

Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
aus dem Institut für Klinische Physiologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Fromm

**Abdichtung der Tight Junction
während Aldosteron-stimulierter ENaC-Induktion
im Colon sigmoideum des Menschen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
Charité- Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von
Maike Bergs
aus Berlin

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. M. Fromm

Koreferent: Prof. Dr. med. H. Habazettl

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Datum der Promotion: 27.03.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Tight Junction-Proteine.....	6
1.2	Aldosteron als regulierendes Hormon des Na ⁺ -Haushaltes.....	10
1.3	Der epitheliale Na ⁺ -Kanal (ENaC).....	12
1.4	Ziele	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Material.....	16
2.1.1	Gewebe	16
2.1.2	Geräte	16
2.1.3	Chemikalien	17
2.1.4	Oligonukleotide.....	19
2.1.5	Antikörper.....	19
2.1.6	Marker.....	19
2.1.7	Materialien	19
2.1.8	Puffer und Lösungen.....	20
2.2	Methoden.....	24
2.2.1	Elektrophysiologie	24
2.2.2	Molekularbiologie.....	26
3	Ergebnisse	33
3.1	PCR.....	33
3.2	Elektrophysiologie.....	34
3.2.1	Induktion des epithelialen Na ⁺ -Transports.....	34
3.2.2	Der transepitheliale Widerstand während der Induktion des ENaC.....	35
3.2.3	Nachweis der γ -ENaC-Untereinheit durch Immunfluoreszenzfärbung.....	37
3.3	Nachweis von Tight Junction-Proteinen mittels Western-Blot.....	37
3.3.1	Western-Blot.....	37
3.3.2	Densitometrie	39
3.4	Lokalisation der Tight Junction-Proteine mittels Immunfluoreszenzfärbung	40
3.5	Kontrollexperimente: Effekt von Amilorid	43
4	Diskussion.....	45
4.1	Aldosteron-abhängige Induktion des epithelialen Na ⁺ -Kanals ENaC und die parazelluläre Barriere.....	45
4.2	Regulation der TJ-Proteine während der Induktion von ENaC	46
4.2.1	Occludin während der Induktion von ENaC.....	48
4.2.2	Die Rolle von Claudin-8.....	50
4.2.3	Claudin 7: Lokalisation und Funktion	51
4.2.4	Lokalisation und Rolle von Claudin-1, -4 und -5	51
4.2.5	Mögliche Regulationsmechanismen der Tight Junction während der Induktion des ENaC-abhängigen Na ⁺ -Stroms.....	53
4.2.6	Klinischer Background: Liddle-Syndrom, Pseudohypoaldosteronismus und Mucoviszidose	54
4.3	Schlussfolgerung.....	56
5	Zusammenfassung.....	58
6	Curriculum vitae	59

7	Danksagung.....	60
8	Literaturverzeichnis.....	61
9	Publikationsliste.....	70
10	Erklärung.....	71

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Der parazelluläre Spalt mit netzförmiger Tight Junction	7
Tab. 1.1: Claudine und ihre pathophysiologische Bedeutung	9
Abb. 1.2: Mechanismus der epithelialen Resorption von Na ⁺ durch Aldosteron	11
Abb. 1.3: Regulation des ENaC durch Aldosteron: Intrazelluläre Signaltransduktion	14
Abb. 2.1: Übersicht über die durchgeführten Experimente	24
Abb. 3.1: PCR-Nachweis von Occludin und Claudin-8 im humanen Colon sigmoideum	33
Abb. 3.2: Induktion des ENaC im Colon sigmoideum-der Kurzschlussstrom I _{SC} im Zeitverlauf	34
Abb. 3.3: Elektrogener Na ⁺ -Transport J _{Na}	35
Abb. 3.4: Transepithelialer Widerstand im Zeitverlauf während ENaC-Induktion	36
Abb. 3.5: Transepithelialer Widerstand zum Zeitpunkt 0 h, 8 h und nach Amilorid-Gabe	36
Abb. 3.6: Immunfärbung der γ -ENaC-Untereinheit	37
Abb. 3.7: Western-Blot der Tight Junction-Proteine Occludin und Claudin-1,-4,-5,-7,-8	38
Abb. 3.8: Densitometrische Auswertung der Western-Blots	39
Abb. 3.9: Detektion von Occludin im humanen Colon sigmoideum	40
Abb. 3.10: Immunfluoreszenzfärbung von Claudin-8	41
Abb. 3.11: Detektion von Claudin-1,-4,-5,-7 mittels konfokaler Laserscanning- Mikroskopie	42
Abb. 3.12: Transepithelialer Widerstand während der Induktion von ENaC durch Aldosteron bei gleichzeitiger Hemmung durch Amilorid	43
Abb. 3.13: Western-Blot von Occludin, Claudin-1, -4, -5 und -8 nach initialer Amilorid-Inkubation	44
Abb. 3.14: Densitometrische Auswertung der Western-Blots aus Abb. 3.13	44

1 Einleitung

Epithelien bedecken alle inneren und äußeren Körperoberflächen, begrenzen Kompartimente in unserem Körper und dienen so der Aufrechterhaltung der inneren Homöostase. Gleichzeitig sind sie die Grundlage für einen kontrollierten Transport von Soluten und Wasser. Sie gewährleisten durch Resorption und Sekretion Stoffwechselfunktionen wie die Verdauung im Gastrointestinaltrakt, die Harnbildung in der Niere und die Sauerstoffaufnahme und Surfactantsekretion in der Lunge.

Der Transport von Wasser und Soluten durch Epithelien kann prinzipiell auf zwei Wegen, trans- und parazellulär, erfolgen. Beim transzellulären Transport bilden die apikale und die basolaterale Zellmembran die zu überwindende Barriere. Der parazelluläre Transport führt durch den Interzellularspalt, dessen Dichtheit vor allem durch die Tight Junction (lat.: *Zonula occludens*, Schlussleiste) bestimmt wird^{14, 19}. Es existieren nach gegenwärtigem Kenntnisstand bei Warmblütern mehr als 26 verschiedene Tight Junction-Proteine, die sich in unterschiedlicher Kombination zusammenlagern können. Die parazelluläre Permeabilität bzw. Abdichtung wird durch das Expressionsmuster dieser Proteine und durch die ultrastrukturelle Ausdehnung der Tight Junction bestimmt².

1.1 Tight Junction-Proteine

Tight Junction-Proteine sind transmembranäre Proteine, die nicht nur den Interzellularspalt abdichten (lat.: *occludere* = verschließen), sondern gleichzeitig die Zellen miteinander verbinden und Signale von ihnen empfangen¹⁶. Morphologisch erscheinen sie als netzförmiger Gürtel (lat.: *zonula*)^{4,18}, der sich aus perlschnurartigen Strängen zusammensetzt, und verlaufen um den apikalen Bereich der Zelle¹⁵ (Abb. 1.1). Zum einen korreliert die Breite des Schlussleistennetzes mit der transepithelialen Permeabilität^{19,18}, zum anderen bestimmen einzelne Tight Junction-Proteine die spezifische Dichtheit bzw. Permeabilität der parazellulären Barriere. Je nach Grad der Abdichtung unterscheidet man zwischen dichten und lecken Epithelien¹⁸.

Bei dichten Epithelien ist die Schlussleiste weniger durchlässig als die apikale Zellmembran. Dadurch erfolgt der Transport vorwiegend transzellulär. Über die abdichtende Schlussleiste kann ein Gradient aufgebaut und erhalten werden. Bei lecken Epithelien kann kein nennenswerter

Gradient aufgebaut werden, da die Schlussleiste permeabler ist als die apikale Zellmembran. Der Transport findet transzellulär und je nach Gradient auch parazellulär statt.

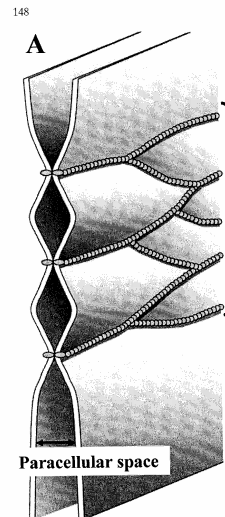


Abb. 1.1: Der parazelluläre Spalt mit netzförmiger Tight Junction

Quelle: Chiba H et al.¹⁷

Nach dem heutigen Wissensstand werden vier unterschiedliche Typen transmembranärer Tight Junction-Proteine unterschieden: Occludin³², Claudine³³, Junctional Adhesion Molecule (JAM)⁵⁶ und Tricellulin⁴⁶.

Occludin wurde 1993 als erstes Tight Junction-Protein mit einer Größe von etwa 65 kDa identifiziert. Es besitzt vier transmembranäre Domänen³². Nachfolgende Studien zeigten anhand von Occludin-Knock-out-Mäusen⁷⁸ und Madin Darby Canine Kidney-Zellen (MDCK-Zellen)⁷⁵, dass ihm wahrscheinlich keine essentielle Barrierefunktion zukommt. Es wird aber diskutiert, ob es in der Differenzierung gastrischer Epithelien⁷⁸ und bei der interzellulären Signaltransduktion eine Rolle spielt⁷⁵.

JAM-Proteine wurden erstmals 1998 charakterisiert^{56,59}. Sie werden mit der Leukozyten-Transmigration im Rahmen von entzündlichen Erkrankungen⁵¹ und der Differenzierung von Spermatozyten während der Spermatogenese in Verbindung gebracht³⁸.

Tricellulin ist ein Tight Junction-Protein mit vier Transmembrandomänen, welches vorwiegend in trizellulären Verbindungsstellen von Epithelzellen nachgewiesen werden kann⁴⁶. Mutationen im Tricellulin-Gen können zu Taubheit führen, wie von Riazuddin et al. 2006 beschrieben worden ist⁷³.

Claudin-1 und -2, die ersten beiden Mitglieder der Claudin-Superfamilie, wurden 1998 von Furuse et al. nachgewiesen³³. Inzwischen sind beim Menschen über 20 verschiedene Claudine mit

einer Größe von ca. 23 kDa bekannt⁸⁸. Bevor die Claudine einer Superfamilie zugeordnet wurden, waren einige von ihnen schon unter anderen Namen beschrieben⁸⁷; Claudin-3 als RVP1, Claudin-4 als CPE-R, Claudin-5 als TMVCF, Claudin-11 als OSP¹¹ und Claudin-16 als Paracellin-1⁷⁹. Mittels Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie konnte die Architektur der Tight Junction näher beurteilt werden. Die paarig verlaufenden Tight Junction Stränge sind punktförmig extrazellulär verknüpft³³. In diesen Strängen konnten Claudine in verschiedenen Kombinationen als Heteropolymere nachgewiesen werden³⁴.

Die einzelnen Proteine der Claudin-Familie weisen unterschiedliche funktionelle Charakteristika auf. Claudin-1 beispielsweise verringert die parazelluläre Permeabilität und stellt für Moleküle bis 600 kDa eine Barriere dar³⁶. Claudin-5 verhindert den parazellulären Transport von niedermolekularen Soluten (< 800 D)⁶⁷ und monovalenten Kationen⁹². Claudin-4 und -8 erhöhen die kationenselektive Barriere^{91,94}. Für Claudin-8 wurde kürzlich gezeigt, dass es nicht nur für Alkalimetallionen, sondern auch für divalente Kationen und Protonen eine abdichtende Funktion hat⁵. Im Gegensatz zu den eben genannten Proteinen bildet Claudin-2 kationenselektive Poren^{2,35}. Auch Claudin-7 wurde als Cl⁻-permeable Pore charakterisiert¹ und Claudin-16 bildet einen Mg²⁺-Kanal^{79,50}. Alle drei erhöhen damit die parazelluläre Permeabilität.

Je nach Organ, Gewebe und dessen Funktion sind die Tight Junctions molekular unterschiedlich zusammengesetzt. Claudin-1 und -3 wurden in Tight Junctions von Keratinozyten der Epidermis lokalisiert^{36,85}. In der Tight Junction von Endothelien wurde insbesondere Claudin-5 nachgewiesen^{86,64} und Claudin-6 wird vorwiegend embryonal exprimiert⁸⁶. Claudin-11 wurde besonders hoch konzentriert im Myelin und in Sertoli-Zellen des zentralen Nervensystems¹⁵ und des Hodens³⁸ sowie in der Stria vascularis des Innenohrs⁵² nachgewiesen. Claudin-19 wurde in Tight Junctions von Schwann-Zellen peripherer Axone beschrieben⁶².

Claudine interagieren mit einigen zytosolischen Proteinen wie ZO-1, AF 6 und dem myosinbindenden Cingulin. Einerseits wird über diese Proteinverbindungen die Gerüstmorphologie der Tight Junction-Proteine aufrechterhalten, andererseits sind sie so mit dem Aktin-Zytoskelett der Zelle verbunden, was vielfältige Möglichkeiten für eine Signaltransduktion zwischen cytoplasmatischen und membranständigen Tight Junction-Proteinen darstellt⁴⁰.

Mutationen in einzelnen Claudinen sind mit unterschiedlichen Krankheitsbildern assoziiert (Tab. 1.1).

Tabelle 1.1: Claudine und ihre pathophysiologische Bedeutung

<u>Pathophysiologische Bedeutung/ Assoziation</u>	<u>Organ</u>	<u>Claudin</u>	<u>Referenz</u>
NISCH-Syndrom (neonatale sklerosierende Cholangitis mit Ichthyosis)	Epidermis, Cholangiozyten	Claudin-1	39
Kolorektales Karzinom	Colon, Rektum	Claudin-1	61
Kollagene Colitis	Colon	Claudin-4 (& Occludin)	12
Chron. entzündl. demyelinisierende Polyneuropathie	Endoneurale Gefäße	Claudin-5	49
Hepatozelluläres Karzinom (Krankheitsverlauf)	Leber	Claudin-10	81
Autoimmun- demyelinisierende Erkrankungen des ZNS	ZNS	Claudin-11	11
Taubheit	Innenohr/ Cochlea	Claudin-14 Claudin-11	52, 8
Hypomagnesiämie	Niere	Claudin-16	79
Selbstlimitierende Hyperkalzurie beim Kind	Niere	Claudin-16	65

Diskutiert wird, ob Claudinen auch in der Diagnostik eine größere Bedeutung zukommt. 2002 belegten Studien, dass Claudin-4 in der frühen bis mittlutealen Phase im Endometrium in 4- bis 12-fach höherer Konzentration exprimiert wird. Lessey et al. formulieren dass es somit eventuell als neuer Marker für die Empfängnisbereitschaft benutzt werden könnte¹³.

Es ist außerdem bekannt, dass Viren und Bakterien Tight Junctions in ihrer Zusammensetzung verändern können. Claudin-3 und -4 beispielsweise sind Rezeptoren für *Clostridium perfringens*-Enterotoxin (CPE), das Lebensmittelvergiftungen hervorrufen kann. Nachdem CPE am Claudin gebunden hat, wird dieser Komplex von der Zelle internalisiert und stört die Tight Junction-Funktion. Zusätzlich können einige Toxine wie vom enteropathogenetischem *E. coli*, *Corynebacterium diphtheriae* und *Clostridium difficile* über eine Veränderung der Aktin-Organisation

und Phosphorylierungsvorgänge die Tight Junction-Morphologie stören und durch den Barriereverlust zu einer starken Diarrhoe führen⁷⁷.

2004 beschrieben Yu et al., dass sich die Claudin-8-Expression in der Niere auf die Aldosteron-sensitiven Tubulusabschnitte beschränkt. Dasselbe gilt für Claudin-7, welches jedoch vorwiegend in der basolateralen Membran lokalisiert ist^{57, 53, 30}.

Diese Beobachtung warf die Frage auf, ob die Expression beider Claudine durch Aldosteron oder einen Aldosteron-abhängigen Mechanismus beeinflusst wird⁵⁷. Schon Stelwagen et al. hatten 1999 die Glukokortikoid-abhängige Induktion des Occludin in Drüsenzellen nachgewiesen⁸⁴. Förster et al. (2005) konnten diese Ergebnisse bestätigen, indem sie die Aldosteron-abhängige Induktion von Occludin in den kapillären Endothelzellen des Gehirns *in vitro* demonstrierten²⁶.

Dass möglicherweise auch Claudine von Aldosteron-vermittelten regulativen Prozessen betroffen sind, zeigten Le Moellie et al. (2005)⁶³. Sie konnten eine Aldosteron-induzierte Phosphorylierung von Claudin-4 in den Sammelrohrepithelien der Niere nachweisen.

Es stellte sich nun grundsätzlich die Frage, welche Auswirkungen die aldosteronabhängige Induktion des epithelialen Na⁺ Kanals (ENaC) auf die Expression von Tight Junction-Proteinen im Colon sigmoideum hat.

1.2 Aldosteron als regulierendes Hormon des Na⁺-Haushaltes

Aldosteron wird in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde produziert. Es gehört zur Gruppe C21-Steroide und besitzt als solches sowohl Mineralo- als auch – allerdings erst in unphysiologisch hoher Konzentration – Glukokortikoidwirkung⁸⁰. Die Aldosteron-Sekretion wird über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) reguliert. Eine Schlüsselposition in der Regulation des RAAS nimmt der juxtaglomeruläre Apparat der Niere ein, dessen Rezeptoren sich in den Seitenwänden der glomerulären afferenten Arteriolen befinden⁹³. Bei vermindertem intravasalem Volumen, verminderter Na⁺- oder erhöhter K⁺-Blutkonzentration, steigt die Reninsekretion⁸⁰. Dieses proteolytische Enzym spaltet Angiotensinogen, wodurch Angiotensin I entsteht, welches wiederum durch das ACE (angiotensin converting enzyme) zu Angiotensin II umgesetzt wird. Angiotensin II stimuliert die Aldosteron-Synthetase in der Nebennierenrinde, welche die drei letzten Schritte der Aldosteron-Biosynthese katalysiert. Es entsteht Aldosteron⁸⁰.

Aldosteron ist eines der Schlüsselhormone bei der Regulation des Blutdrucks. Es wirkt am distalen Tubulus der Niere über eine Steigerung der Na⁺-Resorption und der K⁺-Sekretion. Der

Transport beider Elektrolyte verläuft aneinander gekoppelt. An der basolateralen Membran erfolgt er als primär aktiver Transport durch die ATP-abhängige $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. Diese pumpt zwei K^+ -Ionen in die Zelle und drei Na^+ -Ionen vom Intrazellulär- in den Extrazellulärraum. So entsteht ein elektrochemischer Gradient, der zur Diffusion von Na^+ -Ionen über den epithelialen Na^+ -Kanal (ENaC) in die Zelle und von K^+ -Ionen aus der Zelle über K^+ -Kanäle an der apikalen und basolateralen Membran führt (Abb. 1.2).

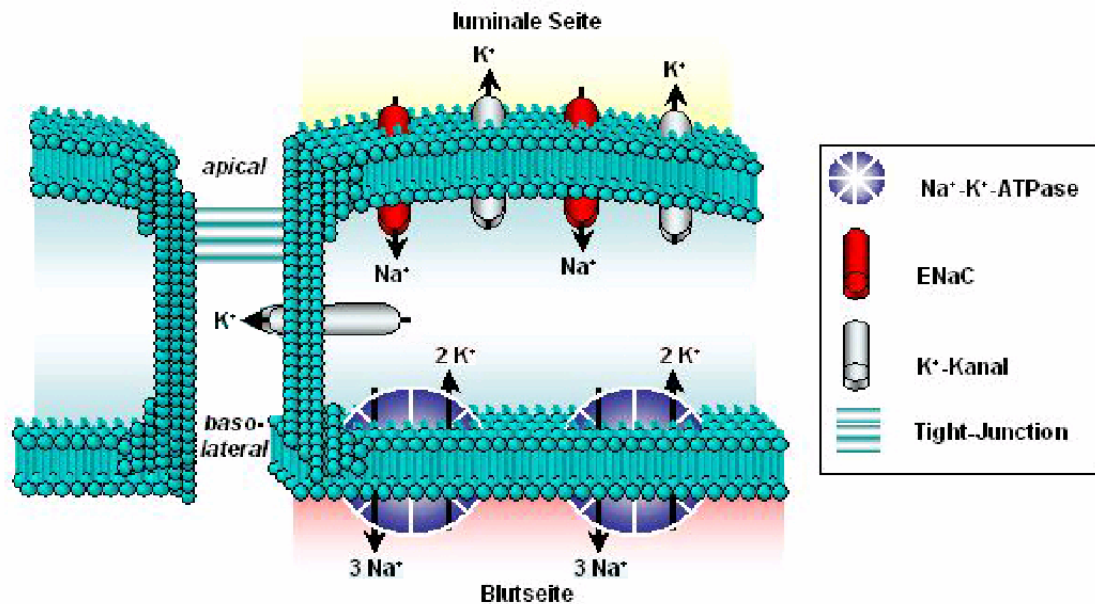


Abb. 1.2: Mechanismus der epithelialen Resorption von Na^+ durch Aldosteron

Aldosteron wirkt über die Aktivierung des intrazellulären Mineralokortikoid-Rezeptors (hMR). Die Folge ist eine durch die vermehrte Transkription spezifischer Gene gesteigerte Biosynthese von ENaC, der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ sowie K^+ -Kanälen⁹³.

In der Niere ist darüber hinaus ein primärer Effekt der Aldosteronwirkung auf die Modifikation bereits vorhandener Proteine gezeigt worden¹⁰. Über diesen Rapid response-Effekt induziert Aldosteron den ENaC und trägt somit beispielsweise zur Regulation der Orthostase bei. Bei Änderung der Körperposition von der horizontalen in die senkrechte Lage wird vermehrt Aldosteron ausgeschüttet. Die Bedeutung dieser Aldosteron-Ausschüttung könnte darin liegen, dass über die Schaffung eines transzellulären Gradienten eine Wasserresorption ins Interstitium erreicht und so in Kombination mit weiteren physiologischen Komponenten einer Umverteilung von zuviel Blutvolumen in die untere Extremität vorgebeugt und die Zirkulation aufrecht erhalten wird. Im Colon kann die Induktion des ENaC dagegen auf rein transkriptioneller Ebene erklärt werden.

1.3 Der epitheliale Na⁺-Kanal (ENaC)

ENaC wird in der apikalen Membran von Salz-resorbierenden Epithelien wie dem distalen Nephron, dem distalen Colon und der Lunge exprimiert⁷⁴. Über den Amilorid-sensitiven ENaC läuft der erste und limitierende Schritt der Na⁺-Resorption. Pathologische Varianten des ENaC sind zum Beispiel mit dem Liddle-Syndrom assoziiert, einer autosomal-dominant vererbten Krankheit, bei der die Patienten eine Hypertension mit Hypokaliämie, niedriger Renin-Plasma-Aktivität und niedrigem Aldosteron-Serumspiegel zeigen⁶⁸.

Zusätzlich wurde ENaC in salzsensitiven Geschmacksrezeptoren des Menschen nachgewiesen und es wird vermutet, dass er bei der Mechanozeption von Wirbeltieren eine Rolle spielt³⁷.

Schon 1987 stellten Fromm et al. im distalen Colon und Rektum der Ratte eine Abnahme der luminalen Na⁺-Konzentration während Aldosteron-Freisetzung unter Anästhesie bis auf 2.2 mmol/l, was einem Lumen-Plasma-Na⁺-Verhältnis von 1:66 entspricht²⁸. 1993 wiesen Fromm et al. die Aldosteron-abhängige Regulation der Na⁺-Resorption im distalen Colon der Ratte nach²⁹. 1995 demonstrierten Epple et al. die gleiche Wirkung nanomolarer Aldosteron-Konzentrationen am humanen Rectum *in vitro*²² und belegten anschließend, dass das Maximum des elektrogenen Na⁺-Transportes nach 8 h Inkubation mit Aldosteron erreicht ist und dieser Effekt durch die Aldosteron-abhängige Induktion von ENaC in der apikalen Zellmembran erzielt wird²³.

ENaC besteht aus drei verschiedenen Untereinheiten α , β , γ , die in der Stöchiometrie $\alpha_2\beta_1\gamma_1$ angeordnet sind^{25,55,24}. Bei der Regulation scheinen der β - und der γ -Untereinheit besondere Bedeutung zu zukommen, da sie unter Aldosteronstimulation vermehrt synthetisiert werden^{6,58}. Aldosteron bewirkt jedoch nur in der Lunge und im distalen Colon eine verstärkte Expression der beiden Untereinheiten des ENaC. In der Niere zeigt es keine Wirkung⁷¹.

Der molekularbiologische Regulationsmechanismus des ENaC ist Gegenstand intensiver Studien. Aktuelle Untersuchungen ergaben, dass Aldosteron zum einen über eine vermehrte Transkription der ENaC-Untereinheiten den Aufbau des funktionellen ENaC im endoplasmatischen Retikulum induziert⁸² und zum anderen über eine Aktivierung der SGK-1 die Endozytose und den Abbau des in der Zellmembran lokalisierten ENaC hemmt⁶⁰. Über die einzelnen Schritte der intrazellulären Signaltransduktion bei ENaC-Induktion durch Aldosteron ist bis dato Folgendes bekannt: Der noch inaktive ENaC wird nach seiner Synthese im ER durch proteolytische Spaltung im Golgi-Apparat aktiviert und anschließend in die Zellmembran integriert. Hier wird er über eine C-terminale spezifische PPXYX Ser/Thr-Sequenz an α -, β - und γ -Untereinheit regu-

liert. Nedd 4-2, eine E3-Ubiquitin-Protein-Ligase, bindet über seine WW-Domäne am PY (PPXY)-Motiv der PPXYX-Sequenz und katalysiert über die Ubiquitinierung dieser C-terminalen Sequenz erst die Internalisierung und dann den endosomalen Abbau des ENaC (Abb. 1.3)^{82,9}. Mutationen dieser Sequenz wie beim Liddle-Syndrom führen zu einem verminderten Abbau des ENaC und somit zu vermehrter Na⁺-Resorption und Bluthochdruck^{31,82}. Nedd 4-2 kann über die SGK-1 durch Phosphorylierung inhibiert und somit der Abbau des ENaC verhindert werden. Neben der Stimulation der SGK-1 durch Aldosteron und Glukokortikoiden regulieren Nedd 4-2 und SGK-1 sich auch gegenseitig⁹⁶. Ferner hemmen zytosolisch veränderte Ionenkonzentrationen, wie erhöhte Mg²⁺²⁰ und Na⁺-Spiegel, die Aktivität des ENaC, letztere über eine ADH-vermittelte Phosphorylierung von Nedd 4-2 durch die PKA⁸² (Abb. 1.3).

Zur Zeit werden zahlreiche weitere Aldosteron-induzierte Signaltransduktionswege, die die Aktivität des ENaC beeinflussen, untersucht. Als Beispiel sei hier die Transduktion über Phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphat (PIP3) genannt. PIP3 bindet in Madin-Darby-Canine-kidney-cells (MDCK) an der N-terminalen Endung der γ -ENaC-Untereinheit und senkt den ENaC-abhängigen Na⁺-Strom⁴¹.

Neben Aldosteron und ADH werden diverse andere hormonale und nicht hormonale Mediatoren als Regulatoren der ENaC-Aktivität diskutiert. Zu der Gruppe der hormonellen Regulatoren gehört vermutlich auch Insulin⁴⁸. Ein Beispiel für nichthormonale Einflüsse ist die inflammatorisch bedingte Downregulation des ENaC über die Zytokine Il-1 β und TNF α bei Colitis ulcerosa, die Barmeyer et al. und Amasheh et al. 2004^{7,3} darstellten.

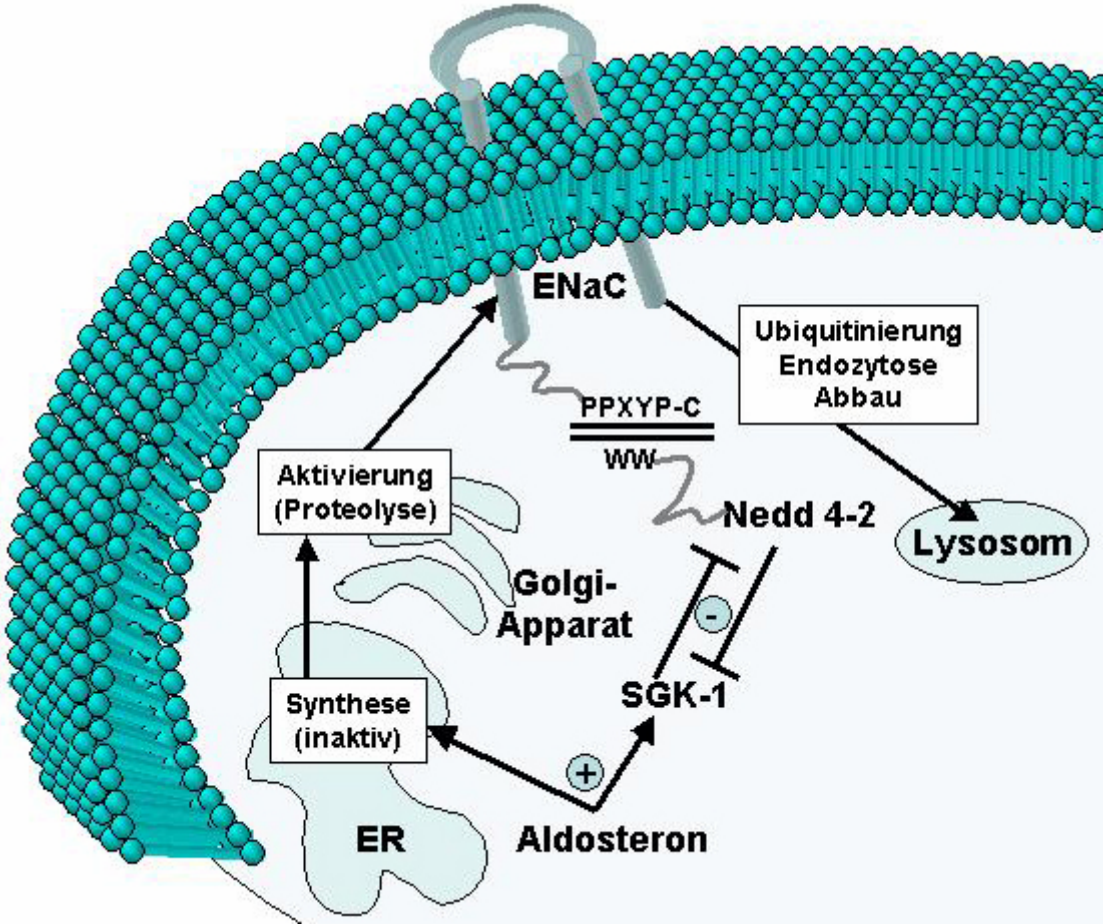


Abb. 1.3: Regulation des ENaC durch Aldosteron: Intrazelluläre Signaltransduktion

1.4 Ziele

Da Na^+ im distalen Colon gegen einen sehr hohen Gradienten transportiert werden kann, stellte sich die Frage, ob hierbei parallel zur Induktion der Na^+ -Resorption eine Regulation der parazellulären Permeabilität erfolgt. Es sollte daher untersucht werden, ob über Aldosteron-, ENaC- oder Na^+ -assoziierte Mechanismen die Expression von Tight Junction-Proteinen beeinflusst wird.

Folgende Ziele wurden verfolgt:

- 1) In vitro-Induktion des Epithelialen Na^+ -Kanals (ENaC) im Colon sigmoideum durch 3 nM Aldosteron

Methode: Ussing-Kammer; Messung des transepithelialen Widerstands, des elektrogeneren Na^+ -Transports (J_{Na}) und des Kurzschluss-Stroms (I_{sc})

- 2) Untersuchung der Auswirkung der Stimulation mit Aldosteron bzw. der ENaC-Induktion auf die Expression und Lokalisation verschiedener Tight Junction-Proteine

Methode: Western-Blot und densitometrische Auswertung, konfokale Laserscanning-Mikroskopie von Immunfluoreszenz-Gewebefärbungen

- 3) Untersuchung der oben genannten Aspekte unter Stimulation mit Aldosteron bei sofortiger Inhibition des Na^+ -Fluxes durch Amilorid-vermittelte ENaC-Blockade

Methode: Western-Blot und densitometrische Auswertung, konfokale Laserscanning-Mikroskopie von Immunfluoreszenz-Gewebefärbungen

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Gewebe

Die Experimente wurden mit humanem Colon sigmoideum durchgeführt. Die Proben stammten von insgesamt 14 Patienten (7 männlich, 7 weiblich) mit Kolonkarzinom, die sich einer Sigmaresektion oder Hemikolektomie links unterziehen mussten. Verwendet wurde tumorfernes gesundes Gewebe. Die Resektate wurden von Pathologen begutachtet und makroskopisch tumorfreies Gewebe mit einem Sicherheitsabstand von mehreren Zentimetern entnommen. Die Patienten waren im Alter von 18- 68 Jahren, durften 7 Tage vor der Operation keine Glukokortikoide eingenommen haben und es durfte keine entzündliche Krankheit vorliegen, da sonst kein objektiver Vergleich von Kontrollgewebe mit Aldosteron-stimuliertem Gewebe möglich gewesen wäre.

2.1.2 Geräte

Agarosegel-Elektrophorese Apparatur	Biorad, München
Duncer	Minikraft, Schweden
GeneAmp PCR System 2400	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Heizblock	Grant, Berlin
Luminiszenzbild Analysator (LAS 100)	Fuji, Düsseldorf
Magnetrührer	Ika-Combimag, München
Mini-Protean-3 Elektrophoresesystem	Biorad, München
Mini Trans-Blot Transfer-Zelle	Biorad, München
Plastikcontainer	Forschungswerkstatt, CBF, Charité, Berlin
Plattenlesegerät Spectra Classic	Tecan, Crailsheim
Power Pac 300	Biorad, München
Schüttler	Biometra, Göttingen
Silikonring	Forschungswerkstatt, CBF, Charité, Berlin

	Ussing-Kammer
	Institut für Klinische. Physiologie, CBF, Charité Berlin
Plattenlesegerät	Tecan Spectra
Wasserbad SW 21/ TWB 5	Julabo, Selbach
Widerstandsmessgerät	Institut für Klinische. Physiologie, CBF, Charité Berlin
Wippe	Hermle Z233MK, Wehingen
Konfokales Laser-Mikroskop	Zeiss LSM, Zeiss, Oberkochen
Zentrifugen	Eppendorf 5414C, Köln Beckmann Ti 70.1 Avanti J25

2.1.3 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Life Technologies, Karlsruhe
Aldosteron	Sigma-Aldrich, Steinheim
Amilorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampli-Taq-Polymerase	Perkin-Elmer, Dreieich
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig
BSA (100x)	BioLabs, Frankfurt am Main
BSA-Standartlg. (Proteinquantifizierung)	Pierce, Bonn
Chloroform	Merck, Berlin
Complete Protease-Inhibitoren	Roche, Mannheim
DAPI	Roche, Mannheim
dATP, dTTP, dCTP, dGTP	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Dithiothreitol 500 mM	Sigma, Taufkirchen
2,5 mEach dNTP-Mix	Roche, Mannheim
EDTA 0,5 M	Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid	Life Technologies, Karlsruhe
Ethanol	J. T. Backer, Deventer, Niederlande
Fluka-Wasser	Fluka Chemie, Buchs
Formaldehyd	Merck, Berlin

Formaldehyd Gel Puffer	Eppendorf, Köln
Formalin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Serva, Heidelberg
Goat-Serum	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
HotStar <i>Taq</i> DNA Polymerase Kit	Qiagen, Hilden
Isopropanol	J. T. Backer, Deventer, Niederlande
Lumi-Light Western-Blotting Kit	Roche, Mannheim
Magermilch	Sucofin, Zeven
MgCl	Perkin-Elmer, Dreieich
Methanol	Merck, Berlin
Na ⁺ -Azid	Sigma, Taufkirchen
1-2 M NaOH	Merck, Berlin
PCR-Puffer	Perkin Elmer, Dreieich
Paraffin	Merck, Berlin
PBS-Tabletten	Life Technologies, Karlsruhe
BCA Protein Assay Reagenz	Pierce, Bonn
ProTags MountFluor	Biocyc, Luckenwalde
Protease-Inhibitoren	Roche, Mannheim
RNAzol B	WAK-Chemie, Bad Soden
SDS	Merck, Berlin
20er-Skalpell Neox	Ansell, Sheffield
SSC 20x	Life Technologies, Karlsruhe
TEMED	Life Technologies, Karlsruhe
Tris	Merck, Berlin
2 M Tris, pH 8,8	Biorad, München
Tween-20	Sigma, Taufkirchen
Wasser	Fluka, Seelze
Western-Blot Transfer-Apparatur	Biorad, München
X-Gal	Life Technologies, Karlsruhe
Xylol	Baker, Phillipsburg, USA

2.1.4 Oligonukleotide

humClaudin-8 For (493)	TATGATTCCCTGCTGGCTCTTTC
humClaudin-8 Rev (494)	GGTGACTTCTTTCCGGTGTGATAA
humClaudin-8 For (527)	CAGAGGATAATGGCAACCCAT
humClaudin-8 Rev (528)	CATACACAACACTACACATACTG

2.1.5 Antikörper

Claudin-1	Zymed Inc., San Francisco
Claudin-4	Zymed Inc., San Francisco
Claudin-5	Zymed Inc., San Francisco
Claudin-7	Zymed Inc., San Francisco
Claudin-8	Zymed Inc., San Francisco
γ -ENaC	Alpha Diagnostic international, San Francisco
Occludin	Zymed Inc, San Francisco
ZO-1	Zymed Inc, San Francisco

2.1.6 Marker

Low Mass DNA Ladder	Invitrogen, USA
Molekulargewicht Standard λ / <i>HindIII</i>	Invitrogen, USA
Molekulargewicht Standart 100bp	Invitrogen, USA
PageRuler Protein Ladder	Fermentas, USA

2.1.7 Materialien

Eppendorf-Gefäß	Eppendorf, Köln
Gel-Blotting-Papier	Schleicher und Schuell, Dassel
Gelbe Kanülen	BD-Mikrolance, Madrid
Histoacryl-Gewebekleber	Braun, Tuttlingen
Insulinnadeln	BD-Plastikpak, Madrid

Magnetrührstäbchen	Merck, Berlin
Mikrotiterplatte	Roth, Karlsruhe
Nylon-Membran	Roche, Mannheim
Objektträger	Menzel, Braunschweig
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Memasha
Pipetten	Eppendorf, Köln
Poly Screen PVDF-Transfer Membran	NEN, Köln
Reaktionsröhrchen (PCR) 0,2 ml	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Röntgenfilm X-OMAT AR/LS	Kodak, Rochester NY
Spritze 20 ml	BD Discardit, Spain
Transparentfolien	Tartan, EU
Whatman-Filter	Polytrap 295 PE

2.1.8 Puffer und Lösungen

BSA-Blockierungslösung:	5 %	BSA
	0,02%	Na ⁺ -Azid in PBS/T
5% BSA in PBS:	5 g	BSA PBS ad 10 ml
5% BSA in PBS/ Tween+ 0,02% Na ⁺ -Azid:	5 g	Albumin Fraktion V
	100 ml	PBS/T
	800 µl	2,5% Na ⁺ -Azid
1mM EDTA-Puffer, pH 8,0	0,74g	EDTA in
	1 l	Aqua bidest
	Tropfenweise	1-2 molare NaOH-Lsg bis pH 8
		Mit aqua bidest auf 2 l auffüllen
Elektrophoresepuffer:	100 ml	10 × Puffer West
	10 ml	10% SDS

			Aqua bidest ad 1 l
Ethidiumbromid-Lösung:	10 mg		Ethidiumbromid
	1 ml		Aqua bidest
Lämmli:	2 g		SDS
	1,54 g		Dithiothreitol 500mM
	3,0 ml		Tris-HCl pH 6,8 300nM
	20 µl		Bromphenolblau 1%
	10 ml		Glycerol
Lösung für Proteinquantifizierung: (je Probe)	196 µl		Pierce BCA Protein Assay Reagenz A
	4 µl		Pierce BCA Protein Assay Reagenz B
5% Magermilchpulver in PBS:	5 g		Magermilchpulver PBS ad 100 ml
Membran-Lysepuffer:	2 ml		Tris HCl, pH 7,4
	500 µl		1 M MgCl ₂
	200 µl		0,5M EDTA
	120 µl		0,5 EGTA
			Aqua bidest. Ad 100 ml
PBS/T:	2 Stk		PBS-Tabletten
	1 ml		Tween-20
			Aqua bidest ad 1l
PBS/T/ 5% Magermilch:	5 g		Magermilch PBS/T ad 100 ml

10 × Puffer West:	144 g	Glycin
	30,4 g	Tris Base
		Aqua bidest ad 1 l
Ringer-Lösung (Ussing-Kammer):	113,6 mM	NaCl
	2,4 mM	Na ₂ HPO ₄
	0,6 mM	Na ₂ H ₂ PO ₄
	5,4 mM	KCL
	Je 1,2 mM	CaCl ₂ + MgCl ₂
	Je 10 mM	D(+)-Mannose+ D(+)-Glukose
	2,5 mM	L-Glutamin
	0,5 mM	β-Hydroxybuttersäure
3x RNA Probenpuffer:	19,15 ml	Aqua bidest
	3,75 ml	10x Formaldehyd Gel Puffer
	12 ml	Formaldehydlösung 37%
	36 ml	Formamid
	2 ml	Glycerol
	20 µl	Ethidiumbromidstammlösung
Sammelgel:	3,9 ml	Sammelgel-Lsg
	40 µl	10% SDS
	40 µl	10% APS
	4 µl	TEMED
Sammelgellösung:	17 ml	Acrylamid
	25 ml	Tris pH 6,8 (0,5M)
	55,5 ml	H ₂ O bidest
20x SSC:	175 g	NaCl
	88,2 g	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O
	800 ml	H ₂ O
		Zitronensäure konz. ad pH 7,0-7,5
		Aqua bidest ad 1 l

TBS/ T:	500 ml	10x TBS
	4,5 l	H ₂ O
	5 ml	Tween
Transferpuffer:	100 ml	10 × Puffer West
	100 ml	Methanol
		Aqua bidest ad 1 l
Trenngel 12,5%:	5,1 ml	H ₂ O
	2,8 ml	Acrylamid-Lsg
	1,9 ml	2M Tris pH 8,8
	100 µl	10% SDS
	100 µl	10% APS
	5 µl	TEMED
1 M Tris-HCl, pH 7,6:	121,1 g	Tris
	800 ml	Aqua bidest
	60 ml	HCl
		HCl pH 7,6
		Aqua bidest ad 1 l, autoklavieren
X-Gal-Lösung:	20 mg	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β - D-Galactosid

2.2 Methoden

Abb. 2.1 zeigt eine Übersicht über die von uns vorgenommenen Untersuchungen:

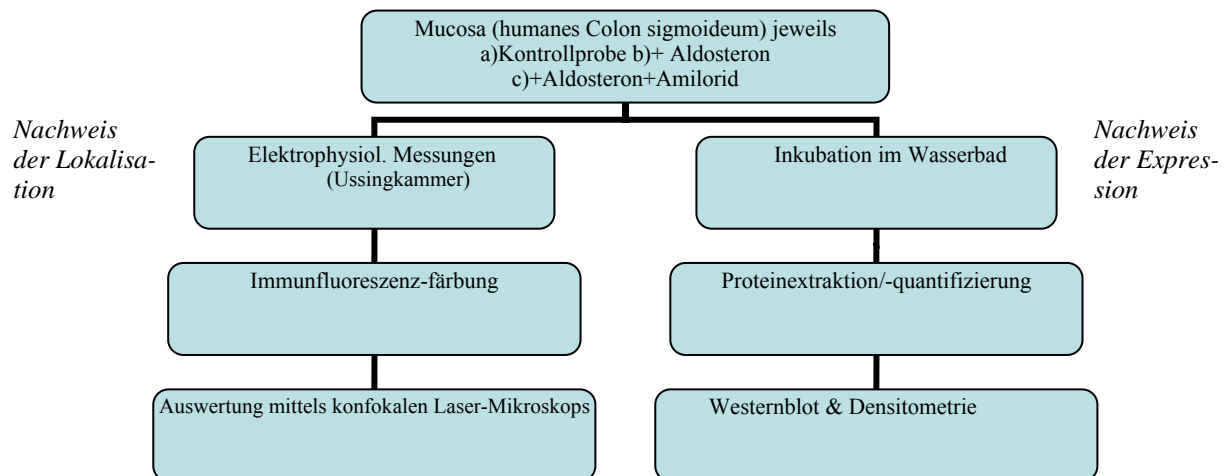


Abb. 2.1: Übersicht über die durchgeführten Experimente

2.2.1 Elektrophysiologie

2.2.1.1 Ussingkammer-Experimente

Nach partiellem 'Stripping' des Gewebes, dem Entfernen der Lamina muscularis propria, wurde die Lamina propria mucosae in die Ussingkammern eingespannt. Das partielle 'Stripping' ermöglicht durch die Entfernung subepithelialer Bestandteile die exklusive Beurteilung des Epithels.

In der Ussingkammer nach Ussing et al. wurden alle elektrophysiologischen Messungen durchgeführt, da diese Methode die ideale Voraussetzung für Kurzstrommessungen von Geweben *in vitro* sowie der Quantifizierung von Ionenpermeabilität (Leitfähigkeit bzw. Widerstand) und aktivem Ionentransport (Kurzschlussstrom, I_{SC})⁸⁹ bietet. Die Mucosafläche, die elektrophysiologisch untersucht wurde, betrug $0,54 \text{ cm}^2$ oder $0,28 \text{ cm}^2$. Sie wurde über einen Silikonring gespannt, mit einem Gewebeklebstoff an einem Plastikcontainer fixiert und anschließend in die Kammer eingesetzt. Das Gewebe wurde beidseitig von 10 ml Ringerlösung umspült und mit

95% Sauerstoff und 5% CO₂ über eine Injektionsnadel begast. Die verwendete Ringer-Lösung war aus (mM) 140.5 Na⁺, 5.4 K⁺, 1.2 Ca²⁺, 1.2 Mg²⁺, 123.8 Cl⁻, 21 HCO₃⁻, 2.4 HPO₄²⁻, 0.6 H₂PO₄⁻, 10 D(+)-Glucose, 0.5 β-OH-Butyrat, 2.5 Glutamin, 10 D(+)-Mannose und 50 mg/l Azlocillin (Securopren TM, Bayer, Germany) zusammengesetzt. Gemäß physiologischer Bedingungen betrug ihr pH-Wert 7,4 und die Temperatur 37°C.

2.2.1.2 Messelektronik

Ein PC (Siemens, PCD 2) registrierte über einen Mehrkanal-AD-DA-Wandler die transepitheliale Spannung U^e. Die Ermittlung des transepithelialen Widerstandes R^t erfolgte über einen Rechteckstrom, der von einem PC-gesteuerten Messverstärker über dem Epithel generiert wurde. Durch Klemmen des Epithels auf 0 mV konnte der Kurzschlussstrom erfasst werden.

Die Registrierungs- und Steuerungs-Software ermöglichte die tabellarische Darstellung der Werte nach individuell einzustellendem Rhythmus. Zu Beginn und Ende der Messung wurden die Werte im 10-Sekunden-Takt und in der verbleibenden Zeit im 5-Minuten Takt erfasst.

2.2.1.2 Versuchsablauf

Vor jeder Messung wurden Asymmetriepotential und Badwiderstand ermittelt und anschließend von den Messergebnissen subtrahiert. Nachdem das Gewebe in die Ussingkammer eingesetzt worden war, wurden auf die mucosale und serosale Kammerseite der Hälfte der Proben je 10 µl 3·10⁻⁶ M Aldosteron appliziert und somit die physiologische Stimulation durch 3·10⁻⁹ M Aldosteron simuliert. Diese Konzentration stimmt mit den in vivo gefundenen Plasma-Konzentrationen unter Stimulation überein. Nach einer Messung von 8 h wurde der ENaC-vermittelten Na⁺-Transport durch Zugabe von 10⁻⁴ M Amilorid auf die mucosale Seite gestoppt. Einigen Kontroll- und mit Aldosteron-inkubierte Proben wurden gleich zu Beginn noch vor der Aldosteron-Zugabe 10⁻⁴ M Amilorid auf die mucosale Seite zugegeben. So konnte der Effekt einer Stimulation mit Aldosteron bei gleichzeitiger Inhibition des ENaC-bedingten Na⁺-Stroms analysiert werden.

Zeitgleich zu den elektrophysiologischen Messungen wurde die Mucosa in je 80 ml Ringer-Lösung der gleichen Zusammensetzung in einem Wasserbad von 37° C inkubiert. Nach dem gleichen Schema wurden Aldosteron und Amilorid appliziert. Das Gewebe wurde anschließend für Western-Blots und Immunfärbungen verwendet. Die durch diese Methoden gewonnenen Ergebnisse konnten direkt mit den elektrophysiologischen Ergebnissen verglichen und ihnen zuge-

ordnet werden, da das untersuchte Gewebe genau wie das Gewebe in den Ussingkammern behandelt worden war.

2.2.1.4 Messung von Spannung, Widerstand und Kurzschlussstrom

Über das Ohmsche Gesetz konnte aus den transepithelialen Potentialdifferenzen (U_1 und U_2), die sich durch die mittels Rechteckgenerator eingestellten Ströme (I_1 und I_2) ergaben, der transepitheliale Widerstand errechnet werden:

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

Der Kurzschlussstrom (I_{SC}) wurde als Quotient aus Spannung und Widerstand berechnet. Die transepitheliale Spannung wurde direkt gemessen. Vom transepithelialen Widerstand wurde jeweils der vor Versuchsbeginn gemessene Grundwiderstand subtrahiert.

$$I_{SC} = \frac{U_e}{R_t}$$

2.2.2 Molekularbiologie

2.2.2.1 PCR

In Vorexperimenten wurde zunächst Claudin-8 in asservierten Colonproben nachgewiesen. Hierfür wurde mittels reverser Transkriptase aus mRNA erzeugte cDNA als Template verwendet. Da die ursprüngliche Menge der für ein Protein codierenden cDNA zu gering war um nachgewiesen werden zu können, erfolgte ihre Amplifizierung um das Millionenfache mittels Polymerasekettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction = PCR).

2.2.2.1.1 Amplifizierung

Die PCR wurde mit 5 µl 10 × PCR-Puffer, 3 µl 25 mM MgCl₂, 0,2 µl Ampli-*Taq*-Polymerase, 2,8 µl 2,5 mM dNTP-Mix und je 1 µl 10 mM Forward- und Reverse-Primer sowie 32 µl Fluka-Wasser angesetzt. Die cDNA-Stränge wurden bei 95°C (1x 5 min, 1x 20 s) denaturiert. Es folgte die Hybridisierung der Primer (Annealing) an die nun getrennten DNA-Stränge bei einer Temperatur von 58°C (30 s) und die cDNA-Strangsynthese (Elongation) bei 70 °C (1 min, 7 min). Dieser Zyklus wurde 35 mal wiederholt.

2.2.2.1.2 Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse der amplifizierten cDNA wurde diese mittels Gelelektrophorese nach Fragmentgröße aufgetrennt.

In die Kammern eines 1% Agarosegel wurden 10 µl der Proben gemeinsam mit 2 µl 6 × Probenpuffer appliziert. Die Trennung der cDNA-Fragmente erfolgte innerhalb von 60 min bei einer Spannung von 65 V. Anschließend wurden die cDNA-Fragmente unter Verwendung von UV-Licht sichtbar gemacht. Hierbei kam es zum Leuchten von Ethidiumbromid, welches im Elektrophoresepuffer vorhanden war und in die cDNA interkalierte.

Um die Wirkung von Aldosteron auf Proteinebene beurteilen zu können, d. h. zu beobachten, ob und wie sich die Stimulation mit Aldosteron auf die Proteinexpression auswirkt, bot sich die Western-Blot-Methode an. Zur Vorbereitung des Western-Blots wurden einzelne Komponenten einer Proteinlösung gelelektrophoretisch aufgetrennt und schließlich auf eine Membran überführt (to blot *engl.* = abklatschen). Anschließend konnten einzelne Proteine mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

Die einzelnen Schritte zur Beurteilung der Proteinexpression waren dabei wie folgt:

2.2.2.2 Proteingewinnung

2.2.2.2.1 Proteinextraktion aus dem Gewebe

Das Gewebe wurde zusammen mit 1 ml Membranlysepuffer und Protease-Inhibitoren in einen Douncer gegeben und anschließend 15 min homogenisiert bis keine Gewebestücke mehr sichtbar waren. Die Zellsuspension wurde zur weiteren Zerkleinerung erst 10× durch eine gelbe Nadel nach der Überführung in ein Eppendorf-Gefäß, dann weitere 10× durch eine Insulinnadel gezogen. Anschließend wurde die Suspension 5 min bei 4°C mit 200 × g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und weitere 30 min mit 43000 × g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die gelöste Membranfraktion befand, wurde abgenommen. Das Pellet, in dem sich die konzentrierte und für diese Arbeit interessante membranständige Proteinfraction, also auch Tight Junction-Proteine, befand, wurde in 100 µl eiskaltem Lysepuffer gelöst und anschließend bei -80°C asserviert oder direkt der Proteinquantifizierung unterzogen.

1.2.2.3.4 Proteinquantifizierung

Das Prinzip der Proteinquantifizierung beruht auf einer Extinktionsmessung, deren Ergebnisse mit den Extinktionen von vier Standardlösungen verglichen werden.

Dies erfolgte im Tecan Spectra-Plattenlesegerät mittels Pierce BCA (Bicinchoninsäure) Protein Assay Reagenz. Zum Erstellen der Eichkurve wurden die Extinktionen von vier unterschiedlichen Rinderserumalbumin (BSA)-Lösungen in den Konzentrationen 0,0-0,2-0,8 und 1,2 mg BSA/ ml als Standardlösungen gemessen.

Sowohl die zu bestimmenden Proteinproben als auch die Standardlösungen und Lysepufferkontrollproben wurden auf eine Mikrotiterplatte pipettiert, dann 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Extinktionsmessung bei der Wellenlänge λ von 526 nm erfolgte dreimal. Aus den Messergebnissen wurden nach Abzug der Werte des Lysepuffers die Mittelwerte bestimmt.

2.2.2.3 Western-Blot

2.2.2.3.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Mit Hilfe der PAGE wurden Proteine bei Vorbehandlung mit SDS nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Dabei war die Geschwindigkeit der Protein-Trennung von der Dichte des Acrylamidgitters im Gel, der Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers und der Höhe der angelegten Spannung abhängig. In dieser Versuchsreihe wurden die Proteine mittels des Lämmli-Systems mit Tris-Glycin-Puffer getrennt.

Die Lösung für ein 12,5% Trenngel wurde in eine Mini-Protean-Apparatur pipettiert und mit absoluten Ethanol bis auf 1 cm überschichtet, damit bei der Aushärtung eine glatte Oberfläche erhalten blieb. Nach einer Polymerisationszeit von 30 min wurde das Ethanol abgegossen und Reste davon vorsichtig mit Filterpapier abgesaugt. Anschließend wurde das Gel mit der Sammelgel-Lösung bis zur Unterkante der kleineren Glasplatte überschichtet und ein kleiner Plastikamm zur Aussparung der Applikationskammern eingesetzt.

Nach einer Polymerisationszeit von weiteren 30 min wurde der Kamm vorsichtig gezogen und die Taschen wurden mit Elektrophoresepuffer gespült. Die 1:3 mit Laemmli vermischten Proben wurden mit Lysepuffer auf das gleiche Gesamtvolumen gebracht. Sie wurden anschließend 5 min bei 95°C im Heizblock denaturiert und in die Probenaschen des Polyacrylamidgels appliziert. Als Marker diente 10 µl Protein Ladder (Fermentas). Die Elektrophorese lief unter konstanter Spannung von 100 V ungefähr 90 min.

2.2.2.3.2 Elektrophoretischer Transfer

Beim Blotten wurden durch eine angelegte Spannung die auf dem Gel aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen und dort durch Protein-Membraninteraktion fixiert und immobilisiert. Die Membran diente hierbei als Trägermatrix und auf ihr konnten nach mehreren Waschgängen und Inkubationen mit Antikörpern die gesuchten Proteine nachgewiesen werden.

Zum Blotten wurde eine Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF) verwendet. Sie wurde 5 min lang in absolutem Alkohol eingeweicht und anschließend genau wie das Polyacrylamidgel, zwei Whatman MM Filterpapiere sowie zwei Schwämme 5 min in Transferpuffer equilibriert.

Der Transfer erfolgte zwischen zwei Kunststoffgittern als „Sandwich“ mit dem Aufbau:

- Schwamm
- Whatman-Filter

- Nylonmembran
- Gel
- Whatmanfilter
- Schwamm

Dieser Aufbau wurde im mit Transferpuffer gefüllten Puffertank so zwischen zwei Halteschienen fixiert, dass die Membran zur Anode zeigte. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte unter einer Spannung von 100 V und 0,2 bis 0,4 A in einer Stunde bei 4°C.

2.2.2.3.3 Immundetektion

Nach einer Reihe von Waschschritten und Antikörperinkubationen wurden die Proteine durch Antikörperbindung und Lumineszenzmarkierung nachgewiesen.

Nach dem Equilibrieren und Spülen der Membran in PBS/Tween wurden die Proteine für mindestens 2 h in 50 ml PBS/Tween + 5% Magermilch bei Raumtemperatur geblockt. Durch die Inkubation mit Magermilch wurden überschüssige Proteinbindestellen der Membran gesättigt und eine unspezifische Bindung von Nachweisreagenzien verhindert.

Anschließend wurde die Membran ein weiteres Mal in PBS/Tween gewaschen und dann in 50 ml PBS/Tween + 5% BSA + 0,02% NaAzid auf einem Schüttler bei 4°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Morgen erfolgte die Inkubation mit dem Protein spezifischen Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:10.000 in 50 ml PBS/ Twen + 5% BSA + ,02% NaAzid für 2 h bei Raumtemperatur. Es wurden Antikörper gegen Occludin, Claudin-1, -4, -5, -7 und -8 und γ -ENaC verwendet.

Nach Ablauf der zwei Stunden folgten zwei weitere Waschschrritte mit PBS/Tween über jeweils 10 min, um überschüssigen nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, und eine anschließende Equilibrierung mit TBS/Tween. Die Inkubation mit dem Primärantikörper-spezifischen Sekundärantikörper erfolgte mit 15 μ l anti-rabbit-Antikörper in 15 ml TBST/ 1% Blocking-Reagenz bei 60-90 min Raumtemperatur auf dem Schüttler.

Nach drei weiteren Waschschrritten mit 2 \times PBS/Tween und 1 \times TBST/ Tween wurden die Membranen genau 5 min in 10 ml LumiLight-Lösung von Roche (5 ml Lösung 1 und 5 ml Lösung 2) im Dunkeln inkubiert. Durch Reaktion der einzelnen Substanzen der Lösungen mit den speziell markierten Sekundärantikörpern kam es zur Chemilumineszenz, welche die Visualisierung der Proteinbanden mittels eines Lumineszenzbildanalytators LAS-1000 ermöglicht. Für densitometrische Analysen wurden die Bilder als Computerdateien gespeichert.

2.2.2.3.4 Densitometrie

Anhand einer geeigneten Software (AIDA Raytest, Straubenhardt) erfolgte über die Analyse der Signalstärke einzelner Banden die relative Quantifizierung der Proteinmenge einzelner Claudine.

2.2.2.4 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

2.2.2.4.1 Immunfluoreszenzfärbung

Bei der Immunfluoreszenzfärbung wurden ähnlich wie beim Western-Blot proteinspezifische Antikörper verwendet und schließlich über Fluoreszenz der Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Die zu messende Signale lagen im Wellenlängenbereich von 488 und 594 nm.

Zum Nachweis von Claudin-8 stellte die Firma Zymed Inc., San Francisco, CA, USA vier neue nicht kommerziell erhältliche Antikörper zur Verfügung. In dieser Versuchsreihe wurde der Antikörper verwendet, der nach Blockierungsexperimenten durch andere spezifische Antikörper kein Signal mehr zeigte.

Nach den elektrophysiologischen Messungen in den Ussingkammern wurden die Gewebeproben den Containern entnommen und über Nacht bei 4°C in Formalin fixiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Präparate in Paraffin eingebettet, in 8 µm-dicke Schnitte geschnitten und auf Superfrost-Objektträger aufgezogen. Nach Fixierung mit 4% Paraformaldehyd und 10 minütiger Permeabilisierung mit 0,5% TritonX erfolgte die 60 minütige Inkubation in PBS + 0,5% Goat-Serum bei Raumtemperatur und anschließendem Waschen in Blockierungslösung.

Für die Färbung wurden die Präparate mit Kombinationen aus Antikörpern gegen ZO-1, Occludin, Claudin-1, -4, -5, -7, -8 oder γ -ENAC-Antikörper, die im Verhältnis 1:50 mit Blockierungslösung verdünnt waren, für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach jeder Inkubationszeit folgte ein Waschdurchgang von 2×5 min in Blockierungslösung.

Schließlich erfolgte als Voraussetzung für die Visualisierung die 45-minütige Inkubation bei 37°C im Dunkeln mit Alexa Fluor anti-rabbit IgG oder Alexa Fluor 488 anti-mouse antibodies (1:500 in Blockierungslösung). Als letztes wurden die Schnitte 5 min zur Markierung der Zellkerne mit DAPI im Dunkeln bei Raumtemperatur angefärbt.

Nach Spülen mit Aqua dest. und absolutem Alkohol wurden die Objektträger mit ProTags-MountFlour eingedeckt und im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.2.4.2 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Zur Visualisierung der nach dem Prinzip der Immunfluoreszenz gefärbten Schnitte wurde ein konfokales Laserscanningmikroskop (LSM Meta510, Zeiss, Germany) verwendet.

2.2.2.5 Statistik

Statistische Auswertungen und die Erstellung von Tabellen erfolgten mit GraphPad PRISM (Version 3.0, GraphPad Software Inc, CA, USA) und Microsoft Excel.

Alle Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Für die statistische Analyse wurde der Student's t-Test verwendet, bei mehrfachen Tests mit Korrektur nach Bonferroni. $P < 0.05$ galt als statistisch signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 PCR

Zunächst konnte im PCR-Verfahren die Anwesenheit von Claudin-8-cDNA im menschlichen Colon nachgewiesen werden (Abb. 3.1), worüber in der Literatur noch keine Daten zu finden waren. Bedingt durch die Wahl der Primer wurden cDNA-Fragmente von einer Größe von 494 bp und 695 bp amplifiziert.

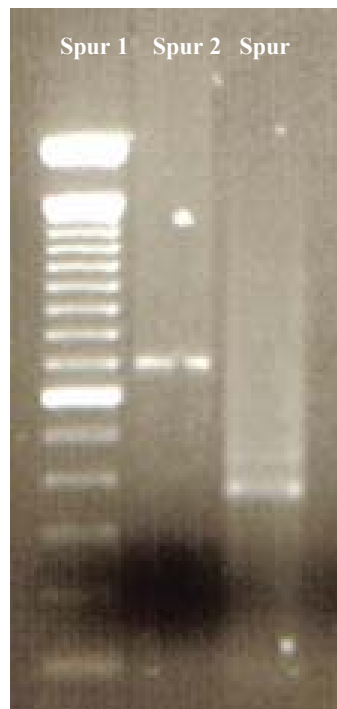


Abb. 3.1: PCR-Nachweis von Occludin, Claudin-8 in humanem Colon. Spur 1: 100 bp-Marker; Spur 2: Claudin-8: 695 bp-Fragment , Spur 3: Claudin-8 494bp-Fragment

3.2 Elektrophysiologie

3.2.1 Induktion des epithelialen Na^+ -Transports

Die Mucosa-Präparate des humanen Colon sigmoideum wurden 8,5 h in der Ussingkammer inkubiert. Die Hälfte der Proben wurde mit 3 nmol/l Aldosteron stimuliert, die anderen Proben unter gleichen Bedingungen aber ohne Stimulation mit Aldosteron parallel als Vergleichs- und Kontrollproben betrachtet (n=16).

Der Kurzschlussstrom (I_{SC}) in den Kontrollproben blieb gleichmäßig konstant niedrig. In den mit Aldosteron inkubierten Präparaten hingegen stellte sich nach einer Latenzzeit von 100 min. eine Erhöhung des Kurzschlussstromes mit einem konstanten Maximum nach ca. 400 min. ein (Abb. 3.2).

Um den Anteil der elektrogenen Na^+ -Resorption am Kurzschlussstrom zu ermitteln, wurde einheitlich nach 8 h der ENaC-vermittelte Na^+ -Strom blockiert, indem 1 ml des ENaC-Blockers Amilorid in der Konzentration 10^{-4} mol/l auf der mukosalen Seite hinzugefügt wurde. Die Amilorid-induzierte I_{SC} -Differenz wurde als J_{Na} definiert.

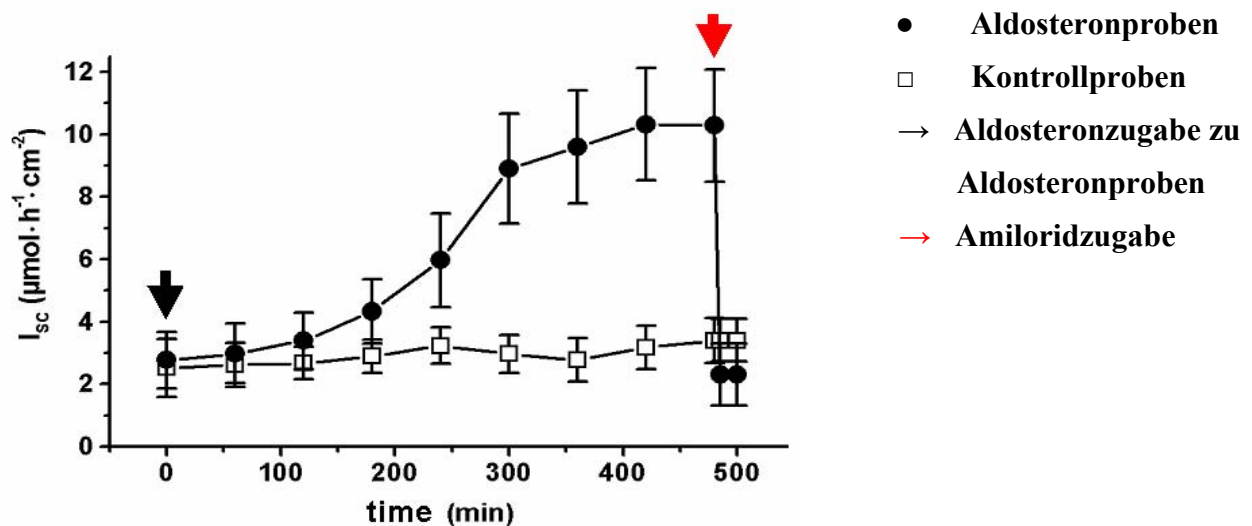


Abb. 3.2: Induktion des ENaC im Colon sigmoideum – der Kurzschlussstrom I_{SC} im Zeitverlauf. Es zeigte sich ein starker Anstieg von I_{SC} in der mit 3 nM Aldosteron-inkubierten Probe bei gleich bleibendem I_{SC} der Kontrollprobe. Nach ca 400 min war das Maximum des I_{SC} erreicht. Nach Zugabe von 100 μM Amilorid ($t=8h$) zeigte sich ein starker Abfall des I_{SC} (n=16).

In den mit Aldosteron-inkubierten Proben zeigte sich eine Induktion von J_{Na} ($8,0 \pm 1,6 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$; $n=10$), wohingegen in den Kontroll-Proben keine Veränderung zu beobachten war ($0,01 \pm 0,01 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$; $n=16$) (Abb. 3.3).

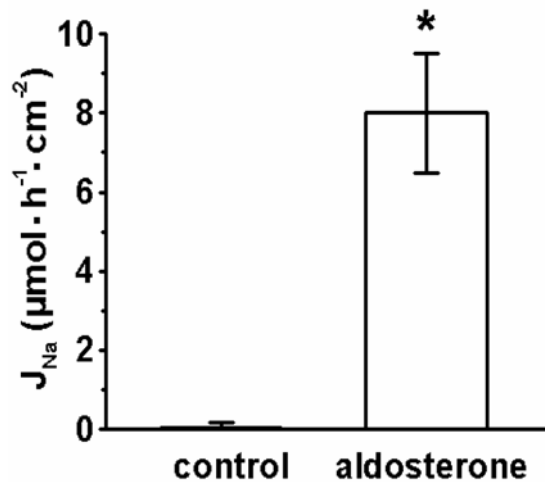


Abb. 3.3: Elektrogener Na^+ -Transport (J_{Na}). Es zeigte sich eine starke J_{Na} -Induktion durch Aldosteron ($n=16$, $*p < 0,05$), welche in der Kontrollprobe nicht nachweisbar war.

3.2.2 Der transepitheliale Widerstand während der Induktion des ENaC

Während der Inkubation war bei beiden Proben, Kontrolle und Aldosteron, eine konstante Abnahme des transepithelialen Widerstandes zu beobachten. Der Zeitverlauf des transepithelialen Widerstands ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Die Hemmung des ENaC mit Amilorid nach Induktion mit Aldosteron führte zu einem schnellen Anstieg von $83 \pm 6 \Omega \cdot \text{cm}^2$ auf $98,5 \pm 7 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Kontrollen zeigten nach Amiloridgabe keine signifikante Änderung ($81,6 \pm 5,6 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, $n=16$).

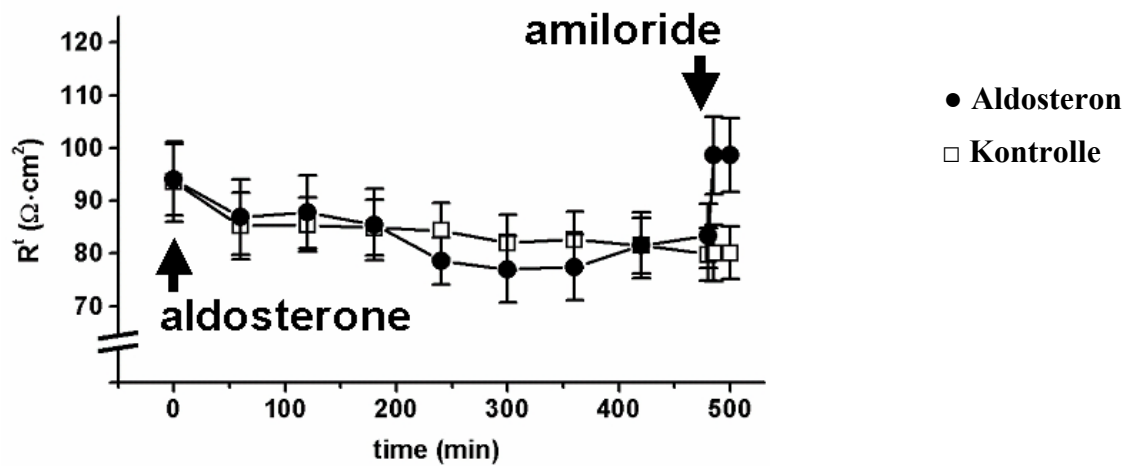


Abb. 3.4: Der transepitheliale Widerstand im Zeitverlauf während der Induktion von ENaC. Sowohl in der Kontroll-Probe ($n=8$) als auch in dem mit 3 nM Aldosteron inkubierten Gewebe ($n=8$) zeigte sich ein Abfall des Widerstandes R nach 8 h. Nach Zugabe von 1 μM Amilorid stieg der Widerstand in der Aldosteron-stimulierten Probe.

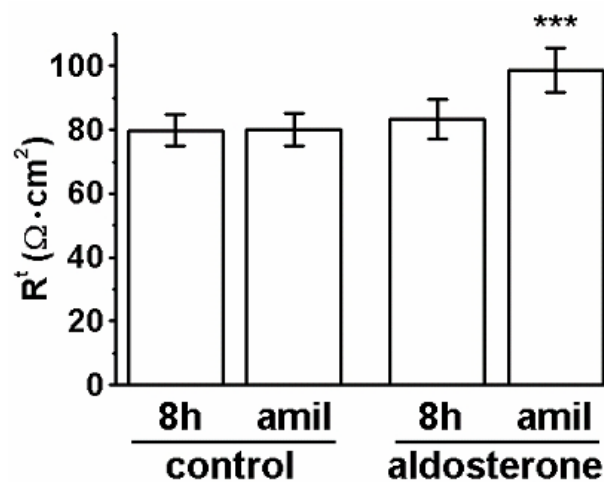


Abb. 3.5: Der transepitheliale Widerstand zum Zeitpunkt 0 h, 8 h und nach Amilorid-Gabe (amil) ($n=16$, *** $p < 0,05$).

3.2.3 Nachweis der γ -ENaC-Untereinheit durch Immunfluoreszenzfärbung

Nach den elektrophysiologischen Messungen wurden mit den in der Ussingkammer untersuchten Gewebeproben Immunfluoreszenzfärbungen der γ -ENaC-Untereinheit durchgeführt, was einen direkten Vergleich der Induktion von ENaC zwischen Kontroll- und Aldosteron-stimulierter Probe ermöglichte. Mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie konnte eine Induktion der γ -ENaC-Untereinheit in der apikalen Zellmembran der Oberflächenzellen beobachtet werden. In den Krypten war kein Signal nachweisbar (Abb. 3.6).

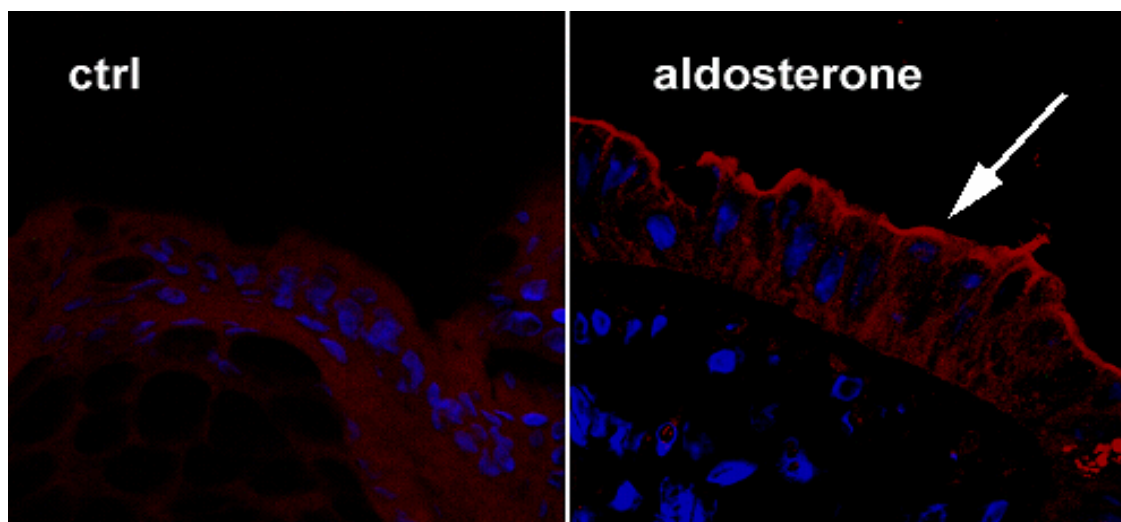


Abb. 3.6: Immunfluoreszenzfärbung der γ -ENaC-Untereinheit).

Im Vergleich zur Kontrolle (ctrl) zeigt sich bei Aldosteroninkubation eine Zunahme des Signals in der apikalen Zellmembran der Oberflächenzellen (Pfeil).

3.3 Nachweis von Tight Junction-Proteinen mittels Western-Blot

3.3.1 Western-Blot

Die zellmembranständigen Proteine aus Aldosteron-inkubiertem Colon sigmoideum und Kontroll-Kolon wurden extrahiert und in gleichen Konzentrationen mittels spezifischer Antikörper

im Western-Blot untersucht. Anhand der Bandenstärke konnte die Expression von Occludin und Claudin-1, -4, -5, -7 und -8 zwischen beiden Geweben verglichen werden.

Hierfür wurde ein neuer nicht kommerziell erhältlicher Claudin-8-Antikörper der Firma Zymed verwendet, von dem 4 Chargen zur Verfügung standen. Alle 4 Chargen wurden in Blockierungsexperimenten getestet. Die Bandengröße (23 kDa), die Reinheit der Bandensignale und die Ausfällbarkeit der Antikörper mittels Blocking-Reagenz diente als Kriterium zur Wahl der besten Antikörper-Charge.

Für die Claudine waren Signale mit der Größe von 23 kDa, für Occludin von 56 kDa zu erwarten. Im Vergleich mit der Kontrolle war bei dem in Aldosteron inkubierten Gewebe ein stärkeres Bandensignal und somit vermehrte Expression von Claudin-8 und Occludin zu beobachten.

Claudin-1, -4, -5 und -7 zeigten keine Signaldifferenz zwischen dem in Aldosteron-inkubierten und dem Kontroll-Gewebe (Abb. 3.7).

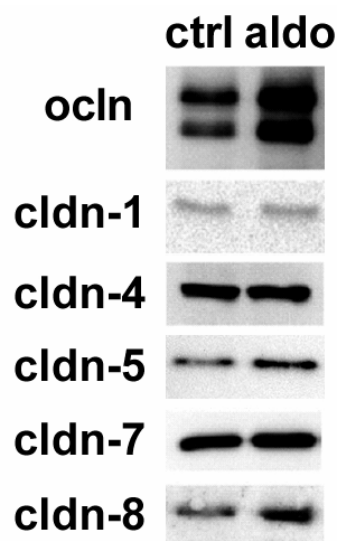


Abb. 3.7: Western-Blot der TJ-Proteine Occludin (ocln) (n=5) und Claudin (cldn)-1, -4, -5, -7, -8 (n=4-7).

In den mit Aldosteron (aldo) inkubierten Proben war im Vergleich mit den Kontrollproben (ctrl) ein stärkeres Bandensignal von Occludin und Claudin-8 zu sehen. Bei Claudin-1, -4, -5 und -7 war kein Unterschied festzustellen.

3.3.2 Densitometrie

Durch eine densitometrische Analyse konnten die Ergebnisse der Western-Blots exakt quantitativ ausgewertet und so die prozentualen Unterschiede der Stärke der Proteinexpression in Kontroll- und Aldosterongewebe ermittelt werden.

Die Mittelwerte der densitometrischen Ergebnisse bestätigten eine Zunahme des Claudin-8-Signals auf $178.7 \pm 25.4\%$ des Kontrollsignals. Bei Occludin konnte ein Anstieg auf $235.8 \pm 28.6\%$ nachgewiesen werden ($n=5$).

Die densitometrische Auswertung zeigte außerdem, dass bei Claudin-1 ($113.1 \pm 11.8\%$), Claudin-4 ($93.3 \pm 9.0\%$), Claudin-5 ($99.7 \pm 15.3\%$) und Claudin-7 ($90.7 \pm 12.3\%$) keine signifikante Änderung der Expression unter Aldosteronstimulation erfolgt war ($n= 4-7$) (Abb. 3.8).

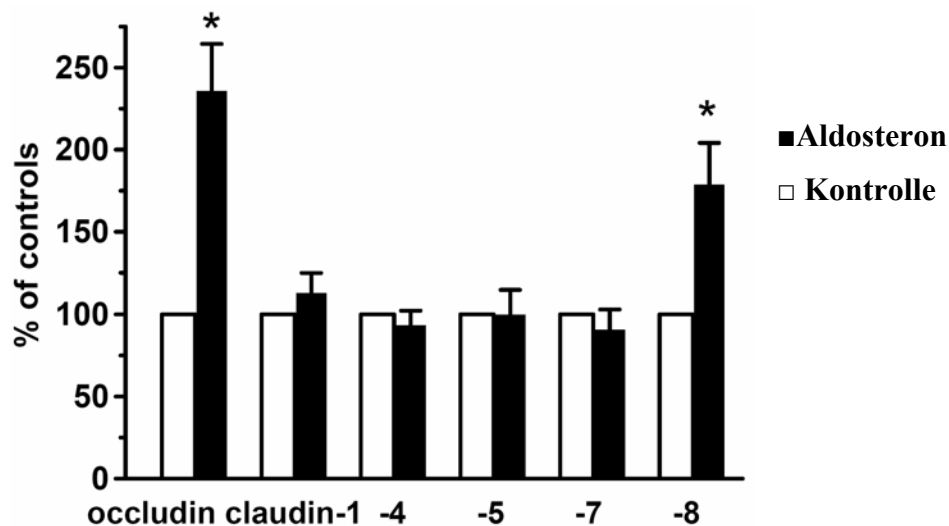


Abb. 3.8: Densitometrische Auswertung der Western-Blots

Eine starke Zunahme des Occludin- und Claudin-8-Signals unter Aldosteronstimulation bei gleichbleibenden Signalen für Claudin-1, -4, -5 und -7 ($n= 4-7$, $*p < 0,05$) konnte ermittelt werden.

3.4 Lokalisation der Tight Junction-Proteine mittels Immunfluoreszenzfärbung

Die elektrophysiologisch beurteilten Gewebeprobe aus den Ussingkammern wurden mit Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet, die Schnitte im Immunfluoreszenzverfahren gefärbt und anschließend unter dem konfokalen Laser-Mikroskop beurteilt. Alle betrachteten Tight Junction-Proteine, Occludin und Claudin-1, -4, -5, -7 und-8, wurden im Bereich des apikolateralen TJ-Strangs der Mucosa-Epithel-Zellen nachgewiesen.

Occludin zeigte in der Kontrollprobe eine gleichmäßige Verteilung in Krypten und Villi.

In der durch Aldosteron stimulierten Probe war eine stärkere Anfärbung von Occludin-Proteinen als im Kontrollgewebe nachweisbar, was die Ergebnisse der Western-Blots bestätigte. Bei genauerer Betrachtung zeigte sich, dass die Zunahme des Signals auf die subjunctionalen Bereiche der Oberflächenzellen limitiert war (Abb. 3.9).

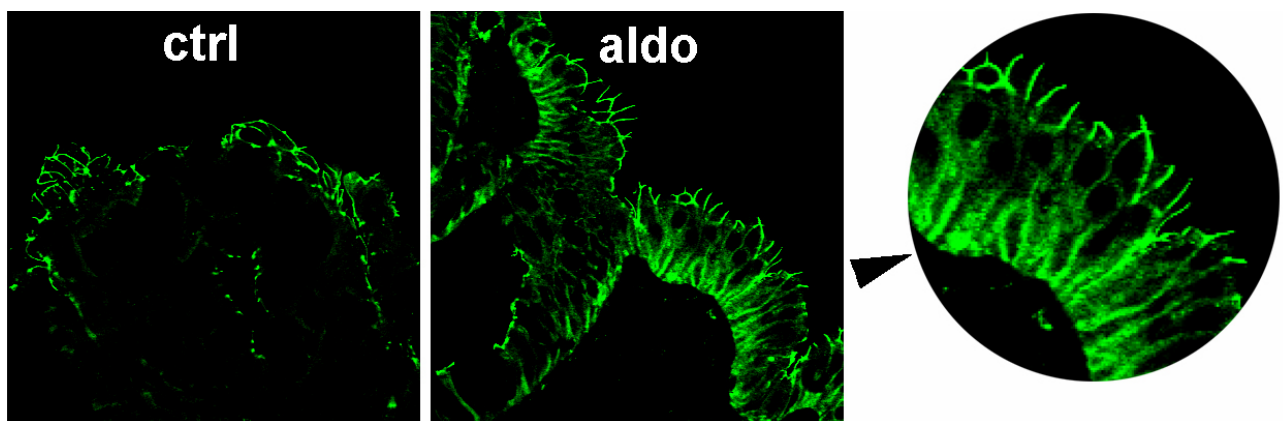


Abb. 3.9: Detektion von Occludin in humanem Colon sigmoideum.

Dargestellt sind Kontrollgewebe (*ctrl*), Aldosteron-stimuliertes Gewebe (*aldo*) und eine Detailansicht von Aldo (Pfeil). In der mit Aldosteron-stimulierten Probe war eine deutliche Zunahme von Occludin im subjunctionalen Bereich von Oberflächenzellen zu vermerken (je $n=5$).

Claudin-8 konnte in den epithelialen Tight Junctions der Kontrollprobe nachgewiesen werden. Nach Inkubation mit Aldosteron konnte ein verstärktes Signal für Claudin-8 in der apikolateralen Strangregion der Tight Junction beobachtet werden (Abb. 3.10).

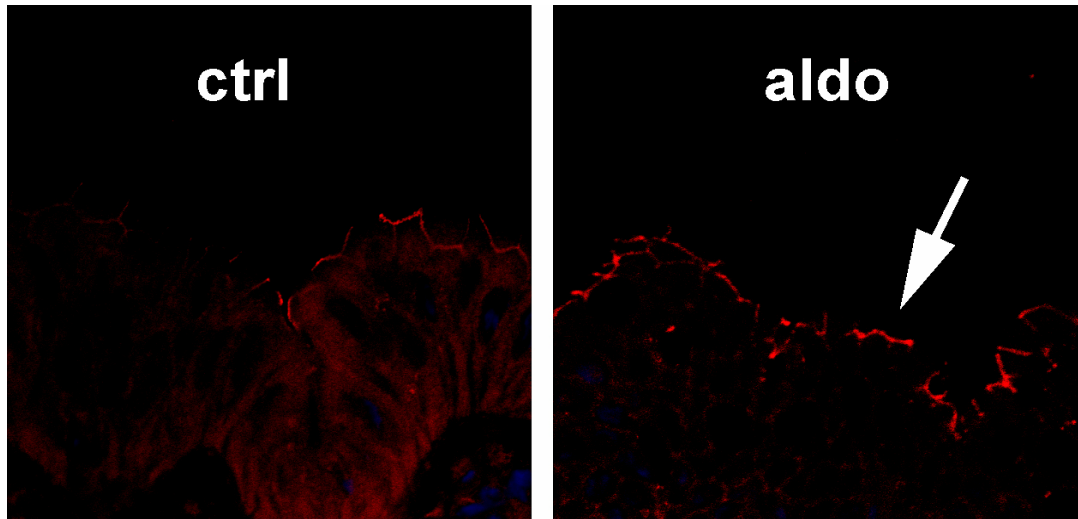


Abb. 3.10: Immunfluoreszenzfärbung von Claudin-8

Im Vergleich zum Kontrollgewebe (ctrl) zeigte sich ein Anstieg von Claudin-8 nach Aldosteronstimulation (aldo) in der apikalen Zellmembran des behandelten Gewebes (je n=4).

Claudin-1, -4, -5 und -7 wurden sowohl in der Kontrollprobe als auch nach Inkubation mit Aldosteron fokussiert in der Tight Junction nachgewiesen. Claudin-1, -4 und -5 zeigten keine Änderung ihrer Lokalisation nach Stimulation durch Aldosteron. Für Claudin-7 jedoch konnte zumindest die Tendenz einer Translokation aus der Tight Junction in subjunctionalen Bereiche festgestellt werden (Abb. 3.11).

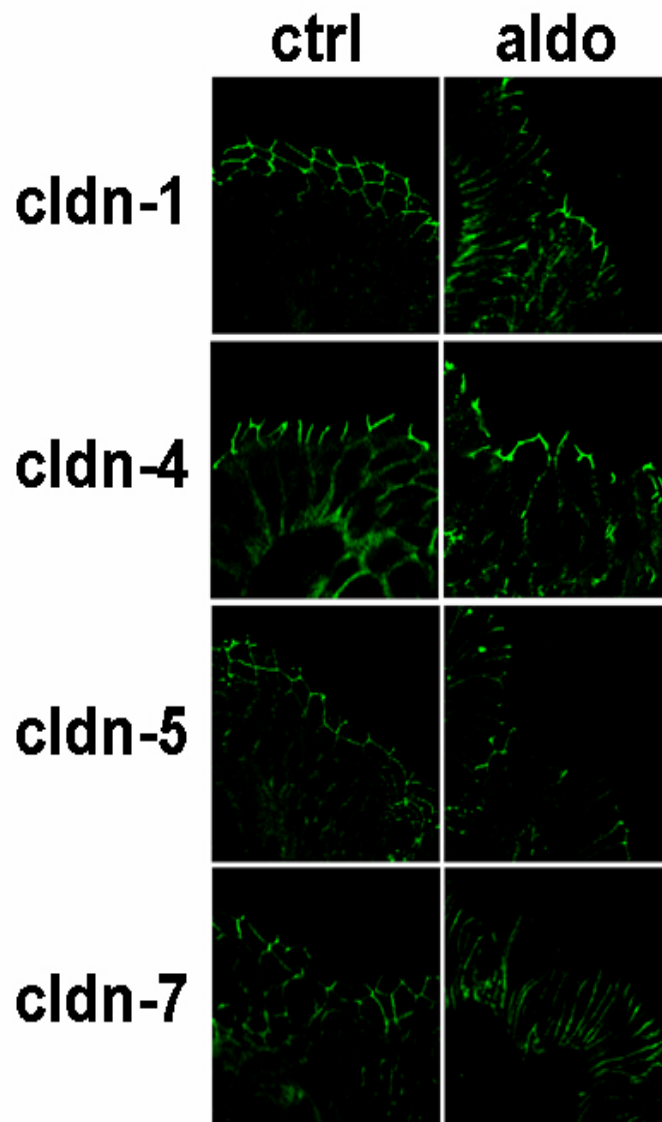


Abb. 3.11: *Detektion von Claudin-1, -4, -5 und -7 im konfokalen Mikroskop*

Bei allen vier Claudinen (cldn) war die Lokalisation der exprimierten Proteine nach 8 h Inkubation mit 3 nM Aldosteron(aldo) identisch mit der in den Kontrollproben (ctrl). (n=4-7)

3.5 Kontrollexperimente: Effekt von Amilorid

In einem weiteren Ansatz wurde direkt zu Beginn des Ussingkammer-Experimentes 10^{-4} Amilorid auf die mukosale Seite der Gewebeprobe appliziert und so von Anfang an eine Zunahme des J_{Na} inhibiert. Parallel zu den vorangegangenen Experimenten wurden jeweils eine Kontrollprobe und eine mit Aldosteron stimulierte Probe im Western-Blot untersucht (je $n=4$), durch Immunfluoreszenzfärbung beurteilt und anschließend mit Proben, bei denen zu Beginn kein Aldosteron appliziert wurde, verglichen.

Es konnte keine Veränderung der Claudin-8-Proteinexpression im Vergleich mit der Kontrollprobe festgestellt werden. Dasselbe galt für den transepithelialen Widerstand (unstimulierte Kontrolle: $111 \pm 6 \Omega \cdot \text{cm}^2$ vs. Aldosteron-inkubiertes Gewebe: $102 \pm 5 \Omega \cdot \text{cm}^2$). Die unter Aldosteron-Stimulation nachgewiesenen Änderungen der Proteinexpression und -lokalisierung blieben folglich unter Inhibition des über Aldosteron-induzierten Na^+ -Stroms aus (Abb. 3.12, 3.13 und 3.14).

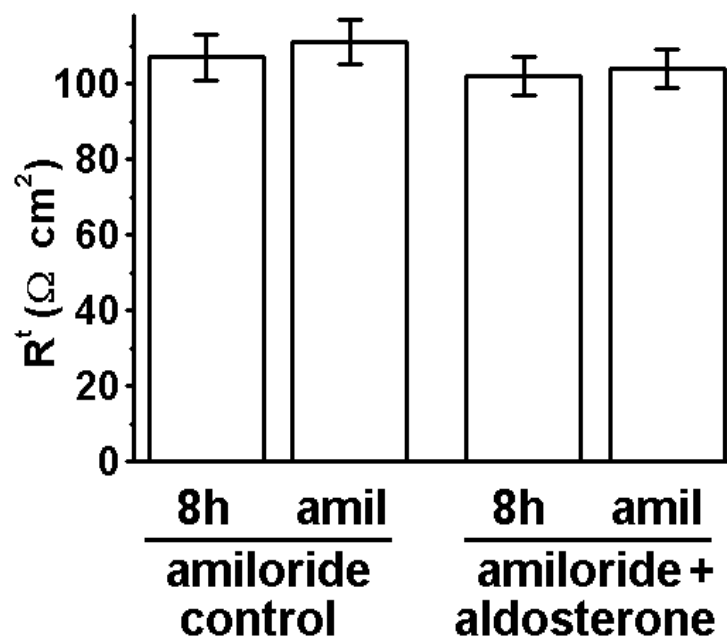


Abb. 3.12: Der transepitheliale Widerstand (R^t) während der Induktion von ENaC durch Aldosteron bei seiner gleichzeitigen Hemmung durch Amilorid (amil) von Beginn der Messung.

Es konnte keine signifikante Änderung des transepithelialen Widerstandes im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (jeweils $n=6$).

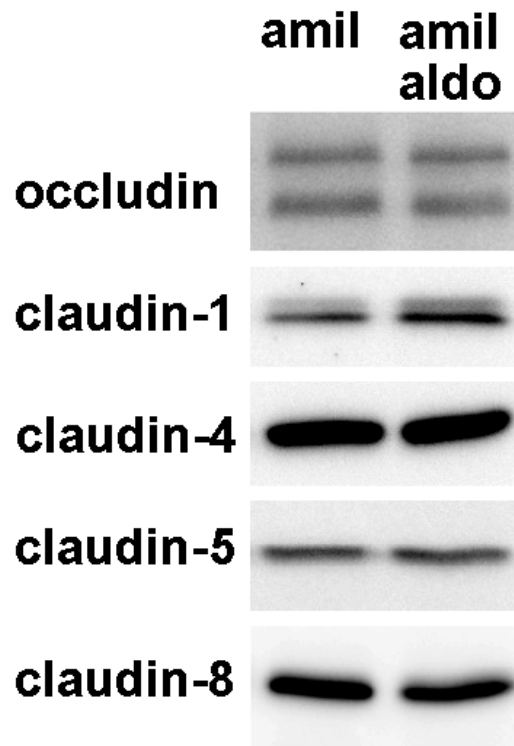


Abb. 3.13: Western-Blot: Nachweis von Occludin, Claudin-1, -4, -5, und -8 nach Langzeit-Inkubation (8h) mit Amilorid (amil) und Aldosteron und Amilorid (amil aldo) (n=4-7).

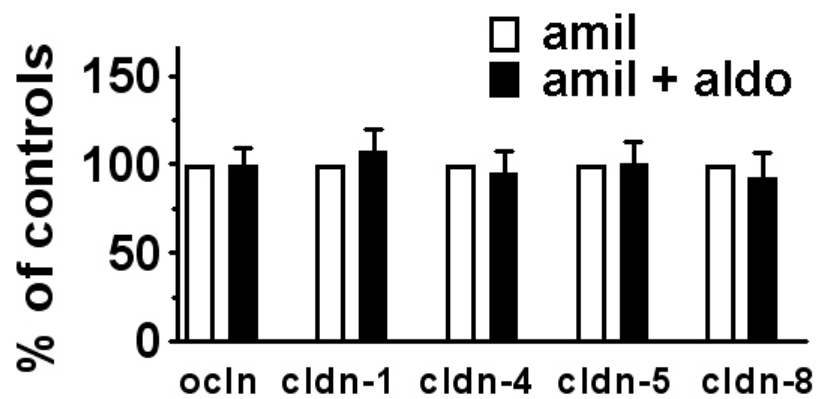


Abb. 3.14: Densitometrische Auswertung der Western-Blots aus Abb.3.13
Ocln-occludin; Cldn-Claudin; amilo-Amilorid, aldo-Aldosteron

4 Diskussion

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Tight Junction-Proteine während der Induktion des Epithelialen Na^+ -Kanals reguliert werden. Zeitgleich mit der Induktion des ENaC erfolgt eine Regulation der Synthese von Tight Junction-Proteinen und ein Einbau in Tight Junction-Stränge, welche die Barriereeigenschaften des Epithels bestimmen. Da die kontinuierliche Hemmung des ENaC durch Amilorid diesen Mechanismus verhindert, ist ein Na^+ -Einstrom in die Zelle Voraussetzung für den Regulationsmechanismus.

Diese Ergebnisse erweitern den Blick auf die physiologische Kaskade, die eine Stimulation mit Aldosteron nach sich zieht, und betonen die Rolle der parazellulären Komponente bei Resorptions- und Sekretionsvorgängen. Konsekutiv erfordern diese Ergebnisse die Diskussion folgender Punkte:

- Einordnung der TJ-Expressionsänderung als Folge der Aldosteron-Stimulation, der ENaC-Induktion, des Na^+ -Stroms oder anderer Begleiteffekte.
- Diskussion möglicher Signaltransduktionswege, über die die Expression der TJ-Proteine unter Aldosteron reguliert wird.
- Physiologische Relevanz des veränderten Expressionsmusters der betroffenen TJ-Proteine bei ENaC-induziertem Na^+ -Strom unter Berücksichtigung der einzelnen funktionellen Charakteristika.
- Rolle der Lokalisation der einzelnen TJ-Proteine.
- Pathophysiologische und klinische Konsequenz.

4.1 **Aldosteron-abhängige Induktion des epithelialen Na^+ -Kanals ENaC und die parazelluläre Barriere**

Die Stärke des transepithelialen Na^+ -Stroms wird über die Synthese des ENaC reguliert, der durch Aldosteron induziert wird. Da von den drei Untereinheiten des ENaC, die in der Stöchiometrie $\alpha_2\beta_1\gamma_1$ dessen Struktur bilden, die β - und γ -Untereinheit unter Aldosteron-Stimulation verstärkt synthetisiert werden, kommt ihnen bei der Regulation des J_{Na} wahrscheinlich eine besondere Bedeutung zu wie Garty et al. 1996⁶ und Epple et al. 2000 beschrieben²³. Der ENaC ist im Colon in der apikalen Membran des Oberflächenepithels lokalisiert⁵⁴.

In dieser Studie wurde die funktionelle Induktion von ENaC betrachtet, indem der Kurzschlussstrom gemessen und anschließend ENaC selektiv mit Amilorid blockiert wurde, um den von ENaC vermittelten J_{Na} von anderen Fluxen zu differenzieren.

Die Immunfluoreszenzfärbung der γ -ENaC-Untereinheit der Gewebeproben ergab eine starke Zunahme des Signals in der apikalen Zellmembran. Dieses Ergebnis bestätigte die Induktion von ENaC. Zu differenzieren blieb, ob der nachgewiesene ENaC-vermittelte Na^+ -Strom auch durch eine parallel regulierte Veränderung der Tight Junction-Expression und -Lokalisation mitunterstützt wird.

4.2 Regulation der TJ-Proteine während der Induktion von ENaC

Je nach Barrierencharakter wird zwischen dichter und durchlässiger Tight Junction unterschieden¹⁸. Im Colon sigmoideum findet sich eine dichte Epithelbarriere wie es für den distalen Abschnitt von Organen mit tubulären Resorptionsepithelien wie Colon und Niere charakteristisch ist. Die apikale Zellmembran einer dichten epithelialen Barriere ist permeabler als ihr parazellulärer Spalt. Somit ist die Abdichtung des parazellulären Spaltes eine wichtige Komponente in der Regulation des transepithelialen Gradienten. Über ihn können Ionen und andere Moleküle selektiv gehindert werden parazellulär in das Lumen zu diffundieren. Gleichzeitig kann auch ihre Passage reguliert werden. Diese Physiologie bildet die Basis für alle resorptiven Vorgänge.

Die Resorption wird über die individuelle Zusammensetzung der Tight Junction im parazellulären Spalt aus verschiedenen Proteinen mit unterschiedlichen Barrierefunktionen mitreguliert.

Durch den ENaC-vermittelten Na^+ -Transport vom Lumen ins Interstitium wird ein negatives transepitheliales Potential aufgebaut. Zum Ausgleich diffundieren Kationen wie K^+ ins Lumen; der Serum- K^+ -Spiegel sinkt. Dieser Vorgang kann nur ablaufen, wenn der durch den Na^+ -Transport entstandene negative transzelluläre Gradient aufrechterhalten wird. Eine Voraussetzung dafür stellt die entsprechende Abdichtung des parazellulären Spaltes durch die Induktion spezieller TJ-Proteine dar. Wäre diese nicht gegeben, würden die in das Interstitium transportierten Na^+ -Ionen zum Ausgleich des negativen Gradienten ins Lumen rediffundieren.

Frühe Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen Tight Junction-vermittelter parazellulärer Permeabilitätsänderung und Aldosteron bzw. ENaC-abhängigem Na^+ -Strom fanden Hoffmann et al. bereits 1990⁴⁴. Sie konnten eine Abdichtung der parazellulären Barriere im distalen Colon des Kaninchens während der Inkubation mit Aldosteron in physiologischer Glukokortikoid-

konzentration von 0,1 μM feststellen. 1998 wiesen Stellwagen et al. einen ähnlichen Effekt der Abdichtung der Tight Junction des Brustepithels beim Rind unter erhöhten Cortisolspiegeln nach⁸³. In einer nachfolgenden Studie beschrieben sie 1999 eine vermehrte Occludin-Expression nach der Behandlung von Zellkulturen des gleichen Gewebes mit 1 μM Dexamethason für 24h⁸⁴. Parallel dazu demonstrierten 1999 Quaroni et al. die Expression von ZO-1 in der intestinalen Zelllinien IEC-6 nach einwöchiger Inkubation mit 0,5 μM Hydrocortison⁶⁹. 2003 konnten Romero et al. die verstärkte ZO-1 und Occludin-Induktion in kapillären Endothelzellen des Rattengehirns unter Dexamethason nachweisen⁷² und 2005 beobachteten Förster et al, dass die Aktivierung der Glucocorticoidrezeptors durch Hydrocortison in einer erhöhten Occludin-RNA und -Protein-Konzentration resultiert²⁶.

All diese Ergebnisse ließen an eine mögliche Interaktion zwischen weiteren Tight Junction-Proteinen und Aldosteron-getriggertem Na^+ -Strom denken. Eine Abdichtung des parazellulären Spaltes wäre zum Beispiel ebenfalls durch die Induktion Na^+ - bzw. kationenselektiver Barrieren, wie es Claudin-4 bzw. -8 sind, gegeben. Sie könnten verhindern dass die über ENaC resorbierten Na^+ -Ionen ins Lumen rediffundieren.

In dieser Studie wurde der Frage nachgegangen, welche anderen Tight Junction-Proteine durch eine Änderung von Expression und/oder Lokalisation zu einer Abdichtung des parazellulären Spaltes beitragen und so das physiologische Konzept von Aldosteron unterstützen könnten.

Unter Aldosteron konnte eine verstärkte Expression von Occludin und Claudin-8 festgestellt werden. Ferner deutete sich eine Translokation von Claudin-7 in subjunctionale Bereiche an. Es stellte sich die Frage, ob die Expression und Translokation der betroffenen Proteine direkt durch Aldosteron oder durch andere parallel ablaufende Regulationsmechanismen wie z. B. über den Na^+ -Strom reguliert werden.

Unter dieser Fragestellung wurden einige Kontrollexperimente durchgeführt, bei denen gleich zu Beginn Amilorid appliziert wurde, welches J_{Na} des über Aldosteron induzierten ENaC sofort inhibierte. Unter diesen Bedingungen konnte weder eine verstärkte Expression von Claudin-8 und Occludin noch eine Claudin-7-Translokation festgestellt werden.

Es konnte somit nachgewiesen werden, dass die Stimulation durch Aldosteron allein keine direkten Auswirkungen auf das Tight Junction-Muster hat. Das Ergebnis deutet auf einen sekundären eventuell Na^+ -getriggerten Regulationsmechanismus hin, da die erwähnten Auswirkungen auf die Tight Junction bei Inhibition des ENaC-vermittelten Na^+ -Stroms durch Amilorid ausblieben.

4.2.1 Occludin während der Induktion von ENaC

Occludin ist das erste und mit 56 kDa gleichzeitig das größte TJ-Protein über das berichtet wurde³². Seine komplexe Rolle als Tight Junction-Protein wird seit Jahren diskutiert und ist Gegenstand zahlreicher Studien.

Die funktionelle Rolle des Occludins als Baustein der transepithelialen Barriere war zunächst umstritten. Schon 1999 demonstrierten Stelwagen et al. eine verstärkte Expression des Occludin unter Dexamethason und Prolactin. Den stärksten Effekt erzielten sie über eine Kombination beider Hormone⁸⁴. Saitou et al. 2000 untersuchten Occludin-defiziente Mäuse und stellten fest, dass sich die Barrierefunktion der Tight Junction durch die Abwesenheit von Occludin elektrophysiologisch nicht verändert. Gleichzeitig beobachteten sie jedoch ein signifikantes postnatales Wachstumsdefizit der Mäuse und histologische Veränderungen in verschiedenen Geweben wie chronische Entzündung und Hyperplasie des gastrischen Epithels, Kalzifizierung des Gehirns, ein Verlust zytoplasmatischer Granulae in Speicheldrüsen und Ausdünnung der Compacta des Knochens. Die männlichen Occludin-defizienten Mäuse waren ferner wegen testikulärer Atrophien nicht in der Lage Nachkommen zu zeugen. Die Ergebnisse führten zu der Überlegung, dass die Tight Junction einen Verlust der Barrierefunktion für andere elektrophysiologisch nicht messbare Substanzen erlebt hatte und/oder Occludin in der intrazellulären Signalübertragung und Differenzierung der Zellen eine Rolle spielt⁷⁵.

2001 berichteten Hirase et al. dass eine Stimulation der Tight Junction durch Histamin und Lyso-phosphatidyl-Säure eine Phosphorylierung von Occludin und die Zunahme der parazellulären Permeabilität nach sich zieht⁴².

2005 untersuchten Schulzke et al. in einer Studie an Occludin-Knock-out-Mäusen die Rolle von Occludin als Barrierenbaustein der Tight Junction detaillierter. Sie führten elektrophysiologische Messungen mittels Impedanz-Wechselstromanalyse durch und konnten so zwischen epithelalem und subepithelalem Widerstand differenzieren. Ferner untersuchten sie die trans- und die parazelluläre Leitfähigkeit einzeln und beobachteten die Gewebe unter mechanischem Stress und niedrigem Calcium-Spiegel. Die Ergebnisse zeigten, dass die Abwesenheit von Occludin keine Auswirkungen auf die parazelluläre Permeabilität hat⁷⁸ und bestätigten so die Ergebnisse der Studie von Saitou et al. (2000)⁷⁵.

Yu et al. untersuchten 2005 Occludin-defiziente Nierenzellen des Madin-Darby Kaninchens. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Unterbindung der Occludin-Expression zu keiner Veränderung der Tight Junction-Organisation wohl aber zur veränderten Expression der einzelnen

Tight Junction-Proteine führt. Im Einzelnen zeigte sich eine verminderte Expression von Claudin-1 und -7 und eine erhöhte Expression von Claudin-3 und -4. Die Claudin-2-Expression blieb unverändert. Diese Veränderungen konnten jedoch nicht mit einer bedeutenden Rolle des Occludins als Tight Junction-Barriere in Verbindung gebracht werden⁹⁵. Da die Stammzellen des MD-Kaninchens schon Occludin-defizient geklont wurden, ist eine Kompensation der Occludin-bedingten Barrierefunktion durch eine veränderte Claudin-Expression wahrscheinlich.

Es wird vermutet, dass Occludin eine Rolle bei der Signaltransduktion apoptotischer Zellen auf das Aktinzytoskelett spielt. So zeigten Occludin-defiziente Zellen eine verminderte Fähigkeit apoptotische Zellen aus dem Zellverbund auszustoßen⁹⁵. Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass die Hauptfunktion des Occludin in der interzellulären Kommunikation bzw. der Kommunikation zwischen Zelle und Umwelt liegt. Insgesamt verdichten sich die Hinweise darauf, dass Occludin zumindest in der direkten Regulation der parazellulären Barriere keine Schlüsselrolle zukommt.

In der vorliegenden Studie konnte eine klare Zunahme des Occludin-Signals unter ENaC-Induktion sowohl im Western-Blot als auch in der Immunfluoreszenzfärbung festgestellt werden. Occludin wurde im Vergleich mit der Kontrollprobe vermehrt in subjunctionalen Bereichen exprimiert. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen einer erst kürzlich erschienenen Studie von Förster et al. (2005), in der eine verstärkte Occludin-Expression unter Inkubation mit Glukokortikoiden in Kapillarendothelien des menschlichen Gehirns *in vitro* mit gleichzeitig dreifach erhöhtem transepithelialen Widerstand beschrieben wurde²⁶.

Die vermehrte Expression des Occludin unter Inkubation mit Aldosteron ist jedoch aufgrund des oben erläuterten Erkenntnisstandes nicht notwendigerweise der Grund für die Erhöhung des transepithelialen Widerstandes, zumal Occludin nach Stimulation mit Aldosteron vermehrt subjunctional exprimiert wurde.

Die wahrscheinlich komplexe Rolle von Occludin als Bestandteil der Tight Junction und die Bedeutung seiner vermehrten subjunctionalen Expression unter Aldosteron-bedingter ENaC-Induktion bleiben ebenso wie seine Regulationsmechanismen in weiteren Studien zu untersuchen.

4.2.2 Die Rolle von Claudin-8

2004 wiesen Li et al. die Expression von Claudin-8 entlang der Aldosteron-sensitiven Tubulusabschnitten, dem distalen Nephron, dem terminalen aufsteigenden dünnen Ast der Henle-Schleife und im distalen Tubulus der Niere der Maus nach⁵⁷. Diese Tubulusabschnitte zeichnen sich als die am höchsten elektrisch isolierten Segmente aus. Claudin-8, welches wie durch Yu et al. beschrieben nicht nur eine Barriere für Alkalimetallionen sondern auch für divalente Kationen und Protonen darstellt², trägt zur Aufrechterhaltung des durch die Na⁺-Resorption gebildeten negativen Gradienten und damit zur K⁺-Sekretion bei.

Diese Beobachtungen führten zu der Frage, ob sich Aldosteron entweder auf die Expression von Tight Junction-Proteinen wie Claudin-8 auswirkt oder ob dieses Aldosteron-unabhängig als Claudin mit stark abdichtender Funktion in diesen sehr dichten Tight Junctions exprimiert wird. In dieser Studie zeigten die Western-Blots und Immunfluoreszenzfärbungen eine verstärkte Expression von Claudin-8 in der Tight Junction unter Aldosteron. Es konnte eine klare Zunahme seiner Expression in der apikalen Zellmembran festgestellt werden.

Die Vermutung, dass die Expression von Claudin-8 in Aldosteron-sensitiven Abschnitten des renalen Tubulussystems ein Hinweis auf eine Regulation ist, die mit Aldosteron zusammenhängt, ist somit bestätigt worden. Wie schon erwähnt und in den Kontrollexperimenten untersucht handelt es sich dabei aber wahrscheinlich nicht um eine direkte Induktion durch Aldosteron. Da sich Aldosteron bei Blockade des durch ihn induzierten Na⁺-Stroms nicht auf das Tight Junction-Expressionsmuster auswirkt, deutet sich hier ein parallel ablaufender Regulationsmechanismus wie eine Triggerung durch den ENaC-abhängigen Na⁺-Strom an.

Die abdichtende Wirkung von Claudin-8 gegenüber Kationen in der Niere wurde bereits nachgewiesen⁹⁴. Als ein weiterer möglicher Mechanismus zur kationenselektiven Abdichtung wurde die Translokation von porenbildenden Claudinen wie Claudin-2 diskutiert. Yu et al. berichteten 2003 von einer Abnahme des Claudin-2, die mit der erhöhten Expression des Claudin-8 in MDKC II-Zellen einhergeht⁹⁴.

Dieser Mechanismus scheint im vorliegenden Fall jedoch keine Rolle zu spielen, da Claudin-2 im distalen Colon nicht exprimiert wird wie Bürgel et al. 2002 zeigten¹². Die Verstärkung der parazellulären Barriere kann demnach durch den direkt abdichtenden Effekt von Claudin-8 erklärt werden wie es auch schon 2003 von Jeansonne et al. diskutiert wurde⁴⁷. Sie wiesen eine Interaktion zwischen Claudin-8 und dem Multi-PDZ-Protein1 (MUPP1) nach, welche eine Reduktion der parazellulären Leitfähigkeit zur Folge hat. Der genaue Signaltransduktionsweg, über den Claudin-8 eine Abdichtung des parazellulären Spaltes vermittelt, bleibt zu untersuchen.

Dieser abdichtende Effekt wird möglicherweise durch die Translokation von Claudin-7, welches als Na^+ -Pore fungiert und dessen Translokation in subjunktionale Bereiche unter ENaC-Induktion sich andeutete, unterstützt.

4.2.3 Claudin 7: Lokalisation und Funktion

Claudin-7 ist Bestandteil von Tight Junctions in endodermalen Epithelzellen. Erst vor kurzem charakterisierten Alexandre et al. (2005) Claudin-7, indem sie es in LLC-PK1-Zellen überexprimierten und u. a. elektrophysiologisch untersuchten. Claudin-7 erhöht die parazelluläre Permeabilität von Na^+ . Ferner besitzt es eine Barrierefunktion für parazellulären Cl^- -Strom¹.

Li et al. 2004 wiesen nach, dass Claudin-7 parallel zu Claudin-8 in den Aldosteron-sensitiven Tubulusabschnitten der Niere exprimiert wird. Es wurde in der gleichen Studie in der basolateralen Zellmembran des Tubulusendothels lokalisiert. Diese Lokalisation führte zu der Vermutung, dass in diesen Nierenabschnitten Claudin-7 einen rekrutierbaren Reservepool darstellt oder eine andere noch unbekannt Funktion in der interzellulären Signalgebung oder der Zell-Matrixadhäsion haben könnte⁵⁷.

In dieser Studie konnte Claudin-7 in der basolateralen Membran von Oberflächen- und Kryptenepithelzellen nachgewiesen werden. Nach Induktion des ENaC deutete sich eine Translokation in subjunktionale Bereiche der Tight Junction an. Im Western-Blot war dabei keine Änderung der quantitativen Präsenz von Claudin-7 festzustellen.

Eine Translokation von Claudin-7 in subjunktionale Bereiche der Tight Junction würde das Modell von Alexandre et al. (2005) stützen. Das Verschwinden von Claudin-7 aus der Tight Junction verhindert danach das Rediffundieren von Na^+ und ermöglicht gleichzeitig die Diffusion von Cl^- durch den parazellulären Spalt entlang dem negativen Gradienten. Es könnte somit den Effekt von Claudin-8 auf die Aldosteron-induzierte Na^+ -Resorption und K^+ -Sekretion unterstützen.

4.2.4 Lokalisation und Rolle von Claudin-1, -4 und -5

Claudin-1 stellt eine parazelluläre Barriere für Moleküle von einer Größe bis 600 Da dar. Es ist Bestandteil der Epidermis⁸⁵, der Lunge, von Endothelien und Osteoblasten⁸⁸. In dieser Versuchreihe konnte Claudin-1 in der apikolateralen Membran der Epithelzellen des Colon sigmoideum

nachgewiesen werden. Seine Lokalisation und Expressionsstärke blieb unter ENaC-Induktion unverändert. Claudin-1 scheint eine konstant abdichtende Funktion während der Zunahme des Aldosteron-induzierten Na^+ -Stroms zu haben, während über andere Tight Junction-Proteine, wie Claudin-8, die Tight Junction-Barriere unter Na^+ -Induktion dynamisch reguliert wird.

Claudin-4 verstärkt die Na^+ -selektive Barriere⁹¹. In MDCK II-Zellen bewirkte seine Expression einen Anstieg des transepithelialen Widerstandes um 300%⁹¹. Claudin-4 wurde im Colon und u. a. in Lungenepithelien⁸⁸ und der Stria vascularis⁵² des Innenohrs nachgewiesen. In einer neu erschienenen Studie untersuchten Le Moellic et al. (2005)⁶³ die Auswirkungen von Aldosteron auf Claudin-4 im renalen Sammelrohr und konnten eine Aldosteron vermittelte Phosphorylierung feststellen. Expressionsstärke und Lokalisation blieben hierbei unverändert. Es wurde jedoch eine verstärkte parazelluläre Permeabilität für ¹²⁵I festgestellt und als mögliche Konsequenz der Claudin-4-Phosphorylierung diskutiert.

Auch in dieser Versuchsreihe mit humanem Colon sigmoideum war eine unveränderte Expression und Lokalisation in der apikolateralen Membran von Epithelzellen nach Inkubation mit Aldosteron festzustellen. Die Ergebnisse decken sich somit mit denen Le Moellic et al. am Sammelrohr der Niere. Es scheint damit keine relevante Funktion in der Aufrechterhaltung des Aldosteron-induzierten negativen transmembranären Potentials zu haben. Die These, dass Claudin-4 in seiner Funktion als Na^+ -Barriere über eine vermehrte Expression eine entscheidende Rolle bei der Abdichtung der Tight Junction spielt und dadurch die physiologische Funktion des ENaC unterstützt, erscheint somit nicht wahrscheinlich. Es bleibt zu klären, ob durch die Phosphorylierung von Claudin-4 eine Konfigurationsänderung stattfindet und es so in seiner Funktion verändert wird. Es könnte über sie aber auch eine qualitative Verstärkung seiner abdichtenden Wirkung gegen Na^+ - oder andere Ionen erfahren. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Claudin-4 nach Phosphorylierung eine neue noch unbekannte Rolle in der Tight Junction beispielsweise in der Signaltransduktion spielt.

Claudin-5 wird in Endothelien und Epithelien exprimiert. Schon Bürgel et al. wiesen 2002 seine Expression im Colon sigmoideum nach¹². Claudin-5 wurde als Protein charakterisiert, das in der Tight Junction die Durchlässigkeit für Moleküle mit einer Größe bis 433 kDa limitiert. In dieser Funktion spielt es beispielsweise in der Physiologie der Blut-Hirn-Schranke der Maus eine große Rolle⁶⁷. In Transfektionsstudien wiesen Amasheh et al. (2005) eine selektive Verstärkung der Barriere durch Claudin-5 in der humanen Epithelzelllinie Caco-2 nach⁴.

In dieser Studie konnte keine Änderung der Expression und Lokalisation von Claudin-5 nach Inkubation des Colon mit Aldosteron festgestellt werden.

4.2.5 Mögliche Regulationsmechanismen der Tight Junction während der Induktion des ENaC-abhängigen Na⁺-Stroms

In den Kontrollexperimenten, in denen der ENaC-abhängigen Na⁺-Strom gleich zu Beginn der Inkubationszeit mit Aldosteron durch den Kanalblocker Amilorid gehemmt wurde, konnten keine Veränderungen des Tight Junction-Aufbaus festgestellt werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Proteinexpression der Tight Junction-Proteine nicht direkt durch Aldosteron, sondern durch zwischengeschaltete Na⁺-Strom-abhängige Mechanismen reguliert wird. Gegenwärtig laufende Studien befassen sich mit der Betrachtung der Promoterebene von Tight Junction-Proteinen während der Inkubation mit Aldosteron.

Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, dass jedes der Proteine an der Aldosteron-abhängigen Signaltransduktionskaskade zur Regulation der ENaC-Aktivität auch an der Regulation der Tight Junction-Proteinaktivität beteiligt ist. Am Beispiel von Claudin-4 demonstrierten schon Le Moellic et al. die Phosphorylierung als ein möglicher Regulationsmechanismus in Frage kommt.

Schritte, die die Expression und Lokalisation der Tight Junction-Proteine beeinflussen könnten, wären demnach die Ubiquitinierung durch Nedd 4-2 und die Phosphorylierung über SGK-Proteine oder durch Proteine der 14-3-3-Familie, die als Bestandteile der Signaltransduktionskaskade zur Regulation des ENaC diskutiert werden. 14-3-3-Proteine phosphorylieren mehr als 200 verschiedene Proteine des eukaryonten Organismus⁹⁰. Jüngst konnten Ichimura et al. 2005 nachweisen, dass 14-3-3-Proteine den ENaC-Abbau durch Nedd 4-2 in Kooperation mit der SGK1 hemmen. Dies geschieht möglicherweise durch eine Unterbrechung der Ubiquitinierung am PY-Motivs des ENaC⁴⁵.

All diese Schritte könnten eine Rolle in der Regulation der Tight Junction-Proteinexpression während der Induktion des ENaC-abhängigen Na⁺-Stroms spielen, da sie unmittelbar an dessen Induktion beteiligt sind. Ebenso könnten jedoch parallel ablaufende Prozesse wie veränderte Ionentransporte und -Konzentrationen, welche die Membrandepolarisation begleiten und mitbewirken, ausschlaggebend sein. Dies könnte beispielsweise die Ca²⁺-oder Mg²⁺-Konzentration betreffen. Rao et al. untersuchten 2004 eine mögliche Abhängigkeit der ENaC-Aktivität von der intra- und extrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Sie stellten fest, dass erhöhte Ca²⁺-Konzentrationen mit einer verstärkten Expression von ENaC-Untereinheiten einhergehen. Gleich-

zeitig wiesen sie mit Anti-Ubiquitin-Antikörpern die Ubiquitinierung des ENaC nach⁷⁰. Korbmacher et al. berichteten 2004 dass für die Aktivität des ENaC die Anwesenheit von Mg^{2+} im Zytosols notwendig sei. Sie führten diese Beobachtung auf die Mg^{2+} -Abhängigkeit einiger Phosphatase-Inhibitoren zurück, welche die Hemmung der Nedd 4-2 aufrechterhalten und so den vermehrten ENaC-Abbau verhindern²⁰.

Die Mechanismen, über die ENaC reguliert wird, sind bis zum heutigen Tage nur teilweise bekannt. Neben den genannten hormonellen Mechanismen gibt es andere Agentien, die den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen, wie beispielsweise Vasopressin. Aber auch G-Proteingekoppelte Mechanismen, zytoskeletale Proteine, Ionen und Ionenkanäle werden auf ihre Einflüsse auf die Aktivität des ENaC untersucht⁷⁰. Zum Verständnis der Signaltransduktionswege, über die parallel zur Regulation der ENaC-Aktivität eine Regulation der Tight Junction-Abdichtung erfolgen könnte, bedarf es weiterer intensiver Studien.

4.2.6 Klinischer Background: Liddle-Syndrom, Pseudohypoaldosteronismus und Mucoviszidose

Für zwei pädiatrische Krankheitsbilder ist diese Studie unmittelbar von Bedeutung: Den Pseudohypoaldosteronismus und das Liddle-Syndrom (Pseudohyperaldosteronismus).

Bei beiden Krankheitsbildern liegen Mutationen der ENaC-Untereinheiten vor und führen so zu einer veränderten Aldosteron-abhängigen Na^+ -Resorption^{21,76,68}. Nach den Ergebnissen dieser Studie ist davon auszugehen, dass die Zusammensetzung der Tight Junction, die Expression und Lokalisation seiner einzelnen Proteine hiervon unmittelbar betroffen sind. Die Auswirkungen der ENaC-Mutationen auf die Tight Junction bei diesen beiden Krankheitsbildern bleiben zu untersuchen.

Man unterscheidet zwei Formen des Pseudohypoaldosteronismus (PHA); den autosomal-rezessiv vererbaren multisystemischen und den autosomal-dominanten renalen Typ. Exemplarisch wird hier der renale Typ, der Pseudohypoaldosteronismus Typ I (PHA I), vorgestellt.

Beim PHA I handelt es sich um ein seltenes neonatales Salzverlustsyndrom, das mit Gedeihstörungen verbunden ist. Obwohl die charakteristische Hyponatriämie und Hyperkaliämie mit metabolischer Azidose eine erniedrigte Aldosteronaktivität erwarten lassen sind seine biochemischen Merkmale hohe Renin- und Aldosteron-Plasma-Konzentrationen (*Pseudohypoaldosteronismus*). Zufgeführte Mineralokortikoide zeigen keine Wirkung. Die Therapie besteht aus einer

Elektrolytsubstitution mit NaCl. Bei Patienten, die gegen diese Therapie resistent sind, sind letale Verläufe zu beobachten.

Beiden Formen des Pseudohypoaldosteronismus liegen unterschiedliche Mutationen von ENaC-Untereinheiten, die diese teilweise verkürzen, oder des Mineralkortikoid-Rezeptor hMR, die zu dessen Inaktivierung führt^{21, 76, 68}, zugrunde. Bei einigen Patienten wurde jedoch keine der beiden Varianten festgestellt.

Yu et al. untersuchten daher 2004 unter Berücksichtigung der scheinbar Aldosteron-abhängigen Expression der Kationenbarriere Claudin-8 solche Patienten auf Mutationen des Claudin-8. Sie konnten jedoch keine Mutation feststellen und die Hypothese der pathogenetischen Bedeutung einer Claudin-8 Mutation für den PHA somit entkräften⁴³.

Die Ergebnisse dieser Studie werfen ein neues Licht auf einen möglichen Kausal-Zusammenhang zwischen Claudin-8, seiner abdichtenden Funktion und dem ENaC bzw. hMR-Defekt bei PHA. Ohne Aldosteronwirkung kann ENaC nicht induziert werden, was nach unserer Beobachtung eine Verstärkung der Na⁺-Resorption und somit Tight Junction-Abdichtung verhindert. Auch eine Mutation des ENaC könnte den gleichen Effekt erzielen.

Das Liddle-Syndrom (*syn.* Pseudohyperaldosteronismus) ist eine hereditäre autosomal-dominante Erkrankung mit den Charakteristika Hypertonie, Hypokaliämie. Bei den betroffenen Patienten werden eine supprimierter Renin-Plasma-Aktivität und ein niedriger Aldosteron-Plasma-Aktivität gemessen. Die Patienten versterben unbehandelt häufig frühzeitig an den Folgen der Hypertonie. Eine Behandlungsmöglichkeit bietet der Einsatz von Amilorid.

Beim Liddle-Syndrom wurden Mutationen im PY-Motiv des zytoplasmatischen C-Terminus der β - und γ -ENaC-Untereinheit festgestellt, die in diesem Fall jedoch die Nedd 4-2-vermittelte Inaktivierung des ENaC inhibiert und so zu dessen verstärkter Aktivierung führen³¹. Eine durch die verstärkte Na⁺-Resorption getriggerte Abdichtung der Tight Junction würde über die Stabilisierung des elektrochemischen Gradienten unterstützend zur Symptomatik der scheinbar erhöhten Aldosteron-Aktivität beitragen. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind daher auch bei diesem Krankheitsbild mit den bis dato bekannten pathogenetischen Daten stimmig.

Immer wieder wird auch ein Zusammenhang zwischen ENaC und der zystischen Fibrose diskutiert. Bei der Zystischen Fibrose (Mukoviszidose) handelt es sich um eine autosomal-rezessiv vererbare Multiorganerkrankung, die in einer erhöhten Salzkonzentration und Viskosität sämtlicher vom Körper sezernierten Flüssigkeiten resultiert. Die Mukoviszidose ist die häufigste an-

geborene Stoffwechselerkrankung der weißen Bevölkerung und wird bislang hauptsächlich auf verschiedene Mutationen des CF-Gens und einem daraus entstehenden abnormen „Cystic fibrosis transmembrane regulator“ (CFTR)-Kanal zurückgeführt. Der CFTR-Kanal ist ein cAMP-abhängiger Cl^- -Kanal an der apikalen Zellmembran von Epithelzellen. Seine Aktivierung erfolgt über Phosphorylierung durch die Proteinkinase A. Aus der Mutation des CFTR-Kanals folgt ein verminderter oder fehlender Cl^- -Transport. Bei den Patienten findet man eine verminderte Cl^- - und erhöhte Na^+ -Konzentration der mukösen Sekrete mit konsekutivem Wasserentzug und Obstruktion verschiedenster Körperhöhlen durch das visköse Sekret.

Lange wurde eine Inhibition des ENaC durch CFTR diskutiert, die bei Mucoviszidose gestört ist und eine verstärkte Na^+ -Resorption bewirkt. Viele verschiedene Studien kamen zu kontroversen Ergebnissen. 2005 untersuchten Barbry et al. erneut den Zusammenhang zwischen ENaC und CFTR-Oozyten des *Xenopus laevis* und konnten keine CFTR-bedingte ENaC-Inhibition feststellen. Sie beobachteten einen inhibitorischen Effekt bei zu hohem Serienwiderstand und stellten die Hypothese auf, dass positive Ergebnisse in vorausgegangenen Studien auf suboptimale Bedingungen wie eine Überexpression des ENaC mit daraus resultierendem hohem Widerstand zurückzuführen seien⁶⁶.

4.3 Schlussfolgerung

In dieser Studie konnte erstmals nachgewiesen werden, dass unter Aldosteron der transzelluläre Na^+ -Transport nicht nur durch Steigerung der Na^+ -Resorption sondern zusätzlich durch einen zweiten Mechanismus, die Abdichtung des parazellulären Weges, gefördert wird.

Die These, dass unter Aldosteron-Stimulation eine Änderung des Expressionsmuster von Tight Junction-Proteinen und ihrer Lokalisation in der Tight Junction zu beobachten ist, wurde bestätigt. Gleichzeitig wurde in dieser Studie gezeigt, dass die Zunahme der parazellulären Barriere der Tight Junction nicht direkt durch Aldosteron, sondern über die Induktion des ENaC-abhängigen Na^+ -Transports reguliert wird. Da bei Inhibition des ENaC durch Amilorid keine Veränderung von Expression und Lokalisation der betroffenen Proteine zu beobachten war, ist davon auszugehen, dass der Effekt des ENaC eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Claudin-8-Expression spielt.

Diese Beobachtungen decken sich mit dem physiologischen Konzept des Aldosteron. Durch eine vermehrte Expression der Kationen-Barriere Claudin-8 sowie zusätzlich eine sich andeutende gleichzeitige Translokation des Na⁺-Permeabilität vermittelnden Claudin-7 aus der Tight Junction wird der elektrochemische Gradient aufrechterhalten und die K⁺-Sekretion ermöglicht.

Die Rolle des ebenfalls unter dem Aldosteron-induzierten Na⁺-Strom vermehrt exprimierten Occludin bleibt zu untersuchen. Einige Studien weisen darauf hin, dass es bei der inter- und intrazellulären Signaltransduktion eine Rolle spielen könnte.

Durch diese neuen Ergebnisse ergeben sich neue Fragen, die zu klären es weiterer Studien bedarf. Wir wissen bisher wenig über die Regulationsmechanismen der Tight Junction. So bleiben die Mechanismen der intrazellulären Signaltransduktion, die den hier beschriebenen Ereignissen im Detail zugrunde liegen, bis heute ungeklärt. Ebenfalls unklar bleibt, inwieweit sich eine Langzeit-Inkubation mit Amilorid auf die Expression von ENaC auswirkt und ob ENaC unter diesen Bedingungen überhaupt noch nachzuweisen ist. Im Fall einer Abwesenheit des ENaC muss darauf geschlossen werden, dass ein weiterer noch unbekannter und ENaC-unabhängiger Regulationsschritt entscheidend ist. Um nach der Relevanz eines solchen weiteren Regulationsschrittes zu suchen, wäre auch eine genaue Beschreibung des Expressions- und Lokalisationsmusters der Tight Junction-Proteine unter Aldosteron-Inkubation bei gleichzeitigem Na⁺-Entzug interessant.

Einen weiteren Ansatz bildet die Untersuchung der Tight Junction während einer Membrandepolarisation bzw. der Einfluss anderer Elektrolyte wie Ca²⁺ und Mg²⁺ auf die Abdichtung des parazellulären Weges.

In jedem Fall könnte die Beobachtung, dass die Tight Junction-Proteine als Barrierekomponente durch Expressionsmuster aktiv den transzellulären Transport unterstützen, einen weiteren Baustein im Verständnis malabsorptiver Erkrankungen darstellen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde die Veränderung des Expressionsmusters und der Lokalisation von einzelnen Proteinen der Tight Junction unter Stimulation mit Aldosteron untersucht. Aldosteron induziert neben der basolateralen $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ vor allem den apikalen epithelialen $\text{Na}^+\text{-Kanal}$ (ENaC), woraus eine vermehrte $\text{Na}^+\text{-Resorption}$ resultiert. Die Voraussetzung für die Effektivität dieses Mechanismus ist dabei eine ausreichende Abdichtung des parazellulären Weges, ohne die der transzelluläre elektrochemische Gradient zusammenbräche und das aktiv resorbierte Na^+ parazellulär wieder zurück diffundieren würde.

Es ist bekannt, dass die beiden Tight Junction-Proteine Claudin-7 und Claudin-8 in den Aldosteron-sensitiven Tubulusabschnitten der Niere spezifisch exprimiert werden. Diese Beobachtung führte uns zu der Vermutung, dass ein Zusammenhang zwischen der Regulation dieser Tight Junction-Proteine und Aldosteron bestehen könnte. Wir haben daraufhin die Arbeitshypothese aufgestellt, dass über eine solche Regulation zugleich der $\text{Na}^+\text{-Transport}$ stimuliert und die oben erklärte Abdichtung des parazellulären Weges gesteigert werden könnte.

Als wichtigstes Ergebnis zeigte sich, dass das als Kationenbarriere fungierende Claudin-8 nach der Induktion des $\text{Na}^+\text{-Transports}$ durch Aldosteron vermehrt in der Tight Junction nachweisbar war und die Permeabilität des parazellulären Weges für Na^+ verminderte. Hierbei blieben die Expression und die Lokalisation von Claudin-2, -4 und -5 unverändert. Das als $\text{Na}^+\text{-permeabilitätssteigernd}$ beschriebene Claudin-7 wurde ebenfalls unverändert exprimiert, zeigte jedoch eine Tendenz zur Translokation aus der Tight Junction heraus in subjunctionale Bereiche.

Erste Ergebnisse zur Signaltransduktion deuten darauf hin, dass die Regulation der Tight Junction-Proteine nicht direkt über Aldosteron erfolgt. In Experimenten, in denen mit Aldosteron stimuliert, der $\text{Na}^+\text{-Strom}$ jedoch durch den ENaC-Blocker Amilorid während des gesamten Experiments inhibiert wurde, traten die oben genannten Veränderungen nicht auf. Die Ergebnisse sprechen somit dafür, dass die Regulation der Expression und der Lokalisation von Claudin-8 über den Effekt des ENaC-medierten $\text{Na}^+\text{-Einstroms}$ in die Zelle erfolgt.

In dieser Studie konnte zum ersten Mal als neuer physiologischer Regelmechanismus nachgewiesen werden, dass der Aldosteron-induzierte $\text{Na}^+\text{-Transport}$ auch über eine parazelluläre Abdichtung durch Veränderung der molekularen Zusammensetzung der Tight Junction reguliert wird. Gegenstand zukünftiger Untersuchungen wird die genaue Aufklärung der Signaltransduktion dieses Mechanismus sein.

6 Curriculum vitae

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

7 Danksagung

Ich danke Prof. Michael Fromm für die Vergabe meines Dissertationsthemas und die Aufnahme in den Kreis der Doktoranden des Instituts für Klinische Physiologie der Charité ebenso wie für seine Ratschläge beim Verfassen der Arbeit. Bei Priv.-Doz. Dr. Salah Amasheh möchte ich mich für die hervorragende Betreuung bei der Durchführung der Experimente und der Auswertung der Daten sowie für die anregenden fachlichen Diskussionen bedanken. Beide, sowohl Prof. Fromm als auch Dr. Amasheh, hatten immer ein offenes Ohr bei Problemen, gaben hilfreiche Ratschläge und hervorragende Anleitung.

Ohne die Hilfe und Unterstützung weiterer Institutmitglieder wäre die Fertigstellung der Dissertation nicht unter diesen optimalen Bedingungen geglückt. Hierfür bedanke ich mich besonders bei Ingrid Lichtenstein, Friederike Hirsch, Sonja Dullat, Susanna Schön und Anja Fromm, die mich durch ihre Erfahrung in der technischen Durchführung und durch tatkräftige Hilfe immer unterstützt haben. Für die Hilfe bei der Herstellung der Graphiken bedanke ich mich herzlichst bei Sebastian Brokat vom Center for Cardiovascular Research der Charité.

Ich bedanke mich ferner bei Christian Brokat für seine Unterstützung und Hilfe während der Zeit meiner Dissertation und während der gesamten letzten sieben Jahre.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich nicht nur während meiner Dissertation, sondern während des ganzen Studiums immer unterstützt und mir den Rücken gestärkt haben und mir somit auch die Möglichkeit geschaffen haben, mich voll auf die Anfertigung meiner Dissertation zu konzentrieren.

8 Literaturverzeichnis

1. Alexandre MD, Lu Q, Chen HY. ***Overexpression of Claudin-7 decreases the paracellular Cl⁻-conductance and increases the paracellular Na⁺-conductance in LLC-PK1 cells.*** J. Cell Sci. 2005; 118: 2683-2693.
2. Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schöneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M. ***Claudin-2 expression induces cation-selective channels in Tight Junctions of epithelial cells.*** J. Cell Sci. 2002; 115: 4969-4976
3. Amasheh S, Barmeyer C, Koch C S, Tavalali S, Mankertz J, Epple H J, Gehring M, Florian P, Kroesen A-J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke J D. ***Cytokine-dependent transcriptional down-regulation of Epithelial Sodium Channel in ulcerative colitis.*** Gastroenterology 2004; 126: 1711-1720
4. Amasheh S, Schmidt T, Mahn M, Florian P, Mankertz J, Tavalali S, Gitter A H, Schulzke JD, Fromm M. ***Expression of Claudin-5 contribute to barrier properties in Tight Junctions of epithelial cells.*** Cell Tissue Res. 2005; 321: 89-96
5. Angelow S, Kim KJ, Yu AS. ***Claudin-8 modulates paracellular permeability to acidic and basic ions in MDCK II cells.*** J. Physiol. 2006; 571: 15-26
6. Asher C, Wald H, Rossier B C, Garty H. ***Aldosterone-induced increase in the abundance of Na⁺-channel subunit.*** Am J Physiol. 1996; 271: C605-C611
7. Barmeyer C, Amasheh S, Tavalali S, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke J D. ***IL-1 β and TNF- α regulate sodium-absorption in rat distal colon.*** Biochem and Biophysic. Research Comm. 2004; 317: 500-507
8. BenYosef T, Belyantseva IA, Saunders TL, Hughes ED, Kawamoto K, Van Itallie CM, Beyer LA, Halsey K, Gardner DJ, Wilcox ER, Rasmussen J, Anderson JM, Dolan DF, Forge A, Raphael Y, Camper Sa, Friedman TB. ***Claudin-14 knockout mice, a model for autosomal-recessive deafness DFNB 29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration.*** Hum. Mol. Genet. 2003; 12(16):2049-2061
9. Bhalla V, Daidié D, Li H, Pao AC, LaGrange LP, Wang J, Vandewalle A, Stockand JD, Staub O, Pearce D. ***Serum-and glukokortikoid-regulated kinase 1 regulates ubiquitin ligase neural precursor cell-expressed, developmentally downregulated protein 4-2 by inducing interaction with 14-3-3.*** Mol. Endocrinol. 2005; 19 (12): 3073-3084
10. Boldyreff B, Wehling M. ***Aldosterone: Refreshing a slow hormone by swift action.*** News Physiol. Sci. 2004; 19: 97-100

11. Bronstein J M, Tiwari-Woodruff S, Buznikov, A G, Stevens D B. ***Involvement of OSP/ Claudin-11 in oligodendrocyte membrane interactions: role in biology and disease.*** J Neuroscience Res. 2000; 59: 709-711
12. Bürgel N, Bojarski C, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schultzke J D. ***Mechanism of diarrhea in collagenous colitis.*** Gastroenterology 2002; 123(3) 433-443
13. Carson DD, Lagow E, Thathiah A, Al-Shami R, Farach-Carson M C, Vernon M, Yuan L, Fritz M A, Lessey B. ***Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening.*** Mol. Hum. Reproduction 2002; 8 (9): 871-879
14. Cereijido M. ***Tight Junctions.*** CRC Press, Boca Raton 1991
15. Cereijido M, Valdés J, Shoshani L, Contreras R G. ***Role of Tight Junctions in establishing and maintaining cell polarity.*** Annu. Rev. Physiol.1998; 60: 161-177
16. Cereijido M, Shoshani L, Contreras R G. ***Molecular physiology and pathophysiology of Tight Junctions.*** Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2002; 270: G477-G482
17. Chiba H. ***Tight Junctions and human diseases.*** Med Electron Microsc 2003; 36: 147-156
18. Claude P, Goodenough D A. ***Fracture faces of Zonulae Occludentes from “tight” and “leaky” epithelia.*** J Cell Biol. 1973; 58: 390-400
19. Claude P. ***Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the Zonula Occludens.*** J. Membr. Biol. 1978; 39: 219-232
20. Diakov A, Korbmacher C ***A novel pathway of Epithelial Sodium Channel activation involves a serum-and glucocorticoid-inducible kinase consensus motif in the C-terminus of the channel’s alpha-subunit.*** J. Biol. Chem. 2004; 297 (37): 38134-38142
21. Edelheit O, Hanukoglu I, Gizewska M, Kandemir N, Tenenbaum-Rakover Y, Yurdakök M, Zajaczek S , Hanukoglu A. ***Novel mutations in Epithelial Sodium Channel (ENaC) subunit genes and phenotypic expression of multisystem Pseudohypoaldosteronism.*** Clin. Endocrin. 2005; 62: 547-553
22. Epple HJ, Schulzje JD, Schmitz H, Fromm M. ***Enzyme-and mineralocorticoid receptor-controlled electrogenic Na⁺-absorption in human rectum in vitro.*** Am. J. Physiol. 1995; 269:G42-G48
23. Epple H J, Amasheh S, Mankertz S, Goltz M, Schulzke J D, Fromm M. ***Early aldosterone effect in distal colon by transcriptional regulation of ENaC subunits.*** Am. J. Gastrointest. Liver Physiol. 2002; 278: G718-G724

24. Eskandari S, Snyder PM, Kreman M, Zampighi GA, Welsh MJ and Wright EM. ***Number of subunits comprising the Epithelial Sodium Channel***. J. Biol. Chem. 1999; 274: 27281-27286
25. Firsov D, Gautschi I, Merillat A M, Rossier BC, Schild L. ***The heterotetrametric architecture of the Epithelial Sodium Channel (ENaC)***. EMBO J. 1998; 17(2):344-52
26. Förster C, Silweel C, Golenhofen N, Burek M, Kietz S, Mankertz J, Drenckhahn D ***Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine in vitro system***. J. Physiol. 2005; 565 (2): 475-486
27. Fromm M, Oelkers W, Hegel U. ***Time course of aldosterone and corticosterone plasma levels in rats during general anaesthesia and abdominal surgery***. Pflügers Arch. 1983; 399: 249-254
28. Fromm M, Hegel U. ***Net ion fluxes and zero flux limiting concentrations in rat upper colon and rectum during anaesthesia-induced aldosterone liberation***. Pflügers Arch. 1987; 408: 185-193
29. Fromm M, Schulzke J D, Hegel U. ***Control of electrogenic Na⁺-absorption in rat late distal colon by nanomolar aldosterone added in vitro***. Am. Physiol. Soc. 1993; 264: E68-E73.
30. Fujita H, Chiba H, Yokozaki H, Sakai N, Sugimoto K, Wada T, Kojima T, Yamashita T, Sawada N. ***Differential expression and subcellular localization of Claudin.7,-8,-12,-13 and -15 along the mouse intestine***. J. Histochem. Cytochem. 2006; 54: 933-944
31. Furuhashi M, Kitamura K, Adachi M, Miyoshi T, Wakida N, Ura N, Shikano Y, Shinshi Y, Sakamoto K, Hayashi M, Satoh N, Nishitani T, Tomita K, Shimamoto K ***Liddle's Syndrome caused by a novel mutation in the proline-rich PY motif of the Epithelial Sodium Channel beta-subunit***. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2005; 90: 340-344
32. Furuse M, Hirase T, Itho M, Nagafuchi A, Yonemura S. ***Occludin: A novel integral membrane protein localizing at Tight Junction***. J. Cell Biol. 1993; 123, 1777-1788
33. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. ***Claudin-1 and -2; novel integral membrane proteins localizing at Tight Junctions with no sequence similarity to Occludin***. J. Cell Biol. 1998; 141 (7): 1539-1550.
34. Furuse M, Sasaki H, Tsukita S. ***Manner of interaction of heterogeneous Claudin species within and between Tight Junctional strands***. J. Cell Biol. 1999; 147: 891-903
35. Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S. ***Conversion of Zonulae Occludentes from tight to leaky strand type by introducing Claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells***. J. Cell Biol. 2001; 153: 263-272

36. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. ***Claudin-based Tight Junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from Claudin-1-deficient mice.*** J. Cell Biol. 2002; 156 (6): 1099-1111
37. Garty H, Palmer LG. ***Epithelial Sodium Channels: function, structure and regulation.*** Physiol. Rev. 1997; 77 (2)
38. Glikli G, Ebnet K, Aurrand-Lions M, Imhof B A, Adams RH. ***Spermatid differentiation requires the assembly of a cell polarity complex downstream of Junctional Adhesion Molecule-C.*** Nature, 2004; 431 (7006): 320-324
39. Hadj-Rabia S, Baala L, Vabres P, Hamel-Teillac D, Jacquemin E, Fabre M, Lyonnet S, De Prost Y, Munnich A, Hadchouel M, Smahi A. ***Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a Tight Junction disease.*** Gastroenterology. 2005; 128(2): 524
40. Heiksalä M, Peterson PA, Yang Y. ***The roles of Claudin superfamily proteins in paracellular transport.*** Traffic. 2001; 2(2): 93-98
41. Helms MN, Liu L, Liang YY, Al-Khalili O, Vandewalle A, Saxena S, Eaton DC, Ma HP. ***Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate mediates aldosterone stimulation of epithelial sodium channel (ENaC) and interacts with gamma-ENaC.*** J. Biol. Chem. 2005; 280(49): 40885-40891
42. Hirase T, Kawashima S, Wong EY, Ueyama T, Rikitake Y, Tsukita S, Yokoyama M, Staddon JM. ***Regulation of Tight Junction permeability and occluding phosphorylation by Rhoa-p160ROCK-dependent and -independent mechanism.*** J. Biol. Chem. 2001; 276: 10423-10431
43. Huey L, Riepe F G, Sippell W G, Yu A S L. ***Genetic heterogeneity in autosomal-dominant Pseudohypoaldosteronism Type I: Exclusion of claudin-8 as a candidate gene.*** Am. J. Nephrol. 2004; 24: 483-487
44. Hoffmann B, Nagel I, Clauss W. ***Aldosterone regulates paracellular pathway resistance in rabbit distal colon.*** J. Comp. Physiol. 1990; 160: 381-388
45. Ichimura T, Yamamura H, Sasamoto K, Tominaga Y, Taoka M, Kakiuchi K, Shinkawa T, Takahashi N, Shimada S, Isobe T. ***14-3-3 proteins modulate the expression of the Epithelial Na⁺-Channels by phosphorylation-dependent interaction with Nedd4-2 ubiquitin ligase.*** J. Biol. Chem. 2005; 280 (13): 13187-13194
46. Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S. ***Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells.*** J. Cell. Biol. 2005; 171: 939-945

47. Jeansonne B, Lu Q, Goodenough DA, Chen YH. ***Claudin-8 interacts with multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) and reduces paracellular conductance in epithelial cells.*** Cell. Mol. Biol. 2003; 49: 13-21
48. Kamynina E, Staub O. ***Concerted action of ENaC, Nedd 4-2 and SGK 1 in transepithelial Na⁺-transport.*** Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 2002; 283(3): F377-F387
49. Kanda T, Numata Y, Mizusawa H. ***Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: decreased Claudin-5 and relocated ZO-1.*** J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 2004; 75(5): 765-769
50. Kausalya PJ, Amasheh S, Günzel D, Wurps H, Müller D, Fromm M, Hunziker W. ***Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg⁺² transport function of Claudin-16.*** J. Clin. Invest. 2006; 116: 878-891
51. Keiper T, Sanstoso S, Nawroth P P, Orlova V, Chavakis T. ***The role of Junctional Adhesion Molecules in cell-cell interactions.*** Histol. Histopathol. 2005; 20: 197-203
52. Kitajiri S-I, Miyamoto T, Mineharu A, Sonoda N, Furuse K, Hata M, Sasaki H, Mori Y, Kubota T, Ito J, Furuse M, Tsukita S. ***Compartmentalization established by Claudin-11-based Tight Junctions in stria vascularis is required for hearing through generation of endocochlear potential.*** J. Cell Science 2004; 117: 5087-5096
53. Kiuchi-Saishin Y, Gotho S, Furuse M, Takasuga A, Tano Y, Tsukita S. ***Differential expression patterns of Claudins, Tight Junction membrane proteins, in mouse nephron segments.*** J. Am. Nephrol. 2002; 13: 875-886
54. Köckerling A, Sorgenfrei D, Fomm M. ***Electrogenic Na⁺-absorption of rat distal colon is confined to surface epithelium: a voltage-scanning study.*** Am. J. Physiol. 1993; 264: C1285-1293
55. Kosari F, Sheng S, Li J, Mak DO D, Foskett J K, Kleyman T R. ***Subunit stoichiometry of the Epithelial Sodium Channel.*** J. Biol. Chem. 1998; 273(22): 13469-13474
56. Williams LA, Martin-Padura I, Dejana E, Hogg N, Simmons DL. ***Identification and characterisation of human Junctional Adhesion Molecule (JAM).*** Mol. Immunol. 1999; 36: 1175-1188
57. Li W Y, Huey C L, Yu AS L. ***Expression of Claudins 7 and 8 along the mouse nephron.*** Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2004; 286(6): F1063-1071
58. Lingueglia E, Renard S, Waldmann R, Voilley N, Champigny G, Plass H, Lazdunski M, Barbry P. ***Different homologous subunits of the amiloride-sensitive Na⁺-channel are differently regulated by aldosterone.*** J. Biol. Chem. 1994; 269, 13736-13739
59. 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. ***Junctional Adhe-***

- sion Molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration.* J. Cell Biol. 1998; 142: 117-127
60. McCormick JA, Bhalla V, Pao AC, Pearce D ***SGKI: a rapid aldosterone-induced regulator of renal sodium reabsorption.*** Physiology 2005; 20: 134-139
61. Miwa N, Furuse M, Tsukita S, Nikawa N, Nakamura Y, Furukawa Y. ***Involvement of Claudin-1 in the beta-catenin/ Tcf signalling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers.*** Oncol. Res. 2000; 12(11-12): 469-476
62. Miyamoto T, Morita K, Takemoto D, Takeuchi K, Kitano Y, Miyakawa T, Nakayama K, Okamura Y, Sasaki H, Miyachi Y, Furuse M, Tsukita S. ***Tight Junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from Claudin-19-deficient mice.*** J. Cell Biol. 2005; 169 (3): 527-538
63. Le Moellic C, Boulkroun S, González-Nunez D, Dublineau I, Cluzeaud F, Fay M, Blot-Chabaud M, Farman N. ***Aldosterone and Tight Junctions: modulation of Claudin-4 phosphorylation in renal collecting duct cells.*** Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2005; 289: C1513-C1521
64. Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. ***Endothelial Claudin: Claudin5/ TMVCF constitutes Tight Junction strands in endothelial cells.*** J. Cell Biol. 1999; 147(1):185-194
65. Mueller D, Kausalya PJ, Claverie-Martin F, Meij IC, Eggert P, Garcia-Nieto V, Hunziker W. ***Novel Claudin 16 mutation with childhood hypercalciuria abolishes binding to ZO-1 and results in lysosomal mistargeting.*** Am. J. Hum. Genet. 2003; 73(6): 1293-1301.
66. Nagel G, Barbry P, Chabot H, Brochiero E, Hartung K, Gryorzyk R. ***CFTR fails to inhibit the Epithelial Sodium Channel ENaC expressed in Xenopus laevis oocytes.*** J. Physiol. 2005; 564(3): 671-682
67. Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S. ***Size-selective loosening of blood-brain barrier in Claudin-5-deficient mice.*** J. Cell Biol. 2003; 161(3): 653-660
68. Pradervand S, Wang Q, Burnier M, Beermann F, Horisberger J D, Hummler E, Rossier B C. ***A mouse model for Liddle's Syndrome.*** J. Am. Soc. Nephrol. 1999; 10: 2527-2533
69. Quaroni A, Tian JQ, Goke M, Podolsky DK ***Glucocorticoids have pleiotropic effects on small intestinal crypt cells.*** Am. J. Physiol. 1999; 277(5 Pt1): G1027-1040
70. Rao US, Baker JM, Pluznick JL, Balachandran P. ***Role of intracellular Ca²⁺ in the expression of the amiloride-sensitive Epithelial Sodium Channel.*** Cell Calcium 2004; 35 (1): 21-28

71. Renard S, Voilley N, Bassilana F, Lazdunski M, Barbry P. ***Localization and regulation by steroids of the alpha, beta and gamma subunits of amiloride-sensitive Na⁺-channel in colon, lung and kidney.*** Pflügers Arch. 1995; 430(3): 299-307
72. Romero IA, Radewicz K, Jubin E, Michel CC, Greenwood J, Courand PO, Adamson P. ***Changes in cytoskeletal and Tight Junctional proteins correlate with decreased permeability induced by dexamethasone in cultured rat brain endothelial cells.*** Neurosci. Lett. 2003; 344(2): 112-116
73. Riazuddin S, Ahmed ZM, Fanning AS, Lagziel A., Kitajiri S, Ramzan K, Kahn SN, Chattaraj P, Friedman PL, Anderson JM, Belyantseva IA, Forge A, Riazuddin S, Friedman TB. ***Tricellulin is a Tight Junction-protein necessary for hearing.*** Am. J. Hum. Genet. 2006; 79; 1040-1051
74. Rossier BC, Caness CM, Schild L, Horisberger JD. ***Epithelial Sodium Channel.*** Curr Opin Nephrol Hypertens. 1994; 3(5): 487-496
75. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S. ***Complex phenotype of mice lacking Occludin, a component of Tight Junction strands.*** Mol. Biol. Cell. 2000; 11: 4131-4142
76. Sartorato P, Khaldi Y, Lapeyraque AL, Armanini D, Kuhnle U, Salomon R, Caprio M, Viengchareun S, Lombes M, Zennaro MC. ***Inactivating mutations of the mineralocorticoid receptor in type I pseudoaldosteronism.*** Mol. Cell Endocrinol. 2004; 217 (1-2):119-125
77. Sawada N, Murata M, Kikuchi K, Osanai M, Tobioka H, Chiba TKH. ***Tight Junctions and human diseases.*** Med. Electron Microsc. 2003; 36; 147-156
78. Schultzke J D, Gitter A H, Mankertz J, Spiegel S, Amasheh S, Saitou S, Tsukita S, Fromm M. ***Epithelial transport and barrier function in Occludin-deficient mice.*** Biochim. Biophys. Acta -Biomembranes. 2005; 1669 (1); 34-42
79. Simon D B, Lu Y, Choate K A, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, Mc Credie D, Milford D, Sanjad S, Lifton R P. ***Paracellin-1, a renal Tight Junction protein required for paracellular Mg²⁺-resorption.*** Science. 1999; 285(5424): 103-106.
80. Simpson SA, Tait JF, Wettstein A, Neher R, Von Euw J, Schindler O, Reichstein T. ***Konstitution des Aldosteron, des neuen Mineralcorticoids.*** Experientia 1954; 10:132-133
81. Siu Tim Cheung, Ka Ling Leung, Ying Chi Ip, Xin Chen, Daniel Y. Fong, Irene O. Ng, Sheung Tat Fan, Samuel So. ***Claudin-10 expression level is associated with recurrence of primary hepatocellular cancer.*** Clin. Cancer Res. 2005; 11: 551-556

82. Snyder PM *Minireview: Regulation of Epithelial Na⁺-Channel trafficking*. *Endocrinol.* 2005; 146 (12):5079-5085
83. Stelwagen K, van Espen DC, Verkerk GA, McFadden HA, Farr VC. *Elevated plasma cortisol reduces permeability of mammary Tight Junctions in the lactating bovine mammary epithelium*. *J. Endocrinol.* 1998; 159: 173-178
84. Stelwagen K, McFadden HA, Demmer J. *Prolactin, alone or in combination with glucocorticoids, enhances Tight Junction formation and expression of the Tight Junction protein Occludin in mammary cells*. *Mol. Cell Endocrinol.* 1999; 156(1-2): 55-61
85. Tebbe B, Mankertz J, Schwarz C, Amasheh S, Fromm M, Assaf C, Schultz-Ehrenburg U, Sanchez-Ruderish H, Schulzke JD, Orfanos CE. *Tight Junction proteins: a novel class of integral membrane proteins. Expression in human epidermis and in HaCaT keratinocytes*. *Arch. Dermatol Res.* 2002; 294 (1-2): 14-18
86. Tsukita S, Furuse M. *The structure and function of Claudins, cell adhesion molecules at Tight Junction*. *Ann. NY Acad. Sci.* 2000; 915:129-135.
87. Tsukita S, Furuse M. *Pores in the Wall: Claudins constitute Tight Junction strands containing aqueous pores*. *J. Cell Biol.* 2000; 149 (1): 13-16
88. Turksen K, Troy T C. *Barriers built on claudins* *J Cell Science* 2004; 117: 2435-2447
89. Ussing HH, Zerahn K. *Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin*. *Acta Physiol. Scand.* 1951; 23: 110-127
90. Van Heusden GP. *14-3-3 proteins: regulators of numerous eukariotic proteins*. *IUBMB Life* 2005; 57(9): 623-9
91. Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM *Regulated expression of Claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability*. *J. Clin. Invest.* 2001; 107(10): 1319-1327
92. Wen H, Watry DD, Marcondes MC, Fox HS. *Selective decrease in paracellular conductance of Tight Junctions: role of the first extracellular domain of Claudin-5*. *Mol. Cell Biol.* 2004; 24: 8408-8417
93. White PC. *Mechanisms of disease: Disorders of aldosterone biosynthesis and action*. *New Engl. J. Medicine* 1994; 331: 250-258
94. Yu ASL , Enck AH, Lencer WI, Schneeberger EE. *Claudin -8 expression in madin-darby canine kidney cells augments the paracellular to cation permeation*. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(19), 17350-17359
95. Yu ASL, McCarthy KM, Francis SA, McCormack JM, Lai J, Rogers RA, Lynch RD, Schneeberger EE. *Knock down of Occludine expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells*. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2005; 288: C1231-C1241

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

9 Publikationsliste

S. Amasheh, S. Milatz, S. Krug, M. Bergs, M. Amasheh, J. Schulzke, M. Fromm
“Na⁺ absorption defends from paracellular back-leakage by claudin-8 upregulation” Biochemical and Biophysical Research Communications. (*in Druck*)

10 Erklärung

„Ich, Maike Berge, geb. am 25.06.1981 in Berlin, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Abdichtung der Tight Junction während Aldosteron- stimulierter ENaC- Induktion im Colon sigmoideum des Menschen „ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 03.11.2008