

3. Diskussion

3.1 Tight Junctions

3.1.1 Expression und Lokalisation von Tight Junction-Proteinen

Als transmembranäre, in den Tight Junction-Strängen gelegene Tight Junction-Proteine konnten bisher Occludin, Proteine der JAM Familie, Tricellulin und Claudine nachgewiesen werden. Seit der ersten Beschreibung von Claudinen im Jahre 1998 sind einige Charakteristika von TJ-Proteinen beschrieben worden. Der erste Abschnitt der vorliegenden Arbeit befasste sich insbesondere mit der funktionellen Charakterisierung von Claudin-2, -5, und -16, sowie der Lokalisation einzelner Tight Junction Proteine.

3.1.2 Rolle von Claudin-2, -5, und -16

MDCK- und Caco-2-Zellen wurden in dieser Arbeit als Expressionsmodell für die Charakterisierung von Tight Junction Proteinen genutzt. Zunächst wurden in Western Blot Experimenten und durch Immunfluoreszenzfärbungen die endogenen Expressionsmuster von Tight Junction-Proteinen bestimmt. Durch Immunfluoreszenzfärbungen konnte gezeigt werden, dass Claudin-1, welches in den niederohmigen MDCK-C11-Zellen deutlich stärker nachweisbar war, subjunktional lokalisiert und somit nicht für die parazelluläre Barriere verantwortlich ist. Daraufhin wurde die Funktion von Claudin-2 charakterisiert.

Claudin-2 ist in Epithelien vieler Organe nachweisbar, z.B. in der Leber, im Gastrointestinaltrakt, im Gehirn und in den Niere [Rahner et al., 2001, Wolburg et al., 2001]. Den Verdacht, dass Claudin-2 für eine erhöhte parazelluläre Durchlässigkeit verantwortlich ist, wurde in weiteren Studien geäußert. Enck et al. identifizierten in der Niere der Maus Claudin-2 ausschließlich im proximalen Anteil, was im Zusammenhang mit der physiologischen Durchlässigkeit dieses Organsegments diskutiert wurde [Enck et al., 2001].

Parallel zur vorliegenden Arbeit wurden erste Ergebnisse über die Wirkung von Claudin-2 auf den R^t in MDCK Zellen publiziert [Furuse et al., 2001]. Nach Transfektion von hochohmigen MDCK-Zellen mit Claudin-2-cDNA zeigte sich ein Abfall des R^t ohne Änderung der Zahl der TJ-Stränge. Furuse et al. folgerten, dass Claudin-2 eine Wasserpore bildet. Dieser Aussage

konnte in der vorliegenden Arbeit entgegnet werden, dass Claudin-2 Kationenkanäle bildet. Ein stichhaltiger Beweis für eine spezifische Permeabilität für Wasser steht jedoch aus.

Flux-, Dilutions- und biionische Potentialmessungen sowie Impedanzspektroskopie zeigen in der vorliegenden Arbeit, dass Claudin-2 parazelluläre Ionenkanäle bildet, welche zwar für Moleküle größer 182 Da impermeabel sind, aber eine selektive Durchlässigkeit für kleine Kationen besitzen. Diese relativ spezifischen Eigenschaften ähneln denen der klassischen Ionenkanäle und bestätigen initiale Beschreibungen von kationenselektiven Tight Junctions [Morena et al., 1974]. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie zeigten zudem, dass Claudin-2 isoliert in der Schlußleiste vorkommt (in Colokalisation mit Occludin) und daher seine Funktion eher auf einem direkten (Ionenkanal) als auf einem indirekten Weg (z.B. durch intrazelluläre Signaltransduktion) ausübt.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Beobachtung, dass Marginalzellen der Stria vascularis keine Claudin-2-Expression zeigten, während die für die Abgrenzung der Endolymph von der Perilymphe des Innenohrs durch die Expression der nachgewiesenen abdichtenden Tight Junction-Proteine Claudin-1, -3, -4 und -5 erklärbar ist.

Der direkte Nachweis der Abdichtung der Barriere durch Claudin-5 konnte ebenfalls durch stabile Transfektion, hier von Caco-2 Zellen, erbracht werden. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen herrschte zunächst die Ansicht vor, Claudin-5 sei endothelspezifisch (Morita et al., 1999). Spätestens seit der beschriebenen Klonierung aus cDNA der humanen Colonzelllinie HT-29/B6 konnte dieses Claudin jedoch auch dem Epithel zugeordnet werden. In der vorliegenden Arbeit führte nach erfolgreicher Transfektion eine Expression von Claudin-5 in Caco-2 Zellen zu einem Anstieg des transepithelialen Widerstandes (R^t) und zu einer Abnahme des Mannitol-Fluxes. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Claudin-5 innerhalb der Tight Junction eine abdichtende Funktion hat und dadurch die parazelluläre Permeabilität abnimmt. Im Gegensatz dazu führt eine Claudin-5-Expression bei „dichten“ Epithelien (MDCK-C7-Subklone) zu keiner Änderung der Barriereigenschaften. Somit kann Claudin-5 eine Barriere bis zu einem gewissen Grad abdichten. In den C7-Subklonen, welche ein „dichtes“ Epithel repräsentieren, konnte dagegen kein abdichtender Effekt von Claudin-5 beobachtet werden.

Parallel zu den vorliegenden Studien wurde der Beitrag von Claudin-5 zur Barriere auch an der Blut-Hirn-Schranke beschrieben (Nitta et al., 2003). Hier führte ein Knockout von Claudin-5 bei Mäusen zu einem selektiven Verlust der Blut-Hirn-Schranke. Durch das Fehlen von Claudin-5 war die Blut-Hirn-Schranke für Moleküle bis zu einer Größe von 800 Da permeabel geworden. Die Tiere starben zehn Stunden nach der Geburt (Nitta et al., 2003; Matter et al., 2003). Wie die vorliegende Arbeit zeigt, wären darüber hinaus auch epitheliale Barriestörungen der Claudin-5-defizienten Tiere naheliegend.

Etwa 70% des Magnesiums werden in der Henle-Schleife resorbiert (Konrad et al., 2004). Claudin-16 besitzt hier eine Schlüsselrolle (Simon et al., 1999). Veränderungen des Claudin-16, die mit einer veränderten Funktion einhergehen, können sich somit nicht nur auf die lokale Magnesium-Resorption, sondern auf die gesamte Magnesiumserumkonzentration und den Magnesiumhaushalt des Organismus auswirken.

Gegenwärtig sind 30 verschiedene, in Zusammenhang mit FHHNC stehende Claudin-16-Mutationen bekannt (Simon et al., 1999; Weber et al., 2000; Blanchard et al., 2001; Weber et al., 2001; Wolf et al., 2002; Tajima et al., 2003; Müller et al., 2003; Kang et al., 2005; Müller et al., 2006). Der molekulare Mechanismus, mit dem diese Mutationen die Funktion beeinflussen, wird in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt.

Zunächst konnten die Mutationen in zwei Kategorien eingeteilt werden: Zur ersten Gruppe gehören Varianten, welche aufgrund eines veränderten intrazellulären Transports die Zellmembran nicht erreichen; in der vorliegenden Arbeit wurden aus dieser Gruppe G121R und T233R funktionell näher untersucht. Die zweite Gruppe besteht aus Mutanten, welche die Zellmembran erreichen; hier wurden die Mutanten H71D, L75P, G128A und R146T analysiert. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Walter Hunziker des Epithelial Cell Biology Laboratory, Institute of Molecular and Cell Biology, Singapur, konnte die Expression und Lokalisation des WT Claudin-16 und der genannten Varianten in MDCK-C7-Zellen untersucht werden.

WT Claudin-16 und die Varianten H71D, L75P, G128A und R146T konnten in Tight Junctions lokalisiert werden. In einer parallel veröffentlichten Arbeit konnte dagegen in LLC-PK1-Zellen G128A und R146T nicht in der Tight Junction nachgewiesen werden (Hou et al., 2005). Dies könnte durch ungleiche Tight Junction-Protein-Expressionswege der verschie-

denen Zelllinien bedingt sein. Unterschiede zwischen MDCK- und LLC-PK1-Zellen in Bezug auf Transport und Lokalisation endogener Membranproteine sind bekannt (Folsch et al., 1999). Die Varianten T233R und G121R konnten zunächst lediglich in den Lysosomen nachgewiesen werden. Nach Gabe eines Endozytose-Inhibitors konnte die Variante T233R in die Tight Junction integriert werden. Folgend wird T233R zuerst an die Plasmamembran transportiert und akkumuliert dann nach erfolgter Endozytose in Lysosomen. G121R hingegen konnte nach Gabe von 4-PBA, welches die Entfaltung und Expression in der Zellmembran erleichtert (Ulloa-Aguirre et al., 2004), an der Zelloberfläche detektiert werden. G121R scheint die Lysosomen also nicht über die Plasmamembran mit nachfolgender Endozytose zu erreichen, sondern direkt vom Golgi-Komplex aus oder über Endosomen. Dies lässt in diesem Fall einen Defekt im Faltungsprozess mit folgender veränderter Struktur des Proteins vermuten.

Nach Expression in MDCK-Zellen zeigte sich beim WT Claudin-16 im Gegensatz zu den Cldn-16-Varianten H71D, L75P, G128A, G121R, R146T und T233R ein erhöhter Magnesiumflux, während bei Dilutionspotentialen und Widerständen kein signifikanter Unterschied zu detektieren war. Dies steht in Einklang mit der Studie von Hou et al. an LLC-PK1-Zellen (Hou et al., 2005), deren Permeabilität aus Dilutionspotentialen errechnet wurde. Im Vergleich zu den Claudin-16 exprimierenden LLC-PK1-Zellen der genannten Studie lag der Magnesiumflux der mit dem WT Claudin-16 transfizierten MDCK-Zellen in dieser Arbeit deutlich niedriger ($5.7 \pm 0.5 \times 10^{-3}$ cm/h vs. $10.7 \pm 0.06 \times 10^{-6}$ cm/s, entspricht 38.7×10^{-3} cm/h). Zur Erklärung kann hier wieder auf bekannte unterschiedliche Expressionswege und Funktionen der Membranproteine in den verschiedenen Zelllinien (Folsch et al., 1999) verwiesen werden. Im Vergleich dazu führten die mit den unterschiedlichen Varianten transfizierten MDCK-C7-Zellen zu keiner Erhöhung der Permeabilität für Mg^{2+} . Dies lässt den Schluss zu, dass der parazelluläre Magnesiumtransport durch die hier untersuchten Punktmutationen im Claudin-16-Protein, die der FHHNC assoziiert sind, gestört wird. Die extrazellulären Schleifen des Claudin-16-Moleküls scheinen essentiell für die Funktion des Proteins zu sein. Vor allem negativ geladene Aminosäuren werden in Verbindung mit der parazellulären Resorption von divalenten Kationen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} gebracht (Simon et al., 1999; Hou et al., 2005). Tatsächlich betreffen die bisher gefundenen, der FHHNC assoziierten

Mutationen jedoch keine negativ geladenen Aminosäuren. Dies gilt auch für die hier untersuchten Zellklone. Variante H71D besitzt in der ersten extrazellulären Schleife anstelle des positiv geladenen Histidins ein saures Aspartat. Die Änderung der Ladung könnte zu veränderten elektrostatischen Wechselwirkungen führen. Dies könnte auch der Fall sein beim R146T-Zellklon, der sich in der zweiten extrazellulären Schleife befindet. Hier wird die positiv geladene Aminosäure Arginin durch Tryptophan ersetzt.

In den Varianten L75P und G128A verändert sich die Ladung nicht, da hier neutrale durch andere neutrale Aminosäuren ersetzt werden. Hier könnte es zu einer veränderten Konformation der Proteine kommen. Unterstützt wird diese Annahme durch das veränderte NaCl-Dilutionspotential von L75P.

Die beiden Zellklone G121R und T233R liegen *in vivo* in der Zellmembran nicht in ausreichender Menge vor. Hier erreichten sie nur durch pharmakologische Behandlung *in vitro* die Zellmembran und wurden dann dort exprimiert. Auch die Expression an der Zelloberfläche wirkte sich nicht auf den Magnesiumflux aus. Die Mutation G121R liegt in der dritten transmembranären Domäne, wobei die neutrale Aminosäure Glycin durch den positiv geladenen Baustein Arginin ersetzt wird. Im T233R-transfizierten Zellen, welcher intrazellulär am COOH-Ende des Proteins lokalisiert ist, ist die alkoholische Aminosäure Tryptophan durch das positiv geladene Arginin ersetzt. Hier konnte gezeigt werden, dass diese Variante auf die Bindungsdomäne für ZO-1 angewiesen ist [Müller et al., 2003].

3.2 Regulation des Na⁺-Transports im distalen Colon

3.2.1 Physiologische Regulation des ENaC

An der Ratte wurde ein Maximum des aldosteroninduzierten elektrogenen Natriumtransports nach 8-stündiger Inkubation mit Aldosteron *in vivo* beschrieben [Fromm et al., 1993]. Zunächst herrschte jedoch Uneinigkeit darüber, welchen Einfluss die Transkription des Kanals an der frühen Induktion der ENaC-Stimulation durch Aldosteron hat [Barbry et al., 1997], da in einem Vergleich von Zeitverläufen der mRNA-Expression von ENaC-Untereinheiten mit aus der Literatur entnommenen Zeitverläufen des Natriumtransports der durch Aldosteron induzierte Natriumtransport früher einsetzte als die Expression der Untereinheiten [Asher et

al., 1996]. In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals an identischen Gewebeproben die funktionelle und molekulare Regulation analysiert werden.

Am gesunden humanen Colon sigmoideum zeigte sich auf mRNA-Ebene bei Inkubation mit Aldosteron eine starke Induktion der β - und γ -Untereinheiten des ENaC *in vitro*. Die Induktion des Transports war dabei abhängig von Konzentration und Zeit, was bereits in früheren Experimenten der Arbeitsgruppe an Ratte [Epple et al., 2000] und Mensch [Epple et al., 1995] beobachtet werden konnte. Der maximale Transport wurde nach 6-8 Stunden erreicht. Die Regulation der β - und γ -Untereinheiten zeigten eine hohe Übereinstimmung auf mRNA- und Proteinebene. Parallel zu dem verminderten Natrium-Transport im Ussing-Experiment war die Induktion der β - und γ -ENaC mRNA bei Patienten mit Colitis ulcerosa gestört.

3.2.2 Gestörte Regulation bei Entzündung

Bei chronischer Stimulation durch Steroide konnte ein aktiver Natrium-Transport bis in distale Dünndarmabschnitte festgestellt werden [Will et al., 1980]. Auf diese Weise ist der Natrium-Transport ein wichtiger intestinaler Resorptionsmechanismus, der als Reservekapazität zum Schutz vor Diarrhöe dient. In dieser Arbeit wurde die ENaC-Dysregulation im Colon bei Colitis ulcerosa gezeigt und entscheidende Informationen über die Pathomechanismen der Hemmung des ENaC durch proinflammatorische Cytokine gewonnen. Der Na^+ -Transport in entzündetem Colitisgewebe war erheblich gestört. *In vivo* bedeutet dies einen Verbleib der Natrium-Ionen im Lumen, was wiederum in einer vermehrten Elektrolyt- und Wasserausscheidung resultiert. Es stellt sich die Frage, wie stark sich der Verlust des Diarrhoe-Reserve-Mechanismus der aktiven Natriumresorption quantitativ auswirkt. Zur Beurteilung des Ausmaßes der Diarrhoe kann die Menge des Ausscheidungsvolumens, das von der aktiven Natriumresorption allein abhängt, berechnet werden. Unter physiologischen Bedingungen resorbiert ein 15 cm-Segment des distalen Colons 21 mmol Na^+ pro Tag. Dies lässt sich aus dem Durchmesser des Colons von 2,3 cm und dem elektrogenen Na^+ -Transport (J_{Na}) von $8 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, wie er bei hohen Aldosteron-Konzentrationen beobachtet wurde, bestimmen. Obwohl die Messung der absoluten Werte für den Durchmesser des Colons und den Natriumstrom J_{Na} schwierig ist, deutet eine hypothetische Rechnung darauf hin, dass die

Resorption von 650 ml Stuhl-Volumen pro Tag entlang eines 15 cm langen Mineralokortikoid-sensiblen distalen Colon-Segments bei Dysfunktion der aktiven Natrium-Resorption verhindert würde. Diese Rechnung erfolgte unter Annahme einer Natrium-Konzentration in den Faeces von 32 mmol/l unter physiologischen Bedingungen und hängt sicherlich von nur schwierig zu verifizierenden Parametern ab, sie charakterisiert jedoch das maximale Ausmaß. Auch wenn das effektive Volumen darunter liegt, es würde auf jeden Fall zum Ausmaß der Diarrhöe bei der Colitis ulcerosa beitragen.

In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst eine Störung des elektrogenen Na^+ -Transports im Colitis ulcerosa-Modell der Interleukin-2-defizienten Maus nachgewiesen werden. Diese Störung zeigte sich bereits in einem frühen Entzündungsstadium noch vor der eigentlichen Barrierestörung des Epithels [Barmeyer, 2003]. Die Hemmung eines aktiven Transports schon ohne manifeste Barrierestörung des Epithels ist ein weiterer Hinweis für ein spezifisches Wirken von inflammatorischen Mediatoren auf die Expression von aktiven Transportern.

In Western- und Northern-Blots konnte gezeigt werden, dass die β - und γ -Untereinheiten im Kontrollgewebe durch Aldosteron induziert wurden, während die α -Untereinheit konstant blieb. Dieses Ergebnis passt auch zu den aktuellen Daten in der Literatur, in der die α -Untereinheit als im Wesentlichen in der apikalen Membran exprimiert beschrieben wird [Epple et al., 2000].

Bei der Colitis ulcerosa konnte keine Zunahme der β - und γ -Untereinheiten durch Aldosteron induziert werden. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass dem reduzierten elektrogenen Na^+ Transport (J_{Na}) eine verminderte Expression der β - und γ -Untereinheiten auf RNA und Proteinebene und eine geringere Aldosteron-vermittelte Induktion zugrunde liegt.

Die Zytokine $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ hemmten sowohl die aldosteronabhängige Induktion des Na^+ -Stroms als auch die β - und γ -ENaC-Expression im humanen distalen Colon in vitro. Die Hemmung dieser beiden Untereinheiten fiel besonders im Vergleich zu α -ENaC auf, weil diese unverändert blieb. Gleichzeitig blieb der epitheliale Widerstand während des Ussing-Versuchs konstant, was gegen unspezifische Effekte wie z.B. den Zytokin-induzierten Verlust

der Oberflächenzellen sprach. Zusammengenommen wiesen beide Ergebnisse auf einen direkten Einfluß der proinflammatorischen Zytokine auf die ENaC-Expression hin. Dass Zytokine aus Typ-1-T-Helfer- Zellen auch auf andere Transporter und deren Regulation einen direkten Einfluß haben können, konnten Rocha et al. [2000] für den Natrium-Protonen-Antiporter NHE3 in humanen Caco-2/BBE Zellen und am Rattendarm nach Behandlung mit IFN- γ nachweisen. Hier führte IFN- γ zur verminderten Expression eines Transporters. TNF- α reduzierte die β - und γ -ENaC-promotorvermittelte Reporter-Gen Expression. Dies zeigt, dass TNF- α die resorptiven Transport-Funktionen durch ein direktes Eingreifen in die Genexpression von Transportproteinen einschränkt.

Im Allgemeinen werden die transkriptionellen Effekte von Steroidhormonen über Glucocorticoid-Response-Elements (GRE) vermittelt. Sowohl für Glucocortikoide als auch für Mineralokortikoide konnte gezeigt werden, dass sie im distalen Colon von Säugetieren und auch in der Niere die Expression von β - und γ -ENaC, aber nicht die von α -ENaC erhöhen [Renard et al., 1995, Asher et al., 1996, Escoubet et al., 1997, Stokes et al., 1998]. Weiter konnte herausgefunden werden, dass der humane α -Promotor durch Gluco- und Mineralocorticoide via eines einzigen GRE's in der 5'-Flankenregion des Gens stimuliert wurde [Mick et al., 2001].

Für die transkriptionelle Regulation der ENaC-Gen-Expression durch TNF- α wurde eine putative Bindestelle für den nuklearen Faktor- κ B (NF- κ B) im Promotor der humanen ENaC- α -Untereinheit beschrieben [Thomas et al., 1998]. Die Promotor-Fragmente von β - und γ -ENaC, welche in Reporter-Gen-Assays verwendet wurden, enthalten einige potentielle Bindestellen, welche immer noch als funktionelles Ziel für die Wirkung von NF- κ B nachgewiesen werden müssen. Bis heute konnte keine direkte Interaktion zwischen GRE und NF- κ B Bindestellen auf die ENaC-Promoteraktivität beschrieben werden.

Neben der hemmenden Wirkung von TNF α auf die Induktion des epithelialen Na⁺-Kanals ist insbesondere der Effekt auf die Barriere von entscheidender Bedeutung. Mankertz et al. [2000] zeigten einen direkten Effekt von TNF α auf die Expression des Tight Junction-Proteins Occludin. TNF α und IFN γ verminderten den transepithelialen Widerstand an HT-29/B6-Zellen und führten zu einer Abnahme der Expression der Occludin-mRNA in Northern Blots. Auch die Promoter-Aktivität des Occludins wurde jeweils durch die beiden Zytokine

allein, aber auch durch einen synergistischen Effekt dieser beiden Mediatoren vermindert, was auf eine Genregulation der parazellulären Barriere-Strukturen deutete.

3.2.3 Regulation der Tight Junction

Aus dem Na^+ -Transport vom Lumen ins Interstitium über den Epithelialen Na^+ -Kanal (ENaC) resultiert ein negatives transepitheliales Potential. Zum Ausgleich diffundiert K^+ ins Lumen; der Serum-Kaliumspiegel nimmt ab. Dieser Vorgang resultiert aus der Aufrechterhaltung des durch den Na^+ -Transport entstandenen negativen transzellulären Gradienten. Voraussetzung hierfür ist die parazelluläre Abdichtung durch TJ-Proteine. Wäre diese nicht gegeben, würden die in das Interstitium transportierten Na^+ -Ionen zum Ausgleich des negativen Gradienten ins Lumen diffundieren. Eine Regulation der Barriere während der ENaC-Induktion wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Bereits 1999 konnten Quaroni et al. die Expression von ZO-1 in der intestinalen Zelllinie IEC-6 nach einwöchiger Inkubation mit $0,5 \mu\text{M}$ Hydrocortison nachweisen [Quaroni et al., 1999]. Darüber hinaus konnte eine verstärkte Expression von ZO-1 und Occludin in kapillären Endothelzellen des Rattenhirns durch Dexamethason gezeigt werden [Romero et al., 2003]. Förster et al. zeigten daraufhin, dass die Aktivierung der Glucocorticoidrezeptors durch Hydrocortison zu einer erhöhten Occludinexpression führt [Förster et al., 2005]. In der vorliegenden Arbeit wurde die TJ-Proteinexpression im parazellulären Spalt des distalen humanen Colons nach Inkubation mit Aldosteron analysiert. Es konnte eine verstärkte Expression von Occludin und Claudin-8 festgestellt werden. Es stellte sich jedoch die Frage, ob die Expression und Translokation der betroffenen Proteine direkt durch Aldosteron oder durch andere parallel ablaufende Regulationsmechanismen wie z.B. über den Na^+ -Strom reguliert werden könnten. Dementsprechend wurden Kontrollexperimente durchgeführt, bei denen gleich zu Beginn Amilorid appliziert wurde und somit eine Induktion des J_{Na} verhindert wurde. Eine verstärkte Expression von Claudin-8 und Occludin konnte in diesen Versuchsansätzen nicht nachgewiesen werden. Stimulation durch Aldosteron führte demnach zu keiner direkten parazellulären Abdichtung. Die Ergebnisse deuteten auf einen sekundären, eventuell durch Na^+ vermittelten Regulationsmechanismus hin.

Untersuchungen an der Occludin-Knock-out-Maus zeigten, dass die Abwesenheit von Occludin keine Auswirkungen auf die parazelluläre Permeabilität hat [Saitou et al., 2000,

Schulzke et al., 2000]. Yu et al. untersuchten 2005 Occludin-defiziente MDCK-Zellen. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Unterbindung der Occludin-Expression zu keiner Veränderung der TJ-Organisation wohl aber zur veränderten Expression der einzelnen TJ-Proteine führt. Im Einzelnen zeigte sich eine verminderte Expression von Claudin-1 und -7 und eine Zunahme von Claudin-3 und -4. Die Expression von Claudin-2 blieb konstant. Diese Veränderungen konnten jedoch nicht mit einer direkten Rolle des Occludin als TJ-Barriere in Verbindung gebracht werden [Yu et al., 2005]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Zunahme der Occludin-Expression während der ENaC-Induktion festgestellt werden.

Die verstärkte Expression ist jedoch nicht notwendigerweise der Grund für die Erhöhung des transepithelialen Widerstandes, zumal Occludin darüber hinaus nach Stimulation mit Aldosteron nur subjunktional verstärkt nachweisbar war. Die wahrscheinlich komplexere Rolle von Occludin als Bestandteil der Tight Junction und die Bedeutung der vermehrten subjunktionalen Expression unter ENaC-Induktion bleiben ebenso wie seine Regulationsmechanismen in weiteren Studien zu untersuchen.

2004 wurde die Expression von Claudin-8 entlang der aldosteronsensitiven Tubulusabschnitte, dem distalen Nephron, dem terminalen aufsteigenden dünnen Ast der Henle-Schleife und im distalen Tubulus beschrieben [Li et al., 2004]. Diese Tubulusabschnitte zeichnen sich durch starke Barriereigenschaften aus. Claudin-8 trägt als kationenselektive Komponente zur Aufrechterhaltung des Natriumgradienten bei. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage ob Aldosteron entweder die Expression von TJ-Proteinen wie Claudin-8 induziert oder ob Claudin-8 aldosteronunabhängig als Claudin mit stark abdichtender Funktion in diesen sehr dichten TJs exprimiert wird.

Die abdichtende Wirkung des Claudin-8 gegenüber Kationen in der Niere konnte nachgewiesen werden [Jeansonne et al., 2003]. Einen weiteren möglichen Mechanismus zur kationenselektiven Abdichtung stellt eine Translokation von porenbildenden Claudinen wie Claudin-2 dar. Yu et al. berichteten 2003 von einer Herabregulation des Claudin-2, welche mit der vermehrten Expression des Cldn-8 in MDCK-II-Zellen einherging. Dieser Mechanismus war für den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Mechanismus jedoch von sekundärer Bedeutung, da Claudin 2 im distalen Colon nicht exprimiert wird [Bürgel et al.,

2002]. Daher liegt nahe, daß die Verstärkung der parazellulären Barriere durch den direkt abdichtenden Effekt von Claudin-8 zu erklären ist.

Die vorliegende Arbeit zeigte eine unveränderte Expression von Claudin-1, -4, und -5 nach Induktion des Epithelialen Na⁺-Kanals im Colon sigmoideum auf; Claudin-1 stellt eine parazelluläre Barriere für Moleküle von einer Größe bis 600 Da dar. Es ist Bestandteil vieler Epithelien wie der Epidermis und der Lunge, von Endothelien und Osteoblasten [Tebbe et al., 2002, Turksen et al., 2004]. Claudin-1 konnte in der apikolateralen Membran der Epithelzellen des Colon sigmoideum nachgewiesen werden. Cldn-1 scheint dabei eine konstant abdichtende Funktion während der Zunahme des Aldosteron-induzierten Na⁺-Stroms zu besitzen, während über andere TJ-Proteine wie Cldn-8 die TJ-Barriere unter Natrium-Induktion dynamisch reguliert wird.

Claudin-4 induziert eine Verstärkung der Na⁺-selektiven Barriere. In MDCK-II-Zellen bewirkte die Expression einen Anstieg des transepithelialen Widerstandes um 300% [Van Itallie et al., 2001]. Claudin-4 wurde im Colon und u.a. im Lungenepithel [Turksen et al., 2004], sowie der Stria vascularis des Innenohrs nachgewiesen [Florian et al., 2003]. In einer Studie untersuchten Le Moellic et al. [2005] die Auswirkungen von Aldosteron auf Claudin-4 im renalen Sammelrohr und konnten eine aldosteronvermittelte Phosphorylierung feststellen. Expressionsstärke und Lokalisation blieben unverändert. Es wurde jedoch eine verstärkte parazelluläre Permeabilität für ¹²⁵I festgestellt und als mögliche Folge der Claudin-4-Phosphorylierung diskutiert.

Auch unsere Untersuchungen am humanen Colon sigmoideum ergaben eine unveränderte Expression und Lokalisation von Claudin-4 in der apikolateralen Membran von Epithelzellen nach Inkubation mit Aldosteron. Die Ergebnisse decken sich somit mit denen Le Moellic et al. am Sammelrohr der Niere [Le Moellic et al., 2005]. Die These, dass Claudin-4 in seiner Funktion als Natrium-Barriere über eine vermehrte Expression eine entscheidende Rolle bei der Abdichtung der TJ spielt und dadurch die physiologische Funktion des ENaC unterstützt erscheint nach unseren Ergebnissen nicht wahrscheinlich. Eine weitere Möglichkeit wäre jedoch, dass es durch Phosphorylierung eine weitere uns noch unbekannte Rolle in der TJ, beispielsweise in der Signaltransduktion, spielt.

Bezüglich zweier Krankheitsbilder ist unsere Studie von unmittelbarer Bedeutung: Pseudohypoaldosteronismus und Liddle-Syndrom (Pseudohyperaldosteronismus). Beiden

Krankheitsbildern liegen Mutationen der ENaC-Untereinheiten zugrunde, welche zu einer veränderten aldosteronabhängigen Na^+ -Resorption führen [Sartorado et al., 2004, Pradervand et al., 1999, Huey et al., 2004]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen darauf schließen, daß auch die Zusammensetzung der Tight Junction hiervon betroffen ist.

Zwei Formen des Pseudohypoaldosteronismus werden unterschieden; der autosomal-rezessiv vererbte multisystemische und der autosomal-dominante renale Typ. Pseudohypoaldosteronismus Typ I (PHA I) ist die renale Form des Pseudohypoaldosteronismus. Es handelt sich um ein seltenes neonatales Syndrom, welches mit hohen Renin- und Aldosteron-Plasma-Konzentrationen sowie Hyponatriämie und Hyperkaliämie mit metabolischer Azidose verbunden ist, und bei dem zugeführte Mineralkortikoide keine Wirkung zeigen. Die Therapie beruht auf einer Elektrolytsubstitution mit Natriumchlorid. Bei therapieresistenten Patienten zeigen sich letale Verläufe.

Beiden Typen des Pseudohypoaldosteronismus liegen unterschiedliche Mutationen von ENaC-Untereinheiten oder des Mineralkortikoid-Rezeptors zugrunde [Sartorado et al., 2004, Pradervand et al., 1999]. Bei einigen Patienten konnte jedoch keine der beiden Varianten nachgewiesen werden. Bei einer Reihe dieser Patienten wurde nach Mutationen des Claudin-8 gesucht, hier konnte jedoch keine Mutation festgestellt und die Hypothese der pathogenetischen Bedeutung einer Claudin-8 Mutation für den PHA entkräftet werden [Huey et al., 2004]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werfen jedoch ein neues Licht auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Claudin-8, dessen abdichtender Funktion und dem ENaC bzw. hMR-Defekt bei PHA. Ohne Aldosteronwirkung wird ENaC nicht induziert, was eine Verstärkung der Na^+ -Resorption und somit der TJ-Abdichtung verhindert.

Beim Liddle-Syndrom (Pseudohyperaldosteronismus) konnten Mutationen im PY-Motiv des zytoplasmatischen C-Terminus der β - und γ - ENaC-Untereinheit festgestellt werden, welche die Nedd 4-2-vermittelte Inaktivierung des ENaC verhindern und so zu einer verstärkten Resorption führen [Furuhashi et al., 2005]. Eine durch die verstärkte Natriumresorption getriggerte Abdichtung der TJ würde über die Stabilisierung des elektrochemischen Gradienten unterstützend zur Symptomatik der scheinbar erhöhten Aldosteron-Aktivität beitragen. Unsere Ergebnisse stehen daher auch in Einklang mit den bei diesem Krankheitsbild bekannten Befunden.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die funktionelle Charakterisierung von Tight Junction-Proteinen, die Analyse der Induktion des Epithelialen Na⁺-Kanals (ENaC), die Rolle der Untersuchungsobjekte bei physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen und den Nachweis der synergistischen Regulation von Transport und Barriere im Colon sigmoideum.

In Bezug auf die Charakterisierung der Tight Junction-Proteine konnte eine Porenfunktion von Claudin-2, eine abdichtende Funktion von Claudin-5 und eine Mg²⁺-Permeabilität von Claudin-16 nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde die molekulare Grundlage der dichten Barriere der Marginalzellen der Stria vascularis aufgeklärt. Für eine Reihe von Varianten von Claudin-16, welche im Zusammenhang mit familiärer Hypomagnesämie mit Hypercalcurie und Nephrocalcinose (FNHHC) stehen, wurde eine direkte Dysfunktion im Epithelzellmodell nachgewiesen.

Die Analyse der Regulation des epithelialen Na⁺-Kanals im distalen Colon der Ratte zeigte, dass Aldosteron bereits initial die Transkription der β - und γ -Untereinheiten des ENaC induziert. Die Verwendung identischer Gewebepräparate für die funktionelle und molekulare Analyse ermöglichte den Nachweis, dass die ENaC-Regulation im distalen Colon auf rein transkriptioneller Ebene erklärt werden kann. Darüber hinaus konnte eine Hemmung der Induktion des ENaC in der entzündeten Colonmucosa von Colitis ulcerosa-Patienten nachgewiesen werden. Im gesunden Colon von Ratte und Mensch wurde ein direkt hemmender Effekt von proinflammatorischen Zytokinen auf die ENaC-Induktion aufgezeigt.

Schließlich konnte ein direkter funktioneller Zusammenhang zwischen der Regulation des Ionentransports und der parazellulären Abdichtung gefunden werden: Während der Induktion des elektrogenen Na⁺-Transports verhindert eine verstärkte Abdichtung des Interzellularspalts den parazellulären Rückfluss von Na⁺ und trägt somit zu einer erhöhten Effizienz des Na⁺-Transports bei.

Literaturverzeichnis

Asher C, Wald H, Rossier BC, Garty H (1996). Aldosterone-induced increase in the abundance of Na⁺ channel subunits. *Am. J. Physiol.* 271: C605-C611.

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, Barmeyer C, Koch CS, Tavalali S, Mankertz J, Epple HJ, Gehring MM, Florian P, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD (2004). Cytokine-dependent transcriptional down-regulation of epithelial sodium channel in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 126: 1711-1720.

Amasheh S, Schmidt T, Florian P, Mankertz J, Gitter AH, Schulzke JD, Fromm M (2005). Claudin-5 contributes to barrier sealing in tight junctions of epithelial cells. *Cell Tissue Res.* 321: 89-96.

Barbry P, Hofman P (1997). Molecular biology of Na⁺ absorption. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 273: G571-G585.

Barmeyer C, Horak I, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD (2002). The interleukin-2-deficient mouse model. *Pathobiology* 3: 139-142.

Barmeyer C*, Amasheh S* (*equally contributing), Tavalali S, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD (2004). IL-1beta and TNFalpha regulate sodium absorption in rat distal colon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317: 500-507.

Benigno V, Canonica C S, Bettinelli A, von Vigier R O, Truttmann A C, Bianchetti M G (2000). Hypomagnesemia-hypercalciuria-nephrocalcinosis: a report of nine cases and a review. *Nephrol. Dial. Transplant.* 15: 605-610.

Blanchard A, Jeunemaitre X, Coudol P, Dechaux M, Froissart M, May A, Demontis R, Fournier A, Paillard M, Houillier P (2001). Paracellin-1 is critical for magnesium and calcium reabsorption in the human thick ascending limb of Henle. *Kidney Int.* 59: 2206-2215.

Bürigel N, Bojarski C, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD (2002). Mechanisms of diarrhea in collagenous colitis. *Gastroenterology* 123: 433-443.

Canessa CM, Horisberger JD, Rossier BC (1993). Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature* 361: 467-470.

Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, Rossier BC (1994). Amiloride-sensitive epithelial sodium channel is made of three homologous subunits. *Nature* 367: 463-467.

Diakov A, Korbmayer C (2004) A novel pathway of epithelial sodium channel activation involves a serum- and glucocorticoid- inducible kinase consensus motif in the C terminus of the channel's alpha- subunit. *J. Biol. Chem.* 297 (37): 38134-38142

Enck AH, Berger UV, Yu AS (2001). Claudin-2 is selectively expressed in proximal nephron in mouse kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 281: F966-974

Epple HJ, Schulzke JD, Schmitz H, Fromm M (1995). Enzyme- and mineralocorticoid receptor-controlled electrogenic Na⁺-absorption in human rectum in vitro. *Am. J. Physiol.* 269: G42-G48.

Epple HJ, Amasheh S, Mankertz J, Goltz M, Schulzke JD, Fromm M. (2000) Early aldosterone effect in distal colon by transcriptional regulation of ENaC subunits. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278: G718-G724.

Escoubet B, Coureau C, Bonvalet JP, Farman N (1997). Noncoordinate regulation of epithelial Na⁺ channel and Na⁺ pump subunit mRNAs in kidney and colon by aldosterone. *Am. J. Physiol.* 272: C1482–C1491.

Eskandari S, Snyder PM, Kreman M, Zampighi GA, Welsh MJ, Wright EM (1999). Number of subunits comprising the epithelial sodium channel. *J. Biol. Chem.* 274 27281-27286.

Firsov D, Gautschi I, Merillat AM, Rossier BC, Schild L (1998). The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC). *EMBO J.* 17: 344-352.

Florian P, Amasheh S, Lessidrensky M, Todt I, Bloedow A, Ernst A, Fromm M, Gitter AH (2003). Claudins in the tight junctions of stria vascularis marginal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304: 5-10.

Förster C, Silweel C, Golenhofen N, Burek M, Kietz S, Mankertz J, Drenckhahn D (2005). Occludin as direct target for glucocorticoid- induced improvement of blood- brain barrier properties in a murine in vitro system. *J. Physiol* 565: 475-486.

Folsch H, Ohno H, Bonifacino J S, Mellman I (1999). A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell.* 99: 189-198.

Fromm, M, Schulzke JD, Hegel U (1993). Control of electrogenic Na⁺ absorption in rat late distal colon by nanomolar aldosterone added in vitro. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 264: E68-E73.

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, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.* 141: 1539-1550.

Furuse, M., Sasaki, H., 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, 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.

Garty H, Palmer LG (1997). Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol. Rev.* 77: 359-396.

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.

Greig E, Sandle GI (2000). Diarrhea in ulcerative colitis. The role of altered colonic sodium transport. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 915: 327-332.

Grotjohann, I, Schulzke JD, and Fromm M (1999). Electrogenic Na⁺ transport in rat late distal colon by natural and synthetic glucocorticosteroids. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 276: G491-G498.

Hawker PC, McKay JS, Turnberg LA (1980). Electrolyte transport across colonic mucosa from patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 79: 508-511.

Heiskala M, Peterson PA, Yang Y (2001). The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport. *Traffic* 2(2):93-98.

Hoogerwerf WA, Tsao SC, Devuyst O, Levine SA, Yun CH, Yip JW, Cohen ME, Wilson PD, Lazenby AJ, Tse CM, Donowitz M (1996). NHE2 and NHE3 are human and rabbit intestinal brush-border proteins. *Am. J. Physiol.* 270: G29-G41.

Huey L, Riepe FG, Sippell WG, Yu ASL (2004). Genetic heterogeneity in autosomal dominant Pseudohypoaldosteronismus Type I: Exclusion of claudin- 8 as a Candidate Gene. *Am. J. Nephrol.* 24: 483- 487.

Hou J, Paul DL, Goodenough DA (2005). Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions. *J. Cell Sci.* 118: 5109-5118.

Hummler E, Horisberger JD (1999). Genetic disorders of membrane transport. V. The epithelial sodium channel and its implication in human diseases. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 276: G567-G571.

Ichimura T, Yamamura H, Sasamoto K, Tominaga Y, Taoka M, Kakiuchi K, Shinkawa T, Takahashi N, Shimada S, Isobe T (2005). 14-3-3 proteins modulate the expression of the epithelial Na⁺ channels by phosphorylation-dependent interaction with Nedd4-2 ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* 280 (13): 13187-13194.

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.

Jeansonne B, Lu Q, Goodenough DA, Chen YH (2003). Claudin-8 interacts with multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) and reduces paracellular conductance in epithelial cells. *Cell. Mol. Biol.* 49: 13-21.

Kamimura Y, Chiba H, Utsumi H, Gotoh T, Tobioka H, Sawada N (2002). Barrier function of microvessels and roles of glial cell line-derived neurotrophic factor in the rat testis. *Med. Electron Microsc.* 35: 139-145.

Kang JH, Choi HJ, Cho HY, Lee JH, Ha IS, Cheong HI, Choi Y (2005). Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis associated with CLDN16 mutations. *Pediatr. Nephrol.* 20(10): 1490-1493.

Kausalya PJ* / Amasheh S* (*equally contributing), Günzel D, Wurps H, Müller D, Fromm M, Hunziker W (2006). Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg²⁺ transport function of claudin-16. *J. Clin. Invest.* 116(4): 878-891.

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

Kojima S, Rahner C, Peng S, Rizzolo LJ (2002). Claudin 5 is transiently expressed during the development of the retinal pigment epithelium. *J. Membr. Biol.* 186: 81-88.

Konrad M, Schlingmann KP, Gudermann T (2004). Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 286(4): F599-605.

Kosari F, Sheng S, Li J, Mak DO, Foskett JK and Kleyman TR (1998). Subunit stoichiometry of the epithelial sodium channel. *J. Biol. Chem.* 273: 13469-13474.

Kreusel KM, Fromm M, Schulzke JD, Hegel U. (1991). Cl⁻ secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6). *Am. J. Physiol.* 261: C574-82.

Le Moellic C, Boulkroun S, González- Nunez D, Dublineau I, Cluzeaud F, Fay M, Blot-Chabaud M, Farman N (2005). Aldosterone and tight junctions: modulation of claudin-4 phosphorylation in renal collecting duct cells *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 289: C1513-C1521.

Li W Y, Huey C L, Yu AS L (2004). Expression of Claudins 7 and 8 along the mouse nephron. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 286: F1063-F1071.

Lingueglia E, Renard S, Waldmann R, Voilley N, Champigny G, Plass H, Lazdunski M, Barbry P (1994). Different homologous subunits of the amiloride-sensitive Na⁺ channel are differently regulated by aldosterone. *J. Biol. Chem.* 269: 13736-13739.

Mankertz J, Tavalali S, Schmitz H, Mankertz A, Riecken EO, Fromm M, Schulzke JD (2000). Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. *J. Cell Sci.* 113: 2085-2090.

Manz F, Scharer K, Janka P, Lombeck J (1978). Renal magnesium wasting, incomplete tubular acidosis, hypercalciuria and nephrocalcinosis in sibilings. *Eur. J. Pediatr.* 128: 67-79.

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: 117-127.

Matter K, Balda MS (2003). Functional analysis of tight junctions. *Methods* 30(3): 228-234.

Michelis MF, Drash AL, Linarelli LG, De Rubertis FR, Davis BB (1972). Decreased bicarbonate threshold and renal magnesium wasting in a sibship with distal renal tubular acidosis. (Evaluation of the pathophysiological role of parathyroid hormone). *Metabolism* 21(10): 905-20.

Mick VE, Itani OA, Loftus RW, Husted RF, Schmidt TJ, Thomas CP (2001). The α -subunit of the epithelial sodium channel is an aldosterone-induced transcript in mammalian collecting ducts, and this transcriptional response is mediated via distinct cis-elements in the 5'-flanking region of the gene. *Mol. Endocrinol.* 15: 575-588.

Morena J, Diamond J (1974). Discrimination of monovalent inorganic cations by "tight" junctions of gallbladder epithelium. *J. Membrane Biol.* 15: 277-318.

Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S (1999). Claudin-5/TMVCF Constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J. Cell Biol.* 147(1): 185-94.

Morita K, Sasaki H, Furuse K, Furuse M, Tsukita S, Miyachi Y (2003). Expression of claudin-5 in dermal vascular endothelia. *Exp. Dermatol.* 12: 289-295

Müller D, Kausalya P J, Claverie-Martin F, Meij I C, Eggert P, Garcia-Nieto C, Hunziker W (2003). A novel claudin 16 mutation associated with childhood hypercalciuria abolishes binding to ZO-1 and results in lysosomal mistargeting. *Am. J. Hum. Genet.* 73: 1293-1301.

Müller D, Kausalya P J, Meij I C, Hunziker W (2006). Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: blocking endocytosis restores surface expression of a novel claudin-16 mutant that lackst he entire C-terminal cytosolic tail. *Hum. Mol. Genet.* 15(7): 1049-105.8

Müller D, Kausalya PJ, Bockenhauer D, Thumfart J, Meij I C, Dillon M J, Van't Hoff W, Hunziker W (2006). Unusual clinical presentation and possible rescue of a novel claudin-16 mutation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91(8): 3076-3079.

Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J. Cell Biol.* 161: 653-660.

Poliak S, Matlis S, Ullmer C, Scherer SS, Peles E (2002). Distinct claudins and associated PDZ proteins form different autotypic tight junctions in myelinating Schwann cells. *J. Cell Biol.* 159: 361-372.

Pradervand S, Mang Q, Burnier M, Beerham F, Horisberger JD, Hummler E, Rossier BC (1999) A mouse model for Liddle's Syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 2527-2533.

Praga M, Vara J, Gonzalez-Parra E, Andres A, Alamo C, Araque A, Ortiz A, Rodicio JL (1995) Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Kidney Int.* 47(5): 1419-1425.

Quaroni A, Tian JQ, Goke M, Podolsky DK (1999). Glucocorticoids have pleiotropic effects on small intestinal crypt cells. *Am J Physiol.* 277: G1027- G1040

Rahner C, Mitic LL, Anderson JM (2001). Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology* 120: 411-422.

Rampton DS, Sladen GE (1984). Relationship between rectal mucosal prostaglandin production and water and electrolyte transport in ulcerative colitis. *Digestion* 30: 13-22.

Rao US, Baker JM, Pluznick JL, Balachandran P (2004). Role of intracellular Ca^{2+} in the expression of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel *Cell Calcium* 35 (1): 21-28

Rodriguez-Soriano J, Vallo A, García-Fuentes M (1987). Hypomagnesaemia of hereditary renal origin. *Pediatr. Nephrol.* 1(3): 465-472.

Renard S, Voilley N, Bassilana F, Lazdunski M, Barbry P (1995). Localization and regulation by steroids of the α , β , and γ subunits of the amiloride-sensitive Na^+ channel in colon, lung and kidney. *Pflügers Arch.* 430: 299-307.

Rocha F, Musch MW, Lishanskiy L, Bookstein C, Sugi K, Xie Y, Chang EB (2000). IFN- γ down-regulates expression of Na^+/H^+ exchangers NHE2 and NHE3 in rat intestine and human Caco-2/bbe cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280: C1224-C1232.

Rodríguez-Soriano J, Vallo A (1994). Pathophysiology of the renal acidification defect present in the syndrome of familial hypomagnesaemia-hypercalciuria. *Pediatr. Nephrol.* 8(4): 431-435.

Romero IA, Radewicz K, Jubin E, Michel CC, Greenwood J, Courand PO, Adamson P (2003). Changes in cytoskeletal and tight junctional proteins correlate with decreased permeability induced by dexamethasone in cultured rat brain endothelial cells *Neurosci. Lett.* 344(2): 112-106.

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.

Sandle GI, Hayslett JP, Binder HJ (1986). Effect of glucocorticoids on rectal transport in normal subjects and patients with ulcerative colitis. *Gut* 27: 309-316.

Sandle GI, Higgs N, Crowe P, Marsh MN, Venkatesan S, Peters TJ (1990). Cellular basis for defective electrolyte transport in inflamed human colon. *Gastroenterology* 99: 97-105.

Sartorato P, Khaldi Y, Lapeyraque AL, Armanini D, Kuhnle U, Salomon R, Caprio M, Viengchareun S, Lombes M, Zennaro MC (2004). Inactivating mutations of the mineralcorticoid receptor in Type I Pseudoaldosteronismus. *Mol. Cell Endocrinol.* 217 (1-2): 119-125.

Schierack P, Nordhoff M, Pollmann M, Weyrauch KD, Amasheh S, Lodemann U, Jores J, Tachu B, Kleta S, Blikslager A, Tedin K, Wieler LH (2006). Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochem. Cell Biol.* 125: 293-305.

Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, Runkel N, Foss HD, Bentzel CJ, Riecken EO, Schulzke JD (1999). Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 116: 301–309.

Schneeberger EE, Lynch RD (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 286(6): C1213-C1228.

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. *BBA-Biomembranes* 1669: 34-42.

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 Mg^{2+} resorption. *Science* 285: 103-106.

Sirotkin H, Morrow B, Saint-Jore B, Puech A, Das Gupta R, Patanjali SR, Skoultchi A, Weissman SM, Kucherlapati R (1997). Identification, characterization, and precise mapping of a human gene encoding a novel membrane-spanning protein from the 22q11 region deleted in velo-cardio-facial syndrome. *Genomics.* 42(2): 245-251.

Stelwagen K, McFadden HA, Demmer J (1999). Prolactin, alone or in combination with glucocorticoids, enhances tight junction formation and expression of the tight junction protein occludin in mammary cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 156(1-2): 55-61.

Stokes JB, Sigmund RD (1998). Regulation of rENaC mRNA by dietary NaCl and steroids : organ, tissue, and steroid heterogeneity. *Am. J. Physiol.* 274: C1699-C1707.

Tajima T, Nakae J, Fujieda K (2003). Two heterozygous mutations of CLDN16 in a Japanese patient with FHHNC. *Pediatr. Nephrol.* 18(12): 1280-1282.

Tasic V, Dervisov D, Koceva S, Weber S, Konrad M (2005). Hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: case report and a family study. *Pediatr. Nephrol.* 20(7): 1003-1006.

Tebbe B, Mankertz J, Schwarz C, Amasheh S, Fromm M, Assaf C, Schultz-Ehrenburg U, Sanchez Ruderish H, Schulzke JD, Orfanos CE (2002). Tight junction proteins: a novel class of integral membrane proteins. Expression in human epidermis and in HaCaT keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 294: 14-18.

Thomas CP, Auerbach S, Stokes JB, Volk KA (1998). 5' Heterogeneity in epithelial sodium channel α -subunit mRNA leads to distinct NH₂-terminal variant proteins. *Am. J. Physiol.* 274: C1312-C1323.

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

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

Turksen K, Troy TC (2004). Barriers built on claudins. *J. Cell Science* 117: 2435-2447.

Ulloa-Aguirre A, Janovick JA, Brothers SP, Conn PM (2004). Pharmacologic rescue of conformationally-defective proteins: implications for the treatment of human disease. *Traffic* 5: 821-837.

Van Heusden GP (2005). 14-3-3 proteins: regulators of numerous eukariotic proteins IUBMB Life 57(9): 623-609.

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.

Wang F, Daugherty B, Keise LL, Wie Z, Foley JP, Savani RC, Koval M (2003). Heterogeneity of claudin expression by alveolar epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29: 62-70.

Weber S, Schlingmann K, Peters M, Niemann Nejsum L, Nielsen S, Engel H, Grzeschik KH, Seyberth HW, Gröne HJ, Nüsing R, Konrad M (2001). Primary gene structure and expression studies of rodent paracellin-1. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: 2664-2672.

Weber S, Schneider L, Peters M, Misselwitz J, Rönnefarth G, Böswald M, Bonzel KE, Seemann T, Suláková T, Kuwertz-Bröking E, Gregoric A, Palcoux JB, Tasic V, Manz F, Schärer K, Seyberth HW, Konrad M (2001). Novel Paracellin-1 Mutations in 25 Families with Familial Hypomagnesemia with Hypercalciuria and Nephrocalcinosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: 1872-1881.

Will PC, Lebowitz JL, Hopfer U (1980). Induction of amiloride-sensitive sodium transport in the rat colon by mineralocorticoids. *Am. J. Physiol.* 238: 261-268.

Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Liebner S, Engelhardt B (2001). Claudin-1, claudin-2 and claudin-11 are present in tight junctions of choroid plexus epithelium of the mouse. *Neurosci. Lett.* 307: 77-80.

Wolf M T, Dötsch J, Konrad M, Böswald M, Rascher W (2002). Follow-up of five patients with FHHNC due to mutations in the Paracellin-1 gene. *Pediatr. Nephrol.* 17(8): 602-608.

Yang H, Jiang W, Furth EE, Wen X, Katz JP, Sellon RK, Silberg DG, Antalis TM, Schweinfest CW, Wu GD (1998). Intestinal inflammation reduces expression of DRA, a transporter responsible for congenital chloride diarrhea. *Am. J. Physiol.* 275: G1445–G1453.

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

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

Zhou R, Snyder PM (2005). Nedd4-2 phosphorylation induces serum and glucocorticoid-regulated kinase (SGK) ubiquitination and degradation. *J. Biol. Chem.* 280: 4518-4523.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
bp	Basenpaare
cDNA	complementary DNA
Cldn	Claudin
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ENaC	Epithelialer Na ⁺ -Kanal
ER	endoplasmatisches Reticulum
FHHNC	familiäre Hypomagnesämie mit Hypercalcurie und Nephrocalcinose
I _{sc}	short circuit current; Kurzschlussstrom
IFN- γ	Interferon-gamma
J	Flux
J _{Na}	Elektrogener Na ⁺ -Transport; Na ⁺ -Flux
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MDCK	Madin-Darby canine kidney
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
mv	Mikrovilli
n.s.	nicht signifikant
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Ocln	Occludin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction; Polymerasenkettenreaktion