

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

DISSERTATION

**Messung des Wassertransportes an einer Nierenzelllinie:
Rolle des Tight Junction-Proteins Claudin-6**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Alexander Stier

aus Jekaterinburg, Russische Föderation

Datum der Promotion: 25.10.2013

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	4
1.1	Epithelien	4
1.1.1	Aufbau und Funktion von Epithelien.....	4
1.2	Tight Junctions	6
1.2.1	Struktur und Funktion der Tight Junctions.....	7
1.2.2	Komponenten der Tight Junctions.....	8
1.2.3	Die Familie der Claudine	10
1.2.4	Claudin-6.....	12
1.3	Claudine und parazelluläre Poren	13
1.4	Epithelialer Wassertransport	14
1.4.1	Transzellulärer Wassertransport	15
1.4.2	Parazellulärer Wassertransport.....	16
1.5	Ziele der Arbeit.....	17
2.	Material und Methoden.....	18
2.1	Zellkultur.....	18
2.1.1	Versuchszellen.....	18
2.1.2	Kultivierung der MDCK-Zellen.....	19
2.2	Chemikalien	20
2.3	Materialien.....	21
2.4	Geräte	22
2.5	Puffer und Lösungen	23
2.6	Nachweis der Proteinexpression (Western-Blot).....	24
2.6.1	Membranprotein-Extraktion	24
2.6.2	Proteinquantifizierung	25
2.6.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	25
2.6.4	Western-Blot	26
2.6.5	Immundetektion.....	27
2.7	Immunfluoreszenzfärbung.....	28

2.8	Wasserfluxexperimente	29
2.8.1	Konstruktion des Messstandes	30
2.8.2	Versuchslösungen.....	31
2.8.3	Versuchsablauf der Wassertransport-Messung	32
2.9	Dilutionspotentialmessungen in der Ussing-Kammer.....	33
2.10	Statistische Auswertung	35
3.	Ergebnisse	36
3.1	Stabile Transfektion der MDCK-C7-Zellen mit der cDNA von Claudin-6.....	36
3.2	Nachweis der Claudin-6-Expression in den transfizierten Zellen	36
3.2.1	Proteinnachweis mittels Western-Blot-Analyse	36
3.2.2	Einfluss der Transfektion auf die Proteinexpression in den Zellen	37
3.2.3	Subzelluläre Lokalisation von Cld-6 mittels Immunfluoreszenzfärbung.....	40
3.3	Funktionelle Untersuchungen.....	41
3.3.1	Transepithelialer Widerstand.....	41
3.3.2	Natrium- und Chlorid-Permeabilität.....	42
3.4	Transepithelialer Wassertransport.....	44
3.4.1	Mannitolgradient.....	45
3.4.2	Natrium-Chlorid-Gradient	46
3.4.3	Natrium-Chlorid- und Mannitolgradient	47
4.	Diskussion	49
4.1	Cld-Überexpressionsstudien und ihre Limitationen	49
4.2	Messung des transepithelialen Wasserfluges	51
4.2.1	Blockierung des transzellulären Weges	52
4.3	Bedeutung von Claudin-6.....	53
4.3.1	Cld-6 und der transepitheliale Wassertransport	53
4.3.2	Cld-6 und Ionenpermeabilität	54
4.3.3	Regulatorische Funktion von Cld-6	55
4.3.4	Cld-6 in der klinischen Forschung.....	56
5.	Zusammenfassung.....	57
6.	Literaturverzeichnis	59

7. Anhang.....	67
7.1 Abkürzungen.....	67
7.2 Abbildungen.....	68
7.3 Tabellen.....	69
8. Lebenslauf.....	70

1. Einleitung

1.1 Epithelien

Das Epithel ist neben Muskel-, Nerven- und Bindegewebe eine der vier Grundgewebearten. Zu Epithelzellen werden neben den Deckzellen, die alle äußeren und inneren Grenzflächen des Körpers umkleiden, auch die Drüsenzellen gezählt. Die Drüsenzellen sind eine Sonderform der Epithelzellen, es handelt sich um Deckzellen, die auf die Absonderung von Stoffen spezialisiert sind. Eine weitere Sonderform des Epithels bilden die Endothelien, die einschichtig die inneren Wände von Blutgefäßen auskleiden (Schmidt et al. 2011).

1.1.1 Aufbau und Funktion von Epithelien

Das Epithel (von griechisch Epi = auf, thele = Brustwarze, also wörtlich das auf der Brustwarze befindliche Gewebe) besitzt zahlreiche Funktionen. Es ist unter anderem für den Schutz des tiefer liegenden Gewebes vor äußeren Einflüssen, die mechanischer, physikalischer oder chemischer Art sein können, verantwortlich. Es stellt eine immunologische Barriere für verschiedene Erregerspezies dar, bildet eine Diffusionsschranke zwischen innerem und äußerem Kompartiment und ermöglicht einen selektiven Austausch von Stoffen in Form von Resorption oder Sekretion. Ohne die Barriere- und Transportfunktionen, die unbestritten wichtigsten Funktionen des Epithels, wäre die Aufrechterhaltung der Zusammensetzung der verschiedenen Körperflüssigkeiten, die Homöostase, unmöglich. Es handelt sich um ein- (wenn die mechanische Beanspruchung gering ist) oder mehrschichtige (bei entsprechend höherer mechanischer Beanspruchung) Zelllagen, die alle inneren und äußeren Körperoberflächen der tierischen Organismen bedecken. Wenn kaum spezifische Leistungen erbracht werden müssen, sind die Epithelzellen eher platt (z.B. Hautepithel), bei komplexen Funktionen, die unter anderem Stoffaufnahme und Stoffabgabe regeln, dagegen hochprismatisch (z.B. Darmepithel). Je nach Aufgabe können die Epithelien unterschiedliche Permeabilität besitzen. Man unterscheidet praktisch undurchlässige, dichte und weniger dichte (lecke) Epithelien. Der Stofftransport kann grundsätzlich auf zwei Wegen erfolgen, nämlich trans- (durch die Zellmembranen der Zellen) oder parazellulär (zwischen den Zellen über die Tight Junctions) (Abbildung 1). Dichte Epithelien weisen kaum parazellulären Stofftransport auf, es überwiegt der

transzelluläre. Bei lecken Epithelien überwiegt dagegen der parazelluläre Transport. Die Dichtigkeit der verschiedenen Epithelien wird mit folgendem Quotienten angegeben: Permeabilität der Tight Junctions (P_{TJ}) geteilt durch Permeabilität der apikalen und basolateralen Zellmembran (P_{Mem}), also der Quotient aus parazellulärer und transzellulärer Permeabilität. Als Beispiel für weniger dichte Epithelien ($P_{TJ}/P_{Mem} = >1$) kann man den Dünndarm, für dichte ($P_{TJ}/P_{Mem} = 1$ bis 0.01) den Dickdarm und für praktisch undurchlässige ($P_{TJ}/P_{Mem} = <0,01$) die Harnblase (mit der Funktion der Speicherung von hochkonzentriertem Urin) oder die Haut anführen. Aus diesen Beispielen wird klar, dass Epithelien besonders dort dicht sind, wo sie als Barriere oder Abdichtung dienen. Weniger dichte Epithelien findet man dagegen dort, wo hohe Transportraten erforderlich sind (Schmidt et al. 2011).

Eine allen Epithelzellen gemeinsame Eigenschaft ist ihre Polarität: sie haben eine apikale Seite, die dem äußeren Milieu (z.B. dem Lumen bei Darm und Niere) zugewandt ist. Oft bilden die Epithelzellen auf der apikalen Seite fingerartige Ausstülpungen, die Mikrovilli, aus, wodurch eine Vergrößerung der Austauschfläche der Epithelzelle erreicht wird. Auf der inneren, basolateralen Seite befinden sich die Lymph- und die Blutgefäße, die im intensiven Stoffaustausch mit den Epithelzellen stehen. Die seitlich gelegene laterale Zellmembran gehört definitionsgemäß zu der basolateralen Seite der Zelle, da sie die gleichen Transportproteine enthält und ebenfalls ohne entscheidende Barriere dem Interstitium zugewandt ist (Fromm 2007). Die Polarität kommt durch eine charakteristische Verteilung der Membranproteine (Ionenkanäle, Pumpen, Carrier) zustande, wodurch die Resorptions- und Sekretionseigenschaften der Zellen erst ermöglicht werden. Von der Resorption spricht man, wenn der Transport von apikal nach basolateral erfolgt, von der Sekretion, wenn der Transport in umgekehrter Richtung abläuft. Epithelien sind auf vielfältige Weise organ- und gewebsspezifisch differenziert. Benachbarte Epithelzellen sind untereinander durch unterschiedliche Zellkontakte verbunden. Die molekulare Zusammensetzung dieser Zellkontakte, deren Funktion und klinische Bedeutung sind seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung. Für die Barriereigenschaften (Kontrolle des parazellulären Stofftransportes) sind spezielle Zellkontakte im apikalen Bereich der Zelle, die Tight Junctions (TJ), von entscheidender Bedeutung.

Weitere parazelluläre Zellverbindungen, die distal der TJ anzutreffen sind, sind die Desmosomen (Adherens Junctions) und die Gap Junctions (Konnexonen). Desmosomen sind hauptsächlich für den mechanischen Zusammenhalt des

Zellverbandes zuständig, wohingegen Konnexone für die direkte Kommunikation zwischen den Zellen eine große Rolle spielen. Über die Gap Junctions können kleine Moleküle bis zu einer Größe von 1 Kilodalton (kDa) zwischen den Zellen ausgetauscht werden.

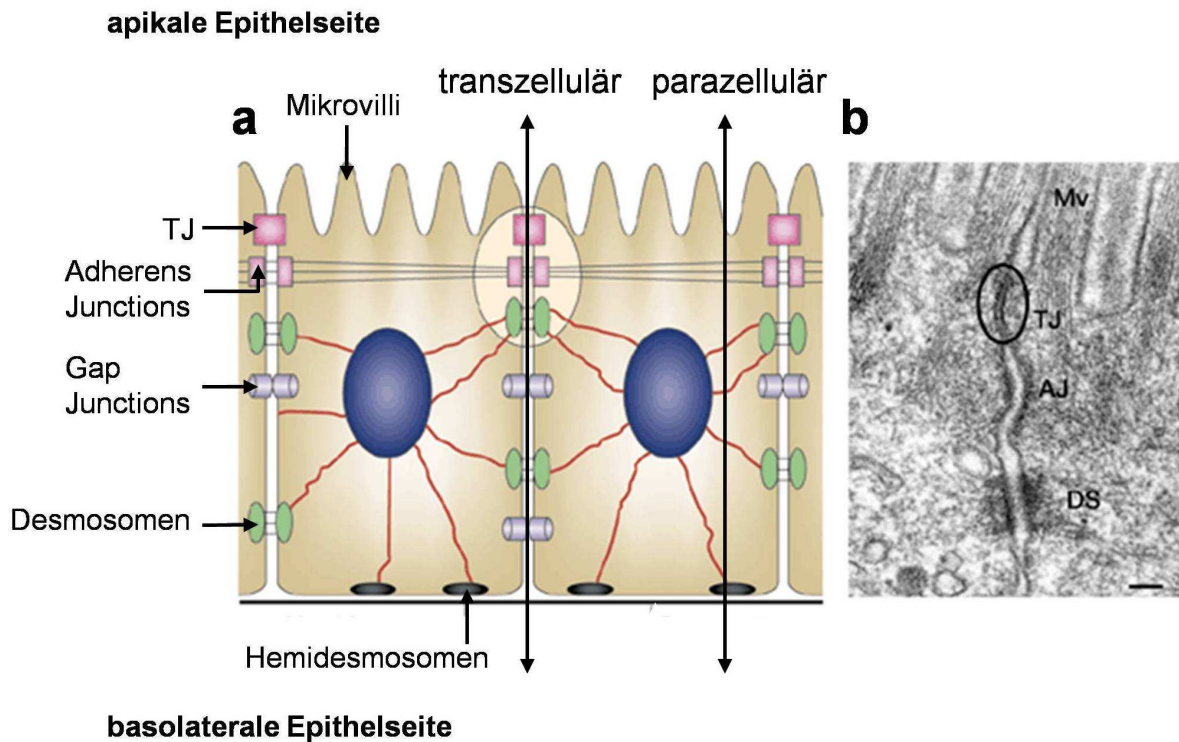


Abbildung 1: a.) Wege des transepithelialen Transportes und schematische Darstellung der Lokalisation von TJ innerhalb des Epithelzellverbandes. b.) Elektronenmikroskopische Aufnahme der TJ-Region (Tsukita et al. 2001)

1.2 Tight Junctions

Tight Junctions (TJ; Schlussleiste; lateinisch: Zonula occludens) sind Komplexe von transmembranären Membranproteinen, die im apikalen Bereich die Zelle kreisförmig umgürten und so die lateralen Membranen von benachbarten Zellen miteinander verknüpfen (Abbildung 1). Die TJ benachbarter Zellen stehen miteinander im direkten Kontakt und wirken als punktuelle Verdichtungen (Staehein 1973).

Die TJ bestehen aus verschiedenen Membranproteinen (siehe Kap. 1.2.2), die mit zahlreichen, auf der zytosolischen Seite befindlichen Proteinen assoziiert sind.

Etwa 40 derartiger Proteine sind bisher beschrieben worden (Schneeberger et al. 2004, Turksen et al. 2004). Zu den TJ-assoziierten Proteinen zählt man ZO-1, -2, -3 (Zonula

occludens), MAGI-1, -2, -3 (Membrane associated guanyl kinase inverted proteins), MUPP-1 (Multi-PDZ domain protein), PAR-3, -6 (partitioning-defective protein) und zahlreiche andere Proteine (Schneeberger et al. 2004). Mit den anderen TJ-Proteinen interagieren sie meistens über eine PDZ-Domäne und beteiligen sich so aktiv am Aufbau und an der Funktion der TJ (Van Itallie et al. 2004). Einige dieser Proteine sind an der Gerüstfunktion der Zelle beteiligt, indem sie die Verbindung zu Aktin- und Myosinfilamenten herstellen. Andere akzessorische Proteine sind hingegen in regulatorische Prozesse eingebunden (González-Mariscal et al. 2008).

1.2.1 Struktur und Funktion der Tight Junctions

Die erste detaillierte, anhand von Ultra-Dünnschnitt-Elektronenmikroskopie erfolgte Strukturbeschreibung von TJ datiert auf 1963 (Farquhar et al. 1963). Die Tatsache, dass der interzelluläre Spalt im Bereich der TJ obliteriert (und die dazu passende Experimente) verleiteten die Autoren zu der Annahme, dass die TJ für Stoffe eine Art undurchdringliche Permeabilitätsbarriere („seal“) darstellen. Dieser Theorie entsprechend wählte man den Namen: Schlussleiste oder Zonula occludens. Die Gefrierbruchschnitte, bei denen die TJ als parallel angeordnete, miteinander kommunizierende und sich je nach Epithel in der Anzahl unterscheidende, strangartige Gebilde erscheinen (Claude et al. 1973, Staehelin 1973) waren mit dieser Theorie noch konform. Die in der gleichen Zeit durchgeführten physiologischen Studien zeigten jedoch, dass der parazelluläre Transport in vielen Epithelien nachweisbar ist (Claude 1978, Frömter et al. 1972). Mit der Zeit erkannte man, dass die TJ neben der Abdichtungsfunktion (Anderson et al. 1995, Furuse et al. 2002, Kirschner et al. 2010, Schneeberger et al. 1992) auch eine „gate“- Funktion, also eine Art Kontrollfunktion, im parazellulären Transportweg übernehmen. Sie bilden dabei kanal- oder porenähnliche parazelluläre Strukturen und sind beim Transport größen- und ladungsselektiv (Amasheh et al. 2002, Powell 1981, Tsukita et al. 2001). Eine „richtige“ Barriere stellen die TJ dementsprechend nur für größere, organische Moleküle dar, während kleinere Ionen diese Schranke unter bestimmten Voraussetzungen durchaus passieren können. Die Dichtigkeit wird in erster Linie von der molekularen Zusammenstellung der TJ und der Ultrastruktur des TJ-Maschenwerks beeinflusst.

Eine weitere essentielle Aufgabe von TJ im Epithelzellverband ist die Gewährleistung der Polarität der Zelle durch Verhinderung der freien Diffusion von Membranproteinen

innerhalb der Lipiddoppelschicht („fence“- Funktion) (Dragsten et al. 1981, Tsukita et al. 2001). Die transzellulären Transportprozesse können somit gerichtet ablaufen. Diese Tatsache unterstreicht eindrucksvoll, dass die TJ für beide Transportwege von besonderer Bedeutung sind. Außerdem greifen die TJ in die Prozesse der Signalübertragung (D'Atri et al. 2002, Matter et al. 2003) und der Onkogenese (Dhawan et al. 2005) ein.

Zum Strukturcharakter der TJ existierten in den 80-er Jahren zwei Modelle nebeneinander: das etwas ältere Protein-Modell (Staehein 1973) und das Lipid-Modell (Kachar et al. 1982, Pinto da Silva et al. 1982, Verkleij 1984). Die Erkenntnis, dass die TJ gegenüber Detergenzien resistent sind (Stevenson et al. 1984) und vor allem die Entdeckung des TJ-Proteins Occludin (Furuse et al. 1993) führten zum Verlassen des Lipid-Modells.

1.2.2 Komponenten der Tight Junctions

Bis zum heutigen Tag sind zahlreiche TJ-Proteine identifiziert und beschrieben worden. Dies sind Occludin, Tricellulin, das Junction Adhesion Molekül (JAM) und die große Familie der Claudine.

Occludin (Abbildung 2) ist ein circa (ca.) 60-65 kD-schweres Protein, welches aus 4 transmembranären Domänen besteht (Tsukita et al. 2001). Obwohl Occludin in der Lage ist TJ-Fibrillen zu bilden, erklärt es keineswegs hinreichend die TJ-Eigenschaften. Trotz embryonal fehlendem Occludin bei Knock-Out-Mäusen konnten normale TJ ausgebildet werden (Saitou et al. 1998 und 2000), außerdem scheint bei einigen Zellarten Occludin in den TJ nicht nachweisbar zu sein (Moroi et al. 1998). Andererseits erhöht die Überexpression von Occludin die Anzahl der TJ-Stränge und den transepithelialen Widerstand (McCarthy et al. 1996). Occludin scheint auch für die Differenzierungsprozesse der Epithelzellen von Bedeutung zu sein (Schulzke et al. 2005). In neueren Studien wird die Vermutung geäußert, dass die Rolle Occludins eher in den Signal- als in Transportprozessen zu suchen ist (Van Itallie et al. 2006a).

Das bisher letzte identifizierte TJ-Protein, Tricellulin, wurde 2005 beschrieben (Ikenouchi et al. 2005). Vom Tricellulin sind mehrere Isoformen bekannt (Riazuddin et al. 2006), es besitzt vier transmembranäre Domänen und hat Sequenzähnlichkeiten mit Occludin (Abbildung 2).

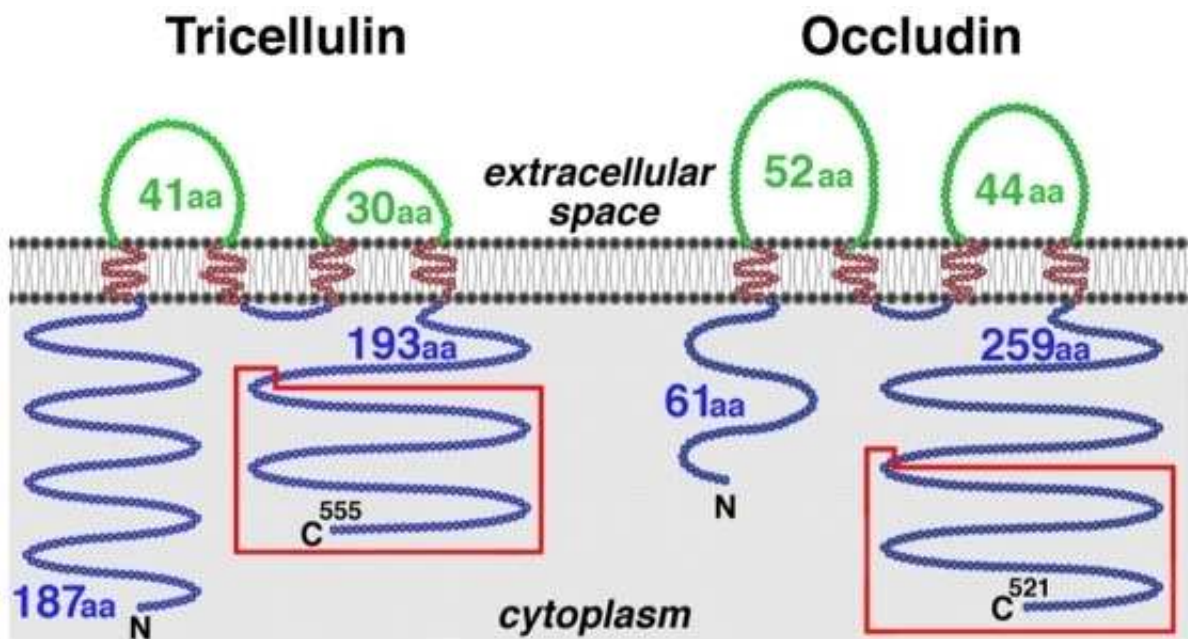


Abbildung 2: Molekulare Struktur der Tight Junction Proteine Tricellulin (links) und Occludin (rechts). (Ikenouchi et al. 2005)

Bevorzugt kommt es in trizellulären TJ (tTJ), also dort wo 3 benachbarte Zellen in Kontakt stehen, vor, wird aber auch in bizellulären Verbindungen (bTJ) nachgewiesen. Tricellulin scheint besonders in den tTJ an der Ausbildung einer epithelialen Barriere beteiligt zu sein, da die Unterdrückung der Tricellulinexpression die Erhöhung der parazellulären Permeabilität nach sich zieht (Ikenouchi et al. 2005). Die Beobachtung, dass bei Occludin-Knockout-Mäusen Tricellulin verstärkt in bTJ nachweisbar ist, deutet auf gegenseitige Wechselwirkungen zwischen den beiden TJ-Proteinen hin (Ikenouchi et al. 2008). Grundlegende Aspekte über die genauere Funktion von Tricellulin im TJ-Verband lieferte 2009 die Arbeit von Krug et al.: hohe Tricellulin-Expressionsspiegel formen, ohne die Ionenpermeabilität zu beeinflussen, eine Barriere für Makromoleküle in den tTJ und eine größenunabhängige Barriere für alle gelösten Stoffe in den bTJ. Die tTJ sollen dabei als eine Art Zentralpore und Durchtrittsstelle für Makromoleküle fungieren (Krug et al. 2009). Zusätzlich führen Mutationen im Tricellulin-Gen unter anderem zur Taubheit (nonsyndromic deafness DFNB49) (Riazuddin et al. 2006). Die Familie der JAM-Proteine ist mit ihren zwei extrazellulären Schleifen den Immunglobulinen ähnlich, wird aber dennoch zu den TJ-Proteinen gerechnet, da es an die anderen Proteine basalwärts angrenzt (Ebnet et al. 2004, Martin-Padura et al. 1998). Im Gegensatz zu den anderen TJ-Proteinen durchspannt es nur einmal die

Zellmembran und ist allein nicht in der Lage TJ-Fibrillen zu bilden (Itoh et al. 2001). Die für die Funktion der TJ wichtigsten Proteine sind aber unumstritten die Claudine.

1.2.3 Die Familie der Claudine

Die Familie der Claudine (von lateinisch *claudere* = abschließen) bildet die größte Gruppe der TJ-Proteine, ihre Größe liegt zwischen 21 und 28 kD (Furuse 2010). Bis heute sind mindestens 27 verschiedene Claudine bekannt (Angelow et al. 2008, Tsukita et al. 2001, Van Itallie et al. 2006a, Günzel & Fromm 2012). Zum Teil wurden einige Claudine bereits früher unter anderen Namen beschrieben. Claudin-3 als RVP-1 (Briehl et al. 1991, Peacock et al. 1997), Claudin-4 als CPE-R (Katahira et al. 1997), Claudin-5 als TMVCF (Sirotkin et al. 1997) und Claudin-16 als Paracellin-1 (Simon et al. 1999). Für die Struktur und Funktion der TJ sind Claudine die wichtigsten Bestandteile innerhalb der TJ-Proteine (Angelow et al. 2008, Furuse et al. 2006). Die ersten beiden Claudine (genannt Cld-1 und Cld-2) wurden 1998 identifiziert (Furuse et al. 1998a). Transfizierte man Fibroblasten mit diesen beiden Proteinen, so bildeten sich TJ-Stränge aus (Furuse et al. 1998b). In den nächsten Jahren wurden weitere Claudine entdeckt (Morita et al. 1999). Typischerweise besitzen Claudine vier transmembranäre Domänen, zwei extrazelluläre Schleifen, wovon die zweite kleiner als die erste ist, und je einen Amino- und Carboxyterminus auf der zytosolischen Seite (Abbildung 3). Die erste Schleife soll dabei für die Ladungselektivität des parazellulären Weges verantwortlich sein (Alexandre et al. 2007) und die zweite als eine Art Rezeptor für die Bildung von TJ-Strängen und für die Interaktion mit anderen Proteinen fungieren (Angelow et al. 2008). Die zweite Schleife einiger Claudine (Claudin-3 und -4) kann außerdem als Rezeptor für Clostridium-perfringens-Enterotoxin (CPE-R) dienen (Fujita et al. 2000). Mit dem Carboxyterminus können Claudine über PDZ-Domänen mit anderen zytosolischen Proteinen in Kontakt treten (Itoh et al. 1999). Obwohl die Struktur der Claudine der von Occludin oder auch der von Tricellulin ähnelt, besitzen diese Proteine untereinander keinerlei Sequenzhomologien (Furuse et al. 1998a). Abhängig von der Sequenzähnlichkeit untereinander werden Claudine in klassische (1-10, 14, 15, 17, 19) und nicht-klassische (11-13, 16, 18, 20-24) Claudine unterteilt (Krause et al. 2008).

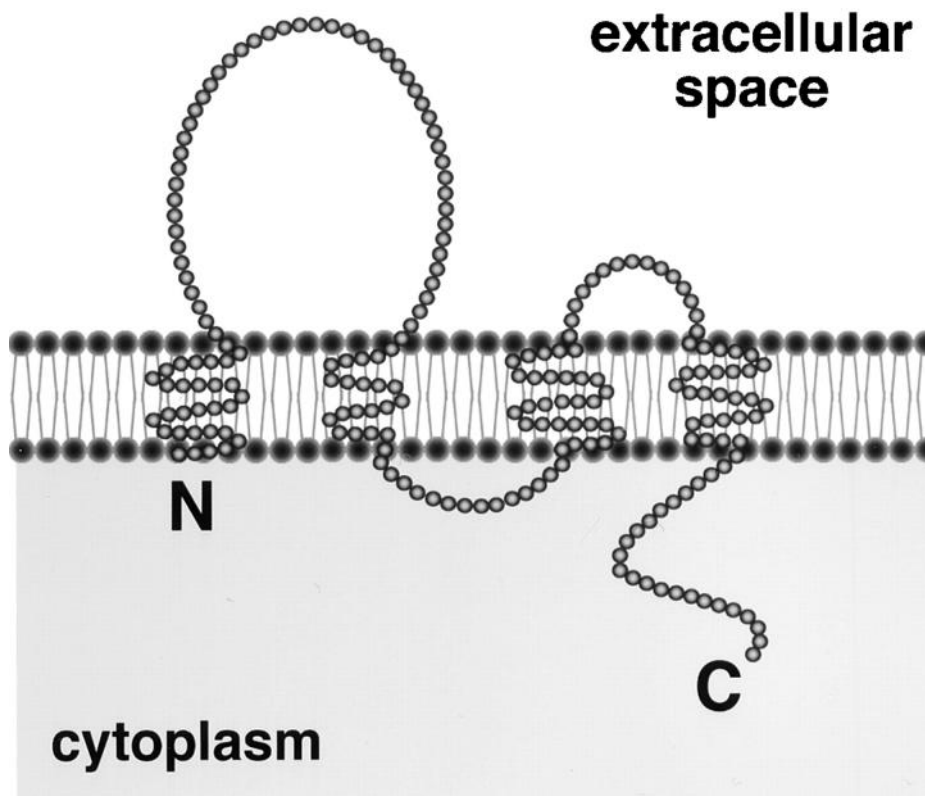


Abbildung 3: Typische molekulare Struktur der Claudine. (Tsukita et al. 2000)

Die Bedeutung einzelner Claudine für die TJ-Funktion wurde mit Methoden wie Downregulation oder Überexpression einzelner Claudine im Zellkulturmodell, Studien der humanen Claudin-Mutationserkrankungen und anhand von Claudin-Knock-out-Mäusen und transgenen Mäusen erforscht. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Cld-2, -10a, -10b, -15 und -17 zu den porenbildenden Claudinen gehören und die Dichtigkeit der TJ verringern, wohingegen Cld-1, -3, -5, -11, -14, und -19 eindeutig abdichtende Funktion haben (Günzel & Fromm 2012).

Eine Mutation im Claudin-16-Gen ist mit der FHHNC (familiäre Hypomagnesämie mit Hypercalcurie und Nephrocalcinose) assoziiert (Simon et al. 1999, Kausalya et al. 2006). Andere Erbkrankheiten, die in Zusammenhang mit Claudin-Mutationen beschrieben wurden, sind die mit Ichthyose assoziierte sklerosierende Cholangitis (Cld-1-Genmutation, Hadj-Rabia et al. 2004) und die autosomal rezessive Taubheit DFNB29 (Cld-14-Genmutation, Wilcox et al. 2001).

Typischerweise kommen in einer Epithelzelle verschiedene Claudine vor, deren Anzahl und Zusammensetzung je nach Zelle variieren. Für die unterschiedliche parazelluläre Permeabilität der Epithelien in verschiedenen Geweben ist das Expressionsmuster der Claudine von entscheidender Bedeutung. Da es bisher keine dreidimensionalen Bilder

von TJ-Strängen gibt, ist es nicht geklärt, wie sich einzelne Proteine zur einer differenzierten Barriere organisieren. Einzelne Claudine können sich zu Homopolymeren (gleiche Claudinspezies) beziehungsweise zu Heteropolymeren (unterschiedliche Claudinspezies) verbinden. Claudine einer Zellmembran (side-by-side interaction) und Claudine gegenüberliegender Zellmembranen (head-to-head interaction) können dabei interagieren (Angelow et al. 2008). Dabei sind aber nur bestimmte Claudinkombinationen möglich (Coyne et al. 2003, Daugherty et al. 2007, Furuse et al. 1999).

1.2.4 Claudin-6

Wie andere Claudine ist Claudin-6 (Cld-6) ein integrales Protein und besitzt vier transmembranäre Domänen, zwei extrazelluläre Schleifen und einen cytoplasmatischen C-Terminus. Cld-6 ist circa 23 kD groß und wurde zusammen mit fünf weiteren Claudinen erstmals 1999 beschrieben (Morita et al. 1999). Bei seiner Entdeckung konnte Cld-6 in adulten Zellen nicht nachgewiesen werden, da Cld-6-mRNA aber in embryonalen Zellen vorhanden war, vermutete man, dass Cld-6 entwicklungsabhängig exprimiert wird (Morita et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, dass Cld-6 eines der ersten Moleküle ist, die im ES (embryonic stem) exprimiert werden (Turksen et al. 2001). Weitere Untersuchungen, in welchen Cld-6 in adulten Zellen ebenfalls kaum nachweisbar war, bestätigten zuerst diese Theorie (Kiuchi-Saishin et al. 2002, Reyes et al. 2002, Turksen et al. 2004). In den letzten Jahren erschienen Studien, bei denen auch in adultem Gewebe eine geringe Cld-6-Expression detektiert werden konnte (Abuazza et al. 2006). So wurde in der adulten Niere einer Maus mittels RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) die Cld-6-Expression nachgewiesen. Im Vergleich zu einer entsprechenden neonatalen Niere lag die Cld-6-Expression allerdings 6-fach niedriger (Zhao et al. 2008). Anderson et al. konnten in 11 von 23 untersuchten Zellarten adulter Mäuse mittels RT-PCR unterschiedlich hohe Cld-6-Spiegel nachweisen, unter anderem in Niere, Auge, Trachea, Lunge, Leber und Prostata (Anderson et al. 2008).

Die ersten Erkenntnisse über die Bedeutung von Cld-6 für die Entwicklung der epidermalen Barriere wurden 2002 von Turksen et al. geliefert (Turksen et al. 2002). Die von ihm generierten, Cld-6 überexprimierenden, transgenen Mäuse starben zwei Tage nach der Geburt an massivem Wasserverlust durch die Haut. Die betroffenen

neugeborenen Mäuse wiesen auch andere Anomalitäten auf. Sie waren kleiner als ihre Artgenossen, ihre Haut war rot, glänzend, schleimig und trotz verdickter Epidermis dünner als bei den Wildtypmäusen (Turksen et al. 2002). Für die Differenzierungsprozesse und die Ausbildung der epidermalen Barriere scheint dabei besonders der cytoplasmatische C-Terminus von Cld-6 von Bedeutung zu sein (Arabzadeh et al. 2006).

1.3 Claudine und parazelluläre Poren

Die Vermutung, dass die TJ parazelluläre Poren ausbilden, ist in der Literatur keineswegs neu (Diamond 1978), die genaue Funktion und Aufbau solcher Poren ist aber immer noch hypothetisch. Die parazellulären Poren sollen von Claudinen gebildet werden und dabei größen- und ladungsselektiv sein (Van Itallie et al. 2006a, Yu et al. 2009). Über die Größe dieser Poren findet man in der Literatur zum Teil sehr unterschiedliche Angaben, die von 4 bis 40 Ångström reichen (Diamond 1978, Tang et al. 2003). Diese große Diskrepanz könnte darauf hinweisen, dass diese Poren keineswegs starr sind, sondern sich dynamisch anpassen können. Andererseits ist es auch vorstellbar, dass unterschiedliche Claudine unterschiedlich große Poren ausbilden. Aber nicht nur die Größe der Moleküle, die eine Pore passieren wollen, ist entscheidend, sondern auch deren Ladung (Van Itallie et al. 2006a).

Eine Funktion als solche parazelluläre Pore konnte bislang für Cld-2 und -10 gezeigt werden. Cld-2 bildet eine parazelluläre Pore für Kationen aus (Amasheh et al. 2002, Yu et al. 2009), Cld-10 besitzt zwei Splice-Varianten und bildet entweder eine anionenselektive (Cld-10a) oder eine kationenselektive (Cld-10b) Pore (Günzel et al. 2009, Van Itallie et al. 2006b). Möglicherweise sind auch andere Claudine in der Lage eine solche Pore auszubilden. Die Annahme, dass Cld-16 eine Magnesiumpore ausbildet (Hou et al. 2008, Kausalya et al. 2006, Simon et al. 1999), wurde durch die Beschreibung von Cld-16-Eigenschaften in Frage gestellt (Günzel et al. 2009).

Nachdem für einige Claudine die Ionenpermeabilität erfolgreich nachgewiesen wurde, stellt sich erneut die Frage, ob diese Ionenporen auch wasserpermeabel sind. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die von Cld-2 gebildeten, kationenselektiven Poren auch wasserpermeabel sind, da deren Einbau den transepithelialen Wasserfluss erhöhte. Eine solche Wasserfluxerhöhung konnte für die ebenfalls kationenselektiven Cld-10b-Poren dagegen nicht gezeigt werden (Rosenthal et al. 2010).

1.4 Epithelialer Wassertransport

Wasser ist Hauptbestandteil von tierischen und pflanzlichen Organismen, 70-85% der Zelle sind Wasser, in dem Stoffe chemisch gelöst oder in Form solider Partikel suspendiert sind (Oberleithner 2007). Wassertransport über die epitheliale Barriere hindurch ist von einer fundamentalen Bedeutung für das Leben von tierischen und pflanzlichen Zellen. Im Körper eines 70-kg schweren Mannes werden pro Tag an die 200 Liter Wasser transportiert (Zeuthen 2002). Nach jahrzehntelangen Untersuchungen sind die Auffassungen über die Wege des Wassertransports immer noch kontrovers. Eine lange Zeit breitanerkannte Standing-gradient-Osmosetheorie wurde bereits 1967 von Diamond und Bossert aufgestellt (Diamond et al. 1967). Sie besagt, dass infolge eines an der Zellmembran lokal aufgebauten elektrochemischen Gradienten Wasser aufgrund von Osmose durch die Membran transportiert wird. Ein wichtiger Pfeiler dieser Theorie ist die Voraussetzung, dass TJ nicht wasserpermeabel sind. Trotz eindeutiger Schwächen und Widersprüchlichkeiten, mit der diese Theorie zu kämpfen hat, konnte bis heute keine bessere Theorie vorgeschlagen werden, die alle Transportvorgänge hinreichend erklären würde.

Prinzipiell kann Wasser entweder transzellulär oder parazellulär die Epithelschicht passieren. (Abbildung 4). Der Wassertransport durch die TJ oder die Aquaporine läuft in allen Fällen passiv, entlang eines osmotischen Gradienten (Spring 1999).

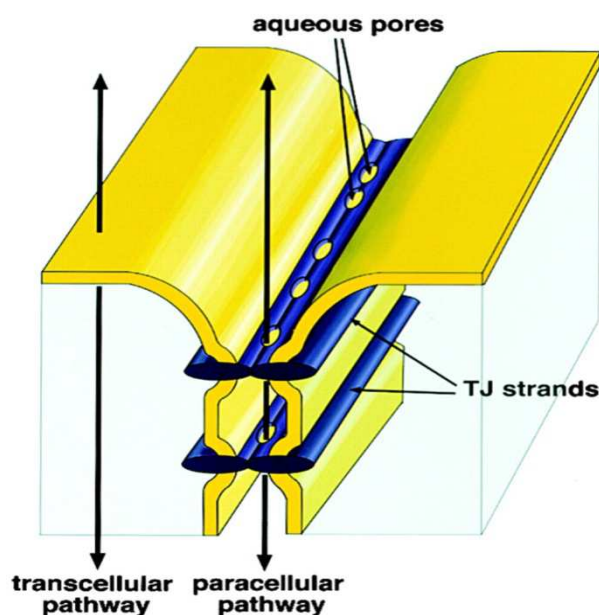


Abbildung 4: Wege des parazellulären und des transzellulären Wassertransportes. (Tsukita et al. 2000)

1.4.1 Transzellulärer Wassertransport

Transzellulär kann Wasser einmal durch die Lipiddoppelschicht der Membran diffundieren. Dieser Transport ist aufgrund der hydrophoben Eigenschaft der Membran jedoch nur in begrenztem Maße möglich und erfordert eine hohe Aktivierungsenergie. Maßgeblich für den transzellulären Wassertransport sind die Aquaporine (AQP), spezifische Wasserkanäle in der Zellmembran (King et al. 2004, Rajasekaran et al. 2008) (Abbildung 5). Mit der Entdeckung der Aquaporine (Preston et al. 1992) konnte das Phänomen des transzellulären Wassertransportes auf der molekularen Ebene bestätigt werden. Die Beobachtung, dass Aquaporine hauptsächlich in wassertransportierenden Epithelien vorkamen (Nielsen et al. 1993), untermauerte die Bedeutung der Aquaporine im transzellulären Wassertransport. Es konnten allerdings bei Menschen mit Mutationen in AQP-1-Genen keine fassbaren klinischen Beeinträchtigungen gefunden werden (Preston et al. 1994). Die aktuell 12 bekannten Aquaporine lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die zur ersten Gruppe gehörenden Aquaporine sind hoch selektiv für Wasser, die zur zweiten Gruppe gehörenden Aquaglyceroporine lassen neben Wasser auch andere kleine Moleküle wie insbesondere Glycerol passieren (Rajasekaran et al. 2008). Da Aquaporine keine Protonen passieren lassen, bleibt der für jede Zelle lebenswichtige Protonengradient aufrechterhalten. Es konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion zwischen dem trans- und parazellulären Wassertransport besteht. In Aquaporin-5-knockout-Mäusen war sowohl der trans- als auch der parazelluläre Wassertransport vermindert (Kawedia et al. 2007).

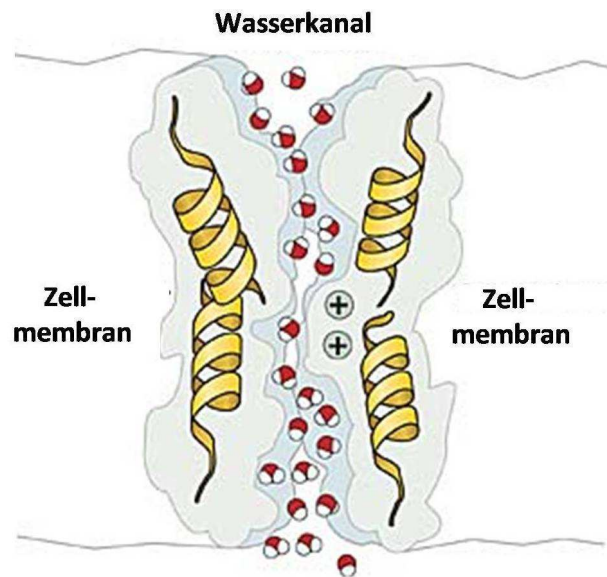


Abbildung 5: Model des Aquaporin-Wasserkanals nach Peter Agre.
 (Quelle: <http://www.klockgiesser.com/bio/aquaporine/aquaporine.html>)

Eine andere, allerdings sehr umstrittene Möglichkeit der transzellulären Wasserpassage bieten die unterschiedlichen membrangebundenen Transportproteine (SLC-Transporter). So wurde ein Natrium- und Glukose-gekoppelter Wassertransport mit Hilfe des Natrium-Glukose-Transporters SGLT1 beschrieben (Loo et al. 1996 und 2002, Zeuthen et al. 1997). Kürzlich wurde außerdem über Wassertransport durch den Na-K-Cl-Kotransporter (NKCC1) berichtet (Hamann et al. 2010). In diesen Fällen könnte der Wassertransport auch entgegen dem osmotischen Gradienten (also „bergauf“) erfolgen.

1.4.2 Parazellulärer Wassertransport

Die andere Möglichkeit, die Wasser durch die Epithelschicht nehmen kann, ist der parazelluläre Weg, der über die TJ führt. Es ist aber immer noch umstritten, inwiefern die TJ überhaupt wasserdurchlässig sind. Der Anteil des parazellulären Wassertransportes in lecken Epithelien wird von verschiedenen Autoren zwischen 0% (Kovbasnjuk et al. 1998, Preisig et al. 1985, Quigley et al. 2002) und nahezu 100% (Shachar-Hill et al. 1993) angenommen.

Wichtige Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem transepithelialen Wassertransport und den TJ, beziehungsweise (bzw.) der Expression von Claudinen, lieferten zwei Tiermodellstudien. Eine Cld-1-defiziente Maus (Furuse et al. 2002) und eine Cld-6-überexprimierende, transgene Maus (Turksen et al. 2002) waren aufgrund von dramatischen dermalen Wasserverlusten nicht lebensfähig.

In neueren Arbeiten wird der parazellulären Route ebenfalls eine bedeutende Rolle zugeschrieben (Fischbarg et al. 2006, Fischbarg 2010, Rosenthal et al. 2010, Shachar-Hill et al. 2002). Die ionendurchlässigen Claudine, wie das Cld-2, werden oft als „wässrige“ Pore bezeichnet (Tsukita et al. 2000, Van Itallie et al. 2004). Exakter wäre die Bezeichnung „wassergefüllte“ Pore, denn eine solche Pore muss nicht zwangsläufig auch Wasser transportieren. Mit optischen Mitteln konnte bisher keine parazelluläre Wasserpermeabilität an einer niederohmigen Nierenzelllinie, die Cld-2 stark exprimiert, nachgewiesen werden (Kovbasnjuk et al. 1998). Andererseits konnte kürzlich gezeigt werden, dass Cld-2 einen parazellulären Wasserkanal ausbildet (Rosenthal et al. 2010).

1.5 Ziele der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob Cld-6 einen parazellulären Wassertransport vermittelt, wie die Untersuchungen von Turksen et al., die massiven Wasserverlust bei Cld-6-überexprimierenden Mäusen nachweisen (Turksen et al. 2002), vermuten lassen. Um das detailliert zu untersuchen, wurde der Wassertransport von stabil mit Cld-6 transfizierten Zellen einer Nierenzelllinie (MDCK-C7) mit den entsprechenden Vektorkontrollen und auch mit nativen Zellen verglichen. In diesem Zusammenhang wurde auch untersucht, ob die Cld-6-Expression die elektrophysiologischen Eigenschaften des Epithels verändert und möglicherweise als Ionenpore fungiert. Ferner wurde untersucht, ob die Expression von Cld-6 einen Einfluss auf die Expression anderer, für den transepithelialen Wassertransport entscheidender Proteine ausübt und damit eine regulatorische Funktion besitzt.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Versuchszellen

Als Untersuchungsobjekte wurden die Madin-Darby Canine Kidney-Zellen (MDCK-Zellen) verwendet. Das sind Sammelrohrzellen der Hundeniere, die bei einer Kultivierung in Nährmedien zu einem konfluenten Monolayer wachsen. Sie wurden nach S. H. Madin und N. B. Darby benannt, die 1958 erstmalig Zellen aus einer weiblichen Hundeniere isolierten (Madin & Darby 1958). Diese Zellen sind besonders geeignet als Untersuchungsobjekte für einschichtige Epithelien, da sie zuverlässig konfluent wachsen und TJs ausbilden (Gonzalez-Mariscal et al. 1985, Meza et al. 1980).

Es gibt 2 Subklone der MDCK-Zellen, MDCK-C7-Zellen mit einem hohen Widerstand (R^t größer $1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$) und MDCK-C11-Zellen mit einem geringen Widerstand. Bei den hier untersuchten MDCK-Zellen handelte es sich um die MDCK-C7-Zelllinie, die ein Modell dichter Epithelien darstellt. Sie stammten aus der Arbeitsgruppe Oberleitner, Institut für Physiologie der Universität Münster (ursprünglich aus kommerziell verfügbaren MDCK-Zellen der American Type Culture Collection (ATCC) hervorgegangen).

Hier wurde mit MDCK-C7-Zellen gearbeitet, die stabil mit humanem Cld-6 transfiziert waren (C7-Cld-6). Als Expressionsvektor diente der CMV4-Vektor. Die stabil transfizierten Zellen wurden im Institut für Klinische Physiologie, CBF, Charité Berlin hergestellt. Es ist denkbar, dass eine Transfektion mit der cDNA an sich, oder bereits der leere Vektor die Proteinexpression und damit die Eigenschaften der Zelle verändert. Als Kontrolle dienten deshalb die MDCK-C7-CMV4-Zellen (C7-CMV4), die mit dem leeren CMV4-Vektor transfiziert wurden. Dadurch sollte geprüft werden, ob die veränderten Eigenschaften der C7-Cld-6-Zellen nicht alleine durch die Transfektion bzw. den leeren Vektor hervorgerufen werden, sondern auf die Expression von Cld-6 zurückzuführen sind. Der CMV4-Vektor enthielt das Resistenzgen für G418 (Geneticin Disulfat). G418 ist ein zytotoxisch wirkendes Aminoglykosid-Antibiotikum, das die Proteinsynthese der Zellen durch eine Störung der ribosomalen Funktion blockiert. Das G418 wurde dem Nährmedium der C7-Cld-6- und C7-CMV4-Zellkultur hinzugegeben, um den erfolgreich transfizierten Zellen einen Selektionsvorteil zu verschaffen.

Als Vergleich zu den transfizierten Zellen dienten die genuinen, nicht transfizierten MDCK-C7-Wildtypzellen (C7-WT).

2.1.2 Kultivierung der MDCK-Zellen

Die MDCK-Zellen wurden unter physiologischen Standardbedingungen bei 37°C im begasten Brutschrank mit einem Carbogen-Gasgemisch aus 95% Luft und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wuchsen in Zellkulturflaschen mit Dulbecco's Minimum Essential Medium unter Zugabe von 10% fötalen Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin. Das Nährmedium wurde alle 3 Tage gewechselt. Alle 7 Tage erfolgte das Passagieren sowie die Neuaussaat der Zellen. Verwendet wurden Zellen zwischen der 60. und 80. Passage.

Für das Passagieren wurden die MDCK-Zellen vom Boden der Zellkulturflasche mit Hilfe der 0,05% Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und je nach Verwendungszweck wie folgt ausgesät:

- für die Wassertransportversuche in der Ussing-Kammer auf Millicell®-HA-Filter (Porengröße 0,45 µm, effektive Transportfläche 4,2 cm²)
- für die Immunfärbung auf Deckgläschen
- für Western-Blot und bei weiterer Kultivierung auf Zellkulturflaschen.

Das Wachstum des Zellrasens wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Für die Wassertransportversuche bestimmte Zellen wurden 10 Tage nach der Aussaat auf Zellfiltern benutzt.

2.2 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Oxoid Ltd, Hamshire, England
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Taufkirchen
Anti-Claudin / Occludin AK Zymed	San Francisco, California, USA
BCA Protein Assay Reagenz A+B Pierce	Rockford, Illinois, USA
Bromphenolblau (Laemmli)	Amersham Phamacia Biotech, Braunschweig
Dichlormethylsilan 2% (1,1,1- Trichlorethan)	Merck, Berlin
DMSO Dimethylsulfoxid	Serva, Heidelberg
Dulbecco's Minimum Essential Medium	Biochrom, Berlin
EDTA 0,5 M	Serva, Heidelberg
EGTA 0,5 M, 1mM	Serva, Heidelberg
Ethanol	J.T.Backer Deventer, Niederlande
Glycin	Serva, Heidelberg
HEPES N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure	BIOMOL Feinchemikalien GmbH, Hamburg
KCl	Merck, Berlin
Lumi-Light Western-Blotting Kit	Roche, Mannheim
Magnesiumchlorid	Merck, Berlin
Methanol	Merck, Berlin
NaCl	Merck, Berlin
Penicillin	Biochrom, Berlin
Paraformaldehyd	Merck, Berlin
PBS-Tabletten	Life Technologies, Karlsruhe

SBTI	Sigma, Taufkirchen
SDS	Merck, Berlin
Silber(I)-Sulfadiazin 98%	Merck, Berlin
Streptomycin	Biochrom, Berlin
TEMED	Life Technologies, Karlsruhe
Tris	Merck, Berlin
Triton X 100	Roche, Mannheim
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
BSA	BioLabs, Frankfurt am Main

2.3 Materialien

Elektroden	Mettler-Toledo GmbH, Urdorf, Schweiz
Zellkulturplatte 8-Well	Nunc, Roskilde, Dänemark
Magnetrührstäbchen	Merck, Berlin
Nylon Membran	Roche, Mannheim
Objektträger	Menzel, Braunschweig
Pipetten	Eppendorf, Köln
Poly Screen PVDF-Transfer Membran	NEN, Köln
Zellkulturflaschen	Nunc, Roskilde, Dänemark
cell-scraper (Zellschaber)	Costar, Corning, NY
Kunststoff-Zellfilter	Millipore Corp., MA, USA
Gel-Blotting-Paper	Schleicher und Schuell, Dassel
Standardtips 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Köln

Poly Screen PVDF-Transfer Membran NEN, Köln

2.4 Geräte

Agarosegel-Elektrophorese Kammern	Biorad, München
Fluoreszenzmikroskop BX 60	Olympus, Hamburg
Luminiszenzbild-Analysator (LAS 1000)	Fuji, Düsseldorf
Magnetrührer Ikamag	IKA-Labortechnik, Staufen
Mini-Protean 3 Elektrophoresesystem	Biorad, München
Mini Trans-Blot Transfer-Zelle	Biorad, München
Inkubator 1000, Uni max 1010	Heidolph, Kelheim
Eppendorf Thermostat 5320	Eppendorf Vertrieb, Wesseling
Plattenlesegerät Spectra Classic	Tecan, Crailsheim
Power Pac 300	Biorad, München
Speed Vac	Uniequip, Martinsried
Zentrifugen Hermle Z233MK	HERMLE, Wehingen
Wippe Biometra WT12	Biometra GmbH, Göttingen
Wasserbad SW 21/ TWB 5	Julabo, Selbach
Zentrifuge Eppendorf 5414 C	Eppendorf AG, Köln
Zentrifuge Beckman Ti 70.1 Avanti J25	Beckman Coulter GmbH, Unterschleissheim-Lohhof
Rollerpumpe MP-4	Ismatec, Zürich, Schweiz
Bad- und Umwälzthermostat B3/C1	Haake, Berlin
pH-Meter, Typ 761	Knick, Berlin
Begasungsbrutschrank, B 5060 EC/CO2	Heraeus, Hanau

Konfokales Laser-Scanning Mikroskop LSM 510 META	Zeiss, Jena
Ussing-Kammer	Institut für Klinische Physiologie, CBF, Charité Berlin
Widerstandsmessgerät	Institut für Klinische Physiologie, CBF, Charité Berlin

2.5 Puffer und Lösungen

5% BSA in PBS:	5 g BSA PBS ad 100 ml
Pierce BCA (Bichinonsäure) (je Probe):	196 µl Protein Assay Reagenz A 4 µl Protein Assay Reagenz B
Transferpuffer:	100 ml 10 × Puffer West 100 ml Methanol Aqua bidest ad 1 l
Elektrophoresepuffer:	100 ml 10 × Puffer West 10 ml 10% SDS Aqua bidest ad 1 l
PBS/Tween:	2 Stück PBS-Tabletten 1 ml Tween Aqua bidest ad 1 l
10 × Puffer West:	144 g Glycin 30,4 g Tris Base Aqua bidest ad 1 l
BSA-Blockierungslösung:	5 % BSA 0,02 % Natriumazid in PBS/Tween
Membran-Lysepuffer:	2 ml Tris HCl, pH 7,4 500 µl 1M MgCl ₂ 200 µl 0,5M EDTA 120 µl 0,5M EGTA Aqua bidest. ad 100 ml

zu je 10 ml frischen Lysepuffer zusätzlich: 1 Tablette Complete

0.5% Triton-X100: 1.5 ml Triton-X
300 ml PBS

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

2.6 Nachweis der Proteinexpression (Western-Blot)

Die Western-Blot-Technik ist eine Methode der Molekularbiologie, mit deren Hilfe Proteine identifiziert werden können. Dabei macht man sich die Fähigkeit der Antikörper, an spezifische Proteine zu binden, zu Nutze. Wichtige Erkenntnisse über die Größe der Proteine und deren Expressionsstärke können somit gewonnen werden. Die einzelnen Analyseschritte umfassen: Protein-Extraktion, Proteinquantifizierung, Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE), Western-Blot, Immundetektion und werden folgend dargelegt.

2.6.1 Membranprotein-Extraktion

Für Extraktion der Membranproteine wurden MDCK-Zellmonolayer in Zellkulturflaschen angezüchtet. Zuerst wurde unter einem Mikroskop sichergestellt, dass die Zellen konfluent und als Monolayer wachsen. Um die bereits bei Raumtemperaturen beginnende Proteolyse zu begrenzen, wurden alle Extraktionsschritte auf Eis durchgeführt. Danach wurde das sich in den Zellkulturflaschen befindliche Nährmedium abgeschüttet und der Zellrasen einmal mit eiskalter PBS-Lösung gewaschen. PBS-Lösung wurde vollständig abgeschüttet und die Zellen wurden mit je 1000 µl Lysepuffer pro Zellkulturflasche (Fläche 75 cm²) lysiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe von cell-scrapern vorsichtig vom Flaschenboden abgeschabt und die so gewonnene Zellsuspension in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Zur Zerkleinerung und Homogenisierung der Zellsuspension wurde diese 10-mal durch eine 26-G-Insulinnadel gezogen. Die homogenisierte Zellsuspension wurde in einer auf 4°C abgekühlter Zentrifuge bei 500 g 5 Minuten (min) lang zentrifugiert. So wurden die Membran- und andere zytoplasmatische Proteine im Überstand vom Pellet (Zellorganelle, RNA-, DNA- und andere Zellfragmente) abgetrennt und in ein separates Eppendorf-Röhrchen

überführt. Die anschließende 30-minütige, bei 43000 g und unter 4°C durchgeführte Zentrifugation trennte die membranständigen Proteine im Pellet von den restlichen Proteinen im Überstand. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Membranproteine mit Lysepuffer vorsichtig resuspendiert und der Proteinquantifizierung zugeführt. Die so gewonnenen Membranlysate wurden nach der Proteinbestimmung bei -80°C gelagert.

2.6.2 Proteinquantifizierung

Die Proteinquantifizierung wurde durchgeführt um gleiche Proteinmengen auf das Gel aufzutragen und damit die Expression bestimmter Proteine quantitativ vergleichen zu können. Dabei wurde die Pierce BCA Assay Reagenz verwendet. Zuerst wurde eine Eichkurve mit bekannten Rinderserumalbumin-Konzentrationen (Standards von 0,0 - 0,2 - 0,8 - 1,2 mg/ml) erstellt und die Lichtabsorption-Messungen bei 562 nm Wellenlänge im Spectra-Plattenlesegerät (Tecan, Österreich) gemessen. Anhand dieser Eichkurve wurde die Proteinkonzentration in den Membranlysaten und dem Lysepuffer ermittelt. Die Proteinkonzentration des Lysepuffers wurde von der Konzentration der Proben abgezogen. Die Messungen erfolgten als eine Doppelbestimmung, für die weiteren Berechnungen wurde der Mittelwert gebildet.

2.6.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteingemischen. Dabei wird die Fähigkeit der geladenen Teilchen entlang eines angelegten elektrischen Feldes zu wandern ausgenutzt. Die Proteine werden dabei abhängig von ihrer Ladung, Größe und Beschaffenheit des Trenngels unterschiedlich stark zum Pluspol (Anode) gezogen und dabei aufgetrennt. Die Beschaffenheit des Trenngels ist insofern von Bedeutung, dass für größere Moleküle eine niedrigere Konzentration von der Trägersubstanz Polyacrylamid erforderlich ist als für kleinere. Quervernetzte Polyacrylamide quellen in wässrigen Lösungen auf und werden mit ansteigender Polyacrylamid-Konzentration zunehmend fester. Um größere Moleküle zu detektieren greift man eher zu weniger festen, wässrigen Gelen, da sie mehr Zeit brauchen um das Gel-Maschenwerk zu durchwandern als kleinere Moleküle.

Die Wanderungsgeschwindigkeit ist weiterhin von der angelegten Spannung abhängig. Trägt man parallel zur Proteinprobe Referenzproteine bekannter Molekülmasse auf, kann man über einen Bandenvergleich Molekulargewichte der Proteine in der Probe abschätzen.

Für die PAGE wurde eine Mini-Protean-Apparatur von der Firma Biorad (München) verwendet. Dazu wurde zwischen zwei abgedichteten Glasplatten (Abstand ca. 1,5 mm) ein 12,5% Trenngel vorsichtig gegossen. Dabei wurde streng darauf geachtet, dass sich im Trenngel keine Luftbläschen bildeten. Bis zum oberen Rand der Glasplatten wurde 1 cm frei gelassen. In diesen Raum wurde zur Glättung der Geloberfläche und zur Vermeidung des Kontaktes mit Sauerstoff 1 ml Alkohol pipettiert. Nach 30 min Polymerisationszeit konnte der Alkohol entfernt werden und der freie Raum wurde bis zur oberen Kante mit Sammelgel gefüllt. In die so entstandene, ca. 1 cm breite Sammelgelschicht wurde ein Plastikkamm eingesetzt, um die zur Probeaufnahme notwendigen Taschen zu erhalten. Es wurde eine 30-minütige Polymerisationszeit angeschlossen, anschließend konnte der Kamm gezogen werden. Die so erhaltenen Gele konnten nun in die Halterung eingespannt werden und in die mit Elektrophoresepuffer gefüllten Elektrophoresekammern eingesetzt werden. Zu den Membranlysaten wurde im Verhältnis 4:1 Lämmli-Puffer (Bromphenolblau) hinzugegeben und das Gemisch 5 min lang bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Sammelgeltaschen mit den Lysaten, die 10 µg Gesamtprotein enthielten, beladen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V und dauerte ungefähr 1 Stunde. Anschließend konnten die Gele für das Blotting verwendet werden.

2.6.4 Western-Blot

Das Prinzip des Western-Blots (vom englisch „blotter“ = Löschpapier, „blotting“ = Übertragung) ist das gleiche wie bei PAGE, nämlich die Wanderung der geladenen Teilchen entlang eines angelegten elektrischen Feldes. Der Grund, warum man die aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine geeignete Trägermatrix, in unserem Fall eine Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF), überträgt, ist 1. die einfachere Handhabung der Trägermembran im Vergleich zu einem Gel, 2. die so gewonnene Immobilität der Proteine und 3. die schnellere Antikörperbindung bei der späteren Verwendung. Der Proteintransfer vom Gel zur Trägermembran erfolgte unter senkrecht zum Gel angelegtem elektrischem Feld. Das Muster der zuvor mit der PAGE aufgetrennten

Proteine bleibt erhalten, die Proteine werden aber dabei der später notwendigen Antikörperbindung (Immundetektion) zugänglich.

Dazu wurde die der Größe des Gels angepasste PVDF-Membran zuerst 5 min lang mit Alkohol benetzt und danach zusammen mit je zwei Schwämmen und je zwei Whatman-Filterpapieren 5 min lang im Transferpuffer getränkt. Danach konnte die Transferkammer nach dem folgenden Prinzip zusammengebaut werden:

- Schwamm
- Whatman-Filterpapier
- PVDF-Membran
- Gel
- Whatman-Filterpapier
- Schwamm

Die Konstruktion wurde beidseits durch eine gelochte Plastikhalterung zusammengehalten und konnte nun in die mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer eingesetzt werden. Damit die negativ geladenen Proteine in die richtige Richtung wandern, musste die Anode an die Seite der PVDF-Membran angeschlossen werden. Der Proteintransfer dauerte 60 min und erfolgte gekühlt bei konstanter Spannung von 100 V.

2.6.5 Immundetektion

Die Technik der Immundetektion bedient sich des Antigen-Antikörper-Bindungs-Prinzips. Dabei können Antigene mittels Antikörperbindung nachgewiesen und quantitativ verglichen werden.

Es kamen zwei Arten von Antikörpern zum Einsatz. Der erste Antikörper war gegen das zu detektierende Protein gerichtet. Weil der erste Antikörper nicht markiert war, wurde der Einsatz von einem zweiten, gegen den bereits gebundenen Erstantikörper gerichteten, Anti-Antikörper nötig, der Peroxidase-gekoppelt war und somit durch Zugabe eines spezifischen Substrats detektiert werden konnte.

Die PVDF-Membran wurde für mindestens zwei Stunden in einer BSA-Blockierungslösung (5 % BSA in PBS/Tween) auf einer Wippe (Fröbel Labor Technik,

Lindau) unter konstanten Kippbewegungen inkubiert. Dies diente zur Sättigung der überschüssigen Proteinbindungsstellen auf der Membran.

Die unspezifischen Antikörperbindungen wurden somit verhindert. Im Anschluss wurde die Behandlung mit den Erstantikörpern durchgeführt. Dies erfolgte bei Raumtemperatur für zwei Stunden in PBS/Tween/5% BSA/0,02% NaAzid-Lösung. Die Konzentration der Antikörper in der Lösung betrug 1:1000 bis 1:2000. Anschließend folgten zwei kurze Waschgänge mit PBS/Tween und ein Waschgang mit TBS/Tween. Die Behandlung mit dem Zweitantikörper (Konzentration 1:10000) erfolgte in TBS/Tween mit 1 % Blockier-Reagenz bei Raumtemperatur und dauerte 90 min. Es folgten zwei Waschschrte mit PBS/Tween und ein Waschschrte mit TBS/Tween. Danach erfolgte eine 5-minütige Inkubation in Lumi-Light-Lösung im Dunkeln. Die mit dem Zweitantikörper konjugierte Peroxidase führt in Verbindung mit Lumineszenzlösung zur Lichtemission. Die Proteinbanden wurden so sichtbar gemacht und konnten im Luminiszenzbild-Analysator (LAS 1000) detektiert und als Computerdatei abgespeichert werden.

2.7 Immunfluoreszenzfärbung

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung und der anschließenden Immunfluoreszenzmikroskopie ist die Detektion eines markierten Proteins innerhalb einer Zelle möglich. Mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops sind die genauere subzelluläre Lokalisation und eine Koloalokalisation mit anderen Proteinen nachweisbar. Prinzipiell nutzt man dazu Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörperkomplexe, die durch Antigen-Antikörperreaktionen an gesuchte Proteine binden. Dabei unterscheidet man direkte (der erste Antikörper ist bereits fluoreszenzmarkiert) und, wie in unserem Fall, indirekte (der zweite Antikörper, der an den ersten Antikörper bindet, ist fluoreszenzmarkiert) Immunfluoreszenzfärbung. Der so gebundene Fluoreszenzfarbstoff emittiert Photonen, wenn man ihn mit Licht bestimmter Wellenlänge anregt. So können die gesuchten Proteine genau detektiert und lokalisiert werden. Dies wurde genutzt um zu überprüfen, ob bei den transfizierten C7-Cld-6-Zellen Cld-6 genau in die TJ eingebaut wird. Die Immunfluoreszenzanalyse und entsprechende bildliche Dokumentation wurden wie bei Weiske et al. beschrieben durchgeführt (Weiske et al. 2001). Zuerst wurden die auf Deckgläschen kultivierten Zellen zweimal mit PBS (Phosphate Buffered Saline) gewaschen, 15 min mit 4% PFA

(Paraformaldehyd, auf pH 7,4 eingestellt) fixiert und 5 min mit 0.5% Triton®-X-100 (R = 1,1,3,3-tetramethylbutyl) permeabilisiert. Dann wurde 10 min lang mit 1% Goat-Serum in PBS blockiert und 45 min lang eine Inkubation mit dem ersten Antikörper gegen Cld-6 in Blockierlösung bei 37°C durchgeführt. Um die Kolo-kalisation von Cld-6 und Occludin in den TJ zu zeigen, wurde anschließend 45 min lang mit einem Anti-Occludin-Antikörper inkubiert. Um die ersten Antikörper mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung nachweisen zu können, wurden diese anschließend 45 min einer zweiten Inkubation mit den zweiten, Fluoreszenz-markierten Antikörpern (die gegen die ersten Antikörper gerichtet sind) in Blockierlösung behandelt. Dabei müssen sich die Fluoreszenz-Markierungen der zweiten Antikörper unterscheiden, um eine Überlagerung der markierten Proteine detektieren zu können. Anschließend wurde eine Kernfärbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) durchgeführt. DAPI bindet an DNA und es bilden sich DNA-DAPI-Komplexe, wodurch stark fluoreszierende Zellkerne entstehen. Dies verdeutlicht die Membranständigkeit der TJ-Proteine in Relation zu den Zellkernen. Die Kernfärbung dauerte 10 min und wurde im Dunkeln durchgeführt. Danach wurden die Zellen mit ProTaq Mount Fluor (Biocyc GmbH & CoKG, Luckenwalde, Germany) auf Objektträger eingedeckelt. Nach der Aushärtung im Dunkeln und bei Raumtemperatur konnten die Objektträger unter einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (Zeiss LSM 510 META) bei einer 63xVergrößerung und bei einer Lichtanregung (Wellenlänge 543 nm und 405 nm) betrachtet, bzw. Bildaufnahmen angefertigt werden.

2.8 Wasserfluxexperimente

Bei den Wasserfluxexperimenten wurden die Cld-6-transfizierten (C7-Cld-6), die Leerverktor-transfizierten (C7-CMV4) und die Wildtyp-Zellen (C7-WT) untersucht. Der Wasserflux wurde durch verschiedene Gradienten induziert, einmal durch einen osmotischen Gradienten (durch Mannitol), einen Ionengradienten (durch NaCl) und eine Kombination beider Gradienten.

2.8.1 Konstruktion des Messstandes

Der Wassertransport an den MDCK-Zellen wurde mit Hilfe einer modifizierten Ussing-Kammer gemessen (Rosenthal et al. 2010) (Abbildung 6). Mit dieser In-vitro-Methode ist eine simultane Messung des Wassertransports und der elektrophysiologischen Parameter möglich. Der im Institut entwickelte Kammeraufbau entsprach grundsätzlich der von Ussing und Zerahn 1951 beschriebenen Anordnung (Ussing & Zerahn 1951). Die aus Plexiglas hergestellte Kammer besteht aus zwei aneinanderschraubbaren, transparenten Gefäßen mit etwa 23 ml Inhalt. Die physiologischen Parameter wie Druck, Temperatur und Volumen waren in beiden Gefäßhälften identisch. Die Kammer war so konstruiert, dass man für die Versuche kommerzielle Millicell®-HA-Filter mit einer Transportfläche von $4,2 \text{ cm}^2$ direkt einspannen konnte. So wurde das System in ein apikales (rechte Kammerhälfte) und basolaterales (linke Kammerhälfte) Kompartiment unterteilt und die beiden Kammern konnten mit unterschiedlichen Lösungen befüllt werden. Die Dichtigkeit der Kammer wurde durch zwei Gummiringe gewährleistet, die jeweils zwischen Filter und Kammer eingelegt wurden. Die gesamte Kammer war durch eine Wärmepumpe auf einer konstanten Temperatur von 37°C gehalten. Um zu verhindern, dass sich unmittelbar am Zellfilter lokale Konzentrationsgradienten aufbauen, wurde die Ringer-Lösung beidseits durch eine Pumpe (Rollenpumpe) zur kontinuierlichen Zirkulation gebracht. Jede Gefäßhälfte besaß drei Öffnungen zum Einbringen von Agarbrücken sowie zum Befüllen mit Lösungen. Je eine Agarbrücke befand sich in unmittelbarer Nähe vom Zellfilter, sie registrierten die epitheliale Spannung. Die Agarbrücken standen zusammen mit den Elektroden in mit gesättigter KCl-Lösung gefüllten Bechern. Zwei andere Agarbrücken waren mit einer Stromquelle verbunden und befanden sich weiter vom Epithel entfernt. Sie dienten der Stromeinspeisung. Das System wurde von einer Kamera zur optischen Registrierung von Menisken in den Kammerhälften ergänzt.

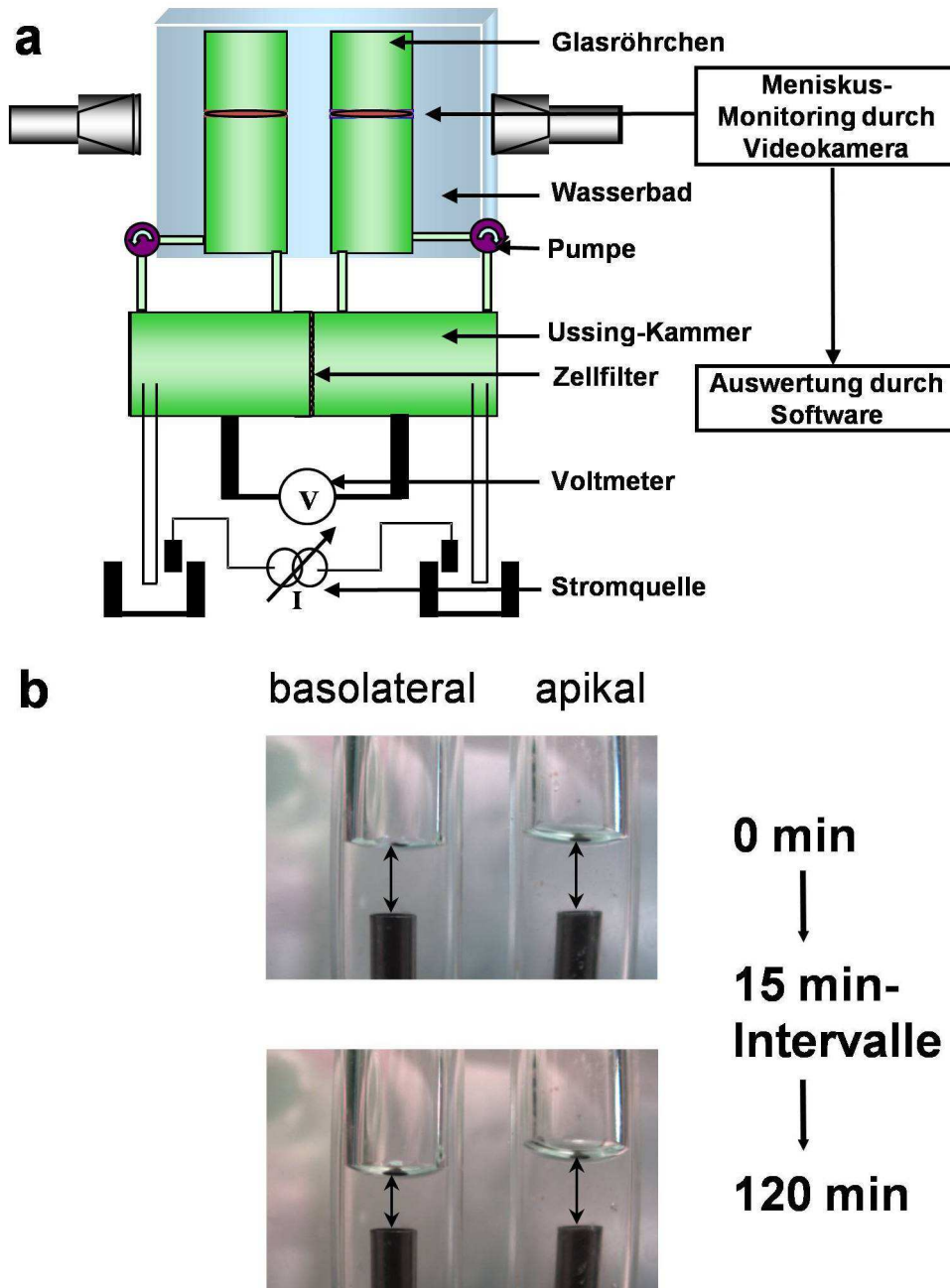


Abbildung 6: a.) Schematische Aufbau des Versuchsstandes und das Prinzip der Messung des Wassertransportes in der Ussing-Kammer. b.) Photographische Darstellung der Meniskenänderung am Anfang und am Ende des Versuchs.

2.8.2 Versuchslösungen

Für die Wassertransportversuche wurde eine modifizierte, HEPES-gepufferte Ringer-Lösung mit folgender Zusammensetzung verwendet (in mMol/l): 134,6 NaCl, 10 D-Glucose, 10,59 HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), 2,4 Na_2HPO_4 , 0,6 NaH_2PO_4 , 5,4 KCl, 1,2 MgCl_2 , 1,2 CaCl_2 titriert auf ein pH von 7,4 mit 1M

NaOH. Durch Zugabe von 100 mMol/l Mannitol an der apikalen Seite entstand die hochosmotische Lösung, die für die Mannitol-Gradienten-Versuche verwendet wurde. Für Versuche mit Natrium-Chlorid-Gradienten hatte die basolaterale Lösung die gleiche Zusammensetzung, auf der apikalen Seite war die NaCl-Konzentration um 80 mMol/l verringert worden, so dass die NaCl-Differenz apikal zu basolateral 80 mMol/l betrug. Die osmotische Differenz wurde anschließend mit 160 mMol/l Mannitol ausgeglichen. Der Lösung für die Versuche mit Mannitol- und Natrium-Chlorid-Gradienten wurden auf der Seite der niedrigen NaCl-Konzentration zusätzlich zu den 160 mMol/l Mannitol 100 mMol/l Mannitol zur Erzeugung des osmotischen Gradienten beigefügt. Die Lösungen wurden jeweils am Vortag angesetzt und bis zum nächsten Tag gekühlt gehalten. Vor Versuchsbeginn wurden die Lösungen auf 37°C erwärmt.

2.8.3 Versuchsablauf der Wassertransport-Messung

Die Versuchskammer und alle mit der Ringer-Lösung in Kontakt kommenden Schläuche wurden vor dem Versuchsbeginn mit Aqua bidest. gespült und mit Papier abgetrocknet. In die Öffnungen der Kammer wurden Agarbrücken eingesetzt und dicht eingespannt. Die Glasröhrchen, in denen die Wasserstände abgelesen wurden, wurden zur besseren Ablesung mit 2% Dichlormethylsilan dünn beschichtet. Zur Bestimmung des Kammerleerwiderstandes und der Offsets wurde zuerst ein leerer Filter (ohne Zellmonolayer) in die Kammer eingesetzt. Anschließend wurde die Kammer mit der 37°C warmer Ringer-Lösung gefüllt, die Wärme- und die Rollerpumpen eingeschaltet und die Computer-Software (Analogon, Ing. grad. D. Sorgenfrei) gestartet. Nach Einstellung der steady-state-Bedingungen, was im Durchschnitt etwa 20 min dauerte, wurde der Kammerleerwiderstand und die Offsetpotentiale und -ströme (Kammer, leerer Zellfilter, Ringer-Lösung) bestimmt. Nun konnte, nach Ablassen der Lösung und Säubern der Kammer, der zellbewachsene Filter eingesetzt werden. Die Kammern wurden jeweils mit circa 11,5 ml bis zum Gleichstand der Menisken gefüllt, alle Systeme eingeschaltet, die Photokamera zur Registrierung der Wassermenisken (Abbildung 6) eingestellt und, nach Stabilisierung des Widerstandes, der Versuch gestartet. Elektrogener Transport kann zum Aufbau von elektrischen Gradienten am Zellfilter, die zu passiven Ionenbewegungen führen können, beitragen. Um das auszuschließen, wurde bei allen Wassertransportmessungen das Epithel durch externe Stromspeisung auf 0 mV geklemmt. Durch die Spannungsklemme konnte der

elektrische Gradient als treibende Kraft für die Ionen- und damit Wasserbewegungen ausgeschaltet werden. Der Wasserflux wurde durch unterschiedliche Bedingungen induziert (osmotischer Gradient, ionaler Gradient und die Kombination beider Gradienten). Die Versuche dauerten 120 min, wobei die Wasserstände alle 15 min fotografiert und die Abstände mit der entsprechenden Software mikrocomputergesteuert in Pixel ausgerechnet wurden. Durch die vorherige Eichung war es möglich, den Wassertransport zu bestimmen und anschließend den Wasserflux in $\mu\text{l/h/cm}^2$ zu berechnen.

Die elektrophysiologischen Parameter wie Strom, Spannung und Widerstand, die mit Hilfe der computergesteuerten Software (Analogon, Ing. grad. D. Sorgenfrei) laufend aufgezeichnet wurden, dienten als Kriterium der Unversehrtheit und der Vitalität des Epithels.

Über die Messung des transepithelialen Widerstandes R^t kann die Dichtigkeit des Epithels beurteilt und die verschiedenen Zelltypen miteinander verglichen werden.

2.9 Dilutionspotentialmessungen in der Ussing-Kammer

Die Dilutionspotentiale wurden zur Ermittlung von partiellen, parazellulären Leitfähigkeit der Natrium- und Chloridionen gemessen. Ein Dilutionspotential (U_m) ist ein Diffusionspotential, das sich einstellt, wenn man in einer Kammerhälfte die Natrium- und Chloridionen unter Beibehaltung des osmotischen Ausgleichs mit einer geeigneten ungeladenen Substanz (in unserem Fall Mannitol) ersetzt.

Mit Hilfe der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung kann man die Größe des Dilutionspotentials U_m folgendermaßen berechnen:

$$U_m = \frac{R \times T}{F} \times \ln \frac{P_{\text{Na}}[\text{Na}]^b + P_{\text{Cl}}[\text{Cl}]^a}{P_{\text{Na}}[\text{Na}]^a + P_{\text{Cl}}[\text{Cl}]^b}$$

U_m : Dilutionspotential, gemessen apikal gegen basolateral

R : allgemeine Gaskonstante

T : absolute Temperatur

F : Faradaykonstante

$P_{\text{Na}}, P_{\text{Cl}}$: Permeabilität der Ionen Natrium, bzw. Chlorid

$[\text{Na}]^b, [\text{Cl}]^b$: basolaterale Konzentration für Natrium, bzw. Chlorid

$[\text{Na}]^a, [\text{Cl}]^a$: apikale Konzentration für Natrium, bzw. Chlorid

Das Permeabilitätsverhältnis von Natrium (P_{Na}) und Chlorid (P_{Cl}) lässt sich durch Umformung der Permeabilitätsgleichung berechnen:

$$\frac{P_{Na}}{P_{Cl}} = \frac{\exp\left[\frac{U_m \times F}{R \times T}\right] \times [Cl]^b \times [Cl]^a}{[Na]^b - \exp\left[\frac{U_m \times F}{R \times T}\right] \times [Na]^a}$$

Durch die unterschiedliche Badzusammensetzung der Ussing-Kammerhälften (normale und durch Mannitol verdünnte Ringerlösung) entsteht ein Potential. Dieses Elektrodenpotential ist allein durch die ungleichen Badlösungen bedingt und muss bei weiteren Rechnungen berücksichtigt, also vom Dilutionspotential abgezogen werden. Die Gesamtleitfähigkeit G^t des Epithels entspricht dem Kehrwert des direkt gemessenen transepithelialen Widerstands R^t ($G^t = 1/R^t$). Aus der relativen Leitfähigkeit für Natrium (P_{Na}) und der Gesamtleitfähigkeit des Epithels (G^t) lässt sich nun die absolute Leitfähigkeit für Natrium (G_{Na}) bestimmen:

$$G_{Na} = \left(\frac{P_{Na}}{P_{Cl}}\right) \times \frac{G^t}{1 + \left(\frac{P_{Na}}{P_{Cl}}\right)}$$

Die gesamte Leitfähigkeit eines Epithels wird durch die Summierung der partiellen Leitfähigkeiten für Natrium und Chlorid gebildet. Demzufolge lässt sich die partielle Leitfähigkeit für Chlorid (G_{Cl}) berechnen.

Zur Messung der Dilutionspotentiale wurden die Zellfilter, die hier eine Fläche von 0.6 cm² hatten, in eine konventionelle Ussingkammer eingesetzt. In beide Kammerhälften wurden 10 ml einer Bicarbonat-gepufferten Ringerlösung folgender Zusammensetzung (in mMol/l) gefüllt: 119 NaCl, 21 NaHCO₃, 5,4 KCl, 1 MgSO₄, 1,2 CaCl₂, 3 HEPES, 10 D-Glucose. Nach Einstellung eines Gleichgewichts wurde aus einer Kammerhälfte 5 ml Versuchslösung entnommen und durch 5 ml einer Mannitol-haltigen Ringerlösung folgender Zusammensetzung ersetzt (in mMol/l): 238 Mannitol, 21 NaHCO₃, 5,4 KCl, 1 MgSO₄, 1,2 CaCl₂, 3 HEPES, 10 D-Glucose. Anhand der Potentialänderung bei Lösungswechsel können anhand der obigen Formeln die Permeabilitätsverhältnisse und die Permeabilitäten bestimmt werden.

2.10 Statistische Auswertung

Die Gesamtzahl der Experimente wurde mit $n = x$ angegeben. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM (standard error of the mean) angegeben. Zum Vergleich wurde der ungepaarte t – Test nach Student durchgeführt. Bei Mehrfachtestung wurde die Bonferroni-Holm-Korrektur angewandt. Signifikanz wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen. Es gilt: $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***).

3. Ergebnisse

3.1 Stabile Transfektion der MDCK-C7-Zellen mit der cDNA von Claudin-6

Um die Bedeutung von Cld-6 auf den transepithelialen Wassertransport zu untersuchen, wurden MDCK-C7-Zellen, die endogen kein Cld-6 exprimieren, stabil mit dem CMV4-Vektor, welches die cDNA für humanes Cld-6 enthielt, transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden bezüglich ihrer Eigenschaften mit C7-Wildtypzellen verglichen, als Kontrolle für die Cld-6 exprimierenden Zellen dienten die mit leerem Vektor transfizierten Zellen.

Die Arbeitshypothese war, dass Cld-6 zum Anstieg der TJ-Permeabilität und somit zu einer vermehrten transepithelialen Wasserdurchlässigkeit beiträgt.

3.2 Nachweis der Claudin-6-Expression in den transfizierten Zellen

Um die Expression von Cld-6 in den transfizierten Zellen nachzuweisen, wurde die Western-Blot-Technik angewandt. Die genaue subzelluläre Lokalisation von Cld-6 im Zellverband wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung und der konfokalen Mikroskopie erforscht.

3.2.1 Proteinnachweis mittels Western-Blot-Analyse

Mit der Western-Blot-Analyse konnten bei C7-Cld-6-Zellen eindeutige Signale in der Größe von ca. 23 kDa detektiert werden. Dies entspricht dem Molekulargewicht von Cld-6 (Morita et al. 1999). Bei den entsprechenden Wildtypzellen (C7-WT) und den Vektorzellen (C7-CMV4) fehlte dagegen dieses Signal erwartungsgemäß (Abbildung 7a). Das zeigt, dass eine endogene Expression von Cld-6 in MDCK-C7-Zellen nicht vorhanden ist.

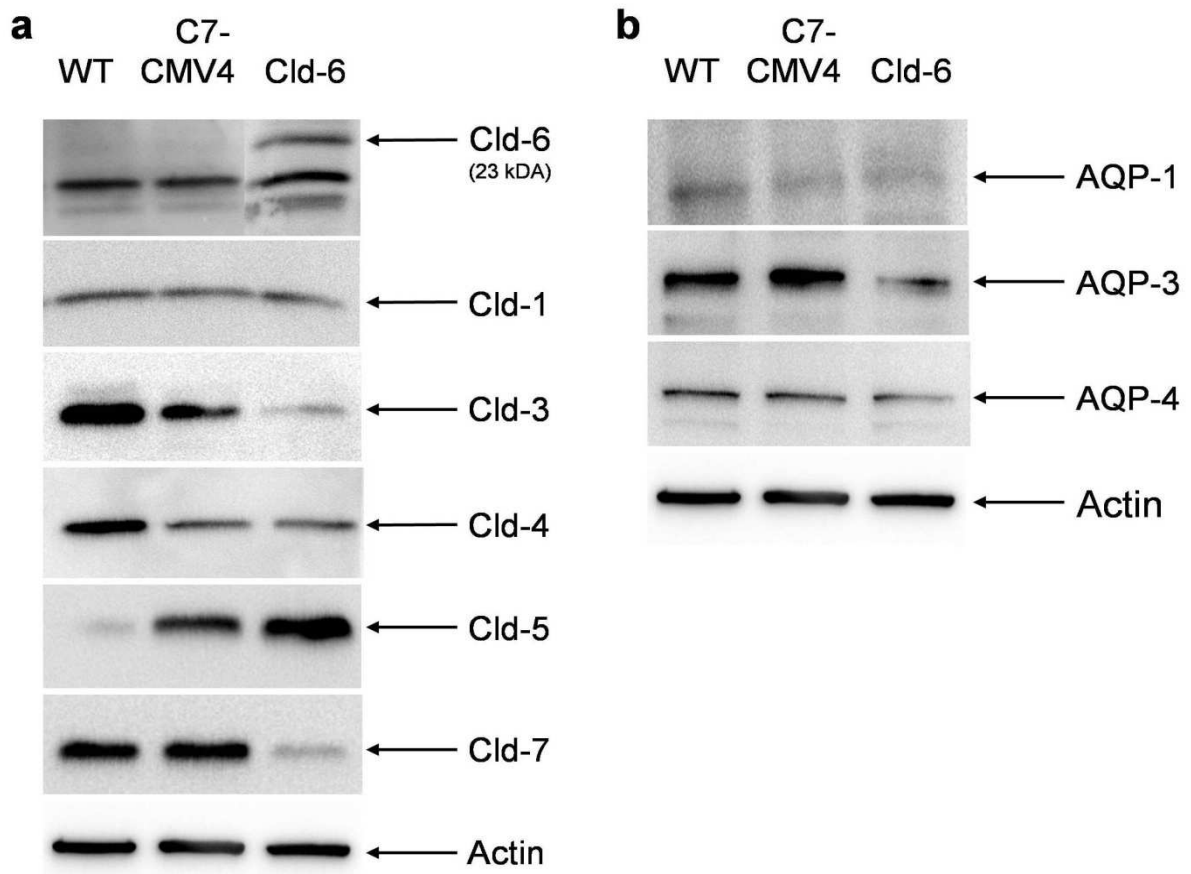


Abbildung 7: Western-Blot; a.) Nachweis der TJ-Proteine bei C7-WT-, C7-CMV4- und C7-Cld-6-Zellen. b.) Nachweis der Aquaporine AQP-1, -3 und -4 bei C7-WT-, C7-CMV4- und C7-Cld-6-Zellen.

3.2.2 Einfluss der Transfektion auf die Proteinexpression in den Zellen

Es ist möglich, dass die Transfektion mit Cld-6, oder bereits die alleinige CMV4-Vektortransfektion, die Expression anderer Membranproteine in den entsprechenden Zellen verändern könnte. Um das auszuschließen, wurden die C7-Cld-6-, die C7-CMV4- und die C7-WT-Zellen auf die Expression von Membranproteinen untersucht und miteinander verglichen. In allen untersuchten Zellreihen wurden folgende Membranproteine detektiert:

- Cld-6
- andere Claudine von Cld-1 bis Cld-7, außer Cld-2
- Occludin
- Aquaporine: AQP-1, AQP-3, AQP-4

und Actin, das zusammen mit Mikrotubuli und Intermediärfilamenten ein Bestandteil des Zytoskeletts der Zelle ist und als Proteinbeladungsmarker fungiert (Abbildung 7).

Cld-6 war erwartungsgemäß nur in transfizierten Zellen detektierbar. Cld-1 konnte bei allen untersuchten Zelltypen (C7-WT, C7-CMV4, C7-Cld-6) nachgewiesen werden. Es scheint bei allen Zelltypen gleich stark exprimiert zu sein (ähnliche Signalstärke). Cld-3 scheint dagegen bei C7-Cld-6-Zellen weniger stark exprimiert zu sein als bei C7-CMV4- und C7-WT-Zellen. Cld-4 ist bei Wildtypzellen mit einem stärkeren Signal nachweisbar als bei C7-Cld-6 und C7-CMV4. Cld-5 dagegen zeigt besonders starkes Signal bei C7-Cld-6, etwas weniger stark bei C7-CMV4 und bei C7-WT ist es praktisch nicht nachweisbar. Die Expression von Cld-7 scheint bei C7-Cld-6 supprimiert, bei den C7-WT und C7-CMV4 dagegen starker ausgeprägt zu sein. In der Western-Blot-Analyse sind bei allen drei Zellarten die Aquaporine AQP-1, -3 und -4 nachweisbar (Abbildung 7b). Die Expression der AQP-3 und -4 ist bei C7-Cld-6-Zellen im Vergleich zur Vektorkontrollen nicht signifikant verändert, die AQP-1-Expression ist dagegen signifikant erhöht. Zum Nachweis gleicher Proteinbeladung wurde das Zytoskelettprotein Actin herangezogen. Eine densitometrische Analyse der Aquaporin- und Claudinexpression wurde in den Vektorkontrollen und den Cld-6-exprimierenden Zellen durchgeführt (Abbildung 8 a, b).

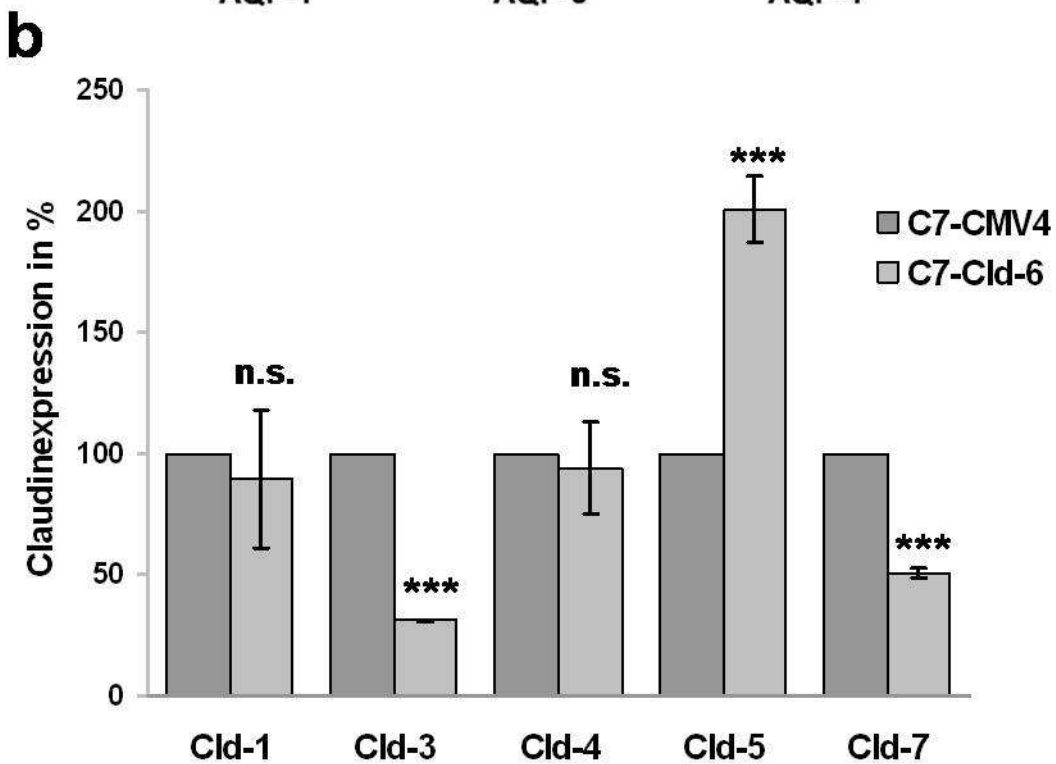
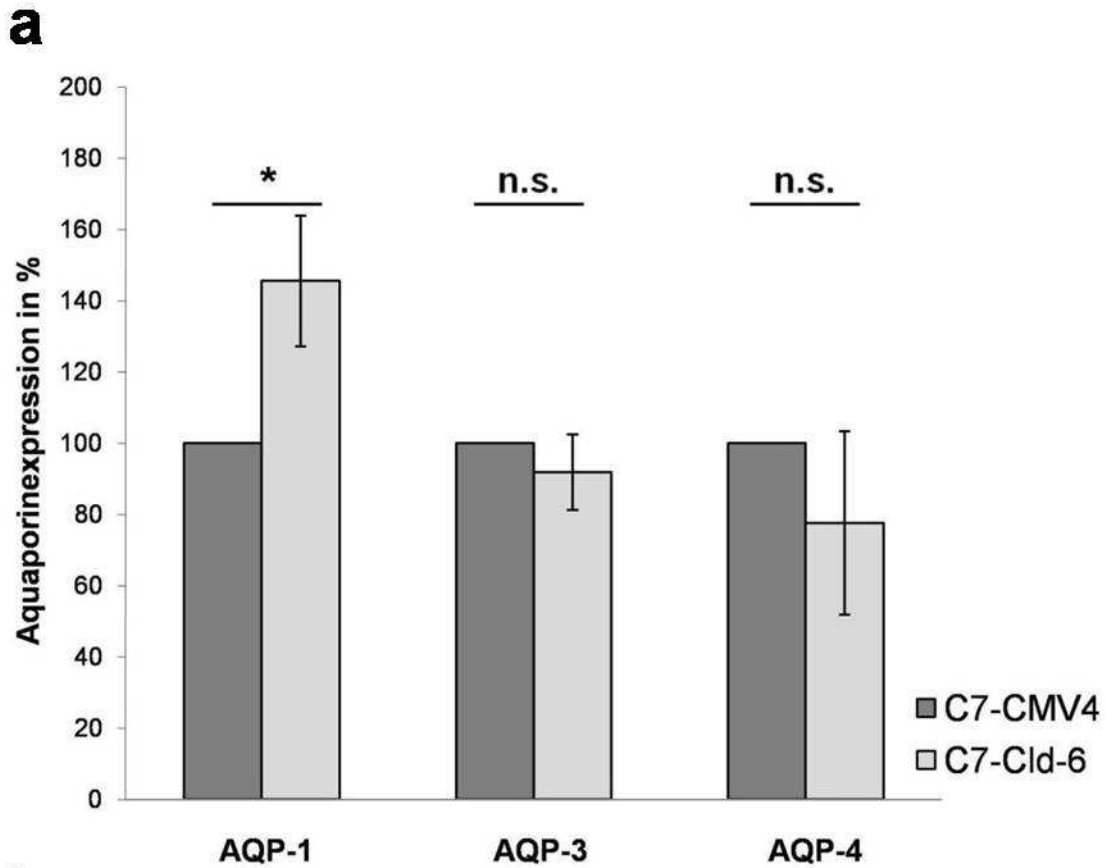


Abbildung 8: Das Verhältnis der Expression (in %) von AQP-1, AQP-3 und AQP-4 (a) und von Cld-1, Cld-3, Cld-4, Cld-5 und Cld-7 (b) bei C7-Cld-6-Zellen im Vergleich zu C7-CMV4-Zellen (100%), n = 3.

3.2.3 Subzelluläre Lokalisation von Cld-6 mittels Immunfluoreszenzfärbung

Die Western-Blot-Technik zeigt nur, dass Cld-6 in den transfizierten Zellen exprimiert wird, über die subzelluläre Lokalisation des exprimierten Proteins kann diese Technik jedoch keine Aussagen machen. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung wurde deshalb überprüft, ob bei den transfizierten Zellen Cld-6 korrekt in die TJ eingebaut wird.

Im Anschluss an die Immunfluoreszenzfärbung, die als eine Doppelfärbung mit Antikörpern gegen den TJ-Marker Occludin und Cld-6 durchgeführt wurde, erfolgte die konfokale Mikroskopie.

Die Abbildung 9 zeigt die mittels konfokaler Mikroskopie angefertigten Bildaufnahmen von C7-Cld-6-Zellen (unten) und den Vektorkontrollen C7-CMV4 (oben). Die Farbsignale grün (TJ-Marker Occludin (Occl)) und rot (Cld-6) überlagern sich zu gelb (Kokalisation beider Proteine) in den transfizierten Zellen. Dies demonstriert den korrekten Einbau von Cld-6 in die TJ. Erwartungsgemäß fehlen bei den Vektorkontrollen, wo kein Cld-6 exprimiert wird, die roten und gelben Farbsignale. Im seitlichen Bildanschnitt (Z-Scan) konnte die Kokalisation von Cld-6 und Occludin in den transfizierten Zellen ebenfalls nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden die Zellkerne bei allen Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI blau angefärbt um ein einschichtiges und intaktes Zellwachstum zu zeigen.

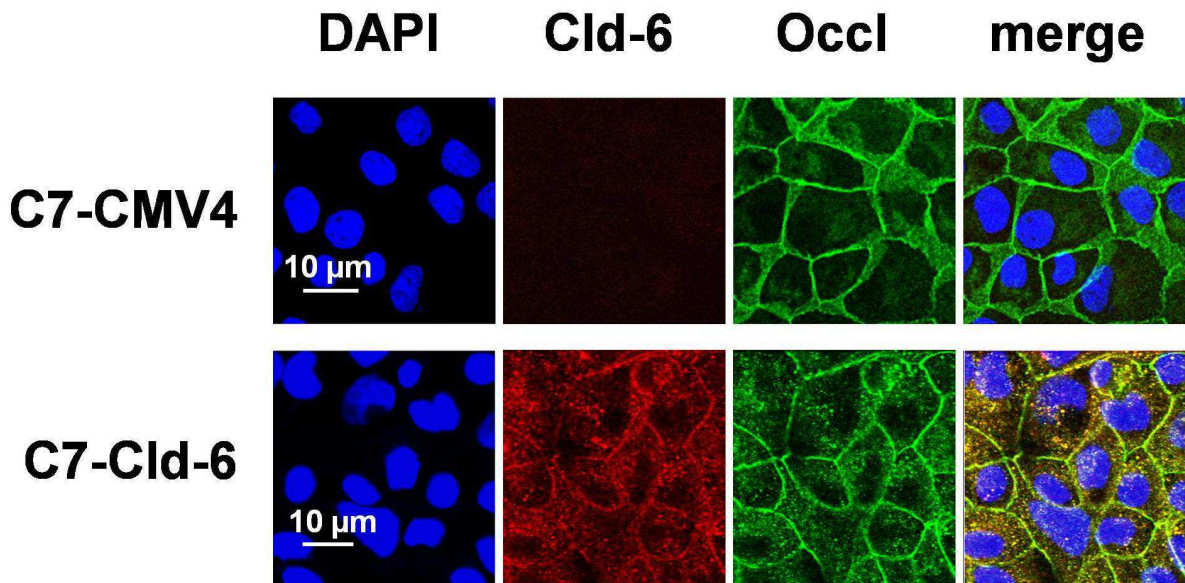


Abbildung 9: Konfokale Mikroskopie von Occludin (grün), Claudin-6 (rot) und deren Überlagerung (gelb) in C7-Cld-6- (unten) und C7-CMV4-Zellen (oben), nähere Erläuterungen im Text.

3.3 Funktionelle Untersuchungen

Um die Eigenschaften der Cld-6-Zellen weiter zu analysieren, wurden diese bezüglich ihrer Widerstände, Ionenleitfähigkeiten und transepithelialer Wassertransportrate untersucht und die Ergebnisse den Werten entsprechender Kontroll- und Wildtypzellen gegenübergestellt.

3.3.1 Transepithelialer Widerstand

Zur Klärung des Einflusses der Cld-6-Expression auf den transepithelialen Widerstand R^t wurde dieser, wie bereits oben beschrieben, während der Versuche in der Ussing-Kammer bei allen drei untersuchten Zellreihen bestimmt und aus diesen Werten jeweils der Mittelwert gebildet. Die gemessenen Widerstandswerte einzelner Zellreihen wurden miteinander verglichen und der Zusammenhang zwischen den transepithelialen Widerständen und der Wassertransportrate überprüft. In der Abbildung 10 sind die transepithelialen Widerstände von C7-WT, C7-CMV4 und C7-Cld-6 dargestellt. Die transfizierten C7-Cld-6-Zellen zeigten den niedrigsten Widerstand ($1472,6 \pm 92,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$; $n = 10$), die C7-CMV4-Zellen hatten einen etwas höheren Widerstand ($1743,5 \pm 276,9 \Omega \cdot \text{cm}^2$; $n = 8$) und die Wildtypzellen wiesen den höchsten Widerstand auf ($1939,2$

$\pm 176,1 \Omega \cdot \text{cm}^2$; $n = 9$), wobei sich keine signifikanten Unterschiede in den Widerstandswerten zwischen den untersuchten Zellreihen aufzeigten.

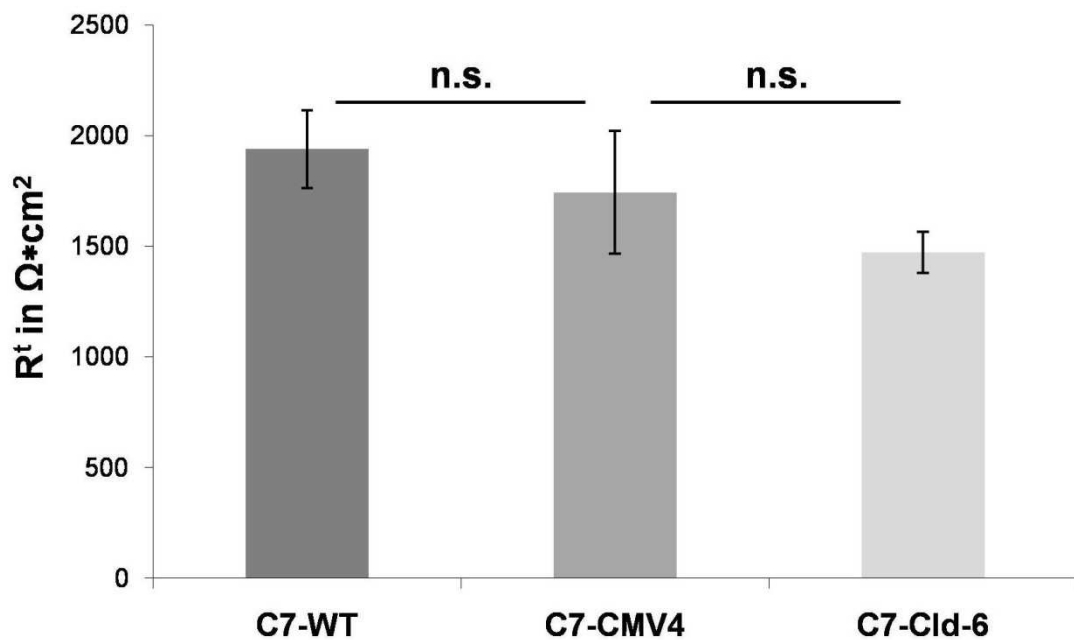


Abbildung 10: Die transepithelialen Widerstände (R^t) in $\Omega \cdot \text{cm}^2$ bei C7-WT-, C7-CMV4- und C7-Cld-6-Zellen.

3.3.2 Natrium- und Chlorid-Permeabilität

Die Messung der Natrium- (P_{Na}) und Chlorid- (P_{Cl}) Permeabilität erfolgte durch die Bestimmung der Dilutionspotentiale in der Ussing-Kammer. Aus den Dilutionspotentialen wurden die Permeabilitäten mit Hilfe der im Methodenabschnitt (siehe Kap. 2.9) beschriebenen Gleichungen ermittelt.

Wie in der Abbildung 11 gezeigt, konnte bei den transfizierten C7-Cld-6-Zellen keine signifikante Veränderung weder bei der Natrium- ($0,81 \pm 0,05 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$; $n = 10$) noch bei der Chloridleitfähigkeit ($0,64 \pm 0,06 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$; $n = 10$) im Vergleich zu C7-CMV4-Kontrollzellen ($P_{\text{Na}} = 0,88 \pm 0,18 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$; $n = 8$; $P_{\text{Cl}} = 0,63 \pm 0,13 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$; $n = 8$) festgestellt werden. Im Vergleich von C7-CMV4-Kontrollzellen mit den C7-WT ($P_{\text{Na}} = 0,62 \pm 0,06 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$; $n = 9$; $P_{\text{Cl}} = 0,53 \pm 0,06 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$; $n = 9$) ließen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der Leitfähigkeit feststellen.

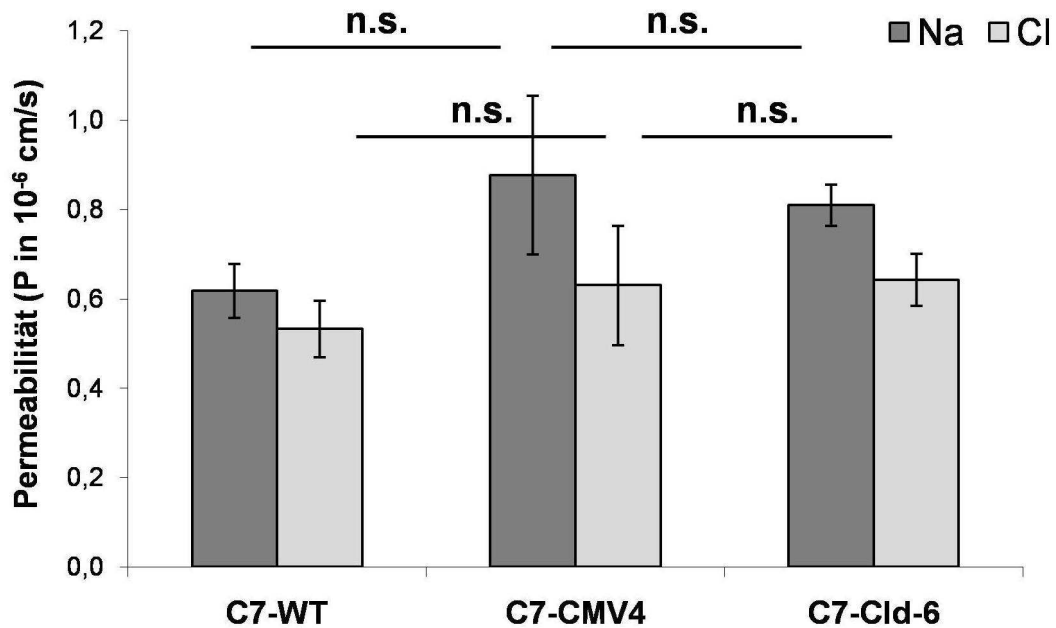


Abbildung 11: Die Natrium- (P_{Na}) und Chlorid- (P_{Cl}) Permeabilitäten in 10^{-6} cm/s bei C7-WT-, C7-CMV4- und C7-Cld-6-Zellen.

Setzt man P_{Na} ins Verhältnis zu P_{Cl} erhält man die Permeabilitäts-Ratio (P_{Na}/P_{Cl}). Ist diese Ratio größer als 1, ist die parazelluläre Ionenpermeabilität kationenselektiv. In der Abbildung 12 ist die Permeabilitäts-Ratio (P_{Na}/P_{Cl}) bei den untersuchten Zellreihen dargestellt. Bei allen drei Zellreihen konnte eine geringe Kationen-Präferenz gefunden werden, wobei signifikante Unterschiede nur zwischen C7-CMV4-Zellen ($1,4 \pm 0,09$; $n = 8$) und C7-WT-Zellen ($1,2 \pm 0,05$; $n = 9$) festgestellt werden konnten. Zwischen den C7-Cld-6-Zellen ($1,3 \pm 0,09$; $n = 10$) und C7-CMV4-Zellen gab es keine signifikanten Unterschiede.

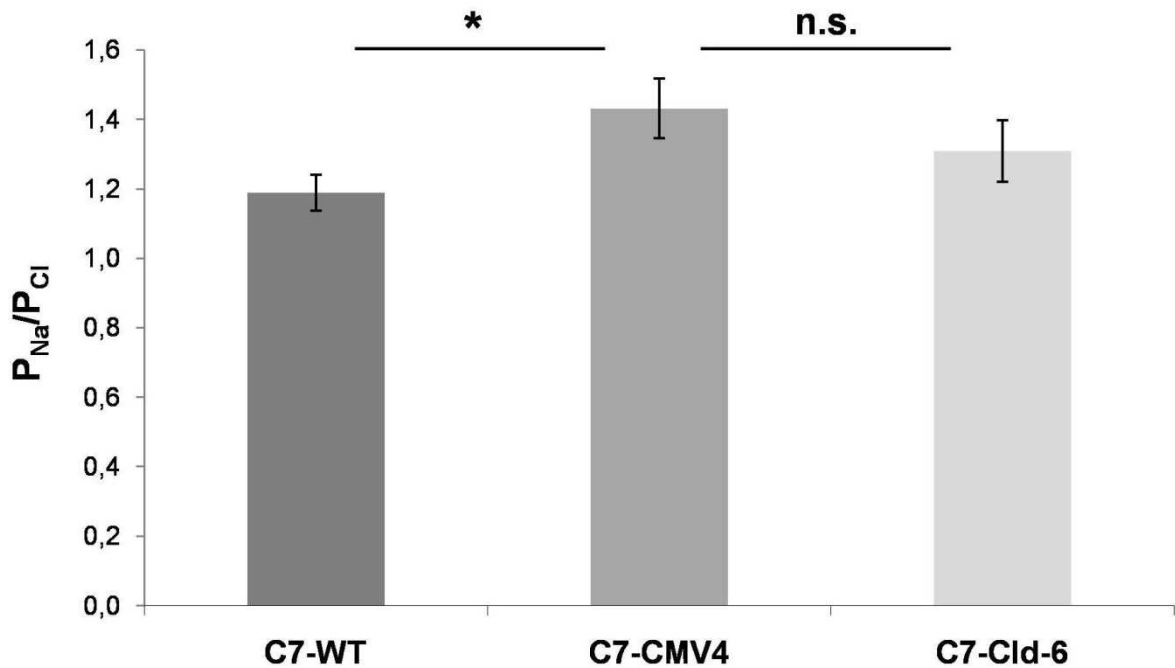


Abbildung 12: Permeabilitätsratio (P_{Na}/P_{Cl}) bei C7-WT-, C7-CMV4- und C7-Cld-6-Zellen.

3.4 Transepithelialer Wassertransport

Der transepithelialer Wassertransport wurde mit Hilfe der modifizierten Ussing-Kammer gemessen. Dies erfolgte für die untersuchten Zellreihen (C7-WT, C7-CMV4 und C7-Cld-6) jeweils unter drei verschiedenen Gradienten (Tabelle 1). Durch diese Gradienten wurde ein sekretorischer Wasserfluss von basal nach apikal induziert. Angegeben sind im Folgenden die Absolutwerte des Wasserflusses.

Eine alle Wassertransportversuche umfassende Zusammenstellung der Ergebnisse liefert die Tabelle 2, eine ausführliche Erläuterung dieser Daten findet in den folgenden Kapiteln statt.

	NaCl (apikal)	NaCl (basolateral)	Mannitol (apikal)	Mannitol (basolateral)
Mannitolgradient	145	145	100	0
Natriumgradient	65	145	160	0
Mannitol- und Natriumgradient	65	145	260	0

Tabelle 1: Gradienten bei Wasserflussversuchen, die Konzentration von NaCl und Mannitol ist in mMol/l angegeben.

Zelltypen	C7-WT	C7-CMV4	C7-Cld-6
Mannitolgradient	8,1 ± 1,3 n = 7	12,9 ± 0,8 n = 7	17,5 ± 0,7 n = 9
Natriumgradient	0,8 ± 0,4 n = 6	1,3 ± 0,3 n = 7	2,2 ± 0,3 n = 8
Mannitol- und Natriumgradient	6,2 ± 0,4 n = 9	8,3 ± 1,1 n = 7	13,3 ± 1,6 n = 8

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse der Wassertransportversuche. Der Wasserflux ist angegeben in $\mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, n entspricht der Anzahl der Messungen.

3.4.1 Mannitolgradient

Bei diesen Versuchen wurde der Wasserflux über das Epithel durch einen osmotischen Gradienten, der durch die Zugabe von Mannitol erreicht wurde, induziert. Bei identischen Lösungen bezüglich der Ionenkonzentrationen beidseits des Epithels und bei fehlendem elektrischen Gradienten bedingt durch die Spannungsklemme war es möglich, ausschließlich den Einfluss des osmotischen Gradienten auf den Wasserflux zu untersuchen. Der transepitheliale osmotische Gradient wurde mit 100 mMol/l Mannitol an der apikalen Membranseite des Epithels angelegt. Mannitol ist eine Substanz, für die es keine Transporter in der Membran gibt und die nur sehr geringfügig parazellulär transportiert werden kann (Amasheh et al. 2002), so dass der angelegte osmotische Gradient aufrecht erhalten bleibt.

Wie die Abbildung 13 zeigt, ist der transepitheliale Wasserflux, angegeben in $\mu\text{l}/\text{h}/\text{cm}^2$, hochsignifikant höher in C7-Cld-6-Zellen als in C7-CMV4-Zellen. Für C7-CMV4 zeigte sich im Vergleich zu C7-WT ebenfalls ein signifikant erhöhter Wasserflux.

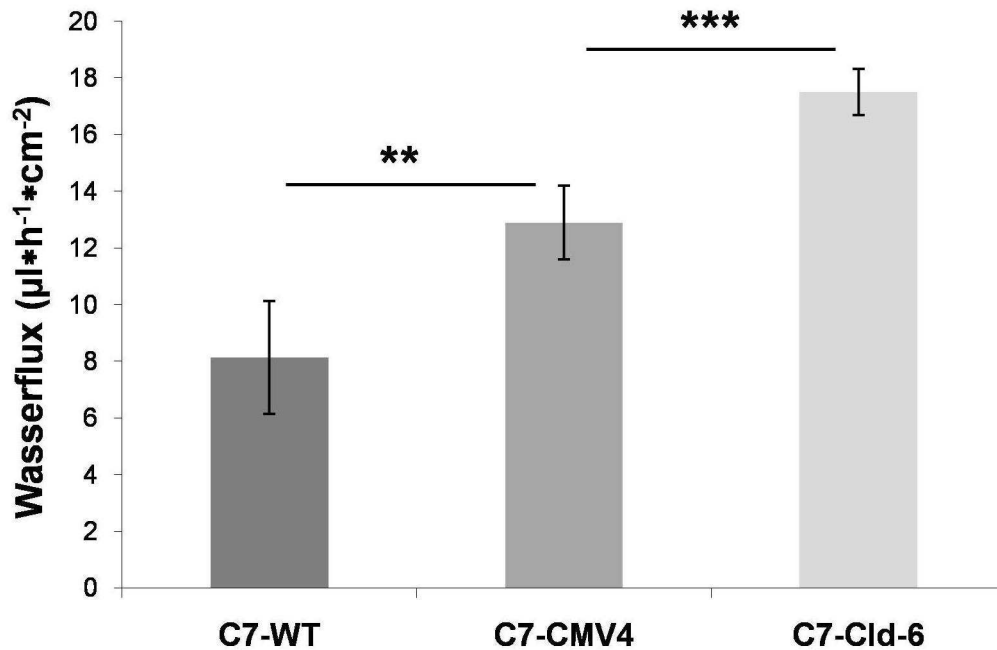


Abbildung 13: Osmotisch induzierter Wasserflux in $\mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ bei C7-WT-, C7-CMV4- und C7-Cld-6-Zellen (Mannitolgradient 100 mMol/l).

3.4.2 Natrium-Chlorid-Gradient

Für die Versuche mit Natrium-Chlorid-Gradienten wurde auf der apikalen Seite die NaCl-Konzentration um 80 mMol/l verringert, so dass die Natrium-Differenz apikal zu basolateral 80 mMol/l betrug. Die osmotische Differenz wurde anschließend mit 160 mMol/l Mannitol ausgeglichen.

Natrium kann sich entlang des Konzentrationsgradienten nur parazellulär bewegen. Transzellulär ist in den MDCK-Zellen diese Bewegung nur in einer Richtung, nämlich von apikal nach basolateral, und nicht in die umgekehrte Richtung möglich. Mit dieser Versuchsanordnung wurde damit ausschließlich der Effekt der parazellulären Natriumbewegung auf den transepithelialen Wasserflux untersucht. Die mögliche Beeinflussung der TJ-Wasserpermeabilität von der TJ-Natriumpermeabilität wird somit ebenfalls analysiert.

Abbildung 14 zeigt den Volumenflux in $\mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ bei einem Natriumgradienten von basolateral nach apikal. Der transepitheliale Wasserflux war signifikant höher in C7-Cld-6-Zellen als in C7-CMV4-Zellen. Der bei den C7-WT-Zellen im Vergleich zu C7-CMV4 erniedrigte Wasserflux erwies sich als statistisch nicht signifikant.

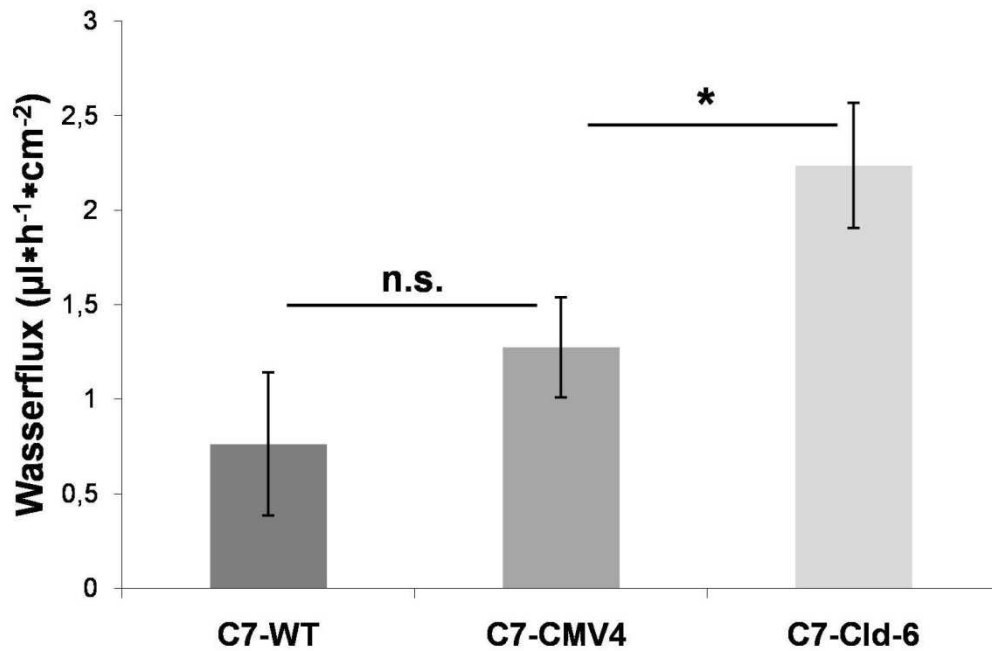


Abbildung 14: Ionen-induzierter Wasserfluss in $\mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ bei C7-WT-, C7-CMV4- und C7-Cld-6-Zellen (NaCl-Gradient 80 mMol/l).

3.4.3 Natrium-Chlorid- und Mannitolgradient

Der Lösung für die Versuche mit Mannitol- und Natrium-Chlorid-Gradienten wurden auf der Seite der niedrigen Natriumkonzentration (apikal) zusätzlich zu den 160 mMol Mannitol 100 mMol Mannitol zur Erzeugung des osmotischen Gradienten beigefügt. Damit sollte untersucht werden, ob der zusätzlich angelegte osmotische Gradient zur Erhöhung des Ionen-gekoppelten Wassertransportes beitragen würde.

Die Abbildung 15 zeigt einen Volumenfluss in $\mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, wenn ein osmotischer Gradient zusätzlich zum Natriumgradienten auf der apikalen Seite appliziert wurde. Der transepithelialer Wasserfluss war signifikant höher in C7-Cld-6-Zellen als in C7-CMV4-Zellen. Für C7-WT-Zellen und C7-CMV4-Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Wasserfluss.

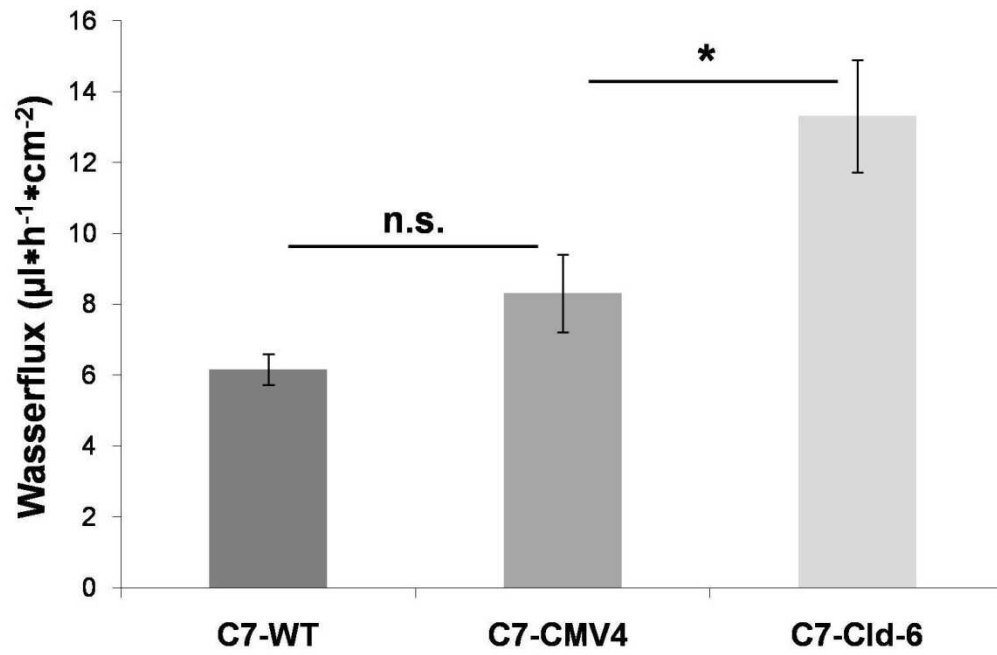


Abbildung 15: Ionen- und osmotisch induzierter Wasserflux in $\mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ bei C7-WT-, C7-CMV4- und C7-Cld-6-Zellen (NaCl-Gradient 80 mMol/l, Mannitolgradient 100 mMol/l).

4. Diskussion

Im letzten Jahrzehnt sind viele neue Details über die molekulare Struktur und Funktion der TJ veröffentlicht worden. Die Fragen, die sich mit dem transepithelialen Wassertransport beschäftigen, bleiben aber immer noch unbeantwortet.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Frage zu klären, ob das Tight Junction Protein Claudin-6 einen Einfluss auf den transepithelialen Wasserfluss ausübt und ob es, ähnlich dem Cld-2 (Rosenthal et al. 2010), eine Pore für Wasser und/oder Ionen ausbildet. Dazu wurde eine Nierenzelllinie mit humaner Cld-6-cDNA transfiziert. Der Vergleich des Wasserflusses an den mit Cld-6 transfizierten Zellen mit den Vektorkontrollen ergab, dass die Cld-6 transfizierten Zellen mehr Wasser transportieren. Da die Transfektion mit Cld-6 einen Einfluss auf die Expression endogener TJ-Proteine und der Aquaporine ausübt, kann der erhöhte Wassertransport in den transfizierten Zellen nicht eindeutig Cld-6 zugeordnet werden. Die Vermutung, dass Cld-6 ionenporenähnliche Eigenschaften aufweist, konnte nicht bestätigt werden.

4.1 Cld-Überexpressionsstudien und ihre Limitationen

Die stabile Transfektion ist eine Methode um die Funktionen verschiedener Claudine zu untersuchen. Dazu werden die zu untersuchenden Claudine in Zellen transfiziert, die diese Claudine endogen nicht oder nur in sehr geringem Maße exprimieren. Die MDCK-Zellkulturen haben sich dabei als geeignet erwiesen (Angelow et al. 2007). Nebenbei entfallen die interindividuellen Zellunterschiede, da die Zellen unter gleich bleibenden Bedingungen kultiviert werden und dieselbe Zelllinie verwendet werden kann. So bleiben die Ergebnisse jederzeit reproduzierbar. Die Expressionsstudien sind allerdings in dem Punkt limitiert, als die zu transfizierende Zellen endogen, je nach Zellart, verschiedene Claudine exprimieren. Ein exogen zugeführtes Claudin könnte somit in unterschiedlichen Wirtszellen die Expression der endogenen Claudine verändern und damit zu veränderten elektrophysiologischen Eigenschaften führen, die nicht allein dem transfizierten Claudin zugeschrieben werden können (Angelow et al. 2007). Gegenwärtig ist es nicht bekannt, wie sich die überexprimierten Claudine in den TJ-Verband integrieren. Ob und in welchem Maße sie die endogene Claudine und andere TJ-Proteine verändern oder diese sogar ersetzen, muss für jedes transfizierte Protein und jede Zelllinie bzw. jeden Zellklon getestet werden. Es wurde berichtet, dass die

Expression exogener Claudine zu einer Veränderung der Expression endogener Claudine führen kann. So konnte in MDCK II-Zellen gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von Cld-8 zu einer verminderten Expression von Cld-2 führt (Yu et al. 2003). Die Eigenschaften der transfizierten Zellen kommen somit erst durch das Zusammenspiel der endogenen und der exogen zugeführten Claudine zu Stande. Für eine fehlerfreie Deutung der Ergebnisse der Überexpressionsstudien ist deshalb die Betrachtung auch anderer TJ-Proteine unbedingt notwendig.

Zu diesem Zweck wurden bei dieser Arbeit die mit Cld-6 stabil transfizierten C7-Cld-6-Zellen, die mit leerem Vektor transfizierten C7-CMV4-Zellen und die nativen C7-WT-Zellen mit Western-Blot-Technik auf die Expression relevanter TJ-Proteine untersucht. Entsprechend den Vorpublikationen (Reyes et al. 2002, Kiuchi-Saishin et al. 2002, Turksen et al. 2004) konnte Cld-6 nur bei transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass die Transfektion erfolgreich verlaufen war und die MDCK-C7-Zellen endogen kein Cld-6 exprimieren.

Von den untersuchten Claudinen ist einzig Cld-1 in allen Zellreihen gleichstark nachweisbar, die Expression anderer Claudine scheint dagegen durch die Transfektion verändert worden zu sein. WT-Zellen und Vektorkontrollen unterscheiden sich bezüglich der Expressionsstärke von Cld-3, -4 und Cld-5. Das zeigt, dass allein die Transfektion oder das Einbringen eines leeren Vektors einen Einfluss auf die Expression endogener Proteine haben kann. Daher werden transfizierte Zellen stets mit den entsprechenden, zur gleichen Zeit hergestellten Vektorkontrollen verglichen. Ein Vergleich zwischen C7-CMV4 und C7-Cld-6 zeigt, dass durch die Transfektion mit Cld-6 die Expression von Cld-3 und -7 herunterreguliert wird, die von Cld-5 dagegen erhöht ist. Diese Ergebnisse sind mit den bereits publizierten Daten vereinbar. So beschreibt Turksen et al. bei den Cld-6 überexprimierenden transgenen Mäusen eine Downregulation von Cld-3, Cld-4 und Cld-7; die Cld-5-Expression wurde in dieser Arbeit nicht untersucht (Turksen et al. 2002). Weiterhin haben Kawedia et al. gezeigt, dass die Expression der Aquaporine und der Claudine sich gegenseitig beeinflussen können (Kawedia et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Cld-6-Transfektion die Expression von AQP-1 erhöht, während die Expression von AQP-3 und AQP-4 nicht verändert wurde. Somit zeigt sich, dass auch hier eine wechselseitige Beeinflussung zwischen der Expression von TJ-Proteinen und Aquaporinen vorliegt. In ähnlichen Transfektionsstudien an MDCK-C7-Zellen mit Cld-10 (Günzel et al. 2009) oder Cld-2 (Rosenthal et al. 2010) wurde dagegen weder eine veränderte Expression der Claudine

noch der Aquaporine beobachtet. Diese Unterschiede zu den Cld-2- und Cld-10-transfizierten Zellen können ein Hinweis darauf sein, dass Cld-6 einen Einfluss auf die Differenzierung der Zellen ausübt.

4.2 Messung des transepithelialen Wasserfluges

Die Ussing-Kammer erlaubt die Messung der transepithelialen Transportvorgänge in lebenden Epithelgeweben. Die bei dieser Arbeit verwendete Kammer zur Messung des Wassertransports enthielt im Vergleich zur 1951 erstbeschriebenen Ussing-Kammer (Ussing & Zerahn 1951) einige Modifikationen. Die erfolgreiche Anwendung dieser Kammer zur Erfassung des transepithelialen Wassertransportes wurde bereits publiziert (Rosenthal et al. 2010). Dieser Versuchsaufbau ermöglicht die Messung des gesamten transepithelialen Wasserfluges, eine isolierte Messung der einzelnen Transportwege, transzellulär oder parazellulär, ist hiermit nicht möglich. Auch in anderen Ansätzen zur Messung des transepithelialen Wassertransports kann experimentell nicht eindeutig zwischen beiden Transportrouten unterschieden werden. Daher ist der Mechanismus des Wassertransports durch lecke Epithelien und die Route, durch die Wasser über das Epithel transportiert wird, bzw. der Anteil der einzelnen Transportwege bis heute nicht vollständig geklärt. Der transzelluläre Wassertransport über die Aquaporine ist detailliert beschrieben und anerkannt, umstritten dagegen ist der gekoppelte transzelluläre Wassertransport, der über Co-Transporter vom Symportertyp (Zeuthen 2010) vermittelt wird (Schultz 2001).

Mit der Entdeckung einer parazellulären Ionenleitfähigkeit schien auch der parazelluläre Wassertransport wahrscheinlich, aber das Vorhandensein eines parazellulären Wassertransportes in Epithelien wurde lange kontrovers diskutiert. Heute ist die Existenz eines parazellulären Wassertransportes allgemein akzeptiert (Fischbarg et al. 2006, Fischbarg 2010, Rosenthal et al. 2010, Shachar-Hill et al. 2002). Die unterschiedlichen Angaben über den Anteil der einzelnen Transportwege am gesamten transepithelialen Wassertransport beruhen auf der Schwierigkeit der isolierten Messung des parazellulären bzw. des transzellulären Wassertransports. Die ideale Lösung, jeweils einen der beiden möglichen Transportwege zu betrachten, wäre jeweils die Blockierung des anderen Weges. Allerdings ist es bis heute nicht in ausreichendem Maße gelungen. Alternativ könnte man, um den parazellulären Weg zu untersuchen, ein dem Wassermolekül in der Form und Größe ähnliches Molekül benutzen, für den es

transzellulär keine Transporter gibt und das entsprechend nur parazellulär transportiert werden kann. Ein solches Molekül konnte aber bis heute nicht konstruiert werden (Kawedia et al. 2007).

4.2.1 Blockierung des transzellulären Weges

Die Blockierung des transzellulären Weges heißt in erster Linie die Blockierung der Aquaporine. In MDCK-C7-Zellen sind apikal AQP-1 und basolateral AQP-3 und -4 lokalisiert (Matsuzaki et al. 2001). Die wichtigste zur Blockierung der Aquaporine in der Literatur beschriebene Substanz ist das Quecksilber. Allerdings lassen sich mit Quecksilber nicht alle Isoformen der Aquaporine im gleichen Maße blockieren und die zur Blockierung notwendige Dosis ist aufgrund von Toxizität nicht für die hier verwendeten Zellen geeignet (Rosenthal et al. 2010). Zudem ist nicht bekannt, ob Quecksilber möglicherweise einen Einfluss auf den parazellulären Wassertransport ausüben könnte. Desweiteren verbleiben auch im Falle der erfolgreichen Blockade der Aquaporine Möglichkeiten der transzellulären Wasserpassage: Erstens direkt durch die Lipiddoppelschicht der Membran und zweitens mit Hilfe der zahlreichen Zellmembran-Transportproteine (Hamann et al. 2010, Loo et al. 1996 und 2002, Zeuthen et al. 1997). Eine Berücksichtigung all dieser Faktoren dürfte außerordentlich schwer fallen. Einige Autoren vertreten sogar eine fast schon revolutionäre Meinung, dass die Aquaporine möglicherweise eher eine regulierende Stellung im transepithelialen Wassertransport einnehmen, im Transportgeschehen an sich sollen sie eine eher untergeordnete Rolle spielen (Fischbarg 2010). Erst nach Blockierung aller transzellulären Wassertransportrouten könnte man den Anteil des parazellulären Wassertransports berechnen. Der umgekehrte Ansatz, die Blockierung des parazellulären Weges, wäre eine weitere Möglichkeit, den Anteil der einzelnen Transportwege zu beschreiben. Allerdings sind bisher keine Substanzen gefunden worden, die die TJ blockieren.

Aus diesen Gründen wurde bei dieser Arbeit auf die getrennte Betrachtung von trans- und parazellulären Wassertransport verzichtet und ein Ansatz zur Messung des Wasserflusses herangezogen, bei dem der gesamte transepitheliale Wasserfluss gemessen wird. Ziel war es zu überprüfen, ob eine Modifikation der TJ durch den Einbau von Cld-6 den transepithelialen Wassertransport verändert. Da die Expression von Cld-6 einen Einfluss auf die Expression anderer Claudine und auch von AQP-1 ausübt, können die gemessenen Veränderungen im Wassertransport nicht eindeutig auf

Cld-6 zurückgeführt werden. Darin unterscheidet sich diese Überexpressionsstudie von andern Studien, die an dieser Zelllinie durchgeführt wurden. So wurden in MDCK-C7-Zellen Claudin-2 (Amasheh et al. 2002, Rosenthal et al. 2010) und Cld-10a und Cld-10b (Günzel et al. 2009, Rosenthal et al. 2010) transfiziert. Dabei wurde weder die Expression anderer TJ-Komponenten noch der Aquaporinen verändert, so dass in diesen Studien die gemessenen Veränderungen eindeutig den transfizierten Claudinen zugeschrieben werden konnten.

4.3 Bedeutung von Claudin-6

In der ersten Zeit der molekularen TJ-Forschung gab es nur wenige Publikationen, die sich mit Cld-6 befassten. Die Anzahl hat sich aber in den letzten Jahren deutlich vergrößert. Abgesehen von Publikationen, die sich mit der Bedeutung von Cld-6 während der Zellentwicklung und seinen Einfluss auf die Zellfunktion beschäftigen, tauchen in letzter Zeit vermehrt Publikationen mit klinischem Hintergrund auf, in denen Cld-6 als möglicher Marker bei unterschiedlichen Prozessen genannt wird. Unter anderem wird Cld-6 als ein globaler Marker des Endoderms angesehen (Anderson et al. 2008).

4.3.1 Cld-6 und der transepitheliale Wassertransport

Erste bedeutende Anhaltspunkte, dass Claudine eine wichtige Rolle im Wasserhaushalt der Zelle spielen, lieferten die Arbeiten, die in erster Linie an Tiermodellen aufbauten. Die Cld-1-defizienten Mäuse waren genauso wie die Cld-6 überexprimierenden Mäuse aufgrund der Störung der epidermalen Hautbarriere nicht lebensfähig (Furuse et al. 2002, Turksen et al. 2002). Die vorliegende Arbeit zeigt ebenfalls, dass Cld-6 eine Rolle im Wasserhaushalt der Zellen zukommen könnte, da die transfizierten Zellen sowohl unter einem osmotischen Gradienten als auch unter einem ionischen Gradienten einen signifikant höheren Wassertransport im Vergleich zu Kontrollzellen aufwiesen. Zwar wiesen auch die mit leerem Vektor transfizierten CMV4-Zellen bei Versuchen mit einem osmotischen Gradienten im Vergleich zur WT-Zellen einen höheren Wasserfluss auf, der Unterschied war jedoch geringer als zwischen Vektorkontrollen und Cld-6-transfizierten Zellen. Daher werden im Weiteren die Vektorkontrollen mit den Cld-6-Zellen verglichen.

Entgegen den Erwartungen wurde kein additiver Effekt beim Wassertransport festgestellt, der durch eine Kombination von NaCl- und Mannitolgradienten induziert wurde. Die Transportrate lag sogar durchgehend unter den im Versuchen mit Mannitolgradienten gemessenen Werten. Ursache dafür könnte sein, dass die Wassertransportversuche zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfanden. Eine Änderung der Versuchsbedingungen, wie z.B. der Einsatz von unterschiedlichen Kulturmedien oder Unterschiede in den Zellkulturfiltern, kann nicht ausgeschlossen werden und könnte für den fehlenden Anstieg der Wassertransportrate ursächlich sein.

Da in dieser Arbeit der gesamte transepitheliale Wassertransport gemessen wird und zudem eine erhöhte Expression von AQP-1 in den C7-Cld-6-Zellen festgestellt wurde, kann nicht eindeutig geklärt werden, ob an der Erhöhung des Wassertransportes auch ein erhöhter parazellulärer Transport beteiligt ist oder diese nur durch einen verstärkten transzellulären Transport über AQP-1 beruht. Zudem sind in den Cld-6-transfizierten Zellen Cld-3 und Cld-7 vermindert exprimiert, so dass eine veränderte Zusammensetzung der TJ und nicht allein Cld-6 eine Änderung des parazellulären Wasserflusses bedingen könnten.

4.3.2 Cld-6 und Ionenpermeabilität

Es ist bekannt, dass einige Claudine wie Cld-2, Cld-10a und Cld-10b ionenselektive, parazelluläre Poren ausbilden (Amasheh et al. 2002, Günzel et al. 2009, Rosenthal et al. 2010, Van Itallie et al. 2006b, Yu et al. 2009). Die Cld-2-Poren transportieren im Gegensatz zu den Cld-10b-Poren neben Ionen auch Wasser.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen hingegen vermuten, dass Cld-6 weder eine solche ionenselektive Pore ausbildet noch dass es eine abdichtende Funktion gegen Ionen ausübt. Die mit Cld-6 transfizierten Zellen wiesen keine veränderte Ionenpermeabilität auf, die Permeabilitäts-Ratio P_{Na}/P_{Cl} wies keine Unterschiede zu den Kontrollzellen auf. Eine Beteiligung von Cld-6 an der Ausbildung parazellulärer Poren oder eine abdichtende Funktion im Zusammenspiel mit anderen Claudinen ist aber nicht auszuschließen. So konnte bei Transfektion von Cld-6 in niederohmige MDCK II-Zellen ein Widerstandsanstieg und eine verringerte Kationen- und Anionenpermeabilität gefunden werden (Sas et al. 2008). Auch in der Niere dichtet Cld-6 die TJ gegen parazelluläre Chloridbewegungen ab (Abuazza et al. 2006, Baum 2008). Bei der hier gezeigten Transfektion in hochohmige MDCK-C7-Zellen übt Cld-6 keinen Effekt auf die

Ionenpermeabilitäten aus. Dass die Funktion einzelner Claudine von der molekularen Zusammensetzung der TJ und der Expression der endogenen TJ-Proteine abhängt, konnte auch an anderen Beispielen gezeigt werden. So bewirkte eine Transfektion von Cld-10b in hochohmige MDCK-C7-Zellen eine Abnahme des transepithelialen Widerstandes, eine Zunahme der Kationenpermeabilität und eine veränderte Selektivität für Kationen (Günzel et al. 2009), während diese Effekte bei einer Transfektion in niederohmige MDCK II-Zellen nicht auftreten (Van Itallie et al. 2006b). Die vorliegende Studie zeigt, dass Cld-6 bei Transfektion in C7-Zellen keinen Effekt auf die Ionenpermeabilitäten hat. Möglich wäre, dass Cld-6 eine wasser- aber nicht ionentransportierende Pore ausbildet.

4.3.3 Regulatorische Funktion von Cld-6

Die Tatsache, dass Cld-6 nur im embryonalen Gewebe exprimiert wird und im adultem Gewebe praktisch nicht nachweisbar ist (Reyes et al. 2002, Kiuchi-Saishin et al. 2002, Turksen et al. 2004) lassen es möglich erscheinen, dass es in die regulatorischen Prozesse im Rahmen der Zellentwicklung involviert ist und die Differenzierung beeinflusst. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Transfektion mit Cld-6 die Expression von AQP-1 steigert und die Expression von Cld-3 und Cld-7 herunterreguliert. Eine verminderte Expression anderer Claudine wurde auch in der Epidermis der Cld-6-überexprimierenden Mäusen gefunden und dort für den transepidermalen Wasserverlust mitverantwortlich gemacht (Turksen et al. 2002).

Die Bedeutung, die Cld-6 in der Zellentwicklung einnimmt, ist am besten am Beispiel der Niere untersucht (Zhao et al. 2008, Abuazza et al. 2006), wo in embryonalen Zellen sehr viel höhere Cld-6-Spiegel als in adulten Zellen detektiert wurden. Die glomeruläre Filtrationsrate beider Nieren beträgt etwa 180 Liter pro Tag (Klinke et al. 2010). Die Niere ist somit das Organ mit der höchsten Transportrate. Die Tatsache, dass Cld-6 eine große Rolle in der Entwicklung der Nieren spielt, lässt vermuten, dass Cld-6 auch in der Ausbildung der Wassertransporteigenschaften der Zellen involviert ist. Ob Cld-6 direkt, durch Ausbildung einer Wasserpore, oder indirekt, durch Veränderung der Expression von im Wassertransport involvierten Proteinen, den Wassertransport beeinflusst, kann aufgrund der vorliegenden Studie nicht geklärt werden.

4.3.4 Cld-6 in der klinischen Forschung

Weitere interessante Ansatzpunkte für die Erforschung der Funktion von Cld-6 liefern zwei Arbeiten, die sich mit dem Thema Hepatitis befassen. In diesen Arbeiten wird die Bedeutung von Cld-6 als Ko-Faktor für den Eintritt von Hepatitis-C-Virus in Targetzellen gezeigt (Zheng et al. 2007, Meertens et al. 2008). Weiterhin wurde erwiesen, dass Cld-6 in der Leber und in peripheren Blutzellen exprimiert wird, den Orten der Replikation von Hepatitis-C-Viren (Zheng et al. 2007). Auch in der Adipogenese und Fetteinlagerung soll Cld-6 eine Rolle spielen (Hong et al. 2005).

5. Zusammenfassung

In dieser Doktorarbeit wurde der Einfluss des TJ-Proteins Cld-6, das bei Überexpression in Mäusen zu einem starken transepidermalen Wasserverlust und dadurch zum Tod kurz nach der Geburt führte, auf den transepithelialen Wassertransport an MDCK-C7-Zellen untersucht. Dabei handelt es sich um eine Nierenzelllinie, die einschichtig und konfluent wächst, TJ ausbildet und ein Modell für ein dichtes Epithel darstellt. Die MDCK-C7-Zellen wurden mit Cld-6-cDNA stabil transfiziert (C7-Cld-6). Als Kontrolle benutzte man die mit identischem, aber leerem CMV4-Vektor transfizierte gleiche Zelllinie (C7-CMV4). Zusätzlich wurden die Untersuchungen an den untransfizierten MDCK-C7-Wildtypzellen (C7-WT) durchgeführt. Der Vergleich der C7-WT- mit den C7-CMV4-Zellen zeigt, dass allein die Transfektion mit dem leeren Vektor die Eigenschaften und endogene Proteinexpression der Zellen verändern kann. Daher sollte in allen Studien mit transfizierten Zellen als Kontrolle stets die aus der gleichen Ursprungskultur hergestellten Vektorkontrollen herangezogen werden. Die erfolgreiche Transfektion mit Cld-6 wurde mit der Western-Blot-Technik nachgewiesen. Die korrekte Lokalisation von Cld-6 in den TJ wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung in Kombination mit der konfokalen Mikroskopie bestätigt. Es zeigte sich eine Kolokalisation von Cld-6 und Occludin, das nur in den TJ vorkommt.

Die Expression von Cld-6 verändert die elektrophysiologischen Eigenschaften nicht, der transepitheliale Widerstand, die Permeabilitäten für Natrium und Chlorid und auch das Verhältnis Kationen- zu Anionenpermeabilität war in den Cld-6-transfizierten Zellen nicht verändert gegenüber den Leervektor-transfizierten Zellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Cld-6 keine porenbildenden Eigenschaften besitzt.

Im Gegensatz dazu ist der hier gemessene transepitheliale Wassertransport in den C7-Cld-6-Zellen höher als in den C7-CMV4-Zellen und zwar unabhängig davon, ob er durch einen osmotischen Gradienten, einen ionalen Gradienten oder der Kombination von beiden induziert wurde. Da Cld-6 die Expression anderer TJ-Proteine und auch die des AQP-1 beeinflusst, kann dieser Effekt nicht eindeutig Cld-6 als wasserleitender Komponente zugeordnet werden. Möglicherweise ist die erhöhte Expression von AQP-1 für einen erhöhten transzellulären Wasserfluss und/oder die veränderte Claudinzusammensetzung der TJ für einen erhöhten parazellulären Wasserfluss verantwortlich.

Die Tatsache, dass Cld-6, das hauptsächlich embryonal exprimiert wird, die Expression endogener Proteine beeinflusst, untermauert die These, dass Cld-6 eine bedeutende Stellung in regulatorischen Zellprozessen einnimmt.

6. Literaturverzeichnis

- Abuazza G, Becker A, Williams SS, et al. Claudins 6, 9, and 13 are developmentally expressed renal tight junction proteins. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291(6):F1132-41.
- Alexandre MD, Jeansonne BG, Renegar RH, Tatum R, Chen YH. The first extracellular domain of claudin-7 affects paracellular Cl⁻ permeability. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;357(1):87-91.
- Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, et al. Claudin-2 expression induces cationselective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci* 2002;115:4969-76.
- Anderson WJ, Zhou Q, Alcalde V, et al. Genetic targeting of the endoderm with claudin-6CreER. *Dev Dyn* 2008;237(2):504-12.
- Anderson JM, Van Itallie CM. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol* 1995;269:G467-75.
- Angelow S, Ahlstrom R, Yu AS. Biology of claudins. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;295(4):F867-76.
- Angelow S, Yu AS. Claudins and paracellular transport: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007;16(5):459-64.
- Arabzadeh A, Troy TC, Turksen K. Role of the Cldn6 cytoplasmic tail domain in membrane targeting and epidermal differentiation in vivo. *Mol Cell Biol* 2006;26(15):5876-87.
- Baum M. Developmental changes in proximal tubule NaCl transport. *Pediatr Nephrol* 2008;23:185-194.
- Briehl MM, Miesfeld RL. Isolation and characterization of transcripts induced by androgen withdrawal and apoptotic cell death in the rat ventral prostate. *Mol Endocrinol* 1991;5(10):1381-8.
- Claude P. Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J Memb Biol* 1978;39(2-3):219-32.
- Claude P, Goodenough DA. Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *J Cell Biol* 1973;58(2):390-400.
- Coyne CB, Gambling TM, Boucher RC, Carson JL, Johnson LG. Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285(5): L1166-78.
- D'Atri F, Citi S. Molecular complexity of vertebrate tight junctions (Review). *Mol Membr Biol* 2002;19(2):103-12.
- Daugherty BL, Ward C, Smith T, Ritzenthaler JD, Koval M. Regulation of heterotypic claudin compatibility. *J Biol Chem* 2007;282(41):30005-13.

- Dhawan P, Singh AB, Deane NG, et al. Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest* 2005;115(7):1765-76.
- Diamond JM. Channels in epithelial cell membranes and junctions. *Fed Proc* 1978;37(12):2639-43.
- Diamond JM, Bossert WH. Standing-gradient osmotic flow. A mechanism for coupling of water and solute transport in epithelia. *J Gen Physiol* 1967;50(8):2061-83.
- Dragsten PR, Blumenthal R, Handler JS. Membrane asymmetry in epithelia: is the tight junction a barrier to diffusion in the plasma membrane? *Nature* 1981;294(5843):718-22.
- Ebnet K, Suzuki A, Ohno S, Vestweber, D. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci* 2004;117:19-29.
- Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 1963;17:375-412.
- Fischbarg J. Fluid transport across leaky epithelia: central role of the tight junction and supporting role of aquaporins. *Physiol Rev* 2010;90(4):1271-90.
- Fischbarg J, Diecke FP, Iserovich P, Rubashkin A. The Role of the Tight Junction in Paracellular Fluid Transport across Corneal Endothelium. Electro-osmosis as a Driving Force. *J Membr Biol* 2006;210(2):117-30.
- Frömter E, Diamond J. Route of passive ion permeation in epithelia. *Nat New Biol* 1972;235(53):9-13.
- Fromm M. Transport in Membranen und Epithelien. Zusammenspiel von Transport und Barrierefunktion in Epithelien. In: Schmidt RF, Lang F. *Physiologie des Menschen*. 30. Auflage. Heidelberg, Deutschland: Springer Medizin Verlag, 2007 :44-45.
- Fujita K, Katahira J, Horiguchi Y, Sonoda N, Furuse M, Tsukita S. Clostridium perfringens enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein. *FEBS Lett* 2000;476(3):258-61.
- Furuse M. Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2(1):a002907.
- Furuse M, Tsukita S. Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol* 2006;16(4):181-8.
- Furuse M, Hata M, Furuse K, et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 2002;156(6):1099-111.
- Furuse M, Sasaki H, Tsukita S. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol* 1999;147(4):891-903.
- 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* 1998a;141(7):1539-50.

- Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* 1998b;143(2):391-401.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 1993;123:1777-88.
- González-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778(3):729-56.
- Gonzalez-Mariscal L, Chávez de Ramírez B, Cerejido M. Tight junction formation in cultured epithelial cells (MDCK). *J Membr Biol* 1985;86(2):113-25.
- Günzel D, Fromm M. Claudins and other tight junction proteins. *Comprehensive Physiology* 2012.
- Günzel D, Stuiver M, Kausalya PJ, et al. Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function. *J Cell Sci* 2009;122:1507-17.
- Hadj-Rabia S, Baala L, Vabres P, et al. Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology* 2004;127(5):1386-90.
- Hamann S, Herrera-Perez JJ, Zeuthen T, Alvarez-Leefmans FJ. Cotransport of water by the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter NKCC1 in mammalian epithelial cells. *J Physiol* 2010;588:4089-101.
- Hong YH, Hishikawa D, Miyahara H, et al. Up-regulation of the claudin-6 gene in adipogenesis. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005;69(11):2117-21.
- Hou J, Renigunta A, Konrad M, et al. Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J Clin Invest* 2008;118(2):619-28.
- Ikenouchi J, Sasaki H, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S. Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. *Mol Biol Cell* 2008;19(11):4687-93.
- 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(6):939-45.
- Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Ozaki H, Kita T, Tsukita S. Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J Cell Biol* 2001;154(3):491-7.
- Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 1999;147(6):1351-63.
- Kachar B, Reese TS. Evidence for the lipidic nature of tight junction strands. *Nature* 1982;296(5856):464-6.

Katahira J, Sugiyama H, Inoue N, Horiguchi Y, Matsuda M, Sugimoto N. Clostridium perfringens enterotoxin utilizes two structurally related membrane proteins as functional receptors in vivo. *J Biol Chem* 1997;272(42):26652-8.

Kausalya PJ, Amasheh S, Günzel D, et al. Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg²⁺ transport function of Claudin-16. *J Clin Invest* 2006;116(4):878-91.

Kawedia JD, Nieman ML, Boivin GP, et al. Interaction between transcellular and paracellular water transport pathways through Aquaporin 5 and the tight junction complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(9):3621-6.

King LS, Kozono D, Agre P. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5(9):687-98.

Kirschner N, Houdek P, Fromm M, Moll I, Brandner JM. Tight junctions form a barrier in human epidermis. *Eur J Cell Biol* 2010;89(11):839-42.

Kiuchi-Saishin Y, Gotoh S, Furuse M, Takasuga A, Tano Y, Tsukita S. Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(4):875-86.

Klinke R, Pape HC, Kurz A, Silbernagl S. *Physiologie*. 6. Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 2010.

Kovbasnjuk O, Leader JP, Weinstein AM, Spring KR. Water does not flow across the tight junctions of MDCK cell epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(11):6526-30.

Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and functions of claudins. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778(3):631-45.

Krug SM, Amasheh S, Richter JF, et al. Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol Biol Cell* 2009;20(16):3713-24.

Loo DD, Wright EM, Zeuthen T. Water pumps. *J Physiol* 2002;542:53-60.

Loo DD, Zeuthen T, Chandy G, Wright EM. Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(23):13367-70.

Madin SH, Darby NB Jr. Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1958;98(3):574-6.

Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, et al. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 1998;142(1):117-27.

Matsuzaki T, Suzuki T, Takata K. Hypertonicity-induced expression of aquaporin 3 in MDCK cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;281(1):C55-63.

Matter K, Balda MS. Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4(3):225-36.

- McCarthy KM, Skare IB, Stankewich MC, et al. Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci* 1996;109:2287-98.
- Meertens L, Bertaux C, Cukierman L, et al. The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *J Virol*. 2008;82(7):3555-60.
- Meza I, Ibarra G, Sabanero M, Martínez-Palomo A, Cerejido M. Occluding junctions and cytoskeletal components in a cultured transporting epithelium. *J Cell Biol* 1980;87:746-54.
- Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(2):511-6.
- Moroi S, Saitou M, Fujimoto K, et al. Occludin is concentrated at tight junctions of mouse/rat but not human/guinea pig Sertoli cells in testes. *Am J Physiol* 1998;274:C1708-17.
- Nielsen S, Smith BL, Christensen EI, Agre P. Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(15):7275-9.
- Oberleithner H. Grundlagen der Zellphysiologie. In: Schmidt RF, Lang F. *Physiologie des Menschen*. 30. Auflage. Heidelberg, Deutschland: Springer Medizin Verlag, 2007 :4-26.
- Peacock RE, Keen TJ, Inglehearn CF. Analysis of a human gene homologous to rat ventral prostate.1 protein. *Genomics* 1997;46(3):443-9.
- Pinto da Silva P, Kachar B. On tight-junction structure. *Cell* 1982;28(3):441-50.
- Powell DW. Barrier function of epithelia. *Am J Physiol* 1981;241(4):275-88.
- Preisig PA, Berry CA. Evidence for transcellular osmotic water flow in rat proximal tubules. *Am J Physiol* 1985;249:F124-31.
- Preston GM, Smith BL, Zeidel ML, Moulds JJ, Agre P. Mutations in aquaporin-1 in phenotypically normal humans without functional CHIP water channels. *Science* 1994;265(5178):1585-7.
- Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 1992;256(5055):385-7.
- Quigley R, Baum M. Water transport in neonatal and adult rabbit proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;283(2):F280-5.
- Rajasekaran SA, Beyenbach KW, Rajasekaran AK. Interactions of tight junctions with membrane channels and transporters. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778(3):757-69.
- Reyes JL, Lamas M, Martin D, et al. The renal segmental distribution of claudins changes with development. *Kidney Int* 2002;62(2):476-87.

- Riazuddin S, Ahmed ZM, Fanning AS, et al. Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. *Am J Hum Genet* 2006;79(6):1040-51.
- Rosenthal R, Milatz S, Krug SM, et al. Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J Cell Sci* 2010;123:1913-21.
- Saitou M, Furuse M, Sasaki H, et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 2000;11(12):4131-42.
- Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, et al. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol* 1998;141(2):397-408.
- Sas D, Hu M, Moe OW, Baum M. Effect of claudins 6 and 9 on paracellular permeability in MDCK II cells. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2008;295:1713-1719.
- Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 31. Auflage. Heidelberg, Deutschland: Springer Medizin Verlag, 2011.
- Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;286(6):C1213-28.
- Schneeberger EE, Lynch RD. Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am J Physiol* 1992;262(6 Pt 1):L647–L61.
- Schultz, S.G., Epithelial water absorption: osmosis or cotransport? *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001;98(7): 3628-30.
- Schulzke JD, Gitter AH, Mankertz J, et al. Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochim Biophys Acta* 2005;1669(1):34-42.
- Shachar-Hill B, Hill AE. Paracellular fluid transport by epithelia. *Int Rev Cytol* 2002;215:319-50.
- Shachar-Hill B, Hill AE. Convective fluid flow through the paracellular system of *Necturus* gall-bladder epithelium as revealed by dextran probes. *J Physiol* 1993;468:463-86.
- Simon DB, Lu Y, Choate KA, et al. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science* 1999;285(5424):103-6.
- Sirotkin H, Morrow B, Saint-Jore B. Identification, characterization, and precise mapping of a human gene encoding a novel membrane-spanning protein from the 22q11 region deleted in velo-cardio-facial syndrome. *Genomics* 1997;42(2):245-51.
- Spring KR. Epithelial Fluid Transport-A Century of Investigation. *News Physiol Sci* 1999;14:92-98.
- Staehelein LA. Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J Cell Sci* 1973;13(3):763-86.

- Stevenson BR, Goodenough DA. Zonulae occludentes in junctional complex-enriched fractions from mouse liver: Preliminary morphological and biochemical characterization. *J Cell Biol* 1984;98(4):1209–21.
- Tang VW, Goodenough DA. Paracellular ion channel at the tight junction. *Biophys J* 2003;84(3):1660-73.
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(4):285-93.
- Tsukita S, Furuse M. Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol* 2000;149(1):13-6.
- Turksen K, Troy TC. Barriers built on claudins. *J Cell Sci* 2004;117:2435-47.
- Turksen K, Troy TC. Permeability barrier dysfunction in transgenic mice overexpressing claudin 6. *Development* 2002;129(7):1775-84.
- Turksen K, Troy TC. Claudin-6: a novel tight junction molecule is developmentally regulated in mouse embryonic epithelium. *Dev Dyn* 2001;222(2):292-300.
- 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(2-3):110-27.
- Van Itallie CM, Anderson JM. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* 2006a;68:403-29.
- Van Itallie CM, Rogan S, Yu A, Vidal LS, Holmes J, Anderson JM. Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006b;291(6):F1288-99.
- Van Itallie CM, Anderson JM. The molecular physiology of tight junction pores. *Physiology (Bethesda)* 2004;19:331-8.
- Verkleij AJ. Lipidic intramembranous particles. *Biochim Biophys Acta* 1984;779(1):43-63.
- Weiske J, Schöneberg T, Schröder W, Hatzfeld M, Tauber R, Huber O. The fate of desmosomal proteins in apoptotic cells. *J Biol Chem* 2001;276(44):41175-81.
- Wilcox ER, Burton QL, Naz S, et al. Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell* 2001;104(1):165-72.
- Yu AS, Cheng MH, Angelow S, et al. Molecular basis for cation selectivity in claudin-2-based paracellular pores: identification of an electrostatic interaction site. *J Gen Physiol* 2009;133(1):111-27.
- Yu AS, Enck AH, Lencer WI, Schneeberger EE. Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation. *J Biol Chem* 2003;278(19):17350-9.
- Zeuthen T. Water-transporting proteins. *J Membrane Biol* 2010;234(2):57–73.

Zeuthen T. General models for water transport across leaky epithelia. *Int Rev Cytol* 2002;215:285-317.

Zeuthen T, Meinild AK, Klaerke DA, Loo DD, Wright EM, Belhage B, Litman T. Water transport by the Na⁺/glucose cotransporter under isotonic conditions. *Biol Cell* 1997;89(5-6):307-12.

Zhao L, Yaoita E, Nameta M, et al. Claudin-6 localized in tight junctions of rat podocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;294(6): 1856-62.

Zheng A, Yuan F, Li Y, et al. Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J Virol* 2007;81(22):12465-71.

7. Anhang

7.1 Abkürzungen

AQP:	Aquaporin
bTJ:	bizelluläre Tight Junctions, Tight Junctions zwischen zwei Zellen
bzw.:	beziehungsweise
et al.:	et alii (lateinisch: und andere)
C7-Cld-6:	mit Cld-6 transfizierte C7-Zellen
C7-CMV4:	mit leerem Vektor transfizierte C7-Zellen
C7-WT:	native, nicht transfizierte C7-Wildtypzellen
ca.:	circa, ungefähr
Cld:	Claudin
ES:	embryonic stem
JAM:	Junction Adhesion Molekül
kDa:	Kilodalton
MDCK:	Madin-Darby Canine Kidney-Zellen
min:	Minuten
n.s.:	nicht signifikant
P_{Mem} :	Permeabilität der apikalen und basolateralen Zellmembran
P_{TJ} :	Permeabilität der Tight Junctions
PVDV-Membran:	Polyvinylidendifluoridmembran
R^t :	transepithelialer Widerstand
RT-PCR:	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SEM:	standard error of the mean, Standardfehler des Mittelwerts
TJ:	Tight Junctions
tTJ:	trizelluläre Tight Junctions, Tight Junctions zwischen drei Zellen
z.B.:	zum Beispiel

7.2 Abbildungen

Abbildung 1: a.) Wege des transepithelialen Transportes und schematische Darstellung der Lokalisation von TJ innerhalb des Epithelzellverbandes. b.) Elektronenmikroskopische Aufnahme der TJ-Region (Tsukita et al. 2001)	6
Abbildung 2: Molekulare Struktur der Tight Junction Proteine Tricellulin (links) und Occludin (rechts). (Ikenouchi et al. 2005)	9
Abbildung 3: Typische molekulare Struktur der Claudine. (Tsukita et al. 2000).....	11
Abbildung 4: Wege des parazellulären und des transzellulären Wassertransportes. (Tsukita et al. 2000)	14
Abbildung 5: Model des Aquaporin-Wasserkanals nach Peter Agre. (Quelle: http://www.klockgiesser.com/bio/aquaporine/aquaporine.html)	16
Abbildung 6: a.) Schematische Aufbau des Versuchsstandes und das Prinzip der Messung des Wassertransportes in der Ussing-Kammer. b.) Photographische Darstellung der Meniskenänderung am Anfang und am Ende des Versuchs.....	31
Abbildung 7: Western-Blot; a.) Nachweis der TJ-Proteine bei C7-WT-, C7-CMV4- und C7-Cld-6-Zellen. b.) Nachweis der Aquaporine AQP-1, -3 und -4 bei C7-WT-, C7-CMV4- und C7-Cld-6-Zellen.	37
Abbildung 8: Das Verhältnis der Expression (in %) von AQP-1, AQP-3 und AQP-4 (a) und von Cld-1, Cld-3, Cld-4, Cld-5 und Cld-7 (b) bei C7-Cld-6-Zellen im Vergleich zu C7-CMV4-Zellen (100%), n = 3.	39
Abbildung 9: Konfokale Mikroskopie von Occludin (grün), Claudin-6 (rot) und deren Überlagerung (gelb) in C7-Cld-6- (unten) und C7-CMV4-Zellen (oben), nähere Erläuterungen im Text.	41
Abbildung 10: Die transepithelialen Widerstände (R^t) in $\Omega \cdot \text{cm}^2$ bei C7-WT-, C7-CMV4- und C7-Cld-6-Zellen.	42
Abbildung 11: Die Natrium- (P_{Na}) und Chlorid- (P_{Cl}) Permeabilitäten in 10^{-6} cm/s bei C7-WT-, C7-CMV4- und C7-Cld-6-Zellen.....	43
Abbildung 12: Permeabilitätsratio ($P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$) bei C7-WT-, C7-CMV4- und C7-Cld-6-Zellen.....	44
Abbildung 13: Osmotisch induzierter Wasserflux in $\mu\text{l} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ bei C7-WT-, C7-CMV4- und C7-Cld-6-Zellen (Mannitolgradient 100 mMol/l).....	46
Abbildung 14: Ionen-induzierter Wasserflux in $\mu\text{l} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ bei C7-WT-, C7-CMV4- und C7-Cld-6-Zellen (NaCl-Gradient 80 mMol/l).....	47
Abbildung 15: Ionen- und osmotisch induzierter Wasserflux in $\mu\text{l} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ bei C7-WT-, C7-CMV4- und C7-Cld-6-Zellen (NaCl-Gradient 80 mMol/l, Mannitolgradient 100 mMol/l).....	48

7.3 Tabellen

Tabelle 1: Gradienten bei Wasserfluxversuchen, die Konzentration von NaCl und Mannitol ist in mMol/l angegeben.	44
Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse der Wassertransportversuche. Der Wasserflux ist angegeben in $\mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben, n entspricht der Anzahl der Messungen.	45

8. Lebenslauf

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

Erklärung

„Ich, Alexander Stier, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

Messung des Wassertransportes an einer Nierenzelllinie: Rolle des Tight Junction-Proteins Claudin-6

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

Datum

Unterschrift