

Aus dem  
CharitéCentrum 13:  
Innere Medizin mit Gastroenterologie und Nephrologie

Medizinische Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie  
(einschließlich Arbeitsbereich Ernährungsmedizin)  
Leiter des Arbeitsbereichs Ernährungsmedizin:  
Prof. Dr. med. Jörg-Dieter Schulzke

## **Tight Junction-Proteine als regulierbare Kanal- und Barrierebildner**

### **Habilitationsschrift**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach

"Experimentelle Biomedizin"

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. rer. nat. Susanne M. Krug**

Eingereicht:	Oktober 2015
Dekan:	Prof. Dr. med. Axel R. Pries
1. Gutachter/in:	Prof. Dr. med. Christoph Korbmacher
2. Gutachter/in:	Prof. Dr. med. Markus Bleich



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>I. Einleitung.....</b>	<b>5</b>
<b>1 Epithelien .....</b>	<b>5</b>
1.1 Transzellulärer Transport.....	6
1.2 Parazellulärer Transport .....	7
<b>2 Tight Junction-Proteine.....</b>	<b>7</b>
2.1 Claudine .....	8
2.2 TAMPs.....	11
2.3 Anguline .....	12
<b>3 Ultrastruktur der Tight Junction .....</b>	<b>13</b>
<b>4 Funktionelle Analyse der Tight Junction .....</b>	<b>16</b>
4.1 Widerstandsmessung in der Ussingkammer .....	16
4.2 Ein- und Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie.....	16
4.3 Dilutions- und biionische Potentialmessungen .....	19
4.4 Permeabilitätsmessungen von parazellulären Markern unterschiedlicher Größe ....	20
<b>5 Molekulare Analyse von Tight Junction-Proteinen .....</b>	<b>20</b>
5.1 Mutagenese.....	20
5.2 Molekulare Modellierung der Kanaleigenschaften.....	21
<b>6 Fragestellungen .....</b>	<b>22</b>
<b>II. Eigene Arbeiten .....</b>	<b>23</b>
1 Claudin-17 bildet parazelluläre Anionenkanäle aus.....	23
2 Molekulare Grundlagen der Anionenselektivität von Claudin-17 .....	38
3 Die perineurale Barriere lässt sich kurzfristig über Regulation von Claudin-1 öffnen .....	55
4 Die parazelluläre Durchlässigkeit kann über Tight Junction-Protein-spezifische Liganden reguliert werden .....	66
5 Caprat reguliert die Permeabilität für Makromoleküle über die trizelluläre Tight Junction .....	78
<b>III. Diskussion .....</b>	<b>87</b>
1 Die molekularen Eigenschaften von Claudinen machen ihre Funktion innerhalb der Tight Junction aus.....	87
2 Die Entwicklung spezifischer Absorptionenhancer zielt auf eine kontrollierte, transiente Öffnung der parazellulären Barriere .....	88
3 Die parazelluläre Passage von Makromolekülen erfolgt über die trizelluläre Tight Junction und kann ebenfalls modifiziert werden.....	88
<b>IV. Zusammenfassung .....</b>	<b>93</b>
<b>V. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>94</b>
<b>VI. Danksagung .....</b>	<b>100</b>
<b>VII. Erklärung .....</b>	<b>101</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AJ	Adherens Junction, <i>Zonula adhaerens</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bTJ	bizelluläre Tight Junction
C	Kapazität [F]
CAR	Coxsackie and adenovirus receptor
C-CPE	C-terminale Domäne des CPE
Cldn	Claudin
CPE	<i>Clostridium perfringens</i> enterotoxin
DAMGO	[D-Ala <sup>2</sup> ,N-Me-Phe <sup>4</sup> ,Gly <sup>5</sup> -ol]-Enkephalin
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EM	Elektronenmikroskopie
ERK1/2	Extrazellulär regulierte Kinase 1/2
ESAM	Endothelial cell-selective adhesion molecule
G	Leitfähigkeit (Kehrwert des Widerstands) [S]
IL-13	Interleukin-13
ILDR	Immunoglobulin-like domain-containing receptor
JAM	Junctional adhesion molecule
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
LSR	Lipolyse-stimulierter Lipoproteinrezeptor
MAGUK	Membranassoziierte Guanylatkinase
MAL	Myelin and lymphocyte
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MARVEL	MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link
MDCK II	Madin-Darby Canine Kidney Cells Typ II
MMP9	Matrix-Metalloprotease-9
MUPP-1	Multi-PDZ-Domänenprotein 1
PAR	Partitioning-defective protein
PEG	Polyethylenglykol
R <sup>epi</sup>	Epithelialer Widerstand [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]
R <sup>para</sup>	Parazellulärer Widerstand [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]
R <sup>sub</sup>	Subepithelialer Widerstand [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]
R <sup>t</sup> = TER	Transepithelialer Widerstand [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]
R <sup>trans</sup>	Transzellulärer Widerstand [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]
SGLT1	Sodium-Glucose Transporter 1
SH3	Src-Homologieregion
SV40	Simian-Virus 40
TAMP	Tight Junction-assoziiertes MARVEL-Protein
TER	Transepithelialer Widerstand [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]
TJ	Tight Junction, <i>Zonula occludens</i>
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TRIC	Tricellulin
tTJ	trizelluläre Tight Junction
ZO	<i>Zonula occludens</i>
ZONAB	ZO-1-associated nucleic acid binding protein

# I. Einleitung

## 1 Epithelien

Epithelien gehören neben Muskel-, Nerven- und Bindegewebe zu den vier Grundgewebstypen und kleiden die inneren und äußeren Oberflächen des Körpers aus.

Sie werden morphologisch nach der Anzahl ihrer Zellschichten und Zellform der obersten Epithelzellschicht in einschichtige einfache, einschichtig mehrreihige und mehrschichtige Epithelien unterteilt. Eine Untergruppe der Epithelien stellen die Endothelien dar, die die innere Auskleidung der Blut- und Lymphgefäße bilden.

Epithelzellen sind polarisierte Zellen, deren Plasmamembranen funktionell in eine apikale und basolaterale Seite unterteilt werden. Die apikale Membran ist dem Lumen (bzw. bei Epidermis der Körperoberfläche) zugewandt. Die basolaterale Membran besteht aus zwei Anteilen, der den benachbarten Zellen zugewandten lateralen Zellmembran und der zur Basallamina gerichteten basalen Zellmembran. Bei Epithelien ist die basale Zellmembran in der Regel der Blutseite zugewandt, während es bei Endothelien umgekehrt ist – dort ist die apikale Membran dem Gefäßlumen und somit dem Blut zugewandt. Die Grenze zwischen der lateralen und der apikalen Zellmembran wird durch die Tight Junction gebildet.

Als Grenzflächen haben Epithelien spezifische Funktionen, die neben dem Schutz vor mechanischer Schädigung oder Feuchtigkeitsverlust vor allem die Ausbildung von Barrieren zwischen den Kompartimenten und der Umwelt, aber auch Regulation von Transport in sekretorischer und resorptiver Richtung umfassen.

Die Gesamtfunktion eines Epithels ergibt sich aus dem Zusammenwirken dieser Funktionen und erlaubt die funktionelle Klassifizierung von Epithelien nach ihrer Permeabilität für Solute und Wasser. Die klassische Einteilung in lecke, dichte und undurchlässige Epithelien (Fromm, 2011, Diamond, 1974) erfolgt anhand ihrer Leitfähigkeit für Ionen, dem Kehrwert des elektrischen Widerstands. Ausschlaggebend ist hierbei das Verhältnis der Leitfähigkeiten des transzellulären Weges (durch die Zellen hindurch) und des parazellulären Weges (extrazellulär zwischen benachbarten Zellen hindurch). Transzelluläre Passage beinhaltet den Durchtritt durch die apikale und die basolaterale Membran, während parazelluläre Passage durch die Tight Junction und den Interzellulärspalt erfolgt.

- Lecke Epithelien sind dadurch definiert, dass ihre parazelluläre Leitfähigkeit höher ist als die transzelluläre. Sie finden sich in den Anfangsteilen tubulärer Epithelien wie dem proximalen Nierentubulus und dem Dünndarm. Lecke Epithelien können große Transportraten mit einem erheblichen parazellulären Anteil aufweisen, jedoch nicht gegen nennenswerte Ionengradienten arbeiten (Frömter, 1972, Frömter & Diamond, 1972, Windhager et al., 1967).
- Dichte Epithelien besitzen eine geringere parazelluläre als transzelluläre Leitfähigkeit. Die Zellmembranen sind somit durchlässiger für Ionen als der Weg durch die Tight Junction und der Transport von Ionen findet somit vorwiegend transzellulär statt. Diese Art von Epithelien findet sich in den Endsegmenten tubulärer Epithelien wie dem distalen Nierentubulus und dem Dickdarm. Dichte Epithelien transportieren weniger, können jedoch gegen zum Teil hohe Gradienten arbeiten.

## I. Einleitung

- Undurchlässige Epithelien, zu denen lediglich die Epidermis und die Harnblase zählen, transportieren extrem wenig. Hier liegt die parazelluläre Leitfähigkeit bei unter einem Prozent der transzellulären Leitfähigkeit, wobei beide so gering sind, dass undurchlässige Epithelien vor allem als Barriere fungieren.

Es ist nicht allzu lange her, dass die Transporteigenschaften der Epithelien fast ausschließlich den Kanälen und Carriern der Zellmembranen zugeschrieben wurden. Wir wissen jedoch inzwischen, dass auch die Tight Junction Kanäle aufweist (Tang & Goodenough, 2003) und somit der parazelluläre Weg – am stärksten bei den lecken Epithelien – zum epithelialen Transport beiträgt (Marcial et al., 1984, Ross et al., 1972). Der ausführlichen Darstellung des parazellulären Transports ist zum Vergleich der beiden Transportwege eine kurze Übersicht über den transzellulären Transport vorangestellt.

### 1.1 Transzellulärer Transport

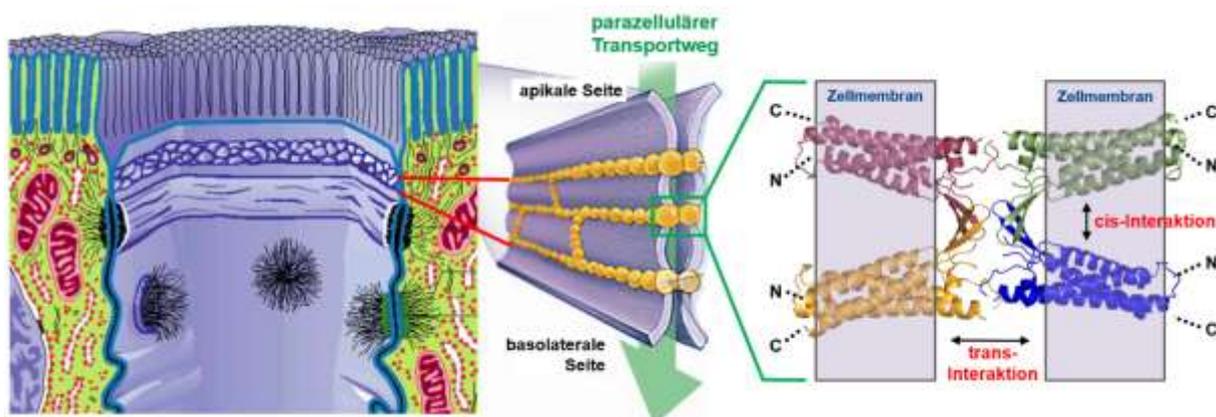
Der transzelluläre Transportweg verläuft durch die apikale und die basolaterale Membran der Epithelzellen. Der Transport von lipophilen Stoffen wie Gase oder Ethanol erfolgt durch einfache Diffusion direkt durch die Phospholipidbereiche der Zellmembran; hydrophile Substanzen dagegen können die Phospholipidmembran nicht ohne weiteres passieren, sondern werden durch Transportproteine oder Zytosemechanismen transportiert. Man unterscheidet drei Arten von Transportproteinen: Kanäle, Carrier und Pumpen:

- Kanäle bestehen in der Regel aus einer durch die Membran führenden tunnelförmigen Pore, Selektivitätsfiltern für Größe und für elektrische Ladung, sowie einem Öffnungs- bzw. Aktivierungsmechanismus. Die meisten Kanäle sind selektiv für Ionen oder Ionensorten gleicher Ladung oder z.B. für Wasser. Die treibende Kraft ist ein elektrochemischer Gradient, der sich aus Konzentrations- und Potentialdifferenzen zusammensetzt. Die Aktivierung und Deaktivierung erfolgt bei epithelialen Kanälen in vielen Fällen durch intrazellulär vermittelte Phosphorylierungsschritte.
- Carrier durchlaufen – anders als Kanäle – eine molekulare Konformationsänderung bei jedem Transportschritt. Man unterscheidet drei Klassen: Uniporter vermitteln rein passiven Transport einer Substanz entsprechend ihrem Konzentrationsgradienten. Symporter benötigen für den Transport eine weitere Substanz: Die eine (zumeist  $\text{Na}^+$ ) wird dabei entlang ihres Gradienten transportiert und die andere kann aufgrund der dabei freiwerdenden Energie auch entgegen ihrem Gradienten transportiert werden. Antiporter transportieren zwei Substanzarten in entgegengesetzte Richtungen. Als Antrieb dient den Symportern und Antiportern der Gradient (z.B. für  $\text{Na}^+$ ), der durch die im Folgenden genannten Pumpen aufgebaut wird.
- Pumpen – das bekannteste Beispiel ist die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase – werden auch als Transport-ATPasen bezeichnet, da sie unter ATP-Hydrolyse den Transport gegen Konzentrationsgradienten ermöglichen. Indem sie z.B. die intrazelluläre Konzentration von  $\text{Na}^+$  niedrig halten, treiben sie indirekt den Transport vieler Symporter und Antiporter an.
- Zytosemechanismen bewirken den Transport durch die Zellmembranen durch einen gänzlich anderen Vorgang. Hierbei kommt es – zum Teil rezeptorvermittelt – zu Einstülpungen und Abschnürung der Membran und der Ausbildung (und gegebenenfalls Wiedereinschleusung) von Vesikeln, in denen sich die zu transportierenden Solute befinden. Auch hierbei handelt es sich um einen aktiven Prozess, über den vor allem größere Moleküle transportiert werden können. Im Falle einer endozytotischen Aufnahme und exozytotischen Abgabe auf der gegenüberliegenden Zelleseite spricht man von Transzytose.

## 1.2 Parazellulärer Transport

Die Zell-Zell-Kontakte der Tight Junction bestehen aus Multiproteinkomplexen, welche die Epithelzelle netzartig im apikolateralen Bereich umgürten und dadurch eine Grenze zwischen apikal und basolateral bilden (*Abbildung 1, links*). Diese Grenze hat zwei Funktionen: Zum einen verhindert sie die Diffusion transmembranaler Proteine zwischen apikaler und basolateraler Zellmembran („Fence“-Funktion) und hält so die Zellpolarisation aufrecht (Assémat et al., 2008, Shin et al., 2006). Zum anderen verhindert die Tight Junction die ungehinderte Diffusion von Substanzen zwischen den Zellen hindurch („Gate“-Funktion), wobei der Interzellulärspalt keine nennenswerte Barriere darstellt (Frömter, 1972).

Anders als ihre Bezeichnung Tight Junction bzw. *Zonula occludens* suggeriert, ist sie jedoch nicht in allen Epithelien völlig dicht, sondern ermöglicht in vielen Epithelien den passiven Durchtritt von Ionen und Wasser auf dem parazellulären Transportweg (*Abbildung 1, Mitte*). Die Regulation dieses Transportweges erfolgt durch die im nächsten Abschnitt vorgestellten Tight Junction-Proteine. Es handelt sich um transmembranale Proteine, die sowohl mit benachbarten Proteinen der gleichen Membran (*cis*-Interaktion) als auch mit Proteinen der Membran der gegenüberliegenden Zelle (*trans*-Interaktion) interagieren. Erst durch diese Anordnung vermögen sie den parazellulären Weg abzudichten oder selektiv durchlässig zu machen (*Abbildung 1, rechts*).



*Abbildung 1: Aufbau der Tight Junction. Links: Anschnitt dreier Epithelzellen mit Darstellung des Tight Junction-Netzwerkes und der basalwärts darunter angeordneten Adhärenz Junction (Nach (Krstic, 1978)). Mitte: Parazellulärer Transportweg und Tight Junction-Stränge, bestehend aus Proteinen benachbarter lateraler Zellmembranen. Rechts: Modell der cis- und trans-Interaktion von Tight Junction-Proteinen (Claudin-15, nach Daten von Suzuki et al., 2015).*

## 2 Tight Junction-Proteine

Tight Junctions der „lecken“ Epithelien sind sehr viel permeabler für Ionen als die der „dichten“ oder der „undurchlässigen“ Epithelien. Diese große Variabilität ergibt sich aus der unterschiedlichen Protein-Zusammensetzung der Tight Junctions sowie ihrer Ultrastruktur. Die Proteine der Tight Junction bestimmen nicht nur die jeweils typischen Permeabilitäts- bzw. Barriereigenschaften der Tight Junction unterschiedlicher Gewebe, sondern werden auch unter physiologischen Bedingungen reguliert und durch pathologische Einflüsse – zum Teil dramatisch – verändert (Schneeberger & Lynch, 2004, Krug et al., 2014, Günzel & Yu, 2013, Beyenbach, 2003).



Die Größe der Claudine variiert zwischen 20 und 36 kDa. Eine Gruppe der Claudine wird aufgrund von Sequenzhomologien als "klassische" Claudine bezeichnet (Claudine 1–10, 14, 15, 17, 19), während alle übrigen größere Unterschiede aufweisen und "nicht-klassische" Claudine genannt werden (Krause et al., 2008).

Die meisten Claudine (Ausnahmen: Claudine 12, 19a, 21 und 24-27 (Günzel & Fromm, 2012, Stiffler et al., 2007)) besitzen C-terminal ein PDZ-Motiv (siehe Abbildung 2, rot gestrichelte Kästchen), über das sie mit peripheren Tight Junction-Proteinen verbunden sind (siehe Abschnitt 2.5 Periphere Tight Junction-Proteine).

Bis 2001 ging man davon aus, dass alle Claudine mehr oder weniger abdichtende Funktion besitzen – was damals zu ihrer Namensgebung (lat. *claudere*, schließen) führte (Furuse et al., 1998). Die bei lecken Epithelien offensichtliche hohe Ionenpermeabilität der Tight Junction wurde bis dahin allein auf Unvollständigkeit und/oder eine geringe Zahl der von den Tight Junction-Proteinen gebildeten Stränge zurückgeführt.

Umso größer war die Überraschung, als im Jahr 2001 gezeigt wurde, dass die Überexpression eines einzelnen Tight Junction-Proteins – Claudin-2 – den transepithelialen Widerstand nicht steigert, sondern im Gegenteil sogar senkt (Furuse et al., 2001) und dass Claudin-2 kationen-selektive Kanäle bildet (Amasheh et al., 2002).

Später wurde für mehrere weitere Claudine entdeckt, dass sie Kanaleigenschaften besitzen, wobei diese entweder für Kationen, für Anionen oder für Wasser bevorzugt permeabel sind (siehe Tabelle 1). Es handelt sich hierbei um parazellulär verlaufende Kanäle, die – anders als die Vielzahl der apikalen und basolateralen Membrankanäle – die Zellmembran nicht kreuzen und aus Proteinen zweier lateraler Zellmembranen bestehen. Voraussetzung für die Kanalbildung (ebenso wie für die Abdichtungsfunktion barrierebildender Tight Junction-Proteine) ist die Interaktion der extrazellulären Schleifen gegenüberliegender und benachbarter Proteine (*trans*- und *cis*-Interaktion, Abbildung 1 rechts).

Claudine besitzen somit ein weites Funktionsspektrum und sind hauptverantwortlich für die Barriereigenschaften und Selektivität der Tight Junction (Günzel & Fromm, 2012).

Viele Claudine, wie z.B. Claudin-1, -3, -4 und -5, führen zu einer Abdichtung der Tight Junction.

- Claudin-1 ist ein für die Abdichtung unabdingbarer Bestandteil der Epidermis. Im Knock-out-Modell führt ein Fehlen von Claudin-1 zu massivem, tödlichem Wasserverlust (Furuse et al., 2002).
- Claudin-3 ist ein ubiquitär exprimiertes Claudin, das abdichtende Funktion hat (Milatz et al., 2010) und zudem eine hohe Ähnlichkeit mit Claudin-4 aufweist, das bei Überexpression zu einem starken Abfall der Kationendurchlässigkeit, aber nicht der Permeabilität für Anionen führt (Van Itallie et al., 2001). Sowohl Claudin-3 als auch Claudin-4 haben Einfluss auf Tight Junction-Komplexität (Colegio et al., 2002) und -erscheinungsbild (Furuse et al., 1999, Milatz et al., 2010, Van Itallie et al., 2001).
- Claudin-5 ist wichtiger Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke, wo es barrierebildende Funktion aufweist, welche im Knockout und durch stabile Transfektion von Zelllinien nachgewiesen werden konnte (Amasheh et al., 2005, Nitta et al., 2003).

Andere Claudine dagegen besitzen kanalbildende Eigenschaften (Krug et al., 2012a), wobei sie nicht nur den transepithelialen Widerstand (TER) als Maß für die Gesamtionenleitfähigkeit erniedrigen, sondern auch ladungsselektiv sind.

- Claudin-2, war das erste als kanalbildend beschriebene Tight Junction-Protein (Furuse et al., 2001) und erwies sich als selektiv durchlässig für kleine Kationen (Amasheh et al., 2002)

## I. Einleitung

und für Wasser (Rosenthal et al., 2010). Es wird typischerweise in lecken, proximalen Segmenten röhrenförmiger Epithelien wie dem proximalem Tubulus (Kiuchi-Saishin et al., 2002) oder dem Dünndarm (Rahner et al., 2001, Van Itallie et al., 2008) stark exprimiert. Auch wird oft eine Heraufregulation von Claudin-2 unter pathologischen Bedingungen, wie z.B. bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beobachtet (Heller et al., 2005, Zeissig et al., 2007). Hierbei wird es unter anderem durch proinflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  reguliert (Mankertz et al., 2009).

- Claudin-15 ist ein weiterer kationenselektiver Kanalbildner (Colegio et al., 2002, Van Itallie et al., 2003). Es wird im Darm exprimiert (Fujita et al., 2006, Inai et al., 2005) und bewirkt hier durch die Rezirkulation des durch den Natrium-Glukose-Symporter SGLT1 aufgenommenen Na<sup>+</sup>, dass die Glukoseresorption effektiv funktionieren kann (Tamura et al., 2011). Claudin-15 ist das erste Claudin, dessen Röntgenkristallstruktur aufgeklärt wurde (Suzuki et al., 2014, Suzuki et al., 2015). Dies stellt einen entscheidenden Durchbruch, u.a. für die Modellierung der Kanaleigenschaften von molekular ähnlichen Claudinen, dar (Conrad et al., 2015; Abschnitt II.2).
- Claudin-10 stellt ein besonderes kanalbildendes Tight Junction-Protein dar – es existiert nämlich in zwei Spleißvarianten, die sich nur im ersten extrazellulären Loop unterscheiden, was aber zur Folge hat, dass die Variante Claudin-10b kationenselektiv ist, während Claudin-10a anionenselektive Kanäle ausbildet (Günzel et al., 2009b, Van Itallie et al., 2006).
- Claudin-17 ist ein Tight Junction-Protein, das parazelluläre Kanäle mit einer klaren Anionenselektivität ausbildet. Bezüglich der Entdeckung der Kanaleigenschaft dieses Claudins und deren molekularer Determinanten wird auf die eigenen Publikationen der Abschnitte II.1 und II.2 verwiesen (Conrad et al., 2015, Krug et al., 2012b)

Je nach verwendetem System der Analyse, aber auch abhängig von dem Vorhandensein anderer Claudine, ergeben sich für einige Claudine unterschiedliche Einflüsse auf die parazelluläre Barriere.

- Claudin-4 wurde als ein für Kationen abdichtendes Claudin beschrieben (Van Itallie et al., 2001), kann aber auch zusammen mit Claudin-8, das ebenfalls ein abdichtendes Claudin ist, zu einer weiteren Permeabilitätserhöhung für Anionen führen (Hou et al., 2010).
- Claudin-16 wurde in frühen Untersuchungen als kanalbildendes Claudin für Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup> beschrieben (Günzel et al., 2009a, Hou et al., 2005). In anderen Untersuchungen zeigte sich dann, dass Claudin-16 allein nicht diesen Effekt bewirkt (Kausalya et al., 2006) und eher auf die Natriumpermeabilität wirkt (Hou et al., 2007). Nach heutigem Kenntnisstand wirkt Claudin-16 nur zusammen mit Claudin-19 kanalbildend (Hou et al., 2008, Peng et al., 2011).

Derartige unterschiedliche oder sogar widersprüchliche Befunde unterstreichen, wie variabel die Eigenschaften der Tight Junction in Abhängigkeit von Expressionen unterschiedlicher Claudine sind und welche entscheidende Bedeutung die Interaktion und Regulation der einzelnen Claudine für die parazelluläre Barriere besitzen.

Einen Überblick über die hinsichtlich ihrer Barriereigenschaften derzeit charakterisierten Claudine (einschließlich der im folgenden Abschnitt besprochenen TAMPs) gibt Tabelle 1.

**Table 1** Kanal- und barrierebildende Tight Junction-Proteine. Die hier nicht aufgeführten Claudine 12, 13, 18a, 20 bis 27 sowie MarvelD3 sind entweder bisher nicht eindeutig charakterisiert oder nicht in der Tight Junction lokalisiert (nach Krug et al., 2014, Günzel & Yu, 2013), aktualisiert)

<b>Kanalbildende Tight Junction-Proteine</b>	<b>Literatur</b>
<u>Kationenselektive Kanalbildner</u>	
Claudin-2	(Amasheh et al., 2002)
Claudin-10b	(Günzel et al., 2009b, Van Itallie et al., 2006)
Claudin-15	(Colegio et al., 2002, Van Itallie et al., 2003)
Claudin-16 + Claudin-19	(Hou et al., 2008, Peng et al., 2011)
<u>Anionenselektive Kanalbildner</u>	
Claudin-7	(Hou et al., 2006)
Claudin-10a	(Günzel et al., 2009b, Van Itallie et al., 2006)
Claudin-17	(Krug et al., 2012b), siehe II.1
Claudin-4 + Claudin-8	(Hou et al., 2010)
<u>Wasserpermeable Kanalbildner</u>	
Claudin-2	(Rosenthal et al., 2010)
<b>Barrierebildende Tight Junction-Proteine</b>	
<u>Kationenselektive Barrierebildner</u>	
(Permeabilität für Anionen ist stärker verringert als für Kationen)	
Claudin-7	(Alexandre et al., 2007, Alexandre et al., 2005)
<u>Anionenselektive Barrierebildner</u>	
(Permeabilität für Kationen ist stärker verringert als für Anionen)	
Claudin-1	(Inai et al., 1999, McCarthy et al., 2000)
Claudin-3	(Milatz et al., 2010)
Claudin-4	(Hou et al., 2006, Hou et al., 2010, Van Itallie et al., 2001)
Claudin-5	(Wen et al., 2004)
Claudin-6	(Sas et al., 2008)
Claudin-8	(Angelow et al., 2007, Yu et al., 2003)
Claudin-9	(Sas et al., 2008)
Claudin-11	(Van Itallie et al., 2003)
Claudin-14	(Ben-Yosef et al., 2003)
Claudin-18b	(Jovov et al., 2007)
<u>Ladungsunselektive Barrierebildner</u>	
Occludin	(Balda et al., 1996, McCarthy et al., 1996, Van Itallie et al., 2010)
Tricellulin	(Krug et al., 2009a)

## 2.2 TAMPs

Auch die Familie der TAMPs (Tight Junction-associated MARVEL proteins (Raleigh et al., 2010)) durchspannt die Membran viermal und stellt somit trotz der Bezeichnung "Tight Junction-assoziiert" echte Tight Junction-Proteine dar. Es besteht keine Sequenzhomologie mit den Claudinen. TAMPs zeichnen sich durch eine allen Mitgliedern gemeinsame MARVEL (MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link)-Domäne aus (siehe Abbildung 2, blau gestrichelte Kästchen). Diese Domäne umfasst die vier Transmembran-Helices, die mit

spezialisierten Cholesterol-reichen Membranmikrodomänen assoziiert ist und bei der Biogenese von Vesikel-Transport-Carriern und Tight Junction-Regulation beteiligt ist (Sánchez-Pulido et al., 2002). Zu ihren Mitgliedern zählen Occludin, Tricellulin (MarvelD2) und MarvelD3.

Occludin und Tricellulin (nicht aber MarvelD3) besitzen eine sog. ELL-Domäne nahe dem C-Terminus (siehe Abbildung 2, braun gestrichelte Kästchen). Hierbei handelt es sich um eine konservierte Gruppe von RNA-Polymerase-II-Elongationsfaktoren, deren Funktion in diesen Proteinen unbekannt ist (DiMartino et al., 2000).

Die TAMPs unterscheiden sich trotz ihrer partiellen strukturellen Gemeinsamkeit hinsichtlich ihrer Barriereigenschaften beträchtlich (Raleigh et al., 2010).

- Occludin ist in seiner Barrierefunktion oft widersprüchlich charakterisiert und diskutiert worden; es wurde deswegen eine eher regulatorische Funktion vermutet. Während sich zum Beispiel im Knockdown in Zellkulturen (Yu et al., 2005) und der Maus (Schulzke et al., 2005) keine Effekte auf den Widerstand oder Ionenpermeabilitäten zeigen, führt die Überexpression von Occludin zur Erhöhung des transepithelialen Widerstands (McCarthy et al., 1996, Van Itallie et al., 2010). Neuere Daten legen auch einen Einfluss verminderter Occludin-Expression auf die Makromolekülpermeabilität (Buschmann et al., 2013) nahe, wobei es unter niedriger Occludin-Expression zur Umverteilung eines anderen TAMPs, dem Tricellulin, kommt (Ikenouchi et al., 2008). Aufgrund solcher Umverteilungen sind auch die widersprüchlichen Befunde für die Barriere erklärbar: Bei Occludin-Reduktion können andere abdichtende Tight Junction-Proteine wie das Tricellulin das fehlende Occludin ersetzen und den Funktionsverlust weitgehend ausgleichen (Günzel & Fromm, 2012, Krug et al., 2014). Tricellulin ist hauptsächlich in den Kontaktpunkten dreier Zellen lokalisiert (Ikenouchi et al., 2005) und kann homo- und heteromere Komplexe bilden (Westphal et al., 2010). Tricellulin konnte als abdichtendes Tight Junction-Protein charakterisiert werden, welches in der trizellulären Tight Junction, die als potentieller Schwachpunkt der parazellulären Barriere gilt (Ikenouchi et al., 2005, Staehelin et al., 1969b, Walker et al., 1985), Einfluss auf die Permeabilität für größere Moleküle hat (Krug et al., 2009a).
- MarvelD3 kommt in zwei Spleißvarianten vor (Steed et al., 2009) und ist in ersten Untersuchungen widersprüchlich in seinen Eigenschaften beschrieben. Der Knockdown von MarvelD3 führte bei unterschiedlichen Autoren zu einem Anstieg (Steed et al., 2009) oder einer Abnahme (Raleigh et al., 2010) des transepithelialen Widerstands. Die Funktion von MarvelD3 innerhalb der Tight Junction-Barriere ist somit noch unklar. Allerdings wurde kürzlich eine wesentliche Beteiligung von MarvelD3 in der Regulation von epithelialer Proliferation, Zellmigration und der Überlebensfähigkeit über den MAPK-Signalweg beschrieben (Steed et al., 2014).

### 2.3 Anguline

Bei den Angulinen (Higashi et al., 2013, Iwamoto et al., 2014) handelt es sich um die jüngste Gruppe der Tight Junction-Proteine. Sie weisen eine Membrandomäne auf und sind den Immunglobulinen ähnlich (Higashi et al., 2013, Masuda et al., 2011).

Zwar waren ihre Mitglieder bereits seit längerem bekannt, z.B. Angulin-1 unter den Namen LSR (lipolysis-stimulated lipoprotein receptor; (Yen et al., 1999)), doch wurde ihre Lokalisation innerhalb der trizellulären Tight Junction sowie ein Einfluss auf die korrekte, trizelluläre Lokalisation von Tricellulin erst kürzlich nachgewiesen (Furuse et al., 2012, Masuda et al., 2011).

Weitere Mitglieder der Angulin-Familie sind Angulin-2/ILDR1 (Hauge et al., 2004) und Angulin-3/ILDR2 (Higashi et al., 2013, Masuda et al., 2011). Alle Anguline durchspannen die Membran dabei nur einmal, weisen eine immunglobulinähnliche Struktur auf (Ig-Domäne siehe Abbildung 2, grün gestricheltes Kästchen) und sind an der vollständigen Entwicklung der tri-, aber davon auch abhängigen bizellulären Tight Junction-Barriere beteiligt. Dabei wurde auch eine Funktion bei der Rekrutierung und Lokalisation von Tricellulin in die trizellulären Tight Junction

beobachtet (Furuse et al., 2014, Higashi et al., 2013, Masuda et al., 2011). Die Angulone selbst werden über JNK1/2-abhängige Phosphorylierung an die trizellulären Kontakte gebracht (Nakatsu et al., 2014).

## 2.4 JAMs

Die Familie der *Junctional adhesion molecules* (JAM) durchspannt die Tight Junction ebenfalls einmal und ist an Funktionen in der Tight Junction-Neubildung (Ebnet et al., 2004) und der Translokation von Immunzellen beteiligt (Martin-Padura et al., 1998). Die JAM-Proteine werden abhängig von ihrer Homologie in zwei Untergruppen unterteilt, wobei die eine JAM-A, JAM-B und JAM-C umfasst und die zweite aus CAR (*Coxsackie and adenovirus receptor*), ESAM (*Endothelial cell-selective adhesion molecule*) und JAM-4 besteht (Ebnet et al., 2004). JAMs besitzen zwei Ig-Domänen (siehe *Abbildung 2*, grün gestrichelte Kästchen) und können über PDZ-Bindemotive (siehe *Abbildung 2*, rot gestricheltes Kästchen) ähnlich wie die Claudine mit peripheren Tight Junction-Proteinen interagieren (siehe Abschnitt 2.5, Periphere Tight Junction-Proteine).

## 2.5 Periphere Tight Junction-Proteine

Eine Vielzahl weiterer Proteine, die keine transmembranalen Domänen besitzen, ist am Aufbau und der Regulation der Tight Junction beteiligt. Diese sind mit den "echten" Tight Junction-Proteinen intrazellulär assoziiert und werden daher auch als "Tight Junction-assoziierte Proteine" bezeichnet. Um Verwechslungen mit dem Namensbestandteil der TAMPs zu vermeiden, bevorzugen wir den Begriff "Periphere Tight Junction-Proteine" (Gonzalez-Mariscal, 2012).

Die peripheren Tight Junction-Proteine sind in den meisten Fällen mit den Tight Junction-Proteinen über PDZ-Domänen (PSD-95/Discs Large/ZO-1-Domäne) verbunden (siehe auch *Abbildung 2*, rot gestrichelte Kästchen). Die PDZ-Domäne ist eine modular aufgebaute Proteininteraktionsdomäne, die sequenzspezifisch mit der C-terminalen Sequenz Glu-Ser/Thr-Asp-Val interagiert (Doyle et al., 1996). Neben dieser Sequenz werden aber auch einige andere Sequenzen aus vier Aminosäuren erkannt, wobei der C-Terminus eine hydrophobe Aminosäure, in der Regel Valin, ist (Nourry et al., 2003). Beispielsweise enden die meisten Claudine mit einer PDZ-Domänen-bindende Sequenz, die auf Valin endet (Roh & Margolis, 2003).

Viele der peripheren Tight Junction-Proteine haben regulatorische Funktionen (Bauer et al., 2010), manche fungieren aber auch als Gerüstproteine (Scaffolding proteins) und sind über Aktin- und Myosinfilamenten mit dem Zytoskelett verbunden (Van Itallie et al., 2009, Van Itallie et al., 2015). Zu den peripheren Tight Junction-Proteinen zählen unter vielen anderen (Van Itallie & Anderson, 2014):

- ZO-1 bis ZO-3 ("Zonula occludens"; (Haskins et al., 1998, Jesaitis & Goodenough, 1994, Stevenson et al., 1986)) als bekannteste Vertreter der MAGUKs (membrane-associated guanylate kinases). Die Namensgebung "Zonula occludens" erfolgte 1986, als die echten Tight Junction-Proteine noch unentdeckt waren.
- PAR (partitioning defective)
- MAGI (membrane-associated guanylate kinase with an inverted arrangement of protein-protein interaction domains)
- MUPP1 (multiple pDZ domain protein 1).

## 3 Ultrastruktur der Tight Junction

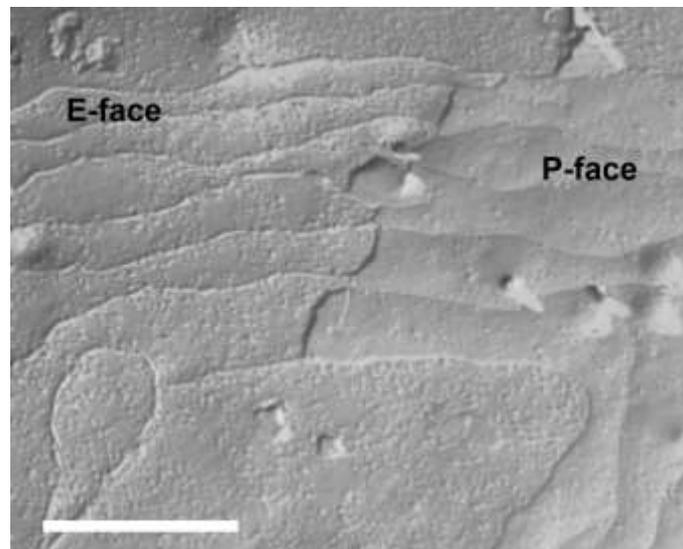
Das Strangnetzwerk des Tight Junction an den Kontaktstellen zweier benachbarter Epithelzellen (bizelluläre Tight Junction), welches die parazelluläre Durchlässigkeit reguliert, wurde be-

## I. Einleitung

reits lange vor seiner molekularen Zusammensetzung durch gefrierbruchelektronenmikroskopische Analysen nachgewiesen (Staehein, 1973, Staehein et al., 1969a, Staehein et al., 1969b). Die Tight Junction-Stränge sind dabei auf beiden Seiten der Bruchebenen erkennbar. Während sie sich auf der protoplasmatischen Seite (P-Face) deutlich abheben, bilden sie auf der exoplasmatischen Seite (E-Face) Rinnen, die zu P-Face-Seite komplementär sind (Easter et al., 1983) (Abbildung 3).

Dieses Netzwerk kann sehr unterschiedlich ausgebildet sein. Wichtige morphometrische Parameter der Auswertung von Gefrierbrüchen sind (i) die Anzahl und Ausdehnung der horizontal zur apikalen Membran orientierten Stränge, (ii) Diskontinuitäten im Verlauf dieser Stränge, (iii) die Ausbildung der Stränge in linearer oder partikelartiger Form und (iv) die Maschenform in rechteckiger oder kurvig-runder Ausbildung.

Die Zahl der horizontalen Stränge steht in einer logarithmischen Relation zum transepithelialen Widerstand (Claude, 1978, Claude & Goodenough, 1973, Marcial et al., 1984). Diese Relation blieb jedoch nicht unwidersprochen (Martinez-Palomo & Erlj, 1975) und trifft offenbar nicht für Vergleiche unterschiedlicher Epithelien zu.



*Abbildung 3: Gefrierbruchelektronenmikroskopische Aufnahme von Tight Junctions aus Claudin-transfizierten HEK-Zellen. Erkennbar ist der Übergang der Bruchebene zwischen P-Face und E-Face. Balken = 10 µm (eigene Aufnahme).*

Das Auftreten von Strangdiskontinuitäten >20 nm geht mit einer Barrierestörung einher und tritt zum Beispiel an entzündlich veränderten Darmepithelien auf (Zeissig et al., 2007, Schulzke et al., 1998, Marin et al., 1983).

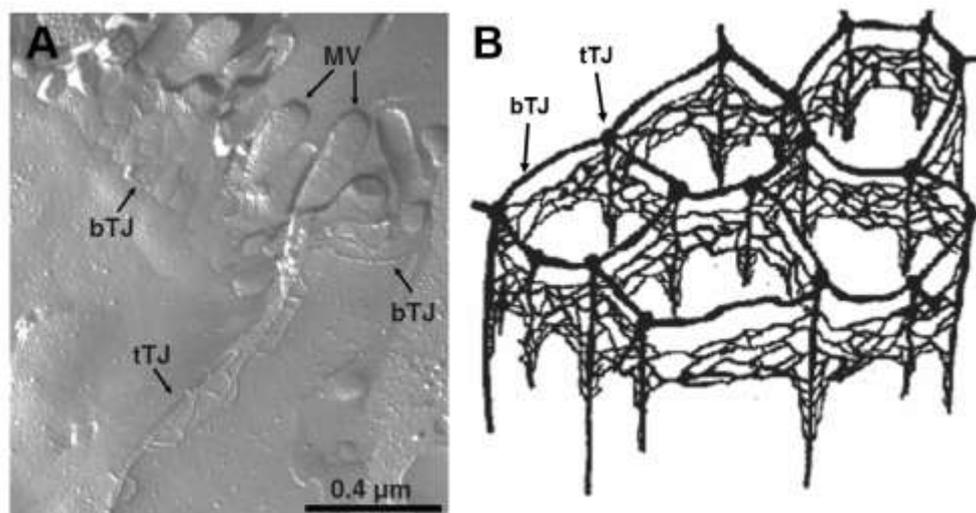
Das Auftreten von partikelartigen Strängen, die im Gegensatz zu linienförmigen Strängen wie Perlschnüre aussehen, scheint charakteristisch für die Gegenwart bestimmter Claudine zu sein, insbesondere für den Kationen- und Wasserkanalbildner Claudin-2 (Furuse et al., 2001). Partikelartige Stränge deuten demnach auf eine eher durchlässige Tight Junction hin, wobei bisher offen bleibt, ob die Partikelartigkeit selbst eine funktionelle Bedeutung besitzt oder nur ein Hinweis auf die Art der vorhandenen Claudine darstellt.

Die meisten Tight Junction-Netzwerke zeigen ein unregelmäßiges, eher rechteckförmiges Erscheinungsbild. Dagegen wird ein kurvig-rundes Erscheinungsbild bei Claudin-3 oder Claudin-4 exprimierenden Tight Junctions gefunden (Furuse et al., 1999, Milatz et al., 2010, Van Itallie et al., 2001). Auch für diesen Parameter ist bisher ungeklärt, ob er Ursache oder Epiphänomen veränderter Barriereigenschaften darstellt.

Im Zusammenhang mit der oben genannten Partikelartigkeit wird die Assoziation von Tight Junction-Partikeln mit der protoplasmatischen oder extrazellulären Bruchseite der Membran für Aussagen über die Interaktion von Tight Junction-Proteinen herangezogen. Eine Verschiebung von einer Präferenz zur anderen könnte dabei dann auch Hinweis auf veränderte Barriereigenschaften der Tight Junction geben (Liebner et al., 2000, Piontek et al., 2008, Wolburg et al., 1994)

Wenn ohne weiteren Zusatz von "Tight Junction" gesprochen wird, ist zumeist die zwischen zwei benachbarten Zellen angeordnete bizelluläre Tight Junction (bTJ, siehe [Abbildung 4](#)) gemeint. Es zeigte sich jedoch schon frühzeitig ultrastrukturell (Menco, 1988, Staehelin, 1973) und vor wenigen Jahren auch molekular (Ikenouchi et al., 2005, Krug et al., 2009a), dass am Kontaktpunkt dreier Zellen eine spezialisierte und funktionell hochinteressante Struktur existiert, die trizelluläre Tight Junction (tTJ). An diesem Punkt treffen die bizellulären Tight Junctions von drei (oder zuweilen vier) Zellen aufeinander und konvergieren in lateraler Richtung ([Abbildung 4](#)). Aus elektronenmikroskopischen Bildern wurde abgeleitet, dass die tTJ eine Zentralpore (*Central Tube*) mit einer Länge von etwa 1  $\mu\text{m}$  und einem Durchmesser von 10 nm ausbilden (Menco, 1988, Staehelin, 1973, Wade & Karnovsky, 1974, Walker et al., 1994, Walker et al., 1985). Schon frühzeitig wurde postuliert, dass diese Struktur aufgrund ihrer Anordnung und ihres Durchmessers einen Schwachpunkt des Tight Junction-Netzwerks und einen Ort erhöhter Permeabilität für Solute darstellt (Ikenouchi et al., 2005, Staehelin et al., 1969b, Walker et al., 1985).

In Abschnitt II.5 wird dargestellt, wie diese Eigenschaft der tTJ für potentielle Absorptionenhancer für makromolekulare Pharmaka ausgenutzt werden kann (Krug et al., 2013).



**Abbildung 4:** **A:** Gefrierbruchelektronenmikroskopische Aufnahme einer trizellulären Tight Junction (tTJ); bTJ: bizelluläre Tight Junction; MV: Microvilli (eigene Aufnahme). **B:** Tight Junction-Netzwerk bestehend aus bi- und trizellulären Tight Junctions; modifiziert nach Menco, 1988.

## 4 Funktionelle Analyse der Tight Junction

Der wohl am häufigsten bestimmte Messwert zur funktionellen Charakterisierung der Transporteigenschaften eines Epithels ist der transepitheliale Widerstand (TER;  $R^t$ ). Er ist ein reziproker Parameter der Permeabilität (exakt: der elektrischen Leitfähigkeit) für die Ionen der umgebenden Flüssigkeit. Für die Beurteilung der Kanal- oder Barriereigenschaften der Tight Junction wäre es allerdings von Vorteil, den Widerstand nur des parazellulären Weges zu ermitteln; der TER setzt sich jedoch aus Anteilen des transzellulären und des parazellulären Weges zusammen und ist somit nur bedingt als Maß der Widerstandseigenschaften der Tight Junction geeignet (siehe Abschnitte 4.1 und 4.2). Zur Beurteilung der Eigenschaften der Tight Junction wären darüber hinaus die Permeabilitäten für Kationen und Anionen (also die Ladungsselektivität) und für einzelne Ionensorten (siehe Abschnitt 4.3) sowie für ungeladene Moleküle unterschiedlicher Größe wichtig (siehe Abschnitt 4.4).

### 4.1 Widerstandsmessung in der Ussingkammer

Für Messungen des TER sind zwei Methoden gebräuchlich. Eine ausführliche Darstellung haben wir z.B. in (Günzel et al., 2010) gegeben, darum hier nur kurz:

- Zwei-Elektrodenmessungen an Zellkulturfiltern mittels "Chopstick-Elektroden" (Jovov et al., 1991). Vorteile hierbei sind die Einfachheit und Wiederholbarkeit der Messungen, Nachteil die Schwierigkeit der Konstanthaltung der Messbedingungen wie Elektrodenabstand zum Epithel, Temperaturkonstanz und entstehende Solutpolarisation aufgrund fehlender Lösungsumwälzung.
- Vier-Elektrodenmessungen an Zellkulturfiltern oder nativen Epithelflächen einschließlich Biopsie-Präparaten in der "Ussingkammer" (Ussing, 1949). Vorteile sind die hohe Messgenauigkeit aufgrund optimierter fester Anordnung von stromeinspeisender und spannungsmessender Elektroden sowie die lange Überlebensdauer des Präparats in der Kammer. Die Ussingkammer ermöglicht zudem die Messung des aktiven Ionentransports (Kurzschlussstrom,  $I_{sc}$ ) (Clarke, 2009, Brown & O'Grady, 2008).

Die Ussingkammer stellt die Basis der in den folgenden drei Abschnitten vorgestellten Methoden dar.

### 4.2 Ein- und Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie

Mit Hilfe der Impedanzspektroskopie können die Ergebnisse der TER-Messung weiter aufgeschlüsselt werden. Die theoretischen Grundlagen von Impedanzmessungen an Epithelien wurden bereits vor Jahrzehnten gelegt (Teorell, 1946, McClendon, 1936, Clausen et al., 1979).

Wir unterscheiden heute zwischen zwei Formen, Ein- und Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie (Fromm et al., 2009):

Die Ein-Wege-Impedanzspektroskopie unterscheidet zwischen dem Widerstand der Epithelzellschicht ( $R^{epi}$ ) und darunter liegenden subepithelialen Schichten ( $R^{sub}$ ).  $R^{sub}$  wird bei nativen Epithelien durch adhärente Bindegewebs- und Muskulatursschichten und bei Zellkulturen durch den Filtersupport gebildet. Die Summe aus  $R^{epi}$  und  $R^{sub}$  ergibt den TER. Die genaue Bestimmung von  $R^{epi}$  ist auch bei Zellkulturen für die Auswertung der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie wesentlich (siehe Gleichungen 2 und 3, in Gl. 2 als Kehrwert  $G^{epi}$  verwendet). Für native Epithelien sei die Bedeutung der Ein-Wege-Impedanzspektroskopie an einem Beispiel erläutert, bei dem aufgrund entzündlicher Prozesse das Darmepithel durchlässiger, das Subepithel jedoch verdickt ist. So kann die Situation auftreten, dass  $R^{epi}$  abnimmt,  $R^{sub}$  jedoch zunimmt, so dass eine reine TER-Messung keine signifikante Änderung zeigen würde (Zeissig et al., 2007).

Neben den bereits erwähnten ohm'schen Komponenten  $R^{epi}$  und  $R^{sub}$  enthält das in Abbildung 5A dargestellte Modellschaltbild eines Epithels auch ein Kondensatorelement ( $C^{epi}$ ).  $C^{epi}$  wird durch die kapazitiven Eigenschaften der Doppellipidschicht der Zellmembranen gebildet.

Bei der Impedanzspektroskopie macht man sich die kapazitiven Eigenschaften der Membranen zunutze, da diese frequenzabhängig leitfähig sind. Appliziert man Wechselströme unterschiedlicher Frequenzen, wird der kapazitive Blindwiderstand bei einer Frequenz von nahe 0 Hz unendlich groß, da der gesamte Strom über den dem epithelialen Widerstand entsprechenden R-Teil des RC-Gliedes und den in Serie geschalteten  $R^{sub}$  fließt. Der erhaltene Wert bei Frequenzen nahe 0 Hz gibt somit den Gesamtwiderstand  $R^t$  wieder. Bei Anlegen sehr hoher Frequenzen (mehrere 10 kHz, Extrapolation gegen unendlich) läuft  $R^t$  gegen Null, da der gesamte Strom über den Kondensator und am Parallelwiderstand vorbei- und schließlich durch den Serienwiderstand  $R^{sub}$  hindurchfließt, so dass bei hohen Frequenzen folglich nur  $R^{sub}$  ermittelt wird.

Die Auftragung der komplexen Daten einer Frequenzreihe zwischen beiden Extrema in einem Nyquist-Diagramm ("Cole-Cole-Plot"), der Phasenwinkel von  $-90^\circ$  des kapazitiven Stroms gegenüber dem Strom durch einen Ohm'schen Widerstand wird durch die um  $90^\circ$  gedrehten Achsen der Zahlenebene repräsentiert (Abbildung 5C).

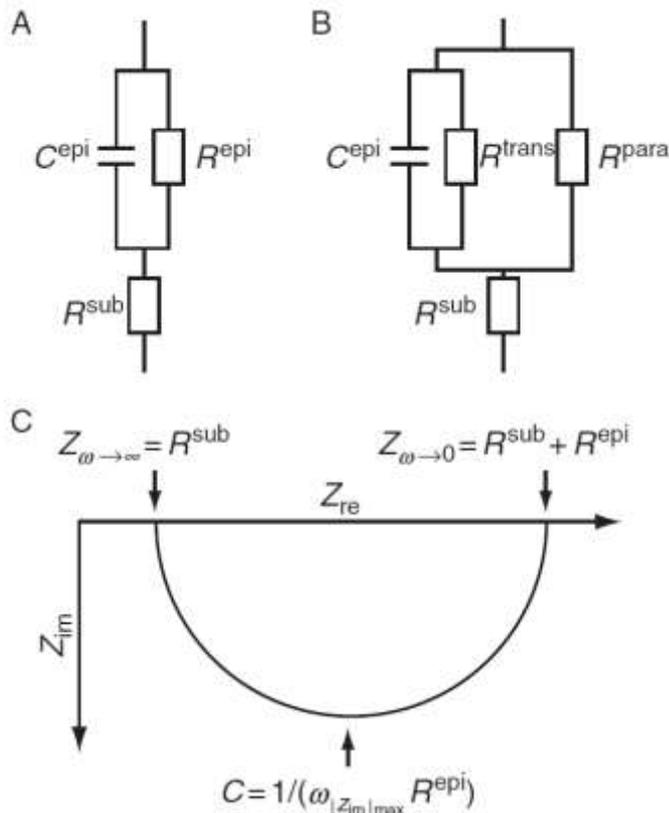
Der Imaginärteil der komplexen Impedanz, der durch die kapazitiven Eigenschaften des Epithels zustande kommt, wird dabei auf der Ordinate gegen den Realteil der komplexen Impedanz, die dem Ohm'schen Widerstand entspricht, auf der Abzisse aufgetragen.

Das erhaltene Kreissegment der Impedanzmessung stellt eigentlich die Überlagerung zweier Kreissegmente dar, welche die Eigenschaften der apikalen und der basolateralen Membran widerspiegeln. Solange diese ähnliche Zeitkonstanten aufweisen, überlagern sie sich zu einem Kreissegment. Veränderte Eigenschaften einer Membranseite lassen sich somit bereits durch den Kurvenverlauf erkennen.

Die komplexe Impedanz  $Z$  einer Parallelschaltung aus Ohm'schen Widerstand  $R$  und einer Kapazität  $C$  setzt sich aus dem Realteil  $Z_{re}$  und dem Imaginärteil  $Z_{im}$  zusammen, wobei  $C$  gemäß (Gleichung 1) berechnet wird:

$$C^{epi} = \frac{1}{\omega \cdot |Z_{im}|_{max} \cdot R^{epi}} \quad (1)$$

mit  $\omega$  = Kreisfrequenz, definiert als Frequenz am Maximum von  $Z_{im}$ .



**Abbildung 5:** Elektrische Schaltbildmodelle eines Epithels. **A:** Stark vereinfachtes Modell, bei dem das Subepithel durch Widerstand  $R^{sub}$  und das Epithel durch Widerstand  $R^{epi}$  sowie den kapazitiven Eigenschaften der Membranen ( $C^{epi}$ ) repräsentiert werden (Modell für Eine-Wege-Impedanzspektroskopie). **B:** Modell, bei dem zwischen parazellulärem Weg (Widerstand  $R^{para}$ ) und dem transzellulärem Weg (Widerstand  $R^{trans}$  und Kapazität  $C^{epi}$ ) unterschieden wird (Modell für Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie). **C:** Auftragung der realen und imaginären Anteile der Impedanz ( $Z_{re}$ ,  $Z_{im}$ ) einer Impedanzmessung im Nyquist-Diagramm. Bei zunehmenden Frequenzen ( $\omega \rightarrow \infty$ ) verringert sich der Realteil  $Z_{re}$  bis zum Wert des subepithelialen Widerstands  $R^{sub}$ , während  $Z_{re}$  bei niedrigen Frequenzen ( $\omega \rightarrow 0$ ) die Summe von subepithelialelem und epithelialelem Widerstand repräsentiert ( $R^t = R^{sub} + R^{epi}$ ). Die zur Berechnung von  $C^{epi}$  verwendete Wert  $\omega$  stellt die Frequenz dar, bei der  $Z_{im}$  sein Maximum erreicht (modifiziert nach Krug et al., 2009b).

Mit der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie kann darüber hinaus zwischen transzellulärem Widerstand ( $R^{trans}$ ) und parazellulärem Widerstand ( $R^{para}$ ) unterschieden werden (Abbildung 5B). Hierzu wird die Bestimmung einer zusätzliche Messgröße benötigt, da sich  $R^{trans}$  und  $R^{para}$  nicht direkt aus dem Nyquist-Diagramm ableiten lassen und das System ansonsten unterbestimmt wäre (Krug et al., 2009b, Kottra & Frömter, 1984).

Diese zusätzliche Messgröße wird gewonnen, indem selektiv  $R^{para}$  (oder  $R^{trans}$ ) perturbiert wird (Krug et al., 2009b). Dies geschieht zum Beispiel durch Gabe des  $Ca^{2+}$ -Chelators EGTA, wodurch der Zusammenhalt der Adherens Junction und damit auch der Tight Junction aufgehoben und der parazelluläre Weg geöffnet wird. In Vorversuchen wurde für verschiedene Zelllinien verifiziert, dass der transzelluläre Weg hierdurch nicht beeinflusst wird.

Gleichzeitig zu dieser Modifikation von  $R^{para}$  wird eine Fluxmessung (siehe 5.4) durchgeführt, wobei in Abhängigkeit des zu untersuchenden Zellsystems ein ausschließlich parazellulär durchtretender Stoff, z.B. Fluoreszein verwendet wird. Wenn nun der parazelluläre Weg durch EGTA geöffnet wird, nimmt der parazelluläre Flux proportional zu dieser Änderung zu, so dass anhand der Fluxänderung und der Änderung des direkt messbaren  $R^{epi}$ ,  $R^{para}$  und  $R^{trans}$  über die Leitfähigkeiten ( $G$ ), die den Kehrwert des jeweiligen Widerstands darstellen, ermittelt werden können (Gleichung 2).

$$G^{epi} = G^{trans} + G^{para} = G^{trans} + 1/(k \times J_{Fluoreszein}) \quad (2)$$

mit  $k = \text{Konstante}$ ;  $J = \text{Flux}$

Die transzelluläre Leitfähigkeit kann dabei direkt aus der Auftragung der Messwerte von  $G^{epi}$  gegen den Flux  $J$  als Schnittpunkt mit der y-Achse abgelesen werden, während die parazelluläre Leitfähigkeit auf zwei Weisen bestimmt werden kann:

- $G^{para}$  kann nach Ermittlung von  $G^{trans}$  aus Gleichung 2 und aus der Steigung  $k \cdot J$  errechnet werden.
- $G^{para}$  kann unter Verwendung der Fluxverhältnisse des parazellulären Markers vor und nach EGTA-Gabe und den Daten der Impedanzanalyse ermittelt werden (Gleichung 3).

$$R^{para} = \frac{R_{vor\ EGTA}^{epi} \cdot R_{nach\ EGTA}^{epi} \cdot \left(1 - \frac{J_{vor\ EGTA}}{J_{nach\ EGTA}}\right)}{\frac{J_{vor\ EGTA}}{J_{nach\ EGTA}} \cdot \left(R_{vor\ EGTA}^{epi} - R_{nach\ EGTA}^{epi}\right)} \quad (3)$$

### 4.3 Dilutions- und biionische Potentialmessungen

Die Selektivität von Epithelien für Ionen bzw. deren Ladungsklassen lassen sich in Ussing-kammern aus Diffusionspotentialen ermitteln, indem man Ionengradienten über dem Epithel aufbaut.

Um beispielsweise die Permeabilitäten für  $Na^+$  und  $Cl^-$  zu messen, wird ein Teil des in der Badlösung vorhandenen  $NaCl$  in einer der Ussing-Halbkammern durch eine ungeladene, isoosmotische Substanz, Mannitol, ersetzt. Dadurch ist das  $NaCl$  verdünnt (daher die Bezeichnung Dilutionspotential), ohne dass osmotische Änderungen auftreten. Wenn die Permeabilitäten für  $Na^+$  und  $Cl^-$  unterschiedlich sind, bildet sich eine transepitheliale Potentialdifferenz  $\Delta E$  aus. Sie ist positiv auf der verdünnten Seite, wenn die Permeabilität für  $Na^+$  größer ist als die für  $Cl^-$ , und negativ, wenn für  $Cl^-$  eine höhere Permeabilität als für  $Na^+$  vorliegt.

Aus der umgeformten Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung lassen sich aus dem Permeabilitätsverhältnis  $P_{Na}/P_{Cl}$  die einzelnen Permeabilitäten berechnen (Gleichung 3,4,5; (Hou et al., 2005)).

$$\frac{P_{Na}}{P_{Cl}} = \frac{10^{(\Delta E/s)} \cdot a_{Cl}^{ap} - a_{Cl}^{bl}}{a_{Na}^{ap} - 10^{(\Delta E/s)} \cdot a_{Na}^{bl}} \quad (3)$$

$$P_{Cl} = \frac{G \cdot RT}{[NaCl] \cdot F^2 \cdot (1 + P_{Na}/P_{Cl})} \quad (4)$$

$$P_{Na} = P_{Cl} \frac{P_{Na}}{P_{Cl}} = \frac{G \cdot RT \cdot P_{Na}}{[NaCl] \cdot F^2 \cdot (1 + P_{Na}/P_{Cl}) \cdot P_{Cl}} \quad (5)$$

mit  $\Delta E = E_{bl} - E_{ap}$  mit Korrektur des Liquid Junction-Potentials;  $s = 2,303(RT/F)$ ;  $a$  = Ionenaktivität;  $ap$  = apikal;  $bl$  = basolateral,  $R$  = Universale Gaskonstante;  $T$  = Absolute Temperatur;  $F$  = Faradaykonstante;  $[NaCl]$  =  $NaCl$ -Konzentration;  $G$  = transepitheliale Leitfähigkeit =  $1/R^t$

Auf ähnliche Art können die Permeabilitäten anderer monovalenter Ionen bestimmt werden, indem  $Na^+$  zum Teil gegen das zu messende Kation ersetzt wird und das resultierende, nun biionische, transepitheliale Potential gemessen wird (Gleichung 6).

$$\frac{P_X}{P_{Na}} = \frac{a_{Na}^{ap} + (P_{Cl}/P_{Na})a_{Cl}^{bl} - 10^{(\Delta E/s)} \cdot (a_{Na}^{bl} + (P_{Cl}/P_{Na})a_{Cl}^{ap})}{10^{(\Delta E/s)} a_X^{bl} - a_X^{bl} a_{x-ap}} \quad (6)$$

Ähnliche Messungen und Berechnungen sind auch für divalente Kationen (Gleichung 7), sowie Anionen (Gleichung 8) möglich, so dass man differenzierte Aussagen über die Ionenselektivität erhält und so Aufschluss über die Beschaffenheit und Dimensionen der beteiligten parazellulären Kanäle gewinnt (Eisenman, 1962).

$$\frac{P_X}{P_{Na}} = \frac{-n_{Na} - (P_{Cl}/P_{Na})n_{Cl} \cdot z_{Cl}}{n_X \cdot z_X} \text{ mit } n = z \cdot \frac{\Delta E}{s} \cdot \frac{a_{bl} 10^{z\Delta E/s} - a_{ap}}{10^{z\Delta E/s} - 1} \quad (7)$$

$z = \text{Ladungszahl des jeweiligen Ions}$

$$\frac{P_Y}{P_{Cl}} = \frac{P_{Na}/P_{Cl} a_{Na}^{ap} + a_{Cl}^{bl} - 10^{(\Delta E/s)} \cdot (a_{Cl}^{ap} + (P_{Cl}/P_{Na}) a_{Na}^{bl})}{10^{(\Delta E/s)} a_Y^{ap} - a_{Y-bl}} \quad (8)$$

#### 4.4 Permeabilitätsmessungen von parazellulären Markern unterschiedlicher Größe

Weitere Permeabilitätseigenschaften lassen sich über die Messung von Fluxen verschiedener parazellulärer Größenmarker erhalten. Hierbei können entweder radioaktiv markierte Substanzen wie Harnstoff, Mannitol, Inulin oder Polyethylenglykole (PEG) unterschiedlicher Größen verwendet werden (Ghandehari et al., 1997) oder Fluoreszenz-markierte Dextrane (Sanders et al., 1995).

Die zu vermessende Substanz wird dabei auf einer Seite des Epithels in die Ussing-Halbkammer gegeben, wenn möglich unter ausgeglichenen Bedingungen mit unmarkierter Substanz auf der anderen Seite. In definierten Zeitintervallen werden Proben auf der anderen Seite genommen und der Flux (J) nach Standardformeln aus den Konzentrationen der Substanz, die das Epithel durchquert hat, berechnet. Die Permeabilität für die betreffende Substanz ergibt sich aus dem Quotienten aus Konzentration und Flux und ermöglicht Aussagen über die Größenlimitierung des Durchtritts.

## 5 Molekulare Analyse von Tight Junction-Proteinen

Da die spezifischen Permeabilitätseigenschaften der Tight Junction maßgeblich über die Zusammensetzung und Interaktion der Tight Junction-Proteine, allen voran der Claudine, bestimmt werden, ist die Analyse des molekularen Aufbaus dieser Interaktionen für das Verständnis der Barriere- oder Kanalfunktion unerlässlich.

Die hierbei verwendeten Methoden erfordern zwar im Vergleich einen anteilmäßig größeren Aufwand, werden allerdings hier nur kurz vorgestellt, da es sich weitgehend um zell- und molekularbiologische Standardmethoden handelt.

### 5.1 Mutagenese

Schon früh, als trotz der hohen Sequenzähnlichkeit die ersten stark unterschiedlichen Eigenschaften von Claudinen erkannt wurden, rückte die molekulare Analyse von Aminosäuren und ihrer Einflüsse auf die Funktionalität in den Fokus des Interesses.

Sequenzvergleiche von Claudinen gleicher und gegensätzlicher Barriere- bzw. Kanaleigenschaften ließen hierbei erste Motivgemeinsamkeiten erkennen und gaben Hinweise auf potentiell wichtige Aminosäuren, die die Funktionalität eines Claudins beeinflussen könnten.

Zur Aufklärung dieser Eigenschaften werden die interessierenden Aminosäuren über *Site-directed Mutagenesis* gegen andere Aminosäurereste ausgetauscht. Anschließend werden die resultierenden Mutanten in Zellkultursystemen überexprimiert und elektrophysiologisch untersucht, wodurch der Einfluss auf die parazelluläre Barriere erkennbar wird.

Claudin-2, das als erstes kanalbildendes Claudin entdeckt wurde, wurde bisher am intensivsten erforscht. Die negativ geladene Aminosäure Aspartat, die innerhalb des ersten extrazellulären Loops bei Claudin-2 an Position 65 lokalisiert ist, wurde als essentiell für die Ausbildung von Kationenkanaleigenschaften beschrieben (Yu et al., 2009). Auch im ebenfalls Kationenkanäle ausbildenden Claudin-15 wurde durch ladungsumkehrende Mutagenese die analoge Position Glutamat-64 als Position, die die Ladungsselektivität bestimmt, ermittelt (Colegio et al., 2002).

Aber auch für andere Claudine wurden schon einige Aminosäurereste untersucht, deren Vorhandensein essentiell für die jeweiligen Claudin-typischen Eigenschaften sind. Die Ausbildung der anionenselektiven Kanäle des Claudin-10a hängt beispielsweise von den Argininen an Position 32 und 59 ab (Van Itallie et al., 2006). Für das barrierebildende Claudin-5 wurden die in allen Claudinen konservierten Cysteine der Claudin-Signatur W-x(15, 20)-[Gn]-L-W-x(2)-C-x(8,10)-C-x(15, 16)-[qR] (Günzel & Yu, 2013), welche bei diesem an Position 54 und 64 sitzen, als notwendig zur Aufrechterhaltung der Abdichtung beschrieben (Wen et al., 2004)

Während lange Zeit die Selektivitätseigenschaften dem ersten extrazellulären Loop zugeschrieben wurden (Krause et al., 2008), zeigte neuere Untersuchung, dass auch der zweite extrazelluläre Loop dabei eine Rolle spielt. In Claudin-5 führten Substitutionen der Aminosäuren Arginin-145, Tyrosin-148 und -158, sowie Glutamat-159 zu einem Verlust der abdichtenden Eigenschaften (Piehl et al., 2010).

## 5.2 Molekulare Modellierung der Kanaleigenschaften

Die Befunde von Mutagenesestudien wurden, da es bis vor kurzem keine Strukturdaten zu Claudinen gab, zum Modellieren hypothetischer Claudinstrukturen verwendet, um letztendlich die molekularen Mechanismen der Abdichtung oder der spezifischen Kanalbildung aufzuklären.

Bisher wurden die meisten Studien zum Verständnis des Claudin-2-Kanals unternommen. Über Cystein-Scanning-Mutagenese konnte die ungefähre Lage verschiedener Aminosäuren innerhalb des Kanals bestimmt werden (Angelow & Yu, 2009, Li et al., 2013, Yu et al., 2009). Dazu wurden diese Aminosäuren zunächst gegen Cysteine substituiert und diese dann über deren Sulfhydrylgruppe an thiol-reaktive raumfordernde Substanzen gekoppelt. Bei einer Positionierung der Aminosäure innerhalb des Kanals würde dieser durch den großen Rest verschlossen, so dass die ursprünglichen Permeabilitäten für verschiedene Ionen verloren gingen, während bei einer Position außerhalb des Kanals der große Rest keinen Einfluss auf die Permeabilitäten hätte. Durch solche Untersuchungen und anschließende Berechnungen über Brown'sche Dynamik-Simulationen konnte für Claudin-2 ein erstes Modell der Kanaldimensionen berechnet werden (Yu et al., 2009).

Durch die Veröffentlichung der ersten Röntgenkristallstruktur zweier Claudine, Claudin-15 (Suzuki et al., 2014) und Claudin-19 (Suzuki et al., 2015), ist die Analyse der funktionell bedeutsamen Aminosäuren um einiges leichter geworden. Unter Verwendung dieser Strukturen können andere Claudine modelliert werden und Vermutungen über Aminosäurerestinteraktionen angestellt werden. Solche Vermutungen können dann mit Mutagenesestudien verbunden und experimentell bestätigt werden.

Die hier skizzierten Methoden wurden in einer in Abschnitt I.2 dargestellten Studie angewandt und erstmals ein hypothetisches Modell eines Claudin-Anionenkanals präsentiert (Conrad et al., 2015).

## 6 Fragestellungen

Tight Junction-Proteine besitzen sowohl abdichtende als auch Durchlässigkeit vermittelnde Eigenschaften. Im Sinne dieses Dualismus ergeben sich mehrere Fragestellungen, aus denen sich zwei Unterthemen dieser Habilitationsschrift ergeben:

1. Für Durchlässigkeit vermittelnde Tight Junction-Proteine stellt sich zunächst die Frage, welche Proteine dies sind, in welchen Organen sie lokalisiert sind und welche Funktion sie dort ausüben. Mit der Funktion einhergehend ergibt sich zudem auch die Frage nach den molekularen Determinanten der Permeabilitätsvermittlung. Die ersten beiden Arbeiten behandeln diese Fragestellungen in Bezug auf Claudin-17.

2. Für abdichtende Tight Junction-Proteine ergeben sich zunächst die gleichen Fragen wie unter 1. dargestellt, dann aber die Frage nach Möglichkeiten, die Tight Junction-Durchlässigkeit transient zu steigern, um die Aufnahme von ansonsten kaum resorbierbaren pharmakologischen Wirkstoffen zu ermöglichen ("drug uptake enhancing"). Dies ist das gemeinsame Oberthema der dritten bis fünften Arbeit.

Auf der Basis der vorliegenden Resultate wird in der Diskussion abschließend die Frage behandelt, auf welche Weise größere Moleküle generell durch die Tight Junction gelangen, (i) durch sich stochastisch öffnende und schließende Unterbrechungen in bizellulären Tight Junction-Strängen oder (ii) durch die Zentralpore der trizellulären Tight Junction.

## II. Eigene Arbeiten

### 1 Claudin-17 bildet parazelluläre Anionenkanäle aus

Über Claudin-17 war bis auf eine hohe Verwandtschaft und Clusterung mit Claudin-8 (Yu et al., 2003) nichts bekannt, weder seine Organlokalisierung noch seine Funktion. Claudin-8 wirkt zwar tendenziell anionenselektiv, ist aber insgesamt ein Barrierebildner (Angelow et al., 2007, Yu et al., 2003). Umso überraschender war der Befund der hier dargestellten Arbeit, dass Claudin-17 parazelluläre Kanäle mit Anionenselektivität ausbildet.

Dies wurde auf Zellebene sowohl in Überexpressions- als auch Knockdown-Experimenten gezeigt. Die für Claudin-17 beobachtete Ladungsselektivität wurde dabei auf die Aminosäureposition 65, welche in Studien an anderen Claudinen bereits als für die Ladungsselektivität wichtig befunden wurde, zurückgeführt.

Die Expression von Claudin-17 wurde in murinen Geweben auf mRNA- und Proteinebene im Gehirn und vor allem in der Niere nachgewiesen. Die Lokalisation von Claudin-17 in den Segmenten des Nephrons wurde über Immunfluoreszenzfärbungen unter Verwendung geeigneter Segmentmarker aufgeklärt und ergab die stärkste Expression im proximalen Tubulus, abnehmende Werte bis zum frühdistalen Tubulus und keine Expression im Sammelrohr.

Hinsichtlich der funktionellen Bedeutung von Claudin-17 als parazellulärer Anionenkanal wurden folgende Überlegungen angestellt: Im proximalen Tubulus findet die Chloridresorption hauptsächlich parazellulär statt (Planelles, 2004, Aronson & Giebisch, 1997) und auch im frühdistalen Tubulus wird von einem parazellulären Chloridtransportweg ausgegangen (Subramanya & Ellison, 2014). Wir schlagen daher vor, dass die parazelluläre Chloridresorption im proximalen Nephron Claudin-17 vermittelt wird. Unbekannt sind gegenwärtig die relativen Beiträge von Claudin-17 und einem weiteren Anionenkanalbildner, Claudin-10a, der ebenfalls im proximalen Tubulus vorkommt.

Über 80% des glomerulär filtrierten Bicarbonats ( $\text{HCO}_3^-$ ), das wichtig für die Säure-Basen-Regulation des Körpers ist, wird bereits im proximalen Tubulus resorbiert (Cogan et al., 1979). Dies erfolgt hauptsächlich transzellulär über die Carboanhydrase, die meisten Carboanhydrase-unabhängigen Transportprozesse laufen jedoch parazellulär ab (Lang et al., 1982). Dem Claudin-17 könnte hierfür eine zentrale Rolle zukommen, da bisherige Daten zu Claudin-10a eher keine Bicarbonatpermeabilität vermuten lassen (Günzel et al., 2009b). Auch im dicken aufsteigenden Ast der Henleschleife, in der Claudin-10a nicht exprimiert ist (Günzel et al., 2009b), findet parazelluläre Resorption von Bicarbonat statt (Capasso et al., 2002), so dass auch hier eine Beteiligung von Claudin-17 denkbar wäre.

Somit kann festgestellt werden, dass die genaue Funktion von Claudin-17 im Nephron (z.B. durch Analyse isolierter Tubuli) bisher nicht aufgeklärt ist, doch weisen diese ersten Befunde darauf hin, dass es eine Rolle bei der parazellulären Anionenresorption im Nephron spielen kann. Unabhängig von diesen Überlegungen ist, dass mit Claudin-17 ein weiteres anionenkanalbildendes Tight Junction-Protein identifiziert wurde.

---

**Krug SM**, Günzel D, Conrad MP, Rosenthal R, Fromm A, Amasheh S, Schulzke JD, Fromm M (2012) Claudin-17 forms tight junction channels with distinct anion selectivity. *Cell. Mol. Life Sci.* 69: 2765-2778

Ergänzende Informationen sind als Supplement verfügbar unter: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00018-012-0949->

II. Eigene Arbeiten

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-012-0949-x>

## 2 Molekulare Grundlagen der Anionenselektivität von Claudin-17

Bereits in der ersten Arbeit über Claudin-17 (Abschnitt II.1) wurde die Aminosäure K65 als für die Ladungsselektivität von Claudin-17 essentiell beschrieben. Eine geladene Aminosäure an dieser Position im ersten extrazellulären Loop – je nach Claudin auch um einige Positionen versetzt – ist auch in anderen Claudinen maßgeblich an der Selektivität beteiligt (Yu et al., 2009, Van Itallie et al., 2006, Hou et al., 2010, Colegio et al., 2002, Angelow & Yu, 2009). Daneben wurden weitere geladene Aminosäuren als wichtig für die Ladungsselektivität beschrieben.

Die nachfolgende Arbeit zu Claudin-17 verknüpft erstmals funktionelle Analysen des Effekts der einzelnen Aminosäurereste mit einem Strukturmodell eines Claudins.

Hierzu wurden zunächst Aminosäurereste beider extrazellulärer Loops im Detail untersucht, indem ladungsumkehrende oder neutralisierende Mutationen durchgeführt und der Einfluss auf die Anionenpermeabilität bestimmt wurde.

Anschließend wurden die aus den generierten Mutationen erhaltenen funktionellen Befunde auf ein Modell der Struktur von Claudin-17 übertragen. Dieses baut auf die unmittelbar zuvor publizierte Kristallstruktur von Claudin-15 auf (Suzuki et al., 2014), einem kationenselektiven Kanalbildner (Tamura et al., 2008, Tamura et al., 2011). Dies ist dadurch gerechtfertigt, dass Proteine mit zumindest partieller Sequenzhomologie zumeist eine vergleichbare Sekundär- und Tertiärstruktur ausbilden.

Deutlich zeigte sich, dass die Aminosäuren, für die wir einen Effekt auf die Ionenpermeabilität und die Ladungsselektivität fanden, vorwiegend an der für Claudin-17 angenommenen Pore liegen und somit die Eigenschaften des Anionenkanals determinieren. Auf der Basis dieser Ergebnisse wurde schließlich ein Porenverlauf des Claudin-17-basierten Anionenkanals vorgeschlagen (siehe Fig. 5) und eine hypothetische Architektur dieses Kanals im Claudin-17-Polymer eines Tight Junction-Stranges präsentiert (siehe Fig. 7).

---

Conrad MP\*, Piontek J\* (\*shared first authorship), Günzel D, Fromm M, **Krug SM** (2016) Molecular basis of claudin-17 anion selectivity. *Cell. Mol. Life Sci.* 73(1): 185-200

Ergänzende Informationen sind als Supplement verfügbar unter:  
<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00018-015-1987-y>

II. Eigene Arbeiten

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-015-1987-y>

### 3 Die perineurale Barriere lässt sich kurzfristig über Regulation von Claudin-1 öffnen

Absorptionsenhancer oder -verstärker sind Substanzen, die die Aufnahme von hydrophilen Soluten, vor allem Medikamenten, erleichtern sollen. Als Angriffspunkt bietet sich dabei die Tight Junction aufgrund des schnellen und die Zellen selbst nicht alterierenden Transports durch die Epithel- bzw. Endothelzellschicht an.

Das in den vorangegangenen Abschnitten dargestellte Claudin-17 beeinflusst – wie andere kanalbildende Claudine auch – selektiv den Durchtritt kleiner Ionen, ohne die Permeabilität für größere Solute wesentlich zu beeinflussen. Die Hochregulation von kanalbildenden Claudinen wie Claudin-2, Claudin -10a oder -10b, Claudin-15 und Claudin-17 ist daher untauglich, die parazelluläre Resorption größerer Moleküle von Medikamentwirkstoffen zu steigern. Der erfolgversprechendere Ansatz besteht darin, stattdessen barrierebildende Tight Junction-Proteine wie z.B. Claudin-1 transient herabzuregulieren und so eine Permeabilitätserhöhung für größere Moleküle zu erzielen.

Die folgende Arbeit beschäftigt sich mit der Modulation der parazellulären Barriere des Perineuriums, das die Nervenfaserbündel umgibt und die Blut-Nerven-Barriere darstellt (Pina-Oviedo & Ortiz-Hidalgo, 2008). Das Ziel dieser Modulation war es, den Durchtritt von Lokal-analgetika durch das Perineurium für die Aufnahme in den peripheren Nerven zu ermöglichen. Die hierbei benutzte Methode, nämlich die perineurale Injektion hypotoner Salzlösung, ist für ihre permeabilitätssteigernde Funktion bekannt (Rapoport, 2000), stellt aber selbst eine schmerzauslösende Behandlung dar und ist daher in der Praxis nicht anwendbar. Allerdings eignet sie sich hervorragend, um ihren Wirkmechanismus, der zu einer Herabregulierung von Claudin-1 führt, aufzuklären. Es zeigte sich, dass hypertone Salzlösung die Metalloproteinase 9 (MMP9) aktiviert, welche über ihre nicht-katalytische Domäne an das dem Low-density Lipoproteinrezeptor-ähnliche Protein-1 bindet. Diese triggert die Phosphorylierung der extrazellulär regulierten Kinase 1/2 (Erk1/2), wodurch es dann zur Herunterregulation von Claudin-1 kommt.

Perineurale Injektionen mit Komponenten dieses Signalwegs hatten alle die gleiche Herabregulation zur Folge, wodurch es zu verstärktem Durchtritt und der Wirkung des als Testsubstanz verwendeten Analgetikums [D-Ala<sup>2</sup>,N-Me-Phe<sup>4</sup>,Gly<sup>5</sup>-ol]-Enkephalin (DAMGO) kommt.

Wir postulieren, dass die Aufklärung von Signalwegen, die zur Barriereöffnung führen, die Generierung spezifischer Modulatoren zur Aufnahmeverbesserung von Medikamenten erleichtert.

- In einer Folgearbeit (Sauer RS, Krug SM, et al., 2014; siehe Liste ausgewählter Publikationen) wurde die Öffnung der Blut-Nerven-Barriere über Regulation von Claudin-1 weiter erschlossen.

---

Hackel D, **Krug SM**, Sauer RS, Mousa SA, Böcker A, Pflücke D, Wrede EJ, Kistner K, Hoffmann T, Niedermirtl B, Sommer C, Bloch L, Huber O, Blasig IE, Amasheh S, Reeh PW, Fromm M, Brack A, Rittner HL (2012) Transient opening of the perineurial barrier for analgesic drug delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109(29): E2018-E2027

Ergänzende Informationen sind als Supplement verfügbar unter:  
<http://www.pnas.org/content/109/29/E2018.abstract?tab=ds>

II. Eigene Arbeiten

DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1120800109>

#### 4 Die parazelluläre Durchlässigkeit kann über Tight Junction-Protein-spezifische Liganden reguliert werden

Nicht nur der Einsatz von bereits bekannten Absorptionenhancern wie dem in Abschnitt II.5 behandelten Caprat oder der in Abschnitt II.3 beschriebenen Regulation von Signalwegen für Claudin-1 sind Ansätze zur Permeabilitätssteigerung der Tight Junction. Auch die zielgerichtete Generierung von bindenden Peptiden ist eine Möglichkeit zur Regulation der Tight Junction-Durchlässigkeit.

Dabei wird auf bereits bekannte Peptide mit Tight Junction-Protein-bindenden Eigenschaften zurückgegriffen. Für das pathogene Bakterium *Clostridium perfringens* ist bekannt, dass es die epitheliale Barriere mit Hilfe seines Toxins, *Clostridium perfringens*-Enterotoxin (CPE) durchbricht. CPE ist ein kleines Protein, dessen N-terminaler Bereich die zytotoxische Domäne darstellt, während die C-terminale Domäne die Rezeptorbindung vermittelt (Katahira et al., 1997, Hanna et al., 1992). Die Rezeptoren dieser Bindung sind Claudin-3 und Claudin-4 (Sonoda et al., 1999), wobei die Bindung jeweils über den zweiten extrazellulären Loop erfolgt (Fujita et al., 2000).

Um spezifischere Bindungen an das Claudin zu erhalten, wurde mittels *Phage Display* nach Bindung mutierter C-CPEs, welche von den C-terminalen Aminosäuren 184-319 abgeleitet wurden, gescreent. Die nicht leicht zu synthetisierenden Claudine wurden für das Display von einem *Budded Baculovirus* synthetisiert und in ihrer aktiven Form an seiner Oberfläche präsentiert (Kakutani et al., 2011).

Aus den zahlreichen Mutanten wurde die C-CPE-Mutation m19, die im Gegensatz zum Wildtyp C-CPE auch an Claudin-1, -2 und -5 bindet, herausgegriffen und im Detail analysiert, da sie einen Breitband-Binder darstellen könnte. Mittels Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie konnten wir zeigen, dass die Bindung und folglich Öffnung der Tight Junction reversibel und auf rein parazellulärer Ebene erfolgt. Die Permeabilität war dabei im Zellkultursystem nur für kleine Ionen, repräsentiert durch den TER, aber nicht für große Moleküle erhöht. Im tierexperimentellen Ansatz dagegen wurde auch die Permeabilität für Makromoleküle erhöht, was eine komplexere Regulation im Organismus nahe legt.

Die Lokalisation der Claudine wurde durch C-CPE m19 nicht beeinflusst, was unterstreicht, dass es sich hier um eine Modifikation der Interaktionen der extrazellulären Loops handelte.

Insgesamt stellt die Methode des *Budded Baculovirus-Phage Displays* eine elegante Methode zur Generation spezifisch bindender Peptide dar, die es erlaubt, nur bestimmte Komponenten der Tight Junction anzuvisieren und damit auch das organspezifische Expressionsmuster zu berücksichtigen. Hierbei können auch andere über Tight Junction-Proteine wirkende Toxin-Domänen als Ausgangspunkt gewählt werden.

- In einem aktuellen Projekt, das kurz vor dem Abschluss steht, wurde in einem neuartigen Ansatz ein Angulin-Rezeptor – wir nennen ihn Angubindin-1 – aus einer CPE-Mutante erzeugt, der über die Blockade von Angulin Tricellulin herabreguliert und dadurch die trizelluläre Tight Junction für mittelgroße und große Moleküle öffnet.

---

Takahashi A\*, Saito Y\*, Kondoh M\*, Matsushita K, **Krug SM**, Suzuki H, Tsujino H, Li X, Aoyama H, Matsuhisa K, Uno T, Fromm M, Hamakubo T, Yagi K (2012) Creation and biochemical analysis of a broad-specific claudin binder. *Biomaterials* 33(12): 3464-3474 (\*shared first authorship)

Ergänzende Informationen sind als Supplement verfügbar unter:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961212000361>

II. Eigene Arbeiten

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.017>

## 5 Caprat reguliert die Permeabilität für Makromoleküle über die trizelluläre Tight Junction

Obwohl sie als Angriffspunkt von Regulationen zur Öffnung der parazellulären Barriere geeignet sind, zeigen die Claudine eher einen Einfluss auf den Durchtritt kleiner Ionen. Für die Tight Junction insgesamt wird jedoch eine größenabhängige Selektivität beobachtet, deren molekularer Grund jedoch bisher nicht aufgeklärt war.

Eine gängige Erklärung hierfür wäre der etappenweise Durchtritt größerer Moleküle durch sich stochastisch öffnende und schließende Unterbrechungen der einzelnen Stränge im Tight Junction-Netzwerk (Anderson et al., 2004, Schneeberger & Lynch, 2004).

Wir gehen davon aus, dass stattdessen die Zentralpore der trizellulären Tight Junction diesen Weg darstellt, da sie zu einem die Dimensionen, für einen makromolekularen Durchtritt besitzt (Staevelin, 1973) und zum anderen wir in einer früheren Arbeit zeigen konnten, dass verminderte Expression von Tricellulin den Durchtritt von Makromolekülen durch die trizelluläre Tight Junction verstärkt (Krug et al., 2009a).

Auch in der hier vorgestellten Arbeit wurde mittels eines Absorptionenhancers – des Fettsäuresalzes Caprat (n-Decanat) – eine Modifikation der Tight Junction zur Erzielung einer erhöhten parazellulären Aufnahme von großen Molekülen eingesetzt mit dem im Vordergrund stehenden Ziel, den Effekt und den Wirkmechanismus zu charakterisieren.

Funktionell zeigte sich, dass Caprat reversibel die parazelluläre Barriere für Ionen und für Solute bis einschließlich 10 kDa öffnet. Auf molekularer Ebene fanden wir, dass Caprat sowohl das abdichtende Protein Claudin-5 aus der bizellulären Tight Junction als auch Tricellulin aus der trizellulären Tight Junction dislozierte. Visualisierungsexperimente am konfokalen Mikroskop mit Sulpho-NHS-SS-Biotin (607 Da) ergaben dabei, dass der Caprat-induzierte Durchtritt dieses Solut durch die trizelluläre Tight Junction erfolgt.

- In einer nachfolgenden Arbeit wurde Laurat (n-Dodecanat), das dem Caprat strukturell verwandt ist, als Absorptionenhancer verwendet. Dabei zeigte sich, dass Laurat nur Claudin-5 beeinflusst und nicht auf Tricellulin wirkt. Dementsprechend hatte Laurat auch nur einen Effekt auf die Permeabilität für kleinere Solute bis hin zu mittelgroßen Molekülen von 650 Da. Dadurch wurde nochmals die Regulation der trizellulären Tight Junction-Barriere als Durchtrittsort für Makromoleküle durch Tricellulin im Vergleich zur bizellulären Durchlässigkeit unterstrichen. Diese Arbeit findet sich im Anlageband unter den ausgewählten Publikationen (Dittmann I, Amasheh M, Krug SM, et al., 2014).

---

**Krug SM**, Amasheh M, Dittmann I, Christoffel I, Fromm M, Amasheh S (2013) Sodium caprate as an enhancer of macromolecule permeation across tricellular tight junctions of intestinal cells. *Biomaterials* 34(1): 275-282

II. Eigene Arbeiten

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.09.051>

## III. Diskussion

### 1 Die molekularen Eigenschaften von Claudinen machen ihre Funktion innerhalb der Tight Junction aus

Für die transzelluläre Barriere oder Passage von hydrophilen Soluten durch die Zellmembran besteht eine deutliche Arbeitsteilung durch grundsätzlich unterschiedliche Molekülklassen: Die Barriere wird durch die Phospholipiddoppelschicht gebildet und der Passageweg durch Kanal- und Carrierproteine der Zellmembran.

Für den parazellulären Weg ist dies anders: Sowohl die Barriere- als auch die Passagefunktion werden von den Vier-Membrandomänen-Proteinen der Tight Junction ausgeübt. Die Funktionsanalyse von Tight Junction-Proteinen führte daher in der Vergangenheit manchmal zu überraschenden Ergebnissen, wie sich am Beispiel von Claudin-17 gezeigt hat.

Seit der Entdeckung des ersten Tight Junction-Proteins (Occludin) im Jahr 1993 bis zum Jahr 2001/2002 wurde angenommen, dass diese Proteine nur abdichtende Funktion haben können. Es war dann eine kleine Sensation, als gezeigt wurde, dass eines dieser Proteine (Claudin-2) den Widerstand vermindert (Furuse et al., 2001), indem es einen parazellulär verlaufenden Kanal für kleine Kationen bildet (Amasheh et al., 2002).

In den anschließenden zehn Jahren wurden weitere Claudine mit permeabilitätsvermittelnden Eigenschaften entdeckt und charakterisiert (siehe Tabelle 1 im Abschnitt I.2.1), zuletzt das in Abschnitt II.1 erstmals beschriebene Claudin-17, das eine eindeutige Anionenselektivität aufweist (Krug et al., 2012b). Der Vergleich von kationen- und anionenselektiven Claudinen legt nahe, dass vor allem geladene Aminosäuren des ersten extrazellulären Loops eine Rolle bei der Selektivitätsausbildung der Claudine spielen. Hierbei ist vor allem die Position 65 in einigen Claudinen als entscheidend beschrieben. Daneben sind aber auch andere Positionen in Mutagenesestudien als die Selektivität beeinflussend gefunden worden. Für Claudin-17 wurden dabei neben funktionellen Analysen über biionische und Dilutionspotentialmessungen der unterschiedlichen Mutanten auch erstmals die Positionen in der hypothetischen Struktur untersucht (Abschnitt II.1; Conrad et al., 2015). Dazu wurde die kurz zuvor publizierte Kristallstruktur von Claudin-15 als Vorlage für die Modellbildung verwendet. Bei der Übertragung der im Experiment die Selektivität beeinflussenden Positionen auf das Modell zeigte sich, dass diese Aminosäurereste sich entlang oder am Anfang oder Ende einer Rinne befinden, von der angenommen wird, dass sie den Porenverlauf für die Anionenpassage darstellt. Aminosäurereste, von denen sich zeigte, dass sie die Selektivität nicht beeinflussten lagen, dagegen weitab von dieser Pore.

Die Verknüpfung funktioneller Analysen mit Strukturüberlegungen stellt einen großen Fortschritt für das Verständnis der Ausbildung und Ionenselektivität von Claudin-basierten Kanälen dar und kann auch zur späteren, eventuellen Beeinflussung und Modifikation dieser verwendet werden. Durch gezielte Mutation einzelner Aminosäurereste kann sich eine völlig andere Selektivität und Ladungspräferenz eines kanalbildenden Claudins ergeben. Da noch zahlreiche Claudine in ihrer Funktion nicht charakterisiert sind, könnten Vergleiche von Strukturmodellen und der Positionierung geladener Aminosäurereste bereits erste Hinweise, besonders im Vergleich mit funktionell bereits bekannten Claudinen und ihren Strukturen, auf ihre Funktionalität geben.

- Unsere aktuelle Forschung beinhaltet zwei Aspekte: Erstens, wird die Lokalisation und funktionelle Bedeutung von Claudin-17 an einem in unserem Labor generierten Knockout-

Mausmodell im Vergleich zur Wildtypmaus untersucht und zweitens wollen wir unseren ersten Modellvorschlag einer Claudin-17-basierten polymeren Pore (Abb. 7 in Conrad et al., 2015) verifizieren und vervollständigen.

## **2 Die Entwicklung spezifischer Absorptionenhancer zielt auf eine kontrollierte, transiente Öffnung der parazellulären Barriere**

Eine auf den molekularen Eigenschaften aufbauende Modifikation der Tight Junction-Proteine könnte dann auch die Berücksichtigung des Claudin-Expressionsprofils zu organspezifischen Anwendungen führen, wenn beispielsweise Claudin-bindende Peptide als Shuttle, bzw. Absorptionenhancer zur selektiven Wirkstoffaufnahme herangezogen werden.

Dabei können die Absorptionenhancer über Mutation und Screening mittels Phage Display gezielt entwickelt werden, um entweder ein Tight Junction-Protein oder aber mehrere zu binden. Dies wurde am Beispiel des C-CPE m19 gezeigt. Im Vergleich zum Wildtyp-C-CPE besitzt es ein weiteres Wirkspektrum, da es auch an Claudin-1, -2 und -5 bindet. Ein fernes Ziel in der Expressionsprofil-spezifischen Entwicklung könnte dann die Selektion von Bindern sein, die zum Beispiel nur bestimmte Komplexe aus spezifischen Claudin-Interaktionen erkennen.

Auch das Verständnis von Signalwegen, welche die Expression der Tight Junction-Proteine regulieren, ist bei der Auswahl von modifizierenden Agenzien von Nutzen, wie es sich zum Beispiel bei der Regulation der Blut-Nerven-Barriere über Claudin-1 zeigte. Durch die Aufklärung des Wirkmechanismus hypotoner Salzlösung auf die Barriereöffnung konnten Alternativen zur Injektion mit dieser gefunden werden. Gleichzeitig eröffneten sich dadurch auch weitere Angriffspunkte innerhalb des Signalwegs für die Claudin-1-abhängige Regulation der Tight Junction-Barriere.

## **3 Die parazelluläre Passage von Makromolekülen erfolgt über die trizelluläre Tight Junction und kann ebenfalls modifiziert werden**

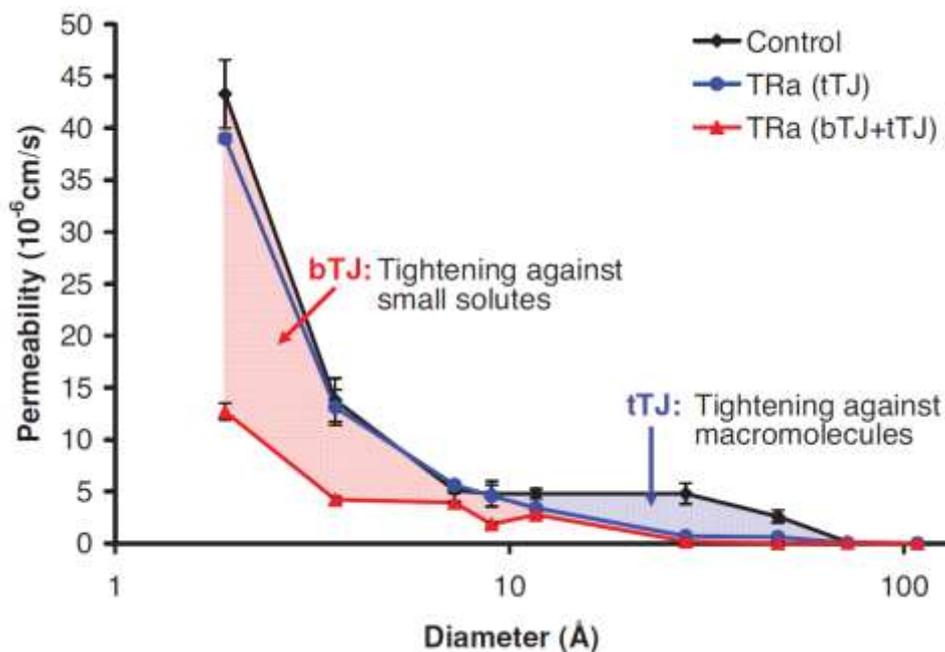
Wasser und Ionen werden abhängig vom Claudin-Expressionsprofil spezifisch in ihrer parazellulären Passage beeinflusst. Daneben wird aber auch eine größenabhängige Selektivität beobachtet. Diese deckt einen Bereich von ca. 4 bis 40 Å ab (Diamond, 1978) und wurde bisher unter der Annahme diskutiert, dass sich die physikalische Barriere für Ionen und andere Solute unterscheidet, da selbst bei hohen Widerständen größere Solute die Tight Junction passieren können.

Das daraus resultierende Modell zur Beschreibung der parazellulären Barriere für ungeladene Solute beschreibt diese als aus zwei Komponenten bestehend, welche nicht nur unterschiedlich an sich, sondern auch unabhängig voneinander sind (Watson et al., 2001, Van Itallie et al., 2008, Van Itallie & Anderson, 2004). Aus Fluxmessungen von PEG-Gemischen eines weiten Größenspektrums wurden einerseits häufige, größenlimitierte „kleine Poren“ mit einem Radius von ungefähr 0,4 nm, und andererseits größenunabhängige „große Poren“, die den Transport größerer Solute erlauben, postuliert.

Hierbei wurde angenommen, dass sich die Permeabilität für kleine Solute proportional zu Porenanzahl und dem Expressionsprofil der Tight Junction-Proteine verhält. Auch die Summe der Ionenleitfähigkeiten innerhalb aller Tight Junction-Stränge des Netzwerks in Abhängigkeit der Claudinselektivität geht in dieses Modell der Ionenleitfähigkeit ein. Da die molekulare Grundlage der Passage größerer Solute unbekannt war, wurde angenommen, dass sie über

reversible und zufällig auftretende Brüche im Strangnetzwerk auftritt und dadurch diese Passage schrittweise und langsam abläuft, was dazu führt, dass die Passage der großen Solute auch bei hohen Widerständen stattfinden könnte (Anderson et al., 2004).

Aus der Charakterisierung des TAMPs Tricellulin konnte dagegen erstmals gezeigt werden, dass der parazelluläre Durchtritt von großen Soluten über die trizelluläre Tight Junction erfolgen kann und Tricellulin dabei eine die Abdichtung regulierende Funktion hat (Krug et al., 2009a); (Abbildung 6). Die Dimensionen der Zentralporen der trizellulären Tight Junction erlauben den Durchtritt der großen Moleküle. Gleichzeitig sind die trizellulären Tight Junctions im Vergleich zum bizellulären Tight Junction-Netzwerk selten genug, um je nach Epithelmodell nur wenig Einfluss von auf die parazelluläre Ionenpermeabilität zu haben.



**Abbildung 6:** Effekt der Tricellulin-Überexpression in MDCK II-Zellen auf die Permeabilität unterschiedlich großer parazellulärer Fluxmarker. Schwache Überexpression von Tricellulin (TRa) zeigte nur trizelluläre Lokalisation (blau), während starke Überexpression tri- und bizelluläre Lokalisation zur Folge hatte (rot). Vektortransfizierte Kontrollen (schwarz) zeigten das zweiphasige Permeabilitätsprofil wie es bereits in anderen Studien (Watson et al., 2001, Van Itallie et al., 2008, Van Itallie & Anderson, 2004) beobachtet wurde. Rein trizelluläre Überexpression führte zur Abdichtung gegen große Moleküle (blaue Fläche) und scheint eine der beiden parazellulären Transportkomponenten darzustellen. Zusätzliche bizelluläre Überexpression führte zu einer zusätzlichen Abdichtung gegen kleinere Solute (rote Fläche; aus Günzel & Fromm, 2012 aus Daten von Krug et al., 2009a).

Weitere Evidenz für die trizelluläre Tight Junction als den Durchtrittsort für große Solute liefert die hier beschriebene Arbeit, die sich mit der Regulation und Öffnung der parazellulären Barriere mittels des Absorptionenhancers Caprat beschäftigte.

Caprat wirkte nicht nur auf Claudine, in diesem Fall Claudin-5, sondern auch auf Tricellulin. Die auftretende Permeabilitätszunahme für größere Solute bis hin zu ca. 10 kDa legte nahe, dass hierbei als Durchtrittsort die trizelluläre Tight Junction in Frage kommt. Dies wurde noch durch weitere Befunde mit dem strukturell ähnlichen Laurat, das aber nur auf Claudin-5 wirkt und dabei auch nur die Permeabilität für kleine Moleküle bis 330 Da beeinflusste, unterstri-

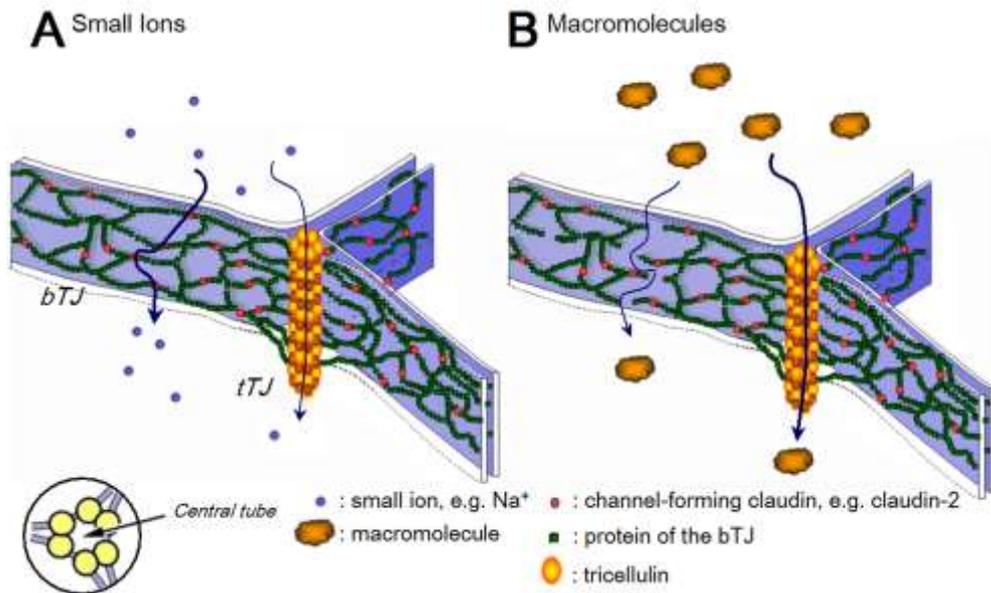
chen. Für das mittelgroße Markermolekül Sulpho-NHS-SS-biotin (607 Da) konnte dann tatsächlich die trizelluläre Tight Junction als Durchtrittsort nach Inkubation mit Caprat visualisiert werden.

Fasst man nun die Ergebnisse und Aussagen der hier beschriebenen Studien zusammen, so lässt sich ein Modell für den parazellulären Transport von Ionen und von großen Molekülen postulieren, das eine entscheidende Abwandlung der bisher gängigen "Pore and leak pathway"-Hypothese darstellt (Schneeberger & Lynch, 2004; Anderson et al., 2004). Sowohl diese Hypothese als auch unser Modell beinhalten zwei Wege, von denen der eine bei beiden gleich ist, nämlich der Weg von Ionen und Wasser durch kanalbildende Claudine (Pore pathway, siehe Abbildung 7A, links). Bei der „Pore and leak“-Hypothese erfolgt der Durchtritt größerer Moleküle schrittweise durch einzelne horizontale Stränge, auf deren stochastische Öffnungen das Molekül warten muss (Leak pathway). In Abbildung 7B ist links der selten auftretende Zustand der gleichzeitigen Offenheit von vier Strangunterbrechungen eingezeichnet, in der Regel sind jedoch nur einzelne Stränge durchlässig. Dies hat zur Folge, dass der elektrische Widerstand dieses Weges extrem hoch ist und trotzdem Solute passieren können. Diese Hypothese ist elegant, aber es existiert bisher keine experimentelle Evidenz für die Existenz oder quantitative Bedeutung dieses Mechanismus.

Alle unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass stattdessen die Zentralpore der trizellulären Tight Junction einen bedeutsamen Weg für Makromoleküle darstellt (Abbildung 7B, Mitte). Sie besitzt mit etwa 10 nm einen hinreichenden Durchmesser für einen makromolekularen Durchtritt (StaeHELIN, 1973) und bereits in einer früheren Arbeit konnten wir demonstrieren, dass bei verminderter Expression von Tricellulin der Durchtritt von Makromolekülen durch die trizelluläre Tight Junction verstärkt ist (Krug et al., 2009a).

Ionen und Wasser können aufgrund ihrer geringen Größe ebenfalls relativ ungehindert die trizelluläre Zentralpore das Epithel passieren (Abbildung 7A, Mitte), doch sind diese Zentralporen im Vergleich zur Zahl bizellulären Claudin-Kanälen sehr selten. Ein Ionendurchtritt ist deshalb nur in dichten Epithelien nachweisbar, da in diesen Epithelien die parazelluläre Ionenleitfähigkeit über die bizelluläre Tight Junction gering ist.

Für Makromoleküle dagegen spielt die trizelluläre Zentralpore eine wichtigere Rolle. Claudin-basierten Kanäle sind für einen Makromoleküldurchtritt bei weitem zu eng, während die trizelluläre Zentralpore trotz ihrer relativen Seltenheit überhaupt erst einen Durchtritt ermöglicht. Die Durchlässigkeit der trizellulären Zentralpore wird über trizellulär lokalisierte Tight Junction-Proteine wie das Tricellulin reguliert.



**Abbildung 7:** Parazelluläre Routen der Passage von kleinen Ionen und makromolekularen Soluten. Dargestellt sind die Tight Junction-Bereiche (TJ) von drei aufeinandertreffenden Zellen. In dem Bereich, an dem die bizellulären TJs (bTJ) dreier Zellen aufeinander treffen, konvergieren die bTJs zur trizellulären TJ (tTJ). Das Inset zeigt die Draufsicht auf die durch die tTJ geformte Zentralpore bestehend aus Angulinen und Tricellulin. **A:** Kleine Ionen und Wasser passieren die TJ hauptsächlich über die leitfähigen, kleinen Kanäle, die durch Claudine gebildet werden, aber zu gewissen Anteilen auch über die tTJ oder Strangbrüche. **B:** Makromoleküle können den parazellulären Spalt über die seltene und gering-kapazitive tTJ oder aber Strangbrüche passieren (Krug et al., 2014).



## IV. Zusammenfassung

Die Tight Junction determiniert den parazellulären Transport, wobei sie vorwiegend abdichtende Funktion hat. Dennoch gibt es zahlreiche Tight Junction-Proteine aus der Familie der Claudine, die eine Permeabilität vermitteln, indem sie parazellulär verlaufende Kanäle mit Selektivität für Kationen, Anionen oder Wasser bilden.

Im ersten Unterthema dieser Habilitationsschrift geht es um ein – wie die Studien ergaben – kanalbildendes Tight Junction-Protein. Es zeigte sich, dass das bisher nicht charakterisierte Tight Junction-Protein Claudin-17 einen anionenselektiven parazellulären Kanal bildet und vorwiegend im proximalen Nephron lokalisiert ist. Seine Anionenselektivität wird von bestimmten geladenen Aminosäuren beider extrazellulärer Schleifen dieses Claudins verursacht. Die Übertragung dieser Aminosäurepositionen auf ein Claudin-17-Strukturmodell ergab, dass sich diese Aminosäurereste am Anfang, im Inneren und am Ende eines hypothetischen Porenverlaufs des Claudin-17-basierten Kanals befinden.

Auf der Basis dieser Ergebnisse waren wir in der Lage, ein erstes hypothetisches Strukturmodell eines Claudinpolymer-basierten Anionenkanals zu präsentieren.

Das zweite Unterthema fokussiert sich auf abdichtende Tight Junction-Proteine. Diese eignen sich als Angriffspunkte für parazellulär wirksame Absorptionenhancer. Aufgabe von Absorptionenhancern ist es, ansonsten schlecht resorbierbare mittel- bis makromolekulare hydrophile Solute – z.B. Medikamente – parazellulär durch Epi- oder Endothelien zu schleusen, indem sie eine kontrollierte transiente Öffnung der Tight Junction bewirken.

Drei unterschiedliche Lösungsansätze werden präsentiert. In einer ersten Studie wurde der Signalweg aufgeklärt, über den Absorptionenhancer an der peripheren Blut-Nerven-Barriere den Durchtritt von Lokalanästhetika erleichtern, indem sie Claudin-1 herabregulieren. In der zweiten Studie wurde eine geeignete Mutante des *Clostridium perfringens*-Enterotoxins benutzt, die mit mehreren abdichtenden Claudinen interagiert und diese funktionsuntüchtig macht. In der dritten Studie zu diesem Unterthema wurde der Effekt des Fettsäuresalzes Caprat untersucht, mit dem Ergebnis, dass es das abdichtende Protein Claudin-5 aus der bizellulären Tight Junction als auch Tricellulin aus der trizellulären Tight Junction dislozierte. Wir konnten fluoreszenzoptisch zeigen, dass ein 607 Da großes Molekül (Biotin) nach Capratgabe durch die trizelluläre Tight Junction gelangt.

Aus unseren Daten leiten wir eine neuartige Hypothese für den Transportweg für Ionen und Makromoleküle ab: Während Ionen und kleine Solute in quantitativ bedeutsamer Menge durch Claudin-basierte parazelluläre Kanäle der bizellulären Tight Junction passieren, können Makromoleküle das Epithel durch die etwa 10 nm große Zentralpore der trizellulären Tight Junction passieren.

## V. Literaturverzeichnis

- ALEXANDRE, M. D., JEANSONNE, B. G., RENEGAR, R. H., TATUM, R. & CHEN, Y. H. 2007. The first extracellular domain of claudin-7 affects paracellular Cl<sup>-</sup> permeability. *Biochem Biophys Res Commun*, 357, 87-91.
- ALEXANDRE, M. D., LU, Q. & CHEN, Y. H. 2005. Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl<sup>-</sup> conductance and increases the paracellular Na<sup>+</sup> conductance in LLC-PK1 cells. *J Cell Sci*, 118, 2683-93.
- AMASHEH, S., MEIRI, N., GITTER, A. H., SCHONEBERG, T., MANKERTZ, J., SCHULZKE, J. D. & FROMM, M. 2002. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci*, 115, 4969-76.
- AMASHEH, S., SCHMIDT, T., MAHN, M., FLORIAN, P., MANKERTZ, J., TAVALLI, S., GITTER, A. H., SCHULZKE, J. D. & FROMM, M. 2005. Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell Tissue Res*, 321, 89-96.
- ANDERSON, J. M., VAN ITALLIE, C. M. & FANNING, A. S. 2004. Setting up a selective barrier at the apical junction complex. *Curr Opin Cell Biol*, 16, 140-5.
- ANGELOW, S., SCHNEEBERGER, E. E. & YU, A. S. 2007. Claudin-8 expression in renal epithelial cells augments the paracellular barrier by replacing endogenous claudin-2. *J Membr Biol*, 215, 147-59.
- ANGELOW, S. & YU, A. S. 2009. Structure-function studies of claudin extracellular domains by cysteine-scanning mutagenesis. *J Biol Chem*, 284, 29205-17.
- ARONSON, P. S. & GIEBISCH, G. 1997. Mechanisms of chloride transport in the proximal tubule. *Am J Physiol*, 273, F179-92.
- ASSÉMAT, E., BAZELLIÈRES, E., PALLES-POCACHARD, E., LE BIVIC, A. & MASSEY-HARROCHE, D. 2008. Polarity complex proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778, 614-630.
- BALDA, M. S., WHITNEY, J. A., FLORES, C., GONZALEZ, S., CERREJIDO, M. & MATTER, K. 1996. Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol*, 134, 1031-49.
- BAUER, H.-C., KRIZBAI, I. A., BAUER, H. & TRAWEGER, A. 2014. "You Shall Not Pass" – Tight junctions of the Blood Brain Barrier. *Frontiers in Neuroscience*, 8.
- BAUER, H., ZWEIMUELLER-MAYER, J., STEINBACHER, P., LAMETSCHWANDTNER, A. & BAUER, H. C. 2010. The dual role of zonula occludens (ZO) proteins. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 402593.
- BEN-YOSEF, T., BELYANTSEVA, I. A., SAUNDERS, T. L., HUGHES, E. D., KAWAMOTO, K., VAN ITALLIE, C. M., BEYER, L. A., HALSEY, K., GARDNER, D. J., WILCOX, E. R., RASMUSSEN, J., ANDERSON, J. M., DOLAN, D. F., FORGE, A., RAPHAEL, Y., CAMPER, S. A. & FRIEDMAN, T. B. 2003. Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. *Hum Mol Genet*, 12, 2049-61.
- BEYENBACH, K. W. 2003. Regulation of tight junction permeability with switch-like speed. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 12, 543-50.
- BROWN, D. R. & O'GRADY, S. M. 2008. The Ussing chamber and measurement of drug actions on mucosal ion transport. *Curr Protoc Pharmacol*, Chapter 7, Unit 7.12.
- BUSCHMANN, M. M., SHEN, L., RAJAPAKSE, H., RALEIGH, D. R., WANG, Y., WANG, Y., LINGARAJU, A., ZHA, J., ABBOTT, E., MCAULEY, E. M., BRESKIN, L. A., WU, L., ANDERSON, K., TURNER, J. R. & WEBER, C. R. 2013. Occludin OCEL-domain interactions are required for maintenance and regulation of the tight junction barrier to macromolecular flux. *Mol Biol Cell*, 24, 3056-68.
- CAPASSO, G., UNWIN, R., RIZZO, M., PICA, A. & GIEBISCH, G. 2002. Bicarbonate transport along the loop of Henle: molecular mechanisms and regulation. *J Nephrol*, 15 Suppl 5, S88-96.
- CLARKE, L. L. 2009. A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296, G1151-66.
- CLAUDE, P. 1978. Morphological factors influencing transepithelial permeability: A model for the resistance of the Zonula Occludens. *The Journal of Membrane Biology*, 39, 219-232.
- CLAUDE, P. & GOODENOUGH, D. A. 1973. Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *J Cell Biol*, 58, 390-400.
- CLAUSEN, C., LEWIS, S. A. & DIAMOND, J. M. 1979. Impedance analysis of a tight epithelium using a distributed resistance model. *Biophys J*, 26, 291-317.
- COGAN, M. G., MADDOX, D. A., LUCCI, M. S. & RECTOR, F. C., JR. 1979. Control of proximal bicarbonate reabsorption in normal and acidotic rats. *J Clin Invest*, 64, 1168-80.
- COLEGIO, O. R., VAN ITALLIE, C. M., MCCREA, H. J., RAHNER, C. & ANDERSON, J. M. 2002. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283, C142-7.
- CONRAD, M. P., PIONTEK, J., GÜNZEL, D., FROMM, M. & KRUG, S. M. 2015. Molecular basis of claudin-17 anion selectivity. *Cell Mol Life Sci*.
- DIAMOND, J. M. 1974. Tight and leaky junctions of epithelia: a perspective on kisses in the dark. *Fed Proc*, 33, 2220-4.
- DIAMOND, J. M. 1978. Channels in epithelial cell membranes and junctions. *Fed Proc*, 37, 2639-43.
- DIMARTINO, J. F., MILLER, T., AYTON, P. M., LANDEWE, T., HESS, J. L., CLEARY, M. L. & SHILATIFARD, A. 2000. A carboxy-terminal domain of ELL is required and sufficient for immortalization of myeloid progenitors by MLL-ELL. *Blood*, 96, 3887-93.

- DOYLE, D. A., LEE, A., LEWIS, J., KIM, E., SHENG, M. & MACKINNON, R. 1996. Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell*, 85, 1067-76.
- EASTER, D. W., WADE, J. B. & BOYER, J. L. 1983. Structural integrity of hepatocyte tight junctions. *J Cell Biol*, 96, 745-9.
- EBNET, K., SUZUKI, A., OHNO, S. & VESTWEBER, D. 2004. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci*, 117, 19-29.
- EISENMAN, G. 1962. Cation selective glass electrodes and their mode of operation. *Biophys J*, 2, 259-323.
- FROMM, M. 2011. Transport in Membranen und Epithelien. In: SCHMIDT, R. F., LANG, F. & HECKMANN, M. (eds.) *Physiologie des Menschen*. Springer Berlin Heidelberg.
- FROMM, M., KRUG, S. M., ZEISSIG, S., RICHTER, J. F., ROSENTHAL, R., SCHULZKE, J. D. & GÜNZEL, D. 2009. High-resolution analysis of barrier function. *Ann N Y Acad Sci*, 1165, 74-81.
- FRÖMTER, E. 1972. The route of passive ion movement through the epithelium of *Necturus gallbladder*. *J Membr Biol*, 8, 259-301.
- FRÖMTER, E. & DIAMOND, J. 1972. Route of passive ion permeation in epithelia. *Nat New Biol*, 235, 9-13.
- FUJITA, H., CHIBA, H., YOKOZAKI, H., SAKAI, N., SUGIMOTO, K., WADA, T., KOJIMA, T., YAMASHITA, T. & SAWADA, N. 2006. Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine. *J Histochem Cytochem*, 54, 933-44.
- FUJITA, K., KATAHIRA, J., HORIGUCHI, Y., SONODA, N., FURUSE, M. & TSUKITA, S. 2000. Clostridium perfringens enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein. *FEBS Lett*, 476, 258-61.
- FURUSE, M., FUJITA, K., HIIRAGI, T., FUJIMOTO, K. & TSUKITA, S. 1998. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*, 141, 1539-50.
- FURUSE, M., FURUSE, K., SASAKI, H. & TSUKITA, S. 2001. Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol*, 153, 263-72.
- FURUSE, M., HATA, M., FURUSE, K., YOSHIDA, Y., HARATAKE, A., SUGITANI, Y., NODA, T., KUBO, A. & TSUKITA, S. 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol*, 156, 1099-111.
- FURUSE, M., IZUMI, Y., ODA, Y., HIGASHI, T. & IWAMOTO, N. 2014. Molecular organization of tricellular tight junctions. *Tissue Barriers*, 2, e28960.
- FURUSE, M., ODA, Y., HIGASHI, T., IWAMOTO, N. & MASUDA, S. 2012. Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor: a novel membrane protein of tricellular tight junctions. *Ann N Y Acad Sci*, 1257, 54-8.
- FURUSE, M., SASAKI, H. & TSUKITA, S. 1999. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol*, 147, 891-903.
- GHANDEHARI, H., SMITH, P. L., ELLENS, H., YEH, P. Y. & KOPECEK, J. 1997. Size-dependent permeability of hydrophilic probes across rabbit colonic epithelium. *J Pharmacol Exp Ther*, 280, 747-53.
- GONZALEZ-MARISCAL, L., QUIROS, M., DIAZ-CORANGUEZ, M. AND BAUTISTA, P. 2012. Tight Junctions. *Current Frontiers and Perspectives in Cell Biology, Prof. Stevo Najman (Ed.), InTech*.
- GÜNZEL, D., AMASHEH, S., PFAFFENBACH, S., RICHTER, J. F., KAUSALYA, P. J., HUNZIKER, W. & FROMM, M. 2009a. Claudin-16 affects transcellular Cl<sup>-</sup> secretion in MDCK cells. *J Physiol*, 587, 3777-93.
- GÜNZEL, D. & FROMM, M. 2012. Claudins and other tight junction proteins. *Compr Physiol*, 2, 1819-52.
- GÜNZEL, D., KRUG, S. M., ROSENTHAL, R. & FROMM, M. 2010. Chapter 3 - Biophysical Methods to Study Tight Junction Permeability. In: ALAN, S. L. Y. (ed.) *Current Topics in Membranes*. Academic Press.
- GÜNZEL, D., STUIVER, M., KAUSALYA, P. J., HAISCH, L., KRUG, S. M., ROSENTHAL, R., MEIJ, I. C., HUNZIKER, W., FROMM, M. & MÜLLER, D. 2009b. Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function. *J Cell Sci*, 122, 1507-17.
- GÜNZEL, D. & YU, A. S. 2013. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev*, 93, 525-69.
- HANNA, P. C., WIECKOWSKI, E. U., MIETZNER, T. A. & MCCLANE, B. A. 1992. Mapping of functional regions of Clostridium perfringens type A enterotoxin. *Infect Immun*, 60, 2110-4.
- HASKINS, J., GU, L., WITTCHEM, E. S., HIBBARD, J. & STEVENSON, B. R. 1998. ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol*, 141, 199-208.
- HAUGE, H., PATZKE, S., DELABIE, J. & AASHEIM, H. C. 2004. Characterization of a novel immunoglobulin-like domain containing receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 323, 970-8.
- HELLER, F., FLORIAN, P., BOJARSKI, C., RICHTER, J., CHRIST, M., HILLENBRAND, B., MANKERTZ, J., GITTER, A. H., BURGEL, N., FROMM, M., ZEITZ, M., FUSS, I., STROBER, W. & SCHULZKE, J. D. 2005. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology*, 129, 550-64.
- HIGASHI, T., TOKUDA, S., KITAJIRI, S., MASUDA, S., NAKAMURA, H., ODA, Y. & FURUSE, M. 2013. Analysis of the 'angulin' proteins LSR, ILDR1 and ILDR2--tricellulin recruitment, epithelial barrier function and implication in deafness pathogenesis. *J Cell Sci*, 126, 966-77.
- HOU, J., GOMES, A. S., PAUL, D. L. & GOODENOUGH, D. A. 2006. Study of claudin function by RNA interference. *J Biol Chem*, 281, 36117-23.
- HOU, J., PAUL, D. L. & GOODENOUGH, D. A. 2005. Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions. *J Cell Sci*, 118, 5109-18.
- HOU, J., RENIGUNTA, A., KONRAD, M., GOMES, A. S., SCHNEEBERGER, E. E., PAUL, D. L., WALDEGGER, S. & GOODENOUGH, D. A. 2008. Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J Clin Invest*, 118, 619-28.

## V. Literaturverzeichnis

- HOU, J., RENIGUNTA, A., YANG, J. & WALDEGGER, S. 2010. Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 18010-5.
- HOU, J., SHAN, Q., WANG, T., GOMES, A. S., YAN, Q., PAUL, D. L., BLEICH, M. & GOODENOUGH, D. A. 2007. Transgenic RNAi depletion of claudin-16 and the renal handling of magnesium. *J Biol Chem*, 282, 17114-22.
- IKENOUCI, J., FURUSE, M., FURUSE, K., SASAKI, H., TSUKITA, S. & TSUKITA, S. 2005. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol*, 171, 939-45.
- IKENOUCI, J., SASAKI, H., TSUKITA, S., FURUSE, M. & TSUKITA, S. 2008. Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. *Mol Biol Cell*, 19, 4687-93.
- INAI, T., KOBAYASHI, J. & SHIBATA, Y. 1999. Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. *Eur J Cell Biol*, 78, 849-55.
- INAI, T., SENGOKU, A., GUAN, X., HIROSE, E., IIDA, H. & SHIBATA, Y. 2005. Heterogeneity in expression and subcellular localization of tight junction proteins, claudin-10 and -15, examined by RT-PCR and immunofluorescence microscopy. *Arch Histol Cytol*, 68, 349-60.
- IWAMOTO, N., HIGASHI, T. & FURUSE, M. 2014. Localization of angulin-1/LSR and tricellulin at tricellular contacts of brain and retinal endothelial cells in vivo. *Cell Struct Funct*, 39, 1-8.
- JESAITIS, L. A. & GOODENOUGH, D. A. 1994. Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *J Cell Biol*, 124, 949-61.
- JOVOV, B., VAN ITALLIE, C. M., SHAHEEN, N. J., CARSON, J. L., GAMBLING, T. M., ANDERSON, J. M. & ORLANDO, R. C. 2007. Claudin-18: a dominant tight junction protein in Barrett's esophagus and likely contributor to its acid resistance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 293, G1106-13.
- JOVOV, B., WILLS, N. K. & LEWIS, S. A. 1991. A spectroscopic method for assessing confluence of epithelial cell cultures. *Am J Physiol*, 261, C1196-203.
- KAKUTANI, H., TAKAHASHI, A., KONDOH, M., SAITO, Y., YAMAURA, T., SAKIHAMA, T., HAMAKUBO, T. & YAGI, K. 2011. A novel screening system for claudin binder using baculoviral display. *PLoS One*, 6, e16611.
- KATAHIRA, J., INOUE, N., HORIGUCHI, Y., MATSUDA, M. & SUGIMOTO, N. 1997. Molecular cloning and functional characterization of the receptor for Clostridium perfringens enterotoxin. *J Cell Biol*, 136, 1239-47.
- KIUCHI-SAISHIN, Y., GOTOH, S., FURUSE, M., TAKASUGA, A., TANO, Y. & TSUKITA, S. 2002. Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol*, 13, 875-86.
- KOTTRA, G. & FRÖMTER, E. 1984. Rapid determination of intraepithelial resistance barriers by alternating current spectroscopy. I. Experimental procedures. *Pflugers Arch*, 402, 409-20.
- KRAUSE, G., WINKLER, L., MUELLER, S. L., HASELOFF, R. F., PIONTEK, J. & BLASIG, I. E. 2008. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta*, 1778, 631-45.
- KRSTIC, R. V. 1978. Die Gewebe des Menschen und der Säugetiere. *Springer, Berlin, Heidelberg, New York*.
- KRUG, S. M., AMASHEH, M., DITTMANN, I., CHRISTOFFEL, I., FROMM, M. & AMASHEH, S. 2013. Sodium caprate as an enhancer of macromolecule permeation across tricellular tight junctions of intestinal cells. *Biomaterials*, 34, 275-82.
- KRUG, S. M., AMASHEH, S., RICHTER, J. F., MILATZ, S., GÜNZEL, D., WESTPHAL, J. K., HUBER, O., SCHULZKE, J. D. & FROMM, M. 2009a. Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol Biol Cell*, 20, 3713-24.
- KRUG, S. M., FROMM, M. & GÜNZEL, D. 2009b. Two-path impedance spectroscopy for measuring paracellular and transcellular epithelial resistance. *Biophys J*, 97, 2202-11.
- KRUG, S. M., GÜNZEL, D., CONRAD, M. P., LEE, I. F., AMASHEH, S., FROMM, M. & YU, A. S. 2012a. Charge-selective claudin channels. *Ann N Y Acad Sci*, 1257, 20-8.
- KRUG, S. M., GÜNZEL, D., CONRAD, M. P., ROSENTHAL, R., FROMM, A., AMASHEH, S., SCHULZKE, J. D. & FROMM, M. 2012b. Claudin-17 forms tight junction channels with distinct anion selectivity. *Cell Mol Life Sci*, 69, 2765-78.
- KRUG, S. M., SCHULZKE, J. D. & FROMM, M. 2014. Tight junction, selective permeability, and related diseases. *Semin Cell Dev Biol*, 36, 166-76.
- LANG, F., NEUMAN, S., OBERLEITHNER, H., GREGER, R. & MESSNER, G. 1982. Carbonic anhydrase independent bicarbonate reabsorption. *Pflugers Arch*, 395, 121-5.
- LI, J., ANGELOW, S., LINGE, A., ZHUO, M. & YU, A. S. 2013. Claudin-2 pore function requires an intramolecular disulfide bond between two conserved extracellular cysteines. *Am J Physiol Cell Physiol*, 305, C190-6.
- LIEBNER, S., KNIASEL, U., KALBACHER, H. & WOLBURG, H. 2000. Correlation of tight junction morphology with the expression of tight junction proteins in blood-brain barrier endothelial cells. *European Journal of Cell Biology*, 79, 707-717.
- MANKERTZ, J., AMASHEH, M., KRUG, S. M., FROMM, A., AMASHEH, S., HILLENBRAND, B., TAVALLALI, S., FROMM, M. & SCHULZKE, J. D. 2009. TNFalpha up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Cell Tissue Res*, 336, 67-77.
- MARCIAL, M. A., CARLSON, S. L. & MADARA, J. L. 1984. Partitioning of paracellular conductance along the ileal crypt-villus axis: a hypothesis based on structural analysis with detailed consideration of tight junction structure-function relationships. *J Membr Biol*, 80, 59-70.
- MARIN, M. L., GREENSTEIN, A. J., GELLER, S. A., GORDON, R. E. & AUFSES, A. H., JR. 1983. A freeze fracture study of Crohn's disease of the terminal ileum: changes in epithelial tight junction organization. *Am J Gastroenterol*, 78, 537-47.

- MARTIN-PADURA, I., LOSTAGLIO, S., SCHNEEMANN, M., WILLIAMS, L., ROMANO, M., FRUSCELLA, P., PANZERI, C., STOPPACCIARO, A., RUCO, L., VILLA, A., SIMMONS, D. & DEJANA, E. 1998. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol*, 142, 117-27.
- MARTINEZ-PALOMO, A. & ERLIJ, D. 1975. Structure of tight junctions in epithelia with different permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 4487-91.
- MASUDA, S., ODA, Y., SASAKI, H., IKENOUCI, J., HIGASHI, T., AKASHI, M., NISHI, E. & FURUSE, M. 2011. LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells. *J Cell Sci*, 124, 548-55.
- MCCARTHY, K. M., FRANCIS, S. A., MCCORMACK, J. M., LAI, J., ROGERS, R. A., SKARE, I. B., LYNCH, R. D. & SCHNEEBERGER, E. E. 2000. Inducible expression of claudin-1-myc but not occludin-VSV-G results in aberrant tight junction strand formation in MDCK cells. *J Cell Sci*, 113 Pt 19, 3387-98.
- MCCARTHY, K. M., SKARE, I. B., STANKEWICH, M. C., FURUSE, M., TSUKITA, S., ROGERS, R. A., LYNCH, R. D. & SCHNEEBERGER, E. E. 1996. Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci*, 109 ( Pt 9), 2287-98.
- MCCLENDON, J. F. 1936. ELECTRIC IMPEDANCE AND PERMEABILITY OF LIVING CELLS. *Science*, 84, 184-185.
- MENCO, B. P. 1988. Tight-junctional strands first appear in regions where three cells meet in differentiating olfactory epithelium: a freeze-fracture study. *J Cell Sci*, 89 ( Pt 4), 495-505.
- MILATZ, S., KRUG, S. M., ROSENTHAL, R., GUNZEL, D., MULLER, D., SCHULZKE, J. D., AMASHEH, S. & FROMM, M. 2010. Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochim Biophys Acta*, 1798, 2048-57.
- MINETA, K., YAMAMOTO, Y., YAMAZAKI, Y., TANAKA, H., TADA, Y., SAITO, K., TAMURA, A., IGARASHI, M., ENDO, T., TAKEUCHI, K. & TSUKITA, S. 2011. Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett*, 585, 606-12.
- NAKATSU, D., KANO, F., TAGUCHI, Y., SUGAWARA, T., NISHIZONO, T., NISHIKAWA, K., ODA, Y., FURUSE, M. & MURATA, M. 2014. JNK1/2-dependent phosphorylation of angulin-1/LSR is required for the exclusive localization of angulin-1/LSR and tricellulin at tricellular contacts in EpH4 epithelial sheet. *Genes Cells*, 19, 565-81.
- NITTA, T., HATA, M., GOTOH, S., SEO, Y., SASAKI, H., HASHIMOTO, N., FURUSE, M. & TSUKITA, S. 2003. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol*, 161, 653-60.
- NOURRY, C., GRANT, S. G. & BORG, J. P. 2003. PDZ domain proteins: plug and play! *Sci STKE*, 2003, RE7.
- PENG, S., RAO, V. S., ADELMAN, R. A. & RIZZOLO, L. J. 2011. Claudin-19 and the barrier properties of the human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52, 1392-403.
- PIEHL, C., PIONTEK, J., CORDING, J., WOLBURG, H. & BLASIG, I. E. 2010. Participation of the second extracellular loop of claudin-5 in paracellular tightening against ions, small and large molecules. *Cell Mol Life Sci*, 67, 2131-40.
- PINA-OVIEDO, S. & ORTIZ-HIDALGO, C. 2008. The normal and neoplastic perineurium: a review. *Adv Anat Pathol*, 15, 147-64.
- PIONTEK, J., WINKLER, L., WOLBURG, H., MÜLLER, S. L., ZULEGER, N., PIEHL, C., WIESNER, B., KRAUSE, G. & BLASIG, I. E. 2008. Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *The FASEB Journal*, 22, 146-158.
- PLANELLES, G. 2004. Chloride transport in the renal proximal tubule. *Pflugers Arch*, 448, 561-70.
- RAHNER, C., MITIC, L. L. & ANDERSON, J. M. 2001. Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology*, 120, 411-22.
- RALEIGH, D. R., MARCHIANDO, A. M., ZHANG, Y., SHEN, L., SASAKI, H., WANG, Y., LONG, M. & TURNER, J. R. 2010. Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. *Mol Biol Cell*, 21, 1200-13.
- RAPOPORT, S. I. 2000. Osmotic opening of the blood-brain barrier: principles, mechanism, and therapeutic applications. *Cell Mol Neurobiol*, 20, 217-30.
- ROH, M. H. & MARGOLIS, B. 2003. Composition and function of PDZ protein complexes during cell polarization. *Am J Physiol Renal Physiol*, 285, F377-87.
- ROSENTHAL, R., MILATZ, S., KRUG, S. M., OELRICH, B., SCHULZKE, J. D., AMASHEH, S., GUNZEL, D. & FROMM, M. 2010. Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J Cell Sci*, 123, 1913-21.
- ROSS, A., RUBIN, A. W. & DEREN, J. J. 1972. Differential permeability of the proximal and distal rabbit small bowel. *Journal of Clinical Investigation*, 51, 2414-2419.
- SÁNCHEZ-PULIDO, L., MARTÍN-BELMONTE, F., VALENCIA, A. & ALONSO, M. A. 2002. MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events. *Trends in Biochemical Sciences*, 27, 599-601.
- SANDERS, S. E., MADARA, J. L., MCGUIRK, D. K., GELMAN, D. S. & COLGAN, S. P. 1995. Assessment of inflammatory events in epithelial permeability: a rapid screening method using fluorescein dextrans. *Epithelial Cell Biol*, 4, 25-34.
- SAS, D., HU, M., MOE, O. W. & BAUM, M. 2008. Effect of claudins 6 and 9 on paracellular permeability in MDCK II cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295, R1713-9.
- SCHNEEBERGER, E. E. & LYNCH, R. D. 2004. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286, C1213-28.
- SCHULZKE, J. D., BENTZEL, C. J., SCHULZKE, I., RIECKEN, E. O. & FROMM, M. 1998. Epithelial tight junction structure in the jejunum of children with acute and treated celiac sprue. *Pediatr Res*, 43, 435-41.

## V. Literaturverzeichnis

- SCHULZKE, J. D., GITTER, A. H., MANKERTZ, J., SPIEGEL, S., SEIDLER, U., AMASHEH, S., SAITOU, M., TSUKITA, S. & FROMM, M. 2005. Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim Biophys Acta*, 1669, 34-42.
- SHIN, K., FOGG, V. C. & MARGOLIS, B. 2006. Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22, 207-35.
- SONODA, N., FURUSE, M., SASAKI, H., YONEMURA, S., KATAHIRA, J., HORIGUCHI, Y. & TSUKITA, S. 1999. Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol*, 147, 195-204.
- STAEHELIN, L. A. 1973. Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J Cell Sci*, 13, 763-86.
- STAEHELIN, L. A., MUKHERJEE, T. M. & WILLIAMS, A. W. 1969a. Fine structure of frozen-etched tight junctions. *Naturwissenschaften*, 56, 142.
- STAEHELIN, L. A., MUKHERJEE, T. M. & WILLIAMS, A. W. 1969b. Freeze-etch appearance of the tight junctions in the epithelium of small and large intestine of mice. *Protoplasma*, 67, 165-84.
- STEED, E., ELBEDIWY, A., VACCA, B., DUPASQUIER, S., HEMKEMEYER, S. A., SUDDASON, T., COSTA, A. C., BEAUDRY, J.-B., ZIHNI, C., GALLAGHER, E., PIERREUX, C. E., BALDA, M. S. & MATTER, K. 2014. MarvelD3 couples tight junctions to the MEK1–JNK pathway to regulate cell behavior and survival. *The Journal of Cell Biology*, 204, 821-838.
- STEED, E., RODRIGUES, N. T., BALDA, M. S. & MATTER, K. 2009. Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family. *BMC Cell Biol*, 10, 95.
- STEVENSON, B. R., SILICIANO, J. D., MOOSEKER, M. S. & GOODENOUGH, D. A. 1986. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol*, 103, 755-66.
- STIFFLER, M. A., CHEN, J. R., GRANTCHAROVA, V. P., LEI, Y., FUCHS, D., ALLEN, J. E., ZASLAVSKAIA, L. A. & MACBEATH, G. 2007. PDZ domain binding selectivity is optimized across the mouse proteome. *Science*, 317, 364-9.
- SUBRAMANYA, A. R. & ELLISON, D. H. 2014. Distal Convoluted Tubule. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 9, 2147-2163.
- SUZUKI, H., NISHIZAWA, T., TANI, K., YAMAZAKI, Y., TAMURA, A., ISHITANI, R., DOHMAE, N., TSUKITA, S., NUREKI, O. & FUJIYOSHI, Y. 2014. Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. *Science*, 344, 304-7.
- SUZUKI, H., TANI, K., TAMURA, A., TSUKITA, S. & FUJIYOSHI, Y. 2015. Model for the architecture of claudin-based paracellular ion channels through tight junctions. *J Mol Biol*, 427, 291-7.
- TAMURA, A., HAYASHI, H., IMASATO, M., YAMAZAKI, Y., HAGIWARA, A., WADA, M., NODA, T., WATANABE, M., SUZUKI, Y. & TSUKITA, S. 2011. Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na<sup>+</sup> deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine. *Gastroenterology*, 140, 913-23.
- TAMURA, A., KITANO, Y., HATA, M., KATSUNO, T., MORIWAKI, K., SASAKI, H., HAYASHI, H., SUZUKI, Y., NODA, T., FURUSE, M., TSUKITA, S. & TSUKITA, S. 2008. Megaintestine in claudin-15-deficient mice. *Gastroenterology*, 134, 523-34.
- TANG, V. W. & GOODENOUGH, D. A. 2003. Paracellular Ion Channel at the Tight Junction. *Biophys J*, 84, 1660-73.
- TEORELL, T. 1946. Application of "Square Wave Analysis" to Bioelectric Studies<sup>1</sup>. *Acta Physiologica Scandinavica*, 12, 235-254.
- USSING, H. H. 1949. The Distinction by Means of Tracers Between Active Transport and Diffusion. *Acta Physiologica Scandinavica*, 19, 43-56.
- VAN ITALLIE, C., RAHNER, C. & ANDERSON, J. M. 2001. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest*, 107, 1319-27.
- VAN ITALLIE, C. M. & ANDERSON, J. M. 2004. The molecular physiology of tight junction pores. *Physiology (Bethesda)*, 19, 331-8.
- VAN ITALLIE, C. M. & ANDERSON, J. M. 2014. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Semin Cell Dev Biol*, 36, 157-65.
- VAN ITALLIE, C. M., FANNING, A. S. & ANDERSON, J. M. 2003. Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *Am J Physiol Renal Physiol*, 285, F1078-84.
- VAN ITALLIE, C. M., FANNING, A. S., BRIDGES, A. & ANDERSON, J. M. 2009. ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton. *Mol Biol Cell*, 20, 3930-40.
- VAN ITALLIE, C. M., FANNING, A. S., HOLMES, J. & ANDERSON, J. M. 2010. Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers. *J Cell Sci*, 123, 2844-52.
- VAN ITALLIE, C. M., HOLMES, J., BRIDGES, A., GOOKIN, J. L., COCCARO, M. R., PROCTOR, W., COLEGIO, O. R. & ANDERSON, J. M. 2008. The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2. *J Cell Sci*, 121, 298-305.
- VAN ITALLIE, C. M., ROGAN, S., YU, A., VIDAL, L. S., HOLMES, J. & ANDERSON, J. M. 2006. Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities. *Am J Physiol Renal Physiol*, 291, F1288-99.
- VAN ITALLIE, C. M., TIETGENS, A. J., KRSTOFIAK, E., KACHAR, B. & ANDERSON, J. M. 2015. A complex of ZO-1 and the BAR-domain protein TOCA-1 regulates actin assembly at the tight junction. *Mol Biol Cell*, 26, 2769-87.
- WADE, J. B. & KARNOVSKY, M. J. 1974. The structure of the zonula occludens. A single fibril model based on freeze-fracture. *J Cell Biol*, 60, 168-80.

- WALKER, D. C., MACKENZIE, A. & HOSFORD, S. 1994. The structure of the tricellular region of endothelial tight junctions of pulmonary capillaries analyzed by freeze-fracture. *Microvasc Res*, 48, 259-81.
- WALKER, D. C., MACKENZIE, A., HULBERT, W. C. & HOGG, J. C. 1985. A re-assessment of the tricellular region of epithelial cell tight junctions in trachea of guinea pig. *Acta Anat (Basel)*, 122, 35-8.
- WATSON, C. J., ROWLAND, M. & WARHURST, G. 2001. Functional modeling of tight junctions in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers. *Am J Physiol Cell Physiol*, 281, C388-97.
- WEN, H., WATRY, D. D., MARCONDES, M. C. & FOX, H. S. 2004. Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: role of the first extracellular domain of claudin-5. *Mol Cell Biol*, 24, 8408-17.
- WESTPHAL, J. K., DÖRFEL, M. J., KRUG, S. M., CORDING, J. D., PIONTEK, J., BLASIG, I. E., TAUBER, R., FROMM, M. & HUBER, O. 2010. Tricellulin forms homomeric and heteromeric tight junctional complexes. *Cell Mol Life Sci*, 67, 2057-68.
- WINDHAGER, E., BOULPAEP, E. & GIEBISCH, G. 1967. Electrophysiological studies on single nephrons.
- WOLBURG, H., NEUHAUS, J., KNIESEL, U., KRAUSS, B., SCHMID, E. M., OCALAN, M., FARRELL, C. & RISAU, W. 1994. Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci*, 107 ( Pt 5), 1347-57.
- YEN, F. T., MASSON, M., CLOSSAIS-BESNARD, N., ANDRE, P., GROSSET, J. M., BOUGUELERET, L., DUMAS, J. B., GUERASSIMENKO, O. & BIHAIN, B. E. 1999. Molecular cloning of a lipolysis-stimulated remnant receptor expressed in the liver. *J Biol Chem*, 274, 13390-8.
- YU, A. S., CHENG, M. H., ANGELOW, S., GÜNZEL, D., KANZAWA, S. A., SCHNEEBERGER, E. E., FROMM, M. & COALSON, R. D. 2009. Molecular basis for cation selectivity in claudin-2-based paracellular pores: identification of an electrostatic interaction site. *J Gen Physiol*, 133, 111-27.
- YU, A. S., ENCK, A. H., LENCER, W. I. & SCHNEEBERGER, E. E. 2003. Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation. *J Biol Chem*, 278, 17350-9.
- YU, A. S., MCCARTHY, K. M., FRANCIS, S. A., MCCORMACK, J. M., LAI, J., ROGERS, R. A., LYNCH, R. D. & SCHNEEBERGER, E. E. 2005. Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 288, C1231-41.
- ZEISSIG, S., BÜRCEL, N., GÜNZEL, D., RICHTER, J., MANKERTZ, J., WAHNSCHAFFE, U., KROESEN, A. J., ZEITZ, M., FROMM, M. & SCHULZKE, J. D. 2007. 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*, 56, 61-72.

## VI. Danksagung

Als erstes möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Michael Fromm und Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke dafür bedanken, dass sie es mir ermöglichten meine Projekte, die zu dieser Arbeit und den weiteren Voraussetzungen für die Habilitation führten, am Institut für Klinische Physiologie / Bereich Ernährungsmedizin der Charité Berlin durchzuführen. Mein besonderer Dank gilt dabei Michael Fromm für sein herausragendes persönliches Engagement und seine immerwährende Unterstützung und Förderung, sowie für alle intensiven Diskussionen und Anregungen.

Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei allen, die zu den Ergebnissen meiner Publikationen beigetragen haben; ohne sie wäre keine davon in ihrer letztlichen Form möglich gewesen. Ich bedanke mich auch bei der DFG und der Sonnenfeld-Stiftung Berlin für die gewährten Förderungen, denn auch ohne diese wäre es nicht möglich gewesen, die geplanten Projekte durchzuführen.

Neben allen internationalen und nationalen Kooperationspartnern gilt mein Dank allen Mitgliedern des Instituts für Klinische Physiologie, wobei ich einige besonders hervorheben möchte:

Prof. Dr. Dorothee Günzel und Dr. Jörg Piontek möchte ich für ihre Unterstützung und anregende Diskussionen danken. In-Fah Lee gilt besonderer Dank für ihre engagierte Mitarbeit und unermüdliche Ausdauer vor allem am Gefrierbruchgerät und bei der Suche nach Tight Junctions am Elektronenmikroskop. Anja Fromm danke ich herzlich für ihre stete Unterstützung und ihre Mithilfe, wenn es mal wieder etwas später oder zu viel auf einmal wurde. Unserer Sekretärin Elisabeth Schultze danke ich für ihre hervorragende organisatorische Arbeit. Insgesamt möchte ich mich für die immer gute und freundschaftliche Atmosphäre im Institut bedanken, zu der jeder beigetragen hat.

Neben dem exzellenten wissenschaftlichen Umfeld gilt mein Dank aber auch meinem privaten Umfeld: Ich danke meinen Freunden und meinem Bruder Stefan dafür, dass sie immer hinter mir standen, und Alexander, der mich stets in meinem Vorankommen unterstützte, aber mir auch ein Ruhepol war – ohne ihn wäre meine Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Und nicht zuletzt danke ich ganz besonders meinen Eltern, die mich in jeglicher Hinsicht auf meinem Weg durch Schule, Studium und beruflicher Tätigkeit liebevoll und tatkräftig unterstützt und gefördert haben.

## VII. Erklärung

Erklärung nach § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....

Datum

.....

Unterschrift