

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

DISSERTATION

**Charakterisierung von Tight Junction-Proteinen mit Hilfe  
eukaryontischer und prokaryontischer Expressionssysteme**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Michaela Mahn**

aus Stendal

Gutachter:

1. PD Dr. S. Amasheh
2. Prof. Dr. G. Aust
3. PD Dr. S. Daum

Datum der Promotion: 29.01.2010

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	6
1.1. Vorkommen und Funktion von Epithelien.....	6
1.2. Struktur und Funktion der Tight Junction.....	7
1.3. Struktur, Vorkommen und Funktion der Claudine.....	8
1.3.1. Claudin-1 bildet dichte Barrieren.....	9
1.3.2. Claudin-2 bildet kationenselektive Poren .....	9
1.3.3. Eigenschaften von Claudin-5 .....	10
1.3.4. Claudin-5-assoziierte Erkrankungen: Das velo-cardio-faziale Syndrom.....	10
1.4. Madin-Darby-Canine-Kidney-Zellen (MDCK) .....	11
1.5. Fragestellung dieser Arbeit .....	11
2. Materialien und Methoden .....	12
2.1. Materialien .....	12
2.1.1. Geräte .....	12
2.1.2. Materialien .....	13
2.1.3. Chemikalien .....	14
2.1.4. Puffer und Lösungen .....	15
2.1.5. Verwendete Zelllinien.....	17
2.1.5.1. Eukaryontische Zelllinien .....	17
2.1.5.2. Prokaryontische Zelllinien .....	17
2.1.6. Vektoren und Primer .....	18
2.1.6.1. Vektoren.....	18
2.1.6.2. Primer .....	18
2.2. Methoden.....	19
2.2.1. Molekularbiologie .....	19
2.2.1.1. RNA Isolation aus adhärenen Zellkulturen.....	19
2.2.1.2. Reverse Transkription (RT) .....	19
2.2.1.3. Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	20
2.2.1.4. Colony-PCR.....	21
2.2.1.5. DNA-Agarosegelelektrophorese .....	21

2.2.1.6. Ligation amplifizierter DNA in Plasmide .....	22
2.2.1.7. Transformation der Plasmid-Insert-Konstrukte in E. coli .....	23
2.2.1.8. Plasmid–Mini–Präparation .....	24
2.2.1.9. Sequenzierung doppelsträngiger DNA .....	24
2.2.1.10. Glycerolstocks .....	25
2.2.1.11. Transfektion von MDCK Zellen .....	26
2.2.1.12. Membranprotein–Extraktion aus eukaryontischen Zellkulturen .....	27
2.2.1.13. Proteinquantifizierung .....	27
2.2.1.14. Western Blotting .....	28
2.2.2. Elektrophysiologie .....	30
2.2.2.1. Widerstandsmessung in Ussing Kammern .....	30
2.2.2.2. Manuelle Widerstandsmessung .....	31
2.2.2.3. Fluxmessungen .....	31
2.2.2.4. Immunfluoreszenz .....	32
2.2.3. Proteinbiochemie .....	34
2.2.3.1. Proteinexpression mittels prokaryontischer Expressionssysteme .....	34
2.2.3.2. Solubilisierung mittels Denaturierung in Urea-Puffer .....	35
2.2.3.3. Aufreinigung und Aufkonzentrierung über Größenfilter .....	36
2.2.3.4. Coomassie–Blau–Färbung .....	36
3. Ergebnisse .....	37
3.1. Endogene Expression von Claudinen und Occludin in MDCK Zellen .....	37
3.2. Stabile Transfektion von MDCK-C11 Zellen mit Claudin-5-cDNA .....	37
3.3. Transepithelialer Widerstand der Claudin-5 transfizierten MDCK-C11 Zellen .....	38
3.4. Expression von Claudin-1 und –2 in E. coli .....	39
3.5. Expression von Claudin-1- und 2- „Einzelloopkonstrukten“ in E. coli .....	42
3.6. Solubilisierung der Claudine .....	46
3.7. Aufreinigung und Konzentrieren der Claudine .....	49
4. Diskussion .....	54
4.1. Expression von Claudin-5 .....	54
4.2. Expression von Claudin-1 und Claudin-2 .....	56

5. Zusammenfassung.....	58
6. Abbildungsverzeichnis.....	60
7. Literaturverzeichnis.....	63
8. Vorpublikationen in Zusammenhang mit dem Dissertationsthema .....	69
9. Danksagung.....	70
10. Lebenslauf.....	71

# **1. Einleitung**

## **1.1. Vorkommen und Funktion von Epithelien**

Epithelien sind spezialisierte Zellverbände, die die Grenzfläche zwischen der Außenwelt und dem Interstitium des Körpers bilden. Sie sind Teil der Haut und der Auskleidung von Körperhöhlen wie dem Gastrointestinaltrakt, der Lunge, dem Urogenitaltrakt und exokriner Drüsen. Eine Sonderform stellt das Endothel dar: Es kleidet die Blutgefäße aus und grenzt somit zwei Bereiche innerhalb des Körpers voneinander ab. Epithelien bilden an diesen Grenzflächen eine Barriere und erhalten so ein spezifisches Stoffmilieu eines Organs beziehungsweise des Organismus. Darüber hinaus schützen sie den Organismus so vor Mikroorganismen und toxischen Substanzen. Eine zweite wesentliche Funktion von Epithelien ist der Stofftransport: Je nach Organsystem besitzen sie mehr oder weniger passive Durchlässigkeit und leisten aktiven Stofftransport.

Transepithelialer Transport kann parazellulär, also zwischen den Zellen, oder transzellulär, also durch eine Zelle hindurch, stattfinden. Das Verhältnis dieser beiden Transportarten unterscheidet dichte, mitteldichte und lecke Epithelien. Dichte Epithelien weisen kaum parazellulären Stofftransport auf. Sie dienen vor allem als Barriere. Dichte Epithelien finden sich beispielsweise in der Harnblase und der Epidermis. Der Transport durch mitteldichte Epithelien erfolgt ebenfalls vorwiegend transzellulär, ist jedoch in höherem Maße auch parazellulär möglich. Sie befinden sich beispielsweise in den distalen Tubuli und Sammelrohren der Niere und in den Auskleidungen von Kolon und Rektum. Im Gegensatz hierzu erfolgt ein erheblicher Teil des Transportes durch lecke Epithelien parazellulär. Diese sind beispielsweise in den proximalen Tubuli der Niere, im Dünndarm und in den Kapillaren der Blut-Hirn-Schranke lokalisiert.

Die Verbindung der Epithelzellen miteinander erfolgt durch Haftverbindungen (Zonulae adherentes, Desmosomen), kommunizierende Verbindungen (Gap Junctions) oder Schlussleisten (Zonulae occludentes, Tight Junctions). Desmosomen sichern den mechanischen Zusammenhalt benachbarter Zellen. Gap Junctions stellen eine Verbindung zwischen dem Zytosol benachbarter Zellen her, worüber Moleküle bis 1000 Da ausgetauscht werden können. Tight Junctions schaffen ebenfalls eine mechanische Verbindung benachbarter Epithelzellen. Darüber hinaus begrenzen sie selektiv den parazellulären Transport.

## 1.2. Struktur und Funktion der Tight Junction

Tight Junctions verbinden benachbarte Epithelzellen. Betrachtet man Epithelien durch ein Elektronenmikroskop, so erscheinen Tight Junctions als Zellen umgürtende Netzwerke von Fibrillen (Stähelin et al., 1973). In Ultra-Dünnschnitten erkennt man sie als aneinander gereihete Fusionspunkte der äußeren Blätter der Membranen benachbarter Zellen. An diesen Fusionspunkten (“kissing points”) ist der Interzellulärraum vollständig verschlossen (Gonzalez-Mariscal et al., 2001).

Tight Junctions regeln den parazellulären Transport ionen- und gröbenselektiv (Tsukita et al., 2001, Gumbiner et al., 1993, Reuss et al., 1992). Sie haben darüber hinaus eine sogenannte “fence”-Funktion: Sie sind apikal an der lateralen Zellmembran lokalisiert und bilden dort eine Barriere, die verhindert, dass Membranproteine wie beispielsweise Transportproteine vom basolateralen in den apikalen Membrananteil diffundieren können und umgekehrt. Auf diese Weise halten sie die Polarität der Zelle aufrecht und ermöglichen gerichtete transzelluläre Transportprozesse (Tsukita et al., 2001, Schneeberger et al., 1992, Gumbiner et al., 1993). Zusammenfassend ermöglichen Tight Junctions also einen selektiven para- und transzellulären Stofftransport.

Verschiedene Membranproteine bilden das primäre strukturelle Korrelat der Tight Junctions: Occludin, Tricellulin und die Familie der Claudine.

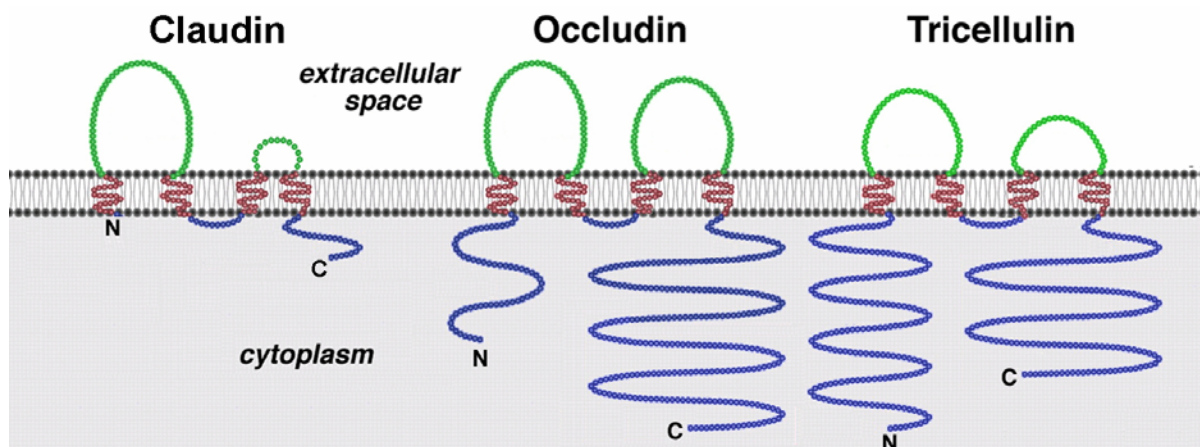


Abb. 1: Schematische Darstellung von Claudin, Occludin und Tricellulin (nach Ikenouchi et al., 2005).

Occludin wurde als erstes integrales Membranprotein in Tight Junctions beschrieben (Furuse et al., 1993; Ando-Akatsuka et al., 1996). Es besitzt vier Transmembrandomänen, eine lange zytoplasmatische Domäne am Carboxyl-Terminus und eine kurze am Amino-Terminus (Tsukita et al., 2001). Eine Reihe von Splicevarianten des Proteins bis zu einer Größe von 65 kDa wurden beschrieben (Gu et al., 2008), Überexpression von Occludin in MDCK Zellen führt zu einer Zunahme der Tight Junction Stränge und des transepithelialen Widerstandes (McCarthy et al., 1996). Expression am COOH-Terminus gekürzter Proteine resultiert in größerer parazellulärer Durchlässigkeit (Balda et al., 1996; Chen et al., 1997). Andererseits bilden Occludin-defiziente Knock-Out-Mäuse normale Tight Junctions aus (Saitou et al., 2000). Da die morphologischen und sekretorischen Eigenschaften der Magenzellen dieser Mäuse deutliche Veränderungen aufweisen, könnte Occludin auch für die Differenzierung von Epithelzellen wichtig sein (Schulzke et al., 2005).

Bisher sind zwei weitere Typen von Tight Junction-Membranproteinen bekannt: Tricellulin und die Familie der Claudine. Tricellulin ist in trizellulären Kontakten von Epithelzellen lokalisiert und bestimmt die parazelluläre Permeabilität von Makromolekülen (Ikenouchi et al., 2005, Krug et al., 2009). Die größte Familie von Tight Junction-Proteinen stellen die Claudine dar.

### **1.3. Struktur, Vorkommen und Funktion der Claudine**

Claudine wurden 1998 als Tight Junction-Proteine identifiziert. Sie weisen keine strukturelle Ähnlichkeit mit Occludin auf (Furuse et al., 1998a). Ihr Name leitet sich vom lateinischen "claudere" (verschließen) ab. Bisher sind 24 Familienmitglieder bekannt (Tsukita et al., 2001). Sie besitzen eine Größe von 22-36 kDa, haben vier Transmembrandomänen und zwei extrazelluläre Loops, deren erster deutlich länger ist als der zweite (Gonzalez-Mariscal et al., 2003). Exprimiert man Claudin-1, -2, -3, -5 oder -11 in Mausfibroblasten, so bilden sie Tight Junction-Stränge aus (Furuse et al., 1998b). Die Form der ausgebildeten Stränge unterscheidet sich dabei Claudin-spezifisch. Während Claudin-1 und -3 kontinuierliche, glatte Intra-membranstränge auf der Protoplasmaseite bilden, entstehen nach Transfektion mit Claudin-2- und -5-cDNA diskontinuierliche Ketten der Proteine auf der exoplasmatischen Seite (Morita et al., 1999). Die Bildung dieser Stränge legt eine wesentliche Rolle der Claudine bei der Bildung von Tight Junctions nahe (Gonzalez-Mariscal et al., 2003).



Verschiedene Claudine im gleichen Tight Junction-Strang können miteinander interagieren (Morita et al., 1999). Die Expressionsmuster von Claudinen unterscheiden sich in verschiedenen Geweben stark voneinander. Spezifische Interaktionsmuster einzelner Claudine lassen sich bestimmten funktionellen Eigenschaften zuordnen (Furuse et al., 1999).

Entsprechend hat die unterschiedliche Verteilung von Claudinen in verschiedenen Abschnitten eines Nephrons unterschiedliche Eigenschaften der Epithelien zur Folge (Reyes et al., 2002). Eine veränderte Claudinzusammensetzung kann in krankhaften Veränderungen der Barriereeigenschaften des Epithels resultieren. Dies konnte z. B. sehr detailliert für Claudin-16 gezeigt werden: Mutationen im Claudin-16-Gen führen zu Familiärer Hypomagnesiämie mit Hypercalcurie und Nephrocalcinose aufgrund einer mangelnden Resorption von  $Mg^{2+}$  im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (Kausalya et al., 2006). Bedingt werden die Claudin-vermittelten Permeabilitätseigenschaften durch geladene Aminosäuren ihrer extrazellulären Loops (Colegio et al., 2002; Colegio et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden die Eigenschaften von Claudin-1, -2 und -5 untersucht.

### **1.3.1. Claudin-1 bildet dichte Barrieren**

Claudin-1 wird vor allem in dichten Epithelverbänden exprimiert. So findet es sich in der Niere beispielsweise im Sammelrohr, kaum jedoch im sehr durchlässigen proximalen Tubulus (Reyes et al., 2002). Wichtig ist es zudem für die Barrierefunktion der Epidermis (Tebbe et al., 2002): Homozygote Claudin-1-Knock-Out-Mäuse sterben rasch durch massiven epidermalen Wasserverlust. Heterozygote Mäuse überleben (Furuse et al., 2002).

### **1.3.2. Claudin-2 bildet kationenselektive Poren**

Claudin-2 kommt in lecken Epithelien wie beispielsweise dem proximalen Tubulus der Niere vor, nicht dagegen in dichten Epithelien wie dem Sammelrohr (Reyes et al., 2002). Es trägt im Epithel des Plexus choroideus zur Bildung der Blut-Hirn-Schranke bei (Wolburg et al., 2001). Darüber hinaus kommt es in vielen anderen Organen wie der Bowman Kapsel, dem deszendierenden Teil der Henle Schleife, Darm, Pankreasgängen, Lunge und Leber vor (Kiushi-Saishin et al., 2002, Rahner et al., 2001, Enck et al., 2001, Morita et al., 1999, Heiskala et al., 2001).

Claudin-2 bildet parazelluläre, kationenspezifische Poren (Amasheh et al., 2002). Der hohe transepitheliale Widerstand von MDCK I und MDCK-C7 Zellen sinkt deshalb nach Transfektion mit Claudin-2-cDNA deutlich ab, das Epithel wird durchlässiger (Furuse et al., 2001).

### **1.3.3. Eigenschaften von Claudin-5**

Claudin-5 bildet Tight Junction-Stränge in Endothelzellen (Morita et al., 1999, Kiuchi-Saishin et al., 2002). So ist es auch an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke (Nitta et al., 2003) und der Blut-Hoden-Schranke (Kamimura et al., 2002) beteiligt. Darüber hinaus wird es in einer Reihe anderer Zelllinien exprimiert, beispielsweise in Pankreas-Azinus-Zellen, HT-29/B6-Zellen, Schwann-Zellen, alveolären Epithelzellen und während der Embryonalentwicklung im Pigmentepithel von Hühnern (Rahner et al., 2001, Amasheh et al., 2005, Poliak et al., 2002, Wang et al., 2003, Kojima et al., 2002). Claudin-5 hat in verschiedenen Geweben eine unterschiedliche Wirkung auf die Durchlässigkeit des Epithels: Die Expression kann in Abhängigkeit zur vorbestehenden Leitfähigkeit eines Zellverbandes den transepithelialen Widerstand zu erhöhen oder diesbezüglich ohne Wirkung bleiben.

### **1.3.4. Claudin-5-assoziierte Erkrankungen: Das velo-cardio-faziale Syndrom.**

Mit veränderter Expression von Claudin-5 sind verschiedene Krankheiten verbunden. Am besten untersucht ist bisher der Zusammenhang zwischen dem Fehlen von Claudin-5 und dem velo-cardio-fazialen Syndrom. Claudin-5 wird deshalb auch als transmembraneprotein deleted in velo-cardio-facial syndrome (TMVCF) bezeichnet (Morita et al., 1999). Die für Claudin-5 codierende Gensequenz befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 22 (22q11). Eine Mikrodeletion dort führt zum velo-cardio-fazialen Syndrom (Shprintzen, 2008, Sirotkin, 1997). Dies ist eines der häufigsten Syndrome multipler Anomalien beim Menschen. Die häufigsten phänotypischen Merkmale sind eine Gaumenspalte, Herzanomalien, Gesichtsanomalien und Lernbehinderungen (Shprintzen et al., 1981). Darüber hinaus kann beinahe jedes Organsystem betroffen sein. Eine Reihe psychiatrischer Erkrankungen ist mit dem velo-cardio-fazialen Syndrom assoziiert, beispielsweise ist die Gefahr, an Aufmerksamkeits-Defizit-Syndrom, Schizophrenie oder einer bipolaren Störung zu erkranken für die Betroffenen um das 25 fache gegenüber der Allgemeinbevölkerung erhöht. Die phänotypische Ausprägung der Erkrankung ist hoch variabel und reicht von beinahe vollständiger Gesundheit bis zu lebensbedrohlichen Symptomen (Shprintzen, 2008).

#### **1.4. Madin-Darby-Canine-Kidney-Zellen (MDCK)**

Madin-Darby-Canine-Kidney-Zellen entstammen ursprünglich dem Sammelrohr der Niere eines Hundes (Madin et al., 1958). Wegen ihrer günstigen Wachstumseigenschaften werden sie häufig für Zellkulturexperimente genutzt. Zwei Vertreter dieser Zelllinie mit unterschiedlichen Eigenschaften sind die Subtypen MDCK-C7 und MDCK-C11.

MDCK-C7-Zellen sind epithelähnliche Zellen mit einem hohen transepithelialen Widerstand von  $> 1 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$  (Gekle et al., 1994). Subtyp MDCK-C11 hingegen ähnelt einem lecken Epithel, der durch die Zellen aufgebaute transepitheliale Widerstand beträgt etwa  $50 \text{ }\Omega \text{ cm}^2$  (Gekle et al., 1994). MDCK-C11 Zellen exprimieren endogen Claudin-2 (Amasheh et al., 2002).

#### **1.5. Fragestellung dieser Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit sollten die funktionellen Eigenschaften von Claudin-5 näher charakterisiert werden. Dazu wurde untersucht, ob und wie sich die Durchlässigkeit von MDCK-C11 Zellen nach stabiler Transfektion mit Claudin-5-cDNA verändert.

Darüber hinaus wurden Konstrukte der von Claudin-1 und -2 für weiterführende Interaktionsanalysen hergestellt, in prokaryontischen Expressionssystemen exprimiert und aufgereinigt. Es sollte geklärt werden, ob diese für Analysen mittels Oberflächen-Plasmonenresonanz (Biacore)-Experimenten geeignet waren.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Geräte

Gen Amplifikations PCR System 2400	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Bakterienschüttler	Biometra, Göttingen
Brutschrank (B5060 EC/CO2)	Heräus, Hanau
Elektrophoresesystem (Agarosegel, PAGE)	Biorad, München
Fluoreszenzmikroskop (BX 60)	Olympus, Hamburg
Gene Quant II	Pharmacia Biotech, Freiburg
Heizblock	Grant, Berlin
Hybridisierungsheizblock (Model 12/24)	Unithzerm, Karlsruhe
Hydraulikpresse („french press“)	Thermo Spectronic, NY, USA
Lumineszenzbild-Analysator (LAS 1000)	Fuji, Düsseldorf
Magnetrührer	Ika-Combimag, München
PH-Meter (Typ 761)	Nick, Berlin
Sequenzierautomat (AbiPrism Model 310)	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Szintillationszähler (Tri-Carb2100TR)	Packard, Meridan, CT, USA
Tecan Spectra Classic Proteinmessgerät	Tecan, Crailsheim
Transilluminator Quickstore	MS Laborgeräte, Heidelberg
Ussing – Kammer	Institut für Klinische Physiologie, Charité
UV-Crosslinker	Pharmacia Biotech, Freiburg
Vakuumtrockner (Speed Vac)	Uniequip, Martinsried
Vortexgerät	Pharmacia Biotech, Freiburg
Wasserbad (SW 21/TWB 5)	Julabo, Selbach
Widerstandsmessgerät	Institut für Klinische Physiologie, Charité
Wippe	Fröbel Labor Technik, Lindau
Zentrifugen	Beckman Ti 70.1 Avanti J25, Unterschleisheim Loh- hof; Eppendorf 5414C, Köln; Hermle Z233MK, We- hingen

### 2.1.2. Materialien

Centricon Aufreinigungssäulchen	Millipore
Centriflex-Säulchen	Mobitech, Göttingen
Gel-Blotting Papier	Schleicher und Schüll, Dassel
Kryo-Röhrchen	Brand, Wertheim
Kunststoff Filter	Millipore Corp., MA, USA
Magnetrührstäbchen	Merck, Berlin
Mikrotiterplatten	Roth, Karlsruhe
Nylon Membranen	Roche, Mannheim
Objektträger	Menzel, Braunschweig
Pipetten	Eppendorf, Köln
Pipettenspitzen 10, 100, 1000 µl	Eppendorf, Köln
Poly Screen PVDF Elektrotransfer Membran	NEN, Köln
Reaktionsgefäße 50 ml	Falcon, BD Biosciences, CA, USA
Reaktionsgefäße 1,5 ml „Eppendorfgefäße“	Plastibrand, Wertheim
Reaktionsgefäße 0,2 ml	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Röntgenfilm X-OMAT AR/LS	Kodak, Rochester, NY
Säulen zur Aufreinigung nach Proteinexpression	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Whatman Filter	Polytrap 295 PE
Zellkulturflaschen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellschaber	Costar, Corning, N

### 2.1.3. Chemikalien

Advantage Polymerase-Kit	Clontech, Heidelberg
Agarose	Life Technologies, Karlsruhe
Ampli Taq DNA-Polymerase	Perkin-Elmer, Dreieich
Antibiotika (Ampicilin, Kanamycin, Penicillin, Streptomycin)	Ratiopharm, Ulm
BCA-Lösung	Pierce, Bonn
BSA	NE Biolabs, Frankfurt am Main
Chemolumineszenz-Nachweislösungen	LumiLight, Roche
Coomassie-Brillant-Blau R-250	Sigma, Taufkirchen
Dulbecco's Minimum Essential Medium	Biochrom, Berlin
DNTP, ddNTP	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
EDTA	Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid	Life Technologies, Karlsruhe
Ethanol	J. T. Backer, Deventer, Niederlande
FKS	Biochrom, Berlin
Gelextraktions-Kit	Qiagen
IPTG	Sigma, Taufkirchen
Lipofectamine Plus Transfectionskit	Life Technologies, Karlsruhe
Magermilchpulver	Sucofin, Zeven
<sup>3</sup> [H]-Mannitol	Biorad, Köln
Marker: Low Mass DNA Ladder, Molekulargewicht Standard	Invitrogen, USA
λHinDIII, Molekulargewicht Standard 100bp	
Kaleidoskop-Marker	Biorad, Köln
Methanol	Merck, Berlin
Minipräparations-Kit	Qiagen, Hilden
Ni-NTA-Agarose	Sigma, Taufkirchen
PBS-Tabletten	Life Technologies, Karlsruhe
Plasmid-Minipräparationskit	Qiagen, Hilden
Pro Tasc Mount Flour	Biocyc, Luckenwalde
Restriktionsenzyme BamHI, Kpn I, EcoRV, Sac I, Sph I, Hind III	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Reverse Transkriptions-Reaktionskit	Quiagen, Hilden
RNAzol	WAK-Chemie, Bad Soden
SDS-Marker	Merck, Berlin
SDS-Probenpuffer	Merck, Berlin
Sequenzierkit	PE Applied Biosystems
SOC-Medium	Clontech, Heidelberg
T4-DNA Ligase und 10x T4 DNA Ligasepuffer	NE Biolabs, Frankfurt am Main
Template Suppression Reagent (TSR)	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Triton X-100	Roche, Mannheim
Ultima gold high flash-point liquid scintillation cocktail	Packard, Groningen, Holland
Wasser	Fluka, Seelze

#### 2.1.4. Puffer und Lösungen

Agaroseplatten	1l LB-Medium 20 g Agar
BSA-Blockierungslösung	5 % (w/v) BSA (Bovines Serum Albumin) 0,02 % (w/v) Natriumazid in PBS/Tween
Coomassie-Blau-Färbelösung	0,25 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blau R-250 45,5 % (v/v) Methanol 9,2 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Blau-Entfärbelösung	100 ml Methanol 100 ml Eisessig ad 1 l H <sub>2</sub> O
6x DNA – Auftragspuffer	40 % (w/v) Sucrose 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 5 mM EDTA pH 8,0
Elektrophoresepuffer	100 ml 10x Puffer West 10 ml 10 % (w/v) SDS ad 1 l Aqua bidest
Laemmli-Probenauftragspuffer	2 g SDS 1,54 g Dithiothreitol 500mM 3,0 ml Tris-HCl pH 6,8 300nM 20 µl Bromphenolblau 1 % 10 ml Glycerol
LB-Medium	10 g/l Bacto – Trypton 5 g/l Bacto – Yeast Extrakt 5 g/l NaCl
Membran-Lysepuffer	2 ml Tris HCl, pH 7,4 500 µl 1 M MgCl <sub>2</sub> 200 µl 0,5 M EDTA 120 µl 0,5 M EGTA ad 100 ml Aqua bidest zusätzlich frisch/ 5 ml: 5 µl 1000 x SBTI 100 µl 50 x PPI 50 µl 100 x PIC 5 µl Aprotinin
PBS/Tween	2 PBS-Tabletten 1 ml Tween ad 1 l Aqua bidest
PBS/Tween/ 5 % Magermilch	5 g Magermilchpulver ad 100 ml PBS/Tween

Proteinexpression-Lysepuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM NaCl 10 mM Imidazol pH auf 8,0 mit NaCl
Proteinexpression-Waschpuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM NaCl 20 mM Imidazole pH auf 8,0 mit NaCl
Proteinexpression-Elutionspuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM NaCl 250 mM Imidazole pH auf 8,0 mit NaCl
10x Puffer West	144 g Glycin 30,4 g Tris Base ad 1 l Aqua bidest
Ringer-Lösung für Fluxmessungen	1 l Ringerlösung (siehe unten) 10 mM Mannitol 25 kBq/ ml [ <sup>3</sup> H]-Mannitol
Ringer-Lösung (manuelle Messung)	2 g Glukose Ad 1 l Aqua bidest
Ringer-Lösung (Ussing-Kammer)	113,6 mM NaCl 2,4 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,6 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 21 mM NaHCO <sub>3</sub> 5,4 mM KCl 1,2 mM CaCl <sub>2</sub> 1 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM D(+)-Glucose 10 mM D(+)-Mannose 2,5 mM l-Glutamin 0,5 mM β-Hydroxybuttersäure
20x SSC	175 g NaCl 88,2 g Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> x 2H <sub>2</sub> O 800 ml H <sub>2</sub> O konz. Zitronensäure ad pH 7,0 - 7,5 ad 1 l Aqua bidest
Transferpuffer	100 ml 10x Puffer West 100 ml Methanol ad 1 l Aqua bidest



## **2.1.5. Verwendete Zelllinien**

### **2.1.5.1. Eukaryontische Zelllinien**

Es wurden zum einen MDCK C11 Zellen (Madin-Darby Canine Kidney cells, subclone C11) verwendet. MDCK-C11 Zellen bilden funktionell lecken Epithelien ähnliche Zellverbände. Sie wurden in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Als Medium diente DMDM (Dulbecco's Minimum Essential Medium), dem 10 %iges (w/v) Kälberserum (FKS) sowie 100 U/l Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin hinzugefügt war. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in einem Sauerstoff/ Kohlendioxid = 95/ 5 Gemisch im Begasungsbrutschrank. Das Medium wurde 3/ Woche gewechselt, alle 10 Tage wurden die Zellen passagiert. Für die Versuche wurden Zellen der 60. bis 80. Passage genutzt. Bei der Zellernte wurden die Zellen mit einer 0,05 %igen (w/v) Trypsin-EDTA-Lösung aus den Flaschen gelöst und auf 0,6 cm<sup>2</sup> Kunststofffiltern ausgesät, auf denen sie nach etwa 72 Stunden einen einschichtigen Film (Monolayer) bildeten.

Zum anderen wurden HT-29/B6 Zellen verwendet. Diese Zellen ähneln funktionell mitteldichten Epithelien. Sie sind Subclone einer humanen Kolon-Karzinom Zelllinie (Kreusel et al., 1991)

### **2.1.5.2. Prokaryontische Zelllinien**

Die zur Transformation verwendeten kompetenten Escherichia coli Bakterienzellen (TOP 10F') stammten von der Firma Clontech, Heidelberg. Zur Proteinexpression wurden Escherichia coli Zellen der Zelllinie BL21 RE4 verwendet. Die Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

## 2.1.6. Vektoren und Primer

### 2.1.6.1. Vektoren

PCR 2.1-Topo	Invitrogen
PFLAG CMV-4	Sigma
pQE 30	Quiagen
pQE 31	Quiagen

### 2.1.6.2. Primer

Die verwendeten Primer bezogen wir von der Firma Metabion GmbH, Martinsried

Claudin-1 (hind) forward	AAAAAGCTTATGGCCAACGCGGGGCTGC
Claudin-1 (hind) reverse	AAAAAGCTTTCACACGTAGTCTTCCCGC
Claudin-2 forward	AAAAAGCTTATGGCCTCTCTTGGCCTCCAA
Claudin-2 reverse	AAAAAGCTTTCACACATACCCTGTCAGGCT
Claudin-5 forward	CCTCTAGCCATGGGGTCCGCA
Claudin-5 reverse	CCAGCGCCCTCAGACGTAGTT
PQE 30 forward	CGGATAACAATTTACACAG
PQE 30 reverse	GTTCTGAGGTCATTACTGG
PFLAG forward	ACGGTGGGAGGTCTATATAAG
PFLAG reverse	TGGGGAGGGTCCACAGGGATG
Claudin1 Loop1 (SAC) forward	AAAGAGCTCCCGTATTTACTCCTATGCCGGCGAC
Claudin1 Loop1 (KPN) reverse	AAAGGTACCACGGGTTGCTTGCAATGTGCTGCT
Claudin2 Loop1 (SAC) forward	CCAAGAATTCTATGACCCTATGACCCCAGTCAATGCCCGT- TACGAAA
Claudin2 Loop1 (KPN) reverse	AAAGGTACCCTGGGCAGCCTGGATGTCAGCGGG
Claudin1 Loop2 (SPH) forward	CCAAGAATTCTATGACCCTATGACCCCAGTCAATGCCCGT- TACGAAA
Claudin1 Loop2 (HND) reverse	AGCTTTTCGTAACGGGCATTGACTGGGGTCATAGGGTCATA- GAATTCTTGGCATG
Claudin2 Loop2 (SPH) forward	CCGTGACTTCTACTCACCCTGGTGCCTGACAGCATGAAAT- TTGAGA
Claudin2 Loop2 (HND) reverse	AGCTTCTCAAATTTTCATGCTGTCAGGCACCAGTGGTGAGTA- GAAGTCACGGCATG
Spacer forward	CGGTGGCGCTGGCGGTGCAGGTGGCGCAGGCGGTGCTGCATG
Spacer reverse	CAGCACCGCCTGCGCCACCTGCACCGCCAGCGCCACCGGTAC

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Molekularbiologie**

#### **2.2.1.1. RNA Isolation aus adhärennten Zellkulturen**

Um Claudin-5-cDNA zu erhalten wurde die entsprechende RNA aus Zellen der humanen Kolon-Karzinom Zelllinie HT-29/ B6 isoliert und in cDNA umgeschrieben. Zur RNA-Isolation wurden die konfluent gewachsenen Zellen mit PBS gewaschen und mittels 1 ml RNAzol/Schale gelöst. Die resultierenden 5 ml Zellsuspension und 100 µl Chloroform (CHCl<sub>3</sub>) wurden in ein Röhrchen überführt, kurz mit dem Vortexgerät vermischt und 5 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde über 15 Minuten bei 4 °C und 12000 g zentrifugiert. Der die RNA enthaltende Überstand wurde abgenommen und mit einem Volumen Isopropanol versetzt. Nach Inkubation über 30 Minuten bei 4 °C erfolgte eine weitere Zentrifugation unter den obengenannten Bedingungen. Nun befand sich die RNA im Pellet. Dieses wurde mit 1 ml eiskalten 70 %igen Ethanol gewaschen und 10 Minuten bei 4 °C und 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet, in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei 4 °C über 30 Minuten inkubiert. Die Lagerung erfolgte bei –80 °C.

#### **2.2.1.2. Reverse Transkription (RT)**

Bei der reversen Transkription stellt eine reverse Transkriptase an der RNA eine DNA-Kopie her. Als Startpunkt dienten sequenzspezifische Oligonukleotide, sogenannte Primer. Die reverse Transkription wurde mit einem kommerziell erhältlichen Reaktionskit durchgeführt.

##### Ansatz:

Omniskript Reverse Transkriptase	1 µl/ Ansatz
10x RT Reaktionspuffer	2 µl/ Ansatz
Oligonukleotid-Primer	2 µl/ Ansatz
DNTP-Mix (0,5 mM each)	2 µl/ Ansatz
RNAse Inhibitor (10 U/ µl)	1 µl/ Ansatz

Die Komponenten wurden in ein Gefäß pipettiert, vorsichtig auf dem Vortex-Schüttler vermischt und in einzelne Reaktions-Tubes aufgeteilt. Nun wurden

Template RNA	2 µl/ Ansatz
RNAse freies Wasser	ad 20 µl/ Ansatz

hinzugefügt, wiederum kurz auf dem Vortex Schüttler vermischt und 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurde das Enzym inaktiviert, indem die Ansätze über 5 Minuten bei 93 °C inkubiert und auf Eis abgekühlt wurden. Die Proben wurden bei –20 °C aufbewahrt.

### 2.2.1.3. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die enzymatische in vitro Herstellung millionenfacher Kopien von Nucleotidsequenzen (Amplifikation). Eine DNA-Polymerase synthetisierte ausgehend von DNA-Oligonukleotiden (Primern) an einer einzelsträngigen Nucleinsäure-Matrize (Template-DNA) einen neuen DNA Strang. Hierzu wurde zunächst der zu amplifizierende DNA Doppelstrang bei 95 °C aufgeschmolzen. An das 3' Ende des entstandenen Einzelstrang hybridisierte der Primer (Annealing). Von hier aus synthetisierte eine hitzestabile DNA-Polymerase einen neuen Doppelstrang (Elongation). Durch Auswahl eines gegenläufig orientierten Primerpaares konnte gezielt eine bestimmte DNA Sequenz amplifiziert werden. Durch die zyklische Wiederholung wurde die Matrize exponentiell amplifiziert. Die PCR erfolgte in Thermocyclern, die das zuvor programmierte, zyklische Temperaturprogramm automatisch steuerten.

#### Chemikalien:

5 µl	10 x Adv. Buffer <sup>2</sup>
5 µl	10 mM dNTPs
1 µl	Adv. Polymerase
1 µl	Template
2,5 µl	Forward Primer
2,5 µl	Reverse Primer
33 µl	Aqua bidest

#### Cycle-Bedingungen:

1. Initiale Denaturierung	95 °C	1 Minute	
2. Denaturierung	95 °C	30 Sekunden	Wiederholung
3. Primer-Hybridisierung	58 °C	30 Sekunden	Schritt 2-4:
4. Polymerisation	68 °C	2 Minuten	35 x
5. Abschliessende Polymerisation	68 °C	7 Minuten	

Um das Claudin nach der Transformation in Bakterienzellen nachzuweisen, wurde die sogenannte „Colony-PCR“ angewandt.

#### **2.2.1.4. Colony-PCR**

Nach der Transformation wurden einzelne Kolonien auf eine neue, mit einem Koordinatensystem versehene, Agar-Platte überführt. Nach dem Anwachsen wurde je eine Kolonie in ein Reaktionsgefäß mit 5 µl 1 % (w/v) Triton X-100 gegeben. Die PCR erfolgte mittels eines Primerpaares aus einem vektor- und einem insertspezifischen Partner.

##### Chemikalien:

5 µl	PCR Puffer II (PE)
3 µl	25 mM MgCl
0,2 µl	Ampli Taq Polymerase (PE)
2,8 µl	2,5 mM each dNTP Mix
10 µl	Vektor-spezifischer Primer
10 µl	Insert-spezifischer Primer
33 µl	Aqua bidest

##### Cycle-Bedingungen:

1. Initiale Denaturierung	94 °C	4 Minuten	
2. Denaturierung	94 °C	20 Sekunden	Wiederholung
3. Primer-Hybridisierung	55 °C	20 Sekunden	Schritt 2-4
4. Polymerisation	72 °C	1,30 Minuten	35 x
5. Abschliessende Polymerisation	72 °C	2 Minuten	

#### **2.2.1.5. DNA-Agarosegelelektrophorese**

Die Gelelektrophorese ist eine Methode zur Trennung, Identifikation und Reinigung beispielsweise von DNA Fragmenten. Die Moleküle passieren in einem elektrischen Feld die Poren eines Gels. Die Geschwindigkeit dieser Passage ist abhängig von der Größe, Konformation, Polarisierung und Ladungsstärke des Moleküls. In dieser Arbeit wurden zur Darstellung und zum Aufreinigen von DNA native Agarosegele verwendet. Agarose ist ein Polysaccharid aus roten Meeresalgen. Sie wird durch Aufkochen in Puffer gelöst und geliert beim Abkühlen.

Die Wahl einer geeigneten Konzentration richtet sich nach der Größe der nachzuweisenden Fragmente. Zum Nachweis der etwa 600 kb messenden Claudine wurden 1 %ige Gele verwendet, zum Nachweis der wesentlich kleineren einzelnen Loops 2 %ige. Zur Größenbestimmung diente ein mitaufgetragener Marker aus Fragmenten definierter Größe.

Die Agarose wurde in 1x TAE/ 0,5 µg Ethidiumbromid Puffer aufgeköcht, auf etwa 50 °C abgekühlt und horizontal in eine Gelkammer gegossen. Die Probestaschen wurden mittels einer an der Kathodenseite ins flüssige Gel gesteckten Taschenschablone geschaffen. Nach dem Festwerden wurde das Gel vollständig in oben genannte Pufferlösung gelegt, die DNA wurde in 1/5 Volumen 6x DNA Probenpuffer in die Taschen überführt. Dann wurde eine Spannung von 60-75 V angelegt, wodurch die Fragmente sich in Laufrichtung von der Kathode zur Anode auftrennten. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn der mitaufgetragene Größenmarker eine ausreichende Trennstrecke anzeigte. Das Ergebnis wurde mittels Geldokumentation aufgezeichnet. Die Aufreinigung von DNA mittels Gelelektrophorese erfolgte mittels eines Gelextraktionskits. Hierzu wurde nach erfolgter Auftrennung das Gelstück mit dem gewünschten Fragment unter UV Licht ausgeschnitten, gewogen und in 3 Volumina Puffer bei 50 °C gelöst, dann wurde zusätzlich 1 Volumen Isopropanol hinzugegeben. Die Probe wurde auf eine Micro-Spin-Säule gegeben und zentrifugiert. Dabei band die DNA an den Filter. Um Verunreinigungen zu entfernen wurden zweimal je 750 µl Waschpuffer auf die Säule geladen und erneut zentrifugiert. Die DNA wurde dann durch eine weitere Zentrifugation mit 30 µl Wasser eluiert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten über 1 Minute bei 10000 g und Raumtemperatur. Die Konzentration der DNA wurde durch Agarosegelelektrophorese des Eluates und dem Vergleich mit einer mitaufgetragenen Markerbande bekannter Konzentration ermittelt.

#### **2.2.1.6. Ligation amplifizierter DNA in Plasmide**

Zum Einbringen von DNA in das Expressionssystem wurde sie in Plasmidvektoren integriert (Ligation). Plasmide sind zirkuläre, doppelsträngige DNA Moleküle, die zwischen 800 und 300000 Basenpaare messen und in bis zu 1000 facher Kopie in einer Zelle vorliegen. Sie werden unabhängig von der normalen DNA repliziert. Um DNA in ein Plasmid zu ligieren, muss dieses zunächst an einer Stelle eröffnet werden. Dies erfolgt mittels eines Restriktionsenzym. Plasmid- und Insert-DNA werden dann, enzymatisch durch eine DNA-Ligase katalysiert, miteinander verbunden. In dieser Arbeit wurden kommerziell erhältliche Plasmide genutzt, die Antibiotikaresistenzgene enthielten. Claudin-1 und -2 als ganzes Protein wurden mittels EcoRV und Kpn I geschnitten, der prokaryontische Expressionsvektor pQE 30 wurde mittels

BamHI und Kpn I eröffnet. Für die Ligation der Konstrukte aus den extrazellulären Loops, Spacer und dem Expressionsvektor pQE 31 wurde der erste Loop von Claudin-1 und -2 mit Sac I und Kpn I, der zweite mit Sph 1 und Hind III geschnitten, pQE 31 mittels SacI und Hind III. Claudin-5 wurde in den Vektor PCR 2.1-Topo kloniert, mittels PCR aus diesem amplifiziert und in den mit EcoRI geschnittenen Expressionsvektor pFLAG CMV-4 ligiert.

Die Konzentration der Schnittprodukte wurde mittels Gelelektrophorese bestimmt. Die Ligation erfolgte mit äquimolaren DNA-Mengen von Vektor und Insert über Nacht bei 14 - 16 °C.

Ansatz:

10–100 ng	Vektor DNA
10–100 ng	Fremd DNA
1 µl	10x Ligasepuffer mit ATP
1 µl	T4 DNA–Ligase
ad 10 µl	H <sub>2</sub> O

**2.2.1.7. Transformation der Plasmid-Insert-Konstrukte in E. coli**

Das Plasmid mit der eingefügten Fremd-DNA wurde in kommerziell erhältliche kompetente E. coli Bakterien des Klons BL 21 RE 4 eingebracht. Diese wurden bei –80 °C gelagert und unmittelbar vor der Verwendung auf Eis aufgetaut. Dann wurden 1-5 µl des Ligationsansatzes, entsprechend 2-20 ng DNA, hinzugegeben und der Ansatz über 30 Minuten auf Eis inkubiert. Um die Aufnahmebereitschaft der Bakterien zu erhöhen, wurde das Gemisch über 30 Sekunden einer Temperatur von 42 °C ausgesetzt und sofort für 2 Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 250 µl eines Nährmediums (SOC Puffer) dazugegeben und über 60 Minuten bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. 100 µl dieser Lösung wurden auf Agaroseplatten gebracht und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

Die Agaroseplatten waren zuvor aus LB-Medium und darin gelöster Agarose gegossen worden. Hierzu war das Gemisch erst aufgeköcht, dann abgekühlt und nach Zugabe von 50 µg/ml Ampicillin in die Plattenform gegossen worden. Von den über Nacht im Brutschrank inkubierten Agaroseplatten wurden am nächsten Tag mit einem sterilen Holzstäbchen einzelne Kolonien in je 4 ml von mit 100 µg/ml Ampicillin versetztem LB-Medium überführt, die dann über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert wurde.

### **2.2.1.8. Plasmid–Mini–Präparation**

Die Plasmid–Mini-Präparation dient der Konzentrierung von Plasmiden. Dazu werden diese aus den Bakterien extrahiert, aufgereinigt und konzentriert. In dieser Arbeit wurde ein kommerziell erhältlicher Kit verwendet. Aus dem unter 2.2.1.6. beschriebenen Ansatz wurden nach Inkubation über Nacht 1,5 ml entnommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und über 1 Minute bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in 300 µl Puffer resuspendiert. Dann wurden 300 µl Puffer hinzugegeben und das Gemisch bei Raumtemperatur über 5 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl Puffer und Inkubation über 15 Minuten bei 4 °C wurde die Mischung für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 13000 rpm zentrifugiert. 800 µl des Plasmid-haltigen Überstandes wurden mit 400 µl Isopropanol gemischt und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das das Plasmid enthaltende Pellet wurde mittels 500 µl 70 %igen Ethanols und Zentrifugation für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 13000 rpm gewaschen, unter Vakuum getrocknet und schließlich in 50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Abschließend wurde überprüft, ob das Plasmid die Fremd-DNA enthielt. Dazu wurden 2,5 µl des Ansatzes und zum Vergleich der leere Vektor gelelektrophoretisch untersucht.

### **2.2.1.9. Sequenzierung doppelsträngiger DNA**

Die Sequenzierung dient der Bestimmung der genauen Nukleotid-Abfolge in einem DNA Molekül. Genutzt wurde in dieser Arbeit das Kettenabbruch- oder Didesoxynucleotidverfahren (Sanger et al., 1992). Die verwendeten Primer wurden so gewählt, dass sie vor einer multiplen Klonierungsstelle an die Matrize banden. Um beide Insert–Vektor–Verbindungsstellen zu überprüfen, wurde ein Primerpaar gewählt, an welchem gegenläufig über je einen Übergang hinweg DNA synthetisiert wurde. An ihnen synthetisierte eine DNA Polymerase einen komplementären DNA-Strang.

Zusätzlich zu den normalen 2' Desoxynucleotidtriphosphaten (dNTPs) wurde eine bestimmte Menge fluoreszenzmarkierter 2'3' Desoxynucleotidtriphosphate (ddNTPs) hinzugegeben. Das Enzym akzeptierte beide gleichermaßen als Substrat, der Einbau eines ddNTPs führte aber aufgrund der mangelnden 3'-OH-Gruppe, die zum Anbau eines weiteren Nukleotids vonnöten gewesen wäre, zum Kettenabbruch. Es entstanden also unterschiedlich lange DNA-Fragmente mit vier verschiedenen Enden. Sie wurden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Die Detektion der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe am Ende eines jeden Stranges erfolgte



per Laser. Das so entstandene Elektropherogramm wurde als Grundlage für eine computergestützte Auswertung der DNA Sequenz genutzt.

Reaktionsansatz:

4 µl	Premix
10-50 ng	DNA
10 pmol	Primer
ad 10 µl	H <sub>2</sub> O

Cycle-Bedingungen:

1. Initiale Denaturierung	5 min	96 °C	
2. Denaturierung	10 sec	96 °C	Wiederholung
3. Primer Hybridisierung	5 sec	55 °C	Schritt 2-4
4. Elongation	4 min	60 °C	25 x
5. Aufbewahrung	∞	4 °C	

Die Proben wurden dann über Reinigungssäulen aufgereinigt, um überschüssige Nukleotide zu entfernen. Hierzu wurden sie in die Mitte des Gelbettes der Säulen gebracht, diese wurden über 2 Minuten bei 750 g zentrifugiert. Das Eluat wurde über 15 Minuten unter Anlage eines Vakuums getrocknet. Das Restvolumen wurde in 20 µl Template Suppression Reagent aufgenommen. Um die DNA Stränge zu trennen, wurde über 3 Minuten bei 96 °C inkubiert. Die Proben wurden dann auf Eis abgekühlt, kurz zentrifugiert um eventuelle Luftblasen zu entfernen und zur Elektrophorese und Sequenzanalyse in den Sequenzierungsautomaten gegeben.

**2.2.1.10. Glycerolstocks**

Um einen Bakterien-Klon nach erfolgreicher Transformation zu konservieren, wurden Glycerolstocks angefertigt. Aus ihnen konnte bei Bedarf eine neue Kultur angeimpft werden. Zur Herstellung von Glycerolstocks wurden 150 µl einer über Nacht bei 37 °C inkubierten Kultur des Bakteriums mit 850 µl Glycerol vermischt. Das Gemisch wurde in flüssigem Stickstoff gekühlt und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.1.11. Transfektion von MDCK Zellen

Die Transfektion ist eine Methode zum Einbringen von cDNA in eukaryontische Zellen mittels geeigneter Vektoren. In dieser Arbeit wurde nach der Lipofektions-Methode transfiziert (Felgner et al., 1987). In dieser Arbeit wurden MDCK-C11 Zellen mit dem kommerziell erhältlichen pFLAG-CMV-4 Expressionvektor, der Claudin-5 cDNA enthielt, transfiziert. Der Vektor enthielt eine „FLAG“-Sequenz, die mittels eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden konnte und Antibiotika-Resistenzgene. In parallelen Ansätzen wurden andere MDCK-C11 Zellen mit dem leeren Vektor transfiziert. Darüber hinaus erfolgte eine parallele Aufarbeitung nicht transfizierter Zellen. Es wurden je  $7 \times 10^4$  MDCK-C11 Zellen in Schalen ausgesät. Für die Transfektion wurden je zwei Lösungen angesetzt:

#### Lösung 1:

400 µl	Medium ohne FKS und Antibiotikum
16 µl	Lipofektamin

#### Lösung 2:

400 µl	Medium
24 µl	Plus-Reagenz
Entweder 1 µl	Claudin-haltiger Expressionsvektor
Oder 2 µl	„leerer“ Expressionsvektor

Beide Lösungen wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, miteinander vermengt und wiederum über 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen. In jede Schale wurden 3,2 ml Medium ohne FKS und Antibiotikum gegeben. Dann wurde in jede der Schalen das Gemisch der oben beschriebenen Lösungen gegeben und die Ansätze bei 37 °C über 4 Stunden inkubiert. Schließlich wurden die Zellen mit FKS- und Antibiotika-haltigem Medium gewaschen und gefüttert. Sie wurden bei 37 °C im Brutschrank gelagert, alle 4-5 Tage gewaschen und mit Antibiotika-haltigem Medium gefüttert. Das Zellwachstum wurde täglich lichtmikroskopisch kontrolliert. Die Bildung des Proteins wurde mittels Western Blotting evaluiert. Mittels immunhistochemischer Untersuchungen wurde die genaue Verteilung des Proteins in der Zelle untersucht. Die funktionellen Eigenschaften des gebildeten Gewebes wurden elektrophysiologisch untersucht.

#### **2.2.1.12. Membranprotein–Extraktion aus eukaryontischen Zellkulturen**

Die Proteine wurden fraktioniert aus den konfluent in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen gewachsenen MDCK-C11 Zellen gelöst und die Membranproteinfraktion isoliert. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 500 µl Lysepuffer in jede Flasche gelöst. Mit einem Zellscraper wurden sie zu einer Suspension zusammengeschoben, die dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert werden konnte. Die Lösung wurde durch mehrfaches Passieren einer 26 G Kanüle homogenisiert. Nach einer Zentrifugation über 5 Minuten bei 4 °C und 250 g wurde der Überstand rasch abgenommen und nun über 30 Minuten bei 4 °C und 43000 g zentrifugiert. Hier erfolgte eine Auftrennung in einen die zytosolische Proteinfraktion enthaltenden Überstand und ein die Membranproteinfraktion enthaltendes Pellet. Dieses wurde in 100 µl eiskaltem Lysepuffer gelöst. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei –80 °C.

#### **2.2.1.13. Proteinquantifizierung**

Die Proteinquantifizierung erfolgte durch Messung der Extinktion von Licht bei einer Wellenlänge von 562 nm im Tecan Spectra Classic Proteinmessgerät. Sie wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Hierzu wurden je 10 µl Probe mit 190 µl BCA–Gebrauchslösung gemischt. Bei Proben mit einer sehr hohen erwarteten Proteinkonzentration wurde die Probe zuvor verdünnt. Als Kontrolle diente eine Reihe von BSA-Lösungen bekannter Proteinkonzentration (0; 0,2; 0,8 und 1,2 mg/ ml) sowie der Lysepuffer. Um die Wahrscheinlichkeit einer Fehlbestimmung zu verringern, wurden sowohl von den BSA-Kontrollen als auch von den Proben jeweils zwei Bestimmungen angesetzt. Aus beiden Werten einer Probe wurde der Mittelwert gebildet und der Wert des Lysepuffers von ihm abgezogen. Aus den Werten der Standardreihe der BSA Proben wurde durch lineare Regression eine Eichkurve gebildet und die Werte der Proben darauf abgelesen.

#### **2.2.1.14. Western Blotting**

Western Blotting ist eine Methode zum Nachweis eines Proteines durch Bindung eines bestimmten Antikörpers. Die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und immunodetektiert. Die einzelnen Schritte sind im Folgenden beschrieben:

##### **Western Blotting: Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Elektrophorese von Proteinen wurde in einem Polyacrylamidgel durchgeführt. Im Gegensatz zu DNA haben Proteine keine einheitliche Ladung. Dies wurde durch den Zusatz von SDS-haltigem Probenpuffer, einem negativ geladenen Detergenz, ausgeglichen. Dies verlieh Proteinen eine negative Ladung, wodurch sie zur Anode wanderten. Die Elektrophorese wurde als diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Hierdurch eignete sie sich besonders zur Bestimmung der molekularen Masse von Proteinen. Das Gel bestand aus einem Sammelgel und einem Trenngel, in welchem die eigentliche Auftrennung der Proteine stattfand.

Zum Fertigen des Gels wurden zwei Glasplatten in einer Halteapparatur befestigt, zwischen die zunächst das Trenngel bis etwa 1,5 cm unter die Oberkante der Glasplatte gegossen wurde. Nach Polymerisation des Gels nach etwa 30 Minuten wurde darauf das Sammelgel gegossen, welches mit einer Schablone für die Probenaschen versehen wurde. Nach 30 Minuten wurde die Schablone entfernt, die Taschen vorsichtig mit Elektrophoresepuffer gespült, das Gel in die Elektrophoreseapparatur überführt und der Elektrophoresepuffer angegossen. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen 5x Laemmli-Probenauftragspuffer versehen und bei 95 °C über 5 Minuten hitzedenaturiert. Mittels einer Hamilton-Pipette wurden jeweils etwa 25-50 µg Protein in maximal 30 µl Gesamtvolumen aufgetragen. Als Molmassenstandards wurden ebenfalls zuvor hitzedenaturierte SDS-Marker bzw. der zuvor über zwei Minuten bei 42 °C inkubierte Kaleidoskop-Marker verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V.

##### **Western Blotting: Elektrotransfer**

Nach erfolgter Auftrennung wurde das Protein elektrophoretisch auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Zunächst wurde die 6,8 x 8,5 cm große PVDF-Membran über 5 Minuten in absolutem Alkohol, dann die Membran, zwei Schwämme und das Gel für 5 Minuten in Transferpuffer inkubiert. Das Gel wurde in definierter Ausrichtung auf dem Filter platziert, beide wurden als Mitte eines „Sandwich“-Aufbaus von je einem Whatman-Filter und einem Schwamm umgeben. Dieser Aufbau wurde in der Elektrophoreseapparatur plat-

ziert und mit Transferpuffer umgeben. Der Transfer erfolgte bei 100 V und 0,2-0,4 A über 1 Stunde.

### **Western Blotting: Immundetektion**

Die Immundetektion ist die Nachweisreaktion eines Proteins durch Bindung eines Antikörpers an dasselbe und eines zweiten Antikörpers an den ersten. Dieser wird durch einen Chemolumineszenz-Nachweis dargestellt.

Die Membran wurde nach dem Elektrotransfer in PBS/ Tween gespült und in 50 ml PBS/ Tween/ 5 % Magermilchpulver über 2 Stunden bei Raumtemperatur unter Wippen inkubiert. Dies diente dem Saturieren überschüssiger Proteinbindungsstellen der Membran und sollte unspezifisches Binden der Nachweisreagenzien verhindern. Dem folgte nach kurzem Spülen in PBS/Tween eine 2 stündige Inkubation bei Raumtemperatur in 50 ml PBS/ Tween/ 5 % BSA/ 0,02 % NaAzid. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper erfolgte in 12,5 ml PBS/ Tween/ 5 % BSA/ 0,02 % NaAzid/ 1. Antikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur und konstantem Schwenken. Nach Entfernen der Lösung und Waschen über 2x 10 Minuten mit PBS/ Tween und 10 Minuten mit TBST/ Tween wurde die Membran über 60-90 Minuten mit dem 2. Antikörper (15 µl Anti-rabbit Antikörper beziehungsweise 38 µl Anti-mouse Antikörper) in 15 ml TBST/ 1 % Blocking Reagent bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen der Lösung und erneutem Waschen wie oben beschrieben wurden die Meerrettichperoxidase-Reagenzien für die Chemolumineszenzreaktion vermischt. und die Membran darin für genau 5 Minuten unter Lichtabschluss inkubiert. Sie wurde dann zwischen zwei Transparentfolien gelegt und in einer Filmkassette aufbewahrt. Die Detektion der Signale erfolgte mittels eines Lumineszenz-Detektors (LAS 100).

## 2.2.2. Elektrophysiologie

### 2.2.2.1. Widerstandsmessung in Ussing Kammern

Eine gut etablierte Methode zur In-vitro-Bestimmung von aktivem Ionentransport (Kurzschlussstrom,  $I_{sc}$ ) und Ionenpermeabilität (Leitfähigkeit bzw. Widerstand) von Epithelien ist die Kurzschlussstrom-Messung in der Ussing Kammer (Ussing et al., 1951). Die Methode erlaubt eine exakte Differenzierung von aktivem und passivem Stofftransport durch ein Gewebe. Der Versuchsaufbau beseitigt alle äußeren Gradienten, die einen Stofftransport bedingen könnten. Durch aktiven Transport geladener Moleküle entsteht eine transepitheliale Spannung. Diese wiederum hat einen passiven Stofftransport über das Epithel zur Folge. Die sich ständig ändernde transepitheliale Spannung wird kontinuierlich registriert und durch einen entgegengesetzten Strom gleicher Höhe ausgeglichen, so dass die Spannung permanent 0 mV beträgt. Die Höhe des Kurzschlussstromes entspricht also exakt dem aktiven Ionentransport des Epithels mit entgegengesetztem Vorzeichen.

Die Apparatur besteht aus 2 gleich großen Kammern aus gefrästem Acrylglas, die durch ein in der Mitte eingespanntes Gewebe so voneinander getrennt sind, dass Stoff-, Flüssigkeits- oder Stromtransport nur über das Gewebe erfolgen kann. In den Kammern befinden sich gleiche Volumina einer Badlösung, die offenen Kontakt zum Gewebe haben. Zu- und Ableitung der Badlösung erfolgt über je zwei Öffnungen. In jeder Kammer befinden sich zwei Elektroden: Ein in Gewebenähe gelegenes Paar registriert die transepitheliale Spannung, ein lateral gelegenes Paar appliziert den Kurzschlussstrom.

Der in dieser Arbeit angewandte Versuchsaufbau war dahingehend modifiziert, dass durch Ausfräsungen der Plexiglaskammern das Einsetzen von nach außen durch Dichtungsringe abgeschirmte Zellkulturschalen möglich wurde (Kreusel et al. 1991). In beide Kammern wurden je 10 ml Badlösung einer Temperatur von 37 °C gegeben. Um den pH-Wert bei 7,4 zu halten wurde über eine Injektionsnadel ein 95:5 Sauerstoff:Kohlendioxid Gas-Gemisch in die Kammern geleitet. Die elektronischen Messungen erfolgten mittels PC (Siemens, PCD 2). Dieser verfügte über einen Mehrkanal-AD-DA-Wandler, der die Spannung über dem Epithel maß und die Elektroden steuerte. Der PC steuerte auch einen Messverstärker (CVC 6), der über einen von ihm generierten Rechteckstrom den transepithelialen Widerstand über dem Epithel bestimmte. Messungen konnten im „closed“ oder „open circuit“ erfolgen. Gemessen wurde in Intervallen von 5-60 Sekunden. Die Messwerte wurden tabellarisch angezeigt. Zur Registrierung und Steuerung wurde eine speziell hierfür entwickelte Software genutzt (Analogon, Ing. Grad. Sorgenfrei). Vor jedem Versuch wurde das Asymmetriepotential, also die Abweichung vom 0-Punkt, der Spannungselektroden und des Badwiderstandes bestimmt und von den spä-

ter erhobenen Messwerten abgezogen. Der transepitheliale Widerstand ( $R_t$ ) wurde aus den mittels Rechteckgenerator applizierten Strömen  $I_1$  und  $I_2$  und den dadurch entstehenden Potentialdifferenzen  $U_1$  und  $U_2$ , dem Ohm'schen Gesetz folgend, berechnet.

$$U_1 = U_e + R \times I_1 \text{ und } U_2 = U_e + R \times I_2$$

$$R = (U_1 - U_2) / (I_1 - I_2)$$

Der Widerstand der mit Badlösung gefüllten Ussing-Kammer ohne Epithel wurde abgezogen. Die transepitheliale Spannung ( $U_e$ ) wurde direkt gemessen. Der Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ) wurde aus diesen beiden Komponenten nach der Formel  $I_{sc} = U_e / R_t$  errechnet.

### **2.2.2.2. Manuelle Widerstandsmessung**

Der initial bestehende transepitheliale Widerstand wurde mittels manueller Messung bestimmt. Der Versuchsaufbau wurde eigens für die Bestimmung des transepithelialen Widerstandes von Zellen in Minicell-Filtern entwickelt. Eine Elektrode wurde an der Oberfläche des Zellrasens und die andere in der extrazellulären Flüssigkeit platziert. Dann wurde der transepitheliale Widerstand mit Claudin-5 in p-FLAG CMV-4 Vektor transfizierter Zellen bestimmt. Zur Kontrolle wurde der Widerstand mit leerem Vektor transfizierter Zellen bestimmt. Der Leerwiderstand wurde jeweils an einem unbeschichteten Filter bestimmt und dann von dem über die Zellen gemessenen Wert abgezogen.

### **2.2.2.3. Fluxmessungen**

Die Untersuchung des paracellulären Transportes erfolgte über Fluxmessungen. Gemessen wurden unidirektionale Fluxe von der apikalen zur basolateralen Seite des Epithels. Die Untersuchung erfolgte unter Kurzschlussbedingungen, um passive Ionenbewegungen, die durch elektrische Gradienten entstehen könnten, auszuschalten. Auf die apikale Seite des Epithels wurde  $^3\text{[H]}$  – Mannitol einer Aktivität von 25 kBq/ ml (Biotrend, Köln) zur Lösung gegeben. Nach 10 Minuten und nochmals am Ende der Messung wurden 100  $\mu\text{l}$  Lösung von der apikalen Seite entnommen, nach weiteren 5 Minuten und dann 3 mal in jeweils 10 minütigen Abständen wurden jeweils 1 ml Lösung von der basolateralen Seite entnommen. Um einen hydrostatischen Gradienten zu vermeiden, wurde die entnommene Lösung durch frische Badlösung ersetzt. Zum Messen der Proben wurden die von der apikalen Seite entnommenen Proben mit Ringerlösung auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt. Alle Proben wurden zur Aktivi-

tätsmessung mit 4 ml Ultima gold high flas-point liquid scintillation cocktail versetzt. Die Aktivitätsmessung erfolgte in einem  $\beta$ -Counter (Tri-Carb 2100TR Liquid Szintillationszähler), da  $^3\text{[H]}$  – Mannitol ein reiner  $\beta$ -Strahler ist.

Die Berechnung der unidirektionalen Fluxe erfolgte mittels folgender Formel:

$$J_{\text{Ma}} = \frac{V + (\text{Man}) \times t}{F_{\text{K}}} \frac{(10 \times ((\beta_{\text{K}2}/2) - \beta_{\text{leer}})) - (8 \times ((\beta_{\text{K}2}/2) - \beta_{\text{leer}}))}{99 \times (\beta_{\text{apikal}} - \beta_{\text{leer}})}$$

$J_{\text{Ma}}$  - unidirektionaler Mannitol-Flux

V – Kammervolumen in Liter

(Man) – Mannitolkonzentration in der Badlösung (1mM)

t – Intervallgröße als 60/ Intervalllänge in Minuten

$F_{\text{K}}$  - Kammerfläche in  $\text{cm}^2$

$\beta_{\text{K}2}$  - Aktivität der Probe (hier Probe 2) in Bequerel/ Minuten im Counter

$\beta_{\text{leer}}$  - Aktivität von 1 ml Badlösung (Leerwert)

#### 2.2.2.4. Immunfluoreszenz

Mit der Immunfluoreszenzfärbung wurde die Anwesenheit und Verteilung von Occludin und Claudin-5 in MDCK-C11 Zellen dargestellt. Die Methode beruht darauf, dass einen Fluoreszenzfarbstoff enthaltende Antikörperkomplexe, spezifisch an die nachzuweisende Struktur binden und der Farbstoff nach Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge Licht einer bestimmten anderen Wellenlänge emittiert. Die Zellen wuchsen als Monolayer auf 18 x 18 mm Deckgläsern. Zunächst wurden sie zweimal mit PBS plus  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$  gewaschen und 10 Minuten bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  mit Methanol fixiert, dann wiederum 2x mit PBS plus  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$  gewaschen. Dann wurde 0,5 % (w/v) Triton X-100 in PBS plus  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$  auf die Zellen gegeben. Sie wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und zweimal wie oben beschrieben gewaschen. Nun wurde über 10 Minuten mit 0,5 % (w/v) Goat-Serum in PBS plus  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$  bei Raumtemperatur blockiert und danach mit Maus Anti-Occludin bzw. Kaninchen Anti-Claudin-5 Antikörper einer Konzentration von 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in der Blockierungslösung für 30 Minuten inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit der Blockierungslösung wurde auf die gleiche Weise ein weiterer Antikörper für die Doppelfärbung zugesetzt und wiederum zweimal mit Blockierungslösung gewaschen. Nun wurde im Dunkeln mit einem zweiten Antikörper (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse und Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit,



Konzentration jeweils 2 µg/ml) auf gleiche Weise inkubiert und anschließend gewaschen. Dies wurde für die Inkubation mit dem weiteren Antikörper für die Doppelfärbung wiederholt. Das Präparat wurde erst mit destilliertem Wasser, dann mit absolutem Ethanol gespült und mit ProTaqMountFluor eingedeckt. Abschließend härtete es für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss aus. Die Bilder wurden mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Zeiss LSM 510) aufgenommen, angeregt wurde mit Licht der Wellenlängen 543 und 488 nm.

### 2.2.3. Proteinbiochemie

#### 2.2.3.1. Proteinexpression mittels prokaryontischer Expressionssysteme

##### Vorversuch zur Ermittlung der optimalen Bedingungen

Um Claudin-1 und -2 charakterisieren zu können, sollten sie möglichst rein und konzentriert nativ in Lösung gebracht werden. Hierzu wurden Claudin-1 und -2 jeweils in den prokaryontischen Expressionsvektor pQE 30 bzw. als Einzelloopkonstrukte in den ebenfalls prokaryontischen Expressionsvektor pQE 31 kloniert. Es wurde eine Versuchsreihe zur Eruiierung der optimalen Expressionsbedingungen durchgeführt. Zunächst wurden 75 µl des E. coli Klons BL 21 RE 4 mit 50 ng Claudin-DNA transformiert und auf Ampicillin- und Kanamycin-haltige Agaroseplatten gebracht. Diese wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein Röhrchen mit 5 ml Antibiotika-haltigen Nährmediums mit einer der Bakteri-enkolonien angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. 40 ml Antibiotika-haltigen Nährmediums wurden mit 4 ml der Bakteriensuspension angeimpft und bei 37 °C im Schüttler inkubiert bis die Bakterien sich bis zu einer OD von 0,5 vermehrt hatten. Die Bestimmung der Dichte erfolgte mittels photometrischer Messung mit Licht einer Wellenlänge von 540 nm. Bei Erreichen dieser Dichte wurde die Proteinexpression mittels Zugabe von IPTG induziert, hierzu wurden je 2 ml Suspension in 12 Röhrchen aufgeteilt. Die Proteinexpression erfolgte unter folgenden Bedingungen:

1h	0,5 mM IPTG	30°C
1h	1 mM IPTG	30°C
1h	0,5 mM IPTG	37°C
1h	1 mM IPTG	37°C
2h	0,5 mM IPTG	30°C
2h	1 mM IPTG	30°C
2h	0,5 mM IPTG	37°C
2h	1 mM IPTG	37°C
4h	0,5 mM IPTG	30°C
4h	1 mM IPTG	30°C
4h	0,5 mM IPTG	37°C
4h	1 mM IPTG	37°C

Zusätzlich wurden transfizierte, nicht IPTG-induzierte Kontrollen unter gleichen Bedingungen inkubiert und verarbeitet. Nach der Inkubation wurden je 1,5 ml der Bakteriensuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 6000 rpm über 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl 2x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Zur Beurteilung der Expression wurden die Proben in einem 7,5 % igen Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und einer Coomassie-Blau-Färbung unterzogen. In einer Variation des Experimentes wuchsen die Bakterien bis zu einer OD von 1,5, wurden mit jeweils 1 mM IPTG induziert und bei 37 °C über 4 beziehungsweise 6 Stunden inkubiert.

### **Proteinexpression**

Nach Testung der günstigsten Bedingungen erfolgte die Proteinexpression in einem größeren Volumen. Hierfür wurde 1 ml Antibiotika-haltigen Nährmediums mit 1 Kolonie der das Plasmid enthaltenden Bakterien angeimpft und bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Nach 12 h wurden 50 ml Antibiotika-haltigen Mediums hiermit angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Hiervon wurden am Morgen 10 ml in 200 ml Antibiotika-haltiges Nährmedium überführt. Die Bakteriensuspension wurde bei 37 °C auf eine OD von 0,5 wachsen lassen, dann wurde die im Vorversuch günstigste Menge an IPTG dazugegeben und über die im Vorversuch günstigste Zeit bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Das gesamte Volumen wurde dann bei 5000 rpm und 4 °C über 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit PBS gewaschen, unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert und der Überstand wiederum verworfen. Das Pellet wurde in 10 ml Lysepuffer aufgenommen, diese Lösung wurde zweimal bei 16000 psi durch eine hydraulische Hochdruckpresse („french press“) gegeben um die Zellen aufzuschließen. Die Lösung wurde jetzt bei 10000 g und 4 °C über 30 Minuten zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde mit 50 % Ni-NTA Agarose im Verhältnis 4:1 vermischt und 1 h bei 4 °C und 200 rpm auf dem Rotations-Schüttler inkubiert. Die Mischung wurde auf eine Säule geladen wobei das Protein an die Säule band. Um Verunreinigungen zu entfernen, wurde sie zweimal mit Waschpuffer beladen. Das Protein wurde mit einem Elutionspuffer aus seiner Bindung befreit und in Fraktionen aufgefangen. Die Darstellung des Expressionsergebnisses erfolgte mittels Coomassie-Blau-Färbung und Western Blotting.

#### **2.2.3.2. Solubilisierung mittels Denaturierung in Urea-Puffer**

Die Proteinexpression erfolgte wie gewohnt bis zum Aufbrechen der Zellen mittels French Press und anschließender Zentrifugation. Hiernach wurde das Pellet über 1,5 h in 5 ml 4 M

Urea-Puffer/ g Feuchtgewicht resuspendiert und die Lösung bei Raumtemperatur mit 10000 g über 25 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in 1/ 5 Volumen 5x Laemmli-Puffer, das Pellet in Lysepuffer aufgenommen. Der Nachweis erfolgte mittels Western Blotting.

#### **2.2.3.3. Aufreinigung und Aufkonzentrierung über Größenfilter**

Zur Aufreinigung wurden die Proben auf eine Säule geladen, deren Boden von einem Größenfilter gebildet wurde und bei 4000 g und 8 °C zentrifugiert. Der Filter hielt Proteine > 30 kDa zurück, kleinere Proteine konnten ihn passieren. Nach Abschluss der Zentrifugation wurde der Filter umgedreht und der Rest der Lösung bei 400x g über 4 Minuten abzentrifugiert. Der Nachweis erfolgte über Gelelektrophorese und Coomassie-Blau-Färbung. Um die Probe aufzukonzentrieren, wurde sie durch Zentrifugation über eine Säule mit einem Größenfilter von 3 kDa eingeeengt. Die Zentrifugationsschritte erfolgten analog zu den oben beschriebenen. Der Nachweis erfolgte durch Coomassie-Blau-Färbung und Western Blotting.

#### **2.2.3.4. Coomassie-Blau-Färbung**

Coomassie-Brillant-Blau R-250 bindet als tiefblauer Komplex unspezifisch an nahezu alle Proteine. Seine Nachweisgrenze liegt bei 0,1-2 µg Protein/ Bande Die Stärke der Färbung einer Bande korreliert mit ihrer Proteinkonzentration. Das Gel wurde in 200 ml Färbelösung unter leichtem Schütteln über 30-45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, die Färbelösung abgossen und das Gel mittels einer Entfärbelösung ebenfalls bei Raumtemperatur entfärbt. Die Entfärbelösung wurde ein- bis zweimal gewechselt. Durch einen mitaufgetragenen Marker wurde die Größe der Fragmente angezeigt. Die Dokumentation und Digitalisierung des Geles erfolgte in feuchtem Zustand mittels Lumineszenz-Detektor (LAS-1000).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Endogene Expression von Claudinen und Occludin in MDCK Zellen

Nach den Widerstandsmessungen wurden die Zellen genauer charakterisiert, indem die darin enthaltenen Membranproteine extrahiert und mittels Western Blotting nachgewiesen wurden. Hierfür wurden Maus Anti-Occludin bzw. die für die einzelnen Claudine spezifischen Antikörper verwendet. Die Leervektor- (mock-) transfizierten MDCK-C11 Zellen zeigten keine nachweisbare Claudin-5 Expression. Alle untersuchten Zellen zeigten eine deutliche Expression von Claudin-1, -2 und -3 sowie von Occludin (Abb. 2).

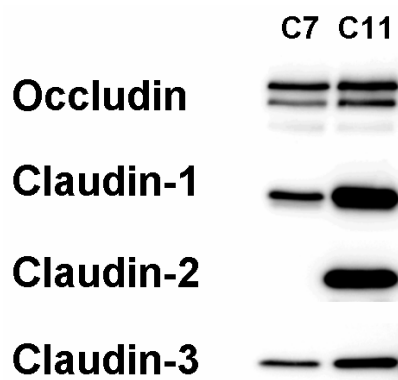


Abb. 2: Western Blot-Nachweis der Claudine 1, -2 und -3 sowie von Occludin in MDCK-C7 bzw.-C11 Zellen.

#### 3.2. Stabile Transfektion von MDCK-C11 Zellen mit Claudin-5-cDNA

Parallel zur stabilen Transfektion von hochohmigen MDCK-C7 Zellen (Amasheh et al., 2005) wurden MDCK-C11 Zellen stabil transfiziert. es zeigte sich eine starke Expression in den Klonen MDCK-C11-5.1 und MDCK-C11-5.2.

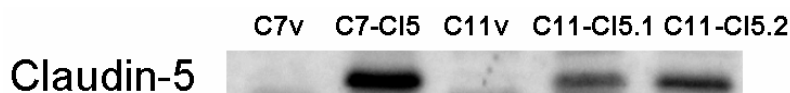


Abb. 3: Western Blot-Nachweis von Claudin-5 in mit Claudin-5 bzw. leerem Vektor transfizierten MDCK-C7 - und -C11 Zellen.

Zur Analyse der Lokalisation wurde Immunfluoreszenzfärbungen der Zellen mit mAnti-FLAG-Antikörper durchgeführt (Gegenfärbung mit rb-Anti-Occludin, Abb. 4).

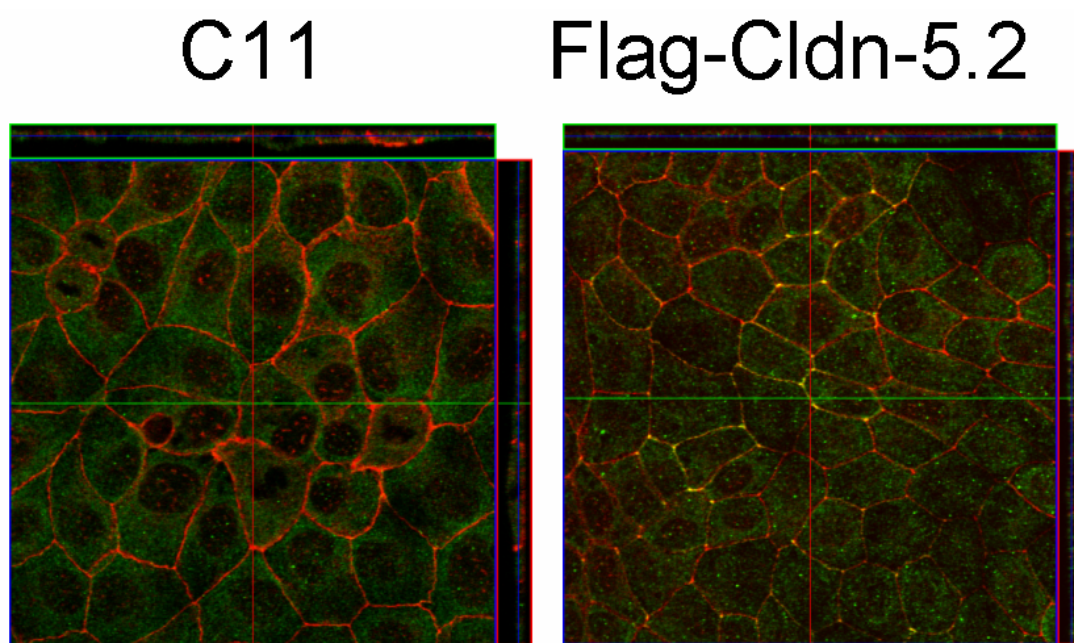


Abb. 4: Immunfluoreszenzfärbung von MDCK-C11-5.2 vs. mock-transfizierter Zellen (C11) mit mAnti-Flag-Antikörper.

### **3.3. Transepithelialer Widerstand der Claudin-5 transfizierten MDCK-C11 Zellen**

Die transepithelialen Widerstände ( $R^t$ ) der mit leerem pFLAG-CMV4-Vektor transfizierten sowie der Claudin-5-pFLAG-CMV4-Vektor transfizierten MDCK-C11 Zellen wurden sowohl manuell als auch in der Ussing Kammer bestimmt.

Die Messung erfolgte am 7. Tag nach der Aussaat auf die für die Messung erforderlichen, permeablen Filter. Sie ergab für die mock-transfizierten Kontrollen  $61,13 \pm 13 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , für die beiden Klone C11-5.1 und C11-5.2  $59,87 \pm 1,72 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , bzw.  $59,07 \pm 2,18 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (n=9, n.s., Abb. 1).

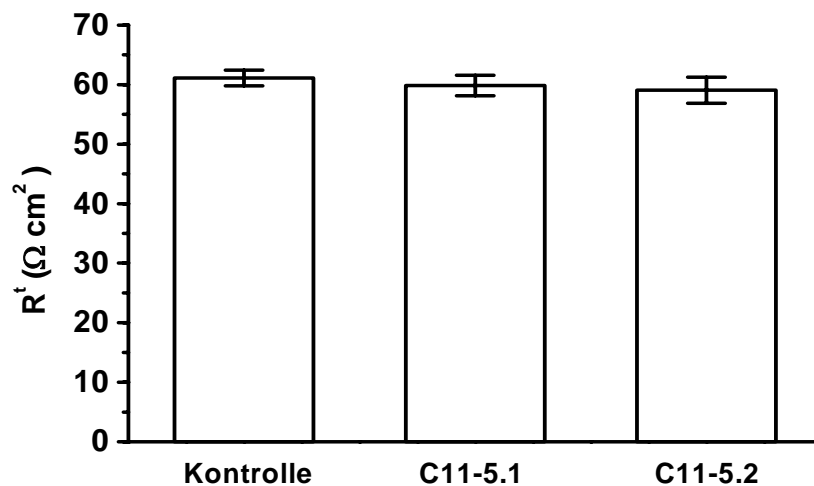


Abb. 5: Widerstände der mit Claudin-5-pFLAG-CMV4-Vektor transfizierten MDCK-C11 Zellen versus Kontrollen (jew. n = 9, n.s.).

### **3.4. Expression von Claudin-1 und -2 in E. coli**

Claudin-1 und -2 mit His-Tag wurden im prokaryontischen Expressionsvektor pQE 30 in *Escherichia coli* Bakterien exprimiert. Es erfolgte zunächst eine Expression in einem kleinen Volumen („Vorversuch“) zur Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen in Temperatur, Expressionsdauer und Menge des zur Induktion der Expression genutzten IPTG. Als Kontrolle wurde für jede Bedingung ein Ansatz des Bakterienklones nicht induziert. Das Ergebnis der Expression wurde mittels Gelelektrophorese und Coomassie-Blau-Färbung dargestellt (Expression von Claudin-1 Abb. 6 und 7, Expression von Claudin-2 Abb. 8 und 9).

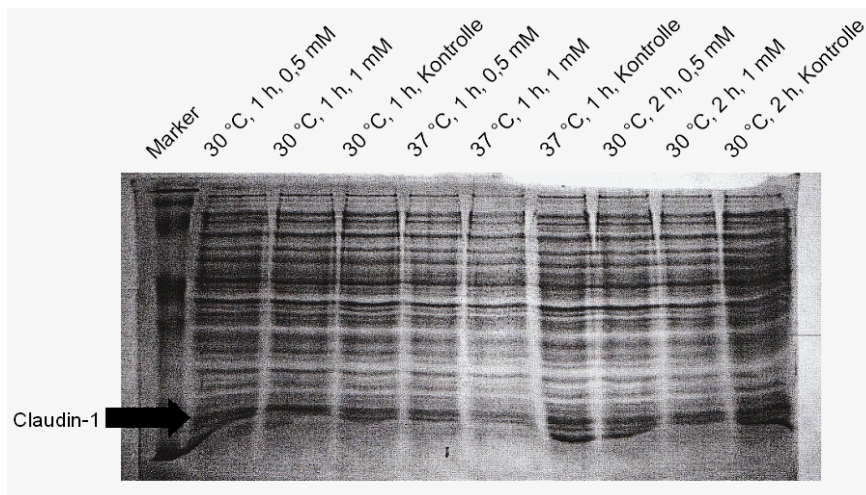


Abb. 6: Expression von Claudin-1 mit His-Tag, Vorversuch zur Ermittlung der optimalen Bedingungen. Coomassie-Blau-Färbung.

Legende: Angegebene Werte: Temperatur, Dauer und Konzentration des angewandten IPTG der Induktion; Kontrollen: Fehlende Zugabe von IPTG; Marker: Kaleidoskop-Marker.

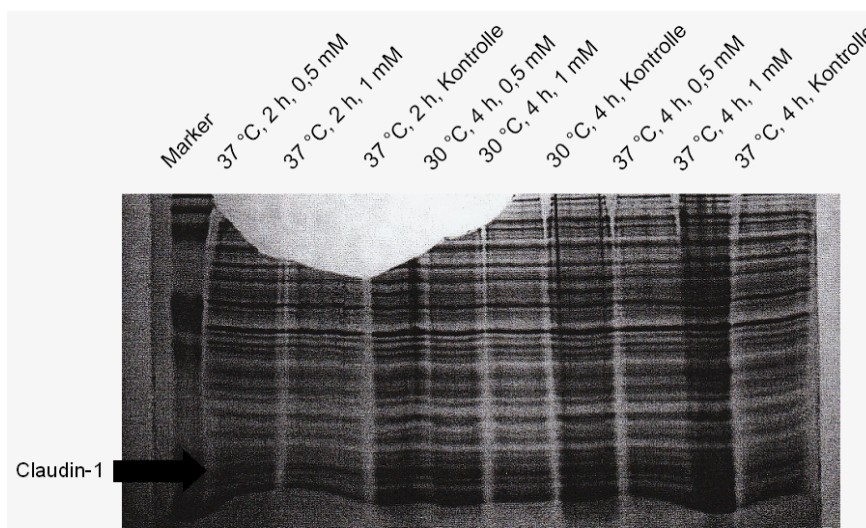


Abb. 7: Expression von Claudin-1 mit His-Tag, Vorversuch zur Ermittlung der optimalen Bedingungen. Coomassie-Blau-Färbung.

Legende: Angegebene Werte: Temperatur, Dauer und Konzentration des angewandten IPTG der Induktion; Kontrollen: Fehlende Zugabe von IPTG; Marker: Kaleidoskop-Marker.



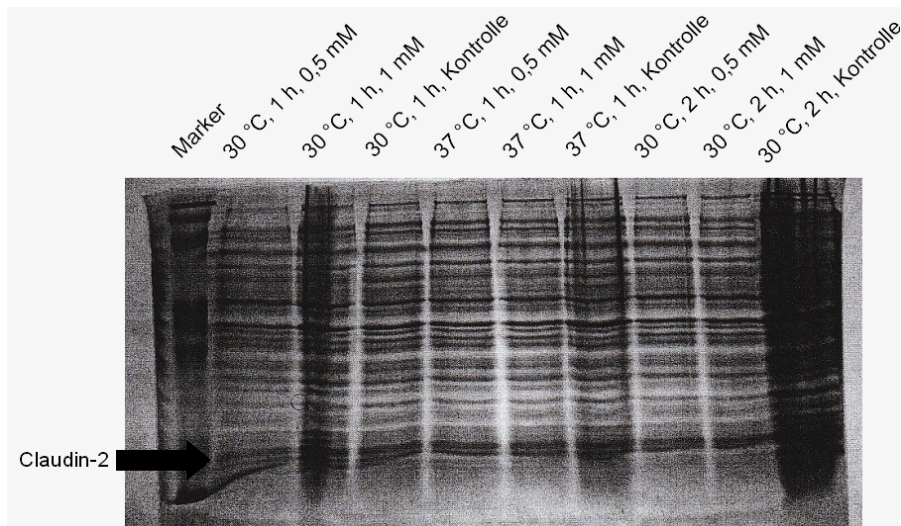


Abb. 8: Expression von Claudin-2 mit His-Tag, Vorversuch zur Ermittlung der optimalen Bedingungen. Coomassie-Blau-Färbung.

Legende: Angegebene Werte: Temperatur, Dauer und Konzentration des angewandten IPTG der Induktion; Kontrollen: Fehlende Zugabe von IPTG; Marker: Kaleidoskop-Marker.

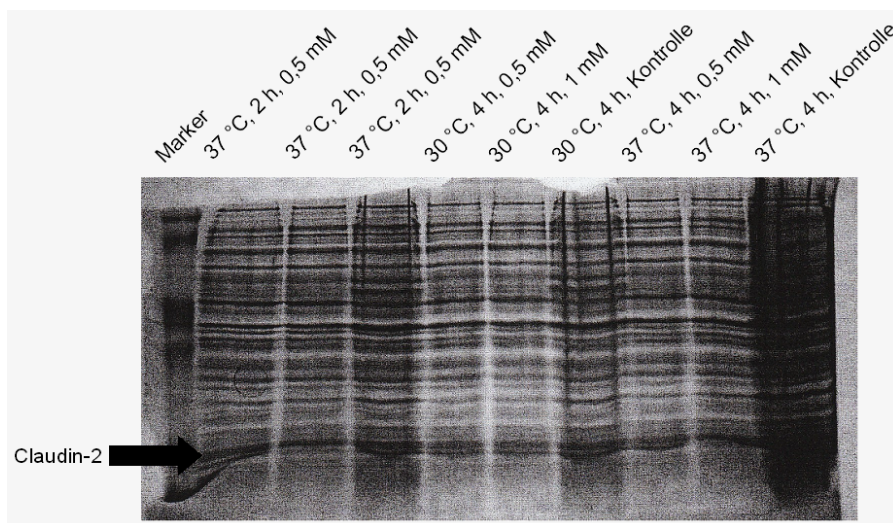


Abb. 9: Expression von Claudin-2 mit His-Tag, Vorversuch zur Ermittlung der optimalen Bedingungen. Coomassie-Blau-Färbung.

Legende: Angegebene Werte: Temperatur, Dauer und Konzentration des angewandten IPTG der Induktion; Kontrollen: Fehlende Zugabe von IPTG; Marker: Kaleidoskop-Marker.

Claudin-1 und -2 sind etwa 22 kDa groß. Eine erfolgreiche Induktion der Bildung der Claudine würde sich darin äußern, dass die entsprechende Bande bei den Kontrollansätzen am schwächsten ausgeprägt wäre und entsprechend den günstigsten Induktionsbedingungen eine immer deutlichere Ausprägung hin zu der günstigsten Bedingung aufweisen würde. In der Vorversuchsreihe konnte keine Induktion nachgewiesen werden (Abb. 6 – 9).

### 3.5. Expression von Claudin-1- und 2- „Einzelloopkonstrukten“ in E. coli

Die funktionellen Eigenschaften der Claudine werden über die extrazellulären Loops vermittelt. Deshalb wurden Konstrukte von Claudin-1 und -2 hergestellt, die nur aus den beiden extrazellulären Loops, verbunden durch einen Platzhalter (Spacer) bestanden. Um das Nukleotidtripletraster einzuhalten, erfolgte die Transformation in den prokaryontischen Expressionsvektor pQE 31. Die Expression erfolgte im gleichen Bakterienstamm unter den gleichen Bedingungen wie zuvor bei der Expression des gesamten Proteins. Zunächst wurden in einem Vorversuch die günstigsten Expressionsbedingungen beurteilt (Expression von Claudin-1: Abb.10 und 12, Expression von Claudin-2: Abb. 11 und 13). Diese ergaben für Claudin-1 Expression bei 37 °C über 4 Stunden nach Induktion mittels 1 mM IPTG und für Claudin-2 Expression bei 37 °C über 2 Stunden nach Induktion mittels 1 mM IPTG.

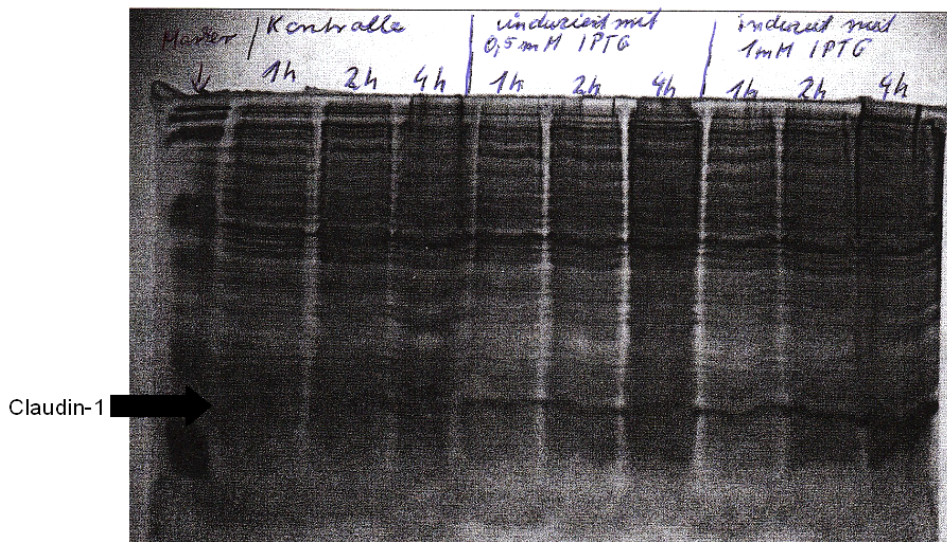


Abb. 10: Expression von Claudin-1 als „Einzelloopkonstrukt“ bei 37 °C, Vorversuch zur Ermittlung der optimalen Bedingungen. Coomassie-Blau-Färbung.

Legende: Angegebene Werte: Temperatur, Dauer und Konzentration des angewandten IPTG der Induktion; Kontrollen: Fehlende Zugabe von IPTG; Marker: Kaleidoskop-Marker.

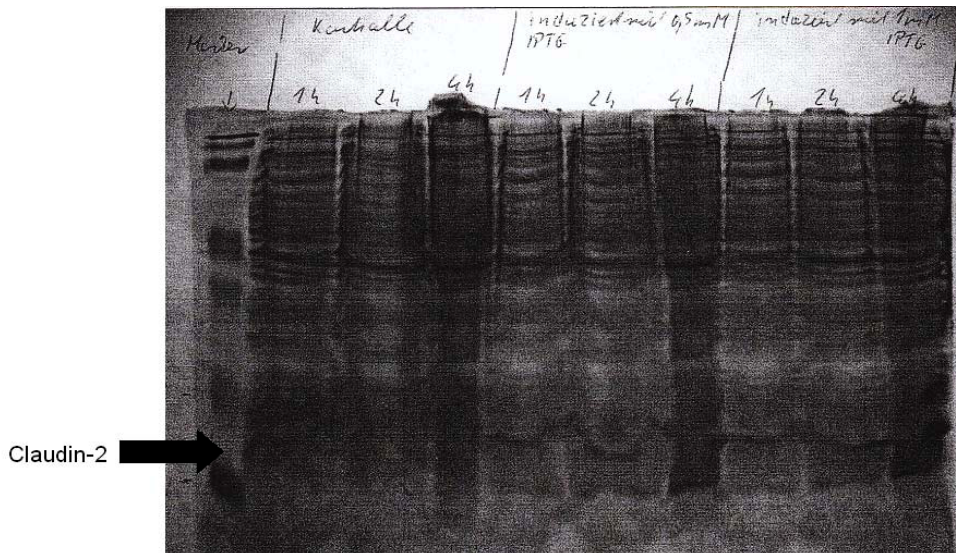


Abb. 11: Expression von Claudin-2 als „Einzelloopkonstrukt“ bei 37 °C, Vorversuch zur Ermittlung der optimalen Bedingungen. Coomassie-Blau-Färbung.

Legende: Angegebene Werte: Temperatur, Dauer und Konzentration des angewandten IPTG der Induktion; Kontrollen: Fehlende Zugabe von IPTG; Marker: Kaleidoskop-Marker.

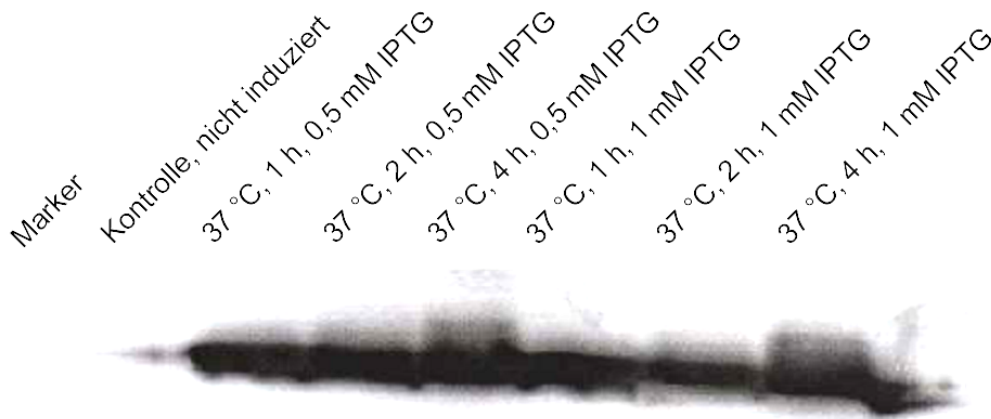


Abb. 12: Expression von Claudin-1 als „Einzelloopkonstrukt“ im Vorversuch zur Ermittlung der optimalen Bedingungen. Western Blotting.

Legende: Angegebene Werte: Temperatur, Dauer und Konzentration des angewandten IPTG der Induktion; Kontrollen: Fehlende Zugabe von IPTG; Marker: Kaleidoskop-Marker.

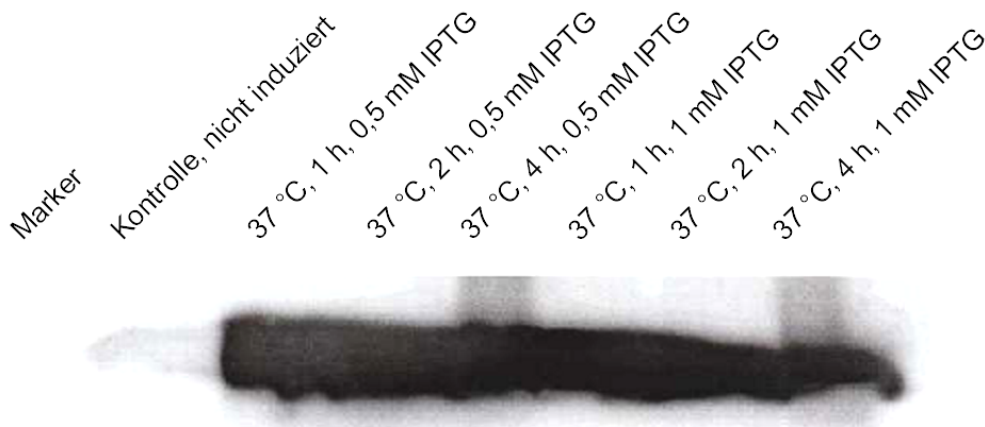


Abb. 13: Expression von Claudin-2 als „Einzelloopkonstrukt“ im Vorversuch zur Ermittlung der optimalen Bedingungen. Western Blotting.

Legende: Angegebene Werte: Temperatur, Dauer und Konzentration des angewandten IPTG der Induktion; Kontrollen: Fehlende Zugabe von IPTG; Marker: Kaleidoskop-Marker.

Nun erfolgte die Proteinexpression der genannten Konstrukte unter den entsprechenden Bedingungen in einem größeren Volumen, das Ergebnis wurde wiederum mittels Elektrophorese, Coomassie-Blau-Färbung und Western Blotting dargestellt. (Abb. 14 – 16).

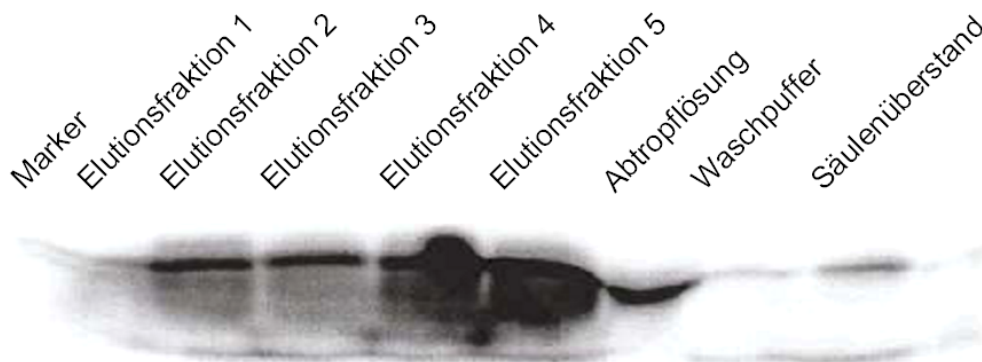


Abb. 14: Expression von Claudin-1 als „Einzelloopkonstrukt“ unter den optimalen Bedingungen: 37 °C, 1 mM IPTG, 4 h. Western Blotting.

Legende: Elutionsfraktion: Lysepuffer nach Passage der Säule, 8 Fraktionen zu je 800 µl; Abtropflösung: 1. Passage der Säule, Puffer-Ni-Agarose-Gemisch; Waschpuffer: Waschpuffer nach Passage der Säule; Säulenüberstand: Nach Beendigung der Elution Gabe von Lysepuffer auf die verschlossene Säule, Probe davon; Marker: Kaleidoskop-Marker. Zusammensetzung aller Puffer siehe „Puffer und Lösungen“.

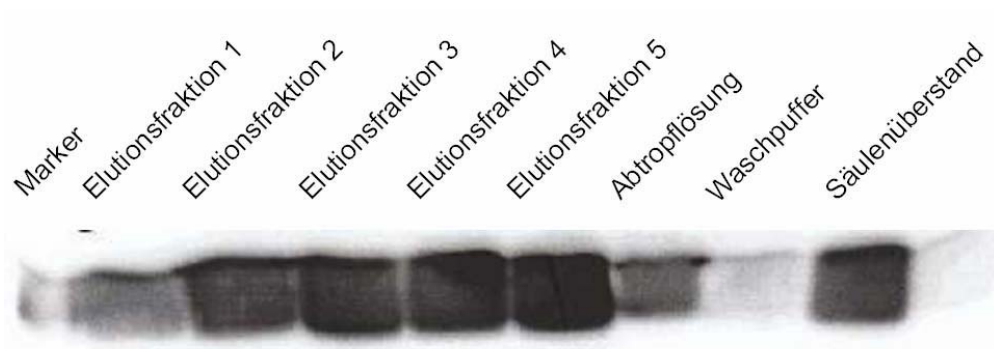


Abb. 15: Expression von Claudin-2 als „Einzelloopkonstrukt“ unter den optimalen Bedingungen: 37°C, 1 mM IPTG, 2 h. Western Blotting.

Legende: Siehe Abb. 14.

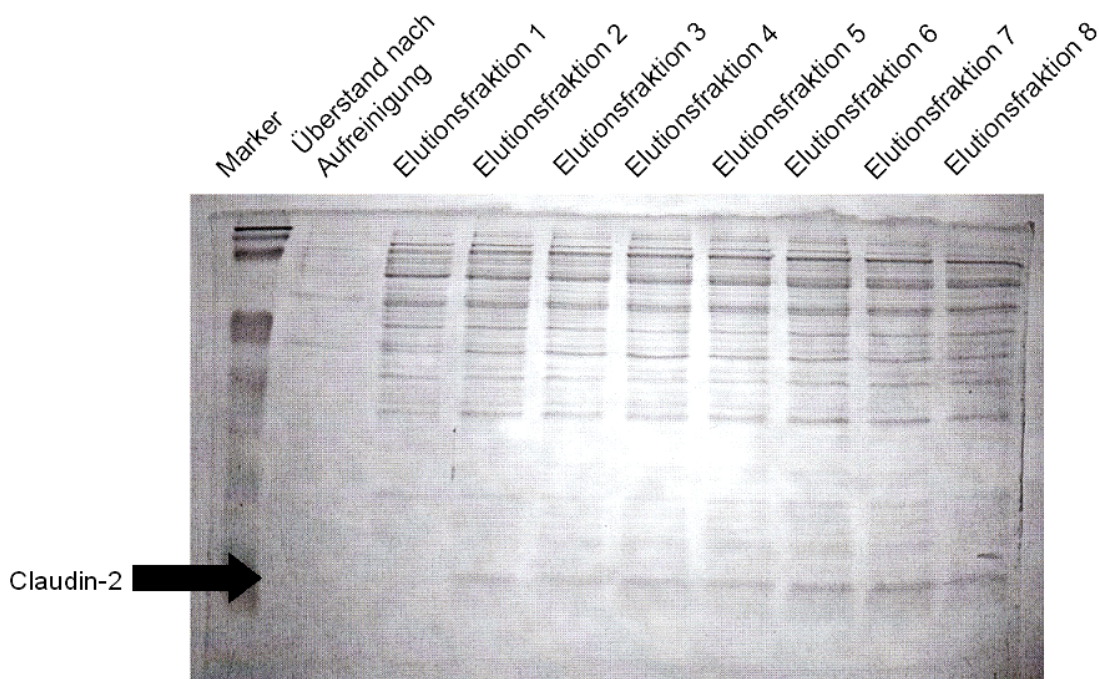


Abb. 16: Expression von Claudin-2 als „Einzelloopkonstrukt“. Coomassie-Blau-Färbung (exemplarisch). Legende siehe Abb. 14; Überstand nach Aufreinigung = Säulenüberstand.

Hierbei war die Bildung des Proteins erkennbar. Es lag jedoch nur in geringer Menge in der Elutionsfraktion vor. Stattdessen befand sich der Großteil nach dem Lysieren der Zellen in der unlöslichen Fraktion im Pellet.

### 3.6. Solubilisierung der Claudine

Um festzustellen, ob das Protein in sogenannten „inclusion bodies“ vorlag, wurde das Pellet in Lysepuffer aufgenommen und auf Eis ultraschallbehandelt. Im positiven Falle wäre es so daraus freigesetzt worden. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation und Coomassie-Blau-Färbung von Pellet und Überstand (Abb. 17).

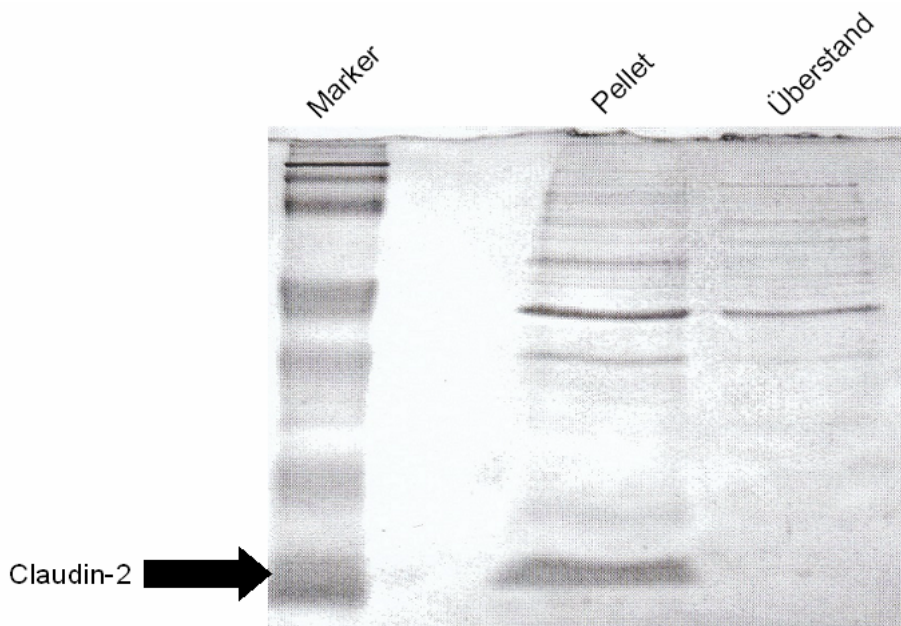


Abb. 17: „Einzelloopkonstrukt“ von Claudin-2, Auftrag von Pellet und Überstand nach Ultraschallbehandlung. Coomassie-Blau-Färbung.

Legende: Pellet und Überstand von abschliessender Zentrifugation nach Ultraschallbehandlung; Marker: Kaleidoskop-Marker.

Hierbei zeigte sich, dass das Protein wiederum in ungelöster Form vorlag und somit nicht in inclusion bodies eingeschlossen gewesen war.

Nun wurde das Protein nach der Expression durch Aufnahme in einen Puffer mit 4 M Urea denaturiert, das Ergebnis wurde mittels Western Blotting dargestellt (Abb. 18).

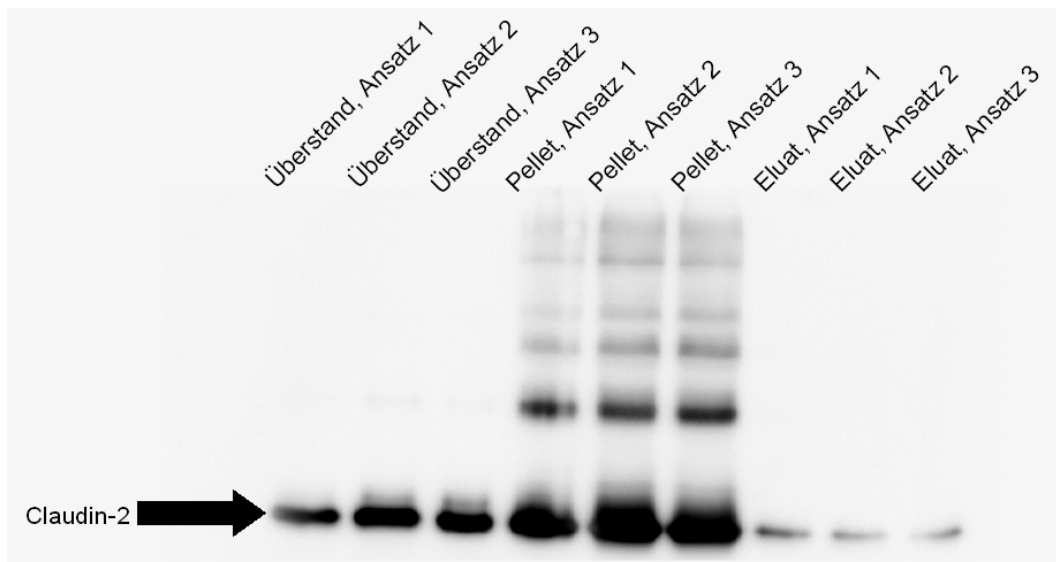


Abb. 18: Pellet nach Aufbrechen der Zellen in Urea-Puffer.

Legende: Überstand und Pellet: Exprimiertes Protein nach Aufbrechen der Zellen und Zentrifugation- Aufnahme des Pellets in Urea-Puffer-Zentrifugation, Pellet in Lysepuffer; Eluat: Überstand nach Aufbrechen der Zellen; Ansatz 1-3: Gleiche Ansätze zum Ausschluss von Verfahrensfehlern zu einem späteren Zeitpunkt des Experimentes.

Nach Aufnahme in den Urea-Puffer befand sich ein Teil des Proteins in Lösung, fiel jedoch nach Reduktion des Urea-Anteils im Puffer wieder aus.

In einer Variante des initial angewandten Expressionsprotokolls wurde eine größere Menge Claudin-1 exprimierender Bakterien – angeimpft wurden 400 statt 200 ml Nährmedium – bis zu einer OD von 1,1 wachsen lassen und dann mit nur 0,5 statt 1 mM IPTG induziert. Die Produktion erfolgte über 12 h bei 20 °C, dann wurde die Lösung in gewohnter Weise verarbeitet (Western Blotting und Coomassie-Blau-Färbung siehe Abb. 19 und 20).

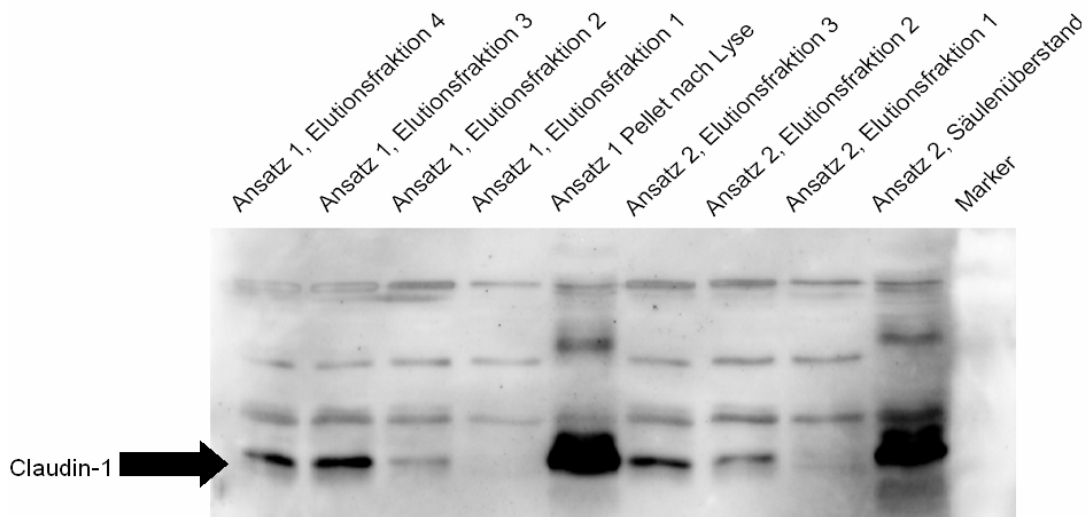


Abb. 19: Expression von Claudin-1 als „Einzelloopkonstrukt“. Western Blotting Nachweis der Expression über Nacht.

Legende: Siehe Abb. 14; Pellet nach Lyse: Auftragen des Zwischenschrittes: Nach Aufbrechen der Zellen Zentrifugation- Pellet in Lysepuffer.

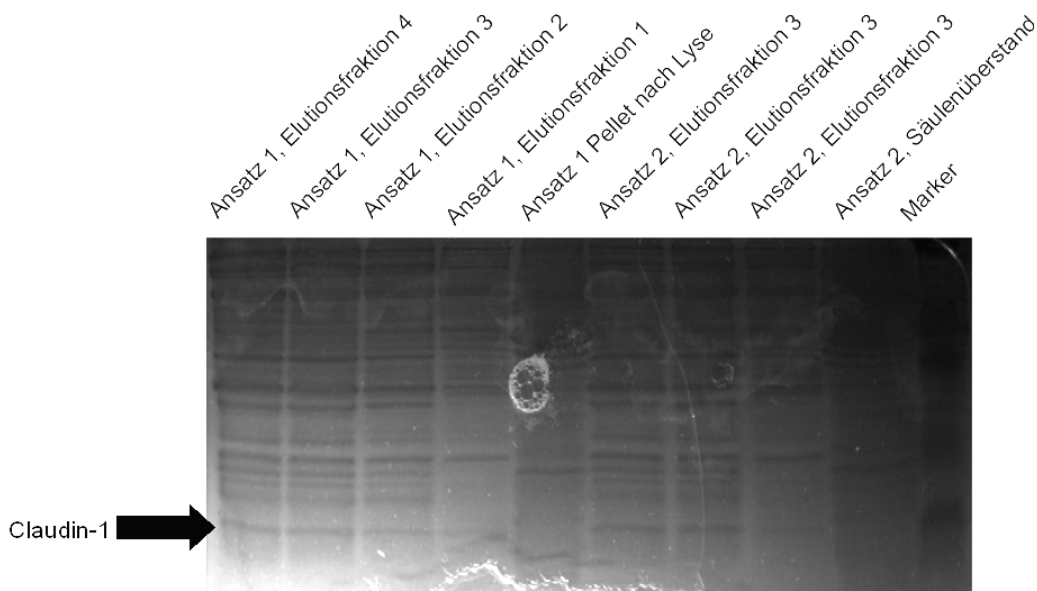


Abb. 20: Expression von Claudin-1 als „Einzelloopkonstrukt“. Coomassie-Blau-Färbung. Expression über Nacht.

Legende: Siehe Abb. 14 und Abb. 19.



Hierbei zeigten sich im Western Blotting mehrere unspezifische Banden bei weiterhin deutlichen Verunreinigungen im Coomassie Gel.

### **3.7. Aufreinigung und Konzentrieren der Claudine**

Um die Verunreinigungen zu reduzieren wurde unter stringenteren Bedingungen aufgereinigt. Hierzu wurde die Ni-NTA-Agarose vor der Verwendung mit dem Lysepuffer gewaschen und schließlich darin aufgenommen, die Probe dann in gewohnter Weise mit der Agarose versetzt und auf die Säulen aufgetragen. Die Säulen wurden mit Waschpuffer aufsteigender Imidazol-Konzentration gewaschen:

#### Waschschritte:

5x 20 mM Imidazol (W1)

5x 25 mM Imidazol (W2)

4x 30 mM Imidazol (W3)

3x 35 mM Imidazol (W4).

Dann wurde das Protein mit dem gewohnten Elutionspuffer aus dem Filter gelöst und in 8 Fraktionen zu je 500 µl aufgefangen (Abb. 21).

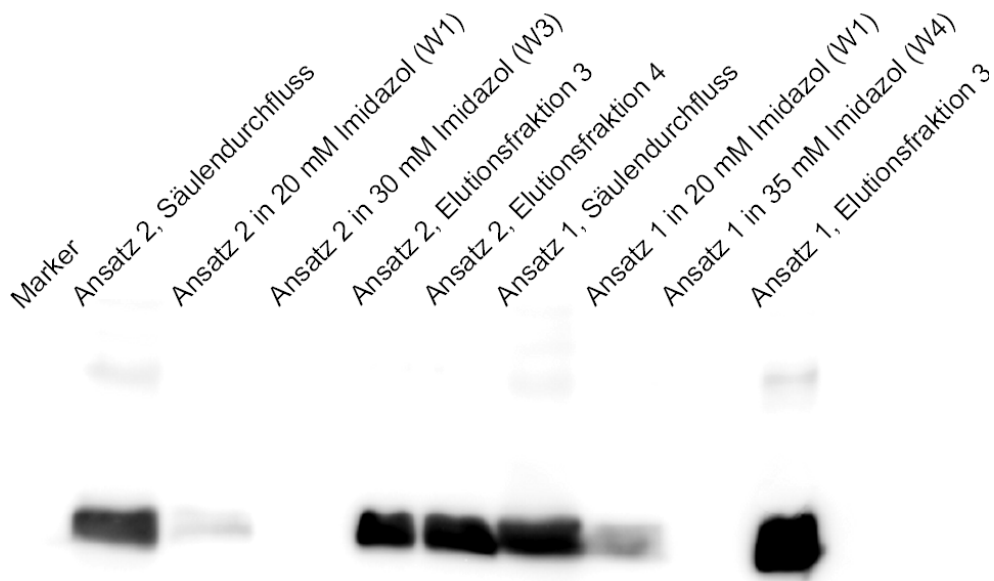


Abb. 21: Claudin-1. Western Blotting nach Expression und Aufreinigung mit stringenten Waschbedingungen.

Legende: Siehe Abb. 14; Ansatz 1 und 2: Zwei Aufreinigungssäulen gleichen Typs, gleich verarbeitet.

Das Protein lag im Eluat vor, die verbleibenden Verunreinigungen waren jedoch weiterhin zu groß, um eine Analyse mittels Oberflächen-Plasmonenresonanz zu erlauben.

Nun wurde die Probe mittels Centricon-Größenfiltern mit einem Grenzwert von 30 kDa aufgereinigt (Abb. 22).

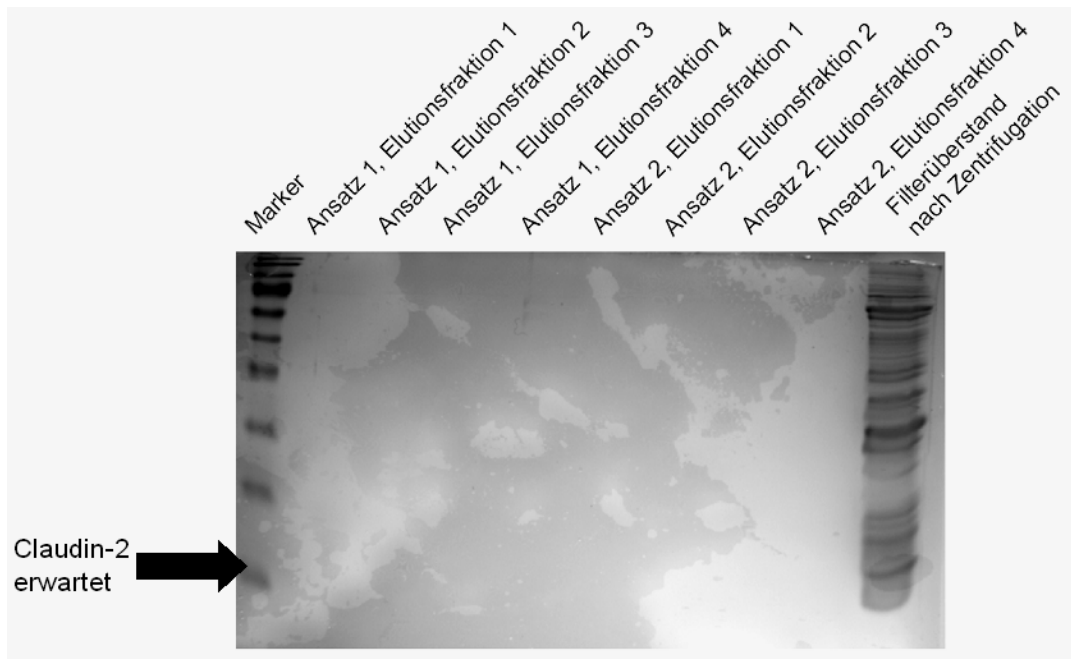


Abb. 22: Claudin-2 als Einzelloopkonstrukt in pQE 31, Aufreinigung über Größenfilter. Coomassie-Blau-Färbung. Konzentration der Proben etwa  $0,03 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $50 \mu\text{l}$  aufgetragen.

Legende: Siehe Abb. 14; Filterüberstand: Überstand des  $30 \text{ kDa}$ -cut-off-Größenfilters; Ansatz 1 und 2: Zwei Aufreinigungssäulen gleichen Typs, gleich verarbeitet.

Hier wurden keine Verunreinigungen mehr gesehen, jedoch war auch die Probe sehr gering konzentriert, weshalb sie im Anschluss über Filter mit einem Grenzwert von  $3 \text{ kDa}$  konzentriert wurde (Abb. 23 und 24).

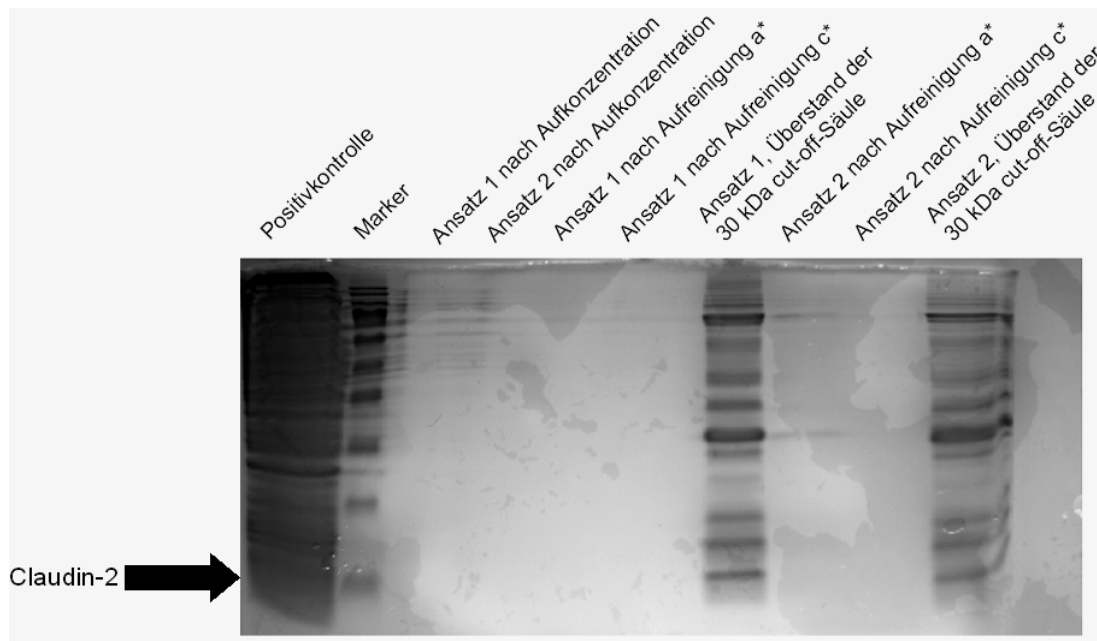


Abb. 23: Claudin-2 als Einzelloopkonstrukt, aufgereinigt und eingengt über Größenfilter. Coomassie-Blau-Färbung.

Legende: Ansatz 1 und 2: Gleicher und gleich verarbeiteter Klon zum Ausschluss von Verfahrensfehlern; \*: Fraktionen: a=1, c=3; Ansatz nach Aufkonzentration: Überstand des Größenfilters cut-off 3 kDa nach Zentrifugation, Ansatz nach Aufreinigung: Lösung nach Passage des 30 kDa-cut-off-Größenfilters; Positivkontrolle: Über Ni-NTA Säulen gereinigtes Protein nach Expression wie oben beschrieben; Marker: Kaleidoskop-Marker.

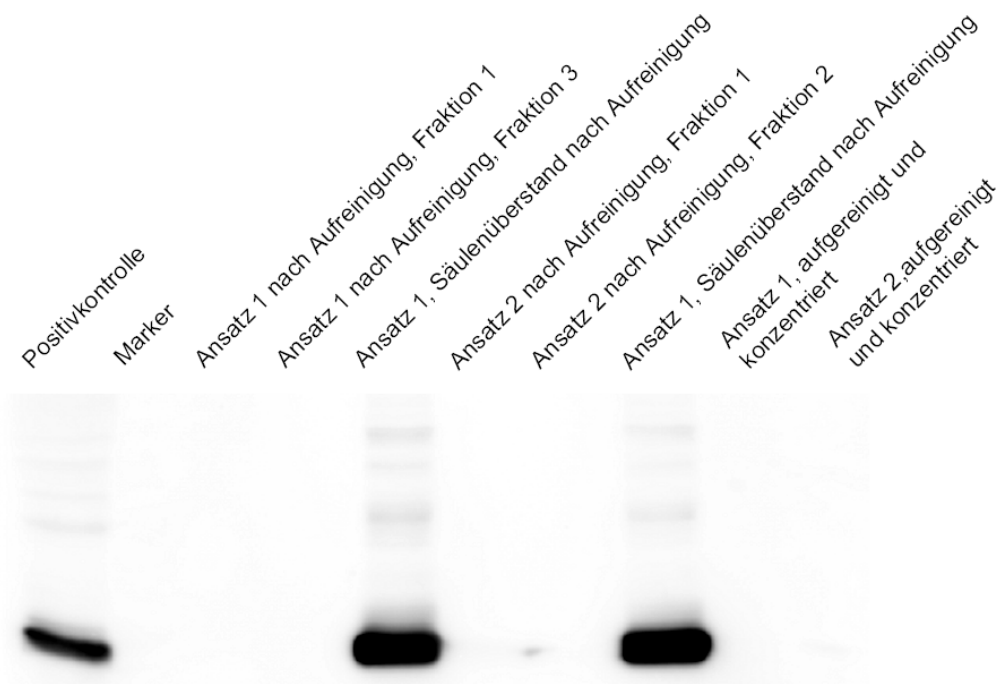


Abb. 24: Claudin-2 als Einzelloopkonstrukt, aufgereinigt und eingengt über Größenfilter. Western-Blotting.

Legende: Siehe Abb. 23; Säulenüberstand nach Aufreinigung: Überstand des 30 kDa cut-off-Größenfilters nach Zentrifugation; aufgereinigt und konzentriert: Lösung nach Passage des 30 kDa-cut-off-Größenfilters, die den 3 kDa cut-off-Größenfilter in Zentrifugation nicht passierte.

Nach Aufreinigung und Einengung der Probe über die Größenfilter war diese für die Interaktionsanalysen zu gering konzentriert. Verunreinigungen waren nicht mehr nachweisbar.

Die Western-Blotting-Analyse des Anteils der Probe, die den 30 kDa Filter nicht passiert hatte, zeigte viele Bindungen des Antikörpers in höheren Größenfraktionen.

## **4. Diskussion**

Claudine sind 20-36 kDa große Tight Junction-Proteine mit vier Transmembrandomänen und zwei extrazellulären Loops (Gonzalez-Mariscal et al., 2003). Sie bedingen durch geladene Aminosäuren in den extrazellulären Loops Permeabilitätseigenschaften von Tight Junctions (Colegio et al., 2002; Colegio et al., 2003). Vermutlich gibt es spezifische Interaktionsmuster verschiedener Claudine, die bestimmte funktionelle Eigenschaften zur Folge haben (Furuse et al., 1999).

Claudin-1 wird vor allem in dichten Epithelverbänden exprimiert. Es trägt dort zu wesentlich zur Aufrechterhaltung der dichten Barriere bei. Claudin-2 kommt in lecken Epithelien vor (Reyes et al., 2002). Es bildet paracelluläre, kationenspezifische Poren (Amasheh et al., 2002). Claudin-5 bildet Tight Junction Stränge in Endothelzellen (Morita et al., 1999 und 2003, Kiuchi-Saishin et al., 2002). Zusätzliche Expression von Claudin-5 kann in Abhängigkeit zur vorbestehenden Leitfähigkeit eines Zellverbandes den transepithelialen Widerstand erhöhen oder ohne Wirkung bleiben.

In dieser Arbeit wurden biophysikalische Eigenschaften der Claudin-Familie untersucht: Extrazelluläre Domänen von Claudin-1 und -2 wurden in einem prokaryontischen Expressionssystem exprimiert, Claudin-5 wurde in einem eukaryontischen Expressionssystem exprimiert und funktionell analysiert.

### **4.1. Expression von Claudin-5**

Claudin-5 hat unterschiedliche Wirkungen auf die Durchlässigkeit verschiedener Epithelien. So führt beispielsweise die stabile Transfektion von CaCo-2 Zellen - Zellen einer humanen Kolon-Karzinom-Zelllinie, die einen geringen transepithelialen Widerstand aufweisen - mit Claudin-5 zu einer signifikanten Erhöhung des Widerstandes (Amasheh et al., 2005). Ähnliches gilt für MDCK-II-Zellen: Die Synthese von Claudin-5 erhöht den transepithelialen Widerstand. (Wen et al., 2004). In Hirnkappillarendothelzellen von Schweinen sinkt gleichzeitig mit einer Reduktion des transepithelialen Widerstandes durch die Zugabe von Serumfaktoren (LPA und VEGF) auch die Expression von Claudin-5 (Nitz et al., 2003). Analog dazu ist die Blut-Hirn-Schranke Claudin-5 defizienter Mäuse durchlässiger für Proteine < 800 Da gegenüber der von Kontrolltieren; für größere Proteine bleibt sie unbeeinträchtigt (Nitta et al., 2003). Diese Studien legen nahe, dass die zusätzliche Expression von Claudin-5 den transepithelialen Widerstand durchlässiger Gewebe erhöht. Die Transfektion von MDCK-C7-Zellen, einer Zelllinie, die einen hohen transepithelialen Widerstand aufweist, mit Claudin-5

ändert nichts an deren Leitfähigkeitseigenschaften (Amasheh et al., 2005). Zusätzliche Expression von Claudin-5 scheint also, unter anderem in Zusammenhang mit der vorbestehenden parazellulären Permeabilität eines Zellverbandes, den transepithelialen Widerstand zu erhöhen oder keinen Einfluss zu haben.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die stabile Transfektion von MDCK-C11 Zellen mit Claudin-5-cDNA den transepithelialen Widerstand dieser Gewebe verändert. Gewebe, die von MDCK-C11 Zellen gebildet werden, ähneln einem lecken Epithel. Der von ihnen aufgebaute transepitheliale Widerstand ist gering. Nach stabiler Transfektion der MDCK-C11 Zellen mit Claudin-5-cDNA zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Transmembranwiderstände der transfizierten- zu den nicht- oder mit dem leeren Vektor transfizierten Zellen. Die Expressionsmuster der anderen Claudine und Occludin unterschied sich zwischen den Zellen nicht, unter anderem exprimierten MDCK-C7 und -C11 Zellen wie oben gezeigt in gleichem Maße Claudin-2. Wie bereits erwähnt, erhöht die Expression von Claudin-5 den transepithelialen Widerstand in Caco-2 Zellen, einer humanen Kolon-Karzinom-Zelllinie, die sonst einen geringen transepithelialen Widerstand aufweist. In der hier vorliegenden Arbeit konnte ein solcher Effekt für MDCK-C11 Zellen, die ebenfalls einen geringen transepithelialen Widerstand aufweisen, nicht gezeigt werden, sie wiesen nach stabiler Transfektion mit Claudin-5-cDNA keine signifikante Änderung desselben auf. In ihren funktionellen Eigenschaften sind MDCK-C11 Zellen den Caco-2 Zellen sehr ähnlich. Die Analyse der Zusammensetzung der anderen Transmembranproteine der beiden Zelllinien zeigt Unterschiede in der Expression von Claudin-1 und Claudin-2: Beide werden in MDCK-C11 Zellen in hohem Maße exprimiert, in Caco-2 Zellen ist die Expression jedoch nur gering (Claudin-1) oder nicht nachweisbar (Claudin-2). Von Claudin-1 ist bekannt, dass es den transepithelialen Widerstand von Epithelien erhöht (Furuse et al., 2002). Claudin-2 bildet kationenselektive Poren und senkt so den transepithelialen Widerstand (Amasheh et al., 2002). Claudin-5 kann den transepithelialen Widerstand erhöhen, indem es die Permeabilität der Tight Junction für Kationen selektiv reduziert (Wen et al., 2004). Das Vorhandensein von Claudin-2 in MDCK-C11 Zellen und somit das Vorhandensein kationenselektiver Poren, die den Effekt der Claudin-5-vermittelten Beschränkung der Kationenpermeabilität aufheben, ist ein möglicher Erklärungsansatz für das Ausbleiben des erwarteten Effektes

Um dies zu belegen, wäre in weiterführenden Studien beispielsweise eine stabile Transfektion von Caco-2 Zellen mit Claudin-2 und -5-cDNA und eine anschließende elektrophysiologische Analyse denkbar. Darüber hinaus könnte die zum Zeitpunkt der Durchführung der in dieser Arbeit präsentierten Experimente noch nicht verfügbare Zweiwege-Impedanz-Spektroskopie

eine genauere Analyse ermöglichen: Sie dient der hochauflösenden Bestimmung von parazellulärem und transzellulärem Widerstand in epithelialen konfluenten Zellkulturen. Eine spezifische Perturbation einer der beiden Wege ermöglicht bei dieser Technik die Erfassung zweier Datensätze, die zusammen mit der Permeabilitätsmessung für einen geeigneten parazellulären Marker eine Berechnung der Widerstandswerte der beiden Wege ermöglicht (Reiter et al., 2006).

#### **4.2. Expression von Claudin-1 und Claudin-2**

Claudine tragen durch Bildung einer dichten Barriere oder durch Bildung selektiver Poren einen großen Anteil an den funktionellen Barriereigenschaften eines Gewebes. (Reyes et al., 2002). Diese Eigenschaften werden durch Ladungen der extrazellulären Schleifen vermittelt (Colegio et al., 2002; Colegio et al., 2003). So ist die selektive Claudin-5-vermittelte Reduktion der Kationen-Permeabilität über die Tight Junction durch zwei Cysteine im ersten extrazellulären Loop des Claudins bedingt (Wen et al., 2004). Einige Claudine weisen eine hohe Affinität auf. So zeigt unter anderem Claudin-5 eine direkte Selbst-Assoziation. Der Mechanismus dieser Assoziation ist noch unbekannt (Blasig et al., 2006). Um extrazelluläre Wechselwirkungen von Claudinen funktionell näher zu analysieren sollte in dieser Arbeit zunächst Claudin-1 und -2 exprimiert und für Interaktionsanalysen mittels Oberflächen-Plasmonenresonanzuntersuchungen aufgereinigt werden.

Claudin-1 und -2 wurden in einem prokaryontischen System exprimiert. Die Zellen wurden nach Induktion der Proteinexpression unter verschiedenen Bedingungen inkubiert. Hierbei zeigte sich keine Induktion der Proteinbildung. Eine Adhäsion an größere Proteine wie auch eine Adhäsion aneinander mit Erscheinen der Claudine in einer größeren Bande ist bei fehlender Induktion von Proteinbanden in anderen Größenfraktionen ebenfalls unwahrscheinlich. Denkbar wäre ein toxischer Effekt des gebildeten Claudins auf die bildenden Bakterien, was zu einer Selbstlimitierung der Konzentration geführt haben würde.

Es wurde nun ein Konstrukt hergestellt, welches nur aus den Extrazellulärdomänen, verbunden durch einen Platzhalter, bestand. Dieses Konstrukt enthielt weder Intrazellulär- noch Transmembrandomänen. Hier zeigte sich eine Induktion mit Bildung des Proteins. Dieses lag jedoch nicht wie erwartet in Lösung, sondern zum Grossteil in unlöslicher Form vor. Ein häufiger Grund hierfür ist ein Einschluss des Proteins in sogenannte inclusion bodies – von der Zelle gebildete, abgeschlossene Vesikel. Dies war hier jedoch nicht der Fall, eine Präparation mittels Ultraschall zeigte keine Solubilisierung des Proteines. Weitere Gründe für eine Unlös-



lichkeit der Proteine wären Hydrophobie, ein unausgeglichenes Verhältnis von Arginin zu Lysin beziehungsweise von Glutamat zu Aspartat oder zu viele Cysteine mit Bildung von Disulfidbrücken innerhalb des Proteins. Diese Ursachen konnten ausgeschlossen werden: Beide Claudine sind hydrophil, die Verhältnisse von Arginin zu Lysin beziehungsweise von Glutamat zu Aspartat sind ausgeglichen und beide enthalten je drei Cysteine.

Wiederholte Western Blot-Analysen wiesen das Claudin in mehreren höheren Banden nach. Dies kann bedeuten, dass mehrere Claudine miteinander interagieren und ein unlösliches Polymer bilden, oder dass sie an andere Proteine binden. Diese Vermutung konnte durch Zentrifugation durch Größenfilter bestätigt werden: Die Claudine in der hier exprimierten kürzeren Variante haben eine Größe von etwa 11 kDa. Sie passierten dennoch einen Filter, der nur über 30 kDa große Proteine an der Passage hinderte, nicht. Dies legt die Vermutung einer hohen Adhäsion mit Bildung der oben erwähnten unlöslichen Polymere nahe. Eine Fehlerquelle wäre eine unspezifische Bindung der zur Western-Blot-Analyse genutzten Antikörper mit dem scheinbaren Nachweis des Claudins in den höheren Banden. Denaturierung der Proteine durch Zugabe von Urea wies die Proteine jedoch in der erwarteten Bande auf, in höheren Banden fanden sich nun keine Signale mehr. Das macht eine unspezifische Antikörperbindung im Nachweis sehr unwahrscheinlich.

Die in dieser Arbeit untersuchten extrazellulären Loops weisen demnach eine sehr hohe Adhäsion auf. Die Unterscheidung, ob die Polymere durch Bindung mehrerer Claudine miteinander oder durch Bindung an andere Proteine entstehen, kann nicht sicher getroffen werden. Für Charakterisierungen der funktionellen Eigenschaften des Proteins in Zukunft wäre die Herstellung kürzerer Segmente, beispielsweise von einzelnen extrazellulären Loops denkbar. Dies kann zum einen die Löslichkeitseigenschaften des Proteins verbessern, zum anderen erlaubt es die Unterscheidung der Eigenschaften der beiden extrazellulären Loops bezüglich der Adhäsion an andere Proteine.

## 5. Zusammenfassung

Epithelien bilden eine Barriere und dienen dem Stofftransport zwischen dem Interstitium des Körpers und der Außenwelt. Die Zellen sind unter anderem durch Tight Junctions miteinander verbunden. Die für die Transport- und Barriereigenschaften wichtigsten Proteine darin sind die Claudine, eine Familie integraler Transmembranproteine mit zwei extrazellulären Domänen. Eigenschaften des Epithels werden durch Ladungen ihrer extrazellulären Schleifen vermittelt

In der vorliegenden Arbeit sollten die funktionellen Eigenschaften von Claudin-5 näher charakterisiert werden. Dazu wurde untersucht, ob und wie sich die Durchlässigkeit von MDCK-C11 Zellen nach stabiler Transfektion mit Claudin-5-cDNA verändert. Darüber hinaus wurden Konstrukte der Claudine-1 und -2 für weiterführende Interaktionsanalysen hergestellt, in prokaryontischen Expressionssystemen exprimiert und aufgereinigt. Es sollte geklärt werden, ob diese für Analysen mittels Oberflächen-Plasmonenresonanz (Biacore)- Experimenten geeignet waren.

Claudin-5 bildet Tight Junction-Stränge in Endothelzellen. Zusätzliche Expression von Claudin-5 kann je nach endogenem Claudin-Expressionmuster den transepithelialen Widerstand erhöhen oder unverändert lassen. In dieser Arbeit wurde es in einen eukaryontischen Expressionsvektor kloniert und in MDCK-C11 Zellen transfiziert. Der transepitheliale Widerstand der transfizierten MDCK-C11 Zellen wurde manuell und in Ussing Kammern gemessen und mit dem von Zellen desselben Klons, welche mit dem leeren Vektor transfiziert worden waren, verglichen. Der transepitheliale Widerstand der Zellen änderte sich nach stabiler Transfektion mit Claudin-5 cDNA in dieser Arbeit nicht. Caco-2-Zellen ähneln in ihren funktionellen Eigenschaften den MDCK-C11 Zellen sehr. Expression von Claudin-5 erhöht den transepithelialen Widerstand in diesen Zellen. Dies könnte durch die unterschiedliche Expression von Claudin-2 bedingt sein: Es wird in MDCK-C11 Zellen in hohem Maße synthetisiert, in Caco-2 Zellen nicht. Claudin-2 senkt den transepithelialen Widerstand durch Bildung kationenselektiver Poren. Claudin-5 kann ihn erhöhen, indem es die Permeabilität für Kationen selektiv reduziert. Somit könnte Claudin-2 durch Bildung kationenselektiver Poren die Claudin-5 vermittelte Beschränkung der Kationenpermeabilität aufheben. Dies ist ein möglicher Erklärungsansatz für das Ausbleiben des erwarteten Effektes in den MDCK-C11 Zellen.

In weiterführenden Studien könnte dies beispielsweise durch stabile Transfektion von Caco-2-Zellen mit Claudin-2 und -5-cDNA und eine anschließende elektrophysiologische Analyse belegt werden.

Claudin-1 wird vor allem in dichten Epithelverbänden exprimiert und ist wichtig für das Aufrechterhalten eines hohen transepithelialen Widerstandes. Claudin-2 kommt in lecken Epithelien vor und bildet parazelluläre, kationenspezifische Poren. Claudin-1 und -2 wurden in einem prokaryontischen Expressionssystem als Protein exprimiert. Zudem wurden 11 kDa große Konstrukte von Claudin-1 und -2 hergestellt, die nur die extrazellulären Schleifen und einen Platzhalter enthielten. Sie wurden unter Anwendung verschiedener Bedingungen in einem prokaryontischen System zur Proteinexpression gebracht und aufgereinigt. In der Western Blot-Analyse wurden die Claudine wiederholt in mehreren höheren Banden nachgewiesen. Sie passierten zudem einen gröÙenselektiven Filter, der nur Proteine  $> 30$  kDa an der Passage hinderte, nicht. Denaturierung der Proteine durch Zugabe von Urea wies die Proteine ausschliesslich in der erwarteten Bande auf.

Die in dieser Arbeit untersuchten extrazellulären Loops weisen demnach eine sehr hohe Adhäsion auf. Die Unterscheidung, ob die Polymere durch Bindung mehrerer Claudine miteinander oder durch Bindung an andere Proteine entstehen, kann nicht sicher getroffen werden.

Für zukünftige Charakterisierungen der funktionellen Eigenschaften des Proteins, insbesondere für Interaktionsanalysen mittels Oberflächen Plasmonenresonanz, wäre die Herstellung kürzerer Segmente, beispielsweise einzelner extrazellulärer Loops denkbar.

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung von Claudin, Occludin und Tricellulin (nach Ikenouchi et al., 2005).

Abb. 2: Western Blot-Nachweis von Claudin-1, -2 und -3 sowie von Occludin in MDCK-C7 bzw.-C11-Zellen.

Abb. 3: Western Blot-Nachweis von Claudin-5 in mit Claudin-5 bzw. leerem Vektor transfizierten MDCK-7- und C11-Zellen.

Abb. 4: Immunfluoreszenzfärbung von MDCK-C11-5.2 vs. mock-transfizierter Zellen (C11) mit mAnti-Flag-Antikörper.

Abb. 5: Widerstände der mit Claudin-5-pFLAG-CMV4-Vektor transfizierten MDCK-C11 Zellen versus Kontrollen (jew. N = 9, n.s.).

Abb. 6: Expression von Claudin-1 mit His-Tag, Vorversuch zur Ermittlung der optimalen Bedingungen. Coomassie-Blau-Färbung.

Abb. 7: Expression von Claudin-1 mit His-Tag, Vorversuch zur Ermittlung der optimalen Bedingungen. Coomassie-Blau-Färbung.

Abb. 8: Expression von Claudin-2 mit His-Tag, Vorversuch zur Ermittlung der optimalen Bedingungen. Coomassie-Blau-Färbung.

Abb. 9: Expression von Claudin-2 mit His-Tag, Vorversuch zur Ermittlung der optimalen Bedingungen. Coomassie-Blau-Färbung.

Abb. 10: Expression von Claudin-1 als „Einzelloopkonstrukt“ bei 37 °C, Vorversuch zur Ermittlung der optimalen Bedingungen. Coomassie-Blau-Färbung.

Abb. 11: Expression von Claudin-2 als „Einzelloopkonstrukt“ bei 37 °C, Vorversuch zur Ermittlung der optimalen Bedingungen. Coomassie-Blau-Färbung.

Abb. 12: Expression von Claudin-1 als „Einzelloopkonstrukt“ im Vorversuch zur Ermittlung der optimalen Bedingungen. Western Blotting.

Abb. 13: Expression von Claudin-2 als „Einzelloopkonstrukt“ im Vorversuch zur Ermittlung der optimalen Bedingungen. Western Blotting.

Abb. 14: Expression von Claudin-1 als „Einzelloopkonstrukt“ unter den optimalen Bedingungen: 37 °C, 1 mM IPTG, 4 h. Western Blotting.

Abb. 15: Expression von Claudin-2 als „Einzelloopkonstrukt“ unter den optimalen Bedingungen: 37 °C, 1 mM IPTG, 2 h. Western Blotting.

Abb. 16: Expression von Claudin-2 als „Einzelloopkonstrukt“. Coomassie-Blau-Färbung (exemplarisch).

Abb. 17: „Einzelloopkonstrukt“ von Claudin-2, Auftrag von Pellet und Überstand nach Ultraschallbehandlung. Coomassie-Blau-Färbung.

Abb. 18: Pellet nach Aufbrechen der Zellen in Urea-Puffer.

Abb. 19: Expression von Claudin-1 als „Einzelloopkonstrukt“. Western Blotting Nachweis der Expression über Nacht.

Abb. 20: Expression von Claudin-1 als „Einzelloopkonstrukt“. Coomassie-Blau-Färbung. Expression über Nacht.

Abb. 21: Claudin-1. Western Blotting nach Expression und Aufreinigung mit stringenten Waschbedingungen.

Abb. 22: Claudin-2 als Einzelloopkonstrukt in pQE 31, Aufreinigung über Größenfilter. Coomassie-Blau-Färbung. Konzentration der Proben etwa 0,03  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{l}$  aufgetragen.

Abb. 23: Claudin-2 als Einzelloopkonstrukt, aufgereinigt und eingeeengt über Größenfilter. Coomassie-Blau-Färbung.

Abb. 24: Claudin-2 als Einzelloopkonstrukt, aufgereinigt und eingeeengt über Größenfilter. Western-Blotting.

## 7. Literaturverzeichnis

Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schöneberg 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: 4969-76.

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.

Ando-Akatsuka Y, Saitou M, Hirase T, Kishi M, Sakakibara A, Itoh M, Yonemura S, Furuse M, Tsukita S (1996). Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. *J Cell Biol.* 133: 43-7.

Balda MS, Whitney JA, Flores C, González S, Cereijido M, Matter K (1996). Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol.* 134: 1031-49.

Blasig IE, Winkler L, Lassowski B, Müller SL, Zuleger N, Krause E, Krause G, Gast K, Kolbe M, Piontek J (2006). On the self-association potential of transmembrane tight junction proteins. *Cell Mol Life Sci.* 63: 505-14.

Chen Y, Merzdorf C, Paul DL, Goodenough DA (1997). COOH terminus of occludin is required for tight junction barrier function in early *Xenopus* embryos. *J Cell Biol.* 138: 891-9.

Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, Rahner C, Anderson JM (2002). Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283: C142-7.

Colegio OR, Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM (2003). Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *Am J Physiol Cell Physiol.* 284: C1346-54.

Enck AH, Berger UV, Yu AS (2001). Claudin-2 is selectively expressed in proximal nephron in mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 281: F966-74.

Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84: 7413-17.

Florian P, Amasheh S, Lessidrensky M, Todt I, Blödown 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.

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: 1777-88.

Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S (1998a). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol.* 141: 1539-50.

Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S (1998b). 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: 263-72.

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: 1099-111.



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: 157-62.

Gonzalez-Mariscal L, Avila-Flores A, Betanzos A (2001). The relationship between structure and function of tight junctions. In Cerejido M, Anderson JM (Eds). *Tight Junctions* (pp 89-119). Boca Raton.

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

Gumbiner BM (1993). Breaking through the tight junction barrier. *J Cell Biol.* 123: 1631-3.

Gu JM, Lim SO, Park YM, Jung G (2008). A novel splice variant of occludin deleted in exon 9 and its role in cell apoptosis and invasion. *FEBS J.* 275: 3145-56.

Heiskala M, Peterson PA, Yang Y (2001). The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport. *Traffic* 2: 93-8.

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: 939-45.

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: 139-45.

Kausalya PJ, Amasheh S, Günzel D, Wurps H, Müller D, Fromm M, Hunziker W (2006). Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg<sup>2+</sup> transport function of Claudin-16. *J Clin Invest.* 116: 878-91.

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: 875-86.

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: 81-8.

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

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, epub ahead of print

Madin SH, Darby NB Jr (1958). Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc Soc Exp Biol Med.* 98: 574-6.

McCarthy WH, Shaw HM, McCarthy SW, Rivers JK, Thompson JF (1996). Cutaneous melanomas that defy conventional prognostic indicators. *Semin Oncol.* 23: 709-13.

Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S (1999). Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol.* 147: 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: 289-95.

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: 653-60.

Nitz T, Eisenblätter T, Psathaki K, Galla HJ (2003). Serum-derived factors weaken the barrier properties of cultured porcine brain capillary endothelial cells in vitro. *Brain Res.* 981: 30-40.

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: 361-72.

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: 411-22.

Reiter B, Kraft R, Günzel D, Zeissig S, Schulzke JD, Fromm M, Harteneck C (2006). TRPV4-mediated regulation of epithelial permeability. *FASEB J.* 20: 1802-1812.

Reuss, L (1992). Tight junction permeability to ions and water. In Cereijido M. (Ed). *Tight Junctions* (pp. 49-66). London, CRC Press.

Reyes JL, Lamas M, Martin D, del Carmen Namorado M, Islas S, Luna J, Tauc M, González-Mariscal L (2002). The renal segmental distribution of claudins changes with development. *Kidney Int.* 62: 476-87.

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: 4131-42.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-7.

Schneeberger EE, Lynch RD (1992). Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am J Physiol.* 262: L647-61.

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: 34-42.

Sirotkin H, Morrow B, Saint-Jone B, Paech A, Das Gupta R, Pantajali SR, Skoultchi A, Weissman SM, Kucherlapati R (1997). Identification, Characterisation, 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: 245-51

Shprintzen RJ, Goldberg RB, Young D, Walford L (1981). The velo-cardio-facial syndrome: a clinical and genetic analysis. *Pediatrics* 67: 167-72

Shprintzen RJ (2008). Velo-cardio-facial syndrome: 30 Years of study. *Dev Disabil Res Rev.* 14: 3-10.

Stähelin LA (1973). Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J Cell Sci.* 13: 763-86.

Tebbe B, Mankertz J, Schwarz C, Amasheh S, Fromm M, Assaf C, Schultz-Ehrenburg U, Sánchez 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: 14-8.

Tsukita S, Furuse M, Itoh M (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2: 285-93.

Ussing HH, Zerahn K (1999). Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *J Am Soc Nephrol.* 10: 2056-65. (Reprinted from *Acta Physiol Scand.* 23: 110-27, 1951.)

Wang F, Daugherty B, Keise LL, Wei 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.

Wen H, Watry DD, Marcondes MC, Fox HS (2004). Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: role of the first extracellular domain of claudin-5. *Mol Cell Biol.* 24: 8408-17.

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.

## 8. Vorpublikationen in Zusammenhang mit dem Dissertationsthema

### Originalarbeit:

Amasheh S, Schmidt T, Mahn M, Florian P, Mankertz J, 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.

### Abstract:

Claudin-5 is a transmembrane protein reported to be primarily present in tight junctions of endothelia. Unexpectedly, we found expression of claudin-5 in HT-29/B6 cells, an epithelial cell line derived from human colon. Confocal microscopy showed colocalization of claudin-5 with occludin, indicating its presence in the tight junctions. By contrast, claudin-5 was absent in the human colonic cell line Caco-2 and in Madin-Darby canine kidney cells (MDCK subclones C7 and C11), an epithelial cell line derived from the collecting duct. To determine the contribution of claudin-5 to tight junctional permeability in cells of human origin, stable transfection of Caco-2 with FLAG-claudin-5 cDNA was performed. In addition, clone MDCK-C7 was transfected. Synthesis of the exogenous FLAG-claudin-5 was verified by Western blot analysis and confocal fluorescent imaging by employing FLAG-specific antibody. FLAG-claudin-5 was detected in transfected cells in colocalization with occludin, whereas cells transfected with the vector alone did not exhibit specific signals. Resistance measurements and mannitol fluxes after stable transfection with claudin-5 cDNA revealed a marked increase of barrier function in cells of low genuine transepithelial resistance (Caco-2). By contrast, no changes of barrier properties were detected in cells with a high transepithelial resistance (MDCK-C7) after stable transfection with claudin-5 cDNA. We conclude that claudin-5 is present in epithelial cells of colonic origin and that it contributes to some extent to the paracellular seal. Claudin-5 may thus be classified as a tight-junctional protein capable of contributing to the "sealing" of the tight junction.

## **9. Danksagung**

Allem voran möchte ich Herrn Prof. Dr. Michael Fromm für die Überlassung des Themas danken. Ich danke Herrn PD Dr. Salah Amasheh für die Betreuung, für viele Gespräche, ansteckenden Optimismus und unerschöpfliche Geduld. Beiden möchte ich für die Möglichkeit danken, auch nach einiger Abstinenz wieder da zu beginnen, wo ich aufgehört hatte.

Anja Fromm, Friederike Hirsch, Ingrid Lichtenstein, Susanna Schön, Bernd Hillenbrand und Shida Tavalali danke ich für ihre Unterstützung und die Beantwortung der vielen kleinen Fragen zwischendurch, die oft so wichtig für das Gelingen der Experimente waren.

Meinen Eltern und Freunden danke ich für das über Jahre hinweg unverminderte Interesse an Thema und Progress dieser Arbeit. Darüber hinaus gilt meinen Eltern meine Dankbarkeit für einen finanziell und emotional freien Rücken während dieser Zeit. Herrn Steffen W. Krüger danke ich zudem für wiederholtes Erden am Küchentisch.

Trotz allem wäre diese Arbeit ohne die Vermittlung externer Nachhaltigkeit und viel Motivation durch Dr. Thomas Bengner wohl nicht zustande gekommen.

Schlussendlich gilt mein Dank unserer kleinen Tochter Paula, die durch ihre Anwesenheit auf dieser Welt einen Zeitrahmen für das Projekt zugleich eröffnet und abgesteckt hat.

## **10. Lebenslauf**

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

Erklärung an Eides statt.

Berlin, 03.07.2009

Ich, Michaela Mahn, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

„Charakterisierung von Tight Junction-Proteinen mit Hilfe eukaryontischer und prokaryontischer Expressionssysteme“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dargestellt habe.