

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

DISSERTATION

**Generierung eines epithelialen Zellmodells zur funktionellen
Charakterisierung des Tight Junction-Proteins Claudin-16**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Mila Melovski

aus Templin

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. S. Amasheh
 2. Prof. Dr. rer. nat. O. Huber
 3. Prof. Dr. U. Wenzel

Datum der Promotion: 07.09.2012

Für meine Kinder

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Funktion und Aufbau des Epithels	1
1.2 Molekulare Struktur der Tight Junctions	4
1.3 Claudine	8
1.4 Familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalzurie und Nephrokalzinose (FHHNC)	14
1.5 Claudin-16 und seine Bedeutung im Magnesiumhaushalt	18
1.5.1 Claudin-16 und Claudin-19 Interaktion	20
1.5.2 Magnesium (Mg ²⁺)-Transport in der Niere	21
1.6 Ziele dieser Arbeit	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Zellen	23
2.1.1 Verwendete Zelllinien	23
2.1.2 Verwendete Zellkultur	24
2.2 Geräte	24
2.3 Chemikalien	26
2.4 Materialien	30
2.5 Puffer und Lösungen	31
2.6 Molekularbiologie	35
2.6.1 Western Blot	35
2.6.1.1 Membranprotein- Extraktion	35
2.6.1.2 Proteinquantifizierung	36
2.6.1.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
2.6.1.4 Elektrotransfer von Proteinen	38
2.6.1.5 Immundetektion	39
2.6.2 Claudin-16-cDNA	39
2.6.3 Polymerase-Kettenreaktion	40
2.6.3.1 Grundprinzipien der Polymerase-Kettenreaktion	40
2.6.3.2 Colony-PCR	41
2.6.4 Sequenzierung	42
2.6.5 Agarosegel-Elektrophorese	43
2.6.5.1 Herstellung und Durchführung der Agarosegel-Elektrophorese	43
2.6.5.2 Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel	44
2.6.6 Ligation	45
2.6.6.1 Ligation in den pTOPO Vektor	46
2.6.6.2 Ligation in den pFLAG-CMV4 Vektor	46
2.6.7 Transformation und Blau-Weiß-Selektion	48
2.6.7.1 Transformation kompetenter Zellen	48
2.6.7.2 Blau-Weiß-Selektion	48
2.6.8 Herstellung von Glycerolstocks	49
2.6.9 Plasmid-Miniprep	49

2.6.10 Restriktionsverdau mit Bam HI und Eco RV	50
2.6.11 Stabile Transfektion von MDCK-C7-Zellen	51
2.7 Elektrophysiologie	53
2.7.1 Widerstandsmessungen: Ussing-Kammer	53
2.7.2 Widerstandsmessung: Manuelle Methode	54
2.8 Immunfluoreszenz	55
2.9 Statistik	56
3 Ergebnisse	57
3.1 Widerstandsmessungen an den Zelllinien MDCK-C7, MDCK-C11, HT-29/B6, T84, Caco-2	57
3.2 Western Blot	58
3.3 Stabile Transfektion von MDCK-C7 mit pFLAG-CMV4-Claudin-16-cDNA	59
3.3.1 Western Blot nach erfolgter Transfektion	59
3.3.2 Immunfluoreszenz und –lokalisierung von FLAG-Claudin-16	60
3.4 Funktionelle Charakterisierung von Claudin-16	61
3.4.1 Elektrophysiologische Untersuchungen zur funktionellen Analyse	61
3.4.2 Widerstandsmessung	61
4 Diskussion	63
5 Zusammenfassung	67
6 Abkürzungsverzeichnis	68
7 Abbildungsverzeichnis	71
8 Tabellenverzeichnis	72
9 Literaturverzeichnis	73
Danksagung	91
Erklärung	92
Lebenslauf	93
Publikationen	94

1 Einleitung

1.1 Funktion und Aufbau des Epithels

Epithelien sind flächige Zellverbände, welche alle inneren und äußeren Grenzflächen des menschlichen Organismus bilden und so das Interstitium von einer funktionellen Außenseite abgrenzen. Beispiele hierfür sind die Epidermis, das Darmepithel und das renale Tubulusepithel.

Epithelzellen unterscheiden sich von anderen Zellen durch einen spezifischen polaren Aufbau mit einer apikalen und einer basolateralen Membran. Während die apikale Membran an der funktionellen Außenseite lokalisiert und so beispielsweise dem Darmlumen zugewandt ist, befindet sich die basolaterale Membran an der Blutseite.

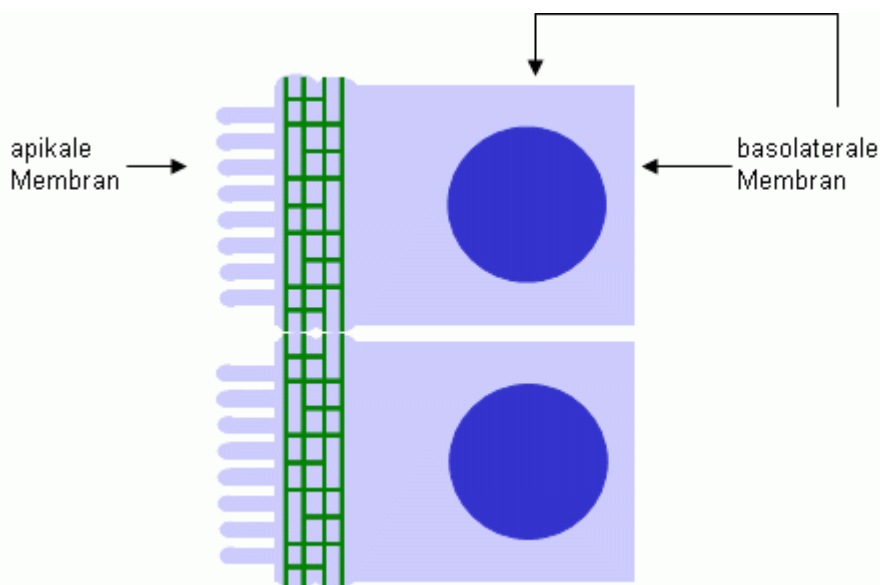


Abbildung 1: Epithelzellen in schematischer Darstellung

Über eine Reihe spezifischer Zell-Zell-Verbindungen bilden die Epithelzellen eine funktionelle Einheit.

- Haftverbindungen dienen dem Zusammenhalt von Epithelzellen. Sie werden durch Anteile des Zytoskeletts aufgebaut. Sind Aktinfilamente am Aufbau der Haftverbindungen beteiligt, bezeichnet man sie als Zonula adhaerens. Diese ist basal der Schlussleisten lokalisiert. Wenn Intermediärfilamente involviert sind, werden die Verbindungen Desmosomen und Hemidesmosomen genannt. Desmosomen dienen dem mechanischen Zusammenhalt der

Epithelzellen. Abgesehen davon findet man diese auch in anderen Zellen, die einer großen mechanischen Belastung ausgesetzt sind, wie beispielsweise der Herzmuskulatur. Dabei sind zwei kreisförmige Haftplatten, an der Innenseite der Zellmembran benachbarter Zellen gelegen, über transmembranäre Filamente miteinander verbunden. Intermediärfilamente verbinden die Haftplatten einer Zelle fest miteinander und dienen der Verankerung im Zytoplasma. Dieses Netz aus den Intermediär- und transmembranären Filamenten zieht sich um die ganze Zelle herum. Die Hemidesmosomen verbinden die Epithelzellen mit der am basalen Zellpol gelegenen Basalmembran.

- Kommunizierende Verbindungen (lat.: Nexus, engl.: Gap Junction) findet man insbesondere bei Neuronen. Weiterhin kommen sie auch bei Epithelien, glatter und quergestreifter Muskulatur sowie embryonalen Zellen vor. Im Bereich dieser Verbindungen nähern sich die Plasmamembranen benachbarter Zellen an. Dabei ermöglichen Kanäle die Passage kleiner Ionen und anderer Metabolite aus dem Zytoplasma der einen Zelle in das Zytoplasma der benachbarten Zelle.
- Schlussleisten (lat.: Zonula occludens, engl.: Tight Junctions) sind im apikolateralen Bereich von Epithelzellen lokalisierte, ringförmige Zell-Zell-Verbindungen. Sie haben eine sogenannte Gate-Funktion, in dem sie die epithelspezifische parazelluläre Barriere unterschiedlicher Organe und Gewebe durch eine spezifische Abdichtung und die Ausbildung selektiver parazellulärer Kanäle bestimmen (*Amasheh et al., 2002*). Außerdem trennen Schlussleisten die apikale von der basolateralen Zellmembran und tragen somit maßgeblich zum polaren Aufbau von Epithelzellen bei, in dem sie eine Diffusion von Membranproteinen von einer auf die andere Membranseite verhindern (Fence-Funktion, *Mandel et al., 1993*).

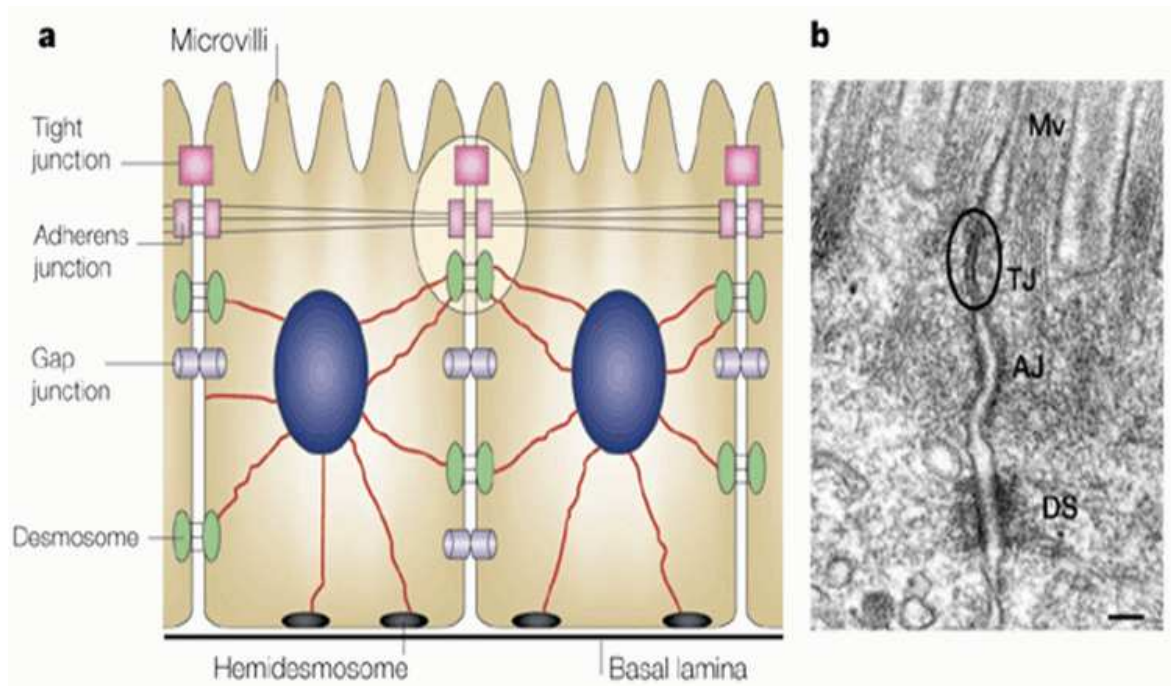


Abbildung 2: Lokalisation von Tight Junction, Adherens Junction, Gap Junction, Desmosomen und Hemidesmosomen.

Die Einheit aus Tight Junction, Adherens Junction, Gap Junction und Desmosomen nennt man epithelialer Schlussleistenkomplex (*Tsukita et al., 2001*).

Die beiden Hauptfunktionen des Epithels sind die Regulation des transepithelialen Transports von Elektrolyten und Wasser und die Aufrechterhaltung der Barriere zwischen inneren und äußeren Flüssigkeitsräumen. Diese Funktionen ermöglichen eine unterschiedliche Solutzusammensetzung in benachbarten Kompartimenten und gewährleisten eine Konstanzhaltung des inneren Milieus. Störungen dieser Funktionen können mit erheblichen Beeinträchtigungen des Elektrolythaushalts einhergehen und damit eine Reihe schwerer Krankheitssymptome verursachen. Ein Beispiel für eine derartige Störung ist die familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalzurie und Nephrokalzinose (FHHNC), eine hereditäre Nierenerkrankung, welche durch einen massiven renalen Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Verlust gekennzeichnet ist. Sie wird in dieser Arbeit in einem gesonderten Kapitel näher beschrieben.

Der transepitheliale Transport kann entweder auf transzellulärem oder parazellulärem Weg erfolgen. Die transzellulären Transportvorgänge über die apikale und basolaterale Zellmembran erfolgen durch spezifische Transportproteine wie Kanäle und Carrier. Beim parazellulären Transport handelt es sich um einen passiven Prozess. Dieser ist abhängig vom elektrochemischen Gradienten, der durch den transzellulären Transport aufgebaut wird. Die wesentlichen Merkmale des

parazellulären Transportes sind die Permeabilität und die Permselectivität. Dabei beschreibt die Permeabilität die Durchlässigkeit einer Barriere bezogen auf eine bestimmte Substanz. Eine Möglichkeit, die Permeabilität von Epithelien zu quantifizieren, ist die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TER, engl.: transepithelial resistance). Je höher der elektrische Widerstand, desto niedriger ist der parazelluläre Transport.

Die Permselectivität hingegen ist die spezifische Durchlässigkeit für Ionen entsprechend ihrer molekularen Ladung und Größe (*Powell, 1981*). Demnach werden je nach Ausprägung und Stärke dieser beiden genannten Faktoren 1) dichte, 2) mitteldichte und 3) lecke Epithelien voneinander unterschieden (*Fromm, 2007*).

Dichte Epithelien besitzen eine sehr niedrige Transportrate, wobei der Transport vorwiegend über den transzellulären Weg erfolgt. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Barrierefunktion und ihr Vorkommen ist auf die Epidermis und die Harnblase beschränkt.

Mitteldichte Epithelien sind zwar stärker durchlässig, doch auch hier erfolgt der Transport vorwiegend auf dem transzellulären Weg und nur in geringem Maße parazellulär. Als Beispiele seien die Epithelien des distalen Nierentubulus, des Kolons sowie des Rektums genannt.

Für lecke Epithelien ist eine hohe Transportrate charakteristisch, welche im Gegensatz zu den vorher genannten v.a. parazellulär und weniger transzellulär erfolgt. Sie kommen im proximalen Nierentubulus, der Gallenblase oder dem Dünndarm vor. Das Vorhandensein der Epithelien im Gewebe, ihre spezifische Anordnung und die Variabilität des Abdichtungsgrades der epithelialen Barriere sind für die jeweilige Organfunktion charakteristisch. (*Schmitz et al., 1999 a; Bojarski et al., 2001; Schulzke et al., 2006*).

1.2 Molekulare Struktur der Tight Junctions

Tight Junctions (TJs) sind integrale Membranproteine, welche Zell-Zell-Kontakte ermöglichen und für die parazelluläre Barrierefunktion in epithelialen und endothelialen Zellverbänden verantwortlich sind (*Wolburg et al., 2001; Furuse et al., 2002; Abbott et al., 2002, Amasheh et al., 2009 b*). Zusätzlich zu diesen Funktionen regulieren sie den parazellulären Transport von Wasser, Ionen und Molekülen und

verhindern gleichzeitig deren Verlust über den parazellulären Weg (*Tsukita und Furuse, 2000; Anderson, 2001; Matter und Balda, 2003; Schneeberger und Lynch, 2004*).

Durch ihre kanalbildenden Eigenschaften sind TJs in der Lage spezifische Ionenkanäle (Poren) zwischen den Zellen auszubilden (*Simon et al., 1999; Tsukita und Furuse, 2000; Van Itallie und Anderson, 2004; Amasheh et al., 2002*). Diese Poren zeichnen sich durch eine Ionen- und Größenselektivität aus (*Tsukita et al., 2001*), welche gemeinsam mit dem Grad der Abdichtung entscheidenden Einfluss auf den epithelialen Transport haben (*Mitic et al., 2000*).

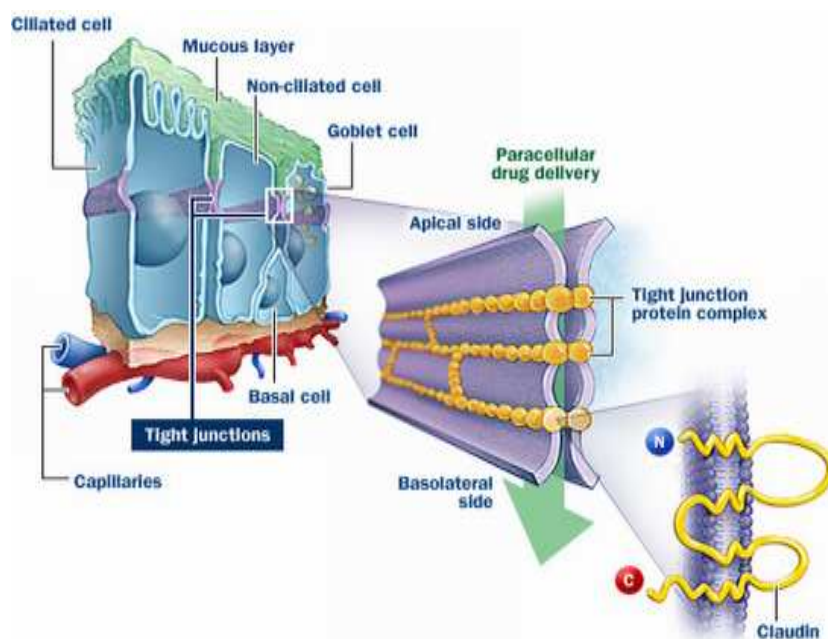


Abbildung 3: Tight Junctions (*Quelle: www.nastech.com, 2005*)

Die TJs schaffen durch die kontrollierte Permeabilität verschiedene Kompartimente unterschiedlicher Solutzusammensetzung. Sie tragen durch das Verhindern der freien Diffusion von Lipiden und Proteinen zwischen den apikalen und basolateralen Domänen der Plasmamembran entscheidend zur Aufrechterhaltung der Zellpolarität bei (*Gumbiner, 1987; Rodriguez-Boulan et al., 1989; Schneeberger und Lynch, 1992; Gumbiner, 1993; Anderson et al., 1995; Gonzalez-Mariscal et al., 2003*).

Gerüstproteine dienen den TJs zur Verbindung und Verankerung mit zyttoplasmatischen Proteinen und Aktin-Mikrofilamenten. Hierzu zählen neben dem 1986 entdeckten ZO-1 (*Stevenson et al., 1986*) das ZO-2, ZO-3, AF6 und Cingulin (*Citi et al., 1988; Gumbiner et al., 1991; Mandai et al., 1997; Haskins et al., 1998*).

In einigen Studien ist gezeigt worden, dass die Funktion der TJs verschiedenen Einflüssen unterliegt und durch diese reguliert werden kann. Nach *Kinugasa et al. (2000)* spielen Zytokine bei dieser Regulation eine wichtige Rolle. Beispielsweise bei entzündlichen Erkrankungen des Darmes und des Bronchialsystems weisen die TJs Veränderungen auf (*Schmitz et al., 1999 b; Gitter et al., 2000 a; Gitter et al., 2000 b; Coyne et al., 2002*). So zeigte sich, dass das proinflammatorische Zytokin Tumor Nekrose-Faktor α (TNF- α) eine Hochregulation von Claudin-2 induziert (*Zeissig et al., 2007*). Bei der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Colitis ulcerosa stört das proinflammatorische Zytokin IL-13 die intestinale Barrierefunktion (*Heller et al., 2008*).

Im Transmissionselektronen-Mikroskop erscheinen die TJs als eine Reihe von Kontaktstellen zwischen benachbarten Zellen, die am apikalen Zellpol der lateralen Membran gelegen sind (*Claude und Goodenough, 1973*).

Im Gefrierschnitt stellen sie ein kontinuierliches Netzwerk von transmembranären, apikolateral gelegenen Fibrillen dar, die mit den Fibrillen gegenüberliegender Zellen anastomosieren und paarweise Stränge ausbilden (*Staeclin, 1973; Staeclin, 1974, Claude und Goodenough, 1973; Tsukita et al., 2001*). In Abhängigkeit vom Zelltyp variieren sowohl die Anzahl der Fibrillen als auch die Frequenz ihrer Verzweigung und somit die Dichte.

Für die Funktionalität der TJs sind drei Proteine von wesentlicher Bedeutung: Occludin (*Furuse et al., 1993*), Claudin (*Furuse et al., 1998 a; Anderson et al., 2001*) und Tricellulin (*Ikenouchi et al., 2005*). Sie besitzen einen gleichartigen Aufbau, bestehend aus einem intrazellulär gelegenen Aminoterminus, zwei extrazellulären Schleifen und einem intrazellulär gelegen Carboxyterminus. Aufgrund ihrer vier transmembranären Domänen werden sie als Tetraspan-Proteine bezeichnet.

Occludin ist ein 65 kDa großes integrales Membranprotein und wurde erstmalig durch *Furuse et al. 1993* in TJs von Hühnern und Säugetieren beschrieben. Es war das erste Protein überhaupt, welches als Baustein der TJs identifiziert wurde. 1995 konnte das Vorkommen von Occludin innerhalb von Fibrillen der TJs elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden (*Fujimoto, 1995*). Es besitzt vier transmembranäre Domänen, zwei nahezu gleichgroße, tyrosinreiche, extrazelluläre Schleifen und zwei intrazellulär gelegene Termini. Die letztgenannten bestehen aus einem langen Carboxyterminus von 254 Aminosäuren und einem kurzen Aminoterminus von 149 Aminosäuren.

Zunächst wurde in einigen Studien die Vermutung aufgestellt, dass Occludin eine funktionelle Bedeutung für die Barriere hat (*Balda et al., 1996; Wong und Gumbiner, 1997*). In Occludin-Knockout-Mäusen konnte jedoch keine veränderte Barrierefunktion der TJs im Vergleich zu Kontrollgruppen gezeigt werden (*Saitou et al., 2000; Schulzke et al., 2005*). Experimente mit siRNA zeigten im Zellkulturmodell jedoch auch für Occludin eine abdichtende Wirkung (*Yu et al., 2005*).

Diese Befunde deuten auf eine funktionelle Kompensation bei fehlender Occludin-Expression. Dafür spricht, dass Stammzellen auch in Abwesenheit von Occludin in polarisierte Epithelzellen mit einer intakten Barriere differenzieren können und Claudine in der Lage sind, in L-Fibroblasten TJ-Stränge auch ohne Occludin auszubilden (*Saitou et al., 1998*).

Occludin scheint darüber hinaus eine regulatorische Funktion bei der Differenzierung spezifischer Epithelzellen auszuüben. So traten im Occludin-Knockout-Modell morphologische Veränderungen der Drüsenzellen des Magenepithels auf. Neben einer Hyperplasie der Mucosazellen kam es zum Verlust der Parietalzellen und dadurch der Magensäuresekretion (*Schulzke et al., 2005*).

Tricellulin wurde 2005 durch die Arbeitsgruppe von *Tsukita* erstmalig identifiziert (*Ikenouchi et al., 2005*) und ist das erste TJ-Protein, welches insbesondere an trizellulären Kontaktstellen von Epithelzellen lokalisiert werden konnte. Es weist eine partielle Sequenzhomologie zur Occludin auf und hat ein Molekulargewicht von 64 kDa. Die erste extrazelluläre Schleife ist mit 41 Aminosäuren nur geringfügig größer als die zweite Schleife mit 30 Aminosäuren. Sowohl der Carboxyterminus als auch der Aminoterminus sind im Zytoplasma gelegen. Wie in Knockout-Modellen gezeigt werden konnte, führt das Fehlen von Tricellulin nicht nur zur einer gestörten Organisation der TJs an trizellulären Kontaktstellen, sondern auch der lateral assoziierten TJs und somit zur einer Störung der epithelialen Barriere. 2009 zeigten *Krug et al.*, dass eine erhöhte Expression von Tricellulin an trizellulären Kontaktstellen eine selektive Barriere für Makromoleküle darstellt, die Permeabilität für kleine Ionen aber nicht beeinflusst.

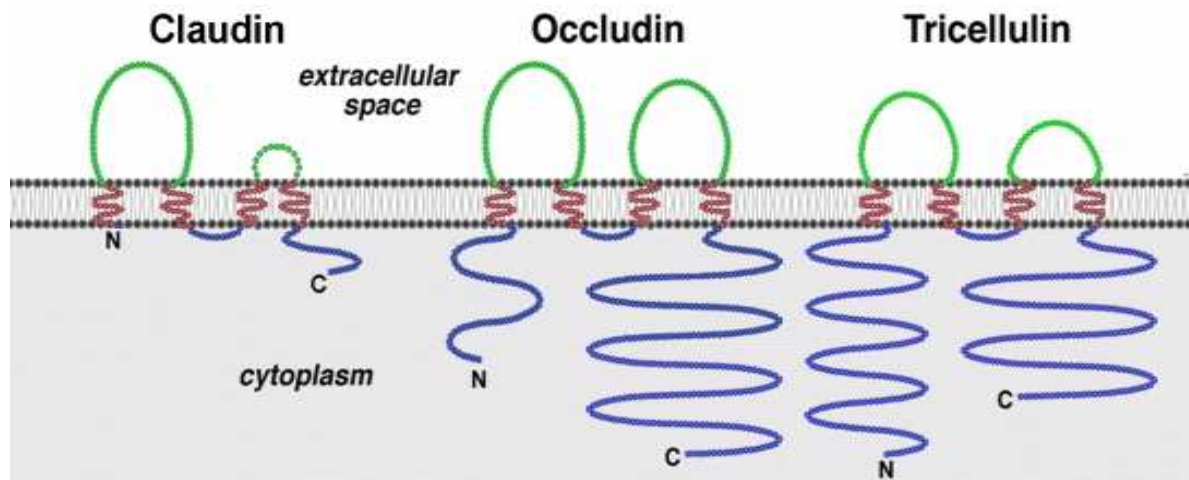


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Tight Junction-Tetraspan-Proteine Claudin, Occludin und Tricellulin in der Zellmembran (nach *Ikenouchi et al.*, 2005)

1.3 Claudine

Die Ergebnisse der ersten Occludin-Studien führten zu der Vermutung, dass noch weitere funktionelle Bestandteile der TJs existieren mussten. Die Entdeckung der Familie der Claudine (lat.: claudere, „abschließen“) durch die Arbeitsgruppe von S. Tsukita (*Furuse et al.*, 1998 a) bestätigte diese letztlich. Schon früh wurde vermutet, dass Claudine funktionell eine entscheidende Rolle bei der Errichtung der parazellulären Barrierefunktion der TJs haben. Neuere Studien haben gezeigt, dass Claudine auch eine wichtige Rolle hinsichtlich der Migration und Invasion von Tumorzellen in Epithelien spielen (*Takehara et al.*, 2009).

Die Claudin-Familie umfasst mittlerweile 27 Proteine und Splicevarianten (*Tsukita et al.*, 2001; *Mineta et al.*, 2011). Sie haben ein Molekulargewicht von 22-36 kDa, einen relativ kurzen intrazellulär gelegenen Carboxyterminus und ebenso wie das Occludin vier transmembranäre Domänen und zwei extrazelluläre Schleifen. Im Unterschied zu Occludin ist die erste Schleife mit ca. 51 Aminosäuren deutlich länger als die zweite Schleife mit ca. 14 Aminosäuren (*Tsukita et al.*, 2000). Die Claudine zeigen untereinander eine Sequenzhomologie von 12,5% bis 69,7% (*Tsukita und Furuse*, 1998; *Fanning et al.*, 1999; *Tsukita und Furuse*, 1999; *Tsukita et al.*, 1999; *Tsukita und Furuse*, 2000), weisen jedoch keine Sequenzhomologie zu Occludin auf (*Furuse et al.*, 1998 a).

Claudine besitzen ferner spezifische Interaktionsmuster, wobei cis-Interaktionen zwischen Claudinen innerhalb derselben Zellmembran und trans-Interaktionen

zwischen Claudinen benachbarter Zellmembranen bestehen. Diese können sowohl homogen als auch heterogen gestaltet sein, wobei nicht alle heterogenen Claudine in der Lage sind miteinander zu interagieren (*Furuse et al., 1999; Furuse et al., 2001; Angelow et al., 2007; Piontek et al., 2008*). So sind Claudin-1 und -3 sowie Claudin-2 und -3 in der Lage zu interagieren, wohingegen Claudin-1 und -2 dies nicht sind (*Furuse et al., 1999*). *Hou et al.* konnten 2008 eine Interaktion zwischen Claudin-16 und Claudin-19, nicht jedoch zwischen Claudin-2 und Claudin-16 nachweisen. Mit den zytoplasmatischen Gerüstproteinen des TJ-Komplexes wie ZO-1 interagieren die Claudine über eine C-terminale PDZ-Bindungsdomäne.

Verschiedene Claudine zeigen unterschiedliche funktionelle Eigenschaften. So konnte durch die Charakterisierung der Claudine-2, -4, -14 und -15 gezeigt werden, dass die Permeabilitätseigenschaften durch die entsprechenden Ladungen der Aminosäuren der beiden extrazellulären Schleifen bestimmt werden (*Colegio et al., 2002; Colegio et al., 2003, Van Itallie et al., 2001*). Als Beispiel sei hier die Kationenselektivität von Claudin-2 angeführt. Diese ergibt sich aus der negativen Ladung der Carboxylgruppe von Aspartat-65, welche innerhalb der Poren gelegen ist und mit den Kationen interagiert (*Yu et al., 2009*).

Das Vorkommen der einzelnen Claudine innerhalb der TJs unterliegt einer breiten Variation. Dementsprechend sind bestimmte Claudine wie z.B. Claudin-1, -3 und -4, typischerweise in dichten Epithelien lokalisiert, wohingegen eine starke Claudin-2 Expression auf ein leckes Epithel deutet. Folglich besitzt das Gewebe der Organe, welches sich durch ein unterschiedliches Expressionsmuster der Claudine unterscheidet, die jeweils für sich spezifischen Barriereigenschaften (*Furuse et al., 1999; Tsukita und Furuse, 2000*).

In zahlreichen Studien sind verschiedene angeborene Erkrankungen mit Mutationen in den Claudingenen in Zusammenhang gebracht worden (*Simon et al., 1999; Sawada et al., 2003*). In der Tabelle 1 ist die typische Lokalisation, Funktion (soweit bekannt) und die klinische Relevanz von Claudinen zusammengefasst. Die darauf folgenden Abschnitte geben einen Überblick über Claudin-16 und erläutern die Auswirkung von Mutationen in dem dafür codierenden Gen.

Tabelle 1: Lokalisation, Funktion und die klinische Relevanz verschiedener Claudine in der Übersicht

<i>Claudin</i>	<i>Lokalisation in Tight Junctions</i>	<i>Funktion und klinische Relevanz</i>
Claudin-1	<p>in dichten Epithelien Epidermis der Haut Plexus choroideus, Herz, Pankreas, Kolon, Plazenta, Prostata, Hoden Endothelien der Lunge, Leber, Niere (Nephronen der Bowman-Kapsel) Innenohr (Cochlea, Marginalzellen der Stria vascularis, Reissnersche Membran, sensorisches Epithel des Vestibulum)</p>	<p>parazelluläre Barriere im Knock-out-Versuch: Barrieredefekt und Dehydratation über die Haut verminderte Expression: bei angeborenen Formen von Mamma-Ca; im endometrioiden Endometrium-Ca vermehrte Expression: im seropapillären Endometrium-Ca, colorektalen-Ca, Pankreas-Ca und Ovarial-Ca Defekt bei der neonatalen sklerosierenden Cholangitis Expression im colorektalen-Ca korreliert mit der Eindringtiefe des Tumors, jedoch nicht mit dem Tumormarker CEA; verringerte Expression im colorektalen-Ca korreliert mit geringerer Tumordifferenzierung und fortgeschrittenerem TNM-Stage und damit schlechterer Prognose Expression im Urothel-Ca des oberen Harntraktes assoziiert mit dem Stadium des Carcinoms wichtiger Co-Faktor für HCV bei der Penetration in Hepatozyten und Endothelzellen</p>
Claudin-2	<p>in lecken Epithelien Epithelien der Niere (Nephronen der Bowman-Kapsel, proximaler Nierentubulus, absteigender Teil der Henle-Schleife) Plexus choroideus, Lunge, Dünndarm, Ducti pancreaticii, Leber; Endothel des Gehirns</p>	<p>parazellulärer Kanal für Kationen (kationenselektiv) Bei vermehrter Expression verminderte Barrierefunktion verminderte Expression: im seropapillären Endometrium-Ca vermehrte Expression: im endometrioiden Endometrium-Ca; im Sigmoid bei M. Crohn; bei der aktiven Colitis ulcerosa, stimuliert die Migration von Caco-2 Zellen Expression wird durch TNF stimuliert Erhöhte Expression im colorektalen Ca ist assoziiert mit dem Tumorwachstum und korreliert mit der Tumor-Progression Up-Regulation in Enterozyten in vivo und in vitro durch 1alpha,25(OH)(2)D(3) über den Vitamin D Rezeptor. Bildung eines Ca²⁺ Kanals in interstitialen Epithelzellen wird vermutet</p>

<p>Claudin-3 (RVP-1)</p>	<p>in dichten Epithelien Epithelien der Niere (Henle-Schleife, distaler Tubulus, Sammelrohr), der Lunge, des Pancreas, der Leber; Epithelien der Haut, des Uterus, im Hoden, der Prostata, im Kolon, im Innenohr (Cochlea, Marginalzellen der Stria vascularis, Reissnersche Membran, Vestibulum)</p>	<p>Parazelluläre Barriere für geladene und nicht geladene Teilchen abdichtende Funktion in MDCK II Zellen Rezeptor für das Enterotoxin von Clostridium perfringens; verminderte Expression: bei lymph. invasivem Adeno-Ca des Magens; vermehrte Expression: im Mamma- und Oesophagus-Ca; fehlende Expression im Adeno-Ca des Oesophagus ist mit dem Vorhandensein entfernter Metastasen assoziiert; Expression im Urothel-Ca des oberen Harntraktes assoziiert mit dem Stadium, dem Grading und dem Wachstumsverhalten des Tumors</p>
<p>Claudin-4 (CPE-R)</p>	<p>in dichten Epithelien Epithelien der Niere (dünner aufsteigender Teil der Henle-Schleife, Sammelrohr), Epidermis, Lunge und Kolon, Lunge, Mamma, Uterus und Prostata</p>	<p>Rezeptor für das Enterotoxin von Clostridium perfringens vermehrte Expression: im Magen-, Oesophagus-, colorectalem-, Pancreas-, Ovarial-Ca vermehrte sowie verminderte Expression: in verschiedenen Formen des Blasen-Ca Überexpression stimuliert die invasive Aktivität der Caco-2 Zellen; fehlende Expression beim Williams-Beuren-Syndrom, Down-Regulation bei der aktiven Colitis ulcerosa</p>
<p>Claudin-5 (TMVCF)</p>	<p>in Endothelien der Blutgefäße Blut-Hirn-Schranke, Blut-Hoden-Schranke, Epithelien im Interstinaltrakt, der Lunge, in azinösen Drüsenzellen des Pankreas, in Schwann-Zellen</p>	<p>abdichtende Barrierefunktion Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke verminderte Expression: im Sigmoid bei M Crohn Claudin-5 Defekt (Mikrodeletion 22q11) beim Velo-cardio-fazialen-Syndrom (Di George Syndrom)</p>
<p>Claudin-6</p>	<p>Leber; Mononukleare Zellen des peripheren Blutsystems; embryonale Epithelien und Haut</p>	<p>Expression in MDCK-Zellen führt zum Anstieg des transepithelialen Widerstandes und zur Abnahme der Permeabilität für Cl⁻-Ionen Überexpression: hemmt die Expression anderer Claudine und bedingt schwere Barrierestörung Verminderte Expression oder Fehlen: Mamma-Ca, in vitro Überexpression in MCF-7 Mamma-Ca: langsamerer Wachstum und höhere Apoptoserate der Ca-Zellen Co-Faktor für HCV bei der Penetration der Endothelzellen</p>

Claudin-7	Lunge (Alveolarepithelien), Niere (Henle-Schleife, Sammelrohr), Haut	Überexpression: verringert Cl ⁻ -Leitfähigkeit und erhöht die parazelluläre Na ⁺ -Leitfähigkeit in LLC-PK1-Zellen verminderte Expression: im IDC inverse Korrelation zwischen verminderter Expression und dem histologischen Grading bei DCIS und ICS, fehlt bei überwiegender Mehrheit der LCIS; Down-Regulation: bei aktiver Colitis Ulcerosa
Claudin-8	Niere (Henle-Schleife, distaler Tubulus, Sammelrohr, Aldosteron-sensitive Nierentubuli sowie Lunge, Mamma, Kolon, Haut	Abnahme der parazellulären Leitfähigkeit der Epithelien Barriere für Kationen in dichten Epithelzellen verminderte Expression: im Sigmoid bei M.Crohn
Claudin-9	Leber, mononukleare Zellen; Gehirn, Auge (Cornea-Epithel), Innenohr, Tumoren	Expression in MDCK-Zellen führt zum Anstieg des transepithelialen Widerstandes und zur Abnahme der Permeabilität für Cl ⁻ -Ionen Co-Faktor für HCV bei der Penetration der Endothelzellen
Claudin10 (OSPL36)	Innenohr (Cochlea, Marginalzellen der Stria vascularis, Reissnersche Membran); Niere (proximaler Tubulus, Henle-Schleife), Gehirn, Tumoren	Splice-Variante 1 ist Anionen-permeabel, Splice-Variante 2 ist Kationen-permeabel Beteiligung an der Invasion des hepatocellulären-Ca
Claudin-11 (OSP)	Myelinscheiden des ZNS (Oligodendrocyten); Innenohr (Cochlea, Basalzellen der Stria vascularis); Niere (proximaler Nierentubulus und Henle-Schleife), Testis (Sertoli-Zellen) Blut-Hoden-Schranke Haut	Aktivierung der Expression durch Androgene im Knockout-Versuch: Defekte in TJ der Myelin- und Sertolizellen, Taubheit in intraepithelialer Neoplasie des Hodens Überexpression und Dislokation von der Blut-Hoden-Schranke
Claudin-12	Epidermis Blase (Deckzellen des Harnblasenepithels), Gehirn, Duodenum, Jejunum, Ileum, Colon, Uterus, Prostata	Trägt zur Ca ²⁺ Absorption in interstitialen Epithelzellen bei Up-Regulation in Enterozyten in vivo und in vitro durch 1alpha,25(OH)(2)D(3) über den Vitamin D Rezeptor. Bildung eines Ca ²⁺ Kanals in interstitialen Epithelzellen wird vermutet
Claudin-13	Blase (Deckzellen des Harnblasenepithels) Duodenum, Jejunum Ileum, Colon; Endothel; nur in der Niere neugeborener Mäuse nachgewiesen bei Mäusen Expression im Gewebe des hämatopoetischen Systems	verminderte Expression: bei Mäusen, die anfällig sind für Anämie

Claudin-14	Innenohr (Cochlea, Marginalzellen der Stria vascularis, Reissnersche Membran, sensorisches Epithel des Vestibulums) Niere (Sammelrohr), Herz, Leber	Barriere Mutation verursacht autosomal rezessive Taubheit (DFNB29)
Claudin-15	Vasa recta in der Medulla der Niere ; Doudenum, Jejunum, Ileum, Colon	im Knock-out -Versuch bei Mäusen: Megakolon wichtig für die normale Morphologie des Dünndarms
Claudin-16 (Paracellin-1)	Niere (dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife, distaler Tubulus); Tumoren Glandulae parotis, submandibularis, labialis und sublingualis	Mutation im Gen verursacht FHHNC
Claudin-17	Epidermis der Haut , Nierentubulus	Anionenkanal
Claudin-18	Innenohr (Cochlea, Marginalzellen der Stria vascularis, Reissnersche Membran, sensorisches Epithel im Vestibulum) Epithelzellen von Lunge, Ösophagus (nur mRNA-Level), Magen, Duodenum	vermehrte Expression: im SCE beim Barrett-Ösophagus, der intraepithelialen Neoplasie und dem infiltrativen ductalen Adeno-Ca des Pankreas verminderte Expression: im Adenom und Magens-Ca 2 Splice-Varianten, CLDN18.2 Expression beim Magen-Ca, Pankreas-, Ösophagus-, Ovarial- und Lungenmalignomen eignet sich eventuell zur Antikörpertherapie epithelialer Tumoren
Claudin-19	Niere , Kolokalisation mit Cldn 16, (distaler Tubulus der Cortex und Sammelrohr der Medulla, weniger im proximalen Tubulus der Cortex und in der Henle-Schleife der Medulla); Auge (Retina); ZNS (Schwann-Zellen)	verminderte Expression: bei polyzystischer Nierenerkrankung im Knock-Out Versuch der Maus: Verlust vom Cldn 16 innerhalb der TJ im TAL Störung der elektrophysiologischen Übertragungsfunktion der Schwann-Zellen Mutationen im CLDN-19-Gen: FHHNC mit okulärer Symptomatik

Tabelle nach Sirotkin et al., 1997; Furuse et al., 1998 b; Morita et al., 1999; Simon et al., 1999; Sonoda et al., 1999; Gow et al., 2000; Heiskala et al., 2001; Niimi et al., 2001; Tsukita et al., 2001; Tursken und Troy, 2001; Rahner et al., 2001; Enck et al., 2001; Weber et al., 2001 a; Wilcox et al., 2001; Amasheh et al., 2002; Brandner et al., 2002; Kiuchi-Saishin et al., 2002; Tebbe et al., 2002; Furuse et al., 2002; Hoevel et al., 2002; Ben-Yosef et al., 2003; Coyne et al., 2003; Jeansonne et al., 2003; Morita et al., 2003; Yu et al., 2003; Kitajiri et al., 2004 a; Kitajiri et al., 2004 b; Li et al., 2004; Luk et al., 2004; Acharya et al., 2004; Schneeberger und Lynch, 2004; Alexandre et al., 2005; Amasheh et al., 2005; Florin et al., 2005; Inai et al., 2005; Miyamoto et al., 2005; Lee et al., 2006; Fujita et al., 2006; Hewitt et al., 2006; Konrad et al., 2006; Montgomery et al., 2006; Boireau et al., 2006; Sanada et al., 2006; Soini et al., 2006; Soebel et al., 2006; Van Itallie et al., 2006; Zeissig et al., 2006; Ip et al., 2007; Jovov et al., 2007; Kriegs et al., 2007; Takala et al., 2007; Zeissig et al., 2007; Zheng et al., 2007; Amasheh et al., 2008; Fujita et al., 2008; Karanjawala et al., 2008; Meertens et al., 2008; Nakanishi et al., 2008; Oshima et al., 2008; Sahin et al., 2008; Sas et al., 2008; Tamura et al., 2008; Amasheh et al., 2009 a; Fink et al., 2009; Günzel et al., 2009; Huo et al., 2009; Takehara et al., 2009; Yu et al., 2009; Hou und Goodenough, 2010; Milatz et al., 2010; Jung et al., 2010; Thompson et al., 2010; Wu et al., 2010; Matsuoka et al., 2011; Morita et al., 2011; Dhawan et al., 2011.

1.4 Familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalzurie und Nephrokalzinose (FHHNC)

Im Jahr 1972 wurde die FHHNC erstmals unter der Bezeichnung Michaelis-Castrillo-Syndrom beschrieben (*Michaelis et al., 1972*). Seither ist über eine Vielzahl von Patienten mit FHHNC aus über 50 genetisch unabhängigen Familien berichtet worden (*Manz et al., 1978; Praga et al., 1995; Nicholson et al., 1995; Simon et al., 1999; Benigno et al., 2000; Gregoric et al., 2000; Weber et al., 2000; Weber et al., 2001 b; Wolf et al., 2002; Kang et al., 2005; Müller et al., 2006 a; Müller et al., 2006 b; Peru et al., 2008, Konrad et al., 2008; Peco-Antic et al., 2010; Seeley et al., 2011*). Die FHHNC ist eine seltene autosomal-rezessiv vererbare Nierenerkrankung, welche durch einen massiven renalen Verlust von Magnesium (Mg^{2+}) und Kalzium (Ca^{2+}) gekennzeichnet ist. Schon früh wurde die Vermutung aufgestellt, dass es sich pathophysiologisch um einen selektiven Defekt bei der Absorption divalenter Kationen im dicken aufsteigenden Teil der Henle Schleife (TAL) handelt (*Rodriguez-Soriano et al., 1987*).

2001 untersuchten *Blanchard et al.* in einer Studie mit FHHNC-Patienten, die Auswirkung der Gabe des natriuretischen Diuretikums Furosemid (Medikament, das über die Hemmung des apikalen $Na^+-K^+-2Cl^-$ -Transporters im TAL eine vermehrte Ausscheidung von Natrium im Urin verursacht). Sie beobachteten, dass die Patienten trotz der Natriuresis keine erhöhte Ausscheidung von Mg^{2+} oder Ca^{2+} hatten. Damit bekräftigten sie die initiale Hypothese von der Arbeitsgruppe um Rodriguez-Soriano, dass bei der FHHNC ein selektiver Defekt bei der Absorption divalenter Kationen im TAL besteht.

1999 entdeckten *Simon et al.*, dass ein Gendefekt im Paracellin-1 (PCLN1) Gen ursächlich für die FHHNC ist. 2001 gelang es *Weber et al.* die Chromosomenlokalisierung (3q27) des PCLN1 Gens zu detektieren (*Weber et al., 2001 a*). Das Paracellin-1 wurde folglich als das zur Claudin-Familie gehörende TJ-Protein Claudin-16 identifiziert.

Bis heute konnten über 40 verschiedene Mutationen des Claudin-16-Gens (CLDN16) bei Patienten mit FHHNC isoliert werden (*Simon et al., 1999; Blanchard et al., 2001; Weber et al., 2001 b; Wolf et al., 2002; Müller et al., 2003; Tajima et al 2003; Kang et al., 2005; Müller et al., 2006 a; Müller et al., 2006 b; Staiger et al., 2007; Hampson et al., 2008; Al Haggag et al., 2009; Günzel et al., 2009 a*).

Mit einer Ausnahme (*Müller et al., 2003*) betreffen sie entweder den transmembranären Bereich oder eine der beiden Schleifen. Je nach Auswirkung der einzelnen Varianten der Mutation, kann man diese in zwei funktionelle Gruppen einteilen. Die erste Gruppe führt aufgrund einer Störung des intrazellulären Transports zur Akkumulation von Claudin-16 in verschiedenen intrazellulären Organellen, wie dem endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat oder in den Lysosomen (*Kausalya/Amasheh et al., 2006*).

Bei der zweiten Gruppe erreicht Claudin-16 zwar die Zellmembran und wird in die TJs eingebaut, führt aber aufgrund des mutationsbedingten Defektes zu einer Störung des parazellulären Magnesium-Transportes. (*Kausalya/Amasheh et al., 2006*). Obwohl bisher eine direkte Korrelation zwischen der einzelnen Mutation und einem spezifischen Phänotyp nicht terminiert werden konnte (*Seeley et al., 2011*), beeinflussen bestimmte Mutationen den Schweregrad der Ausprägung und insbesondere das Manifestationsalter der FHHNC (*Konrad et al., 2008*).

2006 zeigten *Kausalya et al.*, in einer interessanten Studie, dass die Mutation T233R einen vergleichsweise milden Verlauf hat und über Jahre eine stabile GFR von über 80 ml/min aufweist. Um eine eindeutige Aussage machen zu können, war in dieser Studie jedoch das Patientenkollektiv zu klein. Die klinische Ausprägung der Symptome ist sehr variabel und reicht von einer kompensierten, eingeschränkten Nierenfunktion bis zur terminalen Niereninsuffizienz. Dieser Unterschied basiert auf den unterschiedlichen Mutationen und hängt davon ab, ob eine Restfunktion von Claudin-16 vorhanden ist. Die Progression der Niereninsuffizienz korreliert letztlich mit dem Ausmaß der Nephrokalzinose, die somit den limitierenden Faktor bei der FHHNC darstellt (*Praga et al., 1995*).

Ebenfalls 2006 identifizierten *Konrad et al.*, bei einer Reihe von Patienten mit FHHNC mit okulärer Symptomatik wie Nystagmus, Myopie und makulärem Colobom ein zweites Gen CLDN19, welches für das Claudin-19 kodiert. Dieses wird nicht nur in der Niere, sondern insbesondere in den TJ der Retina exprimiert (*Konrad et al.,*

2008; Peng et al., 2011). Der genaue Mechanismus, der die okuläre Symptomatik verursacht, ist nicht geklärt.

Darauf aufbauend stellten Hou et al., 2008 die Vermutung auf, dass 1) Claudin-16 und Claudin-19 miteinander interagieren und synergistische Effekte ausüben und 2) Mutationen in einem der beiden Proteine diese Interaktion und somit ihre Funktion beeinträchtigen und damit zum Entstehen der FHHNC führen können. In den letzten Jahren konnten bei Patienten mit FHHNC und okulärer Symptomatik wiederholt Claudin-19 Mutationen nachgewiesen werden (Haisch et al., 2011; Naeem et al., 2011).

Das Alter der betroffenen Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung beträgt im Durchschnitt zwischen 5-15 Jahren wobei auch schon über Patienten berichtet wurde, bei denen die Erkrankung auch deutlich früher diagnostiziert wurde (Praga et al., 1995; Wolf et al., 2002; Peco-Antic et al., 2010). In den bisherigen Studien zeigte sich, dass die meisten Patienten in der zweiten bis dritten Lebensdekade eine terminale Niereninsuffizienz erreichen. Häufig sind es rezidivierende Harnwegsinfekte und Koliken aufgrund von Nephrolithiasis mit denen die Patienten erstmalig vorgestellt werden. Die typische Klinik und Paraklinik sowie die extrarenale Manifestation bei der FHHNC sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 2: Renale und extrarenale Manifestation sowie die laborchemischen Veränderungen bei der FHHNC

renale Manifestation	extrarenale Manifestation	laborchemische Veränderungen
rezidivierende Harnwegsinfekte	Tetanie	Hypermagnesiurie
Bauchschmerzen/Erbrechen	Parästhesie	Hyperkalzurie
Polyurie/Polydypsie	zerebrale Anfälle	Hypocitraturie
Hyposthenurie	arterieller Hypertonus	inkomplette distale renal-tubuläre Azidose
Nephrolithiasis/Koliken	psychomotorische Retardierung	Serum-Magnesium n/↓
Bilaterale Nephrokalzinose	Nystagmus/Myopie/makuläres Colobom	Serum-Parathormon n/↑
progressive bis terminale renale Insuffizienz	Hörvermögen↓; Taubheit (selten)	Hyperurikämie

n: normal; ↑: erhöht, ↓: erniedrigt

Tabelle nach Meier et al., 1979; Praga et al., 1995; Benigno et al., 2000; Weber et al., 2000; ; Weber et al., 2001 b; Wolf et al., 2002; Tasic et al., 2005; Prabakar et al., 2006; Hampson et al., 2008; Konrad et al., 2008; Al Hagger et al., 2009; Peco-Antic et al., 2010; Faguer et al., 2011; Haisch et al., 2011; Seeley et al., 2011).

Die Diagnostik der FHHNC mit Hilfe der Sonographie beruht im Wesentlichen in der Darstellung einer bilateralen medullären Nephrokalzinose (*Rönnefarth und Misselwitz, 2000; Müller et al., 2006 a*) und evtl. vergrößerten Nieren. Charakteristisch ist eine Echovermehrung im Bereich des Nierenmarks, die durch die diffuse Ausfällung von Kalziumsalzen entsteht. Neben der auffälligen Klinik und den für die FHHNC typisch veränderten Laborparametern ist eine eindeutige und sichere Diagnosestellung nur mit Hilfe einer molekulargenetischen Untersuchung durch den entsprechenden Nachweis einer CLDN16/CDLN19-Mutation möglich.

Die derzeit zur Verfügung stehende Therapie ist rein symptomatisch und besteht aus der oralen Magnesium- und Kalziumsubstitution und der Gabe von Thiazidiuretika (HCT). Dabei führt die Substitutionstherapie nicht zu Normalwerten und hat keinen Einfluss auf das Fortschreiten der Erkrankung (*Praga et al., 1995; Wolf et al., 2002*). Die HCT-Gabe richtet sich nach der Höhe der Hyperkalzurie. 2006 zeigte sich in einer Studie von *Zimmermann et al.*, dass durch HCT die $\text{Ca}^{2+}/\text{Crea}$ Ratio deutlich reduziert werden konnte. Eine signifikante Reduktion von $\text{Ca}^{2+}/24\text{h}$ konnte nicht nachgewiesen werden. Eine frühe Behandlung mit Vitamin D und Kalzium ist für eine normale geistige und pubertäre Entwicklung sowie das Erreichen einer normalen Körpergröße unablässig. Hinzu kommt bei Bedarf die antihypertensive Therapie. Experimentell wird derzeit die Wirkung von Endozytosehemmern erprobt, welche den Einbau fehlerhafter oder mangelnder Claudin-16-Varianten verhindern sollen (*Müller et al., 2006 b*).

Die aufgeführte konventionelle Behandlung führt zwar zu einer Progressionsabnahme (*Praga et al., 1995*), doch kann bis heute die FHHNC in ihrem Verlauf nicht aufgehalten oder gar geheilt werden. Der fortschreitende Verlust der Nierenfunktion führt deshalb bereits im Kindes- oder Jugendalter zu einer chronischen Niereninsuffizienz und der Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie in Form von Dialyse oder der Nierentransplantation. Bei Patienten, die sich einer Nierentransplantation unterzogen haben, konnte eine Normalisierung der Serum-Magnesium- und Urin-Kalziumwerte verzeichnet werden (*Praga et al., 1995*).

Aufgrund der fehlenden Möglichkeit zur Heilung und der infausten Prognose der FHHNC, ist es, um neue Möglichkeiten für Therapieansätze zu finden, unerlässlich, die zugrunde liegenden Mechanismen und damit die genaue Pathophysiologie zu erforschen.

In den folgenden Kapiteln wird genauer auf das in dieser Arbeit funktionell untersuchte Claudin-16 und die bisherigen Erkenntnisse des Proteins im Magnesium-Haushalt eingegangen. Darauf aufbauend wird der bisher bekannte Zusammenhang zwischen der Claudin-16- und Claudin-19-Interaktion und ihre Rolle bei der Entstehung der FHHNC aufgezeigt.

1.5 Claudin-16 und seine Bedeutung im Magnesiumhaushalt

Im Jahr 1999 wurde wie bereits genannt von *Simon et al.* erstmalig das Protein Paracellin-1 (=Claudin-16) in TJs von Nierentubuli beschrieben. Unabhängig davon wurde das Protein bei Rindern identifiziert (*Hirano et al., 2000*). Beim Menschen ist es insbesondere innerhalb der TJs in medullären und kortikalen Abschnitten des dicken aufsteigenden Teils der Henle-Schleife in der Niere lokalisiert. Zusätzlich wird Claudin-16 in proximalen Abschnitten des distalen Tubulus (*Simon et al., 1999; Kiuchi-Siashin et al., 2002*), in Tumoren (*Heiskala et al., 2001*), sowie in den Glandulae parotis, submandibularis, labialis und sublingualis exprimiert (*Kriegs et al., 2007*).

Bestehend aus 305 Aminosäuren (*Simon et al., 1999*) und mit einer Homologie von lediglich 10 - 18% im Vergleich zu anderen Claudinen, weist es die geringste Übereinstimmung mit diesen auf.

Zwei Jahre nach der Erstbeschreibung wurde ein kürzeres Claudin-16 beschrieben, bestehend aus 235 Aminosäuren (*Weber et al., 2001 a*). Dieser Längenunterschied basiert auf einer unterschiedlichen Anzahl der Aminosäuren des intrazellulären Aminoterminus, die funktionellen Eigenschaften und der Aufbau beider Proteine sind jedoch identisch. Analog zu den anderen Claudinen wird Claudin-16 durch vier transmembranäre Domänen, zwei extrazellulären Schleifen und das intrazellulär gelegene Amino – und Carboxylende aufgebaut.

Die Lokalisation innerhalb der TJs wird durch das im Zytoplasma liegende COOH-Ende bestimmt (*Songyang et al., 1997*). Die an dieser Stelle vorliegende Sequenz Thr-X-Val bindet als PDZ-bildende Domäne spezifisch an ZO-1 (*Ikari et al., 2004*) und stellt somit die Verbindung zum Aktin–Zytoskelett her (*Turksen und Troy, 2004*). Die Voraussetzung für die Lokalisation des Claudin-16 innerhalb der TJs ist die

Phosphorylierung an der Aminosäure Ser217 durch die Proteinkinase A (*Ikari et al., 2006; Ikari et al., 2008*).

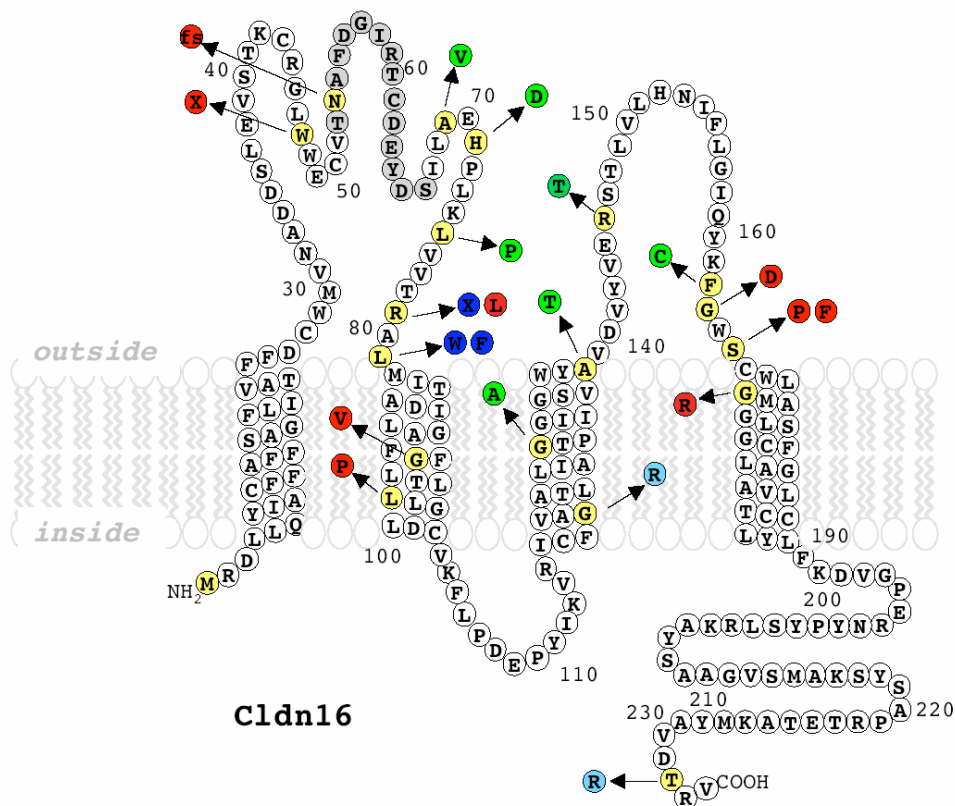


Abbildung 5: Das Claudin-16-Molekül in der Zellmembran mit den FHHNC assoziierten Mutationen

(235 Aminosäuren, Sequenz im 1-Buchstaben-Code, Mutationen in gelb, Pfeil zur Beschreibung der Punktmutation); Darstellung der Effekte der Mutationen in verschiedenen Farben: grün – Zelloberfläche; rot – endoplasmatisches Retikulum; dunkelblau – Golgi Apparat; hellblau – Lysosomen. X -Stopcodon, fs – frame shift, T52 - S66 (grau unterlegt) zur Generierung des Anti-Loop-Antikörpers (*Kausalya/Amasheh et al., 2006*).

Claudin-16 wird in TJs der Niere am Ort der stärksten Magnesiumresorption exprimiert. Auf die von *Simon et al., 1999* aufgestellte Behauptung, dass Claudin-16 funktionelle Kanaleigenschaften besitzt und den parazellulären Transport divalenter Kationen wie Kalzium und Magnesium reguliert, basieren viele in den letzten Jahren durchgeführte Untersuchungen. Die Vermutung, dass die überwiegend negative Ladung der ersten extrazellulären Schleife eine wichtige Rolle bei der Selektivität für divalente Kationen spielt (*Colegio et al., 2003; Hou und Goodenough, 2005*), wird kontrovers diskutiert. Tatsächlich betrifft nämlich keine der bisher nachgewiesenen Mutationen bei der FHHNC diese negativen Ladungen der ersten extrazellulären Schleife (*Weber et al., 2000; Weber et al., 2001 b; Müller et al., 2003; Müller et al., 2006 a; Müller et al., 2006 b*). Trotz zahlreicher Bemühungen ist derzeit der genaue

Mechanismus nicht geklärt, mit dem Claudin-16 den Magnesiumtransport in der Niere und damit den Magnesiumhaushalt des Organismus beeinflusst.

In dem von *Hou et al. 2007* präsentierten Claudin-16-Knockdown-Maus-Modell wiesen die Mäuse das typische Phänobild der FHHNC auf, litten unter Magnesiämie und hatten laborchemisch eine vierfache Erhöhung der Kalzium- und Magnesiumausscheidung. Zusätzlich erhöhte sich die Ausscheidungsrate von Natrium.

1.5.1 Claudin-16 und Claudin-19 Interaktion

Angelow et al., transfizierten 2007 niederohmige MDCK II Zellen mit Claudin-19. Dabei konnte ein durch Claudin-19 induzierter Anstieg des transepithelialen Widerstandes und eine verminderte parazelluläre Permeabilität mono- und divalenter Kationen gemessen werden. Die Permeabilität von Chlorid (Cl⁻) blieb im Vergleich zu Kontrollzellen unverändert.

Hou et al. transfizierten 2008 sowohl niederohmige MDCK II Zellen als auch LLC-PK1 Zellen mit Claudin-19 gemeinsam und ohne Claudin-16. Sie verzeichneten einen Anstieg des transepithelialen Widerstandes und in den LLC-PK1 Zellen einen Abfall der Permeabilität von Chlorid und eine geringfügige jedoch signifikante Erhöhung der Permeabilität von Magnesium. Die Permeabilität von Natrium blieb unverändert.

Sie konnten ebenfalls eine direkte Interaktion zwischen Claudin-16 und Claudin-19 nachweisen, Mutationen in diesen Claudin-16/Claudin-19-Heteromeren stellten sich dabei als relevant bei der FHHNC heraus.

2009 zeigten *Hou et al.*, in einer weiteren Studie, dass Claudin-19-Knockdown-Mäuse einen Phänotyp der FHHNC entsprechend, entwickeln. Zusätzlich beobachteten sie einen gestörten renalen Salztransport. Interessant ist, dass diese Mäuse einen Verlust von Claudin-16 in den TJ des TAL aufwiesen, umgekehrt zeigten die Claudin-16-Knockdown-Mäuse einen Verlust von Claudin-19 innerhalb der TJ des TAL. Diese Beobachtung unterstützt die Vermutung, dass eine heteromere Interaktion von Claudin-16 und Claudin-19 für ihren intakten Aufbau innerhalb der TJs notwendig ist.

1.5.2 Magnesium (Mg^{2+})-Transport in der Niere

Magnesium (Mg^{2+}) ist das häufigste Kation im intrazellulären Raum und hat eine herausragende Bedeutung bei der Aufrechterhaltung vielfältiger Zell- und Stoffwechselfunktionen. Die Niere spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Mg^{2+} -Homöostase.

In der Niere werden bis zu 97% des glomerulär filtrierte Magnesiums wieder rückresorbiert, nur 3-5% werden mit dem Urin ausgeschieden. Die Resorption des glomerulär filtrierte Magnesiums in den einzelnen Tubulussegmenten eines Nephrons weist deutliche Schwankungen auf.

Etwa 10-25% werden im proximalen Tubulus rückresorbiert.

Der weitaus größte Teil der Magnesiumrückresorption findet im dicken aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife (TAL) statt und beträgt in diesem Bereich etwa 70% (*Cole und Quamme, 2000; Satoh und Romero, 2002*). Der Transport erfolgt hier überwiegend parazellulär (*Satoh und Romero, 2002*), angetrieben durch das lumenpositive Potential (*Di Stefano et al., 1993*).

Obwohl im distalen Tubulus nur 5-10% der Mg^{2+} -Rückresorption stattfindet, ist dieser Anteil für die endgültige Menge der Mg^{2+} -Ausscheidung ausschlaggebend (*Konrad et al., 2004*). Im Unterschied zu dem Transport der beiden erst genannten Abschnitte, findet im distalen Tubulus ein aktiver transzellulärer Transport von Magnesium statt. Dieser findet über einen basolateral gelegenen Na^+/Mg^{2+} -Antiport und über apikale Mg^{2+} -Kanäle statt (*Schlingmann und Guedermann, 2005*).

Im Sammelrohr findet kein nennenswerter Transport von Magnesium statt.

1.6 Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Strategie für die funktionelle Charakterisierung des Tight Junction-Proteins Claudin-16 in Epithelzellen entwickelt werden. Folgende Ziele wurden verfolgt:

1. Darstellung der endogenen Claudin-16-Expression, sowie des transepithelialen Widerstandes der Zelllinien MDCK-C7 und -C11, HT-29/B6, T84 und Caco-2.

Verwendete Methoden: Western Blot, Immunfluoreszenzfärbung, konfokale Laserscanning-Fluoreszenzmikroskopie (CLSM), Widerstandsmessungen.

2. Expression von FLAG-markiertem Claudin-16 durch stabile Transfektion von MDCK-C7-Zellen. Methoden: Klonierung, PCR-Verfahren, stabile Transfektion, Selektion.

3. Nachweis der Claudin-16-Expression durch Western Blot und konfokaler Laserscanning-Fluoreszenzmikroskopie im Vergleich zu Vektor-transfizierten Kontrollzellen.

Verwendete Methoden: Western Blots, Immunfluoreszenzfärbung und anschließende Darstellung mit Hilfe konfokaler Laserscanning-Fluoreszenzmikroskopie (CLSM).

4. Funktionelle Analyse Claudin-16 transfizierter Zellen.

Verwendete Methode: Elektrophysiologische Messung des transepithelialen Widerstands.

2 Material und Methoden

2.1 Zellen

2.1.1 Verwendete Zelllinien

In den Versuchsreihen dieser Arbeit wurden MDCK-C7-Zelllinien (Madin-Darby canine kidney) verwendet.

Die MDCK-Zellen wurden erstmals durch Madin und Darby (*Madin und Darby., 1958*) aus dem Sammelrohr der weiblichen Hundeniere isoliert. Sie haben den Vorteil, in Nährmedien ausgesprochen gut kultiviert werden zu können, wodurch sie immer wieder für Versuchsreihen benutzt werden können. Zudem wachsen sie in einem Zellverband heran, in welchem sie den epithelialen Zellen entsprechende Barrieren ausbilden (*Gonzales-Mariscall et al., 1985; Meza et al., 1980*).

Neben der in dieser Arbeit verwendeten C7- gibt es noch die C11-Zelllinie. Diese Bezeichnungen beschreiben verschiedene genetische Untergruppen der MDCK-Zellen, welche sich in ihren morphologischen und funktionellen Eigenschaften voneinander unterscheiden (*Gekle et al., 1994*).

Die C7-Zellen zeichnen sich durch einen hohen transepithelialen Widerstand (R^t) von über $1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ aus und ähneln den Hauptzellen des Sammelrohres.

Demgegenüber weisen die C11-Zellen Ähnlichkeiten zu den Zwischenzellen des Sammelrohres auf und besitzen einen R^t von ca. $50 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (*Barker et al., 1981; Kesting et al., 1993; Gekle et al., 1994*).

Aufgrund ihres relativ schnellen Wachstums sind diese Zelllinien insbesondere für Transfektionsexperimente gut geeignet. Mit Hilfe von elektrischen Widerstandsmessungen bei den heranwachsenden Einzellzellschichten (Monolayern) vor und nach der Transfektion, lassen sich die Barriereigenschaften der Claudine charakterisieren.

Die MDCK-Zellklone dieser Arbeit stammen von der Arbeitsgruppe Oberleithner, Institut für Physiologie der Universität Münster und gehen aus den MDCK-Zellen der American Type Culture Collection (ATCC) hervor.

2.1.2 Verwendete Zellkultur

In 25 cm² Zellkulturflaschen wurden die Zellen in Dulbecco's Minimum Essential Medium (MEM) unter Zugabe von 10% fötalem Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin und 100 mg/l Streptomycin bei 37°C und einem 95:5-Gemisch aus Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid in einem Begasungsbrutschrank kultiviert. Etwa alle 10 Tage wurden die Zellen passagiert, dreimal wöchentlich wurde das Medium gewechselt. Verwendet wurden Zellen der sechzigsten bis achtzigsten Passage. Mittels 0,05% Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen von den Kulturflaschen abgelöst und anschließend auf 0,6 cm² Kunststoff-Filter (Millicell-HA 10 mm) ausgesät. Nach ca. 72 Stunden bildeten die MDCK-Zellen einen einschichtigen konfluenten Zellrasen (Monolayer), welcher unter dem Lichtmikroskop dargestellt werden konnte.

2.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Agarosegel-Elektrophorese Kammern	Biorad, München
Begasungsbrutschrank, B5060 EC/CO2	Heraeus, Hanau
RNA/DNA Calculator Gene Quant II	Pharmacia Biotech, Freiburg
GeneAmp PCR System 2400	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Heizblock	Grant, Berlin
Hybridisierungsöfen Model12/24	Unitherm, Karlsruhe
Inkubator 1000, Uni max 1010	Heidolph, Kelheim
Konfokalmikroskop LSM510	Zeiss, Jena
Lumineszenzbild Analysator (LAS 1000)	Fuji, Düsseldorf

Magnetrührer	Ika-Combimag, München
Mini-Protean 3 Elektrophoresesystem	Biorad, München
Mini Trans-Blot Transfer-Zelle	Biorad, München
pH-Meter, Typ 761	Nick, Berlin
Plattenlesegerät Spectra Classic	Tecan, Crailsheim
Power Pac 300	Biorad, München
Speed Vac	Uniequip, Martinsried
Sequenziergerät: AbiPrism Model 310	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Schnittstelleneinheit, Mod. 1250, 1286	Solartron Schlumberger, Farnborough, UK
Thermostat 5320	Eppendorf, Köln
Transilluminator Quickstore	MS Laborgeräte, Heidelberg
Tri-Carb2100TR Szintillationszähler	Packard, Meridan, CT, USA
Ussing-Kammer	Institut f. Klinische Physiologie, CBF, Charité Berlin
UV-Crosslinker	Pharmacia Biotech, Freiburg
Vortexgerät Pharmacia	Pharmacia Biotech, Freiburg
Wasserbad SW 21/TWB 5	Julabo, Selbach

Widerstandsmessgerät	Institut f. Klinische Physiologie, CBF, Charité Berlin
Wippe	Fröbel Labor Technik, Lindau
Zentrifugen	Hermle Z233MK, Wehingen Eppendorf 5414C, Köln Beckman Ti 70.1 Avanti J25, Unterschleisheim Lohhof

2.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Advantage 2 Polymerase Mix	Clontech, Heidelberg
Ag/AgCl ⁻ Bezugselektroden	Ingold, Steinbach
Agarose	Life Technologies, Karlsruhe
Alexa Fluor Antikörper	MoBiTec, Göttingen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Taufkirchen
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm
Anti-Claudin-AK (Rabbit) / Anti-Occludin-AK (Mouse)	Invitrogen/Zymed, San Francisco, CA, USA
Bacto Agar	Difco, Heidelberg
BCA Protein Assay Reagenz A+B	Pierce, Rockford, Illinois
BigDye Terminator Sequencing Kit	PE Applied Biosystems, Weiterstadt

Bromphenolblau (Laemmli)	Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig
BSA (100 x)	BioLabs, Frankfurt am Main
Kaleidoscope Marker	Sigma, Taufkirchen
dATP,dTTP, dCTP,dGTP	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Dulbecco´s Minimum Essential Medium (MEM)	Biochrom, Berlin
EDTA 0,5 M	Serva, Heidelberg
EGTA 0,5 M, 1mM	Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid	Life Technologies, Karlsruhe
Ethanol	J.T. Backer, Deventer, Niederlande
FKS	Biochrom, Berlin
Flüssigstickstoff	Linde, Berlin
Formaldehyd	Sigma, Taufkirchen
Formaldehyd Gel Puffer	Eppendorf, Köln
Glycerol	Serva, Heidelberg
Glycin	Serva, Heidelberg
High Pure Kit	Roche, Mannheim
HotStar Taq DNA-Polymerase Kit	Qiagen, Hilden
IPTG	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	J.T. Backer, Deventer, Niederlande

LB-Medium Tabletten	Bio 101, Vista, Kalifornien
Lipofectamine Plus Transfektionskit	Life Technologies, Karlsruhe
Lumi-Light Western-Blotting Kit	Roche, Mannheim
Magnesiumchlorid	Merck, Berlin
Methanol	Merck, Berlin
Molekulargewicht Standard I Hind III	Life Technologies, Karlsruhe
Molekulargewicht Standard 100 bp	Life Technologies, Karlsruhe
0,24-9,5 kb RNA-Marker	Life Technologies, Karlsruhe
Natriumacetat, -Fluorid	Merck, Berlin
Natriumchlorid	Serva, Heidelberg
Natriumorthovanadat	Sigma, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Merck, Berlin
PBS-Tabletten	Life Technologies, Karlsruhe
Plusreagenz	Life Technologies, Karlsruhe
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIA Quick Gelextraktionskit 50	Qiagen, Hilden
Quick Prep Micro mRNA Purification Kit	Amersham Biotech, Braunschweig
Random-Primer DNA Labeling System	Life Technologies, Karlsruhe
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Beverly, MA,USA
RNAzol B	WAK-Chemie, Bad Soden

SBTI	Sigma, Taufkirchen
SDS	Merck, Berlin
SOC	Clontech, Heidelberg
SSC 20 X	Life Technologies, Karlsruhe
TEMED	Life Technologies, Karlsruhe
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Groningen, Holland
TAE 50 X	Life Technologies, Karlsruhe
T4 DNA Ligase	Biolabs, Frankfurt am Main
Tris	Merck, Berlin
Tris Base	Calbiochem, Bad Soden
Tris-HCl 1,5M, pH8,8 / 0,5M, pH 6,8	Biorad, München
Tris-HCl 1M, pH 7,4	Life Technologies, Karlsruhe
Triton X 100	Roche, Mannheim
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
TSR Sequenzierungsreagenz	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Vektor (pFLAG-CMV4)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Vektor (pCDNA 3)	Invitrogen, Groningen, Holland
Vektor (pCR2.1TOPO)	Promega, Madison, Wis., USA
Wasser	Fluka, Seelze

Sofern die Herkunft von Chemikalien im Text nicht genannt ist, stammen diese von der Firma Sigma, Taufkirchen.

2.4 Materialien

Material	Hersteller
Centriflex-Säulchen	Mobitec, Göttingen
Gel-Blotting-Paper	Schleicher und Schuell, Dassel
10 ml PPN-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
50 ml PPN-Röhrchen	Nunc, Karlsruhe
Kryo-Röhrchen	Brand, Wertheim
Kunststoff-Filter	Millipore Corp., MA, USA
Magnetrührstäbchen	Merck, Berlin
Nylon Membran	Roche, Mannheim
Objektträger	Menzel, Braunschweig
Pipetten	Eppendorf, Köln
Poly Screen PVDF-Transfer Membran	NEN, Köln
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Plastibrand, Wertheim

Reaktionsröhrchen(PCR) 0,2 ml	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Röntgenfilm X-OMAT AR/LS	Kodak, Rochester, NY
Sequenzierungsröhrchen mit Septum	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Standardtips 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Köln
Zellkulturflaschen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellschaber	Costar, Corning, NY

2.5 Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Menge	Bestandteile
Membran-Lysepuffer:	2 ml	Tris HCl, pH 7,4
	500 µl	1M MgCl ₂
	200 µl	0,5 M EDTA
	120 µl	0,5 M EGTA
	Aqua bidest. ad 100 ml	

Zusätzlich ergänzen für frischen Lysepuffer (je 5 ml):	5µl	1000 x SBTI
	100 µl	50 x PPI
	50 µl	100 x PIC
	5 µl	Aprotinin

Elektrophoresepuffer:	100 ml	10 x Puffer West
	10 ml	10% (w/v) SDS
	Aqua bidest. ad 1l	

Transferpuffer:	100 ml	10 x Puffer West
	100 ml	Methanol
	Aqua bidest. ad 1l	

PBS/Tween:	2 Stück	PBS-Tabletten
	1 ml	Tween
	Aqua bidest. ad 1l	

PBS/Tween / 5% Magermilchpulver:	5 g	Magermilchpulver
	PBS/Tween ad 100 ml	

BSA-Blockierungslösung:	5 % (w/v)	BSA
	0,02 % (w/v)	Natriumazid
	in PBS/Tween	

Pierce BCA (je Probe)	196 µl	Protein Assay Reagenz A
	4 µl	Protein Assay Reagenz B

0.5% Triton-X100	5 ml	Triton-X
	300 ml	PBS

5% Goat-Blockierungslösung	1.5 ml	Goat Serum
	30 ml	PBS

0.4 M Sukrose-Lösung	400 mM	Sukrose
	MEM ad 1l	

4-PBA-Lösung	5 mM	4-Phenylbutyrat
	Aqua bidest. ad 1l	

Standard Ringer-Lösung	21 mM	NaHCO ₃
	119 mM	NaCl
	5.4 mM	KCl
	1 mM	MgSO ₄
	1.2 mM	CaCl ₂
	3 mM	HEPES
	10 mM	Glukose
	Aqua bidest. ad 1l	

nominell Mg ²⁺ -freie Ringerlösung	21 mM	NaHCO ₃
	119 mM	NaCl
	5.4 mM	KCl
	1.2 mM	CaCl ₂
	3 mM	HEPES
	10 mM	Glukose
	Aqua bidest. ad 1l	

Mg ²⁺ -freie, glucosefreie Ringerlösung	21 mM	NaHCO ₃
	119 mM	NaCl
	5.4 mM	KCl
	1.2 mM	CaCl ₂
	3 mM	HEPES
	Aqua bidest. ad 1l	

modifizierte Ringer-Lösung	21 mM	NaHCO ₃
	238 mM	Mannitol
	5.4 mM	KCl
	1 mM	MgSO ₄
	1.2 mM	CaCl ₂
	3 mM	HEPES
	10 mM	Glukose
	Aqua bidest. ad 1l	

EDTA-Lösung	10 mM	EDTA
	Aqua bidest. ad 1l	

Magnesiumsulfatlösung	100 mM	MgSO ₄
	Aqua bidest. ad 100 ml	

20% La ₂ O ₃ in 32% HCl	61 mM	La ₂ O ₃
	1 M	HCl
	Aqua bidest. ad 100 ml	

Primer:

Es wurden

1. spezifische Primer entsprechend der humanen Claudin-16-Sequenz

Sense: CTTCCGGATAATGACCTCCAGG

Antisense: ACGTGCATTTTACACCCTTGT

2. Forward und Reverse Primer, welche eine Schnittstelle für Hind III aufwiesen

Sense: AAAAGCTTATGACCTCCAGGACCCCACTGT

Antisense: AAAAGCTTTTACACCCTTGTGTCTACAGCA

verwendet.

Alle Ringer-Lösungen der elektrophysiologischen Versuchsreihen wurden bei der Herstellung mit Hilfe von NaOH auf einen pH-Wert von 7,8 titriert. Durch Begasung mit einem 95:5 Gemisch aus Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid sowie einer Umgebungstemperatur von 37°C während der Versuche, wurde ein pH-Wert von 7,4 erreicht und gewährleistet.

2.6 Molekularbiologie

2.6.1 Western Blot

Um herauszufinden, ob ein bestimmtes Claudin in den TJ-Proteinen der Schlussleisten bestimmter Zellreihen exprimiert wird, um im Folgenden die Änderung des transepithelialen Widerstandes mit der Expression des jeweiligen Claudins in Zusammenhang bringen zu können, wurden Western Blots durchgeführt.

Dieses Verfahren dient der gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe. Da die kleineren Moleküle in der Lage sind, das Gel schneller zu durchwandern als größere Proteine, ergibt sich folglich ein Trennmuster, welches auf einen geeigneten Trägerfilter übertragen wird. Es entsteht eine exakte Kopie des Gels, wobei die Proteine auf dem Filter immobilisiert werden. Diese sind nun der Behandlung mit verschiedenen Antikörpern zugänglich. Das Claudin-16 wurde mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. Im Folgenden sind die einzelnen Schritte dargestellt: Membranprotein-Extraktion, Proteinquantifizierung, Gelelektrophorese, Elektrotransfer, Immundetektion.

2.6.1.1 Membranprotein- Extraktion

Dieser Vorgang diente dazu, die unterschiedlichen Proteinfractionen (Gesamtproteine, zytosolische und membrangebundene Proteinfractionen) aus den Zelllinien MDCK-C7, MDCK-C11, HT-29/B6, T84 und Caco-2 herauszupräparieren. Hierbei wurde auf Eis gearbeitet. Aus den konfluent mit Zellen bewachsenen 25 cm² Flaschen wurde das Medium abgeschüttet und die Flaschen jeweils mit 5 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 2 ml Lysepuffer und einem Cell-Scraper von der

Unterlage abgeschabt, wobei für jeden Zelltyp ein Scraper benutzt wurde. Die Zellsuspension wurde mit einer 1000 µl Pipette aufgezogen und in ein Eppendorfröhrchen überführt. Um die Zellsuspension zu homogenisieren, wurde diese 13 mal durch eine Insulinnadel gezogen. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfröhrchen überführt. Nach erneuter Zentrifugation über 30 min bei 4300 g und 4°C, wurde der Überstand abgenommen, die membranständigen Proteine, die das Pellet bildeten, mit 100 µl eiskaltem Lysepuffer durch mehrmaliges Aufziehen equilibriert.

2.6.1.2 Proteinquantifizierung

Die quantitative Bestimmung der Proteine wurde mittels Absorptionsmessungen im Team Spectra- Plattenlesegerät durchgeführt. Dafür wurde Pierce BCA (Bicinchonisäure) Protein Assay Reagenz verwendet. Jeweils 10 µl Probe wurden mit 190 µl BCA Gebrauchslösung gemischt. Eine Standardreihe von BSA-Lösungen bekannter Konzentrationen (0,0 - 0,2 - 0,8 und 1,2 mg BSA/ml) sowie 10 µl Lysepuffer dienten zur Kontrolle. Dabei wurden sowohl für die Proben als auch für die Kontrollen Doppelwerte angesetzt. Der Ansatz der Mikrotiterplatten erfolgte wie folgt:

Tabelle 3: Ansatz der Mikrotiterplatten bei der Proteinquantifizierung

	1	2	3	...
A	0,0 mg/ml BSA	0,0 mg/ml BSA	Probe 1	Probe 1
B	0,2 mg/ml BSA	0,2 mg/ml BSA	Probe 2	Probe 2
C	0,8 mg/ml BSA	0,8 mg/ml BSA	Probe 3	Probe 3
D	1,2 mg/ml BSA	1,2 mg/ml BSA	Probe 4	Probe 4
E	Lysepuffer	Lysepuffer	Probe	Probe ...

Danach wurden die Mikrotiterplatten bei 37°C 30 Minuten lang inkubiert, danach auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt. Mittels der Messung der Lichtabsorption bei 562 nm Wellenlänge erfolgte die Proteinquantifizierung. Unter Abzug der Werte des Lysepuffers wurde aus dem Mittel der Probenwerte die Konzentration der Proteine

ermittelt. Aus den Standardwerten erfolgte durch lineare Regression die Erstellung einer Eichkurve.

2.6.1.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Über die Durchwanderung eines elektrischen Feldes können durch die Polyacrylamid-Gelelektrophorese geladene Proteine aufgetrennt werden. Die Ladung und Größe der Makromoleküle, die Porenstruktur des Polyacrylamid-Gels sowie die angelegte Spannung bestimmen dabei maßgeblich das Wanderungsverhalten der Proteine.

Das 12,5 % Trenngel wurde bis zur Unterkante des grünen Gelgießstandes der Mini-Protean-Apparatur mit einer 1000 µl Pipette pipettiert und 1 cm absoluten Alkohols (Isopropanol) vorsichtig aufgeschichtet. Nach 30-minütiger Polymerisation wurde der Alkohol abgegossen, der Rest mit einem 3MM-Papier vorsichtig trockengesaugt und das Sammelgel bis zur Oberkante der kleinen Glasplatte mit einer 1000 µl Pipette pipettiert. Um kleine Probestaschen zu bilden, wurde luftblasenfrei ein Kamm eingesetzt. Nach erneuter Polymerisation über 30 min, wurde der Kamm entfernt und die Taschen mittels einer Spritze mit Elektrophoresepuffer gespült. Anschließend wurden die Gele in die Elektrodenhalterung eingespannt, in die Elektrophoresekammern eingesetzt und der Elektrophoresepuffer angegossen. Die Konzentrationsbestimmung wurde wie folgt durchgeführt:

Tabelle 4: Konzentrationsangaben für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

	MDCK-C7	MDCK-C11	HT29/B6	T84	CACO2
Probe µl	2,42	2,81	1,89	1,16	3,36
LP µl	7,58	7,19	8,11	8,84	6,64
Laemmli 5x µl	5	5	5	5	5

Zum Anfärben wurden insgesamt 10 µl Proteinlysate mit 5 µl Bromphenolblau (Laemmli) vermischt. Die Proteine wurden vor der Elektrophorese für 5 min bei 95°C denaturiert, kurz abzentrifugiert und mit einer Hamiltonspritze aufgetragen. Als

Größenmarker wurden 12 µl von dem Sigma Kaleidoskop-Marker benutzt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 100 V für ca. 1h, bis sich die Bromphenolblau-Lauffront 1 cm vor dem unteren Ende des Gels befand.

2.6.1.4 Elektrotransfer von Proteinen

Da sich eine Membran als deutlich praktikablere Trägermatrix von aufgetrennten Proteinen im Vergleich zu einem Gel erweist, können durch den Elektrotransfer von Proteinen (Blotten) aufgetrennte Proteine aus SDS-Gelen auf Nitrocellulosemembranen übertragen werden. Der Transfer erfolgt mittels eines elektrischen Feldes. Die durch die SDS negativ geladenen Proteine wandern innerhalb des elektrischen Feldes zur Anode. Vor dieser befindet sich die Nitrocellulosemembran, so dass die Proteine aus dem Gel, von der Kathodenseite ausgehend auf die Membran wandern.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Polyscreen PVDF-Membran auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und für ca. 5 min in absolutem Alkohol angefeuchtet. Anschließend wurden die Gele, die PVDF-Membran und 2 Schwämme für ebenfalls ca. 5 min im Transferpuffer inkubiert. Letztlich wurde das sogenannte Gel-Membran-Sandwich folgendermaßen luftblasenfrei hergestellt:

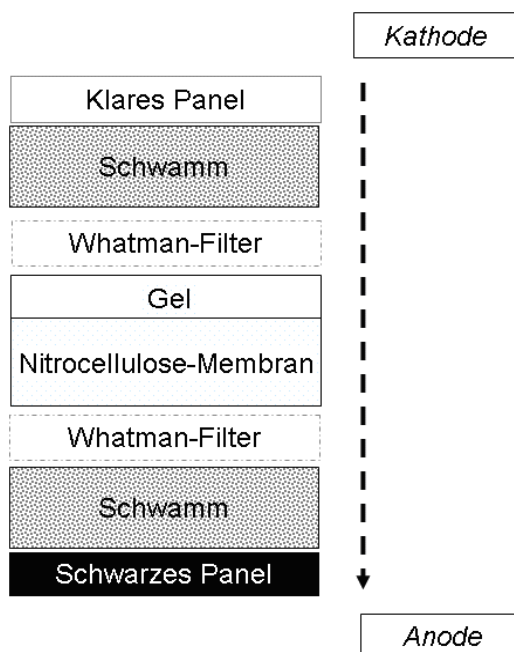


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Elektrotransfers von Proteinen aus SDS-Gelen auf eine Nitrocellulosemembran

Dieses Sandwich wurde in die Elektrodenkammer überführt und zusammen mit einem Kühlakku und Rührstäbchen in die Pufferkammer eingesetzt. Nachdem der Transferpuffer angegossen wurde, erfolgte der Transfer für 60 min bei einer konstanten Spannung von 100 V.

2.6.1.5 Immundetektion

Mit Hilfe der Immundetektion werden Proteine, die auf der Nitrocellulosemembran fixiert wurden, mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. In dieser Arbeit sind Antikörper gegen Occludin, Claudin-16 und FLAG verwendet worden. Nach einer kurzen Spülung mit PBS/Tween/5% (w/v) wurde die Membran bei RT für 2 h mit 50 ml PBS/Tween/5% (w/v) Magermilchpulver in eine Glasküvette gelegt. Dieser Vorgang diente zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Danach wurde die Membran in der Glasküvette erneut kurz mit PBS/Tween gespült und mit 50 ml BSA-Blockierlösung für weitere 2 h bei RT inkubiert. Der erste Antikörper wurde mit einer Konzentration von 1: 2000 in die Lösung gegeben und für 2 h bei RT auf einer Wippe abgestellt. Nach einem dreimaligen Waschvorgang der Membran in PBS/Tween bei RT für jeweils 10 min, wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper einer Konzentration von 1:1000 für 90 min auf der Wippe inkubiert. Nach einem zweimaligen Waschvorgang der Membran wurde die überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier entfernt. Anschließend wurden zu der Membran 10 ml LumiLight-Lösung (5 ml Lösung 1 und 5 ml Lösung 2) hinzugefügt und für genau 5 min im Dunkeln inkubiert. Schließlich wurde die Membran zwischen zwei Transparentfolien gelegt und im Dunkeln in einer Filmkassette aufbewahrt. Die Detektion des Lichtes, welches bei der Spaltung des LumiLight-Substrates ermittelt wurde, erfolgte schließlich im LAS 1000.

2.6.2 Claudin-16-cDNA

Als Erststrang-cDNA diente eine kommerziell erhältliche cDNA (Human QUICK-Clone cDNA, Clontech). Für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden spezifische Primer entsprechend der humanen Claudin-16-Sequenz verwendet

(Sense: CTTCCGGATAATGACCTCCAGG; Antisense: ACGTGCATTTTACACCCTTGT). Das hieraus resultierende 936 bp lange PCR-Produkt beinhaltet die vollständige Claudin-16-Sequenz und wurde anschließend in den pCR2.1-Topo Vektor (Promega, Madison, WI, USA) ligiert. Um die Sequenz hiernach in den eukaryotischen Expressionsvektor pFLAG-CMV4 (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo., USA) umklonieren zu können, wurde die Richtigkeit der Basenabfolge durch Sequenzierungen überprüft. Benutzung fanden veränderte Forward und Reverse Primer, welche eine Schnittstelle für HindIII aufwiesen (Sense: AAAAGCTTATGACCTCCAGGACCCCACTGT; Antisense: AAAAGCTTTTACACCCTTGTGTCTACAGCA). Nach dem folgenden Schnitt und der Ligation resultierte pFLAG-Cld-16, welcher als Ausgangsvektor für die stabile Transfektion von MDCK-C7-Zellen gemäß der Lipofectamin-Plus-Methode fungierte.

2.6.3 Polymerase-Kettenreaktion

2.6.3.1 Grundprinzipien der Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation von spezifischen DNA-Bereichen. Das Grundprinzip der PCR ist die enzymatische Verdoppelung einer DNA-Sequenz. Dazu werden zwei Oligonukleotide, die Primer und eine hitzestabile Polymerase, in diesem Fall die Pfu-Polymerase, benötigt. Folgende Reaktionsschritte sind im Einzelnen durchgeführt worden:

1. Trennung der Doppelstränge der Matrizen-DNA (95°C, 1 min).
2. Annealing der Primer an homologe Bereiche der Template-DNA (55°C, 1 min).
3. Primerextension und Erstellung der Kopie der DNA-Matrize mittels Pfu-Polymerase (72°C, 1:30 min).

Zwei zusätzliche Schritte wurden nur einmal durchgeführt: vor Beginn der Zyklen eine vollständige Denaturierung der DNA bei 95°C (1 min) und zum Schluß einer PCR-Reaktion eine Phase zur Beendigung aller begonnenen Polymerisationen (72°C, 10 min). Durch fünfunddreißigfaches Wiederholen eines PCR-Zyklus wurde eine vieltausendfache Vermehrung der spezifischen DNA-Sequenz erreicht.

2.6.3.2 Colony-PCR

Um herauszufinden, ob die gewünschte DNA-Sequenz im Plasmidvektor vorhanden ist, wurde die Colony-PCR durchgeführt. Vorab wurden neue Ampicillinplatten in Kästchen eingeteilt und nummeriert. Einzelne transformierte Kolonien wurden dann mittels einer Pipettenspitze zunächst auf die neue Agarplatte und anschließend in die PCR-Tubes mit je 5 µl 1% Triton X-100 überführt. Für die anschließende PCR wurde der CMV4 Forward-Primer als vektorspezifisch und ein Claudin-16 Reverse Primer als insertspezifisch benutzt.

Für die Colony-PCR waren folgende Substanzen im Reaktionsansatz nötig:

5 µl	PCR Puffer II
3 µl	25 mM MgCl ₂
0,2 µl	AmpliTaq (PE)
2,8 µl	2,5 mM je dNTP-Mix
1 µl	10 µM Vektor Primer
1 µl	10 µM Insert-spezifischer Primer
32 µl	H ₂ O

Die PCR-Reaktionsschritte im Einzelnen:

94°C	4 min
94°C	20 sec
55°C	20 sec
72°C	1:30 min
72°C	2 min
4°C	∞

Anschließend wurden aus jedem PCR-Ansatz 10 µl entnommen und mit je 2 µl Marker vermischt. Die Auftrennung erfolgte auf einem 1% Agarosegel. Die Plasmidreinigung erfolgte aus den Kolonien, bei denen die gesuchte DNA-Sequenz nachzuweisen war.

2.6.4 Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurde das Sanger-Verfahren verwendet (*Weiske et al., 2001*), auch als enzymatische DNA-Sequenzierung oder Kettenabbruch-Methode bezeichnet. Die zu sequenzierende DNA muss in einzellsträngiger Form vorliegen. Zusätzlich zu den normalen Desoxy-Nucleosid-Triphosphaten wurden fluoreszenzmarkierte 2,3-Dideoxy-Nucleosid-5-Triphosphate verwendet (ddNTP). Da den ddNTPs die 3-OH-Gruppe fehlte, kam es zum Abbruch der Elongation. Für die Sequenzierung lag die DNA in mehreren, kleineren Fragmenten vor, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren. Diese wurden in einer Kapillargelelektrophorese aufgetrennt. Die anschließende Detektion der Fragmente erfolgte mittels eines Lasers. Das daraus resultierende Elektropherogramm stellte die Grundlage für die computergestützte Analyse der DNA-Sequenz dar.

Der Reaktionsansatz wurde wie folgt in einem MikroAmp-Tube zusammengemischt:

4 µl	Premix
5 µl	Miniprep DNA
10 pmol	Primer (M13)
10 µl	H ₂ O

Die anschließende Amplifizierung erfolgte in 25 PCR-Zyklen in folgenden Reaktionsschritten:

5 min	96°C
10 sec	96°C
5 sec	55°C
4 min	60°C
4°C	∞

Die Aufreinigung wurde in Centriflex-Tubes durchgeführt. Zunächst wurden die Säulen der Centriflex-Tubes bei 750 xg leer zentrifugiert und in ein neues Eppendorfröhrchen überführt. In die Mitte des Gelbetts wurden 15 µl des Reaktionsansatzes pipettiert und die Säule bei 750 xg und 4°C für 2 min zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen, das Eluat in Sequencer Vials gegeben, mit einem Gummistopfen verschlossen und für ca. 20 min in der SpeedVac getrocknet. Das Restvolumen, von ca. 5 µl wurde in 20 µl TSR resuspendiert und das Sequencer Vial mit einem Septum verschlossen. Die DNA-Stränge wurden bei 96°C und 3 min denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Nach kurzer Abzentrifugation wurden die Proben in das Sequenziergerät gegeben.

2.6.5 Agarosegel-Elektrophorese

2.6.5.1 Herstellung und Durchführung der Agarosegel-Elektrophorese

Um DNA-Stränge nach ihrer Größe voneinander zu trennen und ihre Größe durch Vergleich mit Strängen bekannter Größe zu bestimmen, wurde die Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. Mit Hilfe eines Agarosegels kann eine Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Länge von 70 bp bis zu einer Größe von 50 kb Länge erfolgen. Je höher das Gel konzentriert ist, desto kleiner ist der Trennbereich in bp. Für die Zubereitung von 1% Agarosegel wurden 1 g Agarosepulver und 100 ml TAE-Laufpuffer in einen Messkolben gegeben und für ca. 3 min in der Mikrowelle erhitzt. Nachdem die Agaroselösung nach ebenfalls ca. 3 min etwas abgekühlt war, wurde diese in die Gelkammer mit einem darin enthaltenen Kamm hineingegossen. Dieser

diente zur späteren Entstehung kleiner Einkerbungen im Gel, die als kleine Taschen zur Aufnahme der Proben dienten. Nach 30-40 min wurde das Gel fest und konnte in den Laufpuffer gelegt und der Kamm gezogen werden. Die entstandenen Taschen lagen an der negativen Elektrode der Kammer und das Gel war vollständig vom Laufpuffer bedeckt. In die erste Tasche wurde als Vergleich ein Farbmarker (DNA-mass ladder) und in die übrigen Taschen (Slots) wurden jeweils 5 ml von der Probe und jeweils 1/5 (zur Probe) vom Mix pipettiert. Die Elektrophorese fand bei einer Spannung von 60 bis 100 V statt. Nach 40-50 min wurde der Laufpuffer abgegossen und die einzelnen DNA-Fragmente in der Gelplatte unter UV-Licht sichtbar gemacht.

2.6.5.2 Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel

Mit Hilfe des Ethidiumbromids, welches an die Nucleinsäuren der einzelnen DNA-Plasmide bindet, konnten die Fragmente in dem Agarosegel unter UV-Licht fluoreszieren. Diese Fragmente wurden unter sorgfältiger Schutzvorkehrung aus dem Gel mittels Skalpell herausgeschnitten und in Collection Tubes überführt.

Für die eigentliche Aufreinigung der DNA-Fragmente wurde ein Qiagen Gel Extraktionskit verwendet. Zunächst wurden alle Gelstücke gewogen, anschließend das dreifache Volumen des Qiagen Gels hinzugefügt. Die Tubes haben dann für 10 min bei 50°C inkubiert. Dabei wurden sie alle 3 min gevortext. Nach den 10 min wurde ein Volumen (bezüglich des Gelstücks) Isopropanol hinzugegeben und erneut gevortext. Anschließend wurden micro-spin Säulen in 2,2 ml Collection Tubes eingehängt und max. 800 µl der Suspension beigefügt. Nachdem bei 10000 Umdrehungen und RT für 1 min zentrifugiert wurde, ist der Durchfluss verworfen und die restliche Flüssigkeit kurz in der Mikrozentrifuge abzentrifugiert und ebenfalls weggekippt worden. Zur Auswaschung wurden 750 µl Waschpuffer PE auf die micro-spin Säule gegeben, für 1 min bei RT inkubiert und erneut bei 10000 Umdrehungen und RT für 1 min zentrifugiert. Danach wurde der Durchfluss verworfen und die Collection Tubes bei gleichbleibender Einstellung trocken zentrifugiert. Nach einmaligem Wiederholen des Waschschruttes wurden die micro-spin Säulen in neue Röhren eingehängt. Nach Zugabe von 30-50 µl sterilem Wasser, sind die Tubes für 15 min bei RT zur Inkubation stengelassen worden. Schließlich wurde bei 10000 Umdrehungen für eine Minute bei RT zentrifugiert. Das gewonnene Eluat

enthielt nun die gereinigte DNA. Um anschließend die Menge der DNA bestimmen zu können, wurden 5 µl gereinigte DNA mit einem LMDM-Marker auf ein 0,5% -iges Agarosegel aufgetragen und die Probenbanden mit jeweiligen Markerbanden bekannter DNA-Konzentration verglichen.

2.6.6 Ligation

Als Ligation bezeichnet man die Verknüpfung zweier DNA-Enden mittels einer Ligase. Dieses Enzym katalysiert die Bindung zwischen 3'-OH-Enden und 5'-Phosphaten eines linearen DNA-Stranges.

Zur Vervielfältigung der DNA-Fragmente, dem Klonieren, wurden bakterielle Plasmidvektoren benutzt. Dabei handelt es sich um ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle. Normalerweise tragen sie Gene für die Konjugation von Bakterien aber auch für Antibiotikaresistenzen. Sie können nach Lyse der Bakterien durch einfache Zentrifugationsschritte in hoher Reinheit isoliert werden. Restriktionsendonucleasen schneiden die Plasmide an spezifischen Schnittstellen und Ligasen katalysieren den Einbau gewünschter DNA Fragmente in das Plasmid. Dieses kann dann auch als Expressionsvektor benutzt werden. Als Marker wurden Resistenzgene gegen Antibiotika auf den Plasmiden benutzt.

2.6.6.1 Ligation in den pTOPO Vektor

In ein 0,5 ml Eppendorfröhrchen wurden 4 µl des aufgereinigten Claudin-16-PCR-Produktes, 1 µl Salzlösung, 1 µl von dem pTOPO Vektor und 2 µl steriles Wasser pipettiert. Nachdem der Ansatz vorsichtig gemischt wurde, fand bei RT eine 30-minütige Inkubation statt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde das Reagenz auf Eis gestellt.

2.6.6.2 Ligation in den pFLAG-CMV4 Vektor

Der pFLAG-CMV4 Vektor hat eine Länge von 6229 bp und ist sowohl für transiente als auch für stabile Transfektionen geeignet. Die 24 bp lange FLAG-Sequenz befand sich am Übergang von der Vektor- zur Insert-DNA (hier Claudin-16-Sequenz). Folglich ergaben die Claudin-16- und die FLAG-Sequenz ein N-terminales Fusionsprodukt, welches von der aus dem humanen Cytomegalievirus stammenden Promoterregion aus reguliert wurde. Diese FLAG-Sequenz mit der Aminosäurekette Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys war später mit einem spezifischen anti-FLAG-Antikörper in erfolgreich transfizierten Zellen immunhistochemisch nachweisbar. Unmittelbar neben der FLAG-Sequenz lagen diverse Schnittstellen für bekannte Restriktionsendonukleasen (Multiple Cloning Region) vor. Die zuvor mit einer Schnittstelle für das Restriktionsenzym Bam HI amplifizierte Claudin-16-Sequenz lieferte folglich die Voraussetzung für eine nachfolgende Ligation der beiden Moleküle, indem mit dem erwähnten Restriktionsenzym parallel geschnitten wurde. Weiterhin befand sich auf dem Vektor-Plasmid ein Aminoglycosid-Phosphotransferase-II-Gen, dessen Gensequenz eine Resistenz gegen Aminoglycoside wie Geneticin (G418) kodierte. Dies war die Voraussetzung für die Selektion der erfolgreich mit dem Plasmid transfizierten Zellen, da nur diese auf dem mit G418 versetzten Nährmedium wachsen konnten. In Vorbereitung auf die Ligation des entsprechenden DNA-Fragments in den Plasmidvektor wurden jeweils 5 µl der DNA- und der Vektorprobe mit 1 µl Probenpuffer gemischt und auf einem 1% Agarosegel aufgetragen. Um die jeweilige Produktmenge für den Ligationsansatz bestimmen zu können, lief im Vergleich ein Marker (DNA Mass-Ladder) mit. Für den folgenden Ansatz wurden equimolare Mengen der Vektor-DNA und der jeweiligen

Claudin-DNA (1 µl Vektor-DNA und 5 µl Claudin-DNA) in einem Eppendorfröhrchen zusammengemischt. Zusätzlich wurden 1 µl Ligasepuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase hinzu pipettiert und der Ansatz durch steriles Wasser auf 10 µl aufgefüllt und vorsichtig gemischt. Nach einer 90-minütigen Inkubation bei RT wurde der Ligationsansatz bis zur Transformation auf Eis gelagert.

N-Terminal FLAG Expression Vectors

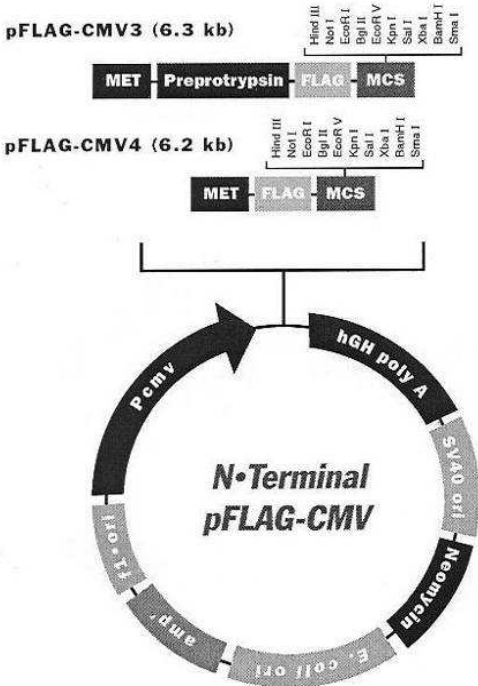


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Plasmidvektors pFLAG-CMV4 mit Vergrößerung der sogenannten „Multiple Cloning Region“.

2.6.7 Transformation und Blau-Weiß-Selektion

2.6.7.1 Transformation kompetenter Zellen

Als Transformation bezeichnet man das Einbringen des Vektor-Plasmids in eine Bakterienzelle. Als kompetente Zellen wurden Zellen eines E.coli Stammes verwendet.

Diese wurden vorsichtig auf Eis aufgetaut und je 50-100 µl in vorgekühlte 12 ml Greiner-Tubes aliquotiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Auf je 50 µl Bakterien Suspension wurden 2 µl DNA pipettiert und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Um die Bakterienzellen aufnahmefähiger zu machen, wurden sie für 30 Sek. bei 42°C schockerhitzt und erneut für 2 min zur Inkubation auf Eis gestellt. Zu diesem Ansatz wurden 250 µl SOC-Medium hinzugegeben und für 1 h bei 37°C unter 225 rpm geschüttelt. In Petrischalen wurden ampicillinbehandelte LB-Medien (50 µl/ml Ampicillin) gegossen und mit 40 µl X-gal-Lösung und 4 µl IPTG-Lösung behandelt und an der Luft getrocknet. Anschließend wurden 75 µl des Transformationsansatzes ausplattiert und im Brutschrank bei 37°C über Nacht zur Inkubation gelagert.

2.6.7.2 Blau-Weiß-Selektion

Um letztlich die erfolgreichen Klonierungen erkennbar zu machen, bedienen wir uns der sogenannten Blau-Weiß-Selektion.

Hierbei gilt, dass jene Bakterien, die einen zur Blau-Weiß-Selektion fähigen Vektor enthalten, ampicillinresistent sind, da der Vektor mit einem ampR-Gen ausgestattet ist. Die multiple cloning site (MCS) des Vektors liegt innerhalb des 5'-Abschnittes des lacZ-Gens, welcher den aminoterminalen Anteil der β-Galaktosidase kodiert. Als passende Bakterienstämme wählten wir diejenigen aus, welche in ihrem Genom den 3'-Abschnitt besaßen. Somit besaßen die Bakterien eine β-Galaktosidase, die sich aus dem Plasmid-kodierten Anteil des Vektors zusammensetzte. Die β-Galaktosidase kann X-GAL (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktosid) enzymatisch umsetzen und bildet Galaktose und den blauen Farbstoff 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol, welcher Kolonien blau erscheinen lässt. Durch den Einbau des DNA-Fragments innerhalb des lacZ-Gens wird das Leseraster zerstört und es kann keine β-

Galaktosidase mehr gebildet werden. Die Kolonien erscheinen weiß. Das bedeutet, dass die Kolonien, die durch das X-Gal blau erscheinen, noch eine funktionstüchtige β -Galaktosidase besitzen und somit keine Fremd-DNA enthalten. Sind die Zellkolonien nicht gefärbt, sind bei der Ligation DNA-Fragmente in den Vektor eingebaut und das Gen für die β -Galaktosidase ist zerstört worden.

2.6.8 Herstellung von Glycerolstocks

Zur langfristigen Aufbewahrung der plasmidhaltigen Bakterienkulturen wurden Glycerolstocks angefertigt. Dazu wurden 150 μ l Glycerol und 950 μ l der bakterienhaltigen Lösung in ein Eppendorfröhrchen steril pipettiert, für 10 Sek. in flüssigen Stickstoff gehalten und danach bei -80°C asserviert.

2.6.9 Plasmid-Miniprep

Von einer Stammplatte wurden mit Hilfe einer sterilen Öse einzelne Bakterienkolonien aufgepickt und jeweils in 4 ml ampicillinhaltiges LB-Medium in sterile Reagenzgläser mit Deckel übertragen. Diese wurden über Nacht bei 37°C und starkem Schütteln (200 rpm) kultiviert. Innerhalb dieser Zeitspanne wuchsen die Bakterienkolonien heran, sodass sie dann für eine Plasmidpräparation verwendet werden konnten. Es wurden jeweils 1,5 ml Bakteriensuspension in ein Eppendorf-Tube überführt und für 1 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, ist das Pellet in 300 μ l P1-Lösung resuspendiert und unter Zugabe von 300 μ l P2 Qiagen-Lösung für 5 min bei RT zur Inkubation stengelassen worden. Danach wurden unter vorsichtigem Invertieren 300 μ l P3 Quiagen-Lösung hinzugegeben und der Lösungsansatz für 15 min auf Eis zur Inkubation gelagert worden. Es folgte eine Zentrifugation über 15 min bei über 13000 rpm und 4°C . Nachdem 800 μ l Überstand mit 400 μ l Isopropanol gemischt worden sind erfolgte eine erneute Zentrifugation über 15 min und 13000 rpm und 4°C . Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das Pellet mit 500 μ l 70% Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation über 5 min bei RT und über 13000 rpm wurde der Überstand abgegossen und das Pellet für 15 min in der Speedvac getrocknet.

Anschließend wurde das Pellet in 50 µl steriles Wasser resuspendiert. Es wurden 2,5 µl für ein 0,7% Agarosegel und 5 µl für den Restriktionsverdau verwendet. Anhand der Laufgeschwindigkeit im Gel konnte überprüft werden, ob die Plasmid-DNA das gewünschte Insert enthielt, da es im Vergleich zum Kontrollvektor aufgrund seiner höheren Molekülgröße langsamer wanderte. Die Miniprep-DNA wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.6.10 Restriktionsverdau mit Bam HI und Eco RV

Restriktionsenzyme gehören zu der Gruppe der Endonukleasen und spalten Doppelstrang-DNA durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung. Sie kommen nur bei Bakterien vor und spalten an spezifischen Sequenzen, die sich durch eine palindromische Struktur auszeichnen.

Im folgenden Ansatz wurden 10 µl MIDI von Claudin-16 und 10 µl CMV4-Vektor in ein Eppendorfröhrchen pipettiert. Dazu wurden 3 µl Bam HI-Puffer, 1 µl Bam HI und 3 µl BSA hinzugegeben und der Ansatz auf je 30 µl Endvolumen durch steriles Wasser aufgefüllt. Nach einer 90-minütigen Inkubation bei 37°C wurde der Restriktionsansatz über Boehringer Kit aufgereinigt und mit Eco RV weiterverarbeitet. Dazu wurden in einem weiteren Ansatz 50 µl Claudin-16-Midi mit 50 µl CMV4-Vektor zusammengemischt. Hierzu wurden 7 µl Enzympuffer, 7 µl BSA und 2 µl Eco RV gegeben und mit 4 µl sterilem Wasser aufgefüllt. Der Restriktionsansatz wurde für 90 min und 37°C zur Inkubation gelassen und anschließend über Agarosegel aufgereinigt. Dafür wurden 70 µl von dem Restriktionsansatz, 14 µl vom Mix und 5 µl vom DNA-Marker zusammengemischt. Da der ungeschnittene Vektor im Unterschied zum geschnittenen Vektor 3 Banden besaß, liefen als Kontrolle 2,5 µl eines ungeschnittenen CMV4-Vektors mit 1 µl Mix. Anschließend wurden die DNA-Fragmente aus dem Agarosegel extrahiert, gereinigt und für die Ligation bereitgestellt.

2.6.11 Stabile Transfektion von MDCK-C7-Zellen

Die Transfektion ist eine molekulargenetische Methode, mit der heterologe DNA in eine Zelle eingeschleust wird. Zur Durchführung stehen grundsätzlich mehrere Techniken wie Lipofektion, DEAE-Dextran, virale Transfektionssysteme, Mikroinjektion, Elektroporation und Calciumphosphat-Präzipitation zur Verfügung.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Lipofektion angewandt. Hierbei werden durch eine Ultraschallbehandlung aus Lipidgemischen Lipofectamine gewonnen, die aus kleinen Lipidpartikeln, den Liposomen aufgebaut sind. Die Liposomen nehmen die DNA auf und schleusen diese in die Zielzelle hinein, indem sie mit der Zellmembran fusionieren. Anschließend erfolgt in der Zelle die Transkription der DNA zu mRNA und die Translation zu einem Protein mittels der Proteinbiosynthese. Mit Hilfe von Detektionsmethoden wie der Immunfluoreszenzfärbung und Western Blot kann dann das exprimierte Protein nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die stabile Transfektion von MDCK-Zellen mit Claudin-16 cDNA durchgeführt. Für eine bessere Detektion der Claudin-16-Expression wurde der Vektor pFLAG-CMV4 verwendet, welcher eine N-terminale Flag-Sequenz beinhaltet. Das Fusionsprodukt konnte nach erfolgreicher Transfektion mittels FLAG-Antikörper immunhistochemisch nachgewiesen werden.

Weitere folgende Ansätze dienten der Kontrolle und Analyse bezüglich eventueller, durch den Transformationsprozess hervorgerufener Veränderungen der transfizierten Zellen: Zum einen wurde die MDCK-C7-Zelllinie mit dem leeren Vektor ohne Insert als positive Kontrolle transfiziert. Zum anderen wurde die MDCK-C7-Zelllinie ohne jegliche Transfektion in den Versuchsablauf integriert. Für die Transfektion wurden Schalen verwendet, auf denen am Vortag der Transfektion je 7×10^4 MDCK-C7-Zellen ausgesät wurden.

Tabelle 5: Die im Versuchsablauf verwendeten Plasmide.

Verwendete Plasmide	Bedeutung
pFLAG-CMV4-Claudin-16	pFLAG-CMV mit Claudin-16-Insert
pFLAG-CMV4	leerer Vektor ohne Insert zur Kontrolle

Für die Transfektionen mit der Expressionsplasmid-DNA galten folgende Ansätze:

- Ansatz 1: Je Plasmidansatz wurden 400 µl Medium (ohne FKS und Antibiotikum) mit 16 µl Lipofectamin gemischt.
- Ansatz 2: Je 4 µg Expressionsplasmid-DNA wurden mit 400 µl Medium (ohne FKS und Antibiotikum) und 24 µl Plus-Reagenz gemischt.

Für die Transfektion mit leerem Vektor wurden folgende Ansätze verwendet:

- Ansatz 1: Je Plasmidansatz wurden 400 µl Medium (ohne FKS und Antibiotikum) und 16 µl Lipofectamin gemischt.
- Ansatz 2: 2 µg Vektorplasmid wurde mit 400 µl Medium und 24 µl Plus-Reagenz gemischt.

Der weitere Ablauf wurde bei beiden Transfektionsansätzen gleichermaßen durchgeführt. Ansatz 1 wurde für 15 min bei RT inkubiert, folglich mit Ansatz 2 vermischt und erneut, unter Bildung von Liposomen-Komplexen, unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Die Zellen auf den Schalen wurden zunächst vorsichtig mit 7 ml PBS gewaschen, um anschließend mit 3,2 ml Medium (ohne Zusatz) gefüttert zu werden. Die vermischten Ansätze wurden auf die MDCK-C7-Zellen gegeben, welche für 4 Stunden bei 37°C inkubierten. Danach wurden sie mit 5 ml Medium plus (enthält 10% FKS und die Antibiotika Penicillin und Streptomycin) gewaschen und gefüttert. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen regelmäßig alle 4-5 Tage gewaschen und gefüttert und ihr Wachstum mikroskopisch kontrolliert. Das Vorhandensein von Antibiotika (G418) diente der Selektion transfizierter Zellen, da diese durch den aufgenommenen Vektor über eine spezifische Antibiotikaresistenz verfügten. Die nicht transfizierten Zellen, welche diese Eigenschaft nicht besaßen, starben somit ab. Nach einer ausreichenden Wachstumsphase konnten die Zellen für weitere Versuchsreihen benutzt werden. Durch Western Blots und Immunfluoreszenzfärbungen konnte der Erfolg der stabilen Transfektion überprüft werden. Die anschließenden elektrophysiologischen Untersuchungen dienten der Funktionsanalyse und wurden an den Zellen mit der stärksten Proteinexpression durchgeführt.

2.7 Elektrophysiologie

Die elektrophysiologischen Versuchsreihen dienten zur funktionellen Analyse. Die Angabe der transepithelialen Widerstandswerte (R^t) erfolgte in [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]. Für alle Werte wurde der mittlere Widerstandswert errechnet und der Standardfehler (SEM) angegeben.

2.7.1 Widerstandsmessungen: Ussing-Kammer

Die Ussing-Kammer ist eine etablierte in vitro-Standardtechnik, welche zur Bestimmung von aktivem Ionentransport (Kurzschlussstrom, I_{sc}), Ionenpermeabilität (Leitfähigkeit bzw. Widerstand) sowie Radioisotopenfluxen genutzt werden kann (*Ussing und Zerahn, 1951*).

In einer modifizierten Ussing-Kammer (*Kreusel et al., 1991*) erfolgten die Widerstandsmessungen der MDCK-C7-Zellen sowohl vor als auch nach der Transfektion. Mit Hilfe einer speziellen Ausfräsung der Plexiglaskammer konnten kommerzielle Zellkulturfilter (Millicell-HA) eingesetzt werden. Zwei Dichtungsringe an der Außenseite des Filters verhinderten einen Kurzschluss, indem sie gewährleisten, dass der Übertritt der Flüssigkeit der einen Kammerhälfte in die andere nicht erfolgte. In diese wurde jeweils 10 ml einer 37°C warmen Flüssigkeit gefüllt. Die Gaszufuhr erfolgte über eine Injektionsnadel.

Die elektronischen Messungen wurden an einem PC (Siemens, PCD2) mit Mehrkanal-AD-DA Wandler durchgeführt. Dieser ermöglicht die Bestimmung der Spannung (U_e) über dem Epithel und steuert die Elektroden im „open“ bzw. „closed circuit“. Weiterhin wird über den PC ein Messverstärker gesteuert (CVC), der zur Ermittlung des transepithelialen Widerstandes (TER, englisch: transepithelial resistance, R^t) einen Rechteckstrom über dem Epithel generiert. Um den Kurzschlussstrom (I_{sc}) im „closed circuit“-Betrieb zu ermitteln, wurde das Epithel auf 0 mV geklemmt. Eine spezielle Software zur Steuerung und Registrierung des entsprechenden Programms, war für die Messung in Intervallen von 5-60 Sek. zuständig und ermöglichte eine tabellarische Darstellung der Messwerte. Der aktuelle pH-Wert wurde über einen pH-Meter registriert.

Im Vorfeld eines jeden Versuches, wurden mit 20 ml Badlösung das Asymmetriepotential der Spannungselektroden und der Badwiderstand bestimmt. Die ermittelten Werte wurden gespeichert und anschließend von den Messwerten abgezogen. Nach dem Einsetzen der Zellfilter wurden beide Kammerhälften zugleich mit jeweils 10 ml Badlösung gefüllt. Die Gaszufuhr über die Injektionsnadel führte zu einer konstanten Durchmischung in den Kammern und um das Epithel herum. Nach der Applikation der Ströme I_1 und I_2 durch den Rechteckgenerator, stellten sich über dem Epithel die Potentialdifferenzen U_1 und U_2 ein. Aus diesen Potentialdifferenzen konnte anhand des Ohm'schen Gesetzes der transepitheliale Widerstand errechnet werden:

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

In der Ussing-Kammer ergibt sich der Widerstand des Präparates aus:

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

Um den transepithelialen Widerstand zu bestimmen, wurde der Badwiderstand der ausschließlich mit Badlösung gefüllten Ussing-Kammer subtrahiert. Die transepitheliale Spannung (U_e) konnte direkt gemessen werden. Der Kurzschlussstrom ergibt sich folglich aus dem Quotienten aus Spannung und Widerstand.

$$I_{sc} = U_e / R^t$$

2.7.2 Widerstandsmessung: Manuelle Methode

Der initiale transepitheliale Widerstand (R^t) der mit Claudin-16 transfizierten Zellen und der Kontrollzellen wurde durch die manuelle Widerstandsmessung bestimmt. Die dafür verwendete Messapparatur ist speziell auf Widerstandsmessungen an Zellrasen, die sich auf Millicell-Filtern befinden, ausgerichtet. Zur Bestimmung des R^t wurde eine Elektrode über die Zelloberfläche, die andere in der extrazellulären

Flüssigkeit platziert. Der Leerwiderstand wurde an einem unbeschichteten Filter (zellfreier Filter) in der jeweiligen Badlösung bestimmt.

Dieser ermittelte Leerwiderstand wurde von dem später gemessenen R^t der Zellklone subtrahiert und so der tatsächliche R^t errechnet. Vor und nach einer Messung der einzelnen Zellfilter wurden die Elektroden des Gerätes mit 80% Ethanol gespült. Zwischen den jeweiligen Messungen wurden die Zellfilter bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit gelagert.

2.8 Immunfluoreszenz

Mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Moleküle können unter einem konfokalen Laserscanning-Fluoreszenzmikroskop (CLSM) entsprechend dargestellt und lokalisiert werden. Dieser Fluoreszenzfarbstoff ist Teil eines Antikörperkomplexes, welcher an das nachzuweisende Protein bindet und dadurch die Darstellung im Lichtmikroskop ermöglicht. Nach Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge, emittiert der Fluoreszenzfarbstoff Licht einer anderen Wellenlänge. Um zwei verschiedene Proteine nachzuweisen, werden unterschiedliche, jeweils für diese Proteine spezifische Antikörper benutzt. Voraussetzung hierfür ist, dass die jeweiligen Antikörperkomplexe Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittieren. Durch das einfache Umschalten der Wellenlänge bestimmt der Untersucher welches Protein dargestellt werden soll. Dadurch können auch Kollokalisierungen von Proteinen nachgewiesen und lokalisiert werden.

In dieser Arbeit wurden Antikörper gegen Occludin, Claudin-1, -2, -7, -15 und -16 sowie FLAG verwendet. Die Zellen wuchsen als Monolayer auf 18x18 mm großen Deckgläsern. Die Monolayer wurden zweimal mit PBS plus Mg^{2+}/Ca^{2+} gewaschen und 10 min lang bei -20°C mit 250 µl eiskaltem Methanol (-20°C) fixiert. Es folgte der gleiche zweimalige Waschvorgang mit PBS plus Mg^{2+}/Ca^{2+} , anschließend wurden zur Permeabilisierung 250 µl 0,5%iger Triton-X-100 in PBS plus Mg^{2+}/Ca^{2+} gelöst und für 5 min bei RT auf den Zellverband gegeben. Auch alle weiteren, von nun an durchgeführten Schritte fanden unter Bedingungen bei RT statt. Der erneuten Waschung mit PBS plus Mg^{2+}/Ca^{2+} schloss sich eine 10-minütige Blockierung mit 0,5%igem Goat-serum (in PBS plus Mg^{2+}/Ca^{2+}) an. Danach fand für 30 min eine Inkubation der Zellen mit einem Antikörper in Blockierlösung (Maus –Anti-Occludin;

Kaninchen-Anti-Claudin-16) statt. Nach einer zweimaligen Waschung mit der Blockierlösung wurde den Zellen für weitere 30 min der Antikörper für die Doppelfärbung zugesetzt. Erneut folgte das zweimalige Waschen mit der Blockierlösung. Daraufhin wurde im Dunkeln für 30 min mit 2 µg/ml des Antikörpers Alexa Fluor 488 (goat anti mouse) inkubiert. Nachdem die Zellen zweimal mit Blockierlösung gewaschen wurden, folgte im Dunkeln eine 30-minütige Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Alexa Fluor 594 goat anti rabbit). Anschließend wurden die Zellen erneut mit Blockierlösung gewaschen und für 10 min im Dunkeln mit 50 µl DAPI Farblösung inkubiert. Nach einer erneuten zweimaligen Waschung mit Blockierlösung, wurde der Zell-Antikörperkomplex kurz mit destilliertem Wasser, anschließend mit absolutem Ethanol abgespült. Damit war die Voraussetzung für das Eindecken mit ProTagsMountFluor geschaffen. Die Deckgläser härteten im Dunkeln für 30 min aus und waren in diesem Zustand unter den genannten Bedingungen für ca. 4-6 Wochen haltbar. Mittels des konfokalen Fluoreszenzmikroskops erfolgte unter Anregung mit Licht der Wellenlänge 543 nm und 488 nm die Aufnahme der Fluoreszenzbilder.

2.9 Statistik

Die Darstellung von Dateitabellen, Abbildungen und sämtlichen statistischen Auswertungen erfolgte mit den Programmen Microsoft Excel, Microsoft Word und GraphPad PRISM (Version 3.0, GraphPad Software Inc, CA, USA). Die Messwerte wurden als arithmetische Mittelwerte \pm SEM angegeben, bei multiplen Vergleichen wurde eine Bonferroni-Korrektur angewandt.

3 Ergebnisse

3.1 Widerstandsmessungen an den Zelllinien MDCK-C7, MDCK-C11, HT-29/B6, T84, Caco-2

Vergleich von Nieren (MDCK-C7 und -C11) - und Kolonepithelzellen (HT-29/B6, T84, Caco-2)

Die Widerstandsmessungen erfolgten am 7. Tag nach Aussaat der Zellen auf permeable Filter. Zunächst wurde mit der manuellen Methode, anschließend in einer Ussing-Kammer gemessen. Konfluente Monolayer der epithelialen Zelllinien MDCK-C7 und MDCK-C11, sowie der Kolonkarzinomzellen HT-29/B6, T84 und Caco-2 zeigten deutliche Unterschiede bezüglich ihres transepithelialen Widerstandes (R^t). Die höchsten R^t -Werte wiesen die MDCK-C7-Zellen auf ($2225,8 \pm 25.2 \Omega \cdot \text{cm}^2$), die niedrigsten R^t -Werte wurden an den MDCK-C11-Zellen gemessen ($60,9 \pm 1,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n=6$). Diese Werte und die transepithelialen Widerstände der Kolonkarzinomzellen sind in Abbildung 8 zusammengefasst:

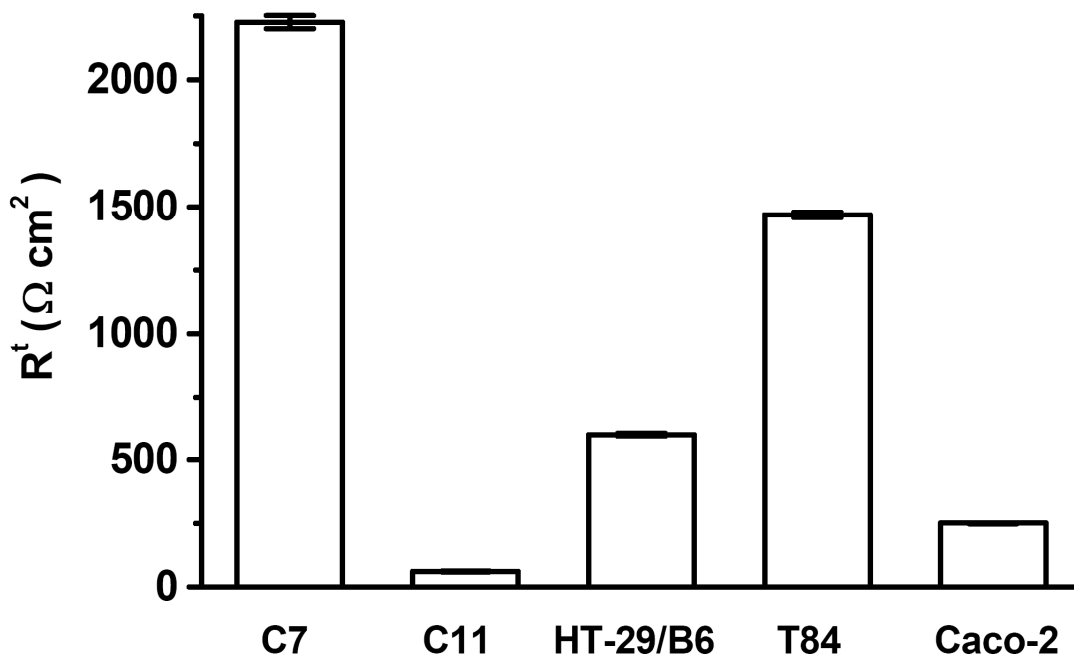


Abbildung 8: Transepithelialer Widerstand der Zelllinien MDCK-C7 und MDCK-C11, HT-29/B6, T84 und Caco-2 ($n=6-15$).

3.2 Western Blot

Zur näheren Charakterisierung der Zelllinien MDCK-C7,-C11, HT-29/B6, T84 und Caco-2 wurden nach den R^t-Messungen die Membranproteine extrahiert und einer Proteindetektion mit entsprechenden Antikörpern gegen TJ-Proteine unterzogen. Während sich Occludin mit einer typischen Doppelbande und den Molekulargewichten zwischen 64 und 56 kDa zeigte, stellten sich alle nachgewiesenen Claudine mit einer Bande und dem Molekulargewicht von ca. 22 kDa dar. Occludin, Claudin-1 und Claudin-7 konnten in allen Zelllinien nachgewiesen werden. Demgegenüber fand sich keine Expression von Claudin-2 in MDCK-C7 und Caco-2-Zellen. Schwache Claudin-15-Signale fanden sich in allen Zellen. Eine Expression von Claudin-16 zeigte sich in MDCK-C11-Zellen.

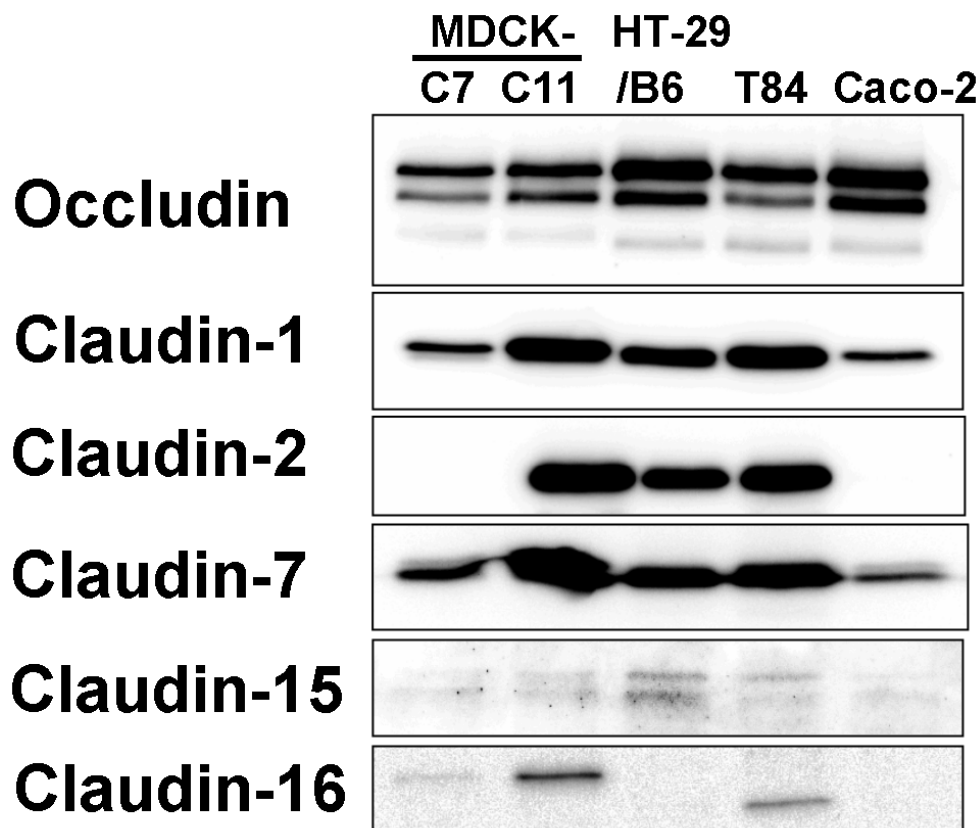


Abbildung 9: Western Blot: Detektion von Occludin, Claudin-1,-2,-7,-15 und -16 in MDCK-C7 und – C11-, HT29/B6-, T84-und Caco-2-Zellen.

3.3 Stabile Transfektion von MDCK-C7 mit pFLAG-CMV4-Claudin-16-cDNA

Um den Einfluss von Claudin-16 auf die parazelluläre Permeabilität und den transepithelialen Widerstand in einer Nierenepithelzelllinie zu untersuchen, wurden MDCK-C7-Zellen stabil mit Claudin-16-cDNA transfiziert. Als Kontrolle dienten entsprechende Expressionsvektoren ohne Insert (leere Vektoren) sowie unbehandelte, nicht transfizierte MDCK-C7-Zellen.

Die erfolgreich transfizierten Zellen wurden mittels PCR (Abb. 10), Western Blots und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (s.u.) analysiert und funktionell mittels elektrophysiologischer Methoden charakterisiert.

Kontrolle C7-16-8 C7-16-11 C7-16-12

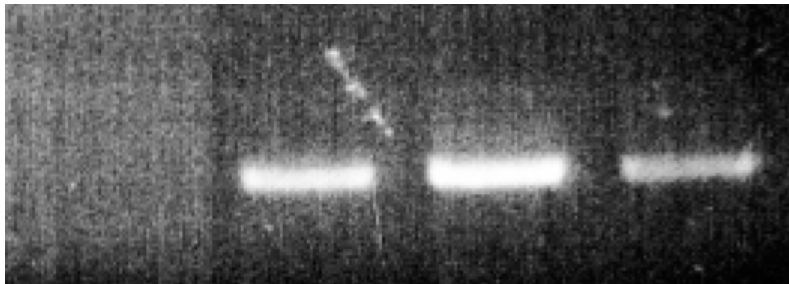


Abbildung 10: PCR Nachweis von Claudin-16 in Kontrollen (Spur 1), Klon 8, 11 und 12 (936 bp)

3.3.1 Western Blot nach erfolgter Transfektion

Um den Erfolg der Transfektion zu überprüfen, wurden Western Blots durchgeführt. Im Gegensatz zu den Vektor-transfizierten Kontrollen, konnten bei den erfolgreich mit Claudin-16-cDNA-transfizierten MDCK-C7-Zellen durch einen Anti-FLAG-Antikörper Signale einer Größe von ca. 36 kDa detektiert werden (Abb. 11). Die Expression und Lokalisation von Claudin-16 wurden anschließend mittels Immunfluoreszenzfärbung und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert.

Kontrolle C7-16-8 C7-16-11 C7-16-12

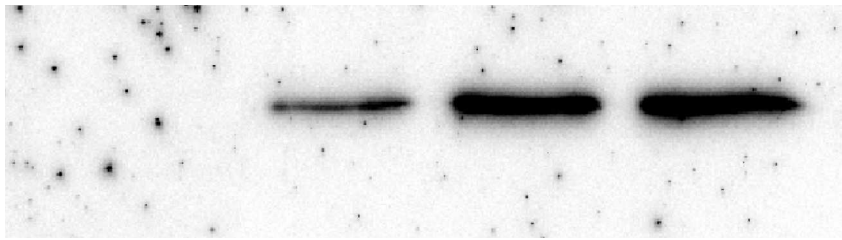


Abbildung 11: Western Blots nach erfolgter Transfektion

3.3.2 Immunfluoreszenz und –lokalisierung von FLAG-Claudin-16

Es wurden nur die Monolayer mit dem stärksten Wachstum verwendet. Mit Hilfe der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie konnte in den MDCK-C7-Klonen die Lokalisation von Claudin-16 in Kolokalisation mit dem TJ-Protein Occludin dargestellt werden (Abb. 12). In den entsprechenden Kontrollen wurde kein spezifisches FLAG-Signal detektiert.

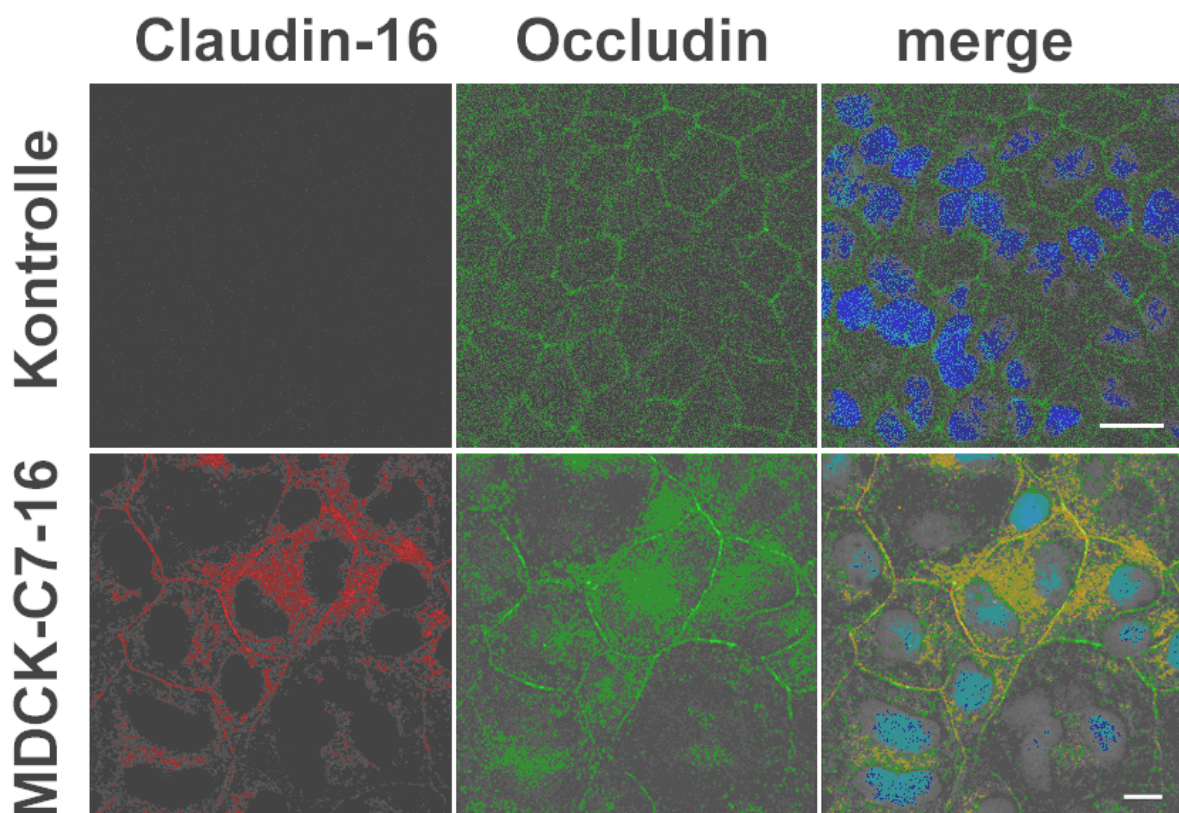


Abbildung 12: Immunfluoreszenz nach erfolgter stabiler Transfektion.

3.4 Funktionelle Charakterisierung von Claudin-16

3.4.1 Elektrophysiologische Untersuchungen zur funktionellen Analyse

Zur funktionellen Charakterisierung von Claudin-16 wurde der transepitheliale Widerstand gemessen. Die Hypothese war, dass in den mit Claudin-16-cDNA transfizierten Zellen ein niedrigerer Widerstand zu messen sei. Zur jeweiligen Kontrolle dienten die Zellen, welche nur mit dem Vektor (ohne Insert) transfiziert wurden.

3.4.2 Widerstandsmessung

Die Widerstandsmessungen wurden zunächst nach der manuellen Methode und im weiteren Verlauf in den Ussing-Kammern durchgeführt. Der transepitheliale elektrische Widerstand der mit Claudin-16-cDNA transfizierten MDCK-C7-Zellen betrug bei dem Klon 8 $2,65 \pm 0,05 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$, bei dem Klon 11 $2,58 \pm 0,11 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ und bei dem Klon 12 $2,93 \pm 0,1 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$. Im Vergleich dazu zeigten die Kontrollzellen einen mittleren Widerstand von $2,81 \pm 0,05 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ (n = 6, nach Bonferroni-Korrektur n.s.).

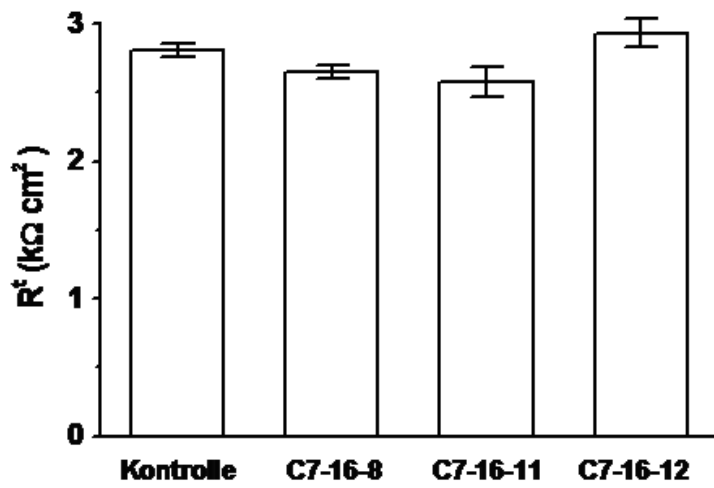


Abbildung 13: Diagramm der Widerstände der Kontrollzellen sowie der Klone 8, 11 und 12 der mit Claudin-16-cDNA transfizierten MDCK-C7-Zellen.

4 Diskussion

Bei Patienten mit familiärer Hypomagnesiämie mit Hyperkalzurie und Nephrokalzinose (FHHNC), wurden Mutationen im Paracellin-1 (Claudin-16) Gen gefunden (*Simon et al., 1999; Weber et al., 2000; Weber et al., 2001 b*). Dies führte zu der Annahme, dass Claudin-16 Kanaleigenschaften besitzt und den parazellulären Transport divalenter Kationen wie Kalzium (Ca^{2+}) und Magnesium (Mg^{2+}) in der Niere, im dicken aufsteigenden Teil der Henle Schleife (TAL), reguliert (*Rodriguez-Soriano et al., 1987; Blanchard et al., 2001*). Zunächst wurde vermutet, dass die negativ geladenen Aminosäuren der ersten extrazellulären Schleife des Proteins entscheidend für die Selektivität für divalente Kationen sind (*Simon et al., 1999; Hou und Goodenough, 2005*). Die in den darauf folgenden Jahren durchgeführten Studien zeigten jedoch, dass keine der FHHNC assoziierten Mutationen diese negativ geladenen Aminosäuren betreffen (*siehe hierzu Kapitel 1.5*). Der genaue Mechanismus, mit dem Claudin-16 den Magnesiumtransport in der Niere und damit den Magnesiumhaushalt des Organismus beeinflusst, ist bis heute nicht vollständig geklärt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Strategie für die funktionelle Charakterisierung des Tight Junction -Proteins Claudin-16 in Epithelzellen zu entwickeln und den Einfluss von Claudin-16 auf die Barrierefunktion und damit indirekt auf die parazelluläre Permeabilität der verwendeten Epithelzellen zu analysieren. Dabei konzentrierten wir uns auf eine elektrophysiologische Methode: Die Messung des transepithelialen Widerstandes (TER, englisch: transepithelial resistance) von mit Claudin-16-cDNA transfizierten Zellen. Vorteil dieser Methode ist die (nach gelungener und erfolgreich nachgewiesener stabiler Transfektion der verwendeten Zellreihen mit Claudin-16-cDNA) praktikable, nicht aufwändige Durchführung. Nachteilig ist, dass die Ergebnisse nicht ionenspezifisch sind und die Messungen immer das Ergebnis der Summe aus sowohl dem trans- als auch dem parazellulären Transport sind. Es ist also nicht möglich eine direkte Korrelation zwischen dem Ergebnis und ausschließlich der parazellulären Leitfähigkeit zu postulieren. In Anbetracht der bis zum damaligen Zeitpunkt (2003) aus der Literatur vorliegenden Studien, eignete sich die Methode dafür, über die Barrierefunktion von Claudin-16, Hinweise über den parazellulären Transport zu erhalten, um darauf basierend weitere Untersuchungen durchführen zu können. Wichtig zu erwähnen ist,

dass zum Zeitpunkt unserer experimentellen Arbeit (2002-2003) viele der im Folgenden diskutierten und auch bereits in dem Kapitel 1.4 beschriebenen vielfältigen Studienergebnisse nicht vorlagen.

Die Claudin-16-Expression in den Tight Junctions der Nierentubuli weist eine Spezies spezifische Verteilung auf. Bisherige Studien haben gezeigt, dass die Expression von Claudin-16 bei der Maus auf den TAL beschränkt ist (*Kiuchi-Saishin et al., 2002*), wohingegen man bei Menschen und Nagetieren eine zusätzliche, wenn auch schwache Expression in Epithelien des distalen Tubulus und Sammelrohres nachweisen konnte (*Simon et al., 1999; Weber et al., 2001 a*).

In den letzten Jahren sind in unterschiedlichen Studien verschiedene Claudin-16 transfizierte Zellreihen funktionell im Hinblick auf die Barrierefunktion und Veränderungen der parazellulären Permeabilität untersucht worden.

2004 haben *Ikari et al.* Claudin-16 in niederohmige MDCK-Zellen transfiziert und dabei zwei wichtige Beobachtungen gemacht. Zum einen stellten sie einen Anstieg des Ca^{2+} -Fluxes lediglich von apikal nach basal fest. Dieser wurde kompetitiv durch Mg^{2+} gehemmt. Darin sahen sie einen indirekten Hinweis auf eine Erhöhung der Mg^{2+} Permeabilität. Zum anderen konnte in den Claudin-16 exprimierenden Zellen ein erhöhter transepithelialer Widerstand im Vergleich zur Kontrollzellen gemessen werden.

Im Jahr 2005 haben *Hou et al.*, ebenfalls niederohmige MDCK- und LLC-PK1-Zellen mit Claudin-16 und einigen FHHNC-relevanten Claudin-16-Varianten transfiziert. Sie konnten in den Claudin-16 exprimierenden LLC-PK1-Zellen nur eine mäßige richtungsunabhängige Erhöhung der Mg^{2+} -Permeabilität, dafür aber einen deutlichen Anstieg der Na^+ -Permeabilität beobachten. In den LLC-PK1-Zellen, die die FHHNC relevanten Claudin-16-Varianten exprimiert haben, konnte eine verminderte Na^+ -Permeabilität gemessen werden. In den niederohmigen MDCK-Zellen konnten sie keine signifikante Änderung der Permeabilität von Mg^{2+} , Na^+ oder Cl^- verzeichnen. Insgesamt war die Permeabilität von Mg^{2+} vergleichsweise nur unwesentlich höher als für die monovalenten Ionen. Dadurch kamen sie zu dem Rückschluss, dass die initial postulierte Vermutung, dass Claudin-16 ein selektiver Kanal für divalente Kationen sei (*Simon et al., 1999*), nicht zutreffend ist. Vielmehr postulierten sie die Behauptung, dass die verminderte Permeabilität von Na^+ , welche in den mit den Claudin-16-Varianten transfizierten Zellen beobachtet wurde, für eine Erniedrigung des transepithelialen Potentials verantwortlich ist. Diese Erniedrigung des

transepithelialen Potentials würde bei der FHHNC den gestörten parazellulären Transport verursachen.

Sowohl in der Studie von *Ikari et al.* als auch in der Studie von *Hou et al.*, konnte kein signifikanter Anstieg der Mg^{2+} -Permeabilität gemessen werden.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden MDCK-C7-Zellen mit Claudin-16-cDNA transfiziert. Nach erfolgter stabiler Transfektion konnte mit Hilfe der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie in den MDCK-C7-Klonen die Lokalisation von Claudin-16 in Kolokalisation mit dem Tight Junction-Protein Occludin dargestellt werden. In den entsprechenden Kontrollen wurde kein spezifisches FLAG-Signal detektiert. Um die Barrierefunktion von Claudin-16 zu charakterisieren, wurde in der Ussing-Kammer der transepitheliale Widerstand (TER) gemessen. Entgegen der Erwartung einer Widerstandserniedrigung, konnten wir keine Veränderung des TER bei den mit Claudin-16 transfizierten MDCK-C7-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen messen. Diese Ergebnisse korrelieren mit denen, die ein bzw. zwei Jahre später von *Ikari et al.* und *Hou et al.* verzeichnet wurden.

Sie waren ebenfalls der Grundstein für die darauf folgenden Untersuchungen, welche in Kooperation mit Prof. Walter Hunziker (*Kausalya/Amasheh et al., 2006*) durchgeführt wurden und korrelierten auch mit diesen. In weiteren Messungen mit Claudin-16-Varianten der Arbeitsgruppe von Dr. Walter Hunziker ergaben sich zwar größere Schwankungen der Widerstände der einzelnen Zellklone, aber ebenfalls keine Abnahme des TER in den mit WT Claudin-16 transfizierten MDCK-C7-Zellen.

Kausalya/Amasheh et al. haben 2006 in den mit WT Claudin-16 transfizierten MDCK-C7-Zellen einen signifikanten Anstieg der Mg^{2+} -Permeabilität im Vergleich zur Kontrollzellen und Zellen, welche mit verschiedenen für die FHHNC relevanten Claudin-16-Varianten transfiziert wurden, gemessen. Es konnte aber keine Korrelation zwischen der Mg^{2+} -Permeabilität und dem transepitheliale Widerstand festgestellt werden. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von *Hou et al., 2005*, wobei der Magnesiumflux der mit WT Claudin-16 transfizierten MDCK-Zellen deutlich niedriger lag als der von den Claudin-16 exprimierenden LLC-PK1-Zellen von *Hou et al.* Dies könnte mit den Unterschieden der einzelnen Zellreihen bezüglich des Transports und der Lokalisation endogener Membranproteine zusammenhängen (*Folsch et al., 1999*). Die Ergebnisse deuten auch darauf hin, dass durch die Mutationen im Claudin-16 Gen der parazelluläre Magnesiumtransport beeinflusst wird.

Grundsätzlich ließen sich in der Studie von Kausalya/Amasheh zwei Arten von Mutationen unterscheiden: Solche, die durch einen veränderten intrazellulären Transport den eigentlichen Wirkort, die Zellmembran, nicht erreichen und solche, die zwar die Zellmembran erreichen, jedoch aufgrund ihres Defektes den parazellulären Magnesiumtransport beeinflussen.

Eine Veränderung in der Natrium-, Kalium-, Chlorid- und Calciumpermeabilität konnte ebenso wenig verifiziert werden.

2009 zeigten *Günzel et al.*, in einer Studie mit MDCK-C7-Zellen, dass Claudin-16 nur einen geringen direkten Effekt auf den parazellulären Transport von Mg^{2+} hat. Sie beobachteten jedoch einen Effekt auf den transzellulären Chlorid (Cl^-)-Transport (*Günzel et al., 2009 b*).

Ausgehend davon, dass eine Änderung des epithelialen Potentials den parazellulären Transport beeinflusst, deuten die Ergebnisse der o.g. Studien darauf hin, dass eine Veränderung des lumen-positiven Potentials der zugrunde liegende Mechanismus ist, der den parazellulären Transport von Mg^{2+} und Ca^{2+} im TAL beeinflusst.

Zusammenfassend korrelieren die Ergebnisse unserer mit der 2006 von Kausalya/Amasheh durchgeführten Studie, wobei in der vorliegenden Arbeit FLAG-markiertes Claudin-16 verwendet wurde. Wie genau Claudin-16 den parazellulären Magnesiumtransport beeinflusst, ist nach wie vor nicht vollständig geklärt.

5 Zusammenfassung

Hintergrund: Das Tight Junction (TJ)-Protein Claudin-16 wird beim Menschen vor allem in der Niere, im dicken aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife (TAL), exprimiert. Die Niere spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation des Magnesium (Mg^{2+})-Haushaltes. Dabei findet der größte Teil der Magnesiumresorption über den parazellulären Weg, angetrieben durch das lumen-positive Potential, im TAL statt. Mutationen im Claudin-16-Gen sind mit der familiären Hypomagnesiämie mit Hyperkalzurie mit Nephrokalzinose (FHHNC) assoziiert, einer hereditären Nierenerkrankung, die durch einen massiven Mg^{2+} - und Kalzium- (Ca^{2+}) Verlust gekennzeichnet ist und schon im Jugend- oder frühen Erwachsenenalter zur terminalen Niereninsuffizienz führt. Initial wurde die Vermutung aufgestellt, Claudin-16 fungiere als ein spezifischer Kanal, der den parazellulären Transport divalenter Kationen reguliert. Bis heute ist der zugrunde liegende Mechanismus, mit dem Claudin-16 den Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Transport beeinflusst, nicht vollständig geklärt. In Anbetracht der infausten Prognose der FHHNC und der fehlenden pharmakotherapeutischen Möglichkeiten ist es dringend notwendig, die zugrunde liegende Physiologie und Pathophysiologie zu erforschen. Methode: In dieser Arbeit wurde nach Vergleich der endogenen Claudin-Expressionsmuster in unterschiedlichen Zelllinien eine stabile Transfektion hochohmiger MDCK-C7-Zellen mit FLAG getaggtter cDNA von Claudin-16 durchgeführt, und die resultierenden Zellklone wurden molekular-biochemisch und elektrophysiologisch analysiert. Ergebnisse und Interpretation: Nach erfolgreicher Klonierung und stabiler Transfektion von MDCK-C7-Zellen mit FLAG-Claudin-16-cDNA wurden Expression und Lokalisation des Claudins mittels PCR, Western Blots und konfokaler Laser-scanning-Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Die elektrophysiologische Analyse konfluenter Monolayer zeigte keine Änderung des transepithelialen Widerstandes der transfizierten MDCK-C7-Zellen im Vergleich zu Vektor-transfizierten Kontrollzellen. Es zeigte sich somit keine Korrelation zwischen der Überexpression des Tight Junction-Proteins und dem transepithelialen Widerstand in diesem Zellmodell, was auf einen widerstandsunabhängigen Einfluss auf die Mg^{2+} -Permeabilität durch Claudin-16 hinweist. Das etablierte Zellmodell stellt daher ein geeignetes Modell für weiterführende Studien der physiologischen Mg^{2+} -Resorption im renalen Tubulussystem dar.

6 Abkürzungsverzeichnis

AF6	engl.: ALL-1 Fusion partner in chromosome 6
ampR-Gen	Ampicillin-Resistenzgen
Asp	Aspartam
ATCC	engl.: American Type Culture Collection
BAMH1	Bacillus amyloliquefaciens Histaminrezeptor
BCA	Bicinchoinsäure
Bp	Basenpaare
BSA	engl.: Bovine serum albumin (Albumin, aufgereinigt aus Kälberserum)
Ca	Karzinom
Ca ²⁺	Kalzium
Caco-2 Zellen	Kolonkarzinomzellen
CASR	Kalziumsensitiver Rezeptor
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEA	Carcino-Embryonales Antigen
CLDN16	Claudin-16
CLSM	engl.: confocal laser scanning microscope
CPE-R	Clostridium-perfringens-Enterotoxin
DAPI Farblösung	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCIS	engl.: Ductal Carcinoma in Situ
dCTP	Desoxythymidintriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
DEAE-Dextran	Diethylaminoethyl-Dextran
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DANN	Desoxyribonucleinacid
dNTP-Mix	Desoxyribonukleosidtriphosphat-Mix
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECOR5	Restriktionsendonuklease
EDTA-Lösung	Ethylendiamintetraacetat

FHHNC	engl.: Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis
FKS	Fetales Kälberserum
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HCT	Hydrochlorothiazid
HCV	Hepatitis-C-Virus
HT-29/B6	Humane Kolonkarzinom-Zelllinie
I	Elektrische Stromstärke
IDC	engl.: Invasive ductal carcinoma
IL-13	Interleukin-13
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Isc	Elektrische Stromstärke bei Kurzschluss
Kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo Dalton
lac Z	B-Galactosidase-Gen
LAS	engl.: Luminescent Image Analysis System
LB-Medium	Luria-Bertani medium
LCIS	engl.: Lobular carcinoma in situ
LLC-PK1-Zellen	Proximale Tubulusepithelzellen der Niere
LMDM-Marker	engl.: Low Mass DNA Marker
LP	Lysepuffer
Lys	Lysin
M Crohn	Morbus Crohn
MDCK	engl.: Madin-Darby canine kidney
MEM	Modifiziertes Eagle's Medium
Mg ²⁺	Magnesium
MIDI	Plasmid Midi Kit
Millicell-HA	Zellplattentyp des schweizer Herstellers Millicell
mRNA	engl.: messenger ribonuclein acid
NCCT	Na ⁺ -Cl ⁻ Kotransporter
OSP	engl.: Oligodendrocyte-specific protein
OSPL36	Claudin-10
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese

PBS	engl.: phosphate buffered saline
PCR	engl.: Polymerase Chain Reaction; Polymerase-Kettenreaktion
PE Waschpuffer	Phycoerythrin Waschpuffer
pH-Wert	potentia Hydrogenii
PTH	Parathormon
PVDF-Transfer Membran	Polyvinylidenfluorid-Transfer Membran
R	Widerstand
RT	Raumtemperatur
R ^t	Transepithelialer Widerstand
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
siRNA	engl.: Small interfering ribonuclein acid
S-Magnesium	Serum-Magnesium
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T84	Epitheliale Zellkultur, kolorektales Karzinom als Ursprungsgewebe
TAE-Laufpuffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TJ	engl.: Tight Junction
TMVCF	engl.: transmembrane protein deleted in Velo-cardial-facial syndrome.
TNF- α	Tumornekrosefaktor- <i>alpha</i>
TRPM6-Gen	engl.: transient receptor potential channels, Melastatin Unterfamilie
TSR	engl.: Template Suppression Reagent
Tyr	Tyrosin
U	Elektrische Spannung
U-Kalziumwerte	Urin-Kalziumwerte
WT Claudin-16	Wildtyp Claudin-16
X-GAL	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl- <i>beta</i> -D-Galactopyranosid
ZO	lat.: Zonula Occludens

7 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Epithelzellen in schematischer Darstellung
- Abbildung 2: Lokalisation von Tight Junction, Adherens Junction, Gap Junction, Desmosomen und Hemidesmosomen
- Abbildung 3: Tight Junctions
- Abbildung 4: Schematische Darstellung der Tight Junction-Tetraspan-Proteine Claudin, Occludin und Tricellulin in der Zellmembran
- Abbildung 5: Das Claudin-16 Molekül in der Zellmembran mit den FHHNC assoziierten Mutationen
- Abbildung 6: Schematische Darstellung des Elektrotransfers von Proteinen aus SDS-Gelen auf Nitrocellulosemembran
- Abbildung 7: Schematische Darstellung des Plasmidvektors pFLAG-CMV4 mit Vergrößerung der sogenannten „Multiple Cloning Region“
- Abbildung 8: Transepithelialer Widerstand der Zelllinien MDCK-C7 und MDCK-C11, HT-29/B6, T84 und Caco-2 (n=6-15)
- Abbildung 9: Western Blot: Detektion von Occludin, Claudin-1,-2,-7,-15 und -16 in MDCK-C7 und C11-, HT29/B6-, T84- und Caco-2-Zellen
- Abbildung 10: PCR Nachweis von Claudin-16 in Kontrollen (Spur 1), Klon 8, 11 und 12 (936 bp)
- Abbildung 11: Western Blots nach erfolgter Transfektion
- Abbildung 12: Immunfluoreszenz nach erfolgter stabiler Transfektion
- Abbildung 13: Diagramm der Widerstände der Kontrollzellen sowie der Klone 8, 11 und 12 der mit Claudin-16-cDNA transfizierten MDCK-C7-Zellen

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Lokalisation, Funktion und die klinische Relevanz verschiedener Claudine in der Übersicht

Tabelle 2: Renale und extrarenale Manifestation sowie die laborchemischen Veränderungen bei der FHHNC

Tabelle 3: Ansatz der Mikrotiterplatten bei der Proteinquantifizierung

Tabelle 4: Konzentrationsangaben für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Tabelle 5: Die im Versuchsablauf verwendeten Plasmide

9 Literaturverzeichnis

1. *Abbott NJ.* Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat* 2002;200:629-38.
2. *Acharya P, Beckel J, Ruiz WG et al.* Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287:F305-18.
3. *Alexandre MD, Lu Q, Chen YH.* Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl⁻ conductance and increases the paracellular Na⁺ conductance in LLC-PK1 cells. *J Cell Sci* 2005;118:2683-93.
4. *Al-Haggag M, Bakr A, Tajima T et al.* Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: unusual clinical associations and novel claudin16 mutation in an Egyptian family. *Clin Exp Nephrol* 2009;13:288-94.
5. *Amasheh S, Meiri N, Gitter AH et al.* Claudin-2 induces cation-selective channels in tight junction of epithelial cells. *J Cell Sci* 2002;115:4969-76.
6. *Amasheh S, Schmidt T, Mahn M et al.* Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junction of epithelial cells. *Cell Tiss Res* 2005;321:89-96.
7. *Amasheh M, Schlichter S, Amasheh S et al.* Quercetin enhances epithelial barrier function and increases claudin-4 expression in Caco-2 cells. *J Nutr* 2008;138:1067-73.
8. *Amasheh S, Milatz S, Krug SM et al.* Na⁺ absorption defends from paracellular back-leakage by claudin-8 upregulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2009 a;378:45-50.
9. *Amasheh S, Milatz S, Krug SM et al.* Tight junction proteins as channel formers and barrier builders *Ann NY Acad Sci* 2009 b;1165:211-9.
10. *Anderson JM, van Itallie CM.* Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol* 1995;269:G467-75.
11. *Anderson JM.* Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol Sci* 2001;16:126-30.

12. *Angelow S, El-Husseini R, Kanzawa SA, Yu AS.* Renal localization and function of the tight junction protein, claudin-19. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293:F166-77.
13. *Balda MS, Whitney JA, Flores C, González S, Cerejido M, Matter K.* 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* 1996;134:1031-49.
14. *Barker G, Simmons NL.* Identification of two strains of cultured MDCK renal epithelial cells which display entirely different physiological properties. *Q J Exp Physiol* 1981;66:61-72.
15. *Benigno V, Canonica CS, Bettinelli A, von Vigier RO, Truttmann AC, Bianchetti MG.* Hypomagnesemia-hypercalciuria-nephrocalcinosis: a report of nine cases and a review. *Neprol Dial Transplant* 2000;15:605-10.
16. *Ben-Yosef T, Belyantseva IA, Saunders TL et al.* Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. *Hum Mol Genet* 2003;12: 2049-61.
17. *Blanchard A, Jeunemaitre X, Coudol P et al.* Paracellin-1 is critical for magnesium and calcium reabsorption in the human thick ascending limb of Henle. *Kidney Int* 2001;59:2206-15.
18. *Boireau S, Buchert M, Samuel MS et al.* DNA-methylation-dependent alterations of claudin-4 expression in human bladder carcinoma. *Carcinogenesis* 2006;28:246-58.
19. *Bojarski C, Gitter AH, Bendfeldt K et al.* Permeability of HT-29/B6 colonic epithelium as a function of apoptosis. *J Physiol* 2001;535:541-52.
20. *Brandner JM, Kief S, Grund C et al.* Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes *Eur J Cell Biol* 2002;81:253-63.
21. *Citi S, Sabanay H, Jakes R, Geiger B, Kendrick-Jones J.* Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. *Nature* 1988;333:272-6.

22. *Claude P, Goodenough DA.* Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *J Cell Biol* 1973;58:390-400.
23. *Cole DEC, Quamme GA.* Inherited disorders of renal magnesium handling. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:1937-47.
24. *Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, Rahner C, Anderson JM.* Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol* 2002;283:C142-47.
25. *Colegio OR, Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM.* Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284:C1346-54.
26. *Coyne CB, Vanhook MK, Gambling TM, Carson JL, Boucher RC, Johnson LG.* Regulation of airway tight junctions by proinflammatory cytokines. *Mol Biol Cell* 2002;13:3218-34.
27. *Coyne CB, Gambling TM, Boucher RC, Carson JL, Johnson LG.* Role of Claudin Interactions in Airway Tight Junctional Permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:L1166-78.
28. *Dhawan P, Ahmad R, Chaturvedi R et al.* Claudin-2 expression increases tumorigenicity of colon cancer cells: role of epidermal growth factor receptor activation. *Oncogene* 2011; doi:10.1038/onc.2011.43.
29. *Di Stefano A, Roinel N, de Rouffignac C, Wittner M.* Transepithelial Ca²⁺ and Mg²⁺ transport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of the mouse is a voltage-dependent process. *Ren Physiol Biochem* 1993;16:157-66.
30. *Enck AH, Berger UV, Yu AS.* Claudin-2 is selectively expressed in proximal mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;281:F966-74.
31. *Faguer S, Chaveau D, Cintas P et al.* Renal, ocular and neuromuscular involvements in patients with CLDN19 mutations. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6:355-60.
32. *Fanning AS, Mitic LL, Anderson JM.* Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1337-45.

- 33.** *Fink C, Weigel R, Fink L et al.* Claudin-11 is over-expressed and dislocated from the blood-testis barrier in Sertoli cells associated with testicular intraepithelial neoplasia in men. *Histochem Cell Biol* 2009;131:755-64.
- 34.** *Florin A, Maire M, Bozec A et al.* Androgens and postmeiotic germ cells regulate claudin-11 expression in rat Sertoli cells. *Endocrinology* 2005;146:1532-40.
- 35.** *Folsch H, Ohno H, Bonifacino JS, Mellmann I.* A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* 1999;99:189-98.
- 36.** *Fromm M.* (2007) Kapitel 3: "Transport in Membranen und Epithelien", In: *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie.* Schmidt RF, Lang F (Hrsg.), 30. Auflage, Springer, Berlin Heidelberg NewYork. ISBN 978-3-540-32908-4
- 37.** *Fujimoto K.* Freeze-fracture replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labelling of intergral membrane proteins. Application to the immunogold labelling of intercellular junctional complexes. *J Cell Sci* 1995;108:3443-9.
- 38.** *Fujita H, Chiba H, Yokozaki H et al.* Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13 and -15 along the mouse intestine. *J Histochem Cytochem* 2006;54:933-44.
- 39.** *Fujita H, Sugimoto K, Inatomi S et al.* Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca²⁺ absorption between enterocytes. *Mol Biol Cell* 2008;19:1912-21.
- 40.** *Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S.* Occludin: a novel intergral protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 1993;123:1777-88.
- 41.** *Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S.* Claudin 1 and 2: novel intergral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 1998 a;141:1539-50.
- 42.** *Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S.* A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* 1998 b;143:391-401.

43. *Furuse M, Sasaki H, Tsukita S.* Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol* 1999;147:891–903.
44. *Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S.* Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol* 2001;153:263–72.
45. *Furuse M, Hata M, Furuse K et al.* Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier; a lesson from claudin-1-efficient mice. *J Cell Biol* 2002;156:1099-1111.
46. *Gekle M, Wunsch S, Oberleitner H, Silbermager S.* Characterization of two MDCK-cells subtypes as a model system to study principal cell and intercalated cell properties. *Pflugers Arch* 1994;428:157-62.
47. *Gitter AH, Bendfeldt K, Schulzke JD, Fromm M.* Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF α -induced single-cell apoptosis. *FASEB J* 2000 a;14:1749-53.
48. *Gitter AH, Bendfeldt K, Schmitz H, Schulzke JD, Bentzel CJ, Fromm M.* Epithelial barrier defects in HT-29/B6 colonic cell monolayers induced by tumor necrosis factor-alpha. *Ann N Y Acad Sci* 2000 b; 915:193-203.
49. *Gonzales-Mariscal L, Chavez de Ramariz B, Cereijido M.* Tight junction formation in cultured epithelial cells (MDCK). *J Membr Biol* 1985;86:113-25.
50. *Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE.* Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 2003;81:1-44.
51. *Gow A, Southwood CM, Li JS.* CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in OSP/ claudin-11. *J Neurosci Res* 2000;60:284-290.
52. *Gregoric A, Bracic K, Novljan G, Marcun-Varda N.* Pseudotumor cerebri in a child with familial hypomagnesemia-hypercalciuria. *Pediatr Nephrol* 2000;14:269-70.
53. *Gumbiner B.* Structure, biochemistry and assembly of epithelial tight junctions. *Am J Physiol* 1987;253:749-58.

- 54.** *Gumbiner B, Lowenkopf T, Apatira D.* Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:3460-4.
- 55.** *Gumbiner B.* Breaking through the tight junction barrier. *J Cell Biol* 1993;123:1631-33.
- 56.** *Günzel D, Haisch L, Pfaffenbach S et al.* Claudin function in the thick ascending limb of Henle's loop. *Ann N Y Aca. Sci* 2009 a;1165:152-62.
- 57.** *Günzel D, Amasheh S, Pfaffenbach S et al.* Claudin-16 affects transcellular Cl⁻ secretion in MDCK cells. *J Physiol* 2009 b; 587:3777-93.
- 58.** *Haisch L, Almeida JR, Abreu da Silva PR, Schlingmann KP, Konrad M.* The role of tight junctions in paracellular ion transport in the renal tubule: lessons learned from a rare inherited tubular disorder. *Am J Kidney Dis* 2011;57:320-30.
- 59.** *Hampson G, Konrad MA, Scoble J.* Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis (FHHNC): compound heterozygous mutation in the claudin 16 (CLDN16) gene. *BMC Nephrol* 2008;9:12.
- 60.** *Haskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J, Stevenson BR.* ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occluding. *J Cell Biol* 1998;141:199-208.
- 61.** *Heiskala M, Peterson PA, Yang Y.* The roles of claudin superfamily in paracellular transport. *Traffic* 2001;2:293-9.
- 62.** *Heller F, Fromm A, Gitter AH, Mankertz J, Schulzke JD.* Epithelial apoptosis is a prominent feature of the epithelial barrier disturbance in intestinal inflammation: effect of pro-inflammatory interleukin-13 on epithelial cell function. *Mucosal Immunol* 2008;1:58-61.
- 63.** *Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ.* The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissue. *BMC Cancer* 2006;6:186.
- 64.** *Hirano T, Kobayashi N, Itoh T et al.* Null mutation of PCLN-1/Claudin-16 results in bovine chronic interstitial nephritis. *Genome Res* 2000;10:659-63.

- 65.** *Hoevel T, Macek R, Mundigl O, Swisshelm K, Kubbies M.* (2002) Expression and targeting of the tight junction protein CLDN1 in CLDN1-negative human breast tumor cells. *J Cell Physiol* 2002;191:60-8.
- 66.** *Hou J, Paul DL, Goodenough DA.* Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions. *J Cell Sci* 2005;118:5109-18.
- 67.** *Hou J, Shan Q, Wang T et al.* Transgenic RNAi depletion of claudin-16 and the renal handling of magnesium *J Biol Chem* 2007;282:17114-22.
- 68.** *Hou J, Renigunta A, Konrad M et al.* Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J Clin Invest* 2008;118:619-28.
- 69.** *Hou J, Renigunta A, Gomes AS et al.* Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:15350-5.
- 70.** *Hou J, Goodenough DA.* Claudin-16 and claudin-19 function in the thick ascending limb. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010;19:483-8.
- 71.** *Huo Q, Kinugasa T, Wang L et al.* Claudin-1 Protein is a Major Factor Involved in the Tumorigenesis of Colorectal Cancer. *Anticancer Res* 2009;29:851-7.
- 72.** *Ikari A, Hirai N, Shiroma M et al.* Association of paracellin-1 with ZO-1 augments the reabsorption of divalent cations in renal epithelial cells. *J Biol Chem* 2004;279:54826-32.
- 73.** *Ikari A, Matsumoto S, Harada H et al.* Phosphorylation of paracellin-1 at Ser217 by protein kinase A is essential for localization in tight junctions. *J Cell Sci* 2006;119:1781-9.
- 74.** *Ikari A, Ito M, Okude C et al.* Claudin-16 is directly phosphorylated by protein kinase A independently of a vasodilator-stimulated phosphoprotein-mediated pathway. *J Cell Physiol* 2008;214:221-9.
- 75.** *Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S.* Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 2005;171:939-45.
- 76.** *Inai T, Sengoku A, Guan X, Hirose E, Iida H, Shibata Y.* Heterogeneity in expression and subcellular localization of tight junction proteins, claudin-10 and -15,

examined by RT-PCR and immunofluorescence microscopy. *Arch Histol Cytol* 2005;68:349-60.

77. *Ip YC, Cheung ST, Lee YT, Ho JC, Fan ST.* Inhibition of hepatocellular carcinoma invasion by suppression of claudin-10 in HLE cells. *Mol Cancer Ther* 2007;6:2858-67.

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

79. *Jovov B, Van Itallie CM, Shaheen NJ et al.* Claudin-18: a dominant tight junction protein in Barrett's esophagus and likely contributor to its acid resistance. *Am J. Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:G1106-13.

80. *Jung H, Jun KH, Jung JH, Chin HM, Park WB.* The Expression of Claudin-1, Claudin-2, Claudin-3, and Claudin-4 in Gastric Cancer Tissue. *J Surg Res* 2010;167:e185-91.

81. *Kang JH, Choi HJ, Cho HY et al.* Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis associated with CLDN16 mutations. *Pediatr Nephrol* 2005;20:1490-3.

82. *Kausalya PJ/Amasheh S, Günzel D, Wurps H, Müller D, Fromm M, Hunziker W.* Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg²⁺ transport function of claudin-16. *J Clin Invest* 2006;116:878-91.

83. *Karanjawala ZE, Illei PB, Ashfaq R et al.* New markers of pancreatic cancer identified through differential gene expression analyses: claudin 18 and annexin A8. *Am J Surg Pathol* 2008;32:188-96.

84. *Kesting U, Schwab A, Treidel M.* Differentiation of Madin-Darby canine kidney cells depends on cell culture conditions. *Cell Physiol Biochem* 1993;3:42-55.

85. *Kinugasa T, Sakaguchi T, Gu X, Reinecker HC.* Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* 2000;118:1001-11.

86. *Kitajiri SI, Furuse M, Morita K et al.* Expression patterns of claudins, tight junction adhesion molecules, in the inner ear. *Hear Res* 2004 a;187:25-34.

- 87.** *Kitajiri S, Miyamoto T, Mineharu A et al.* Compartmentalization established by claudin-11-based tight junctions in stria vascularis is required for hearing through generation of endocochlear potential. *J Cell Sci* 2004 b;117:5087-96.
- 88.** *Kiuchi-Saishin Y, Gotoh S, Furuse M, Takasuga A, Tano Y, Tsukita S.* Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segment. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:875-86.
- 89.** *Konrad M, Schlingmann KP, Gudermann T.* Insights in the molecular nature of magnesium homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:F599-F605.
- 90.** *Konrad M, Schaller A, Seelow D et al.* Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *Am J Hum Genet* 2006;79(5):949-57.
- 91.** *Konrad M, Hou J, Weber S et al.* CLDN16 genotype predicts renal decline in familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:171-81.
- 92.** *Kreusel KM, Fromm M, Schulzke JD, Hegel U.* Cl-secretion in epithelialmonolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6). *Am J Physiol* 1991;261:C574-82.
- 93.** *Kriegs JO, Homann V, Kinne-Saffran E, Kinne RK.* Identification and subcellular localization of paracellin-1 (claudin-16) in human salivary glands. *Histochem Cell Biol* 2007;128:45-53.
- 94.** *Krug SM, Amasheh S, Richter JF et al.* Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol Biol Cell* 2009;20:3713-24.
- 95.** *Lee NP, Tong MK, Leung PP et al.* Kidney claudin-19: localization in distal tubules and collecting ducts and dysregulation in polycystic renal disease. *FEBS Lett* 2006;580:923-31.
- 96.** *Li WY, Huey CL, Yu AS.* Expression of claudin-7 and -8 along the mouse nephron. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:F1063-71.

- 97.** Luk JM, Tong MK, Mok BW, Tam PC, Yeung WS, Lee KF. Sp1 site is crucial for the mouse claudin-19 gene expression in the kidney cells. *FEBS Lett* 2004;578:251-56.
- 98.** Madin SH, Darby NB Jr. Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1958;98:574-6.
- 99.** Mandai K, Nakanishi H, Satoh A et al. Afadin: A novel actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell-to-cell adherens junction. *J Cell Biol* 1997;139:517-28.
- 100.** Mandel LJ, Bacallao R, Zampighi G. Uncoupling of the molecular 'fence' and paracellular 'gate' functions in epithelial tight junctions. *Nature* 1993;361(6412):552-5.
- 101.** Manz F, Scharer K, Janka P, Lombeck J. Renal magnesium wasting, incomplete tubular acidosis, hypercalciuria and nephrocalcinosis in siblings. *Eur J Pediatr* 1978;128:67-79.
- 102.** Matsuoka T, Mitomi H, Fukui N et al. Cluster analysis of claudin-1 and -4, E-cadherin, and β -catenin expression in colorectal cancers. *J Surg Oncol* 2011;103:674-86.
- 103.** Matter K, Balda MS. Holey barrier: claudins and the regulation of brain endothelial permeability. *J Cell Biol* 2003;161:459-60.
- 104.** Meertens L, Bertaux C, Cukierman L et al. The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *J Virol* 2008;82(7):3555-60.
- 105.** Meier W, Blumberg A, Imahorn W, De Luca F, Wildberger H, Oetliker O. Idiopathic hypercalciuria with bilateral macular colobomata: a new variant of oculo-renal syndrome. *Helv Paediatr Acta* 1979;34:257-69.
- 106.** Meza I, Ibarra G, Sabanero M, Martinez-Palomo A, Carejido M. Occludin junctions and cytoskeletal components in a cultured transporting epithelium. *J Cell Biol* 1980;87:746-54.
- 107.** Michaelis MF, Drash AL, Linarelli LG, De Rubertis FR, Davis BB. Decreased bicarbonate threshold and renal magnesium wasting in a sibship with renal tubular acidosis (Evaluation of the pathophysiological role of parathyroid hormone). *Metabolism* 1972;21:905-2.

- 108.** *Milatz S, Krug SM, Rosenthal R et al.* Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochim Biophys Acta* 2010;1798:2048-57.
- 109.** *Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y et al.* Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett* 2011;585:606-12.
- 110.** *Mitic LL, Van Itallie CM, Anderson JM.* Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G250-4.
- 111.** *Miyamoto T, Morita K, Takemoto D et al.* Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice. *J Cell Biol* 2005;169:527-38.
- 112.** *Montgomery E, Mamelak AJ, Gibson M et al.* Overexpression in esophageal adenocarcinoma and its precursor lesions. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006;14:24-30.
- 113.** *Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S.* Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Bio* 1999;147:185-94.
- 114.** *Morita K, Sasaki H, Furuse K, Furuse M, Tsukita S, Miyachi Y.* Expression of claudin-5 in dermal vascular endothelia. *Exp Dermatol* 2003;12:289-95.
- 115.** *Morita K, Miyachi Y, Furuse M.* Tight junctions in epidermis: from barrier to keratinization. *Eur J Dermatol* 2011;21:12-7.
- 116.** *Müller D, Kausalya PJ, Claverie-Martin F et al.* A novel claudin 16 mutation associated with childhood hypercalciuria abolishes binding to ZO-1 and results in lysosomal mistargeting. *Am J Hum Genet* 2003;73:1293-1301.
- 117.** *Müller D, Kausalya PJ, Bockenhauer D et al.* Unusual clinical presentation and possible rescue of a novel claudin-16 mutation. *J Clin Endocrin Metab* 2006 a;91:3076-79.

- 118.** Müller D, Kausalya PJ, Meij IC, Hunziker W. Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: blocking endocytosis restores surface expression of a novel claudin-16 mutant that lacks the entire C-terminal cytosolic tail. *Hum Mol Genet* 2006;15:1049-58.
- 119.** Naeem M, Hussain S, Akhtar N. Mutation in the Tight-Junction Gene Claudin 19 (CLDN19) and Familial Hypomagnesemia, Hypercalciuria, Nephrocalcinosis (FHHNC) and Severe Ocular Disease. *Am J Nephrol* 2011;34:241-48.
- 120.** Nakanishi K, Ogata S, Hiroi S, Tominaga S, Aida S, Kawai T. Expression of occludin and claudins 1, 3, 4, and 7 in urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *Am J Clin Pathol* 2008;130:43-9.
- 121.** Nicholson JC, Jones JL, Powell HR, Walker RG, McCredie DA. Familial hypomagnesemia – hypercalciuria leading to end-stage renal failure. *Pediatr Nephrol* 1995;9:74-6.
- 122.** Niimi T, Nagashima K, Ward JM et al. Claudin-18, a novel downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor, encodes lung- and stomach-specific isoforms through alternative splicing. *Mol Cell Biol* 2001;21:7380-90.
- 123.** Oshima T, Miwa H, Joh. Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:146-50.
- 124.** Peco-Antić A, Konrad M, Milosevski-Lomić G, Dimitrijević N. Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: the first four patients in Serbia. *Srp Arh Celok Lek* 2010;138:351-5.
- 125.** Peng S, Rao VS, Adelman RA, Rizzolo LJ. Claudin-19 and the barrier properties of the human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:1392-403.
- 126.** Peru H, Akin F, Elmas S, Elmasci AM, Konrad M. Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: report of three Turkish siblings. *Pediatr Nephrol* 2008;23:1009-12.
- 127.** Piontek J, Winkler L, Wolburg H et al. Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J* 2008;22:146–58.

- 128.** *Powell DW.* Barrier function of epithelia. *Am J Physiol* 1981;241:G275-88.
- 129.** *Prabakar MR, Manorajan R, Fernando ME, Venkatraman R, Balaraman V Jayakumar M.* Nephrocalcinosis in siblings--familial hypomagnesemia, hypercalciuria with nephrocalcinosis (FHHNC syndrome). *J Assoc Physicians India* 2006;54:497-500.
- 130.** *Praga M, Vara J, Gonzalez-Parra E et al.* Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Pediatr Nephrol* 1995;10:151.
- 131.** *Rahner C, Miltic LL, Anderson JM.* Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4 and 5 in the rat liver, pancreas and gut. *Gastroenterology* 2001;120:411-22.
- 132.** *Rodriguez-Boulan E, Nelson WJ.* Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* 1989;245:718-25.
- 133.** *Rodriguez-Soriano J, Vallo A, Garcia-Fuentes M.* Hypomagnesemia, of hereditary renal origin. *Pediatr Nephrol* 1987;1:465-72.
- 134.** *Rönnefarth G, Misselwitz J.* Nephrocalcinosis in children: a retrospective survey. Members of the Arbeitsgemeinschaft für pädiatrische Nephrologie. *Pediatr Nephrol* 2000;14:1016-21.
- 135.** *Sahin U, Koslowski M, Dhaene K et al.* Claudin-18 splice variant 2 is a pan-cancer target suitable for therapeutic antibody development. *Clin Cancer Res* 2008;14:7624-34.
- 136.** *Saitou M, Fujimoto K, Doi Y et al.* Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol* 1998;141:397-408.
- 137.** *Saitou M, Furuse M, Sasaki H et al.* Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 2000;11:4131-42.
- 138.** *Sanada Y, Oue N, Mitani Y, Yoshida K, Nakayama H, Yasui W.* Down-regulation of the claudin-18 gene, identified through serial analysis of gene expression data analysis, in gastric cancer with an intestinal phenotype. *J Pathol* 2006;208:633-42.

- 139.** Sas D, Hu M, Moe OW, Baum M. Effect of claudins 6 and 9 on paracellular permeability in MDCK II cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;295:R1713-9.
- 140.** Satoh J, Romero MF. Mg²⁺ Transport in the kidney *Biometals* 2002;15:285-95.
- 141.** Sawada N, Murata M, Kikuchi K et al. Tight junctions and human diseases. *Med Electron Microsc* 2003;36:147-56.
- 142.** Schlingmann KP, Gudermann T. A critical role of TRPM channel-kinase for human magnesium transport. *J Physiol* 2005;566:301-8.
- 143.** Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF α) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci* 1999 a;112:137-46.
- 144.** Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M et al. Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1999 b;116:301-9.
- 145.** Schneeberger EE, Lynch RD. Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am J Physiol* 1992;262:647-61.
- 146.** Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;286:C1213-28.
- 147.** Schulzke JD, Gitter AH, Mankertz J et al. Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim Biophys Acta* 2005;1669:34-42.
- 148.** Schulzke JD, Bojarski C, Zeissig S, Heller F, Gitter AH, Fromm M. Disrupted barrier function through epithelial cell apoptosis. *Ann NY Acad Sci* 2006;1072:288-99.
- 149.** Seeley HH, Loomba-Albrecht LA, Nagel M, Butani L, Bremer AA. Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis in three siblings having the same genetic lesion but different clinical presentations. *World J Pediatr* 2011;[Epub ahead of print]
- 150.** Simon DB, Lu Y, Choate KA et al. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science* 1999;285:103-6.

- 151.** *Sirotkin H, Morrow B, Saint-Jore B et al.* Identification, characterization, and precise mapping of a human gene encoding a novel membrane-spanning protein from the 22q11 region deleted in velo-cardio-facial syndrome. *Genomics* 1997;42:245-51.
- 152.** *Soebel G, Nemeth J, Kiss A et al.* Claudin 1 differentiates endometrioid and serous papillary endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 2006;103:591-98.
- 153.** *Soini Y, Tommola S, Helin H, Martikainen P.* Claudins 1, 3, 4 and 5 in gastric carcinoma, loss of claudin expression associates with the diffuse subtype. *Virchows Arch* 2006;448:52-8.
- 154.** *Songyang Z, Fanning AS, Fu C et al.* Recognition of unique carboxylterminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 1997;275:73-7.
- 155.** *Sonoda N, Furuse M, Sasaki H et al.* Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol* 1999;147:195-204.
- 156.** *Staehelein LA.* Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junction. *J Cell Sci* 1973;13:763-6.
- 157.** *Staehelein LA.* Structure and function of intercellular junction. *Int Rev Cytol* 1974;39:191-283.
- 158.** *Staiger K, Staiger H, Haas C et al.* Hypomagnesemia and nephrocalcinosis in a patient with two heterozygous mutations in the CLDN16 gene. *J Nephrol* 2007;20:107-10.
- 159.** *Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA.* Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 1986;103:755-66.
- 160.** *Tajima T, Nakae J, Fujieda K.* Two heterozygous mutations of CLDN16 in a Japanese patient with FHHNC. *Pediatr Nephrol* 2003;18:1280-2.
- 161.** *Takala H, Saarnio J, Wiik H, Soini Y.* Claudins 1, 3, 4, 5 and 7 in esophageal cancer: loss of claudin 3 and 4 expression is associated with metastatic behavior. *Apmis* 2007;115:838-47.

- 162.** *Takehara M, Nishimura T, Mima S, Hoshino T, Mizushima T.* Effect of claudin expression on paracellular permeability, migration and invasion of colonic cancer cells. *Biol Pharm Bull* 2009;32:825-31.
- 163.** *Tamura A, Kitano Y, Hata M et al.* Megaintestine in claudin-15-deficient mice. *Gastroenterology* 2008;134:523-34.
- 164.** *Tang VW, Goodenough DA.* Paracellular ion channel at the tight junction. *Biophys J* 2003;84:1660-73.
- 165.** *Tasic V, Dervisov D, Koceva S, Weber S, Konrad M.* Hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: case report and a family study. *Pediatr Nephrol* 2005;20:1003-6.
- 166.** *Tebbe B, Mankertz J, Schwarz C et al.* Tight junction proteins: a novel class of integral membrane proteins. Expression in human epidermis and in HaCaT keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 2002;294:14-18.
- 167.** *Thompson PD, Tipney H, Brass A et al.* Claudin 13, a member of the claudin family regulated in mouse stress induced erythropoiesis. *PLoS One* 2010;5(9). pii: e12667.
- 168.** *Tsukita S, Furuse M.* Overcoming barriers in the study of tight junctions: from occludin to claudin. *Genes Cells* 1998;3:569-73.
- 169.** *Tsukita S, Furuse M.* Occludin and claudin in tight junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol* 1999;9:268-73.
- 170.** *Tsukita S, Furuse M, Itoh M.* Structural and signalling molecules come together at the tight junction. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:628-33.
- 171.** *Tsukita S, Furuse M.* Pores in the Wall: Claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol* 2000;149:13-16.
- 172.** *Tsukita S, Furuse M, Itoh M.* Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:285-93.
- 173.** *Turksen K, Troy TC.* Claudin-6: A novel tight junction molecule is developmentally regulated in mouse embryonic epithelium. *Dev Dyn* 2001;222:292-300.

- 174.** *Turksen K, Troy TC.* Barriers built on claudins. *J Cell Sci* 2004;117:2435-47.
- 175.** *Ussing HH, Zerahn K.* Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuit isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 1951;23:110-27.
- 176.** *Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM.* Regulated expression of claudin 4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest* 2001;107:1319-27.
- 177.** *Van Itallie CM, Anderson JM.* The Role of Claudins in Determining Paracellular Charge Selectivity. *Proc Am Thoracic Soc* 2004;1:38-41.
- 178.** *Van Itallie CM, Rogan S, Yu A, Vidal LS, Holmes J, Anderson JM.* Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291:F1288-99.
- 179.** *Weber S, Hoffmann K, Jeck N et al.* Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis maps to chromosome 3q27 and is associated with mutations in the PCLN-1 gene. *Eur J Hum Genet* 2000;8:414-22.
- 180.** *Weber S, Schlingmann K, Peters M et al.* Primary gene structure and expression studies of rodent paracellin-1. *J Am Soc Nephrol* 2001 a;12:2664-72.
- 181.** *Weber S, Schneider L, Peters M et al.* Novel paracellin-1 mutations in 25 families with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *J Am Soc Nephrol* 2001 b;12:1872-81.
- 182.** *Weiske J, Schoneberg T, Schroder W, Hatzfeld M, Tauber R, Huber O.* The fate of desmosomal proteins in apoptotic cells. *J Biol Chem* 2001;276:41175-81.
- 183.** *Wilcox ER, Burton QL, Naz S.* Mutation in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB 29. *Cell* 2001;104:165-72.
- 184.** *Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Liebner S, Engelhardt B.* Claudin-1, claudin-2 and claudin-11 are present in tight junctions of choroid plexus epithelium of the mouse. *Neurosci Lett* 2001;307:77-80.
- 185.** *Wolf MT, Dötsch J, Konrad M, Böswald M, Rascher W.* Follow-up of five patients with FHHNC due to mutations in the Paracellin-1 gene. *Pediatr Nephrol* 2002;17:602-8.

- 186.** *Wong V, Gumbiner BM.* A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. *J Cell Biol* 1997;136:399-409.
- 187.** *Wu Q, Liu Y, Ren Y et al.* Tight junction protein, claudin-6, downregulates the malignant phenotype of breast carcinoma *Eur J Cancer Prev* 2010;19:186-94.
- 188.** www.nastech.com, (2005): Abbildung Tight junction
- 189.** *Yu AS, Enck AH, Lencer WI, Schneeberger E.* Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation. *J Biol Chem* 2003;278:17350-9.
- 190.** *Yu AS, McCarthy KM, Francis SA et al.* Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;288:C1231-41.
- 191.** *Yu AS, Cheng MH, Angelow S et al.* Molecular basis for cation selectivity in claudin-2-based paracellular pores: identification of an electrostatic interaction site. *J Gen Physiol* 2009;133:111-27.
- 192.** *Zeissig S, Bürgel N, Günzel D et al.* Changes in Expression and distribution of claudin-2, -5 and -8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 2006;56:61-72.
- 193.** *Zeissig S, Bürgel N, Günzel D et al.* Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 2007;56:6-8.
- 194.** *Zheng A, Yuan F, Li Y et al.* Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J Virol* 2007;81:12465-71.
- 195.** *Zimmermann B, Plank C, Konrad M et al.* Hydrochlorthiazide in CLDN16 mutation. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:2127-32.

Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. med. Michael Fromm für die Vergabe des Themas und für die Möglichkeit zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Salah Amasheh für die Betreuung meiner Arbeit, für die nette Einarbeitung in die Thematik und die fortwährende Unterstützung. Insbesondere danke ich ihm für seine Geduld und sein Verständnis, die stetige Hilfsbereitschaft bei allen aufgetretenen Fragen und für die Motivation zur Fertigstellung des schriftlichen Teils.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle Mitarbeiter des Instituts für Klinische Physiologie für die liebevolle Betreuung und Unterstützung, die fruchtbaren Diskussionen und gedanklichen Anregungen während der experimentellen Zeit und die angenehme Atmosphäre.

Ich danke meiner Mutter Sabine Melovski, dass sie mich stets ermutigt hat und insbesondere dafür, dass sie mir Freiraum für die schriftliche Fertigstellung, indem sie unzählige Zeit auf meine Kinder Milos, Janik und Lotta aufgepasst hat, ermöglicht hat. Ich danke Olaf Stenske für den guten Zuspruch und die Hilfe bei der Erstellung computerspezifischer, unbeliebter und deshalb besonders zehrender Details und natürlich ebenfalls für so manche gute Ablenkung meiner lieben Kleinen.

Ich danke meinen Geschwistern Tina Hess und Filip Melovski sowie meinen Freunden Katja Fischer, Krisztina Turna und Hajnal Kalnoki-Lukovics, für die Liebe und Freundschaft, die sie mir entgegenbringen und dass sie mich auch in allen Phasen immer wieder zum Lachen gebracht haben.

Und natürlich Milos, Janik und Lotta...

Erklärung

„Ich, Mila Melovski, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Generierung eines epithelialen Zellmodells zur funktionellen Charakterisierung des Tight Junction-Proteins Claudin-16 selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Publikationen

1. *Amasheh S, Schmidt T, Melovski M, Mahn M, Florian P, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M.* Functional interplay of claudin-2 and claudin-5 determines paracellular permeability of epithelial cells. *Pflügers Arch* 2004;447:S91 (DPG, poster).
2. *Günzel D, Melovski M, Richter JF, Amasheh S, Schulzke JD, Fromm M.* The tight junction protein claudin-16, stably expressed in MDCK cells, causes a paracellular Mg²⁺ conductance. *Pflügers Arch* 2004;447:S41 (DPG, talk).
3. *Günzel D, Melovski M, Richter J, Amasheh S, Schulzke JD, Fromm M.* Functional properties of claudin-16 in a tight epithelial cell model. *J Physiol Biochem* 2004;60:183 (EITG, poster).
4. *Günzel D, Richter J, Melovski M, Amasheh S, Schulzke JD, Fromm M.* Stabile Expression von Claudin-16 in MDCK-Zellen verstärkt parazellulären und transzellulären Mg²⁺-induzierten Strom. *Magnesium Research* 2005;18:66-67 (25. Mg-Symp. Ges. Mg-Forsch).