

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

DISSERTATION

**Funktionelle Charakterisierung von Varianten  
des Tight Junction-Proteins Claudin-16**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Henrik Wurps**

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Fromm  
2. Prof. Dr. S. Bachmann  
3. Prof. Dr. M. Bleich

Datum der Promotion: 07.12.2007

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1	Claudine und Tight Junctions	5
1.2	Claudin-16 und seine Rolle im Magnesiumhaushalt	9
1.3	Claudin-16-Varianten	11
1.4	Klinik der familiären Hypomagnesämie mit Hypercalcurie und Nephrocalcinose (FHHNC)	12
1.5	Ziele der Dissertation	14
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1	MDCK-Zellen	16
2.1.1	Verwendete Zelllinien	16
2.1.2	Zellkultur	16
2.2	Geräte	17
2.3	Chemikalien	18
2.4	Materialien	20
2.5	Puffer und Lösungen	20
2.6	Molekularbiologie	22
2.6.1	Plasmidvektoren	23
2.6.2	Ligation	23
2.6.3	Stabile Transfektion von MDCK-C7-Zellen	24
2.6.4	Western Blot	27
	<i>Membranprotein-Extraktion</i>	27
	<i>Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)</i>	28
	<i>Elektrophoretischer Transfer</i>	29
	<i>Immundetektion</i>	30
2.7	Immunfluoreszenz	30
2.8	Elektrophysiologie	32
2.8.1	Widerstandsmessungen: Manuelle Methode	32
2.8.2	Widerstandsmessungen: Ussing-Kammern	33
2.8.3	Magnesium-Fluxexperimente an Ussing-Kammern	34
2.8.4	Dilutionspotentiale: Ussing-Kammern	36
2.8.5	Magnesiumkonzentrationsbestimmung durch	38

	Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)	
2.9	Statistik	39
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
3.1	Stabile Transfektion der MDCK-C7-Zellen mit cDNA von WT Claudin-16 und der Claudin-16-Varianten H71D, L75P, G128A, G121R, R146T und T233R	40
3.2	Western Blot	40
3.3	Immunfluoreszenz	41
3.4	Elektrophysiologische Versuchsreihen zur funktionellen Analyse	45
3.4.1	Magnesiumfluxmessungen	45
3.4.2	Widerstandsmessungen	47
3.4.3	Dilutionspotentiale	48
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>50</b>
4.1	Lokalisation und Expression von WT Claudin-16 und der Claudin-16-Varianten H71D, L75P, G128A, G121R, R146T und T233R in MDCK-C7-Zellen	50
4.2	Die Funktion von WT Claudin-16 im Vergleich zu der seiner Varianten H71D, L75P, G128A, A139T, R146T und T233R	51
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>54</b>
<b>6.</b>	<b>Abbildungen und Tabellen</b>	<b>55</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>56</b>
<b>8.</b>	<b>Vorpublikationen in Zusammenhang mit dem Dissertationsthema</b>	<b>66</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>67</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>68</b>

## 1. Einleitung

Transport- und Barrierefunktion der inneren und äußeren Oberflächen des Körpers sind Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Zusammensetzung der verschiedenen Körperflüssigkeiten. Eine Schlüsselrolle spielt in diesem Zusammenhang das Epithelgewebe. Dieses kleidet Oberflächen wie z.B. die Haut, Hohlorgane oder Körperhöhlen aus und bildet so Grenzbereiche des menschlichen Organismus. Mit Hilfe von Resorptions- und Sekretionsmechanismen steht es mit der Umgebung in Kontakt, reguliert so die Passage verschiedener Stoffe und trägt zur Erhaltung der physiologischen Körperhomöostase bei. Störungen dieses engmaschig geregelten Prozesses können sich auf den Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt des Körpers auswirken und zu pathologischen Zuständen führen.

Ein Beispiel für eine Krankheit dieser Art ist die autosomal rezessiv vererbte familiäre Hypomagnesämie mit Hypercalcurie und Nephrocalcinose (FHHNC). Diese ist durch fortschreitenden renalen Magnesium- und Calciumverlust sowie starken Magnesiummangel des Körpers gekennzeichnet. Ferner kommt es in den meisten Fällen zu verminderter Nierenfunktion mit progressiver, chronischer Niereninsuffizienz (Weber et al., 2001). FHHNC wird verursacht durch Mutationen im Claudin-16-Gen, welches im Epithelgewebe der Niere vorliegt und das Claudin-16-Protein (älterer Name: Paracellin-1) kodiert (Simon et al., 1999).

### 1.1 Claudine und Tight Junctions

Claudin-16 gehört zur Proteinfamilie der Claudine (Tsukita et al., 1998; Anderson et al., 2001), die gemeinsam mit Occludin in Tight junctions (Schlussleiste; *lat.: Zonula occludens*) lokalisiert sind (Furuse et al., 1993). Außerdem konnten zwei weitere Tight Junction-Proteinfamilien nachgewiesen werden: Die sogenannten JAMs (engl.: junctional adhesion molecule; Martin-Padura et al., 1998; Fukuhara et al., 2002) sowie Tricellulin, das vor allem in vertikalen Tight Junction-Strängen trizellulärer Zellkontakte lokalisiert ist. Tricellulin besitzt einen dem Occludin homologen C-Terminus und weist ebenfalls vier transmembranäre Domänen auf (Ikenouchi et al., 2005). Die Tight Junction ist charakteristisch für Epithelien und Endothelien und hält deren Barrierefunktion aufrecht, indem sie benachbarte Epithelzellen miteinander

verbindet. Die Veränderung eines Claudinproteins kann somit zu einem Defekt der Tight Junction und ihrer Funktion führen und so die Barrierefunktion vermindern bzw. die Aufrechterhaltung der Körperhomöostase stören.

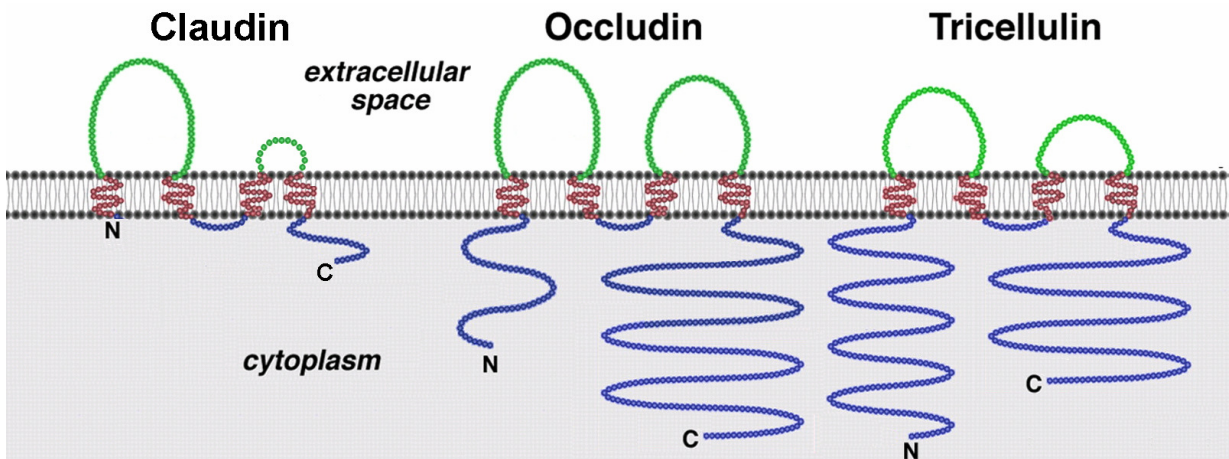


Abb.1: Schematische Abbildung der drei vierfach-transmembranären Tight Junction-Proteine Claudin, Occludin und Tricellulin (Ikenouchi et al., 2005; verändert).

Bis heute konnten 24 verschiedene Claudine nachgewiesen werden (Tsukita et al., 2001), die zum Teil schon unter anderen Namen beschrieben wurden, z.B. Claudin-3 als RVP-1 oder Claudin-4 als CPE-R (Morita et al., 1999). Claudine sind integrale Membranproteine und weisen durchschnittlich eine Molekularmasse von 22 kDa auf (Tsukita et al., 2000). Typischerweise besitzen sie vier transmembranäre Domänen mit zwei extrazellulären Schleifen sowie je einen Amino- und Carboxyterminus zur zytosolischen Seite. Sie weisen eine Sequenzhomologie zwischen 12.5 % und 69.7 % auf (Tsukita et al., 1999; Fanning et al., 1999; Tsukita et al., 2000). Die einzelnen Claudine sind jeweils organ- bzw. gewebespezifisch (Furuse et al., 1999), was als Grundlage für die verschiedenen Transport- und Barriereigenschaften der unterschiedlichen Organe bzw. Gewebe gesehen werden kann (Tsukita et al., 2000).

Durch ihre Lage in der Tight Junction und ihre Barriere- und Transportfunktion werden bestimmte Krankheiten mit einer verminderten Funktion von Claudinproteinen in Zusammenhang gesehen.

Eine Übersicht über das Vorkommen verschiedener Claudine, ihre Funktionen und die assoziierten Erkrankungen gibt Tabelle 1.

Tab.1: Vorkommen und Funktion verschiedener Claudine in der Übersicht

<b>Claudin</b>	<b>Vorkommen</b>	<b>Funktion/Erkrankung</b>
Claudin-1	<b>H</b> (Furuse et al., 1998; Morita et al., 1999 ; Coyne et al., 2003), <b>Pa, C, Pc, Pl, Pr, K, T</b> (Morita et al., 1999; Heiskala et al., 2001) sowie Endothel von <b>N (BK), L, Lu</b> (Kiushi-Saishin et al., 2002)	Barrierefunktion, Barrieredefekt im Knock-out-Versuch (Furuse et al., 2002); verändert im Glioblastoma multiforme (Liebner et al., 2000); fehlt im Mamma-Ca (Hoevel et al., 2002); Hochregulation im seropapillären Endometrium-Ca, Verminderung im endometrioiden Endometrium-Ca (Sobel et al., 2006)
Claudin-2	Epithel von <b>N (BK, pr.T, HS), D, Pa,</b> sowie <b>PC, Lu, L</b> (Morita et al., 1999; Heiskala et al., 2001) sowie Endothel des <b>G</b> (Enck et al., 2001 ; Rahner et al., 2001; Kiushi-Saishin et al., 2002)	Bildung von parazellulären, kationen-selektiven Kanälen (Amasheh et al., 2002); Hochregulation im endometrioiden Endometrium-Ca, Verminderung im seropapillären Endometrium-Ca (Sobel et al., 2006); Hochregulation im Sigmoid bei M.Crohn (Zeissig et al., 2006)
Claudin-3 (RVP-1)	Epithel von <b>L, Lu, Pa, N (HS, d.T, SR), C</b> (Rahner et al., 2001; Kiushi-Saishin et al., 2002; Coyne et al., 2003) sowie <b>D, T, Pr, U, H</b> (Heiskala et al., 2001; Tebbe et al., 2002)	Spezifische Bindung an Clostridium perfringens Enterotoxin (Sonada et al., 1999), Hochregulation in Ma- und Oe-Ca (Montgomery et al., 2006)
Claudin-4 (CPE-R)	<b>C, Lu, N (HS, SR), H,</b> (Rahner et al., 2001; Kiushi-Saishin et al., 2002) sowie <b>D, Pr, U, M</b> (Morita et al., 1999; Heiskala et al., 2001)	Hochregulation im Pa-Ca (Terris et al., 2002); Hochregulation im Ma-Ca (Soini et al., 2006); Verstärkung der Anionen-permeabilität (Van Itallie et al., 2001); Hochregulation in Ma- und Oe-Ca (Montgomery et al., 2006); Hochregulation und Verminderung in verschiedenen Formen des Blasen-Ca (Boireau et al., 2006)
Claudin-5 (TMVCF = Tm-Protein deleted in velo-cardio-facial syndrome)	<b>Lu, Pa, N (Nephronendothel), SM, H, L, C, K, E</b> (Morita et al., 1999; Heiskala et al., 2001; Kiushi-Saishin et al., 2002; Coyne et al., 2003; Amasheh et al., 2005) sowie Endothel von <b>BG</b> (Blut-Hirn-Schranke, Blut-Hoden-Schranke), Epithel und Endothel von <b>D</b> (Rahner et al., 2001; Hewitt et al., 2006)	Barrierefunktion (Blut-Hirn-Schranke fetales und adultes Hirn), Mikrodeletion 22q11 führt zu velo-kardio-faziale Syndrom (Sirotkin et al., 1997); Verminderung im Sigmoid bei M.Crohn (Zeissig et al., 2006)
Claudin-6	<b>F</b> (Heiskala et al., 2001), <b>H</b> (Turksen et al., 2001)	Fetales Claudin, Überexpression in neugeborenen Mäusen führt zur Störung der Hautbarriere (Turksen et al., 2002)
Claudin-7	<b>N (Aldosteron-sensitive NT ; Li et al., 2004), Hippocampus</b> (Lamas et al., 2002) sowie <b>Lu, O, Pr, C, T</b> (Morita et al., 1999; Heiskala et al., 2001; Van	Verminderung im HNO-Plattenepithel-Ca (Al-Moustafa et al., 2002); Verminderung parazellulärer Chlorid-Leitfähigkeit bei Erhöhung der Natrium-Leitfähigkeit

	Itallie et al., 2004)	(Alexandre et al., 2005); Hochregulation in Ma-Ca (Montgomery et al., 2006); vermindert im invasiven, metastasierenden, squamösen Oe-Ca (Usami et al., 2006)
Claudin-8	<b>N (HS, d.T, SR, Aldosteron-sensitive NT;</b> Kiushi-Saishin et al., 2002; Li et al., 2004) sowie <b>Lu, C, M</b> (Heiskala et al., 2001)	Verminderung der parazellulären Leitfähigkeit von Epithelien (Jeansomme et al., 2003; Yu et al., 2003); Verminderung im Sigmoid bei M.Crohn (Zeissig et al., 2006)
Claudin-9	<b>G, Tu</b> (Heiskala et al., 2001)	
Claudin-10 (OSPL 36)	<b>N (pr.T, HS;</b> Kiushi-Saishin et al., 2002) sowie <b>G, Tu</b> (Heiskala et al., 2001)	
Claudin-11 (OSP)	<b>ZNS</b> (Myelinscheiden, Oligodendrozyten; Heiskala et al., 2001), <b>N (NT;</b> Kiushi-Saishin et al., 2002), <b>T</b> (Sertoli-Zellen; Gow et al., 2000)	Knock-out-Versuch: defekte TJ in Sertoli- und Myelin-Zellen (Gow et al., 2000)
Claudin-12	<b>Harnblasenepitheldeckzellen</b> (Acharya et al., 2004) sowie <b>G, Pr, C, U</b> (Heiskala et al., 2001)	
Claudin-13	<b>Harnblasenepitheldeckzellen</b> (Acharya et al., 2004) sowie Endothel (Heiskala et al., 2001)	
Claudin-14	<b>Cochlea</b> im Innenohr (Schneeberger et al., 2004) sowie <b>L, N, K</b> (Heiskala et al., 2001; Tsukita et al., 2001)	Defekt verursacht Taubheit (Wilcox et al., 2001)
Claudin-15	<b>D</b> (Heiskala et al., 2001)	
Claudin-16 (Paracellin-1)	<b>N (aufsteigender dicker Teil der HS;</b> Kiushi-Saishin et al., 2002; Schneeberger et al., 2004) sowie <b>Tu</b> , (Heiskala et al., 2001)	Defekt führt zu FHHNC (Simon et al., 1999; Weber et al., 2001)
Claudin-17	<b>H</b> (Heiskala et al., 2001)	
Claudin-18	<b>Lu, Ma</b> (Heiskala et al., 2001; Niimi et al., 2001)	Möglichkeit der Funktion als Biomarker beim Ma-Ca (Hewitt et al., 2006)
Claudin-19	<b>N</b> (Luk et al., 2004; Lee et al., 2006)	Verminderung bei polyzystischer Nierenerkrankung (Lee et al., 2006)
Claudin-20	<b>D</b> (Heiskala et al., 2001)	
Claudin 21-24		

(BG=Blutgefäße, C=Colon, D=Darm, E=Embryo, F=Fetus, G=Gehirn, H=Haut, K=Kardia, L=Leber, Lu=Lunge, M=Mamma, Ma=Magen, N=Niere [BK=Bowman-Kapsel, pr.T=proximaler Tubulus, d.T=distaler Tubulus, HS=Henle Schleife, SR=Sammelrohr, NT=Nierentubuli], O=Ovar, Oe=Oesophagus, Pa=Pancreas, Pc=Plexus choroideus, Pl=Plazenta, Pr=Prostata, T=Testes, Tu=Tumoren, U=Uterus)



## 1.2 Claudin-16 und seine Rolle im Magnesiumhaushalt

Claudin-16 wird beim Menschen physiologischerweise in der Niere in den medullären und corticalen Anteilen des dicken aufsteigenden Teiles der Henle-Schleife und im proximalen Abschnitt des distalen Tubulus (Kiushi-Siashin et al., 2002) sowie in Tumoren exprimiert (Heiskala et al., 2001). Wie alle anderen Claudine auch besitzt es vier transmembranäre Domänen mit zwei extrazellulären Schleifen. 1999 beschrieben Simon et al. "Paracellin-1" als ein aus 305 Aminosäuren bestehendes Protein, das 10-18% Homologie mit anderen Claudinen aufweist und somit zu allen Claudinproteinen die geringste Ähnlichkeit besitzt. Kurz darauf wurde der in vivo existierende kürzere Proteintyp bestehend aus 235 Aminosäuren entdeckt (Abb. 2; Weber et al., 2001). Paracellin-1 wird inzwischen zumeist als Claudin-16 bezeichnet.

Beide Proteintypen haben gleiche Eigenschaften und einen analogen Aufbau: Eine NH<sub>2</sub>-Gruppe liegt frei im Cytosol und bildet den Anfang des Proteins. Die erste extrazelluläre Schleife ist durch mehrere negative Ladungen, hervorgerufen durch Carboxylgruppen (-COOH) der Aminosäuren, gekennzeichnet. Das cytosolische COOH-Ende mit der Kombination Thr-X-Val als PDZ-bindender Domäne (Songyang et al., 1997) bindet spezifisch an ZO-1, welches die Verbindung zum Aktin-Cytoskelett darstellt und somit die Position von Claudin-16 in der Tight Junction bestimmt (Turksen et al., 2004).

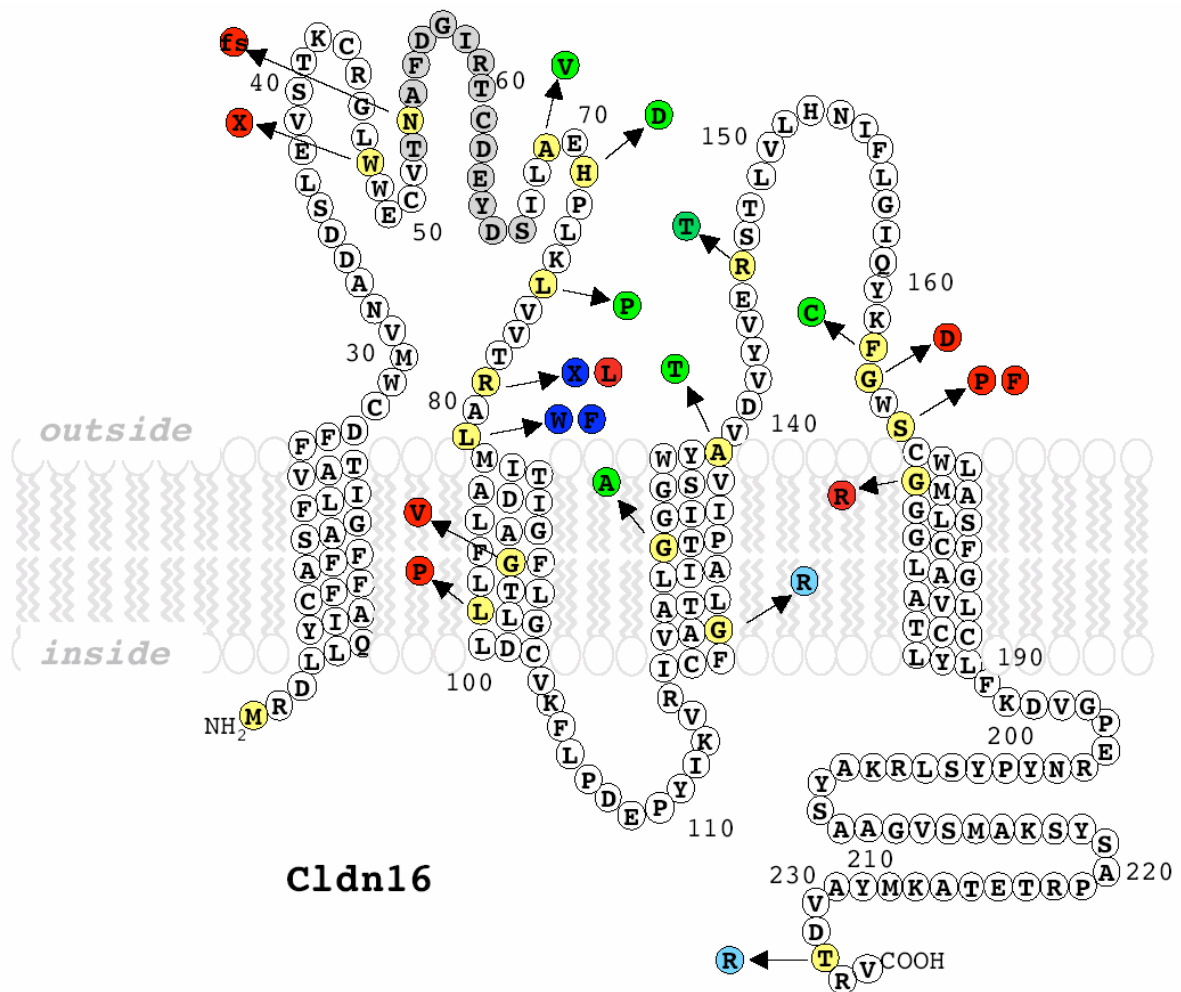


Abb.2: 235 Aminosäuren (AS) langes Claudin-16-Molekül in der Zellmembran mit den FHHNC-assozierten Mutationen (Aminosäuresequenz im 1-Buchstaben-Code, Mutationen in gelb mit Pfeil zur Beschreibung der Punktmutation); Effekt der Mutation in verschiedenen Farben: grün – Zelloberfläche; rot – endoplasmatisches Retikulum; dunkelblau – Golgi Apparat; hellblau – Lysosomen. X – Stopcodon, fs – frame shift, T52 - S66 (grau unterlegt) zur Generierung des Anti-Loop-Antikörpers (Kausalya/Amasheh et al., 2006).

Funktionell steht Claudin-16 in Zusammenhang mit der renalen parazellulären Resorption von Calcium und Magnesium. Es wird angenommen, dass mit Hilfe von Claudin-16 parazelluläre Kanäle entstehen, über welche, angetrieben durch einen elektrochemischen Gradienten, Magnesium und Calcium resorbiert werden (Simon et al., 1999), wobei auch die negative Ladung der ersten transmembranalen Domäne für die Kationenselektivität eine wichtige Rolle spielt.

In der Niere wird Magnesium in den Glomeruli frei filtriert. Im Regelfall werden im Laufe des Nephrons 95-97% der insgesamt filtrierten Magnesiummenge resorbiert, 3-5% werden mit dem Urin ausgeschieden. 15-25% der Resorption erfolgen im proximalen Tubulus, etwa 70% in der Henle-Schleife (hier vor allem im corticalen, dicken, aufsteigenden Ast) und 5-10% im distalen Tubulus (Konrad et al., 2004). Hier kommt es auch zur Regulation der Magnesium Feineinstellung. Während in den ersten beiden genannten Abschnitten die Resorption parazellulär und passiv mit einem elektrochemischen Gradienten als Antrieb erfolgt, ist die Resorption im distalen Konvolut transzellulär und aktiv (Konrad et al., 2004).

Da der größte Teil der Magnesiumresorption im corticalen, dicken, aufsteigenden Ast der Henle-Schleife parazellulär und somit abhängig von der interzellulären Struktur erfolgt, kommt Claudin-16, das wie oben beschrieben gerade in diesem Bereich exprimiert wird, eine Schlüsselrolle in diesem Prozess zu (Simon et al., 1999). Veränderungen des Claudin-16-Proteins können sich somit nicht nur auf die lokale Magnesiumresorption, sondern auch auf die Magnesiumserumkonzentration, den Magnesiumhaushalt und die Magnesiumhomöostase des Körpers auswirken.

### **1.3 Claudin-16-Varianten**

Bis heute sind 30 verschiedene Claudin-16-Varianten beschrieben, die mit der autosomal rezessiv vererbten familiären Hypomagnesämie mit Hypercalcurie und Nephrocalcinose (FHHNC) assoziiert sind (Simon et al., 1999; Weber et al., 2000; Blanchard et al., 2001; Weber et al., 2001; Wolf et al., 2002; Müller et al., 2003; Tajima et al., 2003; Kang et al., 2005; Müller et al., 2006, a; Müller et al., 2006, b). Mit einer Ausnahme (Müller et al., 2003) liegen die Mutationen dieser Varianten alle im transmembranären oder extrazellulären Bereich des Moleküls. Es ist aufgrund unterschiedlicher Eigenschaften der Varianten möglich, diese in zwei Kategorien einzuteilen: Claudin-16-Moleküle mit Mutationen der ersten Gruppe erfahren aufgrund ihres veränderten Aufbaus durch fehlerhafte Reaktionen einen pathologischen intrazellulären Transport. Sie erreichen deswegen die Zellmembran nicht, sondern akkumulieren in verschiedenen Kompartimenten der Zelle (z.B. im endoplasmatischen Retikulum, in den Lysosomen oder im Golgi-Apparat) und liegen dementsprechend nicht am Ort ihrer Wirkung vor.

Die zweite Gruppe besteht aus Varianten, die zwar in die Tight Junction transportiert werden, dort aber wegen einer einzelnen Punktmutation die Magnesiumpermeabilität beeinflussen (Kausalya/Amasheh et al., 2006).

#### **1.4 Klinik der familiären Hypomagnesämie mit Hypercalcurie und Nephrocalcinose (FHHNC)**

FHHNC wurde erstmals 1972 unter dem Namen Michelis-Castrillo-Syndrom beschrieben (Michelis et al., 1972). Seitdem wurde FHHNC bei Patienten aus mindestens 50 verschiedenen, genetisch unabhängigen Gruppen beobachtet (Manz et al., 1978; Nicholson et al., 1995; Simon et al., 1999; Benigno et al., 2000; Gregoric et al., 2000; Weber et al., 2000).

Bei Patienten, die unter hereditärer FHHNC leiden, kommt es zu Veränderungen der Körperhomöostase, die durch den Magnesiummangel bzw. die Hypercalcurie bedingt sind. Typische Veränderungen der Laborparameter bei FHHNC sind:

- Hypomagnesämie
- Hyperparathormonämie
- Hypocitratämie
- Hyperurikämie
- Azidose (distal renal-tubulär)
- Hypercalcurie
- abakterielle Leukozyturie

Als Folge des veränderten Magnesiumhaushaltes kann es zu typischer körperlicher Symptomatik kommen, wobei der Ausprägungsgrad sehr stark variieren kann (Wolf et al., 2002):

- (rezidivierende) Harnwegsinfekte
- Polyurie/Polydipsie
- Hämaturie
- zerebrale Krampfanfälle
- Abdominalschmerz

- Erbrechen, Appetitlosigkeit; bei Säuglingen: Fütterungsproblematik
- muskuläre Tetanie
- Enuresis
- verminderte GFR zum Diagnosezeitpunkt
- Iso-/Hypostenurie
- arterieller Hypertonus
- Parästhesien

(Symptomatik und Laborparameter nach Manz et al., 1978; Rodriguez-Soriano et al., 1987 und 1994; Benigno et al., 2000 ; Weber et al., 2001; Wolf et al., 2002 ; Müller et al., 2003; Tasic et al., 2005)

In der Niere selbst kommt es zu Nephrocalcinose und Nephrolithiasis mit entsprechender, oben beschriebener Symptomatik. Extrarenale, häufig beschriebene Symptome sind okulären Ursprungs wie z.B. Myopie, Nystagmus, Chorioretinitis (Rodriguez-Soriano et al., 1987 und 1994; Nicholson et al., 1995; Praga et al., 1995; Wolf et al., 2002). Seltener wurde vermindertes Hörvermögen beschrieben (Benigno et al., 2000).

Die Folge ist in der Regel eine chronisch-progressive, zum Teil schon in der Kindheit auftretende Niereninsuffizienz, die mit Dialysepflicht oder Indikation zur Nierentransplantation einhergeht. Dies unterscheidet FHHNC auch von anderen hereditären Erkrankungen, die differentialdiagnostisch abgegrenzt werden müssen. Die primäre Hypomagnesämie, von der eine rezessive und eine dominante Form beschrieben wurden (Geven et al., 1987, a und b), führt in der Regel nicht zu Nephrocalcinose, Nephrolithiasis oder chronischer Niereninsuffizienz. Das Gitelman-Syndrom (Gitelman et al., 1966) führt typischerweise neben Hypomagnesämie zu Hypocalcämie, Hypokaliämie und metabolischer Alkalose (Bettinelli et al., 1992). Auch hier kommt es seltener bzw. später zur chronischen Niereninsuffizienz.

Die oben beschriebene Einteilung nach der zellulären Lokalisation der Mutanten kann klinisch nicht beobachtet werden, d.h. anhand ihrer Symptomatik sind Patienten beider Gruppen nicht zu unterscheiden.

Noch ist die einzige Therapiemöglichkeit der FHHNC rein auf die Symptome beschränkt. Ein Teil der aktuellen Therapie ist die vermehrte orale Zufuhr von Magnesium zum Ausgleich des Magnesiummangels sowie die Gabe des Diuretikums Hydrochlorothiazid, das die Hypercalcurie vermindert (Tasic et al., 2005; Zimmermann et al., 2006). Experimentell werden weitere therapeutische Ansätze verfolgt. Um den mangelnden Einbau bestimmter Claudin-16-Varianten in die Zellmembran zu vermeiden, wird beispielsweise eine Behandlung mit medikamentösen Endozytose-Hemmern für spezifische FHHNC-Patienten in Erwägung gezogen (Müller et al., 2006, b).

Zwischen dem 20. und dem 40. Lebensjahr kommt es bei fast allen FHHNC-Patienten zur chronischen Niereninsuffizienz mit Notwendigkeit von Dialyse und Nierentransplantation. Auch die aktuelle (symptomatische) Behandlung kann die Progression der Nierenerkrankung nur hinauszögern, nicht jedoch vermeiden (Weber et al., 2001). Dementsprechend sind die therapeutischen Möglichkeiten der FHHNC noch sehr begrenzt, wenn auch wie oben beschrieben neue Aussichten existieren. Deswegen ist es wünschenswert, mehr über Ursachen, Varianten und Therapiewege dieser Krankheit zu erfahren.

## **1.5 Ziele der Dissertation**

Das Ziel dieser Arbeit war es, weitere Erkenntnisse über den Wildtyp des Claudin-16-Proteins (WT Claudin-16) und einige seiner Varianten zu gewinnen. Es wurden WT Claudin-16 sowie die Mutationen H71D, L75P, G128A und R146T als Vertreter der Gruppe von Varianten, die sich nach aktuellen Erkenntnissen in der Zellmembran anreichern, sowie G121R und T233R als Vertreter der Variantengruppe, die die Zellmembran nicht erreichen, funktionell analysiert. Folgende Versuchsreihen wurden durchgeführt, um neue Erkenntnisse über entsprechende Fragestellungen zu gewinnen:

1. Darstellung der Lokalisation von WT Claudin-16 und der genannten Varianten in transfizierten Zellen und Kontrollzellen.

Methoden: stabile Transfektion, Western Blot, Immunfluoreszenzfärbung und Laser-Konfokalmikroskopie.

2. Funktionelle Charakterisierung von WT Claudin-16 und der genannten Varianten im Hinblick auf die Magnesiumpermeabilität und den Einfluss des Dilutionspotentials.

Methoden: Magnesium-Flux-Messung in der Ussing-Kammer mit anschließender Magnesium-Konzentrationsbestimmung am Atomabsorptionsspektrometer sowie Messung der Dilutionspotentiale in der Ussing-Kammer.

3. Auswirkung einer verstärkten Expression in der Zellmembran der beiden Varianten G121R und T233R auf die Funktionalität.

Methode: Pharmakologische Behandlung der Varianten zur Verstärkung der Zellmembranexpression mit anschließender Durchführung oben genannter elektrophysiologischer Versuchsreihen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 MDCK-Zellen**

In den Versuchsreihen der vorliegenden Arbeit wurde die Zelllinie MDCK-C7 (Madin-Darby Canine Kidney) verwendet und wie nachfolgend beschrieben kultiviert.

#### **2.1.1 Verwendete Zelllinien**

Ursprünglich stammt die oben genannte Zelllinie, die erstmals durch Madin und Darby 1958 isoliert wurde (Madin et al., 1958), aus dem Sammelrohr der weiblichen Hundeniere. Vorteil dieser Zellen ist, dass sie sich sehr gut in Nährmedien kultivieren lassen, weshalb sie immer wieder für Versuchsreihen verwendet werden können. Zusätzlich bilden die MDCK-Zellen eine Art Barriere vergleichbar mit der epithelialer Zellen, da sie in einem Zellverband heranwachsen (Meza et al., 1980; Gonzalez-Mariscal et al., 1985).

C7 beschreibt eine spezifische, genetische Untergruppe der MDCK-Zellen mit typischen morphologischen und funktionellen Eigenschaften (Gekle et al., 1994). Sie zeigen große Ähnlichkeit mit den Hauptzellen des Sammelrohres und haben einen relativ hohen transepithelialen Widerstand ( $R^t$ ) von mehr als  $1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Die Zellen wachsen relativ schnell, weshalb sie sich gut für Transfektionsexperimente eignen. Mit Hilfe von elektrischen Widerstandsmessungen und Fluxexperimenten an den heranwachsenden Monolayern (Einzelzellschichten) kann die Barrierefunktion der Tight Junction vor und nach der Transfektion detektiert werden.

Die MDCK-C7-Zellklone dieser Arbeit stammten von der Arbeitsgruppe Prof. Oberleithner, Institut für Physiologie der Universität Münster.

#### **2.1.2 Zellkultur**

In 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen wurden die Zellen in Dulbecco's Minimum Essential Medium (MEM) unter Zugabe von 10% fötalem Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin und 100 mg/l Streptomycin bei 37°C und einem 95:5-Gemisch aus



Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid in einem Begasungsbrutschrank kultiviert. Etwa alle 10 Tage wurden die Zellen passagiert, dreimal wöchentlich wurde das Medium gewechselt. Verwendet wurden Zellen der sechzigsten bis achtzigsten Passage.

Mittels 0,05% Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen von den Kulturflaschen abgelöst und anschließend auf 0,6 cm<sup>2</sup> Kunststoff-Filter (Millicell-HA 10 mm) ausgesät. Nach ca. 72 Stunden konnte lichtmikroskopisch ein einschichtiger konfluenter Zellrasen (Monolayer) der MDCK-Zellen beobachtet werden.

## 2.2 Geräte

Agarosegel-Elektrophorese Kammern	Biorad, München
Begasungsbrutschrank, B5060 EC/CO <sub>2</sub>	Heraeus, Hanau
RNA/DNA Calculator Gene Quant II	Pharmacia Biotech, Freiburg
GeneAmp PCR System 2400	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Heizblock	Grant, Berlin
Hybridisierungsöfen Model12/24	Unitherm, Karlsruhe
Inkubator 1000, Uni max 1010	Heidolph, Kelheim
Konfokalmikroskop LSM510	Zeiss, Jena
Lumineszenzbild Analysator (LAS 1000)	Fuji, Düsseldorf
Magnetrührer	Ika-Combimag, München
Mini-Protean 3 Elektrophoresesystem	Biorad, München
Mini Trans-Blot Transfer-Zelle	Biorad, München
pH-Meter, Typ 761	Nick, Berlin
Plattenlesegerät Spectra Classic	Tecan, Crailsheim
Power Pac 300	Biorad, München
Speed Vac	Uniequip, Martinsried
Sequenziergerät: AbiPrism Model 310	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Schnittstelleneinheit, Mod. 1250, 1286	Solartron
	Schlumberger, Farnborough, UK
Thermostat 5320	Eppendorf, Köln
Transilluminator Quickstore	MS Laborgeräte, Heidelberg
Tri-Carb2100TR Szintillationszähler	Packard, Meridan, CT, USA
Ussing-Kammer	Institut für Klinische Physiologie, CBF, Charité Berlin
UV-Crosslinker	Pharmacia Biotech, Freiburg
Vortexgerät	Pharmacia Biotech, Freiburg

Wasserbad SW 21/TWB 5  
Widerstandsmessgerät

Wippe  
Zentrifugen

Julabo, Selbach  
Institut für Klinische Physiologie, CBF,  
Charité Berlin  
Fröbel Labor Technik, Lindau  
Hermle Z233MK, Wehingen  
Eppendorf 5414C, Köln  
Beckman Ti 70.1 Avanti J25,  
Unterschleisheim Lohhof

## 2.3 Chemikalien

Acrylamid  
Advantage 2 Polymerase Mix  
Ag/AgCl-Bezugselektroden  
Agarose  
Alexa Fluor Antikörper  
Ammoniumpersulfat (APS)  
Ampicillin  
Anti-Claudin-AK (Rabbit) / Anti-Occludin-AK (Mouse)  
Bacto Agar  
BCA Protein Assay Reagenz A+B  
BigDye Terminator Sequencing Kit  
Bromphenolblau (Laemmli)  
  
BSA (100 x)  
Caleidoscope Marker  
dATP,dTTP, dCTP,dGTP  
Dulbecco's Minimum Essential Medium (MEM)  
EDTA 0,5 M  
EGTA 0,5 M, 1mM  
Ethidiumbromid  
Ethanol  
FKS  
Flüssigstickstoff  
Formaldehyd  
Formaldehyd Gel Puffer  
Glycerol  
Glycin  
High Pure Kit  
HotStar Taq DNA-Polymerase Kit

Serva, Heidelberg  
Clontech, Heidelberg  
Ingold, Steinbach  
Life Technologies, Karlsruhe  
MoBiTec, Göttingen  
Sigma, Taufkirchen  
Ratiopharm, Ulm  
Zymed, San Francisco, CA, USA  
Difco, Heidelberg  
Pierce, Rockford, Illinois  
PE Applied Biosystems, Weiterstadt  
Amersham Pharmacia Biotech,  
Braunschweig  
BioLabs, Frankfurt am Main  
Sigma, Taufkirchen  
PE Applied Biosystems, Weiterstadt  
Biochrom, Berlin  
Serva, Heidelberg  
Serva, Heidelberg  
Life Technologies, Karlsruhe  
J.T. Backer, Deventer, Niederlande  
Biochrom, Berlin  
Linde, Berlin  
Sigma, Taufkirchen  
Eppendorf, Köln  
Serva, Heidelberg  
Serva, Heidelberg  
Roche, Mannheim  
Qiagen, Hilden

IPTG	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	J.T. Backer, Deventer, Niederlande
LB-Medium Tabletten	Bio 101, Vista, Kalifornien
Lipofectamine Plus Transfektionskit	Life Technologies, Karlsruhe
Lumi-Light Western-Blotting Kit	Roche, Mannheim
Magnesiumchlorid	Merck, Berlin
Methanol	Merck, Berlin
Molekulargewicht Standard $\lambda$ HinDIII	Life Technologies, Karlsruhe
Molekulargewicht Standard 100 bp	Life Technologies, Karlsruhe
0,24-9,5 kb RNA-Marker	Life Technologies, Karlsruhe
Natriumacetat, -Fluorid	Merck, Berlin
Natriumchlorid	Serva, Heidelberg
Natriumorthovanadat	Sigma, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Merck, Berlin
PBS-Tabletten	Life Technologies, Karlsruhe
Plusreagenz	Life Technologies, Karlsruhe
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIA Quick Gelextraktionskit 50	Qiagen, Hilden
Quick Prep Micro mRNA Purification Kit	Amersham Biotech, Braunschweig
Random-Primer DNA Labeling System	Life Technologies, Karlsruhe
Restriktionendonukleasen	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
RNAzol B	WAK-Chemie, Bad Soden
SBTI	Sigma, Taufkirchen
SDS	Merck, Berlin
SOC	Clontech, Heidelberg
SSC 20 X	Life Technologies, Karlsruhe
TEMED	Life Technologies, Karlsruhe
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Groningen, Holland
TAE 50 X	Life Technologies, Karlsruhe
T4 DNA Ligase	Biolabs, Frankfurt am Main
Tris	Merck, Berlin
Tris Base	Calbiochem, Bad Soden
Tris-HCL 1,5M, pH8,8 / 0,5M, pH 6,8	Biorad, München
Tris-HCL 1M, pH 7,4	Life Technologies, Karlsruhe
Triton X 100	Roche, Mannheim
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
TSR Sequenzierungsreagenz	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Vektor (pFLAG-CMV-4)	Sigma Aldrich, St. Louis, Mo., USA
Vektor (pCDNA 3)	Invitrogen, Groningen, Holland

Vektor (pCR2.1TOPO)  
Wasser

Promega, Madison, Wis., USA  
Fluka, Seelze

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

## 2.4 Materialien

Centriflex-Säulchen	Mobitec, Göttingen
Gel-Blotting-Paper	Schleicher und Schuell, Dassel
10 ml PPN-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
50 ml PPN-Röhrchen	Nunc, Karlsruhe
Kryo-Röhrchen	Brand, Wertheim
Kunststoff-Filter	MilliporeCorp., MA, USA
Magnetührstäbchen	Merck, Berlin
Nylon Membran	Roche, Mannheim
Objektträger	Menzel, Braunschweig
Pipetten	Eppendorf, Köln
Poly Screen PVDF-Transfer Membran	NEN, Köln
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Plastibrand, Wertheim
Reaktionsröhrchen(PCR) 0,2 ml	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Röntgenfilm X-OMAT AR/LS	Kodak, Rochester, NY
Sequenzierungsröhrchen mit Septum	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Standardtips 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Köln
Zellkulturflaschen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellschaber	Costar, Corning, NY

## 2.5 Puffer und Lösungen

Membran-Lysepuffer:	2 ml	Tris HCl, pH 7,4
	500 µl	1M MgCl <sub>2</sub>
	200 µl	0,5 M EDTA
	120 µl	0,5 M EGTA
		Aqua bidest ad 100 ml
Zusätzlich ergänzen für frischen Lysepuffer (je 5 ml):	5 µl	1000 x SBTI
	100 µl	50 x PPI
	50 µl	100 x PIC

	5 µl	Aprotinin
Elektrophoresepuffer:	100 ml	10 x Puffer West
	10 ml	10% (w/v) SDS
		Aqua bidest ad 1l
Transferpuffer:	100 ml	10 x Puffer West
	100 ml	Methanol
		Aqua bidest ad 1l
PBS/Tween:	2 Stück	PBS-Tabletten
	1 ml	Tween
		Aqua bidest ad 1l
PBS/Tween / 5% Magermilchpulver:	5 g	Magermilchpulver
		PBS/Tween ad 100 ml
BSA-Blockierungslösung:	5 % (w/v)	BSA
	0,02 % (w/v)	Natriumazid
		in PBS/Tween
Pierce BCA (je Probe)	196 µl	Protein Assay Reagenz A
	4 µl	Protein Assay Reagenz B
0.5% Triton-X100	1.5 ml	Triton-X
	300 ml	PBS
5% Goat-Blockierungslösung	1.5 ml	Goat Serum
	30 ml	PBS
0.4 M Sukrose-Lösung	400 mM	Sukrose
		MEM ad 1l
4-PBA-Lösung	5 mM	4-Phenylbutyrat
		Aqua bidest. ad 1l
Standard Ringer-Lösung	21 mM	NaHCO <sub>3</sub>
	119 mM	NaCl
	5.4 mM	KCl
	1 mM	MgSO <sub>4</sub>
	1.2 mM	CaCl <sub>2</sub>
	3 mM	HEPES
	10 mM	Glukose
		Aqua bidest. ad 1l
nominell Mg <sup>2+</sup> -freie Ringerlösung	21 mM	NaHCO <sub>3</sub>
	119 mM	NaCl
	5.4 mM	KCl
	1.2 mM	CaCl <sub>2</sub>
	3 mM	HEPES
	10 mM	Glukose
		Aqua bidest. ad 1l

Mg <sup>2+</sup> -freie, glucosefreie Ringerlösung	21 mM	NaHCO <sub>3</sub>
	119 mM	NaCl
	5.4 mM	KCl
	1.2 mM	CaCl <sub>2</sub>
	3 mM	HEPES
		Aqua bidest. ad 1l
modifizierte Ringer-Lösung	21 mM	NaHCO <sub>3</sub>
	238 mM	Mannitol
	5.4 mM	KCl
	1 mM	MgSO <sub>4</sub>
	1.2 mM	CaCl <sub>2</sub>
	3 mM	HEPES
	10 mM	Glukose
	Aqua bidest. ad 1l	
EDTA-Lösung	10 mM	EDTA
		Aqua bidest. ad 1l
Magnesiumsulfatlösung	100 mM	MgSO <sub>4</sub>
		Aqua bidest. ad 100 ml
20% La <sub>2</sub> O <sub>3</sub> in 32% HCl	61 mM	La <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
	1 M	HCl
		Aqua bidest. ad 100 ml

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

## 2.6 Molekularbiologie

In der vorliegenden Arbeit wurden MDCK-C7-Zellen mit der cDNA von WT Claudin-16 sowie seiner Varianten H71D, L75P, G121R, G128A, R146T und T233R stabil transfiziert. Entsprechende Plasmidvektoren wurden von der Arbeitsgruppe Dr. Walter Hunziker des Epithelial Cell Biology Laboratory, Institute of Molecular and Cell Biology, Singapur, zur Verfügung gestellt. Umgekehrt wurden der Arbeitsgruppe Dr. Hunziker MDCK-C7-Zellen bereitgestellt.

### **2.6.1 Plasmidvektoren**

Plasmidvektoren sind ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, welche in Bakterienzellen repliziert werden können. Viele Plasmide enthalten Antibiotika-Resistenz-Gene. Dies gewährleistet eine Selektion transfizierter gegenüber nicht transfizierter Zellen.

Die Plasmidvektoren wurden in dieser Arbeit verwendet, um DNA-Fragmente zu klonieren. Hierbei wurden die Klonierungsvektoren mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen so geschnitten, dass eine linearisierte Plasmid-DNA entstand. Diese wurde mit dem zu vermehrenden DNA-Abschnitt fusioniert (ligiert).

### **2.6.2 Ligation**

Unter Ligation versteht man die enzymatisch-katalysierte Verknüpfung zweier zu verbindender DNA-Enden. Hierbei kommt das Enzym T<sub>4</sub>-DNA-Ligase zum Einsatz, das für die Katalyse der Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-OH-Enden der linearen DNA-Abschnitte zuständig ist.

In dieser Arbeit wurde der Plasmidvektor pcDNA3 verwendet, um durch Ligation neue, rekombinante DNA-Moleküle herzustellen. Dieser sowohl für stabile als auch transiente Transfektion geeignete Vektor ist 5.4 kb lang. Der Vektor und die cDNA von WT-Claudin-16 wurden jeweils in einem Verhältnis von 1:1 mit 1 µl T<sub>4</sub>-DNA-Ligase und Ligasepuffer in ein Eppendorf-Röhrchen gegeben. Es wurde mit sterilem Wasser auf ein Endvolumen von 10 µl aufgefüllt und nach Ligation bis zur Transformation von E. coli (Stamm Top-10F) gelagert. Weitere, bereits in pcDNA3 ligierte Varianten der Claudin-16-Sequenzen H71D, L75P, G128A, A139T, R146T und T233R wurden von der Arbeitsgruppe Dr. Walter Hunziker des Epithelial Cell Biology Laboratory, Institute of Molecular and Cell Biology, Singapur, zur Verfügung gestellt.

Auf dem Vektorplasmid lag ein Aminoglycosid-Phosphotransferase-II-Gen vor. Die Aufgabe dieser Gensequenz lag in der Kodierung einer Resistenz gegen Aminoglycoside wie z.B. Geneticin (G418). Somit fand nach Transfektion eine

Selektion statt. Durch ein im Nährmedium vorhandenes Antibiotikum (G418) starben alle Zellen ab, die nicht transfiziert worden waren. Zellen, die erfolgreich ein Plasmid aufgenommen und somit eine Resistenz erworben hatten, überlebten.

### **2.6.3 Stabile Transfektion von MDCK-C7-Zellen**

Als Transfektion bezeichnet man das Einschleusen von nicht zelleigener DNA in eine eukaryote Zelle mit anschließender Integration dieser in das Erbgut der Zelle. Es existieren verschiedene Methoden der Transfektion wie z.B. Mikroinjektion, Calciumphosphat-Präzipitation, Elektroporation, Liposomen, DEAE-Dextran und virale Transfektionssysteme sowie die Lipofektion, welche in dieser Arbeit angewendet wurde.

Lipofectamine bestehen aus kleinen Lipidpartikeln (Liposomen) und können durch eine spezifische Ultraschallbehandlung aus Lipidmischungen hergestellt werden. Diese Liposomen nehmen fremde DNA auf, fusionieren mit der Zellmembran der Zielzelle und transportieren so die DNA in die neue Zelle hinein. In der Zelle erfolgt die Transkription der DNA zu mRNA, anschließend findet die Translation per Proteinbiosynthese zu einem Protein statt. Die neu exprimierten Proteine können dann über bestimmte Methoden (z.B. Immunfärbungen oder Western Blot) nachgewiesen werden.

Es existiert eine große Anzahl verfügbarer Expressionsvektoren für die Proteinexpression in eukaryontischen Zellen. Die zu translatierende DNA wird vor der Transfektion in diese hinein ligiert. Danach vermehren die sogenannten Shuttlevektoren zuerst die plasmidale DNA der Bakterien und produzieren danach das Protein in der eukaryontischen Zelle. Viele Vektoren haben am Übergang von Vektor zu plasmidaler DNA eine vorher bekannte Aminosäuresequenz, welche mit der plasmidalen DNA fusioniert. Auf diese Weise fällt der Nachweis des zu exprimierenden Proteins leichter.

In dieser Arbeit wurden Transfektionen sowohl mit Expressionsplasmid-DNA von WT Claudin-16 als auch mit der Varianten H71D, L75P, G121R, G128A, R146T und T233R durchgeführt. Folgende Ansätze wurden zusätzlich in den Versuchsablauf



integriert: Erstens wurde die MDCK-C7 Zelllinie mit einem leeren Vektor ohne Insert als positive Kontrolle transfiziert. Zweitens wurde die Zelllinie ohne jegliche Transfektion in den Versuchsablauf integriert. Diese beiden weiteren Ansätze dienen der Kontrolle und Analyse hinsichtlich bestimmter durch den Transfektionsprozess bedingter Veränderungen der Zellen.

<i>Verwendetes Plasmid</i>	<i>Erklärung</i>
pcDNA-CLDN-16	pcDNA3 mit WT Claudin-16-Insert
pcDNA-H71D	pcDNA3 mit H71D-Insert
pcDNA-L75P	pcDNA3 mit L75P-Insert
pcDNA-R146T	pcDNA3 mit R146T-Insert
pcDNA-A139T	pcDNA3 mit A139T-Insert
pcDNA-G128A	pcDNA3 mit G128A-Insert
pcDNA-T233R	pcDNA3 mit T233R-Insert
pcDNA3	leerer pcDNA-Vektor ohne Insert zur Kontrolle

Die Transfektion selbst fand in Chamber-Slides statt, die 24 Stunden zuvor mit je  $5 \times 10^5$ -MDCK-C7-Zellen pro Slide ausgesät wurden.

Für die Transfektionen mit Expressionsplasmid-DNA wurde folgendermaßen vorgegangen:

Ansatz 1: Je 2 µg Expressionsplasmid-DNA wurden mit 12 µl Plusreagenz und 200 µl MEM (ohne FKS, ohne Antibiotika) gemischt.

Ansatz 2: Pro Plasmidansatz wurden 200 µl MEM (ohne FKS, ohne Antibiotika) und 8 µl Lipofectamine gemischt.

Für Transfektion mit leerem Vektor galten folgende Ansätze:

Ansatz 1: Je 1 µg Vektorplasmid wurden mit 12 µl Plusreagenz und 200 µl MEM (ohne FKS, ohne Antibiotika) gemischt

Ansatz 2: Pro Plasmidansatz wurden 200 µl MEM (ohne FKS, ohne Antibiotika) und 8 µl Lipofectamine gemischt

Im Anschluss wurde mit beiden Transfektionen gleich verfahren:

Ansatz 1 wurde bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert, danach erfolgte die Vereinigung mit Ansatz 2, woraufhin eine weitere Inkubation gleicher Dauer und Temperatur folgte. In dieser Zeit bildeten sich die Liposomenkomplexe aus.

Die Zellen auf den Chamber-Slides wurden erst mit PBS gewaschen, anschließend wurden 1.6 ml MEM (ohne Zusatz) hinzugefügt. Nun wurden die vermischten Ansätze auf die MDCK-C7-Zellen gegeben und 240 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Weiterhin wurden die Zellen mit je 4 ml MEM (enthält 10% FKS, Penicillin und Streptomycin) gewaschen und gefüttert.

Im Anschluss wurden die Zellen alle 4-5 Tage neu gewaschen und gefüttert, sowie ihr Wachstum mikroskopisch überwacht. Antibiotikum (G418) im Wachstumsmedium verhinderte das Wachstum anderer Zellen, während die transfizierten Zellen über eine durch den aufgenommenen Vektor spezifische Antibiotikaresistenz verfügten. Somit starben alle nicht-transfizierten Zellen ab.

Nach einer ausreichenden Wachstumsphase wurden die Zellen für folgende Versuchsreihen weiter verwendet: Mit Hilfe der Western Blot Methode und Immunfluoreszenzfärbungen konnte der Erfolg der stabilen Transfektion nachgewiesen werden. Für die folgenden elektrophysiologischen Widerstandsmessungen und Flux-Experimente zur Funktionsanalyse wurden die Zellen mit der stärksten Proteinexpression ausgewählt.

#### 2.6.4 Western Blot

Grundsätzlich können mittels der Western-Blot-Technik die Komponenten einer Proteinmischung gelelektrophoretisch voneinander getrennt und detektiert werden. In unserem Fall wurden die unterschiedlichen Claudin-16-Varianten (WT Claudin-16, H71D, L75P, G121R, G128A, R146T und T233R) in Membranproteinpräparationen von MDCK-Zellen nachgewiesen und somit der Erfolg der stabilen Transfektion bestätigt. Die einzeln durchgeführten Schritte werden folgend dargelegt.

##### *Membranprotein-Extraktion*

Zunächst wurde die Gesamtproteinfraktion aus Zellmaterial der MDCK-Zelllinie gewonnen. Es folgte eine Auftrennung in eine membrangebundene und eine zytosolische Fraktion.

Die konfluent gewachsenen Zellrasen in ihren Zellkulturflaschen waren Ausgangspunkt des Extraktionsvorganges. Das Zellmedium wurde abgegossen, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend wurden 750 µl Lysepuffer je Flasche hinzugefügt. Dieser wurde durch vorsichtiges Schwenken regelmäßig verteilt. Mit einer 1000 µl-Pipette wurden die Zellen in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Das Zellmaterial wurde durch ca. 20maliges Aufziehen mit einer 26 G-Insulinkanüle homogenisiert. Danach wurde der Ansatz über 5 Minuten bei 200xg und 4°C zentrifugiert. Die Zellorganellen, die DNA und RNA und andere Zellfragmente bildeten das Pellet nach dem ersten Zentrifugationsschritt. Der Überstand, der der Gesamtproteinfraktion der Zellen entsprach, wurde in ein weiteres Eppendorf-Röhrchen überführt und nochmals über 30 Minuten bei 43000xg und 4°C zentrifugiert. Die Membranproteine verblieben im Pellet, das mit 100 µl eiskaltem, frischem Lysepuffer resuspendiert und nach Proteinbestimmung bei -80°C aufbewahrt wurde. Der Überstand entsprach der gelösten zytosolischen Proteinfraktion. Die Proteinkonzentrationen der erhaltenen Suspensionen wurden durch Absorptionsmessungen im Spectra Classic Proteinmessgerät (Tecan) bestimmt.

## *Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)*

In Abhängigkeit ihrer Molekülgröße und Ladung können Proteine dank der PAGE-Technik in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Geschwindigkeit der Durchwanderung der Proteine durch das Polyacrylamidgel ist abhängig von der angelegten Spannung, den Pufferbedingungen, der Proteingröße sowie der Gelzusammensetzung (z.B. werden niedrigprozentige Gele für große Proteine und hochprozentige Gele für kleine Proteine verwendet).

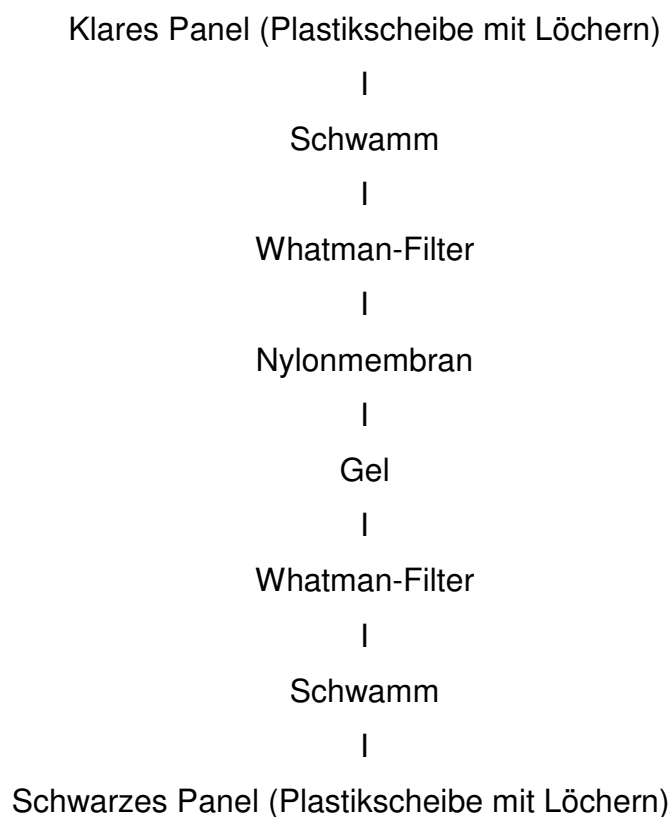
Zum Gießen der Gele wurde eine Mini-Protean-Apparatur (BioRad) verwendet. Zwei Gelkammern, bestehend aus je zwei Glasscheiben mit einem Abstand von 1.5 mm, wurden in das Gerät gehängt. Die Inhaltsstoffe für ein 12,5% Trenngel wurden vermischt und luftblasenfrei in die Gelkammern gegeben. Anschließend wurde 1 ml absoluter Alkohol dem Trenngel hinzugefügt. Dies garantierte eine klare Grenze zwischen Trenn- und Sammelgel. Der Alkohol wurde nach 30 Minuten Polymerisationszeit abgegossen und es folgte eine Aufschichtung des Sammelgels bis zur Oberkante der kleinen Glasplatte. Ein Kamm, zuständig für die Bildung von Vertiefungen zur Probenaufnahme, wurde eingesetzt. Nach weiteren 30 Minuten wurde der Kamm entfernt. Nach einer Spülung mit Elektrophoresepuffer (zur Entfernung von Gelresten) wurde das Gel in die Elektrodenhalterung gespannt und in die Elektrophoresekammern eingesetzt. Zuletzt wurde der Kammer Elektrophoresepuffer hinzugefügt.

Zubereitung der Proben: Zu einer 20 µl Probe (entspricht etwa 2,5 µg Protein) wurden 4 µl  $1/5$  5 x Laemmli-Puffer hinzugefügt. Dieses Gemisch wurde 5 Minuten bei 95 °C denaturiert, kurz zentrifugiert und danach in die durch den Kamm entstandenen Probentaschen des Polyacrylamidgels platziert. Die Elektrophorese geschah bei konstanter Spannung von 100 V über 60 Minuten. Abschließend erfolgten der Plattenausbau und die Lösung der Platten voneinander.

## *Elektrophoretischer Transfer*

Weil der Umgang mit einer Membran als Trägermatrix für den Blot getrennter Proteine im Vergleich zu einem Gel sehr viel einfacher ist (z.B. sind Proteine auf einer Membranoberfläche immobil), erfolgte ein Proteintransfer auf eine Membran in einem elektrischen Feld.

Eine Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF) wurde der Größe des Gels angepasst und fünf Minuten mit reinem Alkohol benetzt. Im Anschluss wurden in Transferpuffer über fünf Minuten die Nylonmembran, das Polyacrylamidgel, zwei Schwämme und zwei Whatman 3MM Filterpapiere equilibriert. Die Transferkammer wurde dann folgendermaßen zusammengesetzt:



Es folgte das Einsetzen dieses Aufbaus in eine Transferkammer und der Anschluss an eine Stromquelle auf einem Magnetrührer. Über etwa 60 Minuten erfolgte nun der

Transfer der negativ geladenen Proteine vom Gel auf die Membran bei 100 V und 0,2 bis 0,4 A.

### *Immundetektion*

Das Prinzip der Immundetektion ist es, auf der Nylonmembran lokalisierte Proteine durch Antikörperbindung und Lumineszenzmarkierung nachzuweisen.

Die Proteine auf der Nylonmembran wurden erst kurz mit PBS/Tween gespült und anschließend in 50 ml PBS/Tween und 5% Magermilchpulver über zwei Stunden bei Raumtemperatur in eine Glasküvette gelegt. Dies führte zu einem „Reaktions-Block“ der Membran, wobei überschüssige, unspezifische Proteinbindestellen der Membran saturiert wurden. Nach Ablauf der zwei Stunden wurde die Membran erneut mit PBS/Tween gespült und in derselben Glasküvette, nachdem diese ausgeschüttelt wurde, über weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur mit 50 ml BSA-Blockierungslösung inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Behandlung mit dem Antikörper. In einer Konzentration von 1:1000 wurde der anti-Claudin-16 Antikörper in Lösung gegeben. Es folgte eine Inkubation von 90 Minuten bei Raumtemperatur auf der Wippe. Nach dreimaligem Waschvorgang der Membran (in PBS/Tween bei Raumtemperatur über jeweils zehn Minuten) wurde die überschüssige Flüssigkeit mit Filterpapier entfernt und eine Inkubation der Membran mit 10 ml Lumi-Light-Lösung (5 ml Lösung 1 und 5 ml Lösung 2) über fünf Minuten im Dunkeln durchgeführt. Zum Abschluss wurde die Membran zwischen zwei transparenten Folien fixiert.

Die Signaldetektion erfolgte mit Hilfe des LAS 1000. Dieses erfasste das Licht, das durch Spaltung des Lumi-Light-Substrates abgegeben wurde.

## **2.7 Immunfluoreszenz**

Auch die Immunfluoreszenzfärbungen und -analyse wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Dr. Walter Hunziker des Epithelial Cell Biology Laboratory, Institute of Molecular and Cell Biology, Singapur, durchgeführt.

Immunfärbungen und -nachweismethoden basieren auf folgendem Prinzip: Antikörper bzw. Antikörperkomplexe, die einen Fluoreszenzfarbstoff enthalten, binden spezifisch an bestimmte Strukturen (z.B. Proteine, andere Antikörper). Nach Stimulation durch Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert dieser Fluoreszenzfarbstoff Licht einer anderen Wellenlänge und ermöglicht so den Nachweis der gesuchten Strukturen. So können in einem Zellverband mehrere Proteine detektiert und lokalisiert werden, indem Antikörperkomplexe unterschiedlicher Spezifität verwendet werden, welche Licht bei verschiedenen Wellenlängen emittieren. Durch Variation der Wellenlänge am Mikroskop können so die unterschiedlichen Proteine und gegebenenfalls eine Kolo-kalisation dargestellt werden.

Die Immunfluoreszenzanalyse und entsprechende bildliche Dokumentation dieser Arbeit wurden wie von Weiske (2001) bzw. Florian et al. (2003) berichtet durchgeführt. Zellen wurden als Monolayer auf 0,6 cm<sup>2</sup> Objektträgern kultiviert, mit Methanol bei -20 °C über 10 Minuten fixiert und anschließend zwei mal mit PBS-Lösung gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde PBS mit 0.5% Triton-X-100 über 10 Minuten bei Raumtemperatur verwendet. Zur Blockierung diente 5%-Goat-Blockierungslösung in PBS über 60 Minuten. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Zellen mit den Antikörpern in Blockierungslösung. In der vorliegenden Arbeit wurde als Primär-Antikörper Rabbit-Anti-Claudin-16 in der Konzentration 20 µg/ml verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei Raumtemperatur und zweimaligem Waschen mit Blockierungslösung wurde der Sekundär-Antikörper für die Doppelfärbung hinzugegeben. Hier wurden Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit in einer Konzentration von 2 µg/ml über 30 Minuten im Dunkeln verwendet. Auch hier wurde danach zweimal mit Blockierungslösung gewaschen. Abschließend wurde der gebildete Zell-Antikörper-Komplex erst mit destilliertem Wasser und dann mit Ethanol abgespült. Zuletzt wurde der Komplex mit ProTaqMountFluor eingedeckt und im Dunkeln gelagert. Fluoreszenzbilder wurden mit einem konfokalen Laser-Mikroskop (Zeiss LSM510) unter Anregung der Wellenlängen 543 nm and 488 nm hergestellt.

## 2.8 Elektrophysiologie

Wie Müller et al. (2003) sowie Kausalya/Amasheh et al. (2006) nachweisen konnten, verhalten sich WT Claudin-16 und bestimmte Varianten nach Expression unterschiedlich: T233R wird zur Zelloberfläche transportiert, nachfolgend endozytiert und akkumuliert dann im endoplasmatischen Retikulum (ER). Im Gegensatz dazu erreicht G121R die Zellmembran nicht, sondern reichert sich direkt im ER an. Um diese beiden Varianten in den elektrophysiologischen Versuchsreihen besser mit den anderen, an der Zelloberfläche exprimierten Varianten vergleichen zu können, wurden sie vor Beginn der Versuche wie folgt behandelt: T233R-Zellklone wurden 60 Minuten bei 37°C in 0.4 M Sukrose-Lösung in MEM inkubiert. Diese Behandlung verhinderte die Endozytose (Heuser et al., 1989). G121R wurde 24h bei 37°C mit 5 mM 4-PBA-Lösung behandelt. 4-PBA erleichterte die Entfaltung und Expression von G121R in der Zellmembran (Ulloa-Aguirre et al., 2004).

### 2.8.1 Widerstandsmessungen: Manuelle Methode

Zur Bestimmung des initialen transepithelialen Widerstandes ( $R^t$ ) der verschiedenen Claudin-16-transfizierten Zellklonen und der Kontrollzellen wurde die manuelle Widerstandsmessung verwendet. Die hierfür verwendete Messapparatur dient speziell der Widerstandsmessung an Zellrasen, die sich auf Millicell-Filtern befinden. Eine Elektrode wurde über der Zellrasenoberfläche, die andere in der extrazellulären Flüssigkeit platziert. So wurde der transepitheliale Widerstand ( $R^t$ ) bestimmt. Zur Bestimmung des Leerwiderstandes wurde ein unbeschichteter Filter (ohne Zellen) in der jeweiligen Badlösung verwendet. Dieser gemessene Leerwiderstand wurde dann von dem später gemessenen Widerstand der Zellklone abgezogen und so der tatsächliche transepitheliale Widerstand  $R^t$  errechnet. Vor bzw. nach einer Messung der jeweiligen Zellfilter wurden die beiden Elektroden des Gerätes mit 80% Ethanol gespült. Zwischen den Messungen lagerten die Zellfilter bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit.



## 2.8.2 Widerstandsmessungen: Ussing-Kammern

Die Ussing-Kammer stellt eine etablierte in vitro-Technik zur Bestimmung des aktiven Ionentransports (Kurzschlußstrom,  $I_{SC}$ ,  $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) und der Leitfähigkeit bzw. des Widerstands dar (Ussing et al., 1951). Die Widerstandsmessungen ( $R^t$ ) der C7-Zellen jeweils vor und nach Transfektion erfolgten in einer modifizierten Ussing-Kammer (Kreusel et al., 1991). Dank einer speziellen Ausfräsung der Plexiglaskammer konnten kommerzielle Zellkulturfilter (Millicell-HA) direkt in diesen Kammern verwendet werden. Zwei Dichtungsringe entlang der Außenseite des Filters verhinderten den Flüssigkeitsübertritt von einer Kammerhälfte in die andere (und damit einen Kurzschluss).

Die elektronischen Messungen erfolgten folgendermaßen: Über einen mit einem Mehrkanal-AD Wandler ausgestatteten PC (Siemens, PCD 2) wurden sowohl die Spannung  $U^e$  über dem Epithel gemessen als auch die Elektroden im „open“ bzw. „closed circuit“ gesteuert. Weiterhin generierte ein über den PC gesteuerter Messverstärker (CVC6 / CVC8) einen Rechteckstrom zur Erfassung des über dem Epithel liegenden transepithelialen Widerstandes ( $R^t$ ). Um den Kurzschlußstrom ( $I_{SC}$ ) im „closed circuit“-Betrieb zu bestimmen, wurde das Epithel auf 0 mV geklemmt. Eine entsprechende Software (Analogon, Ing. grad. D. Sorgenfrei) zur Steuerung und Registrierung des Programms diente zur Messung in Intervallen von 5 – 60 Sekunden sowie zur tabellarischen Anzeige der Messwerte. Die Überwachung des pH-Wertes erfolgte über ein pH-Meter.

Mit insgesamt ca. 20 ml Badlösung wurden vor jedem Versuch der Badwiderstand und das Asymmetriepotential der Spannungselektroden gemessen. Diese ermittelten Werte wurden später von den Messwerten abgezogen. Nach dem Einbau der Filter wurden beide Kammerhälften synchron mit jeweils 10 ml Badlösung gefüllt. Begasung erfolgte über eine Injektionsnadel und führte zu einer kontinuierlichen Durchmischung der Flüssigkeit in den jeweiligen Kammern und um das Epithel herum.

Aus den Potentialdifferenzen  $U_1$  und  $U_2$ , die sich nach Applikation der Ströme  $I_1$  und  $I_2$  mittels Rechteckgenerator über dem Epithel einstellten, konnte der transepitheliale Widerstand mit Hilfe des Ohm'schen Gesetzes ermittelt werden:

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

Folgendermaßen ergibt sich der Widerstand des Präparates in der Ussing-Kammer nun aus:

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

Zur Errechnung des transepithelialen Widerstands ( $R^t$ ) wurde der Badwiderstand der leeren, aber mit Badlösung gefüllten Ussing-Kammer abgezogen. Die transepitheliale Spannungsmessung ( $U_e$ ) erfolgte direkt. Der Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ) lässt sich nun bestimmen als Quotient aus Spannung und Widerstand:

$$I_{sc} = U^e / R^t$$

### **2.8.3 Magnesium-Fluxexperimente an Ussing-Kammern**

Zur Abschätzung der parazellulären Leitfähigkeit für Magnesium wurden unidirektionale Magnesium-Fluxe von serosal nach mukosal bestimmt.

Alle Kammern wurden vor den Versuchen zweifach mit destilliertem Wasser (A.bidest.) und anschließend mit 10 mmol/l EDTA-Lösung durchspült, um magnesiumfreie Kammern zu gewährleisten. Nach dem Abgleich der Kammern mit glucosefreier (und dadurch länger haltbarer) Ringerlösung erfolgte ein zweifaches Spülen der Kammern mit einer nominell magnesiumfreien Ringerlösung. Nach dem Einspannen der Filter wurden mukosal und serosal je 10 ml dieser nominell magnesiumfreien Ringerlösung eingefüllt und das Einstellen eines konstanten Widerstandes abgewartet. Um passive Ionenbewegungen aufgrund elektrischer Gradienten, die durch elektrogenen Transport entstehen können, auszuschließen,

wurde bei allen Fluxexperimenten das Epithel kurzgeschlossen. Anschließend wurde mukosal 1 ml Lösung (Leerwert) der Kammer entnommen und durch Ringerlösung ersetzt. Serosal wurden 100 µl 1 M Magnesiumsulfat-Lösung hinzugefügt (Endkonzentration 10 mM).

Nach 30, 60 und 90 Minuten wurden nun erneut je 1 ml Badlösung auf der mukosalen Seite entnommen und durch Ringerlösung ersetzt. Die Magnesiumkonzentrationen der vier 1-ml-Proben Leerwert (n=0), 30 (n=1), 60 (n=2) und 90 (n=3) Minuten wurde per Atomabsorptionsspektrometrie gemessen.

Der unidirektionalen Magnesium-Flux wurde dann durch folgende Formel errechnet:

$$J_{Mg} = \frac{V \cdot \Delta [Mg^{2+}]}{F_K \cdot \Delta t}$$

$J_{Mg}$  unidirektionaler Flux für Magnesium

$V$  Kammervolumen in Liter

$F_K$  Kammerfläche in  $cm^2$

$\Delta t$   $t_n - t_{n-1}$  in Stunden

$\Delta [Mg^{2+}]$   $[Mg^{2+}]_n - [Mg^{2+}]_{n-1}$  in  $\mu mol/l$

Da nach den Probenentnahmen n=1 und n=2 die Lösung der Kammer mit magnesiumfreier Ringer-Lösung verdünnt wurde, musste für die Magnesiumkonzentrationen der danach abgenommenen Proben (n=2 und n=3) eine Korrekturrechnung durchgeführt werden:

$$[Mg^{2+}]_n' = [Mg^{2+}]_n + \frac{[Mg^{2+}]_{n-1}}{10} \text{ für } n > 1$$

Wegen der einfacheren Vergleichbarkeit wurde der Magnesium-Flux anschließend wie folgt in die Magnesiumpermeabilität umgerechnet:

$$P_{\text{Mg}} = \frac{J_{\text{Mg}}}{[\text{Mg}^{2+}]}$$

$P_{\text{Mg}}$	Magnesiumpermeabilität in cm/h
$J_{\text{Mg}}$	unidirektionaler Magnesiumflux in $\mu\text{mol}/\text{h}\cdot\text{cm}^3$
$[\text{Mg}^{2+}]$	Magnesiumkonzentration in $\mu\text{mol}/\text{l}$

#### 2.8.4 Dilutionspotentiale: Ussing-Kammer

Der Ermittlung der partiellen, parazellulären Leitfähigkeiten der Natrium- und Chlorid-Ionen dient das Dilutionspotential. Ersetzt man die Natrium- und Chlorid-Konzentration einer Kammerhälfte durch eine entsprechende Substanz (z.B. Mannitol), die einen osmotischen Ausgleich gewährleistet, so stellt sich über dem Epithel ein Diffusionspotential ein, das Dilutionspotential ( $U_m$ ).

Nach der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung berechnet sich das Dilutionspotential folgendermaßen:

$$U_m = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{P_{\text{Na}} [\text{Na}]^m + P_{\text{Cl}} [\text{Cl}]^s}{P_{\text{Na}} [\text{Na}]^s + P_{\text{Cl}} [\text{Cl}]^m}$$

(wobei  $U_m$  *serosal* gegen *mucosal* gemessen wird)

$U_m$	Dilutionspotential
$R$	allgemeine Gaskonstante
$T$	absolute Temperatur
$F$	Faradaykonstante
$P_{\text{Na}}, P_{\text{Cl}}$	Permeabilität der Ionen Natrium bzw. Chlorid
$[\text{Na}]^m$	<i>mucosale</i> Konzentration für Natrium bzw. Chlorid ( $[\text{Cl}]^m$ )
$[\text{Na}]^s$	<i>serosale</i> Konzentration für Natrium bzw. Chlorid ( $[\text{Cl}]^s$ )

Die relative Leitfähigkeit für Natrium ( $P_{Na}$ ) und Chlorid ( $P_{Cl}$ ) wird durch Umformung der Permeabilitäts-Gleichung bestimmt:

$$\frac{P_{Na}}{P_{Cl}} = \frac{\frac{U_m F}{R \cdot T} \cdot [Cl]^m - [Cl]^s}{\frac{U_m F}{R \cdot T} \cdot [Na]^m - [Na]^s}$$

Werden beide Kammerhälften der Ussing-Kammer mit den verschiedenen Badlösungen (unverdünnte und mit isotoner Mannitollösung verdünnte Badlösung) gefüllt, entsteht ein Potential, das sich nur durch die ungleiche Zusammensetzung der Lösungen beider Seiten einstellt. In weiteren Rechnungen muss dieses entstandene Elektrodenpotential berücksichtigt und vom Dilutionspotential abgezogen werden. Die partielle Leitfähigkeit für Natrium ( $G_{Na}$ ) lässt sich nun aus der relativen Permeabilität für Natrium und der Gesamtleitfähigkeit ( $G^t$ ) des Epithels berechnen, wobei die Gesamtleitfähigkeit des Epithels dem Kehrwert des transepithelialen Widerstands ( $R^t$ ) entspricht ( $G^t = 1/R^t$ ), der direkt gemessen wird:

$$G_{Na} = (P_{Na} / P_{Cl}) \cdot G^t / (1 + P_{Na} / P_{Cl})$$

Die Summe der partiellen Leitfähigkeiten für Natrium und Chlorid ergibt die gesamte Leitfähigkeit eines Epithels. Dementsprechend ist die partielle Leitfähigkeit für Chlorid ( $G_{Cl}$ ):

$$G_{Cl} = G^t - G_{Na}$$

Zur Bestimmung der Dilutionspotentiale wurde in dieser Arbeit folgendermaßen vorgegangen:

Im Gegensatz zur Messung des transepithelialen Widerstandes ( $R^t$ ) wurden nach dem Einspannen der Zellfilter in beide Kammern 5 ml Standard-Ringerlösung gefüllt und die Einstellung eines konstanten Widerstandes abgewartet (10-15 min). Anschließend wurden mukosal 5 ml einer modifizierten, Mannitol-haltigen Ringer-Lösung hinzugefügt, während serosal 5 ml der Standardlösung eingefüllt wurden. Nach einem Filterwechsel wurde der Ablauf mit modifizierter Ringer-Lösung auf der Gegenseite, d.h. serosal, wiederholt.

### **2.8.5 Magnesium-Konzentrationsbestimmung durch Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)**

Das Prinzip der Atomabsorptionsspektrometrie besteht darin, die Atomkonzentration eines Stoffes in der Gasphase einer Probe zu bestimmen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Perkin-Elmer 2380 Atomabsorptionsspektrometer verwendet.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde folgendermaßen vorgegangen: Die Probe in flüssiger Phase wurde mittels eines Schlauches in die Flamme eines Acetylen-Luftgemisches angesaugt, durch eine 2400-2700 K heiße Flamme verdampft und damit atomisiert. Eine Magnesium-Hohlkathodenlampe als Lichtquelle strahlte durch Elementaranregung monochromatisches Licht aus. Dieses wurde in Abhängigkeit der  $Mg^{2+}$ -Konzentration der Probe absorbiert. Die atomare Absorptionsstärke des Magnesiums wurde bei 285.2 nm gemessen, von einem Detektor registriert und so die Konzentration ermittelt.

Zunächst erfolgte die Kalibrierung des Spektrometers mit standardisierten  $Mg^{2+}$ -Lösungen aufsteigender Konzentrationen: 0.025, 0.075, 0.1, 0.3 und 0.5  $\mu\text{g/ml}$ . Danach erfolgte die Bestimmung der  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen in den gewonnenen 1-ml-Proben: Nachdem die Proben mit 5  $\mu\text{l}$  20%  $\text{La}_2\text{O}_3$  in 32% HCl (Endkonzentration in der Probe: 0.1%  $\text{La}_2\text{O}_3$  in 0.16% HCl) versetzt wurden (Lanthanoxid minimiert Interferenzen von Magnesium und Calcium mit Anionen in der Flamme des Atomabsorptionsspektrometers; Salzsäure gewährleistet einen pH-Wert von 2), erfolgte die Flüssigkeitsansaugung, die Verdampfung und zuletzt die Absorptionsmessung und Konzentrationsbestimmung.

Abschließend wurde die Magnesiumkonzentration wie folgt berechnet:

Mit den Standard-Eichlösungen bekannter Konzentrationen wurde eine Eichgerade erstellt und die Steigung bestimmt. Mit Hilfe dieser Steigung konnte die unbekannte  $Mg^{2+}$ -Konzentration aus dem gemessenen Wert ermittelt werden.

## **2.9. Statistik**

Sämtliche statistische Auswertungen sowie die Herstellung von Dateitabellen und Abbildungen erfolgten mit den Programmen Microsoft Excel und Microsoft Word sowie GraphPad PRISM (Version 3.0, GraphPad Software Inc, CA, USA).

Messwerte wurden als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  SEM (Standardfehler des Mittelwertes) angegeben.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Stabile Transfektion der MDCK-C7-Zellen mit cDNA von WT Claudin-16 und der Claudin-16-Varianten H71D, L75P, G128A, G121R, R146T und T233R**

Um den Einfluss von Claudin-16 und seiner oben genannten Varianten auf den Magnesiumflux und den Epithelwiderstand zu untersuchen, wurde mit MDCK-C7-Zellen, welche endogen kein Claudin-16 exprimierten, eine Transfektion nach der oben beschriebenen Lipofectamine-plus-Methode mit der cDNA von WT Claudin-16 bzw. seiner Varianten durchgeführt. Der Kontrolle dienten die jeweiligen Expressionsvektoren ohne Insert (leerer Vektor) sowie unbehandelte MDCK-C7-Zellen aus dem Laborbestand, die nicht transfiziert wurden.

Die erfolgreich transfizierten Zellen wurden dann mittels Western Blot-Technik und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie näher untersucht und funktionell in elektrophysiologischen Versuchsreihen charakterisiert.

#### **3.2 Western Blot**

Der Erfolg der Transfektion wurde zunächst mit Hilfe der Western Blot-Methode überprüft. Signale einer Größe von etwa 36 kDa konnten bei erfolgreich mit Claudin-16 transfizierten MDCK-C7-Zellen, nicht aber in Vektor-transfizierten Kontrollen detektiert werden (Abb.3). Aufgrund der begrenzten Eignung des Antikörpers für die Anwendung in Western Blot Experimenten wurden Expression und Lokalisation daraufhin mittels Immunfluoreszenzfärbung und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie näher analysiert.



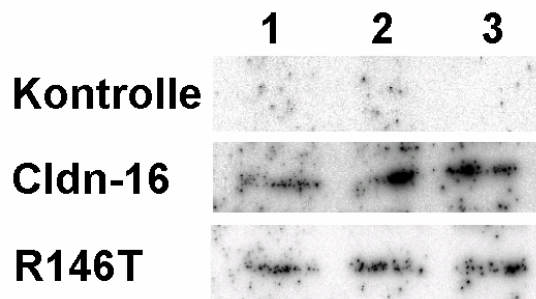


Abb. 3: Detektion von Claudin-16 in Vektor-, WT-Claudin-16- und Claudin-16-Varianten-transfizierten MDCK Zellen.

### 3.3 Immunfluoreszenz

Die Expression von Claudin-16 wurde im Hinblick auf ihre Kolokalisation mit dem Tight-Junction-Marker Occludin analysiert. Es wurden die Monolayer mit dem stärksten Wachstum verwendet. Während kein spezifisches Claudin-16-Signal in Vektor-transfizierten Kontrollen zu sehen war, konnte in mit Claudin-16 bzw. seinen Varianten transfizierten MDCK-Zellen Claudin-16 in Kolokalisation mit Occludin nachgewiesen werden. (Abb. 4 und 5).

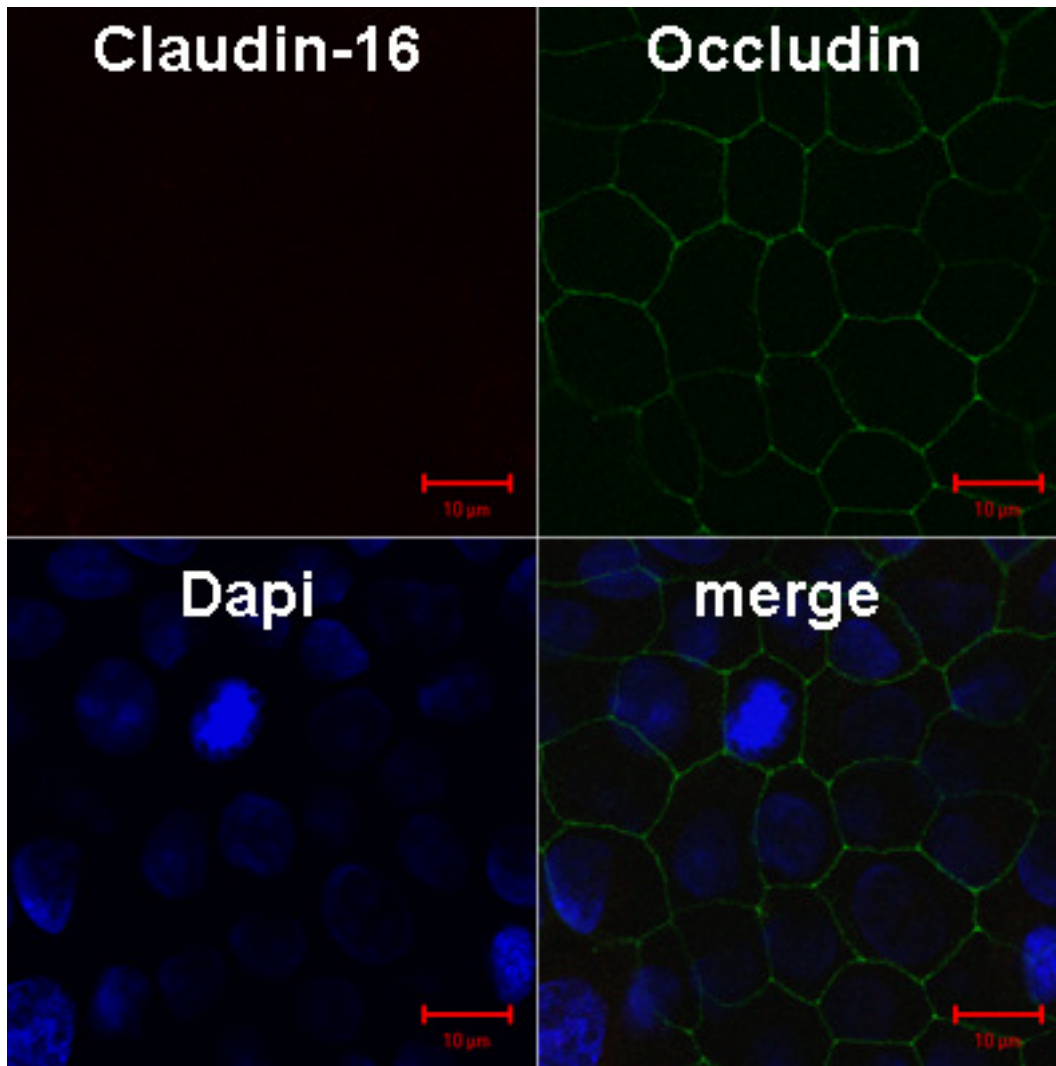


Abb. 4: Detektion von Claudin-16 (rot) und Occludin (grün) in Vektor-transfizierten MDCK-C7-Zellen.

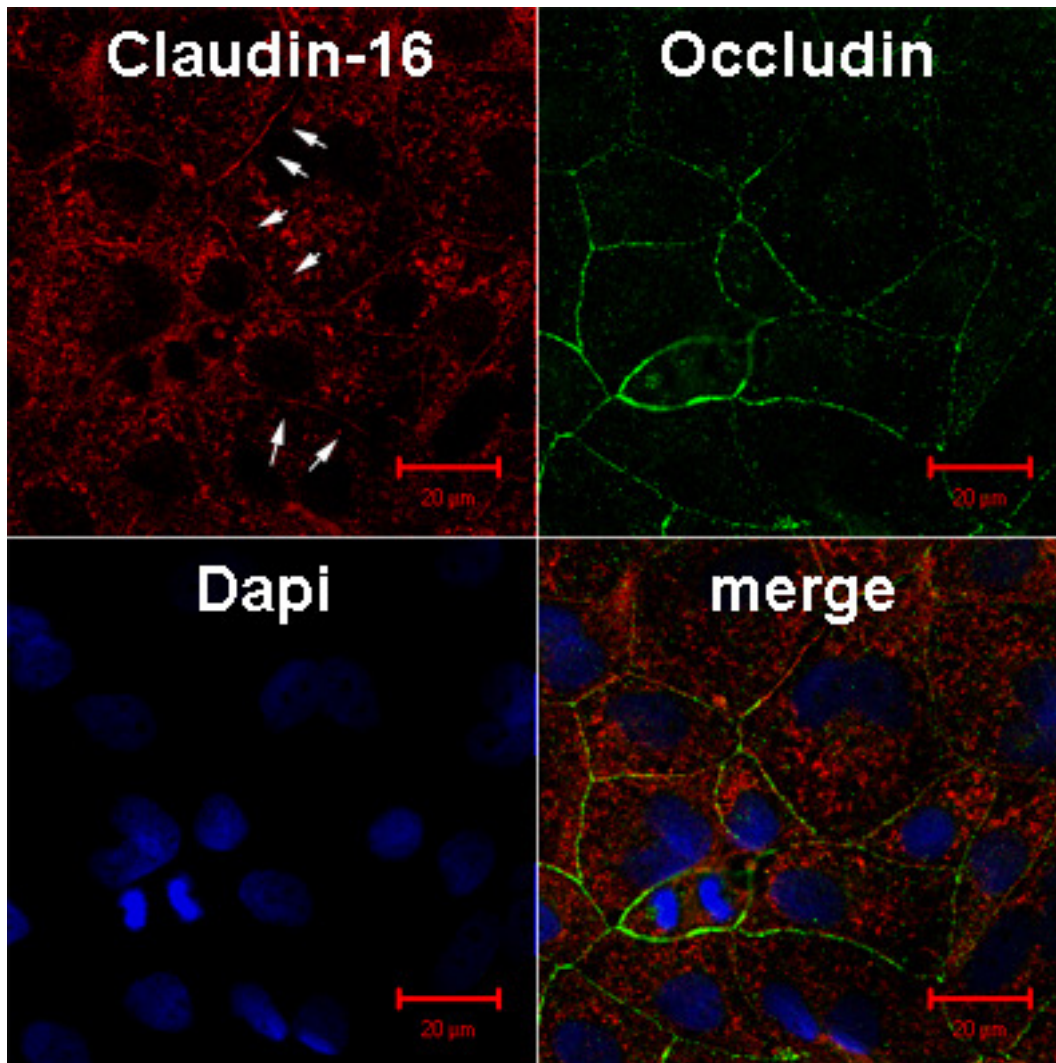


Abb. 5: Detektion von Claudin-16 (rot) und Occludin (grün) in Claudin-16-transfizierten MDCK-C7-Zellen.

Eine Übersicht über die Lokalisationen und Defekte der funktionell untersuchten Varianten sowie weiterer, FHHNC-assoziiierter Mutationen gibt Tabelle 2 wieder. Für die funktionelle Charakterisierung wurden die membranständigen Varianten verwendet.

Tab. 2: Lokalisation und Defekt verschiedener Claudin-16-Varianten assoziiert mit FHHNC (Kausalya/Amasheh et al., 2006).

<b>Mutation</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Defekt</b>
WT Cldn16	Zellmembran	Kein
W47X	ER	Akkumulation im ER
N53fs	ER	Akkumulation im ER
A62V	Zellmembran	Mg-Transport (?)
H71D	Zellmembran	Mg-Transport
L75P	Zellmembran	Mg-Transport
R79X	ER, Golgi-Apparat, Lysosomen	lysosomale Akkumulation
R79L	Zellmembran, ER	partielle Akkumulation im ER
L81W	ER, Golgi-Apparat, Lysosomen	lysosomale Akkumulation
L81F	ER, Golgi-Apparat, Lysosomen	lysosomale Akkumulation
L97P	ER	Akkumulation im ER
G92V	ER	Akkumulation im ER
G121R	ER, Golgi-Apparat, Lysosomen	lysosomale Akkumulation
G128A	Zellmembran	Mg-Transport
A139T	Zellmembran	Mg-Transport (?)
R146T	Zellmembran	Mg-Transport
F162C	Zellmembran	Mg-Transport
G163D	ER	Akkumulation im ER
S165F	ER	Akkumulation im ER
S165P	ER	Akkumulation im ER
G169R	Zellmembran, ER	partielle Akkumulation im ER
T233R	Zellmembran, Lysosomen	lysosomale Akkumulation, Mg-Transport (?)

### **3.4 Elektrophysiologische Versuchsreihen zur funktionellen Analyse**

Um WT Claudin-16 und seine Varianten weiter zu charakterisieren, wurden Widerstands-, Magnesiumflux- und Dilutionspotentialmessungen durchgeführt und die Ergebnisse der einzelnen Varianten miteinander verglichen. Die Hypothese war, dass die mit cDNA der Varianten transfizierten Zellen einen niedrigeren Magnesiumflux vorweisen als die mit WT Claudin-16-cDNA transfizierten Zellen.

#### **3.4.1 Magnesiumfluxmessung**

Die Magnesiumfluxexperimente wurden wie oben beschrieben in Ussing-Kammern durchgeführt und die Magnesiumkonzentration dann durch die Atomabsorptionsspektrometrie bestimmt. Der Magnesiumflux ( $J_{\text{Mg}^{2+}}$ ) der Kontrollzellen sowie von WT Claudin-16 und seiner Varianten H71D, L75P, G128A, R146T, G121R und T233R wurde analysiert. Tabelle 3 zeigt eine Übersicht über die aus dem gemessenen Magnesiumflux berechnete Magnesiumpermeabilität ( $P_{\text{Mg}^{2+}}$ ).

Tab. 3: Berechnete Magnesiumpermeabilität in cm/h der analysierten transfizierten MDCK-C7-Zellen

Variante	$P_{Mg^{2+}}$ [cm/h]
Kontrollzellen	$3.9 \pm 0.2 \times 10^{-3}$ (n=34).
WT Claudin-16	$5.7 \pm 0.5 \times 10^{-3}$ (n=26)
H71D	$3.3 \pm 0.9 \times 10^{-3}$ (n=12)
L75P	$3.6 \pm 0.6 \times 10^{-3}$ (n=7)
G128A	$4.1 \pm 0.5 \times 10^{-3}$ (n=10)
R146T	$3.2 \pm 0.5 \times 10^{-3}$ (n=12)
G121R	$2.4 \pm 0.9 \times 10^{-3}$ (n=11)
T233R	$3.2 \pm 0.5 \times 10^{-3}$ (n=11)

Während die WT Claudin-16-exprimierenden Zellen eine signifikant höhere  $P_{Mg^{2+}}$  ( $P < 0.05$ ) im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigten, war dies bei keinem der Claudin-16-Varianten der Fall. Auch die Varianten G121R und T233R zeigten trotz Expression in der Zellmembran nach pharmakologischer Behandlung keine erhöhte  $P_{Mg^{2+}}$  (Abb. 6).

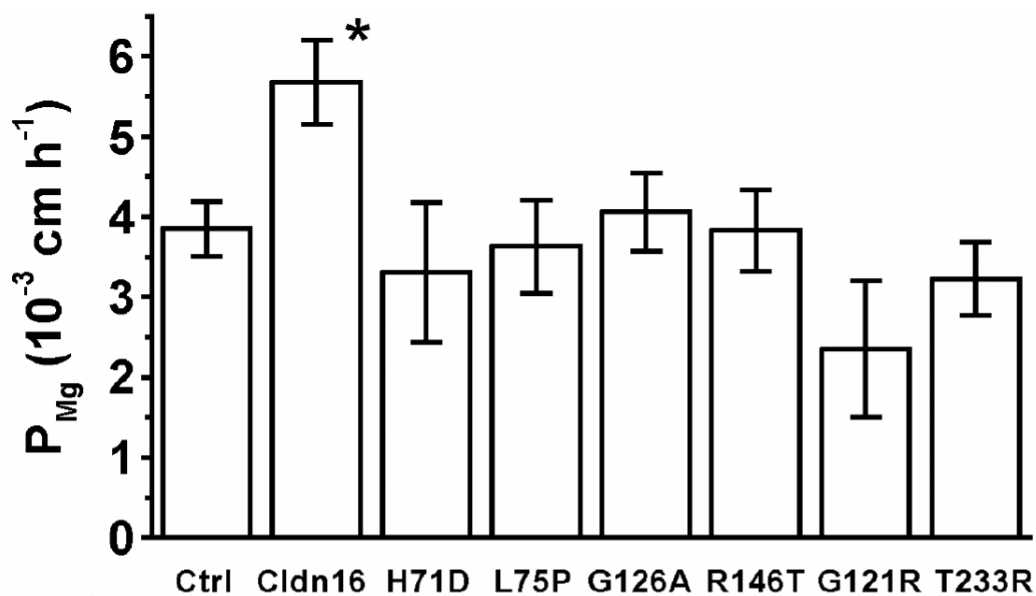


Abb. 6: Magnesiumpermeabilität von Einzelzellschichten mit cDNA von WT Claudin-16 und seinen Varianten bzw. ohne cDNA (Kontrolle) stabil transfizierter MDCK-Zellen.

### 3.4.2 Widerstandsmessungen

Widerstandsmessungen zur Kontrolle wurden initial nach der manuellen Methode und im Verlauf des Versuches in den Ussing-Kammern durchgeführt. Dabei wurden die Widerstände der einzelnen Zellklone miteinander verglichen und auf einen Zusammenhang zum Magnesiumflux bzw. Magnesiumpermeabilität untersucht. Der transepitheliale elektrische Widerstand variierte zwischen  $941 \pm 174 \Omega \text{ cm}^2$  (T233R) und  $3405 \pm 303 \Omega \text{ cm}^2$  (H71D; Abb.7) Zwischen Magnesiumflux und Widerstand konnte keine Korrelation gefunden werden.

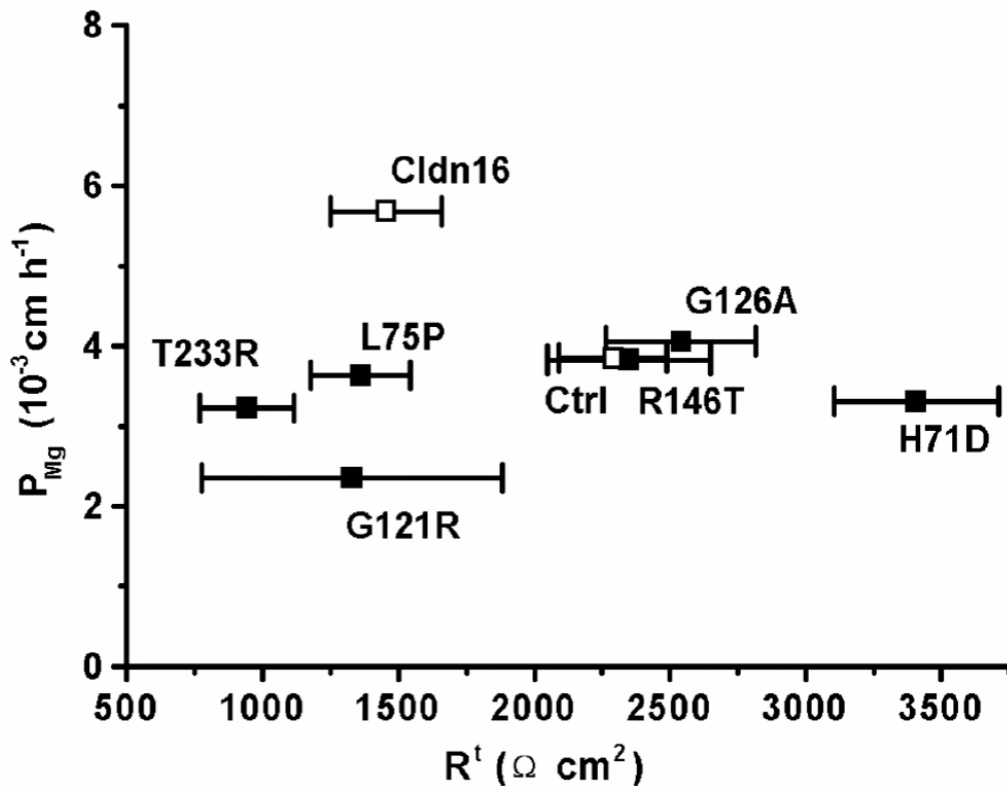


Abb. 7: Zusammenhang von transepithelalem, elektrischem Widerstand konfluenter Einzelzellschichten stabil transfizierter MDCK-Zellen und der Magnesiumpermeabilität. Es zeigte sich keine Korrelation.

### 3.4.3 Dilutionspotentiale

Eine Analyse der Verhältnisse von Natriumpermeabilität zu Chloridpermeabilität ( $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ ) wurde durch die oben beschriebene Messung der Dilutionspotentiale in den Ussing-Kammern durchgeführt. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied im  $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$  zwischen WT Claudin-16, seiner Varianten und der Kontrollen festgestellt werden. Eine Ausnahme bildete die Variante L75P, dessen  $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$  signifikant höher war (Abb. 8).



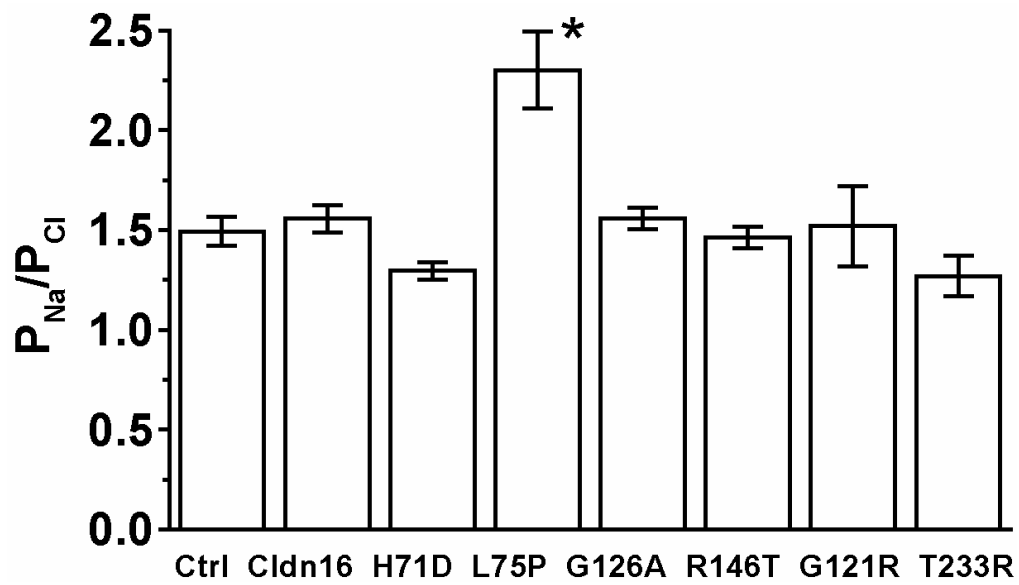


Abb. 8: Verhältnisse von Natriumpermeabilität zu Chloridpermeabilität ( $P_{Na}/P_{Cl}$ ) von Einzelzellschichten stabil transfizierter MDCK-Zellen. Mit Ausnahme der Variante L75P konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.

## **4. Diskussion**

Während bis heute 30 verschiedene, in Zusammenhang mit FHHNC stehende Claudin-16-Mutationen beschrieben worden sind (Simon et al., 1999; Weber et al., 2000; Blanchard et al., 2001; Weber et al., 2001; Wolf et al., 2002; Müller et al., 2003; Tajima et al., 2003; Kang et al., 2005; Müller et al., 2006, a; Müller et al., 2006, b), ist der molekulare Mechanismus, auf welche Weise diese Mutationen die Funktion beeinflussen, weiterhin nicht vollständig geklärt.

Aktuelle Studien (Kausalya/Amasheh et al., 2006) haben gezeigt, dass man die Mutationen in zwei Kategorien einteilen kann: Zur ersten Gruppe gehören Mutationsvarianten, die aufgrund eines veränderten intrazellulären Transports die Zellmembran nicht erreichen und dementsprechend dort nicht wirken können. In der vorliegenden Arbeit wurden aus dieser Gruppe die Varianten G121R und T233R näher untersucht. Die zweite Fraktion besteht aus Mutanten, die die Zellmembran erreichen, aber dort einen Defekt im parazellulären Magnesiumtransport vorweisen. Aus dieser Gruppe wurden hier die Varianten H71D, L75P, G128A und R146T überprüft.

### **4.1 Lokalisation und Expression von WT Claudin-16 und der Claudin-16-Varianten H71D, L75P, G128A, G121R, R146T und T233R in MDCK-C7-Zellen**

In der vorliegenden Dissertation wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Walter Hunziker des Epithelial Cell Biology Laboratory, Institute of Molecular and Cell Biology, Singapur, die Expression und Lokalisation von WT Claudin-16 und seiner Varianten H71D, L75P, G128A, G121R, R146T und T233R im Subklon C7 der „Madin Darby Canine Kidney“-Zelllinie (MDCK), der ein hochohmiges, dichtes Epithel darstellt, untersucht.

Der Transport eines integralen Membranproteins an die Zelloberfläche läuft physiologischerweise wie folgt ab: Während der Biosynthese und der Insertion in das endoplasmatische Retikulum (ER) werden die Membranproteine von „Begleitstoffen“ (engl.: chaperones) stabilisiert, die die Faltung des Proteins und somit das Erreichen der korrekten Konformation erleichtern (Sitia et al., 2003). Durch diese Art von „Qualitätskontrolle“ verlassen nur funktionelle Proteine mit korrekter Struktur das ER (z.B. in Richtung des Golgi-Apparates), die anderen werden in

Proteasomen abgebaut (Jarosch et al., 2002). Somit akkumulieren verschiedene Claudin-16-Mutanten (z.B. W47X, N53fs, G92V, L97P, G163D, S165F, S165P) im ER und fehlen in der Zellmembran (Kausalya/Amasheh et al., 2006).

WT Claudin-16 wie auch die Varianten H71D, L75P, G128A und R146T wurden zur Zelloberfläche transportiert und in die Tight Junction integriert, was durch die Kolokalisation mit dem Tight Junction-Marker Occludin nachgewiesen wurde. Im Vergleich dazu konnten in LLC-PK1-Zellen G128A und R146T nicht nachgewiesen werden (Hou et al., 2005). Dies könnte bedingt sein durch ungleiche Tight Junction-Protein-Expressionswege der verschiedenen Zelllinien. Weiterhin sind Unterschiede zwischen MDCK- und LLC-PK1-Zellen in Bezug auf Transport und Lokalisation endogener Membranproteine bekannt (Folsch et al., 1999).

Die Varianten T233R und G121R konnten nicht an der Zelloberfläche, sondern in den Lysosomen nachgewiesen werden. Dies lässt den Schluss zu, dass sie zuerst auf korrektem Weg das ER verlassen können. Nach Gabe eines Endozytose-Inhibitors konnte T233R an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Folgend wird T233R zuerst an die Plasmamembran transportiert und akkumuliert dann nach erfolgter Endozytose in Lysosomen. G121R hingegen konnte nach Gabe von 4-PBA, das die Entfaltung und Expression in der Zellmembran erleichtert (Ulloa-Aguirre et al., 2004), an der Zelloberfläche detektiert werden. G121R scheint die Lysosomen also nicht über die Plasmamembran mit nachfolgender Endozytose zu erreichen, sondern direkt vom Golgi-Komplex oder über Endosomen. Dies lässt in diesem Fall auf einen Defekt im Faltungsprozess mit folgender veränderter Struktur des Proteins schließen.

#### **4.2 Die Funktion von WT Claudin-16 im Vergleich zu der seiner Varianten H71D, L75P, G128A, G121R, R146T und T233R**

Um die Funktion von WT Claudin-16 und der genannten Claudin-16-Varianten miteinander zu vergleichen, wurden in der vorliegenden Arbeit in Ussing-Kammern Dilutionspotentiale und Widerstände gemessen sowie mit Hilfe der Atomabsorptionsspektrometrie der Magnesiumflux von Monolayern stabil transfizierter MDCK-C7-Zellen bestimmt. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die Varianten G121R und T233R vorher pharmakologisch behandelt, so dass alle an den Versuchen teilnehmenden Varianten und WT Claudin-16 selbst in der Zellmembran exprimiert wurden.

Im Gegensatz zu den Claudin-16-Varianten H71D, L75P, G128A, G121R, R146T und T233R zeigte sich bei WT Claudin-16 ein erhöhter Magnesiumflux, während bei Dilutionspotentialen und Widerständen mit einer Ausnahme (Dilutionspotential von L75P) kein signifikanter Unterschied zu detektieren war. Dies steht in Einklang mit der Studie von Hou et al. (Hou et al., 2005), in der LLC-PK1-Zellen verwendet wurden und die Permeabilität aus Dilutionspotentialen errechnet wurde. Im Vergleich zu den Claudin-16-exprimierenden LLC-PK1-Zellen der genannten Studie lag der Magnesiumflux der mit WT Claudin-16 transfizierten MDCK-Zellen in dieser Arbeit deutlich niedriger ( $5.7 \pm 0.5 \times 10^{-3}$  cm/h versus  $10.7 \pm 0.06 \times 10^{-6}$  cm/s, entspricht  $38.7 \times 10^{-3}$  cm/h). Zur Erklärung kann hier wieder auf bekannte unterschiedliche Expressionswege und Verhalten der Membranproteine in den verschiedenen Zelllinien (Folsch et al., 1999) verwiesen werden.

Im Vergleich dazu führten die mit den unterschiedlichen Varianten transfizierten MDCK-C7-Zellen zu keiner Erhöhung des Magnesiumfluxes. Dies lässt den Schluss zu, dass der parazelluläre Magnesiumtransport durch die hier untersuchten Punktmutationen im Claudin-16-Protein, die der FHHNC assoziiert sind, gestört wird. Die extrazellulären Schleifen des Claudin-16-Moleküls scheinen essentiell für die Funktion des Proteins zu sein. Vor allem die negativ geladenen Aminosäuren, die sich dort gehäuft befinden, werden in Verbindung mit der parazellulären Resorption von divalenten Kationen wie Magnesium und Calcium gebracht (Simon et al., 1999; Hou et al., 2005). Tatsächlich betreffen die bisher gefundenen, der FHHNC assoziierten Mutationen keine negativ geladenen Aminosäuren. Dies gilt auch für die hier untersuchten Varianten.

Im H71D-Zellklon, der sich in der ersten extrazellulären Schleife befindet, ersetzt das saure Aspartat das positive geladene Histidin, wodurch es zu einer Ladungsveränderung kommt. Das könnte zu veränderten elektrostatischen Wechselwirkungen führen. Auch beim R146T-Zellklon, der sich in der zweiten extrazellulären Schleife befindet, könnte das der Fall sein. Hier wird die positiv geladene Aminosäure Arginin durch Tryptophan, welches eine polare Hydroxylgruppe besitzt, ersetzt.

In den Varianten L75P und G128A verändert sich die Ladung nicht, da hier neutrale durch andere neutrale Aminosäuren ersetzt werden. Auch ohne eine Ladungs- oder Polaritätsveränderung kann sich eine veränderte Primärstruktur eines Proteins auf die Sekundär- oder Tertiärstruktur des Gebildes auswirken und somit zu einer

umgewandelten Konformation und Funktionsverminderung führen. Dies könnte für die Variante L75P zutreffen. Durch den geänderten Aufbau könnten sich die parazellulären Leitfähigkeiten für Natrium und Chlorid verändert haben und dies als Erklärung für das erhöhte Dilutionspotential dienen.

Die beiden Zellklone G121R und T233R liegen in vivo in der Zellmembran nicht in ausreichender Konzentration vor, um dort wirken zu können. Hier erreichten sie nur durch pharmakologische Behandlung in vitro die Zellmembran und wurden dort exprimiert. Auch die Expression an der Zelloberfläche wirkte sich nicht auf den Magnesiumflux aus. Der G121R-Zellklon liegt in der dritten transmembranären Domäne, wobei die neutrale Aminosäure Glycin durch den positiv geladenen Baustein Arginin ersetzt wird. Wie in LLC-PK1-Zellen, wo dieses Protein in Tight Junctions exprimiert wird (Hou et al., 2005), könnte es durch eine differente Proteinstruktur zu dieser veränderten Funktion kommen. Im T233R-Zellklon, der intrazellulär am COOH-Ende des Proteins lokalisiert ist, ist die alkoholische Aminosäure Tryptophan durch das positiv geladene Arginin ersetzt. Hier wurde durch Müller et al. (2003) gezeigt, dass dieser Zellklon zur Funktion auf die Bindungsdomäne ZO-1 angewiesen ist.

Die in dieser Arbeit untersuchten Varianten wurden ohne (H71D, L75P, G128A, R146T) bzw. mit (G121R, T233R) pharmakologischer Behandlung in die Tight Junction eingebaut. Vermutlicherweise durch eine veränderte Sekundär- oder Tertiärstruktur des Claudin-16-Proteins kam es im Gegensatz zu WT Claudin-16 zu einem verminderten Magnesiumflux. Dieser verringerte Transport kann die Hypomagnesämie bei Patienten mit FHHNC erklären und die Krankheit als ihre Folge angesehen werden. Es wäre wünschenswert, mehr über molekulare Eigenschaften unterschiedlicher, FHHNC-assoziiierter Claudin-16-Varianten zu erfahren. Insbesondere sollte es ein Ziel sein, die aktuelle, rein symptomatische Therapie und somit auch Folgen und Prognosen der FHHNC zu verbessern.

## 5. Zusammenfassung

Claudin-16 ist ein transmembranäres Protein, das vor allem in der Niere in den medullären und corticalen Anteilen des dicken aufsteigenden Teiles der Henle-Schleife (Kiushi-Siashin et al., 2002) exprimiert wird und dort funktionell mit der Magnesium- und Calciumresorption in Verbindung steht. Mutationen des Proteins stehen in Zusammenhang mit der familiären Hypomagnesämie und Hypercalcurie mit Nephrocalcinose (FHHNC).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktionalität vom Wildtyp des Claudin-16-Proteins (WT Claudin-16) mit den sechs bekannten, der FHHNC assoziierten Mutationsvarianten H71D, L75P, G121R, G128A, R146T und T233R verglichen.

Es erfolgte eine stabile Transfektion (in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Dr. Walter Hunziker des Epithelial Cell Biology Laboratory, Institute of Molecular and Cell Biology, Singapur) von MDCK-C7-Zellen mit cDNA von WT Claudin-16 und der genannten Varianten. Mittels Western Blot und immunhistochemischer konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie konnte eine Expression der Proteine in den transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Nicht in der Zellmembran nachgewiesene Varianten (G121R, T233R) wurden pharmakologisch behandelt, so dass sie schließlich doch an der Zelloberfläche exprimiert wurden. Anschließend erfolgte eine elektrophysiologische Versuchsreihe dieser Zellen. In Ussing-Kammern wurden transepithelialer Widerstand und Dilutionspotentiale gemessen sowie Magnesiumfluxexperimente durchgeführt. Mit Hilfe der Atomabsorptionsspektrometrie wurde der Magnesiumflux bestimmt.

Es konnte ein höherer Magnesiumflux in mit cDNA von WT Claudin-16 transfizierten Zellen im Vergleich zu seinen Varianten nachgewiesen werden. In Widerstand und Dilutionspotential war kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Varianten zu sehen (Ausnahme: Dilutionspotential von L75P).

Diese Arbeit zeigt, dass ein funktionierendes Claudin-16-Protein essentiell für den parazellulären Magnesiumtransport ist und bestätigt die Annahme, dass die untersuchten Varianten eine verminderte Funktionalität aufweisen und somit als Ursache für FHHNC gesehen werden können.

## 6. Abbildungen und Tabellen

Abbildungen:

- Abb. 1 Schematische Abbildung der drei vierfach-transmembranären Tight junction-Proteine Claudin, Occludin und Tricellulin (Ikenouchi et al., 2005; verändert).
- Abb. 2 235 Aminosäuren langes Claudin-16-Molekül in der Zellmembran mit den FHHNC-assoziierten Mutationen (Kausalya/Amasheh et al, 2006).
- Abb. 3 Detektion von Claudin-16 in Vektor-, WT-Claudin-16- und Claudin-16-Varianten-transfizierten MDCK Zellen.
- Abb. 4 Detektion von Claudin-16 (rot) und Occludin (grün) in Vektor-transfizierten MDCK-C7-Zellen.
- Abb. 5 Detektion von Claudin-16 (rot) und Occludin (grün) in Claudin-16-transfizierten MDCK-C7-Zellen.
- Abb. 6 Magnesiumpermeabilität von Einzelzellschichten mit cDNA von WT Claudin-16 und seinen Varianten bzw. ohne cDNA (Kontrolle) stabil transfizierter MDCK-Zellen.
- Abb. 7 Zusammenhang von transepitheliale, elektrischem Widerstand konfluenter Einzelzellschichten stabil transfizierter MDCK-Zellen und der Magnesiumpermeabilität. Es zeigte sich keine Korrelation.
- Abb. 8 Verhältnisse von Natriumpermeabilität zu Chloridpermeabilität ( $P_{Na}/P_{Cl}$ ) von Einzelzellschichten stabil transfizierter MDCK-Zellen. Mit Ausnahme der Variante L75P konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.

Tabellen:

- Tab. 1 Vorkommen und Funktion verschiedener Claudine in der Übersicht.
- Tab. 2 Lokalisation und Defekt verschiedener Claudin-16-Varianten assoziiert mit FHHNC (Kausalya/Amasheh et al, 2006).
- Tab. 3 Berechnete Magnesiumpermeabilität in cm/h der analysierten transfizierten MDCK-C7-Zellen.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Acharya P, Beckel J, Ruiz W G, Wang E, Rojas R, Birder L, Apodaca G (2004) Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 287: F305-F318
2. 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: 2683-2693
3. Al Moustafa AE, Alaoui-Jamali MA, Batist G, Hernandez-Perez M, Serruya C, Alpert L, Black M J, Sladek R, Foulkes W D (2002) Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. *Oncogene* 21(17): 2634-2640
4. Amasheh S, Meiri N, Gitter A H, Schöneberg T, Mankertz J, Schulzke J D, Fromm M (2002) Claudin-2 induces cation-selective channels in tight junction of epithelial cells. *J. Cell Sci.* 115: 4969- 4976
5. Amasheh S, Schmidt T, Mahn M, Florian P, Mankertz J, Tavalali S, Gitter A H, Schulzke J D, Fromm M (2005) Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junction of epithelial cells. *Cell. Tiss. Res.* 321(1): 89-96
6. Anderson J M (2001) Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol. Sci.* 16: 126-130
7. Benigno V, Canonica C S, Bettinelli A, von Vigier R O, Truttmann A C, Bianchetti M G (2000) Hypomagnesemia-hypercalciuria-nephrocalcinosis: a report of nine cases and a review. *Neprol. Dial. Transplant.* 15: 605-610
8. Bettinelli A, Bianchetti M G, Girardin E, Caringella A, Cecconi M, Claris Appiani AC, Pavanello L, Gastaldi R, Isimbaldi C, Lama G, Marchesoni C, Matteucci C, Patriarca P L, Di Natale B, Setzu C, Vitucci P (1992) Use of calcium excretion values to distinguish two forms of primary renal tubular hypokalemic alkalosis: Bartter and Gitelman syndromes. *J. Pediatr.* 120: 38–43
9. Blanchard A, Jeunemaitre X, Coudol P, Dechaux M, Froissart M, May A, Demontis R, Fournier A, Paillard M, Houillier P (2001) Paracellin-1 is



- critical for magnesium and calcium reabsorption in the human thick ascending limb of Henle. *Kidney Int.* 59: 2206-2215
10. Boireau S, Buchert M, Samuel MS, Pannequin J, Ryan JL, Choquet A, Chapuis H, Rebillard X, Avances C, Ernst M, Joubert D, Mottet N, Hollande F (2006) DANN-methylation-dependent alterations of claudin-4 expression in human bladder carcinoma. *Carcinogenesis* 28(2): 246-258
  11. Coyne C B, Gambling T M, Boucher R C, Carson J L, Johnson L G (2003) Role of Claudin Interactions in Airway Tight Junctional Permeability. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 285: L1166-L1178
  12. Enck A H, Berger U V, Yu A S (2001) Claudin-2 is selectively expressed in proximal mouse kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 281(5): F966-F974
  13. Fanning A S, Mitic L L, Anderson J M, (1999) Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J Am. Soc. Nephrol.* 10: 1337-1345
  14. Florian P, Amasheh S, Lessidrensky M, Todt I, Bloedow A, Ernst A, Fromm M, Gitter A H (2003) Claudins in the tight junctions of stria vascularis marginal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304: 5-10
  15. Folsch H, Ohno H, Bonifacino J S, Mellman I (1999) A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* 99: 189-198
  16. Fukuhara A, Irie K, Nakanishi H, Takekuni K, Kawakatsu T, Ikeda W, Yamada A, Katata T, Honda T, Sato T, Shimuzu K, Ozaki H, Horiuchi H, Kita T, Takai Y (2002) Involvement of nectin in the localization of junctional adhesion molecule at the tight junctions. *Oncogene* 21(50): 7642-7655
  17. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell. Biol.* 123: 1777-1788
  18. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at the tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell. Biol.* 141: 1539-1550
  19. Furuse M, Sasaki H, Tsukita S (1999) Manner of heterogenous claudin species within and between tight junction strands. *J. Cell. Biol.* 147: 891-903
  20. 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-efficient mice. *J. Cell. Biol.* 156: 1099-1111
21. Gekle M, Wunsch S, Oberleitner H, Silbernagel S (1994) Characterization of two MDCK-cell subtypes as a model system to study principal cell and intercalated cell properties. *Pflügers Arch.* 428: 157-162
  22. Geven W B, Monnens L A, Willems J L, Buijs W, Hamel C J (1987) Isolated autosomal recessive renal magnesium loss in two sisters. *Clin. Genet.* 32(6): 398-402
  23. Geven W B, Monnens L A, Willems H L, Buijs W C, ter Haar B G (1987) Renal magnesium wasting in two families with autosomal dominant inheritance. *Kidney Int.* 31(5): 1140-1144
  24. Gitelman H J, Graham J B, Welt L G (1966) A new familial disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia. *Trans. Assoc. Am. Physicians* 79:221-235
  25. Gonzales-Mariscal L, Chavez de Ramirez B, Cereijido M (1985) Tight junction formation in cultured epithelial cells (MDCK). *J. Membr. Biol.* 86 : 113-125
  26. Gow A, Southwood C M, Li J S (2000) CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in OSP/ claudin-11. *J. Neurosci. Res.* 60: 284-290
  27. Gregoric A, Bracic K, Novljan G, Marcun-Varda N (2000) Pseudotumor cerebri in a child with familial hypomagnesemia-hypercalciuria. *Pediatr. Nephrol.* 14(3): 269-270
  28. Heiskala M, Peterson P A, Yang Y (2001) The roles of claudin superfamily in paracellular transport. *Traffic* 2: 293-298
  29. Heuser J E, Anderson R G (1989) Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J. Cell Biol.* 108: 389-400
  30. Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ (2006) The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissue. *BMC Cancer* 6(1): 186 (pp 1-8)
  31. Hoevel T, Macek R, Mundigl O, Swisshelm K, Kubbies M (2002) Expression and targeting of the tight junction protein CLDN1 in CLDN1-negative human breast tumor cells. *J. Cell. Physiol.* 191(1): 60-68

32. Hou X, Mrug M, Yoder B K, Lefkowitz E J, Kremmidiotis G, D'Eustachio P, Beier D R, Guay-Woodford L M (2002) Cystin, a novel cilia-associated protein, is disrupted in the cpk mouse model of polycystic kidney disease. *J. Clin. Invest.* 109(4): 533-540
33. Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita Sachiko, Tsukita Shoichiro (2005) Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J. Cell Biol.* 171(6): 939-945
34. Jarosch E, Geiss-Friedlander R, Meusser B, Walter J, Sommer T (2002) Protein dislocation from the endoplasmic reticulum – pulling out the suspect. *Traffic* 3: 530-536
35. Jeansonne B, Lu Q, Goodenough D A, Chen Y H (2003) Claudin-8 interacts with multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) and reduces paracellular conductance in epithelial cells. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 49: 13-21
36. Kang J H, Choi H J, Cho H Y, Lee J H, Ha I S, Cheong H I, Choi Y (2005) Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis associated with CLDN16 mutations. *Pediatr. Nephrol.* 20(10): 1490-1493
37. Kausalya P J, Amasheh S, Günzel D, Wurps H, Müller D, Fromm M, Hunziker W (2006) Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg<sup>2+</sup> transport function of Claudin-16. *J. Clin. Invest.* 116: 878-891
38. 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 segment. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13: 875-886
39. Konrad M, Schlingmann K P, Gudermann T (2004) Insights in the molecular nature of magnesium homeostasis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 286: F599-F605
40. Kreusel K M, Fromm M, Schulzke J D, Hegel U (1991) Cl-secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6). *Am. J. Physiol.* 261: C574-C582
41. Lamas M, Gonzalez-Mariscal L, Gutierrez R (2002) Presence of claudins mRNA in the brain. Selective modulation of expression by kindling epilepsy. *Mol. Brain Res.* 104: 250-254
42. Lee NP, Tong MK, Leung PP, Chan VW, Leung S, Tam PC, Chan KW, Lee KF, Yeung WS, Luk JM (2006) Kidney claudin-19: localization in distal

- tubules and collecting ducts and dysregulation in polycystic renal disease. *FEBS Lett.* 580(3): 923-931
43. Li W Y, Huey C L, Yu A S (2004) Expression of claudin-7 and -8 along the mouse nephron; *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 286: F1063-F1071
  44. Liebner S, Fischmann A, Rascher G, Duffner F, Grote E H, Kalbacher H, Wolburg H (2000) Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta. Neuropathol. (Berl.)* 100: 323-331
  45. Luk J M, Tong M K, Mok B W, Tam P C, Yeung W S, Lee K F (2004) Sp1 site is crucial for the mouse claudin-19 gene expression in the kidney cells. *FEBS Lett.* 578: 251-256
  46. Madin S H, Darby N B (1958) American type culture collection. *Catalog of strains* 2: 574- 576
  47. Manz F, Scharer K, Janka P, Lombeck J (1978) Renal magnesium wasting, incomplete tubular acidosis, hypercalciuria and nephrocalcinosis in siblings. *Eur. J. Pediatr.* 128:67–79
  48. Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E (1998) Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J. Cell Biol.* 142: 117-127
  49. Meza I, Ibarra G, Sabanero M, Martinez-Palomo A, Cereijido M (1980) Occluding junctions and cytoskeletal components in a cultured transporting epithelium. *J. Cell Biol.* 87: 746-754
  50. Michelis M F, Drash A L, Linarelli L G, De Rubertis F R, Davis B B (1972) Decreased bicarbonate threshold and renal magnesium wasting in a sibship with distal renal tubular acidosis (Evaluation of the pathophysiological role of parathyroid hormone). *Metabolism* 21: 905–920
  51. Montgomery E, Mamelak AJ, Gibson M, Maitra A, Sheikh S, Amr SS, Yang S, Brock M, Forastiere A, Zhang S, Murphy KM, Berg KD (2006) Overexpression in esophageal adenocarcinoma and its precursor lesions. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 14(1): 24-30

52. Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S (1999) Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 511-516
53. Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S (1999) Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J. Cell Biol.* 147: 185-194
54. Müller D, Kausalya P J, Bockenhauer D, Tumfart J, Meij I C, Dillon M J, Van't Hoff W, Hunziker W (2006) Unusual clinical presentation and possible rescue of a novel claudin-16 mutation. *J. Clin. Endocrin. Metab.* 91(8): 3076-3079
55. Müller D, Kausalya P J, Claverie-Martin F, Meij I C, Eggert P, Garcia-Nieto C, Hunziker W (2003) A novel claudin 16 mutation associated with childhood hypercalciuria abolishes binding to ZO-1 and results in lysosomal mistargeting. *Am. J. Hum. Genet.* 73: 1293-1301
56. Müller D, Kausalya P J, Meij I C, Hunziker W (2006) Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: blocking endocytosis restores surface expression of a novel claudin-16 mutant that lacks the entire C-terminal cytosolic tail. *Hum. Mol. Genet.* 15(7): 1049-1058
57. Nicholson J C, Jones J L, Powell H R, Walker R G, McCredie D A (1995) Familial hypomagnesemia – hypercalciuria leading to end-stage renal failure. *Pediatr. Nephrol.* 9: 74-76
58. Niimi T, Nagashima K, Ward J M, Mino P, Zimonjic D B, Popescu N C, Kimura S (2001) Claudin-18, a novel downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor, encodes lung- and stomach-specific isoforms through alternative splicing. *Mol. Cell. Biol.* 21: 7380-7390
59. Praga M, Vara J, Gonzalez-Parra E, Andres A, Alamo C, Araque A, Ortiz A, Rodicio J L (1995) Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Pediatr. Nephrol.* 10(2): 151
60. Rahner C, Miltic 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: 411-422

61. Rodríguez-Soriano J, Vallo A (1994) Pathophysiology of the renal acidification defect present in the syndrome of familial hypomagnesaemia-hypercalciuria. *Pediatr. Nephrol.* 8(4): 431-435
62. Rodriguez-Soriano J, Vallo A, García-Fuentes M (1987) Hypomagnesaemia of hereditary renal origin. *Pediatr. Nephrol.* 1(3): 465-472
63. Schneeberger E, Lynch R D (2004) The tight junction: a multifunctional complex. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286: 1213-1228
64. Simon D B, Lu Y, Choate K A, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton R P (1999) Paracellin-1, a renal Tight Junction Protein Required for Paracellular Mg<sup>2+</sup> Resorption. *Science* 285(5424): 103-106
65. Sirotkin H, Morrow B, Saint-Jore B, Puech A, Das Gupta R, Patanjali S R, Skoultchi A, Weissmann S M, Kucherlapati R (1997) Identification, characterization, and precise mapping of a human gene encoding a novel membrane-spanning protein from the 22q11 region deleted in velo-cardio-facial-syndrome. *Genomics* 42: 245-51
66. Sitia R, Braakman I (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature* 426: 891-894
67. Sobel G, Nemeth J, Kiss A, Lotz G, Szabo I, Udvarhelyi N, Schaff Z, Paska C (2006) Claudin 1 differentiates endometrioid and serous papillary endometrial adenocarcinoma. *Gynecol. Oncol.* 103(2): 591-598
68. Soini Y, Tommola S, Helin H, Martikainen P (2006) Claudins 1, 3, 4 and 5 in gastric carcinoma, loss of claudin expression associates with the diffuse subtype. *Virchows Arch.* 448(1): 52-58
69. Songyang Z, Fanning AS, Fu C, Xu J, Marfatia SM, Chishti AH, Crompton A, Chan AC, Anderson JM, Cantley LC (1997) Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 275(5296): 73-77
70. 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
71. Tajima T, Nakae J, Fujieda K (2003) Two heterozygous mutations of CLDN16 in a Japanese patient with FHHNC. *Pediatr. Nephrol.* 18(12): 1280-1282

72. Tasic V, Dervisov D, Koceva S, Weber S, Konrad M (2005) Hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: case report and a family study. *Pediatr. Nephrol.* 20(7): 1003-1006
73. Tebbe B, Mankertz J, Schwarz C, Amasheh S, Fromm M, Assaf C, Schultze-Ehrenburg U, Sanchez Ruderish H, Schulzke JD, Orfanos C E (2002) Tight junction proteins: a novel class of integral membrane proteins. Expression in human epidermis and in HaCaT keratinocytes. *Arch Dermatol. Res.* 294: 14-18
74. Terris B, Blaveri E, Crnogorac-Jurcevic T, Jones M, Missiaglia E, Ruzniewski P, Sauvanet A, Lemoine N R (2002) Characterization of gene expression profiles in intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. *Am. J. Pathol.* 160:1745-1754
75. Tsukita S, Furuse M (1998) Overcoming barriers in the study of tight junctions: from occludin to claudin. *Genes Cells* 3: 569-573
76. Tsukita S, Furuse M (1999) Occludin and claudins in tight junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell. Biol.* 9: 268-273
77. Tsukita S, Furuse M, Itoh M (1999) Structural and signalling molecules come together at tight junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 628-633
78. Tsukita S, Furuse M (2000) Pores in the Wall: Claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J. Cell. Biol.* 149: 13-16
79. Tsukita S, Furuse M, Itoh M (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 285-293
80. Turksen K, Troy T C (2001) Claudin-6: A novel tight junction molecule is developmentally regulated in mouse embryonic epithelium. *Dev. Dyn.* 222: 292-300
81. Turksen K, Troy T C (2002) Permeability barrier dysfunction in transgenic mice overexpressing claudin 6. *Development* 129: 1775-1784
82. Turksen K, Troy T C (2004) Barriers built on claudins. *J. Cell Sci.* 117: 2435-2447
83. Ulloa-Aguirre A, Janovick J A, Brothers S P, Conn P M (2004) Pharmacologic rescue of conformationally-defective proteins: implications for the treatment of human disease. *Traffic* 5: 821-837
84. Usami Y, Chiba H, Nakayama F, Ueda J, Matsuda Y, Sawada N, Komori T, Ito A, Yokozaki H (2006) Reduced expression of claudin-7 correlates with

- invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Hum. Pathol.* 37(5): 569-577
85. Ussing H H, Zerahn K (1951) Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuit isolated frog skin. *Acta Physiol. Scand.* 23: 110-127
  86. 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 –1327
  87. Van Itallie C M, Anderson J M (2004) The Role of Claudins in Determining Paracellular Charge Selectivity. *Proc. Am. Thoracic Soc.* 1: 38-41
  88. Weber S, Hoffmann K, Jeck N, Saar K, Boeswald M, Kuwertz-Broeking E, Meij II, Knoers NV, Cochat P, Sulakova T, Bonzel KE, Soergel M, Manz F, Schaerer K, Seyberth HW, Reis A, Konrad M (2000) Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis maps to chromosome 3q27 and is associated with mutations in the PCLN-1 gene. *Eur. J. Hum. Genet.* 8(6): 414-422
  89. Weber S, Schlingmann K, Peters M, Niemann Nejsum L, Nielsen S, Engel H, Grzeschik K H, Seyberth H W, Gröne H J, Nüsing R, Konrad M (2001) Primary gene structure and expression studies of rodent paracellin-1. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: 2664-2672
  90. Weber S, Schneider L, Peters M, Misselwitz J, Rönnefarth G, Böswald M, Bonzel K E, Seemann T, Suláková T, Kuwertz-Bröking E, Gregoric A, Palcoux J-B, Tasic V, Manz F, Schärer K, Seyberth H W, Konrad M (2001) Novel Paracellin-1 Mutations in 25 Families with Familial Hypomagnesemia with Hypercalciuria and Nephrocalcinosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12:1872-1881
  91. Weiske J, Schöneberg T, Schröder W, Hatzfeld M, Tauber R, Huber O (2001) The fate of desmosomal proteins in apoptic cells. *J. Biol. Chem.* 276: 41175-81
  92. Wilcox E R, Burton Q L, Naz (2001) Mutation in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB 29. *Cell* 104: 165-172



93. Wolf M T, Dötsch J, Konrad M, Böswald M, Rascher W (2002) Follow-up of five patients with FHHNC due to mutations in the Paracellin-1 gene. *Pediatr. Nephrol.* 17(8): 602-608
94. 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: 17350-17359; Erratum in *J. Biol. Chem.* (2004) 279: 51714
95. Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD (2006) 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(1): 61-72
96. Zimmermann B, Plank C, Konrad M, Stohr W, Gravou-Apostolatos C, Rascher W, Dötsch J (2006) Hydrochlorothiazide in CLDN 16 mutation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21(8): 2127-2132

## 8. Vorpublikationen in Zusammenhang mit dem Dissertationsthema

### Originalarbeit:

Kausalya P J / Amasheh S, Günzel D, **Wurps H**, Müller D, Fromm M, Hunziker W (2006) Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular  $Mg^{2+}$  transport function of Claudin-16. *J. Clin. Invest.* 116: 878-891

### Abstract:

Günzel D, Richter JF, Amasheh S, Hunziker W, Pfaffenbach S, **Wurps H**, Schulzke JD, Fromm M (2005) Stable expression of claudin-16 in MDCK cells: effects on paracellular  $Mg^{2+}$  transport and a transcellular  $Mg^{2+}$ -induced current. *Pflügers Arch.* 449: S99 (Deutsche Physiologische Gesellschaft)

## 9. Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Michael Fromm für die Vergabe des Dissertationsthemas sowie für die herausragende Betreuung und das Engagement während der experimentellen Phase, der Datenauswertung und der Erstellung der schriftlichen Form dieser Dissertation bedanken.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Salah Amasheh für seinen permanenten Einsatz und seine ständige Betreuung während jeder Phase dieser Arbeit. Vor allem danke ich Herrn Amasheh für die Vermittlung molekularbiologischer und elektrophysiologischer Arbeitsmethoden, die gute Anleitung bei der Dokumentation der Daten und Bilder sowie für die Unterstützung bei der Datenauswertung. Jede Frage und jedes entstehende Problem konnte Dank seines ständigen Bemühens gelöst werden.

Auch möchte ich mich sehr bei Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Dorothee Günzel für ihren fortwährenden Einsatz im Rahmen der elektrophysiologischen Versuchsreihen und der Datenverwertung bedanken.

Ohne die herzliche Unterstützung der medizinisch-technischen Assistentinnen des Institutes wäre meine Arbeit kaum zu Ende geführt worden. Ich bedanke mich ganz besonders bei Brigitte Papanis für ihren unermüdlichen Arbeitseinsatz bezüglich der Herstellung der Zellkulturen sowie der Messungen mit dem Atomabsorptionsspektrometer. Auch danke ich Anja Fromm für Ihre Geduld hinsichtlich meiner Fragen bezüglich bestimmter Methoden und deren Durchführung sowie für ihren unermüdlichen Einsatz.

Für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Ussing-Kammer-Versuche möchte ich mich außerdem bei Prof. Alexander Markov, Frederik Baumkötter und Friederike Hirsch bedanken.

Die stets angenehme Atmosphäre am Institut für klinische Physiologie sowie die vielen fachlich anregenden Diskussionen während der Anwesenheit im Institut haben mir die Durchführung und Fertigstellung meiner Arbeit sehr erleichtert.

Weiterhin gilt mein Dank meinen Eltern Dr. Klaus-Dieter und Sabine Wurps sowie meinen Geschwistern Steffen und Marieke. Sie standen mir in allen Phasen der Arbeit stets zur Seite und ihr ständiges Interesse an Fortschritten war eine große Motivation für mich.

## **10. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.



Erklärung an Eides statt

Berlin, 16.05.2007

Ich, Jan Henrik Wurps (geb. 22.11.1979), erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

**„Funktionelle Charakterisierung von Varianten des Tight junction-Proteins Claudin-16“**

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

Henrik Wurps