

1 Einleitung

Epithelien sind hochspezialisierte zelluläre Grenzschichten, welche äußere und innere Organe wie die Haut, den Darmtrakt, das Nierentubulussystem und den Atmungstrakt des Menschen auskleiden. Sie sind verantwortlich für die Homöostase des inneren Milieus und für den spezifischen Austausch von Stoffen. Somit können der Elektrolythaushalt und der Haushalt weiterer Stoffe konstant gehalten und an die jeweilige physiologische Situation angepasst werden.

Epithelien bestehen aus polarisierten Zellen, deren Plasmamembranen funktionell in eine apikale, dem Lumen, bzw. der äußeren Oberfläche zugewandte und eine basolaterale Seite unterteilt werden. Grundsätzlich können transzelluläre, die beiden Zellmembranen durchquerende Transportmechanismen und der parazelluläre Durchtritt unterschieden werden. Die spezifischen Barriere- und Transportfunktionen von Epithelien werden primär durch eine Vielzahl unterschiedlicher membranständiger Proteine gewährleistet. Spezifische transzelluläre epitheliale Transportmechanismen erfolgen durch Kanäle und Carrier. Während Kanäle durch Öffnen und Schließen den Fluss von Ionenströmen gemäß ihrem elektrochemischen Gradienten bestimmen, basiert der aktive Transport auf selektiver Anbindung und Translokation des jeweiligen Substrats. Die parazelluläre Permeabilität wird durch die Tight Junction (Zonula occludens) bestimmt.

Diese Arbeit befasst sich zum einen mit dem Nachweis und der funktionellen Analyse von Tight Junction-Proteinen. Hier wird gezeigt, inwiefern die Spezifität parazellulärer Permeabilität direkt durch membranständige Tight Junction-Proteine bestimmt wird. Komplementär zu diesem Themenkomplex wird in der vorliegenden Arbeit eine Analyse der Regulation des Na^+ -Transports im distalen Colon aufgezeigt: Der epitheliale Na^+ -Kanal ENaC besitzt für die Regulation des Salz-Wasser Haushalts als limitierender Faktor der Na^+ -Resorption eine tragende Rolle. Krankheiten wie das Liddle-Syndrom oder der Pseudohypoaldosteronismus unterstreichen die wichtige Funktion für den Organismus.

Darüber hinaus werden in dieser Arbeit beide Themenkomplexe zusammengeführt, indem das Wechselspiel zwischen Induktion des ENaC und der Regulation der Tight Junction aufgezeigt

wird: Es zeigt sich eine konzertierte Regulation von Transport und Barriere zur effektiveren Transportleistung.

1.1 Tight Junctions in Epithel und Endothel

1.1.1 Charakteristika der Tight Junction

Die Tight Junction umschließt den apikolateralen Membranbereich von Epithel- und Endothelzellen netzartig und besteht aus Paaren transmembranärer Zellverbindungsproteine. Sie bildet so die Grenze zwischen dem apikalen und dem basolateralen Bereich der Zellmembran (Abb. 1). Die „Fence“-Funktion verhindert eine Diffusion transmembranärer Proteine zwischen apikaler und basolateraler Membran. Von wesentlicher funktioneller Bedeutung für den Organismus ist die „Gate“-Funktion: Die Tight Junction bestimmt den selektiven parazellulären Transport von Soluten. Die Durchlässigkeit wird durch die Komplexität des Maschenwerks und ganz wesentlich durch die molekulare Zusammensetzung der Tight Junction bestimmt [Matter & Balda, 2003].

Der Abdichtungsgrad der parazellulären Barriere ("gate") ist in verschiedenen Epithelien sehr unterschiedlich ausgeprägt. So ist der parazelluläre Widerstand in den proximalen Segmenten von röhrenförmigen Epithelien geringer als derjenige der Zellmembranen ("lecke Epithelien"; z. B. Dünndarm, proximaler Nierentubulus), während er in distalen Segmenten den der Zellmembranen übertrifft ("dichte Epithelien"; z. B. distales Colon, Sammelrohr). In der Harnblase ist die Tight Junction sogar extrem dicht ("undurchlässiges Epithel").

Der Abdichtungsgrad der Tight Junction ist nicht konstant, sondern kann den physiologischen Bedingungen entsprechend reguliert, aber auch durch zahlreiche pathologische Einflüsse verändert werden [Schneeberger & Lynch, 2004].

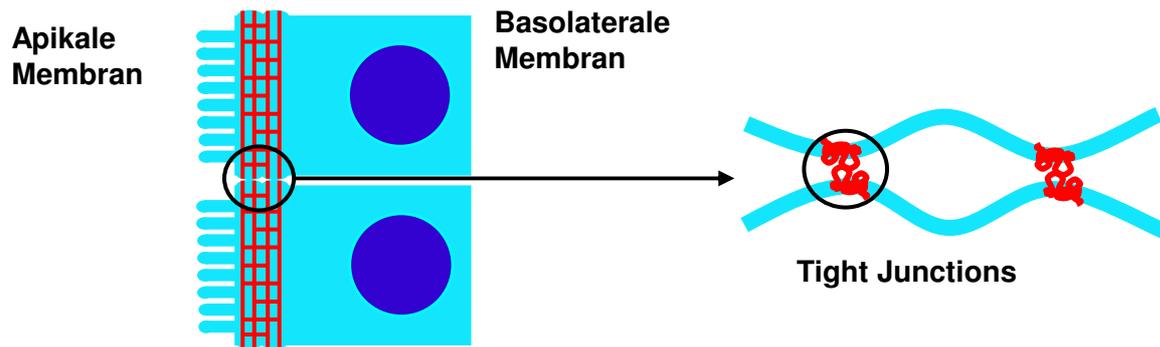


Abb. 1: Schematische Darstellung: Lokalisation von TJ-Proteinen von Epithelzellen.

1.1.2 Transmembranäre Tight Junction-Proteine

Gegenwärtig sind vier Arten transmembranärer Tight Junction-Proteine bekannt: Occludin [Furuse et al., 1993], die Claudin-Familie [Furuse et al., 1998], Tricellulin [Ikenouchi et al., 2005] (Abb. 4) sowie Junctional Adhesion Molecule (JAM) [Martin-Padura et al., 1998]. Allen gemeinsam ist, dass die Tight Junction-Proteine benachbarter lateraler Zellmembranen homo- und heterologe intrafamiliäre Verbindungen eingehen und auf diese Weise die mehr oder weniger ausgeprägte transmurale Abdichtung von Epithelien und Endothelien verursachen.

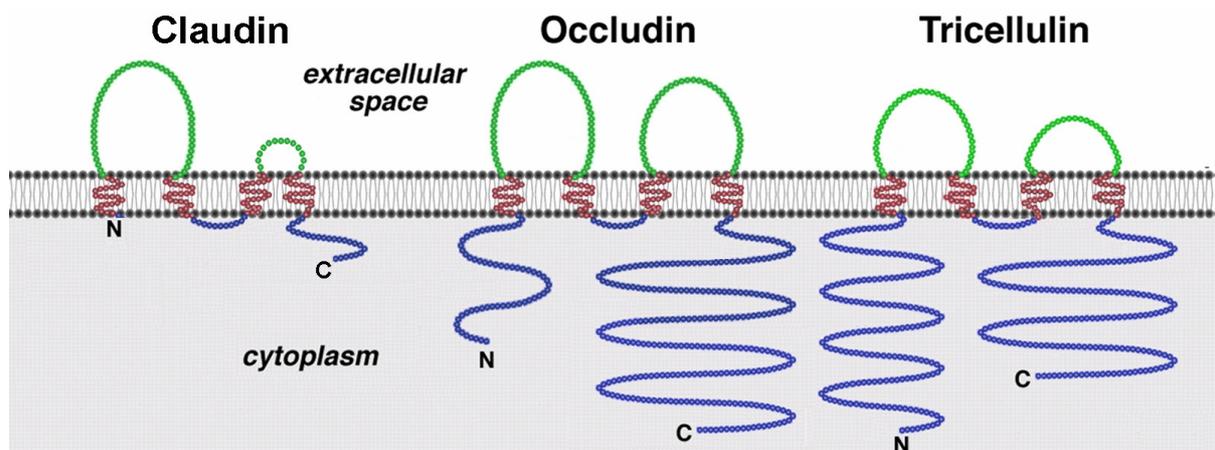


Abb. 2: Schematische Darstellung: Claudin, Occludin und Tricellulin (Nach Ikenouchi et al., 2005, verändert).

Occludin, Claudine und Tricellulin weisen jeweils 4 transmembranäre Domänen und 2 extrazelluläre Schleifen auf. Zwischen Occludin und Tricellulin einerseits und den Claudinen andererseits besteht jedoch keine Aminosäuresequenzhomologie. Mitglieder der Familie der Junction Adhesion Molecule Familie (JAM) besitzen den genannten gegenüber nur eine Transmembrandomäne. Sie sind primär an der Vermittlung der Transmigration von Immunzellen beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Analyse von JAM und Tricellulin nicht weiter verfolgt.

1.1.3 Bedeutung von Claudinen

Claudine bilden mit gegenwärtig bekannten 24 Mitgliedern in Warmblütern die größte Familie der transmembranären Tight Junction-Moleküle. Sie weisen in verschiedenen Epithelien und Endothelien unterschiedliche Expressionsmuster auf [Tsukita et al., 1998, 2001]. Zu Beginn dieser Arbeit war die funktionelle Rolle einzelner Tight Junction Proteine jedoch noch nicht geklärt.

Dieser erste Hauptabschnitt der vorliegenden Arbeit besitzt daher als Schwerpunkt die funktionelle Charakterisierung der Tight Junction-Proteine Claudin-2, Claudin-5 und Claudin-16, welche im Ergebnisteil als Originalarbeiten aufgeführt sind [Amasheh et al., 2002; Amasheh et al., 2005, Kausalya/Amasheh et al., 2006]). Letztere Arbeit beschäftigt sich darüber hinaus mit pathophysiologisch relevanten humanen Varianten des Claudin-16.

Darüber hinaus wurde im Laufe dieser Arbeit die Lokalisation von Claudinen und Occludin in unterschiedlichen Epithelien wie der Haut [Tebbe et al., 2002], dem Innenohr [Florian et al., 2003] und einer porcinen Epithelzelllinie [Schierack et al., 2006] untersucht, sowie eine funktionelle Analyse der Occludin-Knockout-Maus durchgeführt [Schulzke et al., 2005]. Exemplarisch für diese Studien wird im Ergebnisteil dieser Arbeit die Identifikation von Schlussleistenproteinen in der Stria vascularis des Innenohrs präsentiert [Florian et al., 2003].

1.1.3.1 Claudin-2

Claudin-2 konnte in den Epithelien mehrerer Organe nachgewiesen werden, darunter in der Leber, im Gastrointestinaltrakt, in der Niere, in der Bauchspeicheldrüse [Rahner et al., 2001]

und im Gehirn [Wolburg et al., 2001]. Die Tatsache, dass Claudin-2 im Mäusenephron ausschließlich im proximalen Anteil nachweisbar ist [Enck et al., 2001] legte den Schluss nahe, dass Claudin-2 für eine erhöhte parazelluläre Durchlässigkeit verantwortlich ist.

Es folgten parallel zu der vorliegenden Arbeit gezielte Transfektionsstudien an Subtypen von MDCK-Zellen [Gekle et al., 1994], welche zunächst zeigen konnten, dass die Transfektion des hochohmigen Subtyps MDCK-I mit Claudin-2-cDNA zu einem Abfall des R^t ohne Änderung der Zahl der TJ Stränge führte [Furuse et al., 2001]. Dieser erste Befund konnte in der vorliegenden Arbeit maßgeblich erweitert werden, indem im hochohmigen Subtyp MDCK-C7 die Spezifität der Permeabilität analysiert wurde [Amasheh et al., 2002]. Parallel dazu konnte in dichten Epithelien wie der Stria vascularis des Innenohrs kein Claudin-2 nachgewiesen werden [Florian et al., 2003].

1.1.3.2 Claudin-5

Kloniert wurde Claudin-5 erstmals mit der Identifikation des Velokardiofazialen-Syndroms (Shprintzen-Syndrom) [Sirotkin et al., 1997]. Daher stammt auch der alternativ verwendete Name TMVCF (TM-Protein deleted in velo-cardial-facial-Syndrom) [Morita et al., 1999]. Bei dieser autosomal-dominanten Erbkrankheit liegt eine Deletion des Chromosom 22 vor (22q11). Betroffene Patienten haben eine offene Gaumenspalte, Herzanomalien und typische Gesichtsdeformierungen. Ferner sind Thymus und Epithelkörperchen aplastisch mit der Folge, dass die reifen T-Lymphozyten im peripheren Gewebe fehlen.

Erste Analysen zeigten, dass Claudin-5 Tight Junction-Stränge in Endothelzellen bildet [Morita et al., 1999; Kiushi-Saishin et al., 2002; Morita et al., 2003] und eine Komponente der Blut-Hirn-Schranke sowie der Blut-Hoden-Schranke darstellt [Nitta et al., 2003, Kamimura et al., 2002]. Außerdem konnte Claudin-5 in den epithelialen Azinuszellen der Bauchspeicheldrüse [Rahner et al., 2001], in Tight Junction von Schwann'schen Zellen [Poliak et al., 2002], während der Embryonalentwicklung des retinalen Pigmentepithels von Hühnern [Kojima et al., 2002] und in alveolaren Epithelzellen nachgewiesen werden [Wang et al., 2003].

Bei Claudin-5 defizienten Mäusen wurde die Blut-Hirn-Schranke für kleine Moleküle (<800D), jedoch nicht für größere Moleküle, selektiv gestört [Nitta et al., 2003].

Im Intestinaltrakt zeigte sich Claudin-5 in den Schlussleisten lokalisiert, und zwar sowohl im Endothel als auch im Epithel ohne Unterschiede in der Verteilung innerhalb der Krypten bzw. Villi [Rahner et al., 2001]. Biopsien des Colonsigmoids bestätigten dies [Bürgel et al., 2002]. In nativen Nierenepithelien konnte Claudin-5 nicht nachgewiesen werden [Morita et al., 1999; Kiuchi-Saishin et al., 2002]. In der vorliegenden Arbeit wurde es in der intestinalen epithelialen Zelllinie HT-29/B6 detektiert. Es folgte die Klonierung und die funktionelle Charakterisierung des Proteins durch stabile Transfektion einer Zelllinie der Niere (MDCK) und einer Zelllinie des Colons (Caco-2) mit FLAG-Claudin-5 cDNA.

1.1.3.3 Claudin-16

Claudin-16 wurde beim Menschen in der Niere in den medullären und corticalen Anteilen des dicken aufsteigenden Teiles der Henle-Schleife und im proximalen Abschnitt des distalen Tubulus nachgewiesen [Kiuchi-Saishin et al., 2002]. Darüber hinaus ist es in Tumoren nachweisbar [Heiskala et al., 2001].

Von Simon et al. [1999] wurde es als Paracellin-1, ein aus 305 Aminosäuren bestehendes Protein beschrieben, welches 10-18% Homologie mit anderen Claudinen aufweist:

Funktionell ist Claudin-16 verantwortlich für die renale Resorption von Calcium und Magnesium. Es wurde zunächst angenommen, dass mit Hilfe von Claudin-16 parazelluläre Kanäle entstehen welche, angetrieben durch einen elektrochemischen Gradienten, der Resorption von Magnesium und Calcium dienen [Simon et al., 1999].

Hinweise auf die Rolle von Claudin-16 lieferten zunächst zahlreiche beim Menschen nachgewiesene Varianten: In Familien mit autosomal rezessiv vererbter familiärer Hypomagnesämie mit Hypercalcurie und Nephrocalcinose (FHHNC) konnten 30 verschiedene Claudin-16-Mutationen identifiziert werden [Simon et al., 1999; Weber et al., 2000; Blanchard, A. et al., 2001; Wolf et al., Weber et al., 2001; Müller et al., 2003, Müller et al., 2006a, b]. Die Mutationen befinden sich vorwiegend im transmembranären oder extrazellulären Bereich des Moleküls. Aufgrund unterschiedlicher Eigenschaften der

Eine Übersicht über die beschriebenen Varianten gibt folgende Tabelle:

Mutation	Lokalisation	Defekt
Wildtyp Cldn16	Zellmembran	kein Defekt
W47X	ER	Akkumulation im ER
N53fs	ER	Akkumulation im ER
A62V	Zellmembran	Mg ²⁺ -Transport
H71D	Zellmembran	Mg ²⁺ -Transport
L75P	Zellmembran	Mg ²⁺ -Transport
R79X	ER, Golgi-Apparat, Lysosomen	lysosomale Akkumulation
R79L	Zellmembran, ER	partielle Akkumulation (ER)
L81W	ER, Golgi-Apparat, Lysosomen	lysosomale Akkumulation
L81F	ER, Golgi-Apparat, Lysosomen	lysosomale Akkumulation
L97P	ER	Akkumulation im ER
G92V	ER	Akkumulation im ER
G121R	ER, Golgi-Apparat, Lysosomen	lysosomale Akkumulation
G128A	Zellmembran	Mg ²⁺ -Transport
A139T	Zellmembran	Mg ²⁺ -Transport
R146T	Zellmembran	Mg ²⁺ -Transport
F162C	Zellmembran	Mg ²⁺ -Transport
G163D	ER	Akkumulation im ER
S165F	ER	Akkumulation im ER
S165P	ER	Akkumulation im ER
G169R	Zellmembran, ER	partielle Akkumulation (ER)
T233R	Zellmembran, Lysosomen	lysosomale Akkumulation

[Simon et al., 1999; Weber et al., 2000; Blanchard, et al., 2001; Weber et al., 2001; Müller et al., 2003, Kausalya/Amasheh et al., 2006]

Das Krankheitsbild der familiären Hypomagnesämie mit Hypercalcurie und Nephrocalcinose wurde bereits 1972 publiziert [Michelis et al., 1972]. Seitdem wurde FHHNC bei zahlreichen

Patienten beobachtet [Benigno et al., 2000; Simon et al., 1999; Weber et al., 2000; Gregoric et al., 2001]. Als Folge des veränderten Magnesiumhaushaltes der Patienten kommt es zu typischen körperlichen Symptomen. Hierzu gehören u.a. Harnwegsinfekte, Polyurie/Polydipsie, Hämaturie, zerebrale Krampfanfälle, Abdominalschmerz, Erbrechen und muskuläre Tetanie.

In der Niere selbst kommt es zur Nephrocalcinose mit Nephrolithiasis mit entsprechender, oben beschriebener Symptomatik. Extra-renale, beschriebene Symptome sind ein okuläres Geschehen sowie ein vermindertes Hörvermögen. [Tasic et al., 2005; Weber et al., 2001; Müller et al., 2003; Manz et al., 1978; Rodriguez-Soriano et al., 1994 und 1987; Praga et al., 1995; Benigno et al., 2000].

Die Folgen sind in der Regel chronische Niereninsuffizienz, die zum Teil schon in der Kindheit auftritt, mit Dialysepflicht oder Indikation zur Nierentransplantation. Die oben beschriebene Einteilung der Mutationen in zwei Kategorien konnte klinisch nicht beobachtet werden, anhand der Symptomatik sind Patienten beider Gruppen nicht zu unterscheiden.

Noch ist die Therapie der FHHNC rein auf die Symptome beschränkt. Eine Möglichkeit ist z.B. die vermehrte Zufuhr von Magnesium sowie die Gabe des Diuretikums Hydrochlorothiazid, welches die Hypercalcurie vermindert [Tasic et al., 2005]. Deswegen ist es wünschenswert, mehr über Ursachen, Gründe und Varianten sowie Therapiemöglichkeiten dieser Krankheit zu erfahren.

1.2 Funktionelle Charakterisierung von Tight Junction-Proteinen

Die funktionelle Analyse der Tight Junction erfolgte im Zellkulturmodell. Die unterschiedlichen Eigenschaften der Tight Junction Proteine erforderten hier eine große Bandbreite unterschiedlicher elektrophysiologischer Methoden. Voraussetzung für diese Untersuchungen war hier zunächst die molekularbiologische Analyse endogener Expression, sowie die Klonierung von Tight Junction-Protein codierenden-cDNAs und die stabile Transfektion von Zelllinien.

1.2.1 Nachweismethoden

Zum Nachweis von Tight Junction-Proteinen wurden zunächst primär Western Blot-Experimente und Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Für die Western Blot-Experimente wurden Membranproteinpräparationen verwendet, um die membranständige Fraktion der Tight Junction-Proteine zu analysieren. Ausgangspunkt vor stabiler Transfektion war stets der Nachweis endogen bereits vorhandener Proteine. Während die Western-Blot-Technik eine quantitative Aussage über die Expression von Tight Junction-Proteinen ermöglichte, wurde durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie die genaue Lokalisation ermittelt. Dies ist im Falle des Nachweises von Tight Junction-Proteinen besonders wichtig, da nur eine Lokalisation innerhalb des Tight Junction-Proteinkomplexes von funktioneller Bedeutung ist.

1.2.2 Funktionelle Analyse

Die Funktionelle Analyse von Tight Junction-Proteinen erfolgte primär mittels elektrophysiologischer Methoden. Im Mittelpunkt stand hier die Ussing-Kammer-Technik: Die Kurzschlussstrommessung in der Ussing-Kammer stellt eine etablierte in vitro-Technik zur Bestimmung von aktivem Ionentransport (Kurzschlussstrom, I_{sc}) und Ionenpermeabilität (Leitfähigkeit bzw. Widerstand) dar.

Die Widerstandsmessungen (R^t) an den jeweiligen Zellen (MDCK-C7- und Caco-2-Zellen) wurden in einer speziell modifizierten Ussing-Kammer durchgeführt [Kreusel et al., 1991]:

Durch eine spezielle Ausfräsung der Plexiglasskammer konnten Zellkulturfilter eingesetzt werden (Millicell-HA). In die Kammerhälften wurden 10 ml Ringerlösung gefüllt. Über eine Injektionsnadel erfolgte die Gaszufuhr. Es konnte nun, je nach experimentellem Ansatz, die Messung des transepithelialen Widerstandes und der spezifischen Permeabilität durch Fluxexperimente und Messung von Dilutions- und biionischen Potentialen erfolgen. Mit diesen experimentellen Ansätzen konnte die Permeabilität für Na^+ , K^+ , $Cholin^+$, Mannitol, Lactulose, FITC-Dextran, Cl^- , Br^- , sowie im Falle der Claudin-16-Analyse Mg^{2+} analysiert werden. Darüber hinaus konnten mit Hilfe einer modifizierten Form der Ussing-Kammer Impedanz-Spektroskopie-Messungen durchgeführt werden.

1.3 Na⁺-Transport im distalen Colon

1.3.1 Charakteristika des Epithelialen Na⁺-Kanals ENaC

Der epitheliale Na⁺-Kanal (ENaC, Gensymbol SCNN1) ist von zentraler Bedeutung für die Regulation des Na⁺-Haushaltes und hat seinen Wirkort in der apikalen Membran der Epithelien unterschiedlicher Gewebe wie distalem Colon, Sammelrohr der Niere, Lunge, Speicheldrüsenzellen und Schweißdrüsen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation des Na⁺-Transports im distalen Colon analysiert.

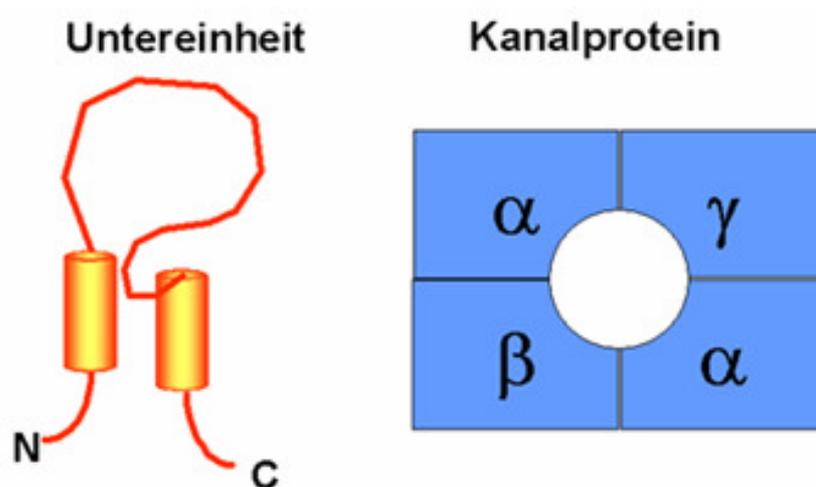


Abb 4: Schematischer Bau des ENaC (nach Firsov et al., 1998, verändert).

Die Na⁺-Resorption im Dickdarm erfolgt durch verschiedenen Transportsysteme. Zum einen erfolgt eine elektroneutrale NaCl-Resorption über den Na⁺/H⁺-Austauscher 3 (NHE3) und den Cl⁻/Bicarbonat-Antiporter (DRA) [Hoogerwerf et al., 1996; Yang et al., 1998]. Zum anderen erfolgt die Na⁺-Resorption über die gekoppelte Aufnahme mit kurzkettigen Fettsäuren und schließlich über den epithelialen Na⁺-Kanal, der den limitierenden Faktor der aktiven Natrium-Resorption im distalen Colon ausmacht [Garty et al., 1997].

Vor einigen Jahren wurde ENaC aus dem Darm der Ratte kloniert. Er setzt sich aus drei homologen Untereinheiten (α , β , γ) zusammen [Canessa et al., 1993, 1994; Lingueglia et al., 1994]. Die Kanalpore wird von diesen Untereinheiten in einem Verhältnis von 2:1:1 gebildet [Kosari et al., 1998, Firsov et al., 1998; Eskandari et al., 1999] (Abb. 4).

Die Regulation des Kanals im distalen Colon erfolgt durch nanomolare Konzentrationen von Aldosteron und anderen Kortikosteroiden primär über den Mineralokortikoidrezeptor [Fromm et al., 1993; Barbry et al., 1997; Garty et al., 1997; Grotjohann et al., 1999]. Mutationen des ENaC können in Über- oder Unterfunktion resultieren und Krankheiten wie Liddle-Syndrom oder Pseudohypoaldosteronismus Typ I bedingen [Hummler, 1999].

1.3.2 Malabsorption bei Colitis ulcerosa

Eine klinische Bedeutung erhält der ENaC durch seine Rolle bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie der Colitis ulcerosa. Diese entzündliche Darmerkrankung geht mit starker wässriger, sowie blutig-schleimiger Diarrhoe einher. Die durch Colitis ulcerosa geschädigte Mucosa zeigt eine gestörte Resorption von Na^+ , Cl^- und Wasser [Hawker et al., 1980; Rampton et al., 1984; Sandle et al., 1986]. Diese Malabsorption führt zur Ausscheidung eines erhöhten Stuhlvolumens. Mögliche Ursachen für dieses Phänomen sind der Leckflux-Mechanismus durch epitheliale Barrierestörung [Schmitz et al., 1999] und die gestörte aktive Resorption von Ionen [Sandle et al., 1990]. Die Aktivierung der Sekretion von Ionen scheint hingegen weniger entscheidend zu sein, wenn auch die Konzentrationen von Prostaglandinen und pro-inflammatorischen Zytokinen typischerweise bei Colitis erhöht sind [Sandle et al., 1990].

In der Pathogenese der Colitis ulcerosa konnte eine Störung des elektrogenen Natrium-Transports (J_{Na}) nachgewiesen werden. Vorherige Untersuchungen wiesen darauf hin, dass die apikale ENaC β - und γ -Untereinheit und die $\alpha 1$ -Isoform der Na^+/K^+ -ATPase in Colitis ulcerosa herunterreguliert sind [Greig et al., 2000]. Eine Erklärung für diese Veränderungen ist, dass subepitheliale Immunzellen inflammatorische Mediatorsubstanzen freisetzen, welche die epitheliale Transportfunktion einschränken. Proinflammatorische Zytokine hemmen bei entzündlichen Darmerkrankungen den $\text{Cl}^-/\text{Bikarbonat}$ -Antiporter (DRA) [Yang et al., 1998].

Die vorliegende Arbeit befasste sich, über die Regulation des ENaC bei Colitis ulcerosa hinaus, mit dem direkten Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen auf die Induktion des Kanals.

1.3.3 Regulation der parazellulären Na⁺-Permeabilität

Dieser Abschnitt dokumentiert eine aktuell eingereichte Arbeit, welche eine Verbindung zwischen den beiden Themenkomplexen Tight Junctions und ENaC darstellt: Im distalen Colon konnte parallel mit der Induktion des ENaC eine parazelluläre Abdichtung der Tight Junction gegenüber Na⁺ beobachtet werden. Dieser Regulationsvorgang erhöht die Effizienz des Na⁺-Transports durch eine Verhinderung der parazellulären Rückdiffusion von Na⁺ [Amasheh et al., s. 2.1.8].

2003 beschrieben Yu et al., dass sich die Claudin-8-Expression in der Niere auf die aldosteronsensitiven Tubulusabschnitte beschränkt. Dasselbe gilt für Claudin-7, welches jedoch vorwiegend in der basolateralen Membran lokalisiert ist.

Diese Beobachtung warf die Frage auf, ob die Expression beider Claudine durch Aldosteron oder einen aldosteronabhängigen Mechanismus beeinflusst wird. Es konnte eine glucokortikoidabhängige Induktion des Occludin in Drüsenzellen nachgewiesen [Stelwagen et al. 1999], sowie eine aldosteronabhängige Induktion von Occludin in den kapillären Endothelzellen des Gehirns in vitro demonstriert werden [Förster et al. 2005].

Darüber hinaus konnte eine aldosteroninduzierte Phosphorylierung von Claudin-4 in den Sammelrohrepithelien der Niere nachgewiesen werden [Le Moellic et al. 2005].

1.4 Analyse der Regulation des ENaC

Der Mechanismus der ENaC-Regulation durch Aldosteron wurde zunächst kontrovers diskutiert. Zwei unabhängige Studien zeigten zunächst, dass endogene Aldosteron-Stimulation eine Induktion der β - und γ -ENaC mRNA im distalen Colon der Ratte verursachte [Lingueglia et al., 1994; Renard et al., 1995], dies ließ eine direkte transkriptionelle Regulation der beiden Untereinheiten vermuten [Fromm et al., 1993] Diese Hypothese wurde jedoch angezweifelt [Barbry et al., 1997], da in einem Vergleich von

Zeitverläufen der mRNA-Expression von ENaC-Untereinheiten mit aus der Literatur entnommenen Zeitverläufen des Natriumtransportes der durch Aldosteron induzierte Natriumtransport früher einsetzte als die Expression der Untereinheiten [Asher et al., 1996]. In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst an identischen Geweben der Zeitverlauf der ENaC-Regulation auf funktioneller und molekularer Ebene identifiziert werden [Epple et al., 1999].

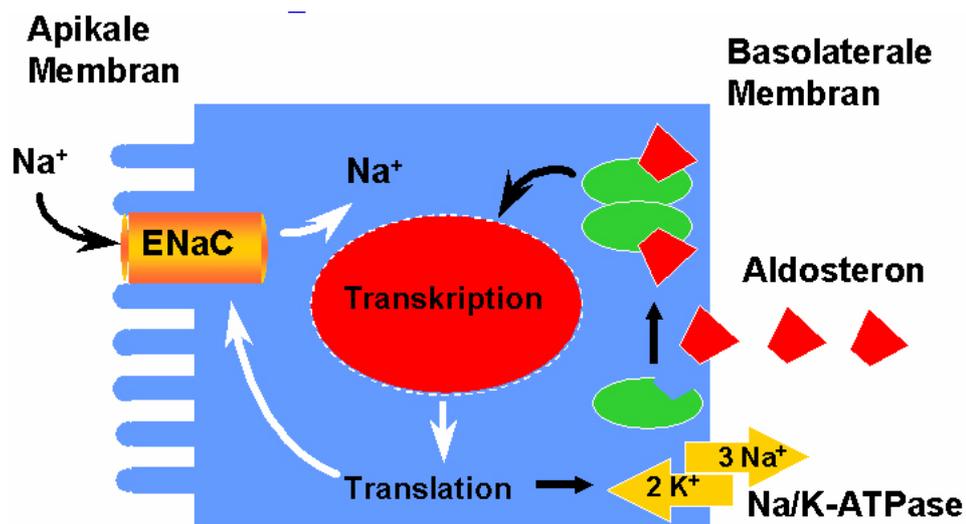


Abb. 5: Wirkmechanismus von Aldosteron.

Des weiteren sollte geklärt werden, ob proinflammatorische Zytokine am Darm von Mensch und Ratte die Regulation des ENaC direkt beeinflussen können [Amasheh et al., 2004, Barmeyer/Amasheh et al., 2004].

Die aus dieser Arbeit hervorgegangenen Publikationen zeigen erstmals einen direkten Vergleich funktioneller Analyse mit molekularbiologischer Regulation an identischen Colonepithelpräparaten von Ratte und Mensch. Die funktionelle Analyse erfolgte zunächst elektrophysiologisch mittels Ussingkammer-Technik. Nach dem Experiment wurden die Präparate für molekularbiologisch-biochemische Nachweismethoden wie Northern Blot, Western Blot und Immunfluoreszenzfärbungen verwendet. Darüber hinaus wurden die menschlichen Präparate für morphometrische Analysen verwendet.

1.4.1 Elektrophysiologische Methoden

Zentrales Experiment für die funktionelle Analyse der Regulation des ENaC war die Kurzschlussstrommessung epithelialer Präparate mittels Ussingkammer-Technik.

OP-Resektate des Colon sigmoideum sowie distale Colonabschnitte männlicher Albino-Wistar-Ratte wurden zunächst mechanisch von der Tunica muscularis und der Lamina muscularis mucosae abpräpariert, so dass als zu untersuchendes Gewebe die Lamina propria und die Epithelzellschicht übrigblieben. Die Epithelialpräparate wurden daraufhin in Ussing-Kammern eingespannt. Diese Kammer besitzt zwei Flüssigkeitsräume, welche mit Badlösung mit identischer Zusammensetzung befüllt wurde. Die transepitheliale Potentialdifferenz zwischen den Flüssigkeitsräumen wurde zur Verhinderung eines elektrochemischen Gradienten durch eine externe Spannungsklemme auf 0 mV geklemmt. Durch diesen Versuchsaufbau konnten lediglich aktive Transportprozesse ablaufen. Diese wurden in ihrer Nettosumme durch den Kurzschlussstrom (I_{SC}) messbar, der die durch den aktiven Ionentransport entstehende Potentialdifferenz kompensierte. Die zu beiden Seiten ins Kammerlumen exponierte Fläche des Epithels betrug je nach experimentellem Ansatz 0,54 cm² oder 0,28 cm².

Durch Zugabe von nanomolaren Konzentrationen von Aldosteron konnte der epitheliale Na⁺ Kanal induziert werden, der elektrogene Natriumtransport wurde am Ende des Experiments durch Zugabe des spezifischen ENaC-Inhibitors Amilorid als Differenz des Kurzschlussstroms ermittelt. Dieser Wert diente als direktes Maß für die Induktion des ENaC.

1.4.2 Molekularbiologische Methoden

Nach Beendigung des Ussing-Versuchs wurden die zur Badlösung hin exponierten Flächen der Epithelien herausgeschnitten. Es folgten Extraktion von RNA und Proteinen, Immunfluoreszenzfärbung oder morphometrische Analyse. Die Regulation der Untereinheiten des ENaC wurde zunächst auf RNA- und Proteinebene mittels Northern- und Western-Blot Technik analysiert.

Die Analyse der Zeitabhängigkeit der ENaC-Regulation wurde durch unterschiedlich lange Inkubation mit Aldosteron erzielt, während der Effekt von proinflammatorischen Zytokinen durch Zugabe in die Ussing Kammer vor Aldosteronstimulation analysiert werden konnte.

Die Northern-Blot Technik folgte einem Standardprotokoll. Als Sonden wurden radioaktiv bzw. Digoxigenin-markierte, gegen die Untereinheiten und GAPDH gerichtete Oligonukleotide verwendet. Die densitometrische Analyse erfolgte nach Luminiszenzreaktion. Für die Western Blot-Technik wurden Membranproteinpräparationen im Polyacrylamidgel aufgetrennt, nach Transfer auf Nylonmembran erfolgte der Nachweis einzelner Untereinheiten mittels spezifischer Antikörper. Letztere kamen ebenfalls bei Immunfluoreszenzfärbungen zum Einsatz.

1.5 Fragestellungen und Ziele dieser Arbeit

Tight Junctions und Membrankanäle bestimmen Barriere- und Transportfunktionen des Epithels. In kombinierten elektrophysiologischen und molekularbiologischen Studien sollte die Struktur/Funktionsbeziehung von beteiligten Membranproteinen untersucht werden. Die Hauptziele waren:

- Stabile Transfektion der Epithelzelllinie MDCK-C7 und Caco-2 mit Claudin-2-cDNA; Funktionelle Charakterisierung des Tight Junction-Proteins Claudin-2.
- Analyse der Lokalisation von Tight Junction-Proteinen in Epithelzelllinien und nativem Gewebe.
- Stabile Transfektion der Epithelzelllinien MDCK-C7 und Caco-2 mit Claudin-5-cDNA; Funktionelle Charakterisierung des Tight Junction-Proteins Claudin-5.
- Funktionelle Charakterisierung humaner Claudin-16-Varianten.
- Induktion des epithelialen Na⁺-Kanals (ENaC) im distalen Colon der Ratte durch Aldosteron in physiologischer Konzentration in vitro, anschließende molekularbiologische Analyse der Regulation seiner drei Untereinheiten.
- Analyse des Effekts proinflammatorischer Zytokine auf die Regulation des ENaC; Vergleich der Effekte mit Darmpräparaten von Colitis ulcerosa-Patienten.
- Analyse der Regulation der Tight Junction während der Induktion des ENaC.