderung der Kontrollen mit Leerwerten bzw. DMSO-Zusatz (Einzelheiten siehe Haupttext). Es wurden die Veränderungen verglichen, die jeweils fünf Minuten nach Protaminapplikation auftraten. Keiner der verwendeten Inhibitoren vermochte den Effekt von Protamin zu hemmen.

4.1.6.2. Einfluss von Inhibitoren auf den Protamineffekt an MDCK II-Zellen

Auch an MDCK II-Zellen kam es unter Einsatz von Ly294004, BAPTA-AM, H-8, ML-7, L-NAME, UO126 und SB212090 zu keiner Hemmung des Protamineffekts. Im Einzelnen:

Unter Ly292040 (20 - 30 μ M, n=9) betragen die Ausgangswiderstände $66,81 \pm 3,51 \Omega\cdot\text{cm}^2$, nach Protaminapplikation zeigten sich Widerstände von $85,16 \pm 6,61 \Omega\cdot\text{cm}^2$. In der Kontrollgruppe (0 - 0,1 % DMSO, n=9) betragen die Ausgangswiderstände $61,68 \pm 6,11 \Omega\cdot\text{cm}^2$, nach Protaminapplikation zeigten sich Widerstände von $76,61 \pm 9,63 \Omega\cdot\text{cm}^2$. Der Unterschied zwischen beiden Protamineffekten war statistisch nicht signifikant (p=0,5).

Unter BAPTA-AM (8 - 10 μ M, n=8) waren die Ausgangswerte $60,36 \pm 8,87 \Omega\cdot\text{cm}^2$, nach Protamingabe $70,06 \pm 10,89 \Omega\cdot\text{cm}^2$. In der Kontrollgruppe (0 - 0,08 % DMSO, n=8)

veränderten sich die Werte von $66,04 \pm 3,48 \Omega \cdot \text{cm}^2$ auf $75,71 \pm 4,95 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p=0,986$).

Unter H-8 (20 - 80 μM , $n=9$) betrug die Ausgangswiderstände $46,45 \pm 6,85 \Omega \cdot \text{cm}^2$, nach Protaminapplikation zeigten sich Widerstände von $53,27 \pm 7,87 \Omega \cdot \text{cm}^2$. In der Kontrollgruppe (0 - 0,1 % DMSO, $n=8$) betrug die Ausgangswiderstände $46,54 \pm 4,04 \Omega \cdot \text{cm}^2$, nach Protaminapplikation zeigten sich Widerstände von $53,45 \pm 5,02 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p=0,956$).

Unter ML-7 (0,2 - 3 μM , $n=10$) betrug die Ausgangswiderstände $66,30 \pm 8,29 \Omega \cdot \text{cm}^2$, nach Protaminapplikation zeigten sich Widerstände von $77,05 \pm 9,91 \Omega \cdot \text{cm}^2$. In der Kontrollgruppe (0 - 0,1 % DMSO, $n=15$) betrug die Ausgangswiderstände $60,91 \pm 4,33 \Omega \cdot \text{cm}^2$, nach Protaminapplikation zeigten sich Widerstände von $78,31 \pm 5,62 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Der Unterschied der beiden Protamineffekte war statistisch nicht signifikant ($p=0,14$).

Unter L-NAME (100 - 200 μM , $n=5$) betrug die Ausgangswiderstände $49,82 \pm 3,34 \Omega \cdot \text{cm}^2$, nach Protaminapplikation zeigten sich Widerstände von $54,54 \pm 3,68 \Omega \cdot \text{cm}^2$. In der Kontrollgruppe (kein Lösungsmittel, $n=5$) betrug die Ausgangswiderstände $46,07 \pm 5,45 \Omega \cdot \text{cm}^2$, nach Protaminapplikation zeigten sich Widerstände von $51,31 \pm 6,21 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Der Unterschied war damit statistisch nicht signifikant ($p=0,617$).

Unter UO126 (4 μM , $n=3$) betrug die Ausgangswiderstände $67,83 \pm 7,94 \Omega \cdot \text{cm}^2$, nach Protaminapplikation zeigten sich Widerstände von $84,04 \pm 11,39 \Omega \cdot \text{cm}^2$. In der Kontrollgruppe (0,1 % DMSO, $n=3$) betrug die Ausgangswiderstände $67,07 \pm 4,16 \Omega \cdot \text{cm}^2$, nach Protaminapplikation zeigten sich Widerstände von $80,52 \pm 7,00 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p=0,606$).

Unter SB212090 (20 μM , $n=3$) betrug die Ausgangswiderstände $88,28 \pm 3,84 \Omega \cdot \text{cm}^2$, nach Protaminapplikation zeigten sich Widerstände von $115,02 \pm 6,18 \Omega \cdot \text{cm}^2$. In der Kontrollgruppe (0,1 % DMSO, $n=3$) betrug die Ausgangswiderstände $66,79 \pm 9,65 \Omega \cdot \text{cm}^2$, nach Protaminapplikation zeigten sich Widerstände von $81,53 \pm 13,03 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p=0,092$).

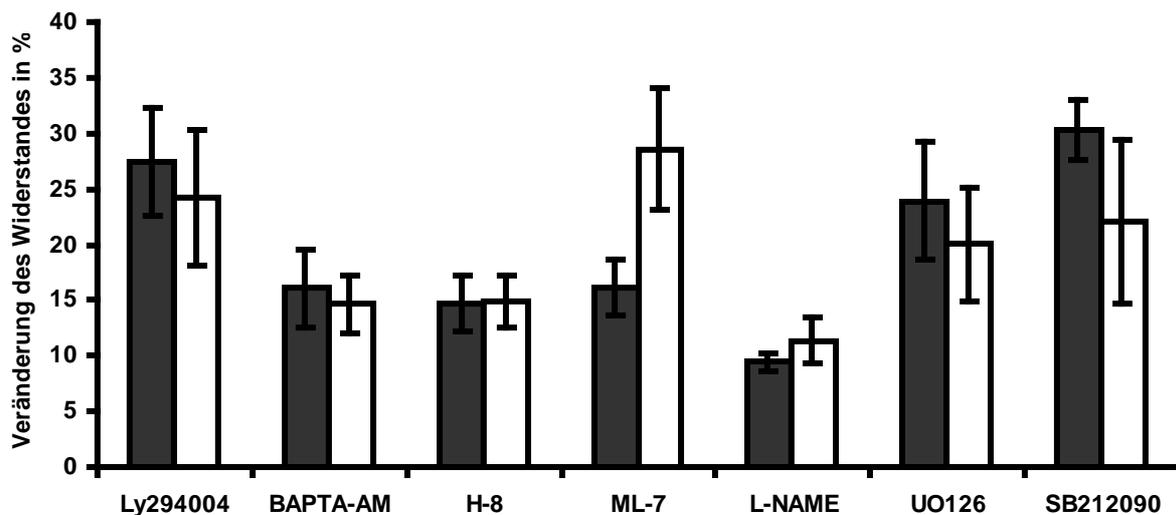


Abb. 7 Vergleich der relativen Veränderung des transepithelialen Widerstandes (TER) konfluenter Monolayer von MDCK II-Zellen mit und ohne Inhibitorzusatz jeweils nach Protaminapplikation. Die dunkle Säule repräsentiert die Widerstandsveränderung mit Inhibitor, die helle Säule die Widerstandsveränderung der Kontrollen mit bzw. ohne DMSO-Zusatz. Es wurden die Veränderungen verglichen, die jeweils fünf Minuten nach Protaminapplikation auftraten. Keiner der verwendeten Inhibitoren konnte den Effekt von Protamin zu hemmen (n.s.).

4.1.6.3. Einfluss weiterer Inhibitoren auf den Protamineffekt

Der Inhibitor Nystatin blockiert die caveolinabhängige Endozytose, Chlorpromazin hingegen die clathrinabhängige. Keine der beiden Substanzen vermochte den Protamineffekt zu hemmen. Im Einzelnen:

Bei MDCK II-Zellen unter Nystatin (6 - 10 µg/ml, n=5) veränderten sich die Widerstände von $45,23 \pm 1,38 \Omega \cdot \text{cm}^2$ auf $56,34 \pm 1,50 \Omega \cdot \text{cm}^2$. In der Kontrollgruppe (0,02 – 0,05 % DMSO, n=3) veränderten sich die Werte von $47,92 \pm 0,46 \Omega \cdot \text{cm}^2$ auf $59,97 \pm 0,89 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant.

Chlorpromazin (50 µM, n=3) führte an Claudin-2-transfizierten MDCK C7-Zellen selbst zu einem schnellen Widerstandsanstieg, verhinderte den Protaminanstieg jedoch nicht. Es kam zu Anstiegen von $373,79 \pm 14,83 \Omega \cdot \text{cm}^2$ auf $412,17 \pm 14,49 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Die Kontrollen (n=3) stiegen von $219,39 \pm 24,09 \Omega \cdot \text{cm}^2$ auf $255,56 \pm 25,97 \Omega \cdot \text{cm}^2$ an. Das Ergebnis war statistisch nicht signifikant.

4.1.7. Einfluss von Protamin auf Ionenleitfähigkeiten

Unter Protaminapplikation konnten verminderte Leitfähigkeiten für monovalente Kationen (Na^+ , K^+ , Li^+ , Rb^+ , Cs^+) festgestellt werden. Die Leitfähigkeit für Cl^- blieb unverändert. Die Einheit der folgenden Leitfähigkeiten und SEM ist in 10^{-6} cm/s, ferner sind die betrachteten n-Zahlen der Kontrollen und von Protamin sowie die p-Werte angegeben:

Die Leitfähigkeit für Lithium (n=5 und n=6) verringerte sich von $37,71 \pm 0,86$ auf $31,30 \pm 0,52$ (10^{-6} cm/s), $p < 0,001$ (***). Die Leitfähigkeit für Natrium (n=5 und n=6) verringerte sich von $43,14 \pm 3,58$ auf $33,03 \pm 1,58$ (10^{-6} cm/s), $p = 0,022$ (*). Die Leitfähigkeit für Kalium (n=8 und n=11) verringerte sich von $46,37 \pm 0,31$ auf $35,03 \pm 0,51$ (10^{-6} cm/s), $p < 0,001$ (***). Die Leitfähigkeit für Rubidium (n=3 und n=6) verringerte sich von $44,84 \pm 0,95$ auf $32,79 \pm 1,01$ (10^{-6} cm/s), $p < 0,001$ (***). Die Leitfähigkeit für Cäsium (n=6 und n=6) verringerte sich von $39,27 \pm 1,42$ auf $30,26 \pm 0,80$ (10^{-6} cm/s), $p < 0,001$ (***). Die Leitfähigkeit für Chlorid (n=5 und n=6) veränderte sich von $14,73 \pm 3,87$ auf $16,38 \pm 2,40$ (10^{-6} cm/s), $p = 0,716$ (n.s.).

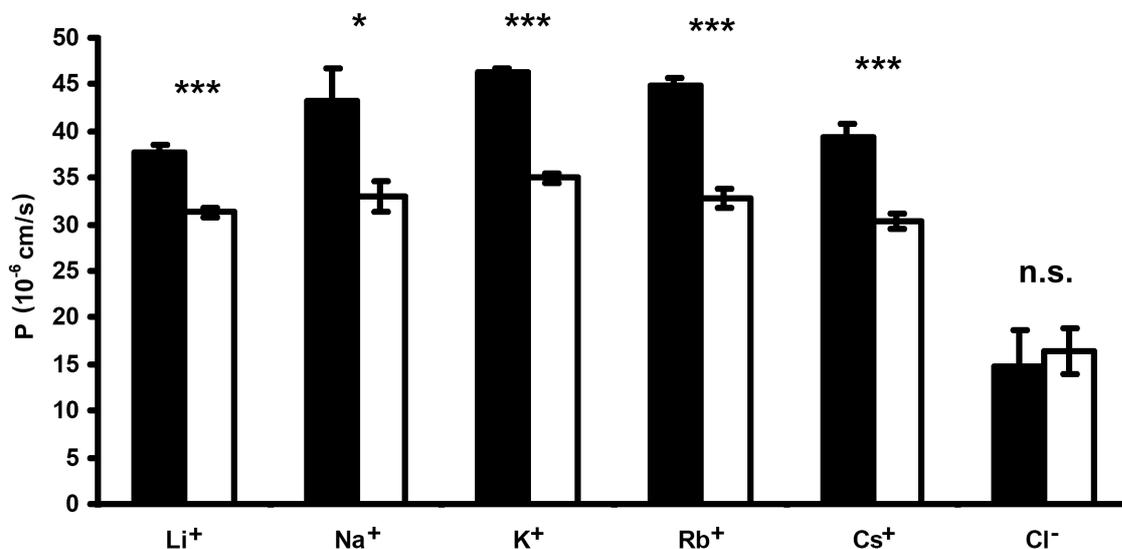


Abb. 8 Veränderung der Leitfähigkeit für monovalente Kationen und Chlorid an MDCK II-Monolayern nach Protaminapplikation. Die dunkle Säule repräsentiert die Leitfähigkeit vor, die helle die Leitfähigkeit nach Protaminapplikation. Bei allen betrachteten Kationen zeigte sich eine deutliche Abnahme der Leitfähigkeit, die Leitfähigkeit von Chlorid blieb unverändert.

4.2. Immunfluoreszenzfärbungen

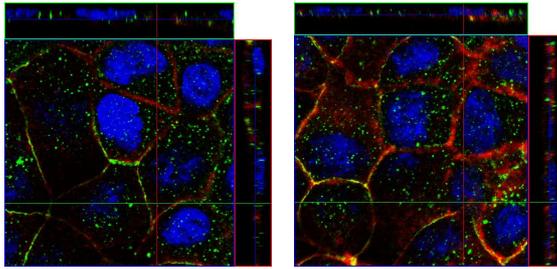
4.2.1. Betrachtete Zelltypen und Proteine

Immunfluoreszenzfärbungen wurden an MDCK I, II, C7 und C11 durchgeführt. Gefärbt wurden Claudin-1, -2, -3, -4, -7 und -8 sowie Occludin, F-Aktin, E-Cadherin und ZO-1. Darüber hinaus wurden Claudin-2-transfizierte MDCK-C7-Zellen näher analysiert. Aufgrund der hohen Anzahl unterschiedlicher Kombinationen und der zumeist eindeutigen Ergebnisse wurde die Anzahl der Versuche auf einheitlich n=4 begrenzt.

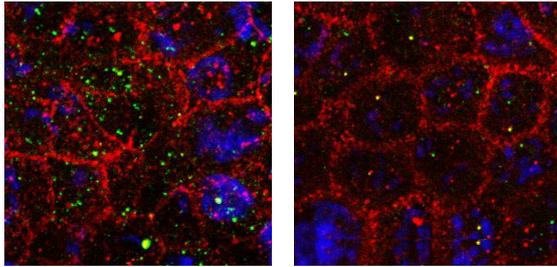
4.2.2. Qualitative Beurteilung

In der Immunfluoreszenz zeigte sich eine quantitative Abnahme der Claudin-2-Konzentration in der TJ nach Protamingabe. Nach Heparingabe erreichte das Claudin-2-Signal die Stärke der Kontrollproben. Occludin, Claudin-1, -3, 4, -7 zeigten keine Veränderungen. F-Aktin zeigte nach Protamingabe eine Dispersion des intrazellulären Signals. ZO-1 und Claudin-8 konnten aus technischen Gründen nicht beurteilt werden.

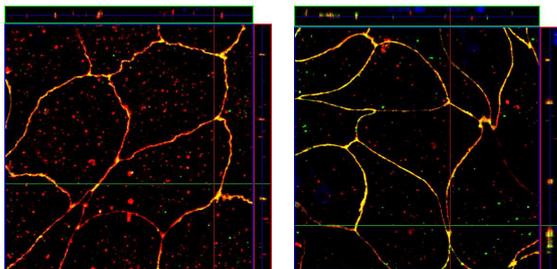
In den folgenden Abbildungen werden repräsentative Immunfluoreszenzbilder gefärbter MDCK II- oder MDCK C11-Monolayer gezeigt. Dabei ist links jeweils das Kontrollbild (ohne Protaminapplikation) und rechts das Bild nach fünfminütiger Protamininkubation zu sehen. Die Bildbalken oberhalb und zur rechten der einzelnen Bilder erlauben eine Zuordnung in der apiko-basalen Achse der Zellen jeweils in der durch rote bzw. grüne Linien gekennzeichneten Schnittebenen.



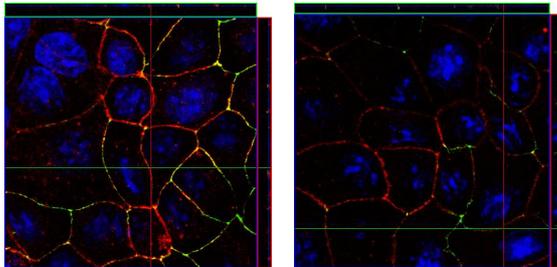
MDCK II-Zellen. Rot: F-Aktin, Grün: Claudin-1. Blau: Zellkernfärbung DAPI.



MDCK II-Zellen. Rot: Claudin-3, Grün: ZO-1. Blau: Zellkernfärbung DAPI.

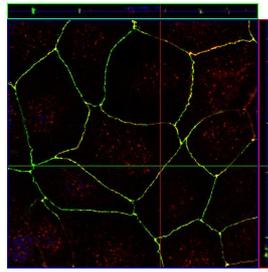
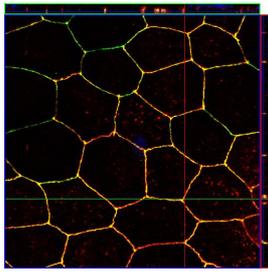


MDCK II-Zellen. Rot: Occludin, Grün: Claudin-4. Blau: Zellkernfärbung DAPI.

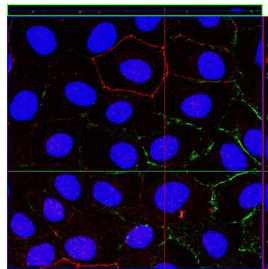
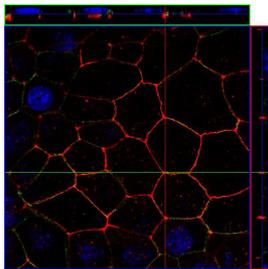


MDCK II-Zellen. Rot: Claudin-7, Grün: Occludin. Blau: Zellkernfärbung DAPI.

Abb. 9 Immunfluoreszenz an MDCK II-Monolayern vor und nach Protaminapplikation unter Betrachtung von Claudin-1, -3, -4 und -7, F-Aktin und Occludin. Dabei entsprechen die linksseitigen Aufnahmen den Kontrollen, während die rechtsseitigen denen nach fünfminütiger Protamininkubation entsprechen. F-Aktin zeigte eine Dispersion des Signals, während für Occludin, Claudin-1, -3, -4 und -7 keine Veränderung festgestellt werden konnte.



MDCK II-Zellen. Rot: Claudin-2, Grün: Occludin. Blau: Zellkernfärbung DAPI.



MDCK C11-Zellen. Rot: Claudin-2, Grün: E-Cadherin. Blau: Zellkernfärbung DAPI.

Abb. 10 Immunfluoreszenz an MDCK-Monolayern nach Protaminapplikation unter Betrachtung von Claudin-2, E-Cadherin und Occludin. Dabei entsprechen die linksseitigen Aufnahmen den Kontrollen, die rechtsseitigen denen nach fünfminütiger Protamininkubation. Es zeigte sich eine deutliche Abnahme bis hin zum Verschwinden des Signals von Claudin-2 im Bereich der Tight Junction. Eine Verlagerung - beispielsweise im Sinne einer Internalisierung – ließ sich nicht erkennen. E-Cadherin und Occludin zeigten keine erkennbaren Signalveränderungen.

4.3. Wirkung von Protamin auf die Proteinzusammensetzung von Membran und Tight Junction

Western Blots wurden als Triton X-100-lösliche und Triton X-100-unlösliche (unter Verwendung von RIPA-Puffer) Proteinpräparationen vorgenommen und damit Claudin-1, -2, -3, -4, -7 und -8, Occludin, ZO-1 und E-Cadherin betrachtet. Es wurden MDCK C11- und MDCK II-Zellen betrachtet mit den Zeitpunkten vor und fünf Minuten nach Protamingabe. Die Ausgangswerte sind nach densitometrischer Mittelung mit 100 % angegeben. Die folgenden Werte sind Angaben in Prozent, ebenso wie die angeführten SEM.

4.3.1. Triton X-100-lösliche Fraktion

Claudin-1 zeigte bei MDCK II-Zellen ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=6) einen relativen Wert von $98,27 \pm 2,34$ % (nach Protamin, n=6). Bei MDCK C11-Zellen war dieser Wert ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=4) bei $106,06 \pm 9,71$ % (nach Protamin, n=4).

Bei Betrachtung von Claudin-2 zeigte sich bei MDCK II-Zellen ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=6) ein Endwert von $101,88 \pm 4,36$ % (nach Protamin, n=6). Bei MDCK C11-Zellen fand sich entsprechend initial 100 % (Kontrolle, n=4) und nach Inkubation $100,21 \pm 4,23$ % (nach Protamin, n=4).

Claudin-3 zeigte bei MDCK II-Zellen eine Veränderung ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=6) auf $104,91 \pm 2,10$ % (nach Protamin, n=6). Bei MDCK C11-Zellen veränderten sich die Werte ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=4) auf $98,65 \pm 5,92$ % (nach Protamin, n=4).

Claudin-4 zeigte bei MDCK II-Zellen ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=6) einen Endwert von $110,71 \pm 4,80$ % (nach Protamin, n=6). Bei MDCK C11-Zellen betrug der Wert ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=4) $96,81 \pm 8,05$ % (nach Protamin, n=4).

Claudin-8 ergab bei MDCK II-Zellen ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=6) nach Inkubation einen Wert von $108,38 \pm 11,07$ % (nach Protamin, n=6). Bei MDCK C11-Zellen war der Wert ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=4) $99,66 \pm 1,53$ % (nach Protamin, n=4).

Bei Occludin fand sich bei MDCK II-Zellen vom Ausgangswert 100 % (Kontrolle, n=5) ein Wert von $104,72 \pm 1,94$ % (nach Protamin, n=5). Bei MDCK C11-Zellen veränderten sich die Werte ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=3) auf $101,62 \pm 5,98$ % (nach Protamin, n=3).

Für ZO-1 zeigte sich an MDCK II-Zellen ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=3) ein Endwert von $163,00 \pm 56,44$ % (nach Protamin, n=3), bei MDCK C11-Zellen entsprechend von 100 % (Kontrolle, n=3) auf $130,11 \pm 40,44$ % (nach Protamin, n=3).

Bei E-Cadherin zeigte sich bei MDCK II-Zellen ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=4) ein Endwert von $125,45 \pm 14,23$ % (nach Protamin, n=4). Bei MDCK C11-Zellen veränderten sich die Werte ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=4) auf $103,89 \pm 6,00$ % (nach Protamin, n=4). Alle erfassten Signalveränderungen waren schwach ausgeprägt und statistisch nicht signifikant (n.s.).

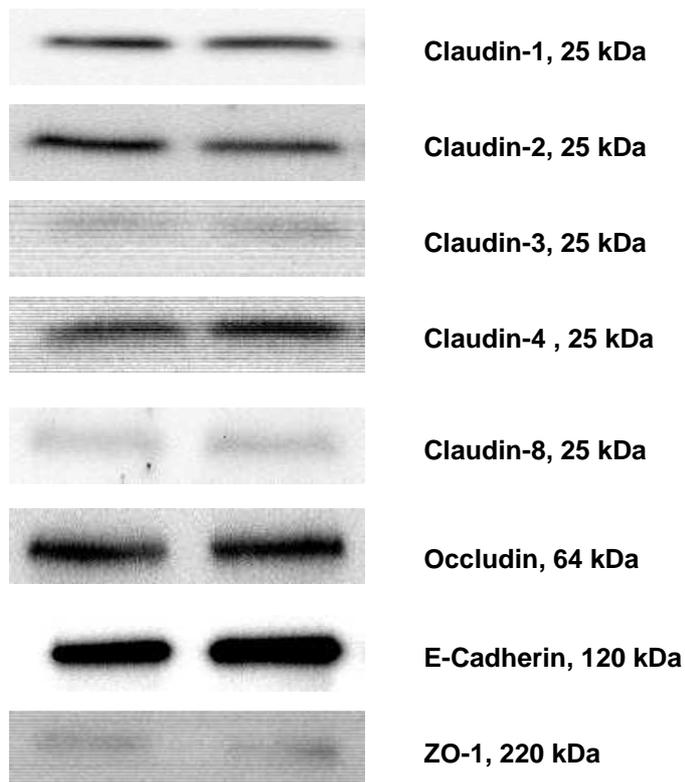


Abb. 11 Detektion von Tight Junction-Proteinen im Western Blot. Dargestellt sind die Triton X-100-löslichen Fraktionen an MDCK II-Zellen. Das linke Signal entspricht der Kontrolle, das rechte der nach fünfminütiger Protamininkubation. Es fanden sich keine deutlichen Signalveränderungen. Die quantitative Auswertung ist im Haupttext beschrieben (n=3-6).

4.3.2. Triton X-100-unlösliche Fraktion

Mithilfe der Triton X-100-unlöslichen Fraktionen werden diejenigen Fraktionen visualisiert, welche zytoskeletal gebunden (beispielsweise vesikulär) und möglicherweise einer Internalisierung unterliegen.

Die densitometrische Auswertung für Claudin-1 zeigte bei MDCK II-Zellen eine Veränderung ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=6) auf $114,43 \pm 13,19$ % (nach Protamin, n=6). Bei MDCK C11-Zellen veränderten sich die Werte ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=4) auf

98,38 ± 6,33 % (nach Protamin, n=4). Claudin-2 zeigte bei MDCK II-Zellen eine Veränderung ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=6) auf 96,98 ± 3,66 % (nach Protamin, n=6). Bei MDCK C11-Zellen veränderten sich die Werte ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=4) auf 90,30 ± 5,82 % (nach Protamin, n=4).

Claudin-3 veränderte sich densitometrisch bei MDCK II-Zellen ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=6) auf 100,80 ± 0,80 % (nach Protamin, n=6). Bei MDCK C11-Zellen veränderten sich die Werte ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=4) auf 88,28 ± 8,99 % (nach Protamin, n=4).

Claudin-4 zeigte bei MDCK II-Zellen eine Veränderung ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=6) auf 116,23 ± 13,51 % (nach Protamin, n=6). Bei MDCK C11-Zellen veränderten sich die Werte ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=4) auf 91,37 ± 4,11 % (nach Protamin, n=4).

Claudin-8 zeigte bei MDCK II-Zellen eine Veränderung ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=6) auf 96,29 ± 2,65 % (nach Protamin, n=6). Bei MDCK C11-Zellen veränderten sich die Werte ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=4) auf 99,16 ± 2,24 % (nach Protamin, n=4).

Das Signal für Occludin zeigte bei MDCK II-Zellen eine Veränderung ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=5) auf 103,63 ± 9,13 % (nach Protamin, n=5). Bei MDCK C11-Zellen veränderten sich die Werte ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=3) auf 95,10 ± 4,86 % (nach Protamin, n=3).

ZO-1 reagierte bei MDCK II-Zellen ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=3) auf 48,98 ± 18,61 % (nach Protamin, n=3). Bei MDCK C11-Zellen (Einzelexperiment, alle n=1) veränderten sich die Werte ausgehend von 100 % auf 58,87 % nach Protamin.

Bei E-Cadherin veränderten sich die densitometrischen Werte bei MDCK II-Zellen ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=4) auf 93,14 ± 8,07 % (nach Protamin, n=4). Bei MDCK C11-Zellen veränderten sich die Werte ausgehend von 100 % (Kontrolle, n=4) auf 96,62 ± 5,83 % (nach Protamin, n=4).

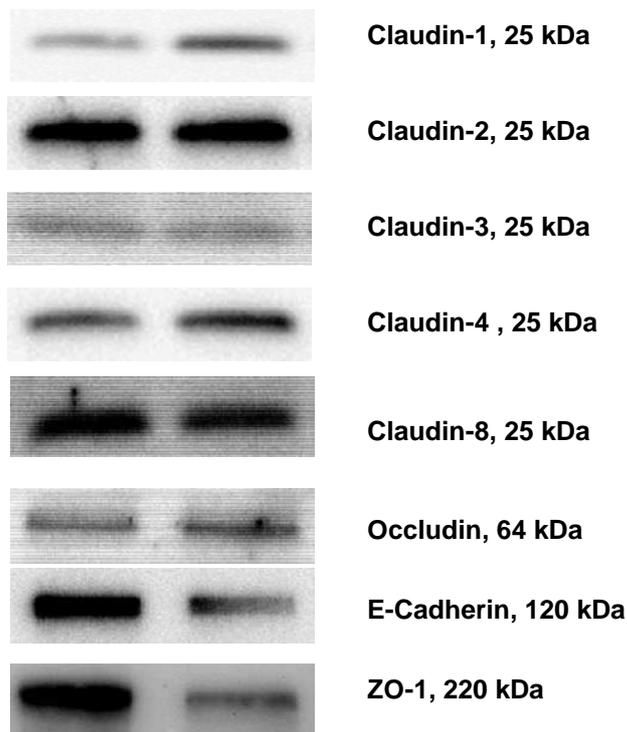


Abb. 12 Detektion von Tight Junction-Proteinen im Western Blot – Nichtmembranfraktion. Gezeigt sind die Triton X-100-unlöslichen Fraktionen exemplarisch an MDCK II-Zellen. Das linke Signal entspricht der Kontrolle, das rechte der nach fünfminütiger Protamininkubation. Es fanden sich Abnahmen des Signals bei ZO-1 und E-Cadherin. Bei den übrigen betrachteten Proteinen fanden sich keine deutlichen Signalveränderungen ($n=3-6$).

4.4. Wirkung von Protamin auf intrazelluläre Signalwege

Mithilfe von Phosphoblots kann anhand des Phosphorylierungsnachweises auf intrazelluläre Aktivierung von Signalwegen geschlossen werden. Es zeigte sich eine Signalzunahme innerhalb der ersten 30 Minuten. Es wurden die Proteine Akt, p38, p42/44 und MLCK betrachtet.

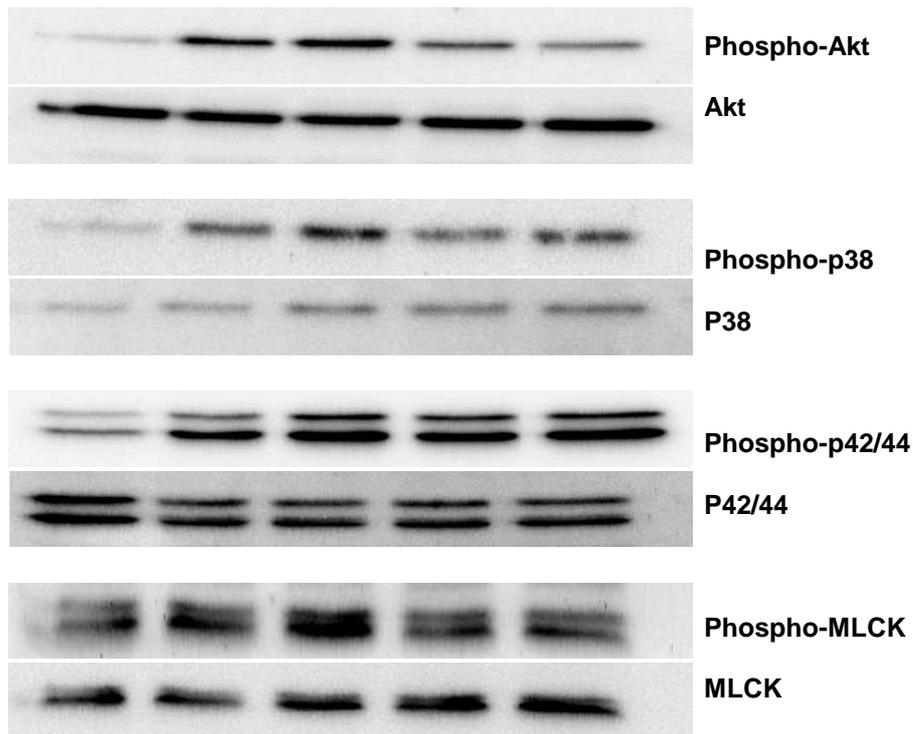


Abb. 13 Intrazelluläre Phosphorylierungsprozesse unter Protamin. Dargestellt sind die Phosphoblots von MDCK II-Zellen. Von links nach rechts: Signale der Kontrolle, sowie 5, 15, 30 und 60 Minuten nach Protamingabe. Es sind frühe Phosphorylierungen von Akt, p38 und MLCK zu erkennen. Das Signal von p42/44 steigt im Verlauf noch an.

Im Einzelexperiment zeigte sich eine Zunahme der Phosphorylierung von Akt und p38, vor allem nach fünf und 15 Minuten, die Phosphorylierung von p42/44 nahm hingegen kontinuierlich bis zum Zeitpunkt 60 Minuten zu, MLCK zeigte ein Maximum der Phosphorylierung nach 15 Minuten.

5. Diskussion

5.1. Übersicht

Untersucht wurden die Wirkungen von Protamin auf Nierenepithelzellen. Hierbei lagen die Schwerpunkte auf der elektrophysiologischen Analyse (Ussingkammerexperimente, Ionenleitfähigkeiten, Betrachtung von Zellklonen), der strukturellen Analyse auf Proteinebene (Westernblot, Immunfluoreszenz) und der Analyse regulatorischer Aspekte (Inhibitorenexperimente, Temperaturabhängigkeit, Phosphoblot). Die Diskussion der Methodik und Ergebnisse erfolgt im folgenden im Rahmen der dargelegten Schwerpunkte.

5.2. Elektrophysiologische Effekte von Protamin

Der Widerstandseffekt von Protamin an Epithelien (Necturus-Gallenblase, MDCK I, II, C11 und C7) ist gut belegt, ebenso wie seine Reversibilität unter Heparin und seine ausschließliche Wirkung von der apikalen Seite aus. Beispielsweise kommt es zu einer Verdopplung des transepithelialen Widerstandes an der Necturus-Gallenblase (Fromm et al., 1985). Die Ionenpermeabilitäten für K^+ und Na^+ zeigten eine Abnahme um den Faktor drei, während die Chlorid-Permeabilität unbeeinträchtigt blieb (Fromm et al., 1985).

In dieser Arbeit bestätigte sich die Abnahme der Permeabilität für Kalium und Natrium. Untersuchungen mit Rubidium, Caesium und Lithium zeigten auch bei diesen Ionen eine vergleichbare Abnahme, so dass von einer größenunselektiven Abnahme der Permeabilität für monovalente Kationen (in einer Größenordnung von 17 – 26 %) auszugehen ist. Für Chloridanionen verändert sich die Leitfähigkeit dagegen nicht. Somit scheint die Abnahme der Permeabilität für monovalente Kationen die Widerstandszunahme unter Protamin zu verursachen. Unter physiologischen Bedingungen ist dies also v.a. Na^+ , insbesondere da der Effekt parazellulär ist (Fromm et al., 1985). Dies passt zu dem Ergebnis, dass der Protamineffekt von den kationenkanalbildenden Claudinen 2 und 10b abhängt. Das Ausmaß der Leitfähigkeit für andere Anionen, größere geladene Moleküle sowie divalente Kationen wurde nicht untersucht, so dass ihr Stellenwert im Rahmen der protaminbedingten Widerstandserhöhung noch unklar ist. Experimente an MDCK I-Zellen zeigten dagegen eine Widerstandsabnahme unter Protamin mit der höchsten Permeabilität nach vier Stunden (Peterson et al., 1990). Dieser Effekt scheint unterschiedlich von dem in dieser Arbeit untersuchten und ist möglicherweise ein „später“ Protamineffekt (s.u.).

5.3. Abhängigkeit des Protamineffektes von der Claudinexpression

In dieser Arbeit ließen sich Widerstandszunahmen unter Protamin an lecken Epithelien (MDCK C11 und MDCK II) sowie mit Claudin-2 bzw. -10b transfizierten, ursprünglich hochohmigen Zellklonen (MDCK C7) auslösen. Diese Claudine bilden zudem Kationenkanäle (Amasheh et al., 2002 und Van Itallie et al., 2006). Wildtypen hochohmiger Zellen (MDCK C7- und MDCK I-Zellen) zeigten dagegen keinen bzw. einen sehr geringen initialen Widerstandsanstieg unter Protamin sowie zu späteren Zeitpunkten einen deutlichen Abfall des Widerstands. Gleiches gilt für die Transfektion mit anderen Claudinen (u.a. bei mit Claudin 10a-, 10a Δ 57- und Claudin 16-transfizierten MDCK C7-Zellen). Leichte initiale Widerstandserhöhungen waren quantitativ klein, statistisch nicht signifikant und können auf eine endogene Expression von porenbildenden Claudinen sein. Der Befund, dass mit kationeporenbildenden Claudinen transfizierte hochohmige Zellen, die – anders als die Wildtypen und Vektorkontrollen – nun wie lecke Epithelien Widerstandszunahmen unter Protamin zeigen, spricht dafür, dass der Protamineffekt vom Vorhandensein dieser Claudine direkt oder indirekt abhängt. Hierzu passt der bereits bekannte Effekt, dass Protamin zu einer Abnahme der Kationenpermeabilität führt.

Ob sich der Widerstandseffekt bei Transfektion mit anderen Claudinen ebenfalls auslösen lässt, könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. So bildet Claudin-15 wie Claudin-2 Kanäle mit Selektivität für Kationen (Tamura et al., 2011). Ebenso könnten Varianten von Claudin-2 bzw. Claudin-10b untersucht werden, die sich in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden bzw. deletierte Abschnitte aufweisen. Dies könnte Hinweise auf eventuelle Interaktionspunkte mit Protamin geben, die bisher noch unklar sind.

5.4. Strukturelle Effekte von Protamin

Dass Protamin auch die Zellstruktur verändert und intrazelluläre Signalwege anstößt, ist bekannt. In Gefrierbruchschnitten zeigte sich eine Erhöhung der Anzahl der der Tight Junction-Stränge bereits zehn Minuten nach Applikation (Bentzel et al., 1987). Weiterhin kommt es zu späteren Zeitpunkten zu einer Desorganisation des Aktinzytoskeletts bei MDCK I- und II-Zellen sowie einer inhomogeneren Verteilung von ZO-1 bei MDCK II-Zellen (Peixoto et al., 2005).

An Methoden kamen zur Untersuchung der strukturellen Veränderungen die Immunfluoreszenz und der Western Blot zum Einsatz. Bei den Immunfluoreszenzexperimenten wurden zum einen konfluent bewachsene Filter (mit oder ohne vorangegangenes Ussingexperiment) oder konfluent bewachsene Deckgläser verwendet. Der Vorteil bei der Verwendung von Deckgläsern lag in der besseren Qualität der

Bilder, der Darstellung der Zellen in einer Ebene und damit bessere Durchführbarkeit der konfokalen Laserscanningmikroskopie sowie der einfacheren Durchführbarkeit. Der Nachteil war das fehlende Monitoring des Protamineffektes, welcher bei Filtern stets eine Erfolgskontrolle ermöglichte. Diesem Problem wurde durch mikroskopische Kontrolle der Zellverbände und das Mitführen eines ebenfalls aus derselben Aussaat stammenden Filters mit Widerstandsmessung ausgeglichen. Die Protaminanwendung auf Deckgläsern stellte kein Problem dar, da die Wirkung ohnehin nur von apikal erfolgt.

Da der beobachtete Protamineffekt innerhalb von Sekunden bis Minuten auftritt und bereits nach fünf Minuten sein Maximum erreicht hatte, kam zum Nachweis struktureller Veränderungen eine besondere Präparation der Western Blots zum Einsatz. Mithilfe von Triton X-100-Präparation können die betrachteten Proteine in solche, die an die Membran oder Zytoplasma (Triton X-100-löslich) und solche die am Zytoskelett gebunden sind differenziert werden (Gilbert und Fulton, 1985). Die Vorstellung war, eine Verlagerung von abdichtenden Claudinen in die Membran oder Verlagerung von kanalbildenden Claudinen ans Zytoskelett beobachten zu können. Einschränkend muss jedoch hinzugefügt werden, dass nicht alle Membranabschnitte mit Triton X-100 gelöst werden. Insbesondere cholesterinreiche Abschnitte, sogenannte „lipid rafts“ lassen sich nicht lösen und schränken somit die Aussage über Membranbindung ein (London und Brown, 2000). Da von MARVEL-Domänen bekannt ist, dass sie in cholesterinreichen Membranabschnitten vorkommen, könnte die Aussagekraft bezüglich von Membranproteine, welche diese Domänen enthalten (beispielsweise Occludin) eingeschränkt sein. Ggf. könnte in Zukunft eine andere Präparation zur Solubilisierung (anderes Detergens als Triton X-100) angewandt werden.

Der wesentliche Befund der Immunfluoreszenz war der starke und mehrfach reproduzierte Signalverlust von Claudin-2, sowohl bei MDCK C11- und II- Zellen, als auch bei Cldn-2-transfizierten MDCK C7-Zellen unter Protaminapplikation. Dies könnte einerseits auf eine Internalisierung hindeuten, eine Blockade oder Veränderung des Claudins. Gegen eine Internalisierung sprechen jedoch beinahe gänzlich fehlende Signale ohne Nachweis einer vesikulären submembranären Anordnung. Eine direkte Interaktion mit eventueller Blockade der fluoreszenzrelevanten Epitope erscheint denkbar. Ob sich ein ähnlicher Befund für Claudin-10b nachvollziehen lässt ist derzeit unklar. Weitere Untersuchungen könnten Färbungen mit Markern für Vesikel (beispielsweise Clathrin) einschließen. Ein genauer Nachweis einer solchen Interaktion könnte durch Bindungsstudien oder gegen Protamin gerichtete Antikörper erfolgen und weitere Hinweise auf eventuelle Interaktionen des Protamins mit TJ-Proteinen geben.

Andererseits ließen sich Hinweise auf quantitative Veränderungen im Western Blot nur bei noch längerer Inkubation bzw. nach zusätzlicher Heparinapplikation nachweisen. Wegen geringer n-Zahlen wurden diese jedoch nicht in die Auswertung übernommen und werden hier nur als Ausblick erwähnt. So fallen in der Triton X-100-löslichen Fraktion eine Zunahme von Claudin-2, Claudin-4 und Claudin-8 (jeweils nur MDCK II-Zellen) 10 Minuten nach Protaminapplikation auf. ZO-1 und E-Cadherin zeigten ebenfalls Zunahmen. Claudin-7 ließ sich nur in der Triton X-100-Präparation nachweisen und zeigte ebenfalls einen Anstieg nach 10 Minuten (in beiden Zelltypen). Ob dies Effekte von Heparin (welches zur Antagonisierung hinzugefügt wurde) oder ein verzögertes Ansprechen und damit längerfristige Reaktion der Zellen auf Protamin ist, konnte anhand dieser Experimente noch nicht geklärt werden. Hierzu müsste eine alleinige Inkubation mit Protamin durchgeführt werden und eine größere n-Zahl angestrebt werden.

Die Triton X-100-unlösliche Fraktion (am Zytoskelett gebundene Proteine) zeigte für ZO-1 eine starke Abnahme in beiden Zelltypen, eine leichte Abnahme zeigt sich auch bei E-Cadherin. Auch hier sind die Abnahmen v.a. nach 10 Minuten (und erfolgter Heparinapplikation) anzutreffen bzw. als späte Protamineffekte zu sehen und können als Umbauprozesse im Membranbereich interpretiert werden. Dabei deutet vor allem der korrespondierende Effekt von ZO-1 mit Zunahme in der Zellmembranfraktion (Triton X-100-löslich) und Abnahme in der Nicht-Zellmembranfraktion (Triton X-100-unlöslich) auf solche Umbauprozesse hin. Insbesondere, da von ZO-1 eine Bindung am Zytoskelett bekannt ist. Möglich wäre jedoch auch eine Verlagerung in lipid raft-Bereiche der Membran.

Anders als vermutet zeigte sich keine Abnahme kationenkanalbildender Claudine (Claudin-2) bzw. Zunahme von abdichtenden Claudinen (Claudin-1, -3 und -8) in der Membranfraktion.

Insgesamt korrelierten die betreffenden Umbauprozesse nicht mit dem Zeitraum der Widerstandszunahme. Sie können auch die bereits diskutierten Abnahmen der Permeabilitäten für Kationen und die Abhängigkeit vom Vorhandensein der kationenkanalbildenden Claudine 2 und 10b zumindest nicht auf struktureller Ebene erklären. Sie bestätigen jedoch, dass Protamin auch in die Zellstruktur eingreift.

5.5. Protamin und Signaltransduktion

Protamin selbst beeinflusst den Calciumhaushalt von epithelialen Zellen. Es ist ein Agonist am Calcium-Sensing-Rezeptor und führt hierüber zu einer Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels (Gama et al., 1997). Dieser Effekt scheint G-Protein-vermittelt u.a. über die Proteinkinase C zu erfolgen (Gama et al., 1997). Außerdem führt Protamin an Podozyten zu

einer Retraktion der Ausläufer bei gleichzeitigem Anstieg des intrazellulären Calciums (Rüdiger et al., 1999). Am Endothel wird eine Stimulation der iNOS mit nachfolgender NO-Produktion und Relaxation der glatten Muskulatur beschrieben (Takahura et al., 2006).

Ein anderer Aspekt ist die Regulation der Tight Junction. Für diese wurden verschiedene, daran beteiligte Signalwege aufgezeigt, von denen einige in dieser Arbeit näher beleuchtet wurden: Extrazelluläres Calcium bestimmt entscheidend die Permeabilität von Epithelien (Gonzalez-Mariscal et al., 1990). ML-7, der Inhibitor der MLCK, ist in der Lage, den Widerstandsverlust und die Aktin-Myosin-Retraktion zu verringern, die unter Calciumverlust zustande gekommen sind (Ma et al., 2000). Durch die MLCK kommt es nach Phosphorylierung zu Erhöhung der Permeabilität sowie zur Redistribution von ZO-1 und Occludin (Shen et al., 2006).

Calciumdepletion führt zudem zu einer Internalisierung u.a. von TJ-Proteinen (Occludin, ZO-1, Cldn-1, Cldn-4, JAM-1) über den Clathrin-Weg (Ivanov et al., 2004). Toxine von *Clostridium difficile* führen zu einer Internalisierung von Occludin, die caveolinabhängig ist (Nusrat et al., 2001). Proteinkinasen und ihre Phosphorylierungswege sind ebenfalls wichtig: Die PKA phosphoryliert Claudin-3 und Claudin-5 und führt zu einem Abfall des TER bei phosphoryliertem Claudin-3 und einem Anstieg des TER bei phosphoryliertem Claudin-5 (Angelow et al., 2008). Die Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert Claudin-1 und Claudin-4 und führt bei Aktivierung durch Phorbolester zu einer verminderten Stärke der Tight Junction sowie zu einer veränderten Claudin-4-Verteilung (Angelow et al., 2008).

Aufgrund dieser Überlegungen wurden Inhibitorenexperimente durchgeführt, wobei in Ussingkammerexperimenten bislang bekannte Signalwege von Protamin geblockt werden sollten: mit L-NAME die NO-Synthese, mit BAPTA-AM intrazelluläres Calcium, mit H-8 PKA und PKG u.a. Die Versuche mit Inhibitoren intrazellulärer Signalwege zeigten jedoch, dass der Protamineffekt weder von Phosphorylierungen von PKA und PKG (Inhibitor H-8) noch von der intrazellulären Calciumkonzentration (Chelator BAPTA-AM), NO-Synthese (L-NAME) oder von MLCK (ML-7) abhängig zu sein scheint. Die verwendeten Inhibitoren zeigten keinen Effekt. Auch Hemmstoffe der caveolinabhängigen (Inhibitor Nystatin) und clathrinabhängigen (Inhibitor Chlorpromazin) beeinflussen den Effekt nicht. Diese Resultate ließen sich an MDCK C11- und MDCK II-Zellen zeigen.

Interessanterweise ließ sich der Effekt – wenn auch schwächer – auch bei 4 °C nachweisen und deutet so auf einen von intrazellulären Prozessen unabhängigen Prozess hin.

Unter der Fragestellung, ob überhaupt intrazelluläre Signalwege aktiviert werden, wurden sogenannte Phosphoblots durchgeführt, welche spezifisch phosphorylierte Proteine

detektieren. Hierbei zeigten sich phosphorylierte Formen für MLCK, AKT, p42/44 und p-38 mit Beginn bereits nach fünf Minuten und Aktivierung bis zu 30 Minuten nach Protaminapplikation. Dies deutet auf eine Aktivierung intrazellulärer Signalwege durch Protamin hin, ohne dass sich dieser „schnelle Effekt“ durch Inhibitoren beispielsweise der MLCK bzw. PI3-Kinase in Ussingkammerexperimenten hemmen ließe.

5.6. Duales Wirkprinzip von Protamin

Die erhobenen Befunde zeigen einerseits eine schnelle Widerstandszunahme unter Protamin, bei der die Abnahme der Permeabilität für monovalente Kationen im Zusammenhang mit dem Vorhandensein entsprechender kationenkanalbildender Claudine die Hauptrolle spielt, wobei sich dieser Effekt nicht durch Inhibitoren oder niedrige Temperaturen hemmen lässt. Andererseits zeigt sich die Abnahme des Claudin-2-Signals in der Tight Junction, zugleich Aktivierungen intrazellulärer Signalwege und später stattfindende Membranproteinveränderungen im Western Blot. Diese Befunde erscheinen widersprüchlich und lassen sich durch einen einzigen Effektormechanismus nur schwerlich erklären. Daher wird vorgeschlagen die Wirkung von Protamin mit mindestens zwei Wirkprinzipien zu beschreiben, welche im folgenden als „schnelle“ und „späte“ Protamineffekte bezeichnet werden.

Viel spricht dafür, dass es sich beim „schnellen“ Effekt, also dem innerhalb von Sekunden auftretenden Widerstandsanstieg, um eine direkte Interaktion des Polykations Protamin mit den kationenkanalbildenden Claudinen 2 und 10b (eventuell auch Claudin-15, welches in dieser Arbeit nicht untersucht wurde) handelt. Erstens tritt der Effekt nur auf, wenn kationenkanalbildende Claudine vorhanden sind. Zweitens ist die Widerstandszunahme getragen von einer entsprechenden Permeabilitätsniedrigung für monovalente Kationen. Drittens lässt sich der Effekt weder durch Inhibitoren noch durch niedrige Temperaturen inhibieren. Viertens zeigt die Immunfluoreszenz zwar eine Abnahme des Claudin-2-Signals in der Tight Junction, jedoch keinen Anhalt für eine Internalisierung. Fünftens zeigten weder Western Blot noch Phosphoblot erklärende Veränderungen in Proteinzusammensetzung oder Signaltransduktion, welche mit dem Zeitrahmen des „schnellen“ Effektes zusammenfallen.

Die „späten“ Protamineffekte führen dagegen zu intrazellulären Veränderungen und sind möglicherweise für bereits vorbeschriebene Veränderungen beispielweise der Tight Junction-Stränge verantwortlich (Bentzel et al., 1987). Möglicherweise sind diese „späten“ Protamineffekte auch für die Widerstandsabnahme an MDCK I-Zellen unter Protamin (Peterson et al., 1990) verantwortlich. Die genaue Signaltransduktion ist noch unklar.

Möglich wäre eine agonistische Protaminreaktion am Calcium-Sensing-Receptor. Alternativ ist auch eine Aktivierung durch die postulierten Protamin-Claudin-Interaktionen denkbar.

5.7. Vergleich von Protamin mit Absorptionenhancern

Von Absorptionenhancern, also Stoffen, welche die Dichtigkeit von Epithelien herabsetzen, sind bereits Wirkprinzipien und Signalwege bekannt. Zu diesen Resorptionenhancern wird neben Calcium-Chelatoren wie EGTA und EDTA auch Clostridium perfringens Enterotoxin (CPE), Caprat und Chitosan gezählt (Krug et al., 2013; Rosenthal et al., 2012a; Rosenthal et al., 2012b). Die Senkung des transepithelialen Widerstandes findet bei positivem Ladungszustand statt und vergleichbar mit Protamin ließ sich der Effekt durch Heparin rückgängig machen (Rosenthal et al., 2012b). Die Widerstandsabnahme war schnell und durch Erhöhung des pH inhibierbar. Der Mechanismus schließt eine Aktivierung des Chlorid-Bicarbonat-Austauschers ein (Rosenthal et al., 2012b). Möglicherweise ist auch der Protamineffekt pH-abhängig und könnte analog bei höheren Werten inhibiert werden. Die weiterführende detaillierte Analyse der regulatorischen Effekte von Protamin ist daher Bestandteil zukünftiger Forschungsansätze.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die molekulare und elektrophysiologische Charakterisierung der Wirkungsweise von Protamin auf die renale Zelllinie MDCK II. Eine transepitheliale Widerstandszunahme von MDCK II-Zellen (und anderen lecken Epithelien) ausgelöst durch Protamin ist bekannt.

Es zeigte sich, dass die Widerstandszunahme auf die größenunselektive Abnahme der Leitfähigkeit für monovalente Kationen (Na^+ , K^+ , Li^+ , Rb^+ , Cs^+) zurückzuführen war. Diese Abnahmen der Leitfähigkeiten bewegten sich im Rahmen von 16,9 % (Lithium) bis 26,8 % (Rubidium). Die Leitfähigkeit für Chlorid blieb unverändert. MDCK C11- und MDCK II-Monolayer (Wildtypen) zeigten konsistent eine Widerstandszunahme von ca. 20 % nach apikaler Protaminapplikation. Mithilfe claudintransfizierter hochohmiger MDCK C7-Zellen zeigte sich, dass der Protamineffekt vom Vorhandensein solcher Claudine abhängig ist, die parazelluläre Kanäle für monovalente Kationen bilden. MDCK C7-Zellen reagieren normalerweise auf Protamin nicht mit einer Widerstandszunahme. Nach Transfektion mit den kationenkanalbildenden Claudinen 2 und 10b zeigten sie jedoch einen ähnlichen, prozentual teilweise noch ausgeprägteren Widerstandsanstieg (im Durchschnitt 16,5 % bzw. 53,1 %) als die Wildtypen MDCK C11 und II. Der Protamineffekt bei Claudin-10b-Transfektion war der stärkste gemessene. Eine Transfektion mit Claudin-16 und Claudin-10a zeigte kein von den Vektorkontrollen signifikant unterschiedliches Ergebnis.

Der Protamineffekt war auch bei 4 °C nachweisbar und zeigt sich somit von energieverbrauchenden intrazellulären Prozessen zumindest teilweise unabhängig. Auch ließ sich der Effekt weder an MDCK II- noch an MDCK C11-Zellen durch die untersuchten Inhibitoren Ly294004, BAPTA-AM, H-8, ML-7, L-NAME, UO126 und SB212090 hemmen. Die Membranzusammensetzung bezüglich Claudin-1, -2, -3, -4, -8, Occludin und E-Cadherin veränderte sich in dem innerhalb des Zeitraums der Widerstandszunahme nicht.

Strukturell zeigte sich in der Immunfluoreszenz ein stark reduziertes Claudin-2 unter Protamin in der Tight Junction. Eine Verlagerung nach intrazellulär zeigte sich jedoch nicht. Die Signale von Claudin-1, -3, -4 und -8 sowie Occludin und E-Cadherin zeigten sich nicht verändert. Dennoch führte Protamin zu einer Aktivierung intrazellulärer Signalwege (Phosphorylierungen von Akt, p38, p42/44, MLCK). E-Cadherin und ZO-1 zeigten erniedrigte Signale in der Nicht-Membranfraktion im Westernblot.

Alle erhobenen Befunde sprechen dafür, dass die Widerstandszunahme an lecken Epithelien ausgelöst durch Protamin auf einer direkten Interaktion von Protamin mit den kationenkanalbildenden Claudinen 2 und 10b beruht. Ebenfalls durch Protamin aktivierte

intrazelluläre Signalwege bzw. verursachte strukturelle Zellveränderungen scheinen hierfür von untergeordneter Bedeutung zu sein und spielen erst im späteren Zeitverlauf eine Rolle.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AJ	Adherens Junction
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA-AM	1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraacetat tetrakis-acetoxymethyl ester
BBB	Blood-Brain Barrier (Blut-Hirn-Schranke)
BS	Blocking Solution
BSA	Bovines Serum-Albumin
Ca ²⁺	Calcium
Caco-2	Zelllinie des humanen colorektalen Adenokarzinoms
CAR	Coxsackie and adenovirus receptor
Cldn	Claudin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cs ⁺	Caesium
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid
DTT	Dithriothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EPCAM	Epithelial cell adhesion molecule
ESAM	Endothelial cell-selective adhesion molecule
FCS	Fetal Calf Serum
FHHNC	Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis
Glc	Glucose
GTP	Guanosintriphosphat
H-8	N-(2-(methylamino)ethyl)-5-isoquinolinsulfonamid
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IL-8	Interleukin-8
IP3	Inositol-1,3,4-Trisphosphat
JAM-1	Junctional Adhesion Molecule-1
K ⁺	Kalium

kDa	Kilodalton
LNX1	Ligand-of-Numb protein X 1
LPS	Lipopolysaccharid
L-NAME	N ^G -Nitro-L-Arginin-methylester
Ly 294004	2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-on-hydrochlorid
MAGI	Membrane-associated guanylate kinase with an inverted arrangement of protein-protein interaction domains
MAGUK	Membrane-associated guanylate kinase homologues
MAP	Mitogen-activated protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MARVEL	Myelin and lymphocyte and related proteins for vesicle trafficking and membrane link
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MLCK	Myosin-Light-Chain-Kinase
ML-7	1-(5-Iodonaphtalen-1-sulfonyl)-1H-hexahydro-1,4-diazepin hydrochlorid
MEK	MAPK/ERK Kinase
MEM	Minimal Essential Medium
MUPP1	Multiple PDZ domain protein 1
Na ⁺	Natrium
NISCH	Neonatal ichthyosis sclerosing cholangitis
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Molekularer Sauerstoff
PAR	Partitioning defective
PI-3-K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PBS	Phosphate-buffered saline
PBST	PBS plus Tween 20
PDZ	PSD-95/Discs Large/ZO-1-Domäne
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rb ⁺	Rubidium
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RyR	Ryanodin-Rezeptor

SB202190	4-[4-(4-Fluorophenyl)-5-(4-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]-phenol
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SH	SRC homology
sPLA2	soluble Phosphlipase 2
TAMP	Tight Junction-assoziertes MARVEL-Protein
TBST	TRIS-buffered saline plus Tween 20
TEMED	Tetramethylethylenamin
TJ	Tight Junction
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
Tric	Tricellulin
TRIS	Trishydroxymethyl-aminoethan
Triton-X-100	Octoxinol-9
UO126	1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)butadien
ZO-1	Zonula Occludens-Protein-1
ZONAB	ZO-1-associated nucleic acid binding protein

8. Abbildungsverzeichnis

Abb.1 Transepithelialer Widerstand (TER) konfluenter Monolayer der Zelltypen MDCK I, MDCK C7 und MDCK CMV4 (Mock-transfizierte Vektorkontrolle). Die dunkle Säule repräsentiert das Widerstandsniveau vor, die helle Säule das Widerstandsniveau fünf Minuten nach Protaminapplikation. Dabei zeigten sich keine signifikanten Veränderungen.

Abb. 2 Relative Veränderung des transepithelialen Widerstandes (TER) konfluenter Monolayer Claudin-10a-transfizierter MDCK C7-Zellen. Die dunkle Säule repräsentiert das Widerstandsniveau vor, die helle Säule das Widerstandsniveau fünf Minuten nach Protaminapplikation. Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen.

Abb. 3 Relative Veränderung des transepithelialen Widerstandes (TER) konfluenter Monolayer Claudin-16-transfizierter MDCK C7-Zellen. Die dunkle Säule repräsentiert das Widerstandsniveau vor, die helle Säule das Widerstandsniveau fünf Minuten nach Protaminapplikation. Dabei zeigten sich keine signifikanten Veränderungen.

Abb. 4 Relative Veränderung des transepithelialen Widerstandes (TER) konfluenter Monolayer Claudin-2- und Claudin-10b-transfizierter Zellklone (MDCK C7-Zellen). Die dunkle Säule repräsentiert das Widerstandsniveau vor, die helle Säule das Widerstandsniveau fünf Minuten nach Protaminapplikation. Es zeigten sich statistisch signifikante Zunahmen der Widerstände von bis über 50 % (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Abb. 5 Relative Veränderung des transepithelialen Widerstandes (TER) konfluenter Monolayer Claudin-2- und Claudin-10b-transfizierter MDCK C7-Zellen und MDCK II-Zellen bei 4 °C. Die dunkle Säule repräsentiert wiederum das Widerstandsniveau vor, die helle Säule das Widerstandsniveau fünf Minuten nach Protaminapplikation. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme des Widerstandes unter Protamin auch unter Bedingungen von 4 °C bei allen betrachteten Zelltypen (* $p < 0.05$).

Abb. 6 Vergleich der relativen Veränderung des transepithelialen Widerstandes (TER) konfluenter Monolayer von MDCK C11-Zellen mit und ohne Inhibitorzusatz unter Protaminapplikation. Die dunkle Säule repräsentiert die Widerstandsveränderung mit Inhibitor, die helle Säule die Widerstandsveränderung der Kontrollen mit Leerwerten bzw. DMSO-Zusatz (Einzelheiten siehe Haupttext). Es wurden die Veränderungen verglichen, die jeweils fünf Minuten nach Protaminapplikation auftraten. Keiner der verwendeten Inhibitoren vermochte den Effekt von Protamin zu hemmen.

Abb. 7 Vergleich der relativen Veränderung des transepithelialen Widerstandes (TER) konfluenter Monolayer von MDCK II-Zellen mit und ohne Inhibitorzusatz jeweils nach Protaminapplikation. Die dunkle Säule repräsentiert die Widerstandsveränderung mit Inhibitor, die helle Säule die Widerstandsveränderung der Kontrollen mit bzw. ohne DMSO-Zusatz. Es wurden die Veränderungen verglichen, die jeweils fünf Minuten nach Protaminapplikation auftraten. Keiner der verwendeten Inhibitoren konnte den Effekt von Protamin zu hemmen (n.s.).

Abb. 8 Veränderung der Leitfähigkeit für monovalente Kationen und Chlorid an MDCK II-Monolayern nach Protaminapplikation. Die dunkle Säule repräsentiert die Leitfähigkeit vor, die helle die Leitfähigkeit nach Protaminapplikation. Bei allen betrachteten Kationen zeigte sich eine deutliche Abnahme der Leitfähigkeit, die Leitfähigkeit von Chlorid blieb unverändert.

Abb. 9 Immunfluoreszenz an MDCK II-Monolayern vor und nach Protaminapplikation unter Betrachtung von Claudin-1, -3, -4 und -7, F-Aktin und Occludin. Dabei entsprechen die linksseitigen Aufnahmen den Kontrollen, während die rechtsseitigen denen nach fünfminütiger Protamininkubation entsprechen. F-Aktin zeigte eine Dispersion des Signals, während für Occludin, Claudin-1, -3, -4 und -7 keine Veränderung festgestellt werden konnte.

Abb. 10 Immunfluoreszenz an MDCK-Monolayern nach Protaminapplikation unter Betrachtung von Claudin-2, E-Cadherin und Occludin. Dabei entsprechen die linksseitigen Aufnahmen den Kontrollen, die rechtsseitigen denen nach fünfminütiger Protamininkubation. Es zeigte sich eine deutliche Abnahme bis hin zum Verschwinden des Signals von Claudin-2 im Bereich der Tight Junction. Eine Verlagerung - beispielsweise im Sinne einer Internalisierung – ließ sich nicht erkennen. E-Cadherin und Occludin zeigten keine erkennbaren Signalveränderungen.

Abb. 11 Detektion von Tight Junction-Proteinen im Western-Blot. Dargestellt sind die Triton X-100-löslichen Fraktionen an MDCK-II-Zellen. Das linke Signal entspricht der Kontrolle, das rechte der nach fünfminütiger Protamininkubation. Es fanden sich keine deutlichen Signalveränderungen. Die quantitative Auswertung ist im Haupttext beschrieben (n=3-6).

Abb. 12 Detektion von Tight Junction-Proteinen im Western-Blot – Nichtmembranfraktion. Gezeigt sind die Triton X-100-unlöslichen Fraktionen exemplarisch an MDCK II-Zellen. Das linke Signal entspricht der Kontrolle, das rechte der nach fünfminütiger Protamininkubation. Es fanden sich Abnahmen des Signals bei ZO-1 und E-Cadherin. Bei den übrigen betrachteten Proteinen fanden sich keine deutlichen Signalveränderungen (n=3-6).

Abb. 13 Intrazelluläre Phosphorylierungsprozesse unter Protamin. Dargestellt sind die Phosphoblots von MDCK II-Zellen. Von links nach rechts: Signale der Kontrolle, sowie 5, 15, 30 und 60 Minuten nach Protamingabe. Es sind frühe Phosphorylierungen von Akt, p38 und MLCK zu erkennen. Das Signal von p42/44 steigt im Verlauf noch an.

9. Literaturverzeichnis

Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schoneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, 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 AH, Schulzke JD, Fromm M (2005) Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell Tissue Res.* 321: 89-96

Amasheh S, Milatz S, Krug SM, Bergs M, Amasheh M, Schulzke JD, Fromm M (2009) Na⁺ absorption defends from paracellular back-leakage by claudin-8 upregulation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 378: 45-50

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

Angelow S, Ahlstrom R, Yu A (2008) Biology of claudins. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 295: 867-876.

Anderson JM, Van Itallie CM (1995) Tight Junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am. J. Physiol.* 269(4 Pt 1): G467-G475.

Balhorn, R (2007) The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* 8: 227: 1-8.

Basuroy S, Sheth P, Kuppuswamy D, Balasubramian S, Ray RM, Rao RK (2003) Expression of kinase-inactive c-Src delays oxidative stress-induced disassembly and accelerates calcium-mediated reassembly of tight junctions in the Caco-2 cell monolayer. *J. Biol. Chem.* 278: 11916-11924.

Bentzel CJ, Fromm M, Palant CE, Hegel U (1987) Protamine alters structure and conductance of Necturus gallbladder tight junctions without major electrical effects on the apical cell membrane. *J. Membr. Biol.* 95: 9-20.

Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N (2008) Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim. Biophys. Acta* 1778: 588–600.

Cowley LL, Lam CR (1948) The neutralization of heparin by protamine. *Surgery* 24(1): 97-99.

Coyne CB, Gambling TM, Boucher RC, Carson JL, Johnson LG (2003) Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 285: L1166–L1178.

Daugherty BL, Ward C, Smith T, Ritzenthaler JD, Koval M (2007) Regulation of heterotypic claudin compatibility. *J. Biol. Chem.* 282: 30005–30013.

Ebnet K, Schulz CU, Meyer Zu Brickwedde MK, Pendl GG, Vestweber D (2000) Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. *J. Biol. Chem.* 275: 27979-27988.

Ebnet K, Suzuki A, Ohno S, Vestweber D (2004) Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J. Cell Sci.* 117: 19-29.

Ebnet K (2008) Organization of multiprotein-complexes at cell-cell junctions. *Histochem. Cell Biol.* 130: 1-20.

Emadi S, Elalamy I, Vargaftig BB, Hatmi M (1996) Reversible inhibition of by protamine human synavial and rabbit platelet secretory phospholipase A₂. *Biochim. Biophys. Acta* 1300: 226-232.

Farquhar M, Palade G (1963) Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.* 17: 375–412.

Feldmeyer L, Huber M, Fellmann F, Beckmann JS, Frenk E, Hohl D (2006) Confirmation of the origin of NISCH syndrome. *Hum. Mutat.* 27: 408-410.

Fromm M, Palant CE, Bentzel CJ, Hegel U (1985) Protamine reversibly decreases paracellular cation permeability in *Necturus* gallbladder. *J. Membr. Biol.* 87: 141-150.

Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell. Biol.* 123: 1777-1788.

Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S (1994) Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J. Cell Biol.* 127: 1617–1626.

Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S (1998) A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J. Cell Biol.* 143: 391-401.

Furuse M, Sasaki H, 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, 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: 263–272.

Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S (2002) Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J. Cell Biol.* 156: 1099-1111.

Gama L, Baxendale-Cox LM, Breitwieser GE (1997) Ca²⁺-sensing receptors in intestinal epithelium. *Am. J. Physiol.* 273: C1168-1175.

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

Gilbert M and Fulton AB (1985) The specificity and stability of the triton-extracted cytoskeletal framework of gerbil fibroma cells. *J. Cell Sci.* 73:335-45.

Gonzalez-Mariscal L, de Ramirez C, Cerejido M (1990) Role of calcium in tight junction formation between epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 259: C978–C986.

Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE (2003) Tight junction proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 81: 1-44.

Günzel D, Amasheh S, Pfaffenbach S, Richter JF, Kausalya PJ, Hunziker W, Fromm M (2009a) Claudin-16 affects transcellular Cl⁻ secretion in MDCK cells. *J. Physiol.* 587: 3777-3793.

Günzel D, Stuver M, Kausalya PJ, Haisch L, Krug SM, Rosenthal R, Meij IC, Hunziker W, Fromm M, Müller D (2009b) Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms which exhibit distinct localization and function. *J. Cell Sci.* 122: 1507-1517.

Günzel D, Yu AS (2012) Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol. Rev.* (in press).

Günzel D, Fromm M (2012) Claudins and other tight junction proteins. *Comprehensive Physiology (former Handbook of Physiology)* 2: 1819-1852.

Haskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J, Stevenson BR (1998) ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J. Cell Biol.* 141: 199-208.

Helander IM, Vaara M (1987) Reversible binding of salmonella typhimurium lipopolysaccharides by immobilized protamine. *Eur. J. Biochem.* 163(1): 51-55.

Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Bürgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, Schulzke JD (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.

Holmes JL, van Itallie CM, Rasmussen JE, Anderson JM (2006) Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. *Gene Expr. Patterns* 6: 581–588.

Ikari A, Okude C, Sawada H, Sasaki Y, Yamazaki Y, Sugatani J, Degawa M, Miwa M (2008) Activation of a polyvalent cation-sensing receptor decreases magnesium transport via claudin-16. *Biochim. Biophys. Acta* 1778: 283-290.

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

Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. (1999) Direct binding of three tight junction-associated MAGUKS, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J. Cell Biol.* 147: 1351–1363.

Ivanov AI, Nusrat A, Parkos CA (2004) Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment. *Molecular Biology of the Cell* Vol. 15: 176–188.

Kausalya PJ, Amasheh S, Günzel D, Wurps H, Muller D, Fromm M, Hunziker W (2006) Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg transport function of Claudin-16. *J. Clin. Invest.* 116: 878-91.

Kohaar I, Ploss A, Korol E, Mu K, Schoggins JW, O'Brien TR, Rice CM, Prokunina-Olsson L (2010) Splicing diversity of human OCLN gene and its biological significance for hepatitis c virus (HCV) entry. *J. Virol.* 84: 6987-6994.

Krug SM, Amasheh S, Richter JF, Milatz S, Günzel D, Westphal JK, Huber O, Schulzke JD, Fromm M (2009) Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol. Biol. Cell* 20: 3713-3724.

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

Krug SM, Günzel D, Conrad MP, Rosenthal R, Fromm A, Amasheh S, Schulzke JD, Fromm M (2012b) Claudin-17 forms tight junction channels with distinct anion selectivity. *Cell. Mol. Life Sci.* 69: 2765-2778.

Liu Y, Nusrat A, Schnell FJ, Reaves TA, Walsh S, Pochet M, Parkos CA (2000) Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J. Cell Sci.* 113 (Pt13): 2363-2374.

London E, Brown DA (2000) Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim. Biophys. Acta.* 1508(1-2):182-95.

Ma TY, Tran D, Hoa N, Nguyen D, Merryfeld M, Tarnawsky A (2000) Mechanism of extracellular calcium regulation of intestinal epithelial tight junction permeability: Role of cytoskeletal involvement. *Microscopy Research And Technique* 51: 156–168.

Machinist JM, Crane FL, Jacobs EE (1965) Tetrachlorohydroquinone oxidase activity in beef heart mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry* 240(4): 1788-1795.

Madin SH, Darby NB Jr. (1958) Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 98(3): 574-576.

Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, 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(1): 117-127.

McCarthy KM, Skare IB, Stankewich MC, Furuse M, Tsukita S, Rogers RA, Lynch RD, Schneeberger EE (1996) Occludin is a functional component of the tight junction. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 9): 2287-2298.

Mekras CI (1989) Inhibition of pepsin by polyions and c.d. studies. *Int. J. Biol. Macromol.* 11(4): 207-212.

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

Miller D, Brinkworth M, Iles D (2010) Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 139: 287-301.

Mitic LL, Unger VM, Anderson JM (2003) Expression, solubilization, and biochemical characterization of the tight junction transmembrane protein claudin-4. *Protein Sci.* 12: 218–227.

Murase K, Naruse K, Kimura A, Okumura K, Hayakawa T, Sokabe M (2001) Protamine augments stretch induced calcium increase in vascular endothelium. *Br. J. Pharmacol.* 134(7): 1403-1410.

Nusrat A, von Eichel-Streiber C, Turner JR, Verkade P, Madara JL, Parkos CA (2001) Clostridium difficile toxins disrupt epithelial barrier function by altering microdomain localization of tight junction proteins. *Infect. Immun.* 69(3): 1329-1336.

Parsons CL (2007) The role of the urinary epithelium in the pathogenesis of interstitial

cystitis/prostatitis/urethritis. *Urology* (Suppl 4A): 9-16.

Peixoto EBMI, Collares-Buzato CB (2005) Protamine-induced epithelial barrier disruption involves rearrangement of cytoskeleton and decreased expression of tight junction associated proteins in cultured MDCK strains. *Cell Structure and Function* 29: 165-178.

Peterson MW, Gruenhaupt D (1990) Protamine increases the permeability of cultured epithelial monolayers. *J. Appl. Physiol.* 68(1): 220-227.

Piontek J, Winkler L, Wolburg H, Muller SL, Zuleger N, Piehl C, Wiesner B, Krause G, Blasig IE (2008) Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J* 22: 146–158.

Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP, Rice CM (2009) Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 457 (7231): 882-886.

Raleigh DR, Marchiando AM, Zhang Y, Shen L, Sasaki H, Wang Y, Long M, Turner JR (2010) Tight junction-associated MARVEL proteins marvelD3, tricellulin and occludin have distinct but overlapping functions. *Cell Interactions* 21(7): 1200-1213.

Richardson JC, Scalera V, Simmons NL (1981) Identification of two strains of MDCK cells which resemble separate nephron tubule segments. *Biochim. Biophys. Acta* 673(1): 26-36.

Roh MH, Margolis B (2003) Composition and function of PDZ protein complexes during cell polarization. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 285(3): F377-F387.

Rosenthal R, Heydt MS, Amasheh M, Stein C, Fromm M, Amasheh S (2012a) Analysis of absorption enhancers in epithelial cell models. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1258(1): 86-92.

Rosenthal R, Günzel D, Finger C, Krug SM, Richter JF, Schulzke JD, Fromm M, Amasheh S (2012b) The effect of chitosan on transcellular and paracellular mechanisms in the intestinal epithelial barrier. *Biomaterials.* 33(9): 2791-2800.

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

Rüdiger F, Greger R, Nitschke R, Henger A, Mundel P, Pavenstädt H. (1999) Polycations induce calcium signaling in glomerular podocytes. *Kidney Int.* 56(5): 1700-1709.

Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, Takano H, Noda T, Tsukita S (1998) Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J. Cell Biol.* 141: 397-408.

Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S (2000) Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol. Biol. Cell.* 11(12): 4131-4142.

Schulzke JD, Gitter AH, Mankertz J, Spiegel S, Seidler U, Amasheh S, Saitou M, Tsukita S, Fromm M (2005) Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1669(1): 34-42.

Shen L, Black ED, Witkowski ED, Lencer WI, Guerriero V, Schneeberger EE, Turner JR (2006) Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure. *J. Cell Sci.* 119: 2095–2106.

Sheth P, Samak G, Shull JA, Seth A, Rao R (2009) Protein phosphatase 2A plays a role in hydrogen peroxide-induced disruption of tight junctions in Caco-2 cell monolayers. *Biochem J.* 421(1): 59-70.

Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton RP (1999) Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science* 285(5424): 103-106.

Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J, Horiguchi Y, Tsukita S (1999) Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J. Cell Biol.* 147 (1): 195-204.

StaeHELIN LA (1973) Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J. Cell Sci.* 13(3): 763-786.

Steed E, Rodrigues NT, Balda MS, Matter K (2009) Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family. *BMC Cell Biol.*10: 95.

Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA (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(3): 755-766.

Takahura K, Mizogami M, Fukuda S (2006) Protamine-sulfate causes endothelium-independent vasorelaxation via inducible nitric oxide synthase pathway. *Can. J. Anaesth.* 53(2): 162-167.

Tamura A, Hayashi H, Imasato M, Yamazaki Y, Hagiwara A, Wada M, Noda T, Watanabe M, Suzuki Y, Tsukita S (2011) Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na⁺ deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine. *Gastroenterology* 140: 913-923.

Tsujita T, Matsuura Y, Okuda H (1996) Studies on the inhibition of pancreatic and carboxylester lipases by protamine. *Journal of Lipid Research* 37: 1481-1487.

Tsukita S, Furuse M, Itoh M (1996) Molecular dissection of tight junctions. *Cell Struct. Funct.* 21(5): 381-385.

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

Tsukita S, Furuse M, Itoh M (1999) Structural and signalling molecules come together at tight junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11(5): 628-633.

Tsukita S, Furuse M (2000) The structure and function of claudins, cell adhesion molecules at tight junctions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 915: 129-135.

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

Vaara M, Vaara T (1983) Polycations as outer membrane-disorganizing agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24(1): 114-122.

Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM (2001) Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J. Clin. Invest.* 107(10): 1319-1327.

Van Itallie CM, Anderson JM (2006) Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu. Rev. Physiol.* 68: 403–429.

Van Itallie CM, Rogan S, Yu A, Vidal LS, Holmes J, Anderson JM (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 CM, Fanning AS, Holmes J, Anderson JM (2010) Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers. *J. Cell Sci.* 123: 2844-2852.

Wittchen ES, Haskins J, Stevenson BR (1999) Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J. Biol. Chem.* 274: 35179–35185.

Yu AS, Enck AH, Lencer WI, Schneeberger EE (2003) Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation. *J. Biol. Chem.* 278 (19): 17350-17359.

Yu AS, McCarthy KM, Francis SA, McCormack JM, Lai J, Rogers RA, Lynch RD, Schneeberger EE (2005) Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288: C1231-C1241.

Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Michael Fromm für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit der Forschungsarbeit am Institut für Klinische Physiologie sowie die ausgezeichnete Unterstützung hierbei bedanken.

Besonders bedanken für die tolle Unterstützung und Zusammenarbeit möchte ich mich bei PD Dr. Salah Amasheh, der die Betreuung meiner Arbeit übernommen hatte. Er war mir zu jedem Zeitpunkt eine große Hilfe und lenkte mit viel Umsicht, Erfahrung und Ruhe die einzelnen Arbeitsschritte. Bei technischen Fragestellungen standen mir Anja Fromm, Detlef Sorgenfrei und Marianne Boxberger zur Seite und konnten alle sich stellenden Probleme klären. Dr. Susanne Krug und Dr. Susanne Milatz hatten immer ein offenes Ohr und haben mich mit freundlicher, humorvoller und hochkompetenter Art und Weise in meiner Arbeit unterstützt. Die Arbeitsatmosphäre habe ich stets als positiv und hochprofessionell erlebt, so dass ich mich bei allen Mitarbeitern am Institut auf das Herzlichste für die Zusammenarbeit bedanken möchte.

Erklärung

Ich, Ilya Christoffel, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Charakterisierung molekularer und elektrophysiologischer Effekte von Protamin auf Nierenepithelzellen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Verzeichnis der eigenen Publikationen

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