

2 Ergebnisse in Form von Veröffentlichungen

- 2.1.1 Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells.
J. Cell Sci. 115 (2002), 4969-4976.
- 2.1.2 Claudins in the tight junctions of stria vascularis marginal cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 304 (2003): 5-10..
- 2.1.3 Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells.
Cell Tissue Res. 321 (2005), 89-96.
- 2.1.4 Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg^{2+} transport function of Claudin-16.
J. Clin. Invest. 116 (2006): 878-891.
- 2.1.5 Early aldosterone effect in distal colon by transcriptional regulation of ENaC subunits.
Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 278: G718-G724.
- 2.1.6 IL-1beta and TNFalpha regulate sodium absorption in rat distal colon.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 317:500-507.
- 2.1.7 Cytokine-dependent transcriptional down-regulation of epithelial sodium channel (ENaC) in ulcerative colitis.
Gastroenterology, 126:1711-1720
- 2.1.8 ENaC-mediated Na^+ absorption defends from paracellular back-leakage by claudin-8 up-regulation
J. Gen. Physiol., *submitted*

2.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

Diese Arbeit beschreibt den Nachweis und die Charakterisierung von Tight Junction-Proteinen und die Regulation des epithelialen Na^+ -Kanals, sowie das Zusammenwirken von Transport und Barriere im distalen Colon.

Zunächst wurden Struktur und Funktion von Tight Junctions zweier Subtypen der renalen Zelllinie MDCK, dem hochohmigen Typ C7 und dem niederohmigen Typ C11, untersucht. Claudin-2 zeigte eine deutliche Expression in C11, während es in C7 Zellen nicht nachgewiesen wurde. Beide Zelltypen zeigten keinen Unterschied hinsichtlich der Expression von Occludin und Claudin-3. Typ C11 zeigte eine stärkere Claudin-1-Expression, konfokale Mikroskopie identifizierte diese jedoch als subjunktional und somit als sekundär in Bezug auf den transepithelialen Widerstand.

Der hochohmige Typ (C7) wurde daraufhin stabil mit Claudin-2-cDNA transfiziert. Die anschließende Analyse mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie ergab eine Colokalisation von Claudin-2 mit Occludin. Funktionell resultierten eine 5,6 fache Zunahme der parazellulären Leitfähigkeit und relative Ionenpermeabilitäten von $\text{Na}^+=1$, $\text{K}^+=1$, $\text{Cholin}^+=0,7$ and $\text{Cl}^-=0,1$ (gegenüber Vektorkontrolle: 1, 1, 0,9, 0,8), ohne Änderung der Mannitolpermeabilität. Die Na^+ Leitfähigkeit betrug $0,2 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ in Kontrollen und $1,7 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ in Claudin-2-transfizierten Zellen, während die Cl^- -Leitfähigkeit $0,2 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ in beiden Gruppen betrug. Dementsprechend konnte gefolgert werden, daß Claudin-2 eine parazelluläre Pore für Kationen darstellt.

In der Cochlea von Wirbeltieren zeigen sich in den Marginalzellen der Stria vascularis und anderen epithelialen Zellen des Innenohrs in Gefrierbruchbildern Tight Junctions. Die molekulare Zusammensetzung war jedoch nicht bekannt. In dieser Arbeit wurde die Expression der Tight Junction-Proteine Claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7, -14, -15 und Occludin in der Stria vascularis des Meerschweinchens mittels Western-Blot und konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert und mit der Expression in der Niere und im Colon verglichen.

Im Western-Blot zeigte sich eine Expression von Claudin-1, -3, -4, -5, -7, -14 und Occludin. Immunfluoreszenzfärbungen wiesen eine Lokalisation von Claudin-1, -3, -4 und -5 in den Tight Junctions nach. Die Expression der abdichtenden Tight Junction Proteine Claudin-1, -3, -4 und -5 und das Fehlen von Claudin-2 stellen das strukturelle Korrelat für die physiologische Abgrenzung der K^+ -reichen Endolymphe von der Na^+ -reichen intrastriären Flüssigkeit dar.

Claudin-5 konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch in Tight Junctions der Colonepithelzelllinie HT-29/B6 nachgewiesen werden. In konfluenten Monolayern der humanen Colonzelllinie Caco-2 und renaler MDCK-Zellen konnte dagegen keine endogene Expression von Claudin-5 detektiert werden.

Um den Beitrag von Claudin-5 zur Barrierefunktion der Tight Junctions zu bestimmen, wurde die stabile Transfektion von Caco-2-Zellen und MDCK-C7-Zellen mit FLAG-Claudin-5-cDNA durchgeführt. FLAG-Claudin-5 konnte daraufhin in Tight Junctions der transfizierten Zellen detektiert werden.

Die Messung von transepithelialelem Widerstand und Mannitol-Fluxen zeigte in transfizierten Caco-2-Zellen eine parazelluläre Abdichtung. Bei den hochohmigen „dichten“ C7-Subklonen konnte dagegen keine Veränderung hinsichtlich des transepithelialen Widerstandes (R^t) nach Transfektion beobachtet werden. Je nach Zelltyp ist Claudin-5 demnach in der Lage, die parazelluläre Barriere zu verstärken und kann deshalb als ein „abdichtendes“ Tight Junction Protein bezeichnet werden.

Claudin-16 wird vor allem in der Niere in den medullären und corticalen Anteilen des dicken aufsteigenden Teiles der Henle-Schleife exprimiert und korreliert hier funktionell mit der Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Resorption. Mutationen resultieren in familiärer Hypomagnesämie und Hypercalcurie mit Nephrocalcinose (FHHNC). Die Funktionalität des WT Claudin-16 wurde in der vorliegenden Arbeit mit den sechs bekannten, FHHNC-assoziierten Mutationen H71D, L75P, G121R, G128A, R146T und T233R verglichen.

Es erfolgte eine stabile Transfektion von MDCK-C7-Zellen mit cDNA von Claudin-16 und Varianten. Mittels Western Blot und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie konnte eine

Expression der Proteine in den transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Die zunächst nicht in der Zellmembran lokalisierten Varianten G121R und T233R konnten durch pharmakologische Behandlung der Zellklone schließlich an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Anschließend erfolgte die elektrophysiologische Charakterisierung dieser Zellen. In Ussing-Kammern wurden transepithelialer Widerstand und Dilutionspotentiale gemessen sowie Magnesiumflux-Experimente durchgeführt. Mit Hilfe der Atomabsorptionsspektrometrie wurde der Magnesiumflux bestimmt.

Es zeigte sich ein erhöhter Magnesiumflux in mit WT Claudin-16-cDNA transfizierten Zellen. Dieser korrelierte nicht mit dem transepitheliale Widerstand. NaCl-Dilutionspotentiale zeigten hier keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und Zellklonen. Demnach zeigt diese Arbeit, dass Wildtyp Claudin-16 essentiell für den parazellulären Magnesiumtransport ist und bestätigt die Annahme, dass die untersuchten Zellklone eine verminderte Funktionalität aufweisen und diese als direkte Ursache der FHHNC angesehen werden kann.

Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Induktion des Epithelialen Na⁺-Kanals ENaC auf molekularer Ebene auf der Aldosteron-induzierten Zunahme der β - und γ -Untereinheit des Kanalproteins beruht. Hierfür wurden an jeweils identischen Geweben des früh- und spätdistalen Colons der Ratte funktionelle und molekulare Analysen kombiniert. Bereits nach einer Inkubationszeit von einer Stunde mit 3 nM Aldosteron konnte eine Zunahme der β - und γ -Untereinheit nachgewiesen werden. Dies zeigte, dass bereits eine frühe Aldosteron-induzierte Regulation des ENaC auf molekularer Ebene durch eine Zunahme der Transkription der β - und γ -Untereinheit erklärt werden kann.

Ebenfalls am distalen Colon der Ratte konnte nachgewiesen werden, dass die proinflammatorischen Zytokine IL-1beta und TNF-alpha einen inhibierenden Effekt auf die Induktion des ENaC aufweisen.

Darüber hinaus konnte dieses Experiment auf den Menschen übertragen werden: Präparate aus dem Colon sigmoideum zeigten eine mit dem spätdistalen Colon der Ratte vergleichbare Induktion des ENaC in vitro. Hier gelang der Nachweis der Zunahme der β - und γ -Untereinheit in Northern Blots, Western Blots und Immunfluoreszenzfärbungen. Das proinflammatorische Zytokin TNF α zeigte auch hier eine Hemmung der ENaC-Induktion auf

transkriptioneller Ebene. Promoterassays zeigten eine direkte Hemmung der Promoters der β - und γ -Untereinheit durch $\text{TNF}\alpha$.

Schliesslich konnte gezeigt werden, daß während der Induktion des Epithelialen Na^+ -Kanals eine parazelluläre Abdichtung erfolgt, welche eine effektivere Transportleistung für Na^+ unterstützt. Auf molekularer Ebene konnte eine Zunahme von Claudin-8 in Tight Junctions des humanen Colonepithels nachgewiesen werden, welche diesen Effekt erklärt. Auch im Zellkultorexperiment mittels stabil mit Glucocorticoid-Rezeptor cDNA transfizierter HT-29/B6-Zellen zeigte sich die Zunahme des abdichtenden Tight Junction-Proteins Claudin-8.