

UNTERSUCHUNGEN ZU ENDOZYTULO UND INTERAKTIONEN VON
TIGHT JUNCTION PROTEINEN

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universitat Berlin

vorgelegt von

Nora Gehne

aus Berlin

2017

Diese Arbeit wurde am Leibniz Institut für molekulare Pharmakologie (FMP) Berlin unter der Leitung von Ingolf E. Blasig angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. Ingolf E. Blasig
Molekulare Zellphysiologie
Leibniz Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. Oliver Daumke
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
Institut für Chemie und Biochemie
c/o Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC)

Disputation am 29.6.2017

Danksagung

Ich danke PD Dr. Ingolf E. Blasig für die Möglichkeit diese Arbeit in der Arbeitsgruppe für molekulare Zellphysiologie anfertigen zu können. Des Weiteren bedanke ich mich für die vielen konstruktiven Diskussionen und Vorschläge.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Oliver Daumke für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Mein Dank gilt auch allen derzeitigen und früheren Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die durch tatkräftige Zusammenarbeit und seelisch-moralische Unterstützung viel zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich all die Jahre unterstützt motiviert haben.

Inhalt

1.	Einleitung.....	8
1.1.	Morphologie von epithelialen Zellkontakten	8
1.2.	Aufbau und Funktion der Tight Junctions.....	10
1.2.1.	Die Proteinfamilie der Claudine	10
1.2.2.	Lokalisierung und Funktionelle Eigenschaften der Claudine.....	11
1.2.3.	Organisation der Claudine innerhalb der Tight Junctions	12
1.2.4.	Claudin-Claudin Interaktionen	13
1.2.4.1.	Interaktionen mit anderen TJ Proteinen	15
1.3.	Regulierung und Modulierung der <i>tight junctions</i>	15
1.3.1.	Mobilität von Claudinen innerhalb der <i>tight junctions</i>	16
1.3.2.	Grundlagen Endozytose und Vesikeltransport	17
1.3.3.	Regulation der Claudin-Zusammensetzung durch Endozytose.....	20
1.3.4.	Modulation der TJ durch Claudin-abgeleitete Peptide	21
1.4.	Zielstellung.....	22
2.	Material und Methoden	24
2.1.	Geräte und Material.....	24
2.2.	Molekularbiologische Methoden.....	28
2.2.1.	Klonierung	28
2.2.2.	Proteinanalyse mittels Western Blot.....	29
2.2.2.1.	Proben Aufbereitung	29
2.2.2.2.	SDS-PAGE und Proteintransfer.....	30
2.2.2.3.	Membran- <i>stripping</i>	30
2.3.	Mikrobiologische Methoden	31
2.3.1.	Kultivierung, DNA-Isolation und Kryostocks.....	31
2.3.2.	Herstellung elektrokompenter Bakterien	31
2.4.	Zellbiologische Methoden.....	31
2.4.1.	Kultivierung und Vermehrung von Zellen	31
2.4.2.	Transfektion und Herstellung stabiler Zelllinien.....	32
2.4.3.	FACS-Sortierung transfizierter Zellen	32
2.4.4.	Kryokonservierung	33
2.4.5.	Zytotoxizitäts-Assay	33
2.4.6.	RNA-Interferenz	33
2.5.	Untersuchungen zu Endozytose	34
2.5.1.	Pharmakologische Inhibition der Endozytose und des Vesikeltransports.....	34
2.5.2.	Peptide	35

2.6.	Funktionelle Messungen	36
2.6.1.	Aussaat von Zellen auf Zellkultur-Inserts	36
2.6.2.	Messungen des transepithelialen elektrischen Widerstands (TER).....	36
2.6.3.	Messung der Permeabilität	36
2.7.	Mikroskopie	37
2.7.1.	Vorbereitung der Proben	37
2.7.1.1.	Fixierung und Immunfluoreszenz	37
2.7.1.2.	Lebendzellmikroskopie.....	38
2.7.1.3.	Gefrierbruchelektronenmikroskopie	38
2.7.2.	Verwendete Mikroskope.....	38
2.7.3.	Mikroskopie-basierende Assays	39
2.7.3.1.	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)-Analyse.....	39
2.7.3.2.	<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i> (FRAP)	40
2.7.3.3.	<i>Fluorescence Protease Protection</i> (FPP) Assay	41
2.8.	3-D Strukturvorhersage von Claudinen.....	41
2.9.	Auswertung	42
2.9.1.	Quantifizierung der Vesikelzahlen	42
2.9.2.	Kokalisation mit Endosomenmarkern	42
2.9.3.	Quantifizierung der internalisierten Peptidmenge	43
2.9.4.	Quantifizierung der degradierten Claudinmenge	43
2.9.5.	YFP- <i>rescue</i> Bestimmung.....	43
2.9.6.	Berechnung der <i>cis</i> -Interaktionen.....	44
2.9.7.	Bestimmung der mobilen Fraktion	44
2.9.8.	Statistik	44
3.	Ergebnisse.....	45
3.1.	<i>Cross-over</i> Endozytose	45
3.1.1.	In HEK-293-Zellen findet kaum <i>cross-over</i> Endozytose statt	45
3.1.2.	<i>Cross-over</i> Endozytose in MDCK-II-Zellen	46
3.1.2.1.	MDCK-II-Zellen als Zellsystem zur Untersuchung von <i>cross-over</i> Endozytose.	46
3.1.2.2.	Homophile und heterophile <i>cross-over</i> Endozytose	46
3.2.	Eigenschaften der Cldn5-Aminosäuresubstitutionen Cldn5 _{F147A} und Cldn5 _{Q156E}	48
3.2.1.	Lokalisation von Cldn5 _{F147A} und Cldn5 _{Q156E}	49
3.2.2.	Einfluss der Claudin-5-Mutanten auf die Permeabilität der Zellbarriere	49

3.2.2.1.	Einfluss auf den Transepithelialen Elektrischen Widerstand	49
3.2.2.2.	Einfluss auf die Permeabilität für kleine Moleküle	51
3.2.3.	Cldn5 _{F147A} und Cldn5 _{Q156E} führen zu einer Veränderung der Proteinstruktur.....	51
3.2.4.	Cldn5 _{F147A} bildet keine <i>tight junction</i> Stränge.....	53
3.2.5.	Einfluss der Aminosäuresubstitutionen auf Claudin-Claudin-Interaktionen.....	54
3.2.5.1.	Cldn5 _{F147A} und Cldn5 _{Q156E} beeinträchtigen die <i>cis</i> -Interaktionen	54
3.2.5.2.	Cldn5 _{F147A} zeigt eine erhöhte Mobilität in der Plasmamembran	55
3.3.	Faktoren der <i>cross-over</i> Endozytose	56
3.3.1.	Claudin-Claudin-Interaktionen beeinflussen die <i>cross-over</i> Endozytose	56
3.3.2.	<i>Cross-over</i> endozytierte Vesikel enthalten mehrere TJ-Proteine	57
3.3.2.1.	Claudine	58
3.3.2.2.	Andere Tight Junction Proteine	58
3.3.3.	<i>Cross-over</i> Endozytose in lebenden Zellen	59
3.4.	Endozytoseweg der <i>cross-over</i> endozytierten Vesikel.....	60
3.4.1.	Einfluss von Endozytose-Inhibitoren auf <i>cross-over</i> Endozytose.....	60
3.4.2.	Kolokalisation von <i>cross-over</i> endozytiertem Claudin-5 mit Endosomenmarkern	61
3.4.2.1.	Kolokalisation von <i>cross-over</i> endozytiertem Cldn5 mit Rab-Proteinen	61
3.4.2.2.	<i>Cross-over</i> endozytiertes Claudin kolokalisiert mit lysosomalen Markern.....	63
3.4.2.3.	Kolokalisationsanalyse	63
3.5.	Abbau der <i>cross-over</i> endozytierten Vesikel	64
3.5.1.	Hemmung des lysosomalen Abbaus.....	64
3.5.1.1.	Chloroquin führt zu einer Akkumulation von <i>cross-over</i> endozytiertem Cldn5, aber nicht von Cldn5 _{F147A} und Cldn5 _{Q156E}	64
3.5.1.2.	Einfluss von Chloroquin auf die Fluoreszenz von <i>cross-over</i> endozytiertem YFP	65
3.5.1.3.	Einfluss von Bafilomycin auf die Fluoreszenz von <i>cross-over</i> endozytiertem YFP-Cldn5	67
3.5.2.	Beteiligung von Autophagie am Abbau <i>cross-over</i> endozyzierter Claudine.....	68
3.5.2.1.	<i>Cross-over</i> endozytiertes Cldn5 kolokalisiert mit dem Autophagiemarker LC3	69

3.5.2.2.	<i>Cross-over</i> endozytiertes Cldn5 kolokalisiert mit <i>autophagy related protein 16L</i> , einem Marker für frühe Autophagosomen.....	71
3.5.2.3.	Hemmung von Kinasen, welche an der Initiierung von Autophagosomen-Entstehung beteiligt sind, führt zu verringerter <i>cross-over</i> Endozytose	72
3.5.2.4.	Induktion von Autophagie mittels Rapamycin führt zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der <i>cross-over</i> endozytierten Vesikel ...	73
3.5.3.	Chloroquin und Rapamycin beeinflussen die Proteinmengen von Cldn5	74
3.6.	Struktur der <i>cross-over</i> endozytierten Vesikel.....	75
3.6.1.	<i>Stimulated emission depletion</i> (STED)-Mikroskopie.....	75
3.6.1.1.	<i>Stimulated emission depletion</i> -Mikroskopie in lebenden Zellen zeigt doppelwandige Vesikelstruktur.....	75
3.6.1.2.	In fixierten Proben ließ sich keine gute Auflösung der Vesikel erzielen.....	76
3.6.2.	<i>Cross-over</i> endozytiertes Claudin befindet sich im Vesikellumen	77
3.7.	Internalisierung Claudin-abgeleiteter Peptide	80
3.7.1.	Cldn1, -2 und -5 abgeleitete Peptide unterscheiden sich nicht in ihrer Lokalisation	80
3.7.2.	Claudin-abgeleitete Peptide unterscheiden sich in der Menge des internalisierten Peptids	82
3.7.3.	Einfluss von C5C2 auf die <i>cross-over</i> Endozytose	84
4.	Diskussion	85
4.1.	Einfluss von Claudin-Claudin-Interaktionen auf die	85
4.2.	Endozytoseweg und Transport	87
4.3.	Vesikelstruktur	91
4.4.	Internalisierung von Claudin-abgeleiteten Peptiden	93
4.5.	Mechanismus der <i>cross-over</i> Endozytose	95
4.6.	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	96
	Zusammenfassung.....	100
	Summary	101
	Literaturverzeichnis.....	102
	Eidesstattliche Erklärung.....	110
	Anhang	111

Abkürzungen

A Alanin	LC3 Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3
AJs adherens junctions	MDCK-II Madin Darby canine kidney cells type II
AP2 Clathrin Adapterprotein 2	MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide
AS Aminosäure	N Asparagin
ATG9 autophagy related protein 9	PBS phosphate buffered saline
BMVEC human brain microvascular endothelial cells	PI Phosphatidylinositol
Cldn Claudin, Claudin	PIKfyve phosphoinositide kinase, FYVE-type zinc finger containing
CPZ Chlorpromazin	PIP Phosphatidylinositolphosphat
CQ Chloroquin	P_{LY} Permeationskoeffizient für lucifer yellow
DMSO Dimethylsulfoxid	Q Glutamin
E Glutaminsäure	RT Raumtemperatur
EEA1 early endosome antigen 1	S Serin
EZS Extrazelluläre Schleife	STED stimulated emission depletion
F Phenylalanin	T Threonin
F3 Filipin III	TAMP tight junction associated MARVEL proteins
FPP fluorescence protease protection	TAMRA Tetramethyl-6-Carboxyrhodamin
FRAP fluorescence recovery after photobleaching	TJ tight junction
FRET Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer	TM Transmembrandomäne
GPs gap junctions	TRQ monomeric Turquoise 2
HBSS Hank's balanced salt solution	V-H⁺-ATPase vacuolar H ⁺ -ATPase
HEK-293 human embryonic kidney cells 293	Y Tyrosin
HUVEC human umbilical vein endothelial cells	YFP yellow fluorescent protein
JAM junctional adhesion molecule	ZO zonula occludens
K Lysin	

1. Einleitung

Epitheliale Barrieren kontrollieren den Stoffaustausch zwischen Geweben und halten so das spezifische Milieu jedes Kompartimentes aufrecht (Powell, 1981). Dafür sind spezialisierte Zellen notwendig, welche eine gerichtete Permeation gewährleisten können. Epithelzellen und Endothelzellen sind polarisierte Zellen, welche eine klare Aufteilung in einen apikalen, dem Lumen zugewandten Bereich, und einen basolateralen, also dem Lumen abgewandten Bereich welche funktionell und strukturell verschieden sind (Yeaman et al., 1999). Die Bereiche grenzen sich durch unterschiedliche räumliche Verteilung bestimmter Proteine voneinander ab, komplexe *protein sorting* Mechanismen sorgen für die Aufrechterhaltung dieser Asymmetrie (Mellman and Nelson, 2008). Der Stoffübertritt über die Zellbarriere kann entweder über den transzellulären Weg erfolgen, wobei spezialisierte Transporter involviert sind, oder über den parazellulären Weg, wobei die Kontaktbereiche zwischen den Zellen die Regulierung der Diffusion und des Transports übernehmen.

1.1. Morphologie von epithelialen Zellkontakten

Die Zellzwischenräume werden von spezialisierten Membranbereichen eingenommen, welche in mehrere Abschnitte gegliedert sind. An apikaler Position, also dem Lumen am nächsten, befinden sich die *tight junctions* (TJ), anschließend folgen die *adherens junctions* (AJs) und schließlich die Desmosomen und *gap junctions* (GJs). Diese Gliederung findet sich in allen Epithelien (Farquhar and Palade, 1963), wobei TJs und AJs ein kontinuierliches Band um die Zelle bilden, während Desmosomen und GJs punktiert sind und ihre Häufigkeit abhängig von der Art der Zellen ist. Funktionell dienen AJs und Desmosomen der Zelladhäsion (Garrod and Chidgey, 2008), GJs dienen der Zellkommunikation (Giepmans, 2004) und TJs bilden zusätzlich zu ihrer Funktion in der Zelladhäsion eine parazelluläre Diffusionsbarriere zwischen der luminalen und der abluminalen Seite der Epithelien und der Regulation des parazellulären Transportweges (Balda et al., 1996).

Dieser *Apical Junctional Complex* ist auf elektronenmikroskopischen Bildern gut zu erkennen (Abb. 1.1A,B). Eine Zellmembran lässt sich in drei Schichten unterteilen: zwei elektronendichte Lamellen, welche jeweils etwa 40 Å breit sind, die von einer etwa 30 Å breiten, weniger elektronendichten Schicht getrennt werden (Farquhar and Palade, 1963). Während der interzelluläre Region (also die Distanz zwischen dem Zytoplasma beider Zellen) im Bereich der AJs etwa 200 Å breit ist, wird er im Bereich der TJs auf 70 – 90 Å verengt. Hier scheinen die äußeren Schichten beider aneinander grenzender Zellmembranen zu fusionieren und bilden eine Mittellinie zwischen den Zellen, welche dünner ist als die inneren Schichten der jeweiligen Membran. Dies führte zu der Hypothese, dass die äußeren Schichten der Plasmamembranen im Bereich der TJ miteinander verschmelzen (Lee et al., 2008), diese Ansicht ist mittlerweile allerdings nicht mehr gängig.

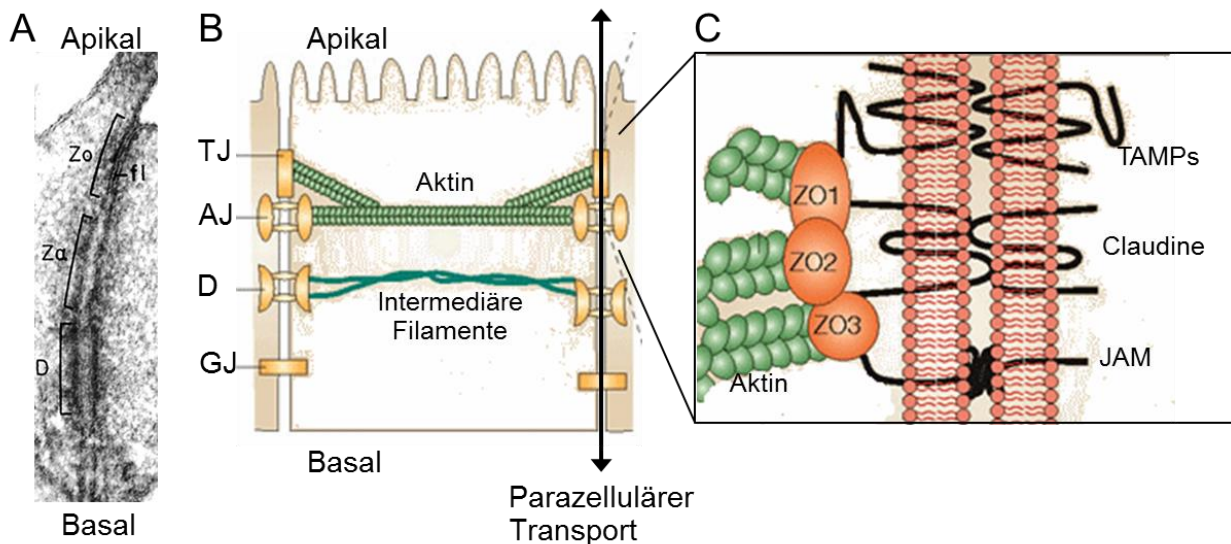


Abb. 1.1: Räumliche Organisation von Zellkontakten. A: Elektronenmikroskopische Darstellung eines epithelialen Zellkontaktes. Zu erkennen ist apikal die *tight junction* (*zonula occludens*, Zo), dann die *adherens junction* (*zonula adherens*, Za) und noch weiter basal ein Desmosom (D). Im Bereich der *tight junction* ist der parazelluläre Spalt geschlossen, wie man an der dunklen Färbung (hohe Elektronendichte) der Fusionslinie (fl) zwischen den Membranen erkennen kann, modifiziert nach (Farquhar and Palade, 1963). B: Schematische Darstellung eines Zellkontaktes. Die *tight junction* (TJ) und *adherens junction* (AJ) sind mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden, welches die Zelle durchspannt. C: Darstellung der TJ. Claudine, *tight junction associated MARVEL proteins* (TAMPs) und *junctional adhesion molecule* (JAM) sind über die *zonula occludens* (ZO)-Proteine mit dem Zytoskelett verbunden. B, C: Modifiziert nach (Aktories and Barbieri, 2005).

1.2. Aufbau und Funktion der Tight Junctions

TJs sind spezialisierte Zellkontakte, welche zur parazellulären Abdichtung der lateralen Zellzwischenräume in allen Epi- und Endothelien vorkommen. In elektronenmikroskopischen Bildern stellen sie eine verdichtete Stelle (*Zonula occludens*) an den Berührungsbereichen zwischen benachbarten Zellen dar (Abb. 1.1B,C). Je nach Proteinzusammensetzung ändert sich die parazelluläre Durchlässigkeit der TJs für Ionen und wasserlösliche Stoffe, wodurch eine Regulierung des Stofftransportes erreicht wird (Van Itallie and Anderson, 2006).

Die TJs sind ein Proteinkomplex bestehend aus transmembranalen und zytosolischen, membranassoziierten Proteinen, welche in Kontakt mit dem Aktin-Zytoskelett stehen (Abb. 1.1C). Zu den zytosolischen Proteinen zählen z.B. die *Zonula occludens* (ZO)-Proteine 1 bis 3, sowie Cingulin. Transmembranale TJ-Bestandteile sind Claudine, welche wesentlich an der abdichtenden Funktion der TJs beteiligt sind, sowie *Junctional adhesion molecules* (JAMs) und die Gruppe der *Tight junction associated MARVEL proteins* (TAMPs), bestehend aus Occludin, Tricellulin und MarvelD3 (Haseloff et al., 2015).

1.2.1. Die Proteinfamilie der Claudine

Claudine kommen in allen Zellbarrieren vor, je nach Claudin-Ausstattung werden unterschiedliche Barriereigenschaften realisiert. Claudine beeinflussen durch homophile und heterophile Wechselwirkungen die Dichtigkeit der jeweiligen Barriere. Die Familie der Claudine umfasst aktuell 27 Mitglieder (Mineta et al., 2011), die zwischen 21 und 34 kDa groß sind, wobei jedoch die Zugehörigkeit der zuletzt entdeckten Mitglieder Claudin-26 und -27 noch nicht abschließend geklärt ist (Maher et al., 2011). Sie gehören zur Pfam00822-Superfamilie und teilen morphologische Eigenschaften, wie vier helikale Transmembrandomänen (TM), zwei extrazelluläre Schleifen (EZS) und jeweils einen zytosolischen COOH- und NH₂- Terminus (Abb. 1.2 A). Der N-Terminus ist im Allgemeinen nur wenige Aminosäuren lang, während der C-Terminus länger ist und regulatorische Domänen enthält, unter anderem meistens eine PDZ-Bindedomäne (Morita et al., 1999b), Phosphorylierungs- und Palmitoylierungsdomänen (Van Itallie et al., 2005; Yamamoto et al., 2008). Zusätzlich enthalten die meisten Claudine in der ersten EZS ein konserviertes GLWxxC(8-10 Aminosäuren)C-Motiv, wobei die zwei Cysteine

konserviert sind. Diese bilden vermutlich eine intramolekulare Disulfid-Brücke die funktionelle Bedeutung hat (Li et al., 2013).

Die Kristallstrukturen von Cldn15 und -19 (Shinoda et al., 2016; Suzuki et al., 2014) geben einen Hinweis auf die dreidimensionale Konformation von Claudinen in der Membran. Die beiden EZS bilden eine Ebene aus fünf untereinander verbundenen β -Strängen, wobei vier Stränge von der ersten EZS gebildet werden und der fünfte von der zweiten EZS beigesteuert wird (Abb. 1.2B). Die vier TMs haben helikale Konformation und sind zu einem Bündel geordnet, wobei TM3 wesentlich länger ist als die anderen Helices.

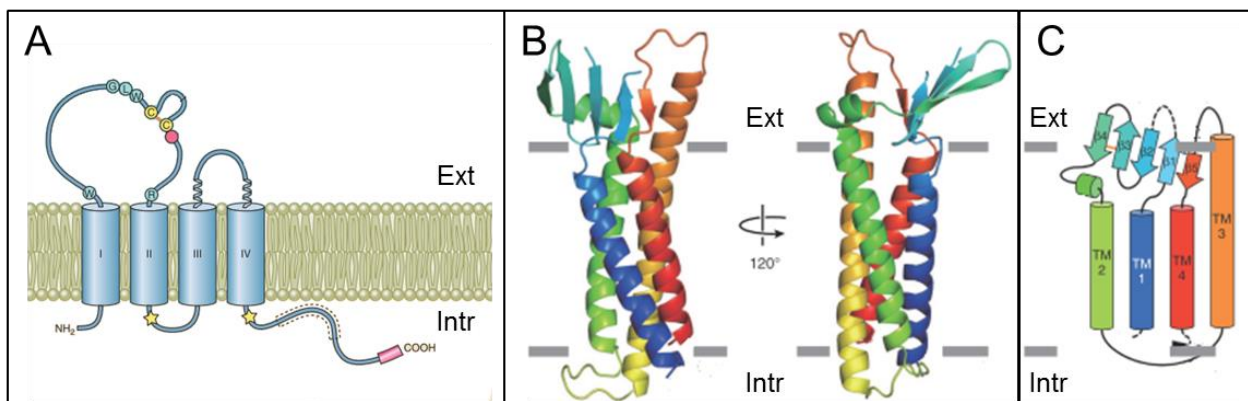


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Claudine. **A:** Claudine besitzen vier Transmembrandomänen (TM), zwei extrazelluläre Schleifen (EZS) und eine kurze intrazelluläre Schleife. Beide Termini sind intrazellulär, der N-Terminus ist normaler Weise kurz, während der längere C-Terminus Interaktionsdomänen für verschiedene Proteine beinhaltet. Sterne: Palmitoylierungsdomänen, Punkte: Phosphorylierungsdomäne, roter Zylinder: PZD-Domäne. Bearbeitet nach (Gunzel and Yu, 2013). **B:** Modell von Cldn15 aufgrund seiner Kristallstruktur. Die vier TM sind zu einem Bündel zusammengefasst. Die beiden EZS bilden ein konjugiertes β -Faltblatt aus 5 Strängen (β). **C:** Schematische Darstellung der Proteindomänen von Cldn15. B,C: Bearbeitet nach (Suzuki et al., 2014). Ext: extrazellulärer Bereich. Intr: intrazellulärer Bereich.

1.2.2. Lokalisierung und Funktionelle Eigenschaften der Claudine

Die Expression von Claudinen in einem Zelltyp beschränkt sich nicht auf einen einzigen Subtyp. Im Allgemeinen bestehen Gewebebarrieren aus einem Gemisch mehrerer unterschiedlicher Claudine. Verschiedene Gewebe exprimieren spezifische Sets an Claudinen (Morita et al., 1999b; Peppi and Ghabriel, 2004; Rahner et al., 2001), welche die Barriereigenschaften bestimmen. Außerdem unterscheidet sich die subzelluläre Lokalisation der Claudine. So wurden im Darmepithel Cldn2, -8, -10, -12, -15 und -18 fast ausschließlich im Bereich der TJs gefunden, während Cldn1, -3, -4, -5 und -7 sich auch in der basolateralen Membran befinden. Zusätzlich unterschieden sich die Expressionslevel in den unterschiedlichen Darmabschnitten. Während

beispielsweise Cldn7 im gesamten Darm ähnliche Expressionslevel aufwies, wurde Cldn8 vornehmlich im Kolon exprimiert (Fujita et al., 2006).

Innerhalb der Claudine gibt es abdichtende Claudine, wie zum Beispiel Cldn1 (Furuse et al., 2002) und -5 (Amasheh et al., 2005). Andere Claudine bilden dagegen parazelluläre Poren, wie zum Beispiel Cldn2, welches einen Wasserkanal bildet (Rosenthal et al., 2010), und Cldn15, einem Natriumkanal (Van Itallie et al., 2003). Die Funktion einzelner Claudine ist gut untersucht. So führt ein *knock-out* von Cldn5 in Mäusen zu einer Öffnung der der Blut-Hirnschranke für Moleküle kleiner als 800 Da (Nitta et al., 2003). Cldn1 ist ein wesentliches Protein bei der Abdichtung der Epidermis gegen Wasserverlust, Cldn1 defiziente Mäuse sterben kurz nach der Geburt an Austrocknung (Furuse et al., 2002). Die porenbildenden Claudine weisen teilweise eine Kationen- oder Anionen-Selektivität in ihrer Durchlässigkeit auf (Colegio et al., 2003; Van Itallie et al., 2003), wobei diese Selektivität durch die geladene AS in den EZS moduliert wird. Murines Cldn4 bildet zum Beispiel einen Chlorid-Kanal, dessen Anionenselektivität durch K65 vermittelt wird. Ein Austausch des positiv geladenen Lysins gegen ungeladenes Threonin hob die Anionenselektivität auf (Hou et al., 2010).

1.2.3. Organisation der Claudine innerhalb der Tight Junctions

Claudine bilden maschenartige Strangnetzwerke zwischen benachbarten Zellen (Abb. 1.3A,B), welche die gesamte Zelle gürtelartig umschließen. In TJ-freien Zellsystemen ist die Expression einzelner Claudine ausreichend um ein Strangnetzwerk aufzubauen (Furuse et al., 1998). Dieses besteht aus Claudin-Polymeren, welche sich in gepaarten Doppelsträngen zusammenlagern, d.h. zweireihige Claudinstänge innerhalb einer Membran interagieren mit ebensolchen Strängen der gegenüber liegenden Membran (Furuse et al., 1999). Für Claudine innerhalb derselben Membran wurde in diesen Strängen eine Anordnung der Claudine in einer antiparallelen Doppelreihe nachgewiesen (Milatz et al., 2015). Diese Anordnung ergibt die kompakteste Packung der Claudine (Abb. 1.3C) im Vergleich zu parallelen Strängen oder ungeordneten Claudinen. Anhand von murinen Cldn3/Cldn5-Chimären konnten Proteindomänen identifiziert werden, welche beim Einbau der Claudine in TJs eine Rolle spielen (Rossa et al., 2014). Aminosäuren (AS) der dritten und vierten TM von murinem Cldn5 (Cys128, Ala132, Ile142, Ala163, Ile166 und Leu174) wurden als wichtige Elemente der Proteinfaltung und der TJ-Montage identifiziert.

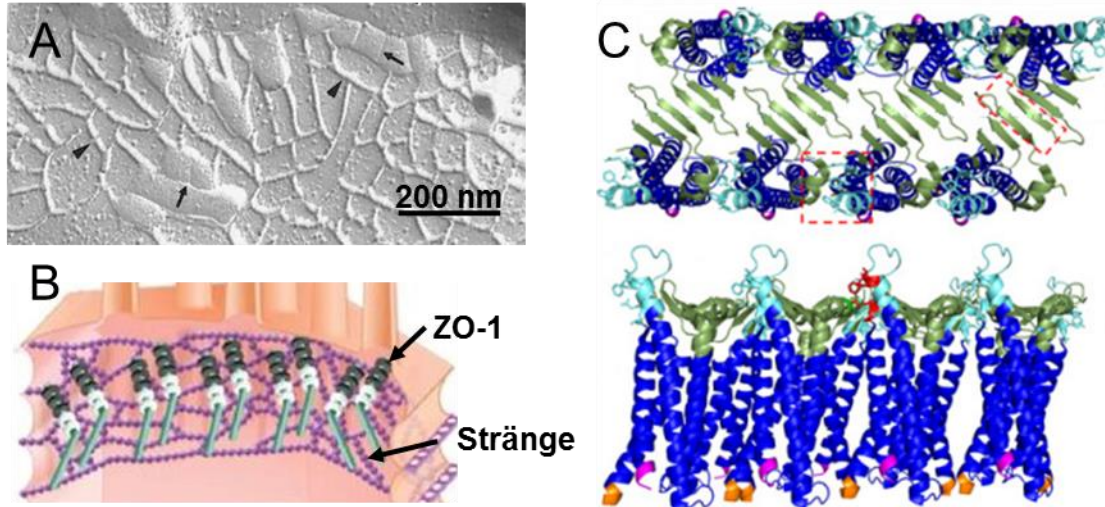


Abb. 1.3: Anordnung von Claudinen in *tight junction* (TJ)-Strängen. **A:** Elektronenmikroskopische Darstellung des TJ-Strangnetzwerks (Pfeile). Durch Verzweigungen kommt ein maschenartiges Muster zustande; modifiziert nach (Tsukita et al., 2001) **B:** Schematische Darstellung der TJ-Stränge und Interaktion mit ZO-1; modifiziert nach (Yamazaki et al., 2011). **C:** Modell der antiparallelen doppelreihigen Anordnung von Claudinen in der Membran in Aufsicht (oben) und Seitenansicht (unten). Rote Kästen: Areale der *cis*-Interaktion; modifiziert nach (Milatz et al., 2015).

1.2.4. Claudin-Claudin Interaktionen

Claudine interagieren miteinander entlang derselben Plasmamembran (*cis*-Interaktionen) und auch mit Claudinen der gegenüber liegenden Zelle (*trans*-Interaktionen). Diese Interaktionen können entweder homophil oder heterophil erfolgen (Abb. 1.4A), wobei die meisten Claudine nur mit bestimmten anderen Claudin-Subtypen interagieren. Homophile *cis*-Interaktionen sind beispielsweise für Cldn1, -3 und -5 bekannt (Milatz et al., 2015; Piontek et al., 2011), heterophile *cis*-Interaktionen zwischen Cldn1 und -3, Cldn1 und -5, Cldn3 und -5 (Piontek et al., 2011), sowie zwischen Cldn3 und -4 (Daugherty et al., 2007).

Homophile *trans*-Assoziationen sind ebenfalls für viele Claudine beschrieben, so zum Beispiel für Cldn1,-2, -3 und -5 (Furuse et al., 1998; Piontek et al., 2008), heterophile *trans*-Assoziationen findet man zwischen Cldn1 und -3, Cldn2 und -3, sowie Cldn5 und -3, allerdings nicht zwischen Cldn1 und -2 (Furuse et al., 1999; Piontek et al., 2011). Cldn4 interagiert in *trans* weder mit Cldn1, Cldn3 noch Cldn5 (Daugherty et al., 2007). Allerdings sind die Wechselwirkungen nicht gleich stark für alle Kombinationen. Die heterophilen *trans*-Interaktionen zwischen Cldn3 und -5 sind weit weniger stark ausgeprägt als die Interaktionen zwischen Cldn1 und -3, zwischen Cldn1 und -5, sowie die homophilen Interaktionen von Cldn3 und Cldn5 (Piontek et al., 2011). Die homophilen *trans*-Assoziationen von Cldn1 sind etwa doppelt so stark wie die von Cldn5,

heterophile *trans*-Interaktionen zwischen Cldn1 und -5 sind etwas intensiver als homophile Cldn5 Interaktionen.

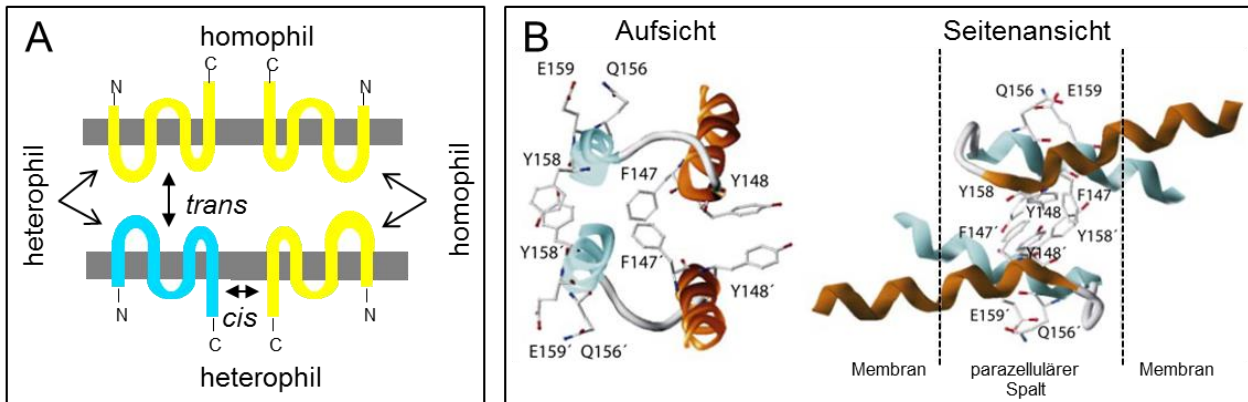


Abb. 1.4: Interaktionen von Claudinen. **A:** Abhängig vom Claudin-Subtyp können Claudine innerhalb derselben Membran (*cis*) oder mit Claudinen der gegenüber liegenden Membran (*trans*) interagieren. Sowohl *cis*- als auch *trans*-Interaktionen können zwischen Claudinen des gleichen Subtyps (homophil) oder unterschiedlicher Subtypen (heterophil) stattfinden. **B:** Schema der an *trans*-Interaktionen beteiligten Aminosäuren von murinem Cldn5. Die drei aromatischen Seitenketten von F147, Y148 und Y158 interagieren mit den Seitenketten des gegenüber liegenden Claudins, modifiziert nach (Piontek et al., 2008).

Aufschluss über die an den Wechselwirkungen beteiligten Proteindomänen geben Arbeiten mit Claudin Chimären und AS-Austauschmutanten. Ein Austausch einer der beiden EZS von Cldn4 gegen die entsprechende EZS von Cldn3 führte zu *trans*-Interaktionen der Chimäre mit Cldn1, -3 und -5, welche bei Wildtyp Cldn4 nicht vorhanden sind (Daugherty et al., 2007). Die Arbeiten an Claudin-AS-Substitutionsvarianten zeigten auch, dass die EZS an den *trans*-Interaktionen von Claudinen beteiligt sind. Murines Cldn3 enthält in der ersten EZS an der Stelle 44 die AS Asparagin, während murines Cldn4 an gleicher Stelle ein Threonin enthält. Die AS-Substitution von Cldn3 (N44T) führt dazu, dass diese Mutante nun *trans*-Interaktionen mit Cldn4 eingehen kann, wobei die Fähigkeit Cldn1 und -5 zu binden erhalten bleibt (Daugherty et al., 2007). Cldn5 reichert sich in HEK-293-Zellen aufgrund seiner starken *trans*-Interaktionen in den Bereichen der Zell-Zellkontakte im Vergleich zur restlichen Membran an. Austausch der AS F147, Y148, Q156, Y158 und E159 in murinem Cldn5 führt zu einer Reduzierung dieser Kontakthanreicherung, was auf verringerte *trans*-Interaktionen schließen lässt (Piontek et al., 2008). Die *trans*-Interaktionen basieren vermutlich auf Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Seitenketten gegenüberliegender Claudine (Abb. 1.4B).

Auch an den *cis*-Assoziationen sind AS der EZS beteiligt. Ein AS-Austausch in der zweiten EZS von murinem Cldn5 (F158A) führt zu einem Verlust der homophilen *cis*-Interaktionen (Piontek

et al., 2008), sowie der heterophilen *cis*-Interaktionen zwischen Cldn3 und -5 (Piontek et al., 2011). *Cis*-Interaktionen werden aber auch durch die TMs realisiert, wie für Cldn16 und -19 gezeigt wurde (Gong et al., 2015a). Die *cis*-Assoziationen zwischen Claudinen sind allerdings nicht nur für die Stabilisierung der TJ von Bedeutung, sondern auch für die korrekte Lokalisation der Claudine beim Auf- oder Umbau der TJs. So werden zum Beispiel die Wechselwirkungen zwischen Cldn16/19 und Cldn4/8 für eine korrekte TJ-lokalisation der Claudine benötigt. *Knock-down* von Cldn16 oder -19 in der Niere führt zu einer Mislokalisierung des jeweils anderen Claudins. *Knock-down* von Cldn8 in der Niere führt zu einem Verlust von Cldn4 in den TJs (Hou et al., 2009; Hou et al., 2010).

1.2.4.1. Interaktionen mit anderen TJ Proteinen

Interaktionen von Claudinen mit anderen TJ-Proteinen beeinflussen den Aufbau der TJs erheblich. ZO-1 bis -3 interagieren über ihre PZD-Domäne mit dem C-Terminus vieler Claudine (Itoh et al., 1999). Sie können so Claudine zu Membranabschnitten rekrutieren, an denen sich TJ-ausbilden, wie für ZO-1 und -2 gezeigt wurde (Umeda et al., 2006). Allerdings sind diese Interaktionen nicht unbedingt notwendig um Claudine in TJs einzubauen. Deletion der ZO-1-Bindedomäne von Cldn1 führte bei hohem Expressionslevel des verkürzten Cldn1 zur aberranten Polymerisation von TJ-Strängen in der lateralen Membran. Bei Reduktion des Cldn1-Expressionslevels konnten die verkürzten Cldn1-Proteine aber aufgrund von Wechselwirkungen mit endogenem Cldn1 korrekt in die TJs eingebaut werden (Kobayashi et al., 2002). Auch TAMPs interagieren mit Claudinen und wirken regulatorisch auf die Verteilung von Claudinen. Co-Expression von Cldn1 mit Tricellulin, Occludin oder MarvelD3 in TJ-freien HEK-293-Zellen führt zur Veränderung der TJ-Stränge, vornehmlich zu einer verringerten Maschenweite, als sie bei Expression von Cldn1 alleine gefunden wird (Cording et al., 2013).

1.3. Regulierung und Modulierung der *tight junctions*

Native TJs sind ein komplexes Netzwerk, welches streng reguliert wird. Faktoren, welche zur Dysregulation der Claudin-Expression führen, haben einen großen Einfluss auf die Barrierefunktion und gehen oft mit Krankheiten einher. Einige inflammatorischen Zytokine beeinflussen die TJ-Permeabilität über die Endozytose von Claudinen (Utech et al., 2010). Entsprechend wurde bei Patienten mit Morbus Crohn eine veränderte Expression von

Cldn2, -5, -8 und Occludin im Darmepithel nachgewiesen. Hochregulation des porenbildenden Cldn2, bei gleichzeitiger Reduktion der abdichtenden Claudine Cldn5 und -8, sowie Occludin, führt zu diskontinuierlichen TJ-Strängen und erhöhter Durchlässigkeit der Barriere (Zeissig et al., 2007). Nach einem Schlaganfall wird die Permeabilität der Blut-Hirnschranke durch Endozytose von Cldn5 aus den TJs von Endothelzellen erhöht (Liu et al., 2012). Außerdem geht die Expression bestimmter Claudine (zum Beispiel Cldn11) aus den TJs mit niedrigerer Invasivität von Tumoren einher (Awsare et al., 2011), während durch Überexpression von Cldn6, -7, und -9 die Invasivität erhöht wird (Zavala-Zendejas et al., 2011). Daher sind Faktoren, welche die Stabilität von Claudinen in der Membran beeinflussen, von großem Interesse.

1.3.1. Mobilität von Claudinen innerhalb der *tight junctions*

TJs sind funktionell stabil, die einzelnen Claudine sind jedoch zum Teil mobil in der Membran eingebaut, wie durch *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP)-Messungen gezeigt wurde. In MDCK-II Zellen wurde nur eine mobile Fraktion von 25% von Cldn1 gefunden (Shen et al., 2008), in TJ-freien HEK-293-Zellen hat Cldn1 eine mobile Fraktion von 30% (Cording et al., 2013). Für Cldn5 wurde in HEK-293-Zellen eine mobile Fraktion von 30% in den TJs nachgewiesen (Piontek et al., 2011). In MDCK-I-Zellen wurde für Cldn3 und -19 eine mobile Fraktion von 13% gefunden, bei Cldn14 waren es 14% und bei Cldn7 18%. Cldn10 und Cldn12 lagen etwas höher bei 37% bzw. 52% (Yamazaki et al., 2011). Die Mobilität hängt jedoch auch vom jeweiligen Zelltyp ab. In HEK-293-Zellen, welche keine endogenen Claudine exprimieren, hat Cldn3 eine mobile Fraktion von 70%. Zusätzlich wurde demonstriert, dass die Mobilität durch *trans*-Interaktionen der Claudine moduliert wird. Die AS-Substitution Y148A in murinem Cldn5 führte zu verminderten *trans*-Wechselwirkungen und erhöhte die Mobilität von Cldn5 von 30% auf über 50% (Piontek et al., 2011).

Die Mobilität der Claudine wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. So wird die Mobilität von Cldn3 durch Interaktionen von *hepatocyte growth factor* (HGF) mit der PDZ-Domäne von Cldn3 erhöht (Twiss et al., 2013). Stabilisierung von Occludin in der Membran führt zu einer höheren Mobilität von Cldn1 und -2, aber nicht von Cldn4 (Raleigh et al., 2011). In Endothelzellen führt die Inhibition von GSK3 β zu einer Stabilisierung der TJs durch Reduzierung des Cldn5-*turnover* (Ramirez et al., 2013). Die Halbwertszeiten von Claudinen sind abhängig

vom jeweiligen Subtyp. In MDCK-II-Zellen wurden beispielsweise die Halbwertszeiten von Cldn2 und Cldn 4 auf 12 h, bzw. 4 h bestimmt (Van Itallie et al., 2004). Auch der Zelltyp scheint eine Rolle zu spielen, für Cldn5 wurde in HUVEC-Zellen eine Halbwertszeit von 70 min gemessen (Mandel et al., 2012), während in HEK-293-Zellen und BMVEC-Zellen eine Halbwertszeit von 14 h festgestellt wurde (Ramirez et al., 2013).

Trotz der geringen Mobilität vieler Claudine sind TJ-Stränge in der Membran keine starren Strukturen, sondern werden ständig umgebaut (Shen et al., 2008). Dies lässt sich in Zeitserien fluoreszenz-markierter Claudine visualisieren. So konnte im Fall von GFP-markiertem Cldn1 in L-Fibroblasten zum Beispiel eine große Mobilität ganzer TJ-Stränge nachweisen, während die einzelnen Claudine innerhalb der Stränge nur eine geringe Mobilität aufwiesen (Sasaki et al., 2003). Diese Stränge scheinen zeitgleich aus den Plasmamembranen angrenzender Zellen internalisiert zu werden, wobei Claudine, wie zum Beispiel Cldn3, aus der Nachbarzelle aufgenommen werden können (Matsuda et al., 2004).

1.3.2. Grundlagen Endozytose und Vesikeltransport

Endozytose ist ein Prozess, bei welchem durch Invagination der Plasmamembran intrazelluläre Vesikel entstehen. Auf diese Weise kann die Zelle mit ihrer Umgebung in Austausch treten, eine wichtige Voraussetzung für interzelluläre Kommunikation. Dabei können sowohl membranständige Signale aufgenommen werden, als auch Material aus dem extrazellulären Bereich. Die Internalisierung der Membran kann auf verschiedenen Wegen erfolgen (Abb. 1.5A).

Bei der Clathrin-abhängigen Endozytose wird Clathrin an die Plasmamembran rekrutiert, wo es zur Invagination der Plasmamembran beiträgt (Schmid, 1997). Diese *clathrin coated pits* (CCPs) werden schließlich von der Membran abgeschnürt und bilden kleine Vesikel (ca. 100 - 200 nm Durchmesser) (Kumari et al., 2010). Die Clathrin-Untereinheiten sind untereinander verbunden, sodass sie eine Triskelion-Struktur (also drei Arme, welche von einem gemeinsamen Zentrum ausgehen) bilden (Ungewickell and Branton, 1981). Die Rekrutierung von Clathrin an die Plasmamembran erfolgt durch das Adapterprotein 2 (AP2), wo sich Clathrin-Triskelions netzartig zusammenlagern und so die Beugung der Membran herbeiführen. Nach Abschnürung wird die Clathrin-Hülle vom Vesikel entfernt und es kommt zur Fusion mit frühen Endosomen (McMahon and Boucrot, 2011).

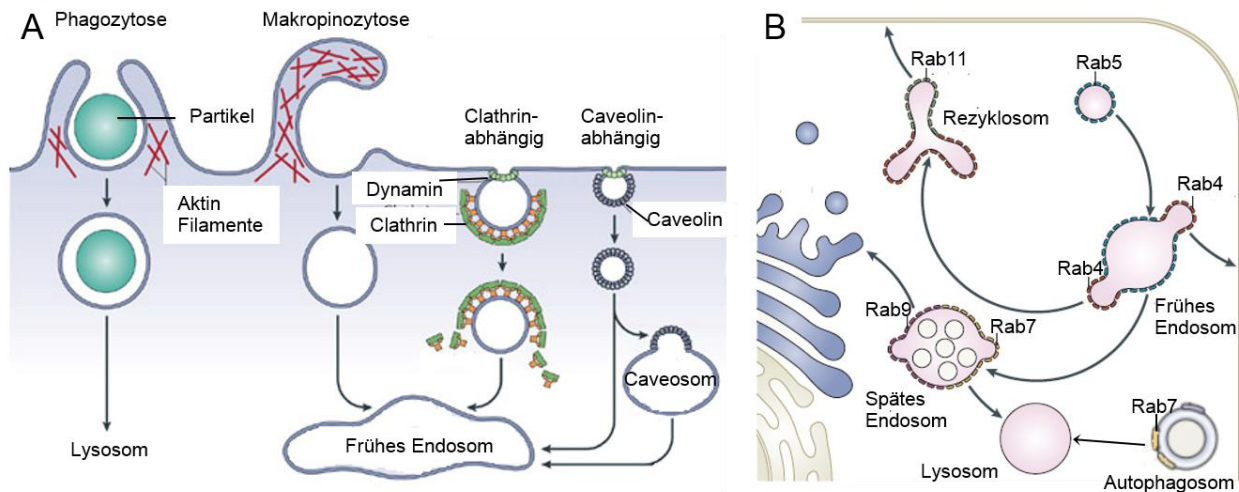


Abb. 1.5: Endozytose und Vesikeltransport. **A:** Unterschiedliche Endozytosewege, modifiziert nach (Mayor and Pagano, 2007). **B:** Rab-Proteine regulieren den Vesikeltransport nach Abschnüren des Vesikels von der Membran. Dabei sind die einzelnen Rab-Proteine spezifisch für bestimmte Prozesse und nehmen mehr oder weniger abgegrenzte Mikrodomänen der Vesikel ein, modifiziert nach (Stenmark, 2009).

Ein anderer Internalisierungsweg ist abhängig von Caveolin, wobei kleine Vesikel (Durchmesser von etwa 120 nm) internalisiert werden (Kumari et al., 2010). Hier werden im Bereich von *lipid rafts*, spezialisierten Membranbereichen welche viel Cholesterin enthalten, durch Interaktionen zwischen Caveolin und Cholesterin Einstülpungen der Membran erzeugt. Sowohl in Clathrin-abhängiger (Damke et al., 1994) als auch Clathrin-unabhängiger Endozytose (Henley et al., 1998) lagert sich Dynamin, eine GTPase, am Hals des sich bildenden Vesikels an und bewirkt durch Kontraktion die Abschnürung des Vesikels (Sweitzer and Hinshaw, 1998).

Weitaus größere Vesikel entstehen durch Makropinozytose, hier werden Vesikeldurchmesser von bis zu 10 μm erreicht. Es kommt zu einer Ausstülpung der Plasmamembran, diese aktinreichen Membranarme umschließen einen extrazellulären Bereich, welcher endozytiert wird. Eingeleitet und reguliert wird dieser Prozess durch Phosphoinositid (Swanson, 2008). Ausgehend von Phosphatidylinositol (PI) entstehen durch Phosphorylierung des Inositolzuckers an Position 3', 4', 5' oder einer Kombination aus Mehrfach-Phosphorylierungen durch spezifische Kinasen ein bestimmtes Phosphatidylinositolphosphat (PIP), durch welches spezifische Effektor-Proteine rekrutiert werden.

Nach der Endozytose wird das Vesikel entlang des Aktinskeletts transportiert. Im Fall der Clathrin- oder Caveolin-abhängigen Endozytose, sowie der Makropinozytose fusioniert das

Vesikel mit einem frühen Endosom. Dort wird der Inhalt sortiert und zu dem entsprechenden Kompartiment transportiert (Mukherjee et al., 1997). Für die Regulation des Vesikeltransports sind zum großen Teil Rab-Proteine zuständig, eine Gruppe von kleinen monomeren GTPasen. Die einzelnen Rabs haben hierbei eine spezifische Lokalisation entlang der endozytotischen Route (Abb. 1.5B) und werden daher auch als Vesikelmarker eingesetzt. Einige für den Transport von TJ-Proteinen relevante Rab-Proteine sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst.

Tabelle 1.1: Rab-Proteine und deren Funktionen.

Protein	Lokalisation	Funktion
Rab3	TJs polarisierter Epithelzellen Transzytotische Vesikel	? Exozytose sekretorischer Vesikel (TGN zu apiko-lateralen Membranen)
Rab4	Frühe Endosomen und Rezyklosomen	Recycling von frühen Endosomen zur PM
Rab5A, Rab5B	PM, Clathrin-haltige Vesikel	PM zu frühen Endosomen
Rab5C	Frühe Endosomen	Transport, Fusion früher Endosomen
Rab7	Späte Endosomen	Frühe zu späte Endosomen, späte Endosomen zu Lysosomen
Rab8	post-Golgi Vesikel, basolaterale Vesikel, TJs polarisierter Zellen	Golgi zu basolaterale PM, Transport in polarisierten Zellen
Rab9	Späte Endosomen, TGN	Späte Endosomen zu TGN
Rab10	Golgi und post-Golgi Vesikel	Basolateraler Proteintransport von Golgi und TGN
Rab11	TGN, Rezyklosomen, post-Golgi Vesikel	Transport von Golgi über Rezyklosomen bei apikalem und basolateralem Recycling
Rab13	TJs polarisierter Epithelzellen	TJ-Aufbau TJs in Epithelzellen
Rab15	Frühe Endosomen und Rezyklosomen	Inhibitor endozytischer Internalisation
Rab 24	ER, cis-Golgi, späte Endosomen	Bildung von Autophagosomen (zusammen mit Rab33)

(Bhuin and Roy, 2014; Martinez and Goud, 1998; Stenmark, 2009); TJ – *tight junction*, PM – Plasmamembran, TNG – trans-Golgi-Netzwerk, ER – endoplasmatisches Retikulum.

Makroautophagie (im Folgenden Autophagie genannt) ist ein Prozess, über welchen Aggregate aus dem Zytoplasma verdaut werden. Die Biogenese von Autophagosomen wird durch PI(3)P reguliert (Blommaart 1997). In einer spezialisierten, PI(3)P-reichen Region des endoplasmatischen Retikulums wird das Omegasom induziert (Tooze and Yoshimori, 2010), aus welchem zunächst ein flaches, einwandiges Vesikel, der Phagophor, entsteht. Dieser wird verlängert und umschließt ein Aggregat, worauf die Seiten des Phagophors verschmelzen und so ein doppelwandiges Vesikel bildet, das fertige Autophagosom. Anschließend erfolgt der Transport zum Lysosom, wo die äußere Membran mit der lysosomalen Membran fusioniert und die innere Membran zusammen mit dem Vesikelinhalt verdaut wird (Mizushima et al., 2002). *Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3* (LC3) ist ein Markerprotein für Autophagosomen. Die zytosolische Form (LC3-I) wird N-terminal lipidiert (LC3-II) und in die Autophagosomenmembran inseriert. Es lokalisiert sowohl an der inneren, als auch an der äußeren

Autophagosomenmembran. Nach Fusion mit dem Lysosom wird das an der inneren Membran gebundene LC3 verdaut, während das LC3 von der äußeren Membran gelöst wird (Kimura et al., 2007). Jedoch hat sich heraus gestellt, dass nicht nur das endoplasmatische Retikulum Ort der Autophagosomen Biogenese ist, sondern auch andere zelluläre Membranen, unter anderem die Plasmamembran. Das *autophagy related protein 16L* (ATG16L) interagiert mit der schweren Clathrin-Kette und induziert die Entstehung von Phagophoren an der Plasmamembran (Ravikumar et al., 2010).

1.3.3. Regulation der Claudin-Zusammensetzung durch Endozytose

Bei der Regulation der Claudin-Zusammensetzung in der Membran spielt Endozytose von Claudinen eine wichtige Rolle. Der Endozytoseweg ist dabei abhängig vom Claudin-Subtyp, Zelltyp und Stimulus. So wird zum Beispiel Cldn5 in Endothelzellen über den Caveolin-abhängigen Weg endozytiert, etwa nach einem Schlaganfall (Liu et al., 2012), oder nach Behandlung mit dem Zytokin CC-chemokine ligand 2 (CCL2) (Stamatovic et al., 2009). In Epithelzellen wird Cldn1 nach Behandlung mit Interferon- γ über einen Endozytoseweg internalisiert, der dem der Makropinozytose ähnelt (Bruewer et al., 2005) und findet sich dann in frühen Endosomen und Rezyklosomen. Nach Kalzium-Entzug wird Cldn1 dagegen zusammen mit Cldn4 Clathrin-abhängig in eine bisher nicht charakterisierte Art von Vesikel internalisiert (Ivanov et al., 2004), welches positiv für Syntaxin-4 ist, aber negativ für Marker später Endosomen, Rezyklosomen, Golgi oder Lysosomen. Cldn4 wird auch nach Carbachol-Behandlung über den Clathrin-abhängigen Weg endozytierte (Cong et al., 2015). Des Weiteren führt Depolymerisierung der Aktinfilamente zur Endozytose von Occludin über den Caveolin-abhängigen Weg und zum Verlust der Barrierefunktion gegenüber Ionen (Shen and Turner, 2005). Neben der Stimulus-induzierten Herunterregulierung von Claudinen wurde aber auch konstitutives Recycling von Cldn1 und -2 nachgewiesen (Dukes et al., 2011). Zusammen mit der Mobilität eines Teils der Claudine im stabilen Zustand der TJs lässt sich schlussfolgern, dass die TJs keine starren Barrieren sind. Es erfolgt ein kontinuierlicher *turn-over* von Claudinen, welcher aber die Barrierefunktion nicht beeinflusst (Shen et al., 2008).

Für die Regulierung von Claudin-Endozytose gibt es Hinweise auf den Einfluss von Phosphorylierungen. Die Internalisierung von murinem Cldn2 wird nach Phosphorylierung an S208 verringert (Van Itallie et al., 2012). Phosphorylierung von murinem Cldn4 an S195, bzw.

humanem Cldn4 an dem korrespondierenden S194 wird für die TJ-Lokalisation von Cldn4 benötigt (Aono and Hirai, 2008). In vivo gingen unter inflammatorischen Bedingungen Veränderungen in der Phosphorylierung verschiedener Claudine (Cldn3, -5, -6 und -7) mit der Permeabilität der TJs einher (Li et al., 2015).

Der Abbau von Claudinen kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. In Endothelzellen konnte für humanes Cldn5 eine Polyubiquitinierung am K199 nachgewiesen werden und anschließender proteasomaler Abbau, aber auch lysosomaler Abbau (Mandel et al., 2012). In epithelialen Zellen wurde für Cldn1 auch eine Ubiquitinierung nachgewiesen, welche zu lysosomalem Abbau führt (Takahashi et al., 2009). Dephosphorylierung von Cldn1 und Cldn2 führt zur Internalisierung beider Claudine und Abbau über das Lysosom (Fujii et al., 2016).

1.3.4. Modulation der TJ durch Claudin-abgeleitete Peptide

Zu den bisher noch nicht diskutierten Modulatoren von TJs gehören Claudin-abgeleitete Peptide, welche zur Internalisierung von Claudinen führen (Tscheik et al., 2013). So führt ein kurzes Peptid, welches auf einer Sequenz der zweiten EZS basiert (DFYNP), zur spezifischen Internalisierung von Cldn3 und Cldn4 (Baumgartner et al., 2011). Das analoge Cldn2-Peptid (DFYSP) führt zu einer spezifischen Internalisierung von Cldn2 und dessen Abbau via dem Lysosom (Ikari et al., 2015). Auch Peptide, welche auf der Sequenz der ersten EZS basieren können zur Modulation der TJs eingesetzt werden. Cldn1 abgeleitetes Peptid erhöht die parazelluläre Permeabilität in Zellkulturmodellen und wurde *in vivo* zur Verbesserung des Transportes eines Analgetikums über das Perineurium eingesetzt (Zwanziger et al., 2012a). Für Cldn1 und Cldn5 abgeleitete Peptide konnten gezeigt werden, dass deren Aufnahme in epithelialen HEK-293-Zellen abhängig von der Expression von Claudinen ist und das Peptid intrazellulär mit Claudinen kolokalisiert (Zwanziger et al., 2012b). Cldn1 abgeleitetes Peptid wird in epithelialen HEK-293-Zellen vornehmlich über Clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen, während Cldn5 abgeleitetes Peptid in endothelialen bEND-3-Zellen vor allem über Caveolin-vermittelte Endozytose internalisiert wird. Cldn1 abgeleitetes Peptid führt in HEK-239-Zellen zu einer Umverteilung von Cldn1 und Cldn5, aber nicht von Cldn2, Cldn3 oder Cldn4 von der Membran ins Zytoplasma (Staat et al., 2015). In Zellen mit intaktem TJ-Apparat bewirkt das Peptid eine reversible Umverteilung von Cldn1 bis -5, sowie von Occludin von der

Membran in zytoplasmatische Vesikel. Diese Peptide binden mit hoher Affinität an Claudine, für Cldn1 und -5 wurden Affinitäten im nanomolaren Bereich gemessen (Dabrowski et al., 2015).

1.4. Zielstellung

Der Stand der Forschung deutet darauf hin, dass es einen kontinuierlichen *turn-over* von TJs gibt. Die Mechanismen des TJ-Umbaus und die Abbauege der TJ-Proteine sind allerdings nur unzureichend geklärt. Verschiedene Stimuli, die zur Internalisierung von Claudinen führen können, sind gut beschrieben (Utech et al., 2010). Allerdings gibt es nur wenige Untersuchungen zu Abbauegen und zu konstitutiver Internalisierung (also des TJ-Remodeling unter physiologischen Bedingungen) von Claudinen. Außerdem sind die Mechanismen, über welche Claudine endozytiert werden, noch ungenügend untersucht.

TJs sind funktionell stabil, ihre molekularen Bestandteile sind aber durch eine hohe Dynamik gekennzeichnet. Einerseits werden Claudine kontinuierlich erneuert, zum Beispiel durch Recycling aus TJ-freien Membranbereichen (Dukes et al., 2011) oder durch *de novo*-Synthese von Claudinen. Andererseits sind TJs durch starke *cis*- und *trans*-Assoziationen zwischen bestimmten Claudinen gekennzeichnet. Dabei fällt eine relativ geringe Mobilität vieler abdichtender Claudine in der Membran auf. Besonders der Einfluss der EZS-vermittelten *trans*-Interaktionen auf die Endozytose von Claudinen aus den TJs ist völlig unklar. Die extrazellulären Segmente müssten entweder im extrazellulären Bereich voneinander getrennt werden, oder beide Zellmembranen müssten aneinanderhaftend endozytiert werden. Hinweise auf doppelwandige Vesikel im Zusammenhang mit Claudin-Endozytose sind zwar gegeben (Matsuda et al., 2004), allerdings ist der Mechanismus, wie diese entstehen, unbekannt. Außerdem konnte bisher die Lokalisation von Claudinen in diesen Vesikeln nicht nachgewiesen werden.

Experimente mit Cldn1-Peptidomimetika in HEK-293-Zellen, welche nur einen Claudin-Subtyp exprimieren, zeigen eine selektive Wirkung des Peptids auf Cldn1 und -5 (Staat et al., 2015). Allerdings geht diese Spezifität in Epithel- und Endothelzellen, welche eine größere Palette an Claudinen exprimieren, verloren und es kommt nach Behandlung mit Cldn1-Peptid zur Umverteilung von Cldn1 bis -5 sowie Occludin von der Membran ins Zytoplasma. Dies spricht für einen Einfluss heterologer Claudin-Wechselwirkungen auf deren Endozytose, allerdings gibt es bisher keine Untersuchungen zu diesem Thema.

In dieser Arbeit soll daher (I) der Einfluss von Claudin-Interaktionen auf deren Endozytose, anhand der Cldn5-AS-Substitutionen F147A und Q156E untersucht werden. Sowohl Cldn5_{F147A} als auch Cldn5_{Q156E} zeigen reduzierte *trans*-Interaktionen (gemessen anhand fehlender Anreicherung an Zellkontakten), die *cis*-Interaktionen mit Wildtyp Cldn5 waren jedoch nicht beeinträchtigt (Piontek et al., 2008). Zum anderen soll (II) der Prozess der *cross-over* Endozytose von Claudinen in die Nachbarzelle genauer charakterisiert werden. Dazu soll der Einfluss verschiedener Endozytosewege, der Abbauweg der Claudine und die Struktur der resultierenden Vesikel untersucht werden. Außerdem soll (III) analysiert werden, ob die *cross-over* Endozytose spezifisch für einzelne Claudine ist. Zusätzlich soll (IV) geklärt werden, auf welchem Weg Claudin-abgeleitete Peptide in die Zelle gelangen, speziell, ob sie zusammen mit Claudinen aus den TJs oder zusammen mit freien Claudinen internalisieren, welche nicht in der TJ eingebaut sind.

Insgesamt soll mit dieser Arbeit ein Beitrag zum besseren Verständnis der TJ-Dynamik geleistet werden, da deren Modulation bzw. Regulation große Bedeutung für die Barrierefunktion von Zellkontakten hat.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte und Material

Im Folgenden werden die verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmittel (Tabelle 2.1), Antikörper (Tabelle 2.2), Enzyme (Tabelle 2.3), Zellen und Bakterien (Tabelle 2.4), Inhibitoren (Tabelle 2.5), Puffer und Lösungen (Tabelle 2.6), sowie die Geräte (Tabelle 2.7) aufgelistet.

Tabelle 2.1: Chemikalien und Verbrauchsmittel

Bezeichnung	Hersteller
AccuPol DNA Polymerase + Buffer	VWR, Radnor, USA
Aceton	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Acrylamid/Bisacrylamid Mischung 30%	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Agarose	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, Hercules, CA, USA
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Benzonase	Merck Bioscience, Darmstadt, Deutschland
bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Deckgläser Durchmesser 12 mm und 30 mm	Cotech Vertriebs GmbH, Berlin, DE
Digitonin	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DNA-Marker (100bp-GeneRuler™; 1kb DNA-Marker GeneRuler™; dNTPs)	Fermentas, St.-Leon-Rot, Deutschland
dNTP Mix (100 mM)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + GlutaMAX mit 1 g/L D-Glucose,	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol unvergällt	Berkel AHK Alkoholhandel GmbH & Co. KG, Ludwigshafen, DE
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
FACS- Röhrchen mit Zellfilter-Deckel (BD Falcon tubes, 5 ml, Polystyrene)	BD Biosciences, San Jose, USA
Falcon 10 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Falcon 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Fötales Kälberserum (FKS)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
G418	Biochrom
Geneticin (G418)	Biochrom, Berlin, DE
Glycerol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Glyzerin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Immu-Mount	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Isopropanol	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Kanamycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kryoröhrchen 1,2 ml	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Lucifer Yellow (LY)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Luria Broth (LB)-Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Luria Broth (LB)-Medium	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lysotracker DND99	Life Technologies, Darmstadt, DE
Methanol	VWR, Darmstadt, DE
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Millicell hängende Zellkultureinsätze (PIHT 12R 48)	Millipore
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	SERVA, Heidelberg, DE
Objektträger 76 x 26 mm, geschliffen 90°, Mattrand	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
<i>Opti-minimal essential</i> -Medium (Opti-Mem)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
PageRuler	
Parafilm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Pasteurpipette Gesamtlänge 230 mm	Glaswarenfabrik Karl Hecht "Assistent", Sondheim/Rhön, DE
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Pipettenspitzen 10 - 1000 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Plasmid Plus Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, DE
Plasmid Plus Midi Kit	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Polyethylenimin (PEI)	Polyscience, Eppelheim, DE
Poly-L-Lysin (PLL)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
ProLong Gold	Life Technologies, Darmstadt, DE
Rattenschwanzkollagen	Roche, Mannheim, DE
Salzsäure	Merck, Darmstadt, DE
Serologische Pipetten 1 ml, 2 ml	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
SignalSilence LC3B siRNAI	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
SYBR Safe DNA Gel Stain	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Transferpipette 3,5 ml, Polyethylen Low Density	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
TritonX-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween20	
Zellkulturflaschen Filterdeckel 25 cm ² , 75 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Zellkulturplatten Version F 6 well, 24 well, 96 well	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
ZR Plasmid miniprep Classic	Zymo Research Corporation, Irvine, CA, USA
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research Corporation, Irvine, CA, US

Tabelle 2.2: Verwendete Antikörper.

Primärantikörper (Bestellnummer)	Spezies	Hersteller
Anti-Atg16 (4425)	Kaninchen	ProSci Inc. Poway, USA
Anti-Claudin-1 (51-9000)	Kaninchen	Life Technologies, Darmstadt, DE
Anti-Claudin-2 (51-6100)	Kaninchen	Life Technologies, Darmstadt, DE
Anti-Claudin-5 (34-1600)	Kaninchen	Life Technologies, Darmstadt, DE
Anti-Claudin-7	Kaninchen	

Anti-GAPDH (MCA4740G)	Maus	AbD Serotec, Puchheim, DE
Anti-Lamp1 (3629)	Kaninchen	ProSci Inc. Poway, USA
Anti-LC3/MAPLC3A (100-2331)	Kaninchen	Novus
Anti-LC3A/B (4108S)	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-MAP1LC3A (7579)	Kaninchen	ProSci Inc. Poway, USA
Anti-MAP1LC3B (7581)	Kaninchen	ProSci Inc. Poway, USA
Anti-Occludin (33-1500)	Maus	Life Technologies, Darmstadt, DE
Anti-zonula occludens protein-1 (33-9100)	Maus	Life Technologies, Darmstadt, DE
Rab Family Ab Sampler Kit: Rab4, Rab5, Rab7, Rab9, Rab11, Lamp1 (9385S)	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Sekundärantikörper (Bestellnummer)	Spezies	Hersteller
Anti-Kaninchen Alexa Fluor 647-Konjugat (A-21244)	Ziege	Life Technologies, Darmstadt, DE
Anti-Kaninchen Meerrettich-Peroxidase (STAR208P)	Ziege	Bio-Rad, Hercules, USA
Anti-Maus Alexa Fluor 647-Konjugat (A-21236)	Ziege	Life Technologies, Darmstadt, DE
Anti-Maus-Meerrettich-Peroxidase (STAR207P)	Ziege	Bio-Rad, Hercules, USA

GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; Rab, *Ras-related protein*

Tabelle 2.3: Enzyme und zugehörige Puffer

Enzym/Puffer	Hersteller
FastDigest BamH1	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
FastDigest HindIII	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
FD Green Buffer 10x	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Proteinase K	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
T4 DNA Ligase Buffer 10x	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
T4-Ligase	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Tabelle 2.4: Zellen, Bakterien und Medienzusammensetzung

Zellen	Quelle	Medium	Trypsin
MDCK-II	(Staat et al., 2015)	DMEM 1g/ml Glukose, 10% FKS, 1% Pen/Strep	0,25%
HEK-293	(Piontek et al., 2011)	DMEM 1g/ml Glukose, 10% FKS, 1% Pen/Strep	0,05%
Escherichia coli (E.coli) DH5 α	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	LB-flüssig, LB-Agar	

* für stabile Linien wurde zusätzlich 1% G418 zum Medium gegeben.

Tabelle 2.5: Inhibitoren

Inhibitor	Ziel	Konzentration (Stock/ final)	Hersteller
Bafilomycin (Baf)	V-H ⁺ -ATPase-Inhibitor	100 μ M in DMSO/ 100 nM	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Chloroquin (CQ)	Lysosomale Alkalinisierung	20 mM in H ₂ O/ 100 – 200 μ M	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Chlorpromazin (CPZ)	Clathrin-vermittelte Endozytose	25 mM in DMSO/ 50 μ M	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dynasore (Dyn)	Dynamamin	10 mM in DMSO/ 100 μ M	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Filipin III (F3)	Caveolae-vermittelte Endozytose	15,27 mM in DMSO/ 15,27 μ M	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
LY294002 (LY)	PI3-Kinase/ Autophagie Inhibition	100 mM in DMSO/ 100 μ M	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Rapamycin	mTOR/ Autophagie Induktion	100 μ M in DMSO/	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA

(Rap)		50 – 500 nM	
YM201636	PIKfyve-Kinase/ Autophagie	1 mM in DMSO/	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
(YM)	Inhibition	1 µM	

* die Inhibitoren wurden in zellspezifischem Medium gelöst und appliziert

Tabelle 2.6: Verwendete Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
Blockpuffer BSA	5% BSA in PBS-T pH 7,4
Blockpuffer Milchpulver	5% Milchpulver in TBS-T pH 7,4
Extraktionslösung	5% TritonX-100, 0,04 N HCl, 93% Isopropanol
<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺ (HBSS +/+)	140 mg/L CaCl ₂ , 100 mg/L MgCl ₂ x 6 H ₂ O, 100 mg/L MgSO ₄ x 7 H ₂ O, 400 mg/L KCl, 60 mg/L KH ₂ PO ₄ , 350 mg/L NaHCO ₃ , 8 g/L NaCl, 48 mg/L Na ₂ HPO ₄ , 1 g/L D-Glucose pH 6.7 - 7.8 / Gibco by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
KHM-Puffer	110 mM Kaliumacetat, 20 mM HEPES, 2 mM MgCl ₂ pH 7,4
Laufpuffer	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0,1% SDS pH 8,3
Lysepuffer	5% Glycerol, 20mM Tris, 100mM NaCl, 1mM MgCl ₂ , 0,1% Tx-100, pH 7,5
MTT-Lösung	5 mg/ml MTT in PBS
Phosphatgepufferte Salzlösung mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺ (PBS +/+)	8 g/L NaCl, 200 mg/L KCl, 1,15 g/L Na ₂ HPO ₄ , 200 mg/L KH ₂ PO ₄ , 100 mg/L MgCl ₂ x 6 H ₂ O, 100 mg/L CaCl ₂ , pH 7,4 / Biochrom AG, Berlin, DE
Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ (PBS -/-)	8 g/L NaCl, 200 mg/L KCl, 1,15 g/L Na ₂ HPO ₄ , 200 mg/L KH ₂ PO ₄ pH 7,4 / Biochrom AG, Berlin, DE
Probenpuffer (5 x)	0,225 M Tris-Cl, pH 6,8, 50% Glycerol, 5% SDS, 0,05% Bromphenolblau, 0,25 M DTT
Sammelgelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
Stripping Puffer	15 g Glycin, 1 g SDS, 10 ml Tween20, pH = 2.2, auf 1 l auffüllen
TBST	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,4
Transferpuffer	25 mM Tris-HCl, 190 mM Glycin, 20% Methanol, pH 8,3
Trenngelpuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
Trypsin 0,05%	0,05% Trypsin, 0,02% Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung/ Life Technologies, Darmstadt, DE
Trypsin 0,25%	0,25% Trypsin, 0,02% Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung/ Life Technologies, Darmstadt, DE

Tabelle 2.7: Geräte.

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe Vacumat 130-K	H. Saur Laborbedarf, Reutlingen, DE
Agarosegel- Dokumentationskammer E.A.S.Y. 440 K	Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch, DE
Agarosegel-Kammer Owl Separation Systems, Model: B1A	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Bio-Rad Mini Protean Blot System	Bio-Rad, Hercules, USA
CellZscope	nanoAnalytics GmbH, Münster, DE
CO ₂ -Inkubator BB16	Heraeus Instruments, Hanau, DE
CO ₂ -Inkubator CB 210	Binder GmbH, Tuttlingen, DE
Durchflußzytometer BD FACSAria II	BD Biosciences, San Jose, USA
Elektrophorese Netzgerät Consort E835	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Elektroporationsküvetten 1 mm	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, DE
Elektroporator	Easyject Prima EquiBio/Thermo Electron, Milford, MA, USA
Gefrierbox Nalgene "Mr. Frosty" Freezing Container für	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

1-2 ml Kryoröhrchen	
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Heizplatte LHG Präzitherm Störk-Tronic	Störck GmbH & Co. KG, Stuttgart, DE
Kompaktschüttler KS 15 A mit Inkubationshaube	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, DE
Mikroskop IMT-2	Olympus Corporation, Tokyo, Japan ?
Mikroskop LSM 510 Meta - NLO	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, DE
Mikrowaage AT21 Comparator	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
Mikrowelle 8018	Privileg, Stuttgart, DE
Neubauer-Zählkammer Tiefe 0,1 mm	Paul Marienfeld, Lauda Königshofen, DE
Pipetten Pipetman Classic P2, P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
Pipetten Transferpipette S 1 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, DE
Pipettierhilfe pipet4u Oasis	AHN Biotechnologie GmbH, Nordhausen, DE
Plattenreader Safire	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Plattformschüttler Polymax 2040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwalbach, DE
Sicherheitsbrenner Fireboy eco	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald, DE
Spectrophotometer NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Sterilwerkbank Heraeus HS 12	Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA
Sterilwerkbank Laminar Flow Sicherheitswerkbank 1200	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, DE
Thermocycler PTC-100	MJ Research Inc., St. Bruno, Kanada
UV-Handlampe HL-6-MK	Bachofer
Vortexer MS2 Minishaker	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE
Vortexer VF2	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE
Waage MC 1 Laboratory LC 2200 S	Sartorius AG, Göttingen, DE
Waage PB1502-S	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
Wasserbad GFL	Victor Recker, Berlin, DE
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifuge Mini C- 1200	Labnet International Inc. Edison, NJ, USA

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Klonierung

Murines Cldn1 und -5, sowie die Mutanten Cldn5_{F147A} und Cldn5_{Q156E} wurden N-terminal mit YFP oder mTurquoise2 fusioniert. Die N-terminale Position wurde gewählt um eine Korrekte Lokalisierung der Proteine an der Plasmamembran zu gewährleisten, da sich C-terminal u.a. die Interaktions-Domäne für ZO-1 befindet. Dazu wurden Primer mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme HindIII und BamHI designt (Tabelle 2.8). Mittels Polymerase-Kettenreaktion wurden dann die Claudine aus den Ausgangsvektoren (Tabelle 2.9) mit den Schnittstellen amplifiziert und über ein Agarosegel aufgereinigt. Anschließend wurden sowohl die PCR-Produkte als auch die Vektoren peYFP-C1 und pmTurquoise2 mit den FastDigest

Enzymen BamH1 und HindIII in FD Green Buffer verdaut (45 min, 37 °C) und über ein Agarosegel aufgereinigt. Anschließend wurden Inserts und Vektoren (4:1 Ratio) mit T4-Ligase inkubiert (über Nacht, 16 °C). Nach der Ligation wurden elektrokompente *E. coli* DH5α mit den Konstrukten elektrotransformiert, in Antibiotikum-freiem LB-Medium geschüttelt (1 h, 37 °C) und anschließend auf Kanamycin-haltige Agarplatten ausplattiert. Nach Inkubation der Platten (über Nacht, 37°C) wurden einzelne Kolonien in flüssigem LB-Medium mit Kanamycin resuspendiert und bei 250 rpm kultiviert (über Nacht, 37°C).

Tabelle 2.8: Primer für die Klonierung.

Primer	Sequenz
Cldn1-fwd	5'- CACC AAGCTT CCATGGCCAACGCGGGGCTG
Cldn1-rev	5'- GCAG GGATCCT CACACATAGTCTTTCCCCTAGTA
Cldn5-fwd	5'- CATC AAGCTT CCATGGGGTCTGCAGCGTTG
Cldn5-rev	5'- GCAG GGATCCT TAGACATAGTTCTTCTTGTCGTA

Restriktionssequenzen: rot, HindIII; grün, BamH1.

Tabelle 2.9: Ausgangsvektoren für die Klonierung.

Vektor	Quelle	Resistenz	Anwendung
pEYFP-C1	Clontech	Kanamycin	Expressionsvektor
pmTurquoise2-C1	(Goedhart et al., 2012)	Kanamycin	Expressionsvektor
pCMV-SPORT6	Source BioScience (IRAVp968A105D)	Ampicillin	Cldn1 Vorlage
pCld5-mCherry	C. Tschek, FMP Berlin, unpubliziert	Kanamycin	Cldn5 Vorlage
pEYFP-Cldn5 _{F147A} -N1	(Piontek et al., 2008)	Kanamycin	Cldn5 _{mut} Vorlage
pEYFP-Cldn5 _{Q156E} -N1	(Piontek et al., 2008)	Kanamycin	Cldn5 _{mut} Vorlage

2.2.2. Proteinanalyse mittels Western Blot

2.2.2.1. Proben Aufbereitung

Die Zellen wurden in 6-well Zellkulturplatten ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz behandelt. Anschließend wurde zweimal mit PBS +/- (4 °C) gewaschen und die Proben in 1 ml PBS mit einem Zellkulturschaber von der Platte gelöst. Die Zellsuspension wurde bei 300 x g zentrifugiert (10 min, 4°C) und das Zellpellet in flüssigem Stickstoff gefroren, in der Hand aufgetaut und anschließend in Lysepuffer resuspendiert und fünfmal durch eine Kanüle (26 G) gezogen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 600 x g (10 min, 4 °C), der Überstand wurde abgenommen und das Pellet verworfen. Vor Auftragen der Proben auf das Polyacrylamid-Gel wurde Probenpuffer dazugegeben und die Proben auf dem Heizblock inkubiert (5 min, 95 °C). Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C.

2.2.2.2. SDS-PAGE und Proteintransfer

Die Proben wurden auf ein 12% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und in Biorad Mini-Protean System erst bei 80 V laufen lassen, bis die Lauffront das Trenngel erreichte, anschließend wurde die Spannung auf 120V erhöht. Als Marker wurde PageRuler Prestained oder PageRuler Prestained Plus aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde gestoppt, als die Lauffront fast den unteren Rand erreicht hatte. Das SDS-Gel wurde in Transferpuffer (15 min, 4 °C) equilibriert und anschließend mit dem Biorad Mini-Protean Wetblot-System (1 h, 100 V) auf eine Membran mit 0,2 µm Porengröße geblottet. Anschließend wurde die Membran in Milchpulver-Blocklösung inkubiert (45 min, Raumtemperatur) und mit Primärantikörper (Tabelle 2.10) inkubiert (über Nacht, 4 °C), anschließend in TBST gewaschen (4 x 10 min) und mit Sekundärantikörper inkubiert (1 h, 4 °C), worauf wieder Waschschrte mit TBST folgten (4 x 10 min) Alle Antikörper wurden in Milchpulver-Blockierlösung verdünnt, die Konzentrationen sind Tabelle 2.10 zu entnehmen. Anschließend wurde die Membran mit Lumilight Entwicklerlösung entwickelt und die Banden am Transilluminator detektiert. Die densitometrische Auswertung der Proteinbanden erfolgte mit ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Die Proteine wurden zunächst auf GAPDH normiert und anschließend auf den unbehandelten Wert. Die unterschiedlichen Proteine wurden auf derselben Membran immer in der gleichen Reihenfolge detektiert: LC3, GAPDH, Cldn5, Cldn1. Zwischen Cldn5 und Cldn1 Detektion wurde die Membran gestrippt (siehe 2.2.2.3).

Tabelle 2.10: Proteine und Antikörper im Western Blot.

Protein	Größe	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Cldn1	23 kDa	1:1000	1:5000
Cldn5	23 kDa	1:1000	1:5000
GAPDH	36 kDa	1:2000	1:5000
LC3-I/II	18/16 kDa	1:1000	1:2000
YFP	27 kDa	-	-

2.2.2.3. Membran-stripping

Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die Membran wurde mit Stripping Puffer inkubiert (2 x 10 min), dann mit PBS (2 x 10 min) und anschließend mit TBST (2 x 10 min) gewaschen. Darauf erfolgte ein erneuter Blockierschritt und Antikörperinkubation (vgl. 2.2.2.3).

2.3. Mikrobiologische Methoden

2.3.1. Kultivierung, DNA-Isolation und Kryostocks

Flüssiges Antibiotikum-haltiges LB-Medium wurde mit Bakterien aus Kryostocks oder von Agarplatten angeimpft und bei 250 rpm kultiviert (über Nacht, 37°C). Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit einem Plasmidaufreinigungskit isoliert, in H₂O eluiert und bei -20 °C gelagert. Für die Herstellung von Kryostocks wurde von dem über Nacht kultiviertem Bakterien-Ansatz 0,5 ml entnommen, mit 0,5 ml Glycerol (100%) gemischt und in Kryoröhrchen bei -80 °C gelagert.

2.3.2. Herstellung elektrokompenter Bakterien

Untransformierte *E. coli* DH5α wurden in 5 – 10 ml Antibiotikum-freiem LB-Medium bei 250 rpm kultiviert (über Nacht, 37°C). Diese Vorkultur wurde zu 1 l vorgewärmtem, Antibiotikum-freiem LB-Medium gegeben und bis zum Erreichen einer OD von 600 wachsen lassen (etwa 3 h). Die Bakterienkultur wurde in 250 ml Zentrifugengefäße überführt, 30 min auf Eis gekühlt und abzentrifugiert (3200 × g, 4 °C, 10 min). Der Überstand wurde verworfen, jedes Pellet in 80 ml H₂O (bidestilliert, 4 °C) resuspendiert, in zwei 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert (1500 × g, 4 °C, 15 min). Anschließend wurde der Waschschrift mit 40 ml H₂O pro Falcon wiederholt. Die Pellets wurden jeweils in 10 ml steriler Glycerollösung (10% in H₂O bidestilliert, 4 °C) resuspendiert, in zwei Falcon-Röhrchen gesammelt und abzentrifugiert (1500 × g, 4 °C, 15 min). Der Überstand wurde verworfen, die Pellets in 1 ml steriler Glycerollösung (10% in H₂O bidestilliert, 4 °C) und 50 µl Aliquots angefertigt, welche bei -80 °C gelagert wurden.

2.4. Zellbiologische Methoden

2.4.1. Kultivierung und Vermehrung von Zellen

MDCK-II- und HEK-293-Zellen wurden in Zellkulturflaschen bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens wurden die Zellen mit PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺

(PBS -/-) gewaschen und anschließen mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst (Konzentration und Medium vgl. Tabelle 2.4). Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche überführt oder auf Coverslips oder Zellkulturplatten ausgesät. Für die Kultivierung auf Coverslips wurden diese vor der Überführung der Zellen für 30 min mit einer Poly-L-Lysin-Lösung (20 µg/ml in PBS) beschichtet.

2.4.2. Transfektion und Herstellung stabiler Zelllinien

Für die Transfektion wurden Zellen auf 6-well Zellkulturplatten ausgesät und bei Erreichen von etwa 80% Konfluenz transfiziert. Für jedes Well wurden 10 µl PEI (1 mg/ml) mit 250µl Optimem gemischt, sowie 2 µg der Plasmid-DNA und 250 µl Optimem. Beide Ansätze wurden 5 min separat inkubiert, anschließend vereinigt und weitere 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde vorsichtig tropfenweise in das *Well* pipettiert und die Platte 16 h im Inkubator belassen. Anschließend wurden die Zellen wie oben beschrieben abgelöst und auf Coverslips überführt. Für die Herstellung stabiler Zelllinien wurden die Zellen nach der Transfektion in eine 25cm² Zellkulturflasche überführt und dem Medium G418 (500 µg/µl) zugesetzt. Dieses wurde regelmäßig gewechselt, bis die transfizierten Zellen zu einem Zellrasen zusammenwuchsen.

2.4.3. FACS-Sortierung transfizierter Zellen

Zur Erhöhung des Anteils der Zellen, welche das Zielprotein exprimieren, wurden stabil transfizierte MDCK-II-Zellen mittels Durchflusszytometrie sortiert. Die Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert, wie oben beschrieben abgelöst und resuspendiert und anschließend 4 min zentrifugiert (4 °C, 150 x g). Das Zellpellet wurde in PBS -/- mit 5 mM EDTA resuspendiert und weitere 4 min zentrifugiert und in 1 ml PBS -/- mit 5 mM EDTA aufgenommen. Nach Filtration in ein FACS-Röhrchen wurden die Zellen auf Eis gekühlt. Die Einstellungen für die Durchflusszytometrie wurden für alle YFP- bzw. TRQ-markierten Proteine konstant gehalten, um möglichst ähnliche Zellpopulationen zu erhalten. Als Negativ-Kontrolle für Auto-Fluoreszenz wurden untransfizierte MDCK-II-Zellen gemessen. Die fluoreszierenden Zellen wurden in 2 ml Zellkulturmedium aufgefangen, bei 150 x g abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und in eine 25 cm² Zellkulturflasche überführt.

2.4.4. Kryokonservierung

Die Zellen wurden wie oben erläutert kultiviert und abgelöst, anschließend zentrifugiert (4 min, 150 x g, 21 °C) und in Kryomedium (10% DMSO in FKS) resuspendiert. Anschließend wurden 500 µl Aliquots in Kryoröhrchen gefüllt und diese in einer Kryobox mit Isopropanol mit einer konstanten Kühlrate von 1 °C/min auf -80 °C abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Auftauen der Kryokulturen erfolgte im Wasserbad bei 37 °C, dann wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt um tote Zellen zu entfernen.

2.4.5. Zytotoxizitäts-Assay

Zur Bestimmung der Zytotoxizität der Inhibitoren erfolgte mittels eines MTT-Tests. Die Zellen wurden in 24-well Zellkulturplatten ausgesät und wie in den korrespondierenden Experimenten mit Inhibitor behandelt. Als Positivkontrolle wurde dem Medium 0,1% TritonX100 zugesetzt (15m, 37 °C, 10% CO₂) Anschließend wurden die Zellen mit HBSS^{+/+} gewaschen und mit 500 µl MTT-Lösung inkubiert (3 h, 37 °C, 10% CO₂). Diese wurde abgenommen und durch 300 µl Extraktionslösung ersetzt, die Zellen wurden 15 min auf einem Horizontalschüttler geschüttelt und das Lysat anschließend durch mehrmaliges auf und ab pipettieren gemischt. Die Absorption wurde am TECAN Plattenreader bei 570 nm bestimmt.

2.4.6. RNA-Interferenz

Für die RNA-Interferenz wurde si-RNA gegen humanes LC3 eingesetzt, welche laut Herstellerangaben zu 85% mit der caninen Sequenz übereinstimmte, da canine si-RNA nicht zur Verfügung stand. Die Bedingungen wurden an untransfizierten MDCK-II-Zellen und YFP-Cldn5 transfizierten Zellen etabliert. Die Transfektion erfolgte in Suspension mittels PEI. Die Zellen wurden wie in (2.4.1) beschrieben kultiviert und abgelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension mit dem Transfektionsansatz (10 µl PEI + 250 µl Optimem, 3 µl si-RNA + Optimem, vgl. 2.4.2) gemischt und auf einer Zellkulturplatte (3,5 cm) oder Deckgläschen (1,2 cm) ausgesät. Am

folgenden Tag wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 24 h bzw. 48 h die Zellen fixiert, oder für den *Western blot* vorbereitet.

2.5. Untersuchungen zu Endozytose

Madin-Darby canine kidney cells type II (MDCK-II) und *human embryonic kidney 293* (HEK-293)-Zellen sind epitheliale Zelllinien aus der Niere, welche gängige Zellkulturmodelle darstellen. Die embryonalen HEK-293-Zellen exprimieren endogen weder Claudine, noch ZO-1, während MDCK-II-Zellen eigene TJs ausbilden und mindestens einige endogene Claudine exprimieren, z.B. Cldn1 bis -4 und Cldn7, allerdings kein Cldn5. Zur Untersuchung der Endozytose von Claudinen wurden Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Claudin monotransfiziert, also entweder mit mTurquoise2 (TRQ)-Cldn oder *Yellow Fluorescent Protein* (YFP)-Cldn. Diese stabilen monotransfizierten Zelllinien wurden in TRQ-Cldn/YFP-Cldn Kokulturen auf Coverslips ausgesät und nach zwei Tagen Kultivierung behandelt. Dabei wurde YFP-Cldn und TRQ-Cldn in gleichen Verhältnissen, jeweils 1:6 – 1:10 (je nach Wachstumsgeschwindigkeit) sodass nach zwei Tagen Konfluenz erreicht wurde. Die Untersuchungen wurden an Zellen durchgeführt, welche Zellkontakte mit Zellen teilten, die das jeweils andere Fluorophor exprimierten. So konnte Claudin, welches aus der Nachbarzelle stammte anhand des Fluorophors identifiziert werden.

2.5.1. Pharmakologische Inhibition der Endozytose und des Vesikeltransports

Für die Inhibition der Clathrin-abhängigen Endozytose wurde Chlorpromazin (CPZ) eingesetzt. CPZ stört die Interaktionen zwischen Clathrin und dem AP2, und führt zu einer Umverteilung von Clathrin und AP2 von der Plasmamembran an endosomale Membranen (Wang et al., 1993). Filipin III (F3) interagiert mit Cholesterol in der Plasmamembran und führt so zu einer Inhibition der Caveolin-abhängigen Endozytose (Schnitzer et al., 1994). Gleichzeitig hat es eine Autofluoreszenz und kann somit auch als Marker für Cholesterol genutzt werden (Maxfield and Wustner, 2012). Außerdem wurde Dynasore eingesetzt, einem spezifischen Inhibitor von Dynamamin, welches für die Abschnürung der Vesikel von der Plasmamembran in Clathrin- und Caveolin-abhängiger Endozytose benötigt wird (Macia et al., 2006).

Durch Chloroquin (CQ), eine schwache membrangängige Base, welche in sauren Organellen akkumuliert, kommt es zu einer Alkalinisierung des Lysosoms (Misinzo et al., 2008).

Gleichzeitig kommt es zu einer starken Vergrößerung der Lysosomen und einer verringerten Proteindegradation, da die lysosomalen Enzyme, welche einen niedrigen pH-Wert benötigen, gehemmt werden (de Duve et al., 1974). Der lysosomale Abbau wird auch durch Bafilomycin gehemmt. Bafilomycin hemmt die V-H⁺-ATPase Protonenpumpe (Crider et al., 1994), welche die Azidifizierung von Endosomen bewirkt (Yoshimori et al., 1991). Zusätzlich hemmt es die Fusion von Endosomen und Autophagosomen mit dem Lysosom (Mauvezin et al., 2015). YM201636 ist ein Inhibitor der PIKfyve Kinase (Ikonomov et al., 2009), welche an der Initiation von Autophagie beteiligt ist (Vicinanza et al., 2015). LY294002 inhibiert PI3-Kinasen der Klasse III, welche in die frühe Phase der Autophagosomenbiogenese involviert sind (Balla, 2013). Rapamycin ist ein Autophagieinduktor, welcher über die Inhibition von mTOR die Aktivität von ATG-Proteinen erhöht (He and Klionsky, 2009).

Lysotracker wurde im Verhältnis 1:10.000 eingesetzt. Die Inhibitoren wurden in den oben angegebenen Lösungsmitteln gelöst, in den angegebenen Konzentrationen (Tabelle 2.5) dem Zellkulturmedium zugesetzt und durch vorsichtiges auf und ab pipettieren vermischt. Die Kontrollzellen wurden entweder mit der entsprechenden Menge DMSO oder Wasser behandelt.

2.5.2. Peptide

Es wurden Cldn1, -2 und -5 abgeleitete Peptide untersucht, deren Sequenz mit dem N-terminalen Teil der ersten EZS übereinstimmt. Die Cysteine wurden dabei durch Serine ausgetauscht. Die Peptide wurden in der AG Beyermann (FMP Berlin) synthetisiert und aufgereinigt. Die Peptide wurden in DMSO gelöst und anschließend 1:100 in Zellkulturmedium verdünnt. Tetramethyl-6-Carboxyrhodamin (TAMRA)-markiertes Peptid wurde einer finalen Konzentration von 10 µM eingesetzt, unmarkiertes Peptid in einer Konzentration von 300 µM.

Tabelle 2.11: Peptide.

Name	Ursprung	Sequenz	Konzentration
C5C2	Murines Claudin5(53-81)	SSVVQSTGHMQSKVYESVLALSAEVQAAR-NH ₂	300 µM
TAMRA-C1C2	Murines Claudin1(53-81)	TAMRA-SSVSQSTGQIQSKVFDSLLNLNSTLQATR-NH ₂	10 µM
TAMTA-C2C2	Murines Claudin-2(53-81)	TAMRA-ESATHSTGITQSDIYSTLLGLPADIQAAQ-NH ₂	10 µM
TAMRA-C5C2	Murines Claudin5(53-81)	TAMRA-SSVVQSTGHMQSKVYESVLALSAEVQAAR-NH ₂	10 µM

2.6. Funktionelle Messungen

2.6.1. Aussaat von Zellen auf Zellkultur-Inserts

Zur Aussaat der Zellen auf Zellkultur-Inserts wurden die Zellen wie beschrieben abgelöst und resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl/ml in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Pro Insert wurden 80.000 Zellen in 500 ml Medium ausgesät. Die Inserte wurden mit Rattenschwanzkollagen in PBS (Konzentration) beschichtet, wobei 150 µl Collagen-Lösung in jedes Insert gegeben wurde und über Nacht auf der Heizplatte getrocknet wurde. Die so vorbereiteten Inserte wurden vor Zugabe der Zellsuspension mit Zellkulturmedium equilibriert (2 h, 37 °C, 10% CO₂). Die Zellzahl wurde in einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

2.6.2. Messungen des transepithelialen elektrischen Widerstands (TER)

TER-Messungen erlauben Aussagen über die Durchlässigkeit der Zellbarriere für Ionen. Nach Aussaat der Zellen in den Zellkultur-Inserts wurden diese in das Cellscope überführt und der Außenbereich mit Medium aufgefüllt, allerdings ohne dass es zum Kontakt zwischen dem Innen- und Außenbereich kam. Der TER wurde nach Aussaat der Zellen einmal pro Stunde gemessen und die Messungen dauerten 6 Tage an.

2.6.3. Messung der Permeabilität

Da Cldn5 die Barriere gegen den Durchtritt von Molekülen < 800 Da abdichtet (Nitta et al., 2003), wurden Permeabilitätsmessungen mit *Lucifer Yellow*, einem etwa 450 Da großen fluoreszenten Farbstoff durchgeführt. Nach Messung der TER-Werte wurden die Zellkultur-Einsätze vom Cellscope in eine 24-well Zellkulturplatte transferiert und zweimal mit HBSS^{+/+} gewaschen (alle Schritte erfolgten bei 37 °C). *Lucifer Yellow*-Lösung wurde in das apikale Kompartiment pipettiert (200µl, 200 µM in HBSS^{+/+}), während basolateral 1 ml HBSS^{+/+} zugegeben wurde. Nach Inkubation (10 min, 37 °C, 10% CO₂) wurden die Zellkultureinsätze in eine Platte mit frischem HBSS^{+/+} überführt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt und von jedem Zeitpunkt 80 µl in Triplikat in eine 96-well-Platte überführt, zusammen mit einer Standardreihe. Die Fluoreszenz wurde mit dem Tecan Plattenreader analysiert (Anregung:

425nm, Detektion: 520 nm) und die Lucifer Yellow Konzentrationen anhand der Standardreihe bestimmt. Der Permeationskoeffizient (P_{LY}) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$P_{LY} = \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{1}{A \cdot C \cdot 60} \text{ (cm/s)}$$

Wobei dQ/dt die Menge an diffundiertem Lucifer Yellow ($\mu\text{g}/\text{min}$), A die Fläche des Einsatzes (cm^2) und C die initiale Konzentration von Lucifer Yellow ($\mu\text{g}/\text{ml}$) darstellt.

2.7. Mikroskopie

2.7.1. Vorbereitung der Proben

2.7.1.1. Fixierung und Immunfluoreszenz

Die Zellen wurden auf einem Coverslip mit 1,2 cm Durchmesser ausgesät, nach der Behandlung zweimal mit PBS+/+ (4 °C) gewaschen und dann entweder mit PFA (4% in PBS mit 0,1% TritonX-100, 10 min, RT) oder mit einer Reihe aus Aceton, Ethanol 100% und PBS (5 min, 1 min, 1 min, alles auf Eis) fixiert. Anschließend wurden die Coverslips mit einer BSA-Blockierlösung (Tabelle 2.6) inkubiert (15 min, RT). Die primären Antikörper (Tabelle 2.2, Tabelle 2.12) wurden in Blockierlösung auf die Zellen gegeben (4 °C, über Nacht). Nach Behandlung mit dem primären Antikörper wurden die Zellen mit PBS 0,1% TritonX-100 gewaschen (4 x 2 min), anschließend erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Alexa-647-konjugierten sekundären Antikörper (Tabelle 2.2) in Blockierlösung (1 h, RT, 1:250 verdünnt). Dann wurden die Waschschrte wiederholt und die Coverslips in Immu-Mount auf einem Objektträger eingebettet. Für *stimulated emission depletion* (STED)-Mikroskopie wurde zum Einbetten ProLong Gold benutzt. Nach Trocknen der Proben (15 min, 37 °C auf der Heizplatte) wurden die Objektträger bei 4 °C gelagert. Für ProLong Gold eingebettete Proben wurden die Proben zusätzlich vor der Mikroskopie mindestens eine Woche im Kühlschrank trocknen lassen.

Tabelle 2.12: Antikörper für Immunfluoreszenzen

Antikörper	Verdünnung
Anti-Atg16	1:100
Anti-Claudin-1	1:200
Anti-Claudin-2	1:200
Anti-Claudin-5	1:200
Anti-Claudin-7	1:200
Anti-Lamp1 (ProSci)	1:100
Anti-LC3/MAPLC3A (Novus)	1:100

Anti-LC3A/B (Cell Signaling)	1:100
Anti-MAP1LC3A (ProSci)	1:100
Anti-MAP1LC3B (Prosci)	1:100
Anti-Occludin	1:200
Anti-zonula occludens protein-1	1:200
Rab Family Ab Sampler Kit: Rab4, Rab5, Rab7, Rab9, Rab11, Lamp1	1:100

2.7.1.2. Lebendzellmikroskopie

Für die Lebendzellmikroskopie wurden die Zellen auf großen Deckgläsern ($r = 1,5 \text{ cm}$) ausgesät (vgl. 2.4.1). Diese wurden einmal mit HBSS^{+/+} gewaschen und in eine Mikroskopier-Küvette eingespannt. Wenn nicht anders beschrieben wurden alle Messungen an lebenden Zellen in HBSS^{+/+} durchgeführt.

2.7.1.3. Gefrierbruchelektronenmikroskopie

Für die Gefrierbruchelektronenmikroskopie wurden HEK-293-Zellen, welche entweder mit Cldn5-YFP oder Cldn5_{F147A}-YFP transfiziert waren auf 25 cm² Zellkulturflaschen ausgesät (vgl. 2.4.1). Diese wurden vorher mit 5 ml PLL (20 µg/ml in PBS) für beschichtet (5 h, RT) und anschließend mit PBS^{+/+} gewaschen. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit PBS^{+/+} gewaschen und mit Glutaraldehyd (2,5% Glutaraldehyd in PBS^{+/+}) fixiert (2 h, RT). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS^{+/+} gewaschen die Zellkulturflasche mit PBS^{+/+} angefüllt und bei 4 °C gelagert. Die Gefrierbrüche und Mikroskopie wurden von Prof. H. Wolburg (Universität Tübingen, DE) durchgeführt.

2.7.2. Verwendete Mikroskope

Für alle Assays, mikroskopische Analysen der Vesikelzahlen und Kollokalisationsstudien wurde das konfokale Mikroskop Zeiss NLO mit einem Plan-Neofluar 100x 1.3 Öl-Objektiv (Zeiss, Oberkochen, DE) benutzt. TRQ wurde bei einer Wellenlänge von 458 nm, YFP bei 514 nm und Alexa647 bei 633 nm angeregt. Bei STED-Mikroskopie wird eine höhere Auflösung als bei konfokaler Mikroskopie erreicht indem durch einen Depletions-Laser unerwünschte Fluoreszenz unterdrückt wird. So lässt sich eine Auflösung von unter 100 nm herstellen, zusätzlich ist STED Mikroskopie auch für lebende Zellen geeignet. Für die STED-Mikroskopie wurde das Leica TCS 3X gSTED, Leica LASX Software und HC PL APO CS2 100x 1.4 Oil Objektiv (Leica, Wetzlar,

Germany) benutzt. TRQ wurde bei 405 nm angeregt und die Emission zwischen 440 nm und 513 nm detektiert. YFP wurde bei 514 nm angeregt und die Emission zwischen 519 nm und 581 nm detektiert, beide über HyD Detektoren (*time gated mode*, 0,3 - 6 ns) unter Einsatz eines 592 nm Depletionslasers.

2.7.3. Mikroskopie-basierende Assays

2.7.3.1. Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)-Analyse

HEK-293-Zellen wurden transient mit YFP-Cldn und TRQ-Cldn Plasmid kotransfiziert (jeweils 1 µg pro Plasmid-DNA pro Ansatz). Als Negativkontrolle wurde YFP-*corticotropin releasing factor receptor-1* (CRFR1) mit TRQ-Cldn5 transfiziert. CRFR1 kolokalisiert mit Zellkontakten, zeigt aber keine Interaktionen mit Cldn5. Nach Transfektion (vgl. 2.4.2) wurden die Zellen auf Deckgläser ($\varnothing = 3$ cm) überführt und zwei Tage wachsen lassen. FRET wurde mit der Methode des Akzeptor-Photobleichens gemessen (Abb. 2.1) (Van Munster et al., 2005).

Bei Fluorophoren kommt es unter bestimmten Bedingungen zu strahlungsfreiem Energietransfer. Im angeregten Zustand kann ein Fluorophor Energie auf einen anderen Fluorophor übertragen, wenn die Distanz zwischen den beiden gering genug ist (Försterradius). Innerhalb dieses Radius lässt sich aus der transferierten Energie ein Rückschluss auf die Distanz zwischen den Fluorophoren ziehen. Dieser Energietransfer findet allerdings nur statt, wenn die Anregungswellenlänge des Akzeptors mit der Abstrahlungswellenlänge des Donors überlappt. Der Donor strahlt nach Anregung kein Licht aus, sondern gibt die Energie an den Akzeptor weiter. In Anwesenheit eines Akzeptors strahlt der Donor also weniger Licht ab, allerdings nur, wenn die Fluorophore nicht weiter als 10 nm entfernt liegen. Durch Zerstörung des Akzeptors durch einen starken Laserimpuls gewinnt der Donor an Fluoreszenz, welche gemessen wird. Um die *cis*-Interaktionen zu messen, wurde YFP an Zellkontakten mit 12 Laserpulsen bei 100% Intensität gebleicht und vor jedem Puls die YFP und TRQ-Fluoreszenz gemessen. Es wurden nur Kontakte ausgewertet, welche jeweils ein ähnliches Verhältnis von YFP zu TRQ hatten, da dies die FRET-Effizienzen beeinflussen kann (Chen et al., 2006).

Tabelle 2.13: Mikroskopieeinstellungen für Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer.

	λ_A (nm)	λ_E (nm)	Intensität	Detektor gain
Bleichen	514	537-644	100%	600
TRQ	458	462-494	5,0%	695
YFP	514	526-644	1,0%	593

λ_A : Anregungswellenlänge; λ_E : Emissionswellenlänge

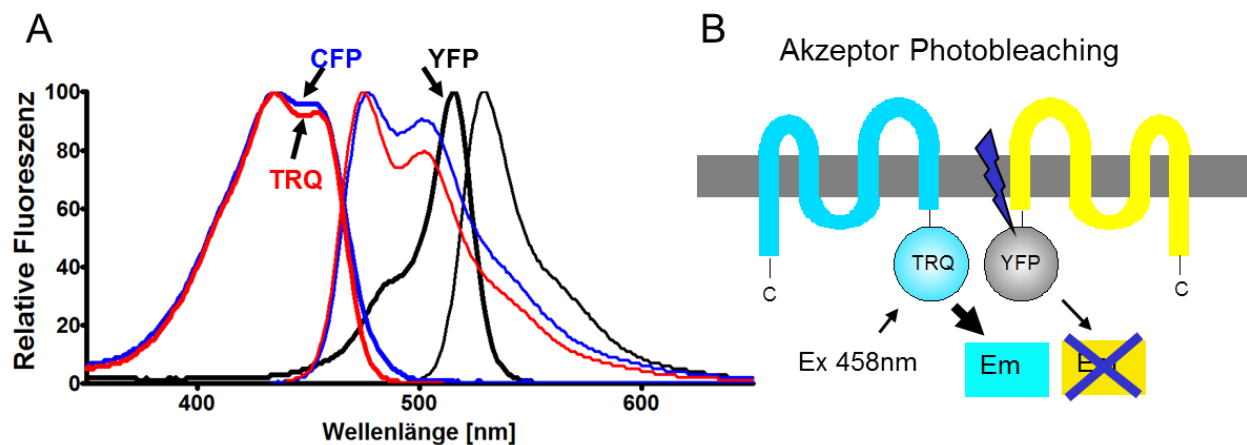


Abb. 2.1: Fluoreszenz Resonanz Energietransfer. A: Anregungs- und Emissionsspektren von CFP, mTurquoise2 und YFP. **B:** Energietransfer zwischen Donor und Akzeptor.

2.7.3.2. Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)

FRAP ist eine Methode zur Bestimmung der Mobilität von Proteinen in der Membran. Dabei wird ein Teil der Fluorophore durch einen hohen Laser-Impuls zerstört und anschließend die Rückkehr der Fluoreszenz an die gebleichte Stelle gemessen. FRAP wurde in Kokulturen YFP-Cldn oder TRQ-Cldn monotransfizierter MDCK-II-Zellen (vgl. 2.5) an Zellkontakten gemessen, welche von Zellen gebildet wurden, die unterschiedlich markierte Claudine exprimierten. Dieser Versuchsaufbau wurde gewählt, um nur Daten von jeweils einer einzelnen Zelle zu erhalten. Die Messungen wurden ausschließlich an YFP-Cldn durchgeführt, da TRQ wesentlich fotostabiler ist und nicht so schnell ausgebleicht werden kann. Zwischen den Messungen lag jeweils ein Intervall von 5 s, die Aufnahmen wurden mit geringer Laserintensität gemacht (514 nm, 0,5% Intensität, Detektion 535-590 nm). Für das Einstellen einer stabilen Ausgangsfluoreszenz wurden

5 Aufnahmen vor dem Bleichen gemacht. Das Bleichen erfolgte durch einen Impuls bei voller Laserintensität (1 s), anschließend wurden wieder Aufnahmen in 5 s – Intervallen aufgenommen.

2.7.3.3. Fluorescence Protease Protection (FPP) Assay

Der FPP-Assay beruht auf selektiver Permeabilisierung der Plasmamembran durch Digitonin und anschließendem Verdau von zytosolischen Proteinen durch Proteasen. Digitonin interagiert mit Cholesterol und interkaliert in der Membran, wodurch diese permeabel wird. Da die Plasmamembran eine weitaus höhere Konzentration an Cholesterol aufweist als endosomale Membranen hat Digitonin relativ geringe Effekte auf intrazelluläre Membranen (Plutner et al., 1992). So sind Proteine innerhalb der Organellen vor dem Verdau geschützt, während zytosolisches Protein abgebaut wird. Auf diese Weise lässt sich die Orientierung von Fluorophoren in der Vesikelmembran bestimmen. Der FPP-Assay wurde in Anlehnung an (Lorenz et al., 2006) durchgeführt. Auf Deckgläser ausgesäte MDCK-II-Zellen wurden mit KHM-Puffer gewaschen (3 x 1 min) und mit Digitonin (100 μ M in KHM-Puffer, 3 min) permeabilisiert. Anschließend wurde noch einmal kurz mit KHM-Puffer gewaschen und der Verdau mit Proteinase K (300 μ g/ml in KHM-Puffer, 26 min) gestartet. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Vor Beginn des Verdau wurde ein konfokaler *Z-stack* aufgenommen, sowie während der Proteolyse alle 2 min.

2.8. 3-D Strukturvorhersage von Claudinen

Die dreidimensionale Struktur der Proteine wurde mit I-TASSER (*Iterative Threading ASSEMBly Refinement*) berechnet. Dieses analysiert die eingegebene AS-sequenz anhand der Ähnlichkeit mit Proteinen in der Datenbank und erstellt mögliche Konformationen der Proteine Anhand des Vergleichs mit bekannten Kristallstrukturen (Roy et al., 2010). Kristallstrukturen von Claudinen sind bereits für Cldn15 und Cldn19 bekannt (Shinoda et al., 2016; Suzuki et al., 2014). Die vierte TM wird bei den meisten Claudinen von mehreren geladenen AS flankiert, welche den Übergang ins Zytoplasma markieren. Für die Strukturanalyse wurden die C-terminalen Bereiche der Proteine ab diesen geladenen AS nicht berücksichtigt. Die Darstellung der Strukturen wurde mit PyMOL bearbeitet (<https://www.pymol.org/>). Für die Cldn5-AS-substituenten wurde ein

alignment mit Cldn5 durchgeführt, für die Darstellung der humanen Pfam00822-Familie wurde mit der Cldn1-Struktur abgeglichen.

2.9. Auswertung

Alle Auswertungen wurden mit ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) durchgeführt. Um die Auswertungsprozesse zu automatisieren wurden Makros für die einzelnen Assays geschrieben. Wenn nicht anders dargestellt, wurden die TRQ-Signale ausgewertet, da YFP weniger foto- und pH-stabil ist und ein schwaches Dimer ausbildet, welches die Messungen verfälschen könnte. Die *region of interest* (ROI) wurde innerhalb der Zellmembran gelegt, um die membranständigen Claudine aus der Analyse auszuschließen. Die Diagramme wurden mit Graphpad Prism 5 erstellt.

2.9.1. Quantifizierung der Vesikelzahlen

Vesikelzahlen wurden in konfokalen Z-Stacks bestimmt (0,25 μm Intervallen zwischen den Ebenen). Da MDCK-II-Zellen oft unterschiedliche Ausdehnungen in den Ebenen hatten, wurde jede Ebene einzeln ausgewertet und die durchschnittliche Vesikelzahl pro Ebene bestimmt. Diese wurde für die Gesamtzahl der Vesikel auf den Zellumfang normiert und für die Anzahl der *cross-over* endozytierten Vesikel auf die Gesamtlänge der Zellkontakte, welche mit jeweils andersfarbigen Zellen geteilt wurde. Um die Hintergrundfluoreszenz aus anderen Ebenen zu reduzieren wurden nur Intensitäten oberhalb der Schwellenwerte einbezogen (TRQ, YFP = 70, Alexa647 = 40). Als Vesikel wurden Partikel interpretiert, welche einen Radius von $50 \text{ nm} < r < 500 \text{ nm}$ hatten. Für jedes Experiment wurden die alle Werte auf den Mittelwert der unbehandelten Probe normiert. Es wurden die Vesikelzahlen und nicht die mittlere Intensität analysiert, um ein Maß zu erhalten, das relativ unabhängig vom Expressionslevel ist. Außerdem können so einzelne Endozytose-Ereignisse quantifiziert werden, unabhängig von der Vesikelgröße und Intensität.

2.9.2. Kolokalisation mit Endosomenmarkern

Für die Kolokalisationsanalyse wurde eine Z-Projektion (nach maximaler Intensität berechnet) erstellt. Dabei wurden die konfokalen Z-Stacks auf eine gemeinsame XY-Ebene projiziert,

welche für die Auswertung der Kolo-kalisation genutzt wurde. Die Pearson- und Manders-Koeffizienten der einzelnen Zellen mit dem JACOP-Plugin von ImageJ berechnet. Für die Manderskoeffizienten wurden für die einzelnen Fluorophore Schwellenwerte gesetzt (YFP: 40; TRQ: 40; Alexa674: 20).

2.9.3. Quantifizierung der internalisierten Peptidmenge

In den einzelnen Ebenen wurde die durchschnittliche Intensität des intrazellulären Peptids bestimmt. Die Werte der Ebenen wurden gemittelt und die mittlere Intensität der unbehandelten Proben als Hintergrundfluoreszenz abgezogen.

2.9.4. Quantifizierung der degradierten Claudinmenge

Da sich die Zellen während der langen Aufnahme leicht aus dem Fokus bewegten, wurde für die Auswertung des FPP-Assays von jedem Z-Stack eine Projektion (nach maximaler Intensität) berechnet und zu jedem Zeitpunkt die mittlere Intensität des intrazellulären YFP-Cldn5 und TRQ-Cldn5 bestimmt. Um die Hintergrundfluoreszenz zu bestimmen wurden Zellen gemessen, welche keinen Kontakt zu Zellen mit dem jeweils anderen Fluorophor hatten und die mittlere Intensität der “nicht eigenen” Fluoreszenz gemessen (d.h. der Hintergrund für TRQ-Fluoreszenz wurde in YFP-Cldn5 exprimierenden Zellen gemessen). Für die Kurven wurde der Hintergrund von den mittleren Intensitäten abgezogen und alle Zellen ausgeschlossen, welche nach dem Verdau einen Endwert von weniger als Hintergrundintensität + Standardabweichung hatten. Für die Berechnung des verdauten Claudin-Anteils, wurde der Anteil (Endwert nach 14 Messzyklen), der durch das Bleichen des Fluorophors verloren ging, zum Endwert des abgebauten Claudins hinzugerechnet.

2.9.5. YFP-rescue Bestimmung

Für den YFP-rescue wurde eine Z-Projektion (nach maximaler Intensität berechnet) erstellt und die durchschnittliche Intensität des intrazellulären Claudins bestimmt. Durch die Vergrößerung der Vesikel nach CQ-Inkubation war es hier nicht sinnvoll nach Vesikeln oder Ebenen zu trennen, da sich die Lysosomen teilweise über mehrere Ebenen erstreckten.

2.9.6. Berechnung der *cis*-Interaktionen

Die FRET-Effizienzen (F_E) wurden nach der Formel $F_E = (I_A - I_B) * 100 / I_A$ berechnet und auf den Mittelwert der Cldn5-Messungen normiert, wobei I_A und I_B die TRQ-Intensitäten vor bzw. nach dem Fotobleichen des Akzeptors sind.

2.9.7. Bestimmung der mobilen Fraktion

Die FRAP-Auswertung erfolgte in Anlehnung an (Yguerabide et al., 1982). Die über die Zeit gemessenen Werte wurden nach der Formel $I_{rel}(t) = (I(t) - I_{Bleichen}) / (I_{vor} - I_{Bleichen})$ normiert, wobei I_{vor} und $I_{Bleichen}$ die gemessenen Intensitäten direkt vor und nach dem Bleichen des Zellkontaktes sind und $I(t)$ die zu einem bestimmten Zeitpunkt gemessene Intensität. Die relativen Intensitäten (I_{rel}) zu jedem Messpunkt wurden gemittelt als Diagramm dargestellt und die mobile Fraktion und Halbwertszeit durch einen *nonlinear curve fit* (einphasige Assoziation) berechnet.

2.9.8. Statistik

Alle statistischen Berechnungen wurden mit GraphPad Prism 5 durchgeführt. Ausreißer wurden mit Graphpad Quickcalcs Outlier calculator (<https://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>) bestimmt. Für Experimente mit mehr als zwei Gruppen wurde ein *one way* ANOVA (Kruskal-Wallis Test für nicht normalverteilte Daten, mit anschließendem Dunn's Test für multiple Vergleiche) durchgeführt. Bei Experimenten in denen nur zwei Gruppen verglichen wurden, wurde ein t-Test durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt, sofern nicht anders angegeben.

3. Ergebnisse

3.1. *Cross-over* Endozytose

Kokulturen von Zellen, welche Claudine mit unterschiedlichem Fluorophor exprimieren, wurden Vesikel welche Claudin aus der Nachbarzelle enthalten gefunden (Abb. 3.1). Dieses Phänomen wird in dieser Arbeit als *cross-over* Endozytose bezeichnet.

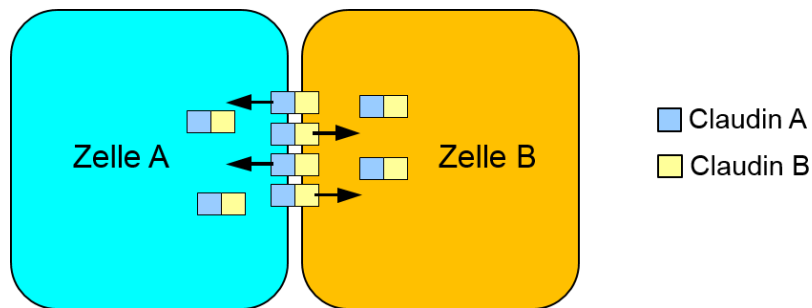


Abb. 3.1: Piktogramm der *cross-over* Endozytose. Claudine werden in die Nachbarzelle transportiert. Dieser Vorgang lässt sich aufgrund der Expression von Claudinen mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern sichtbar machen. Vgl. Abb. 3.2, Abb. 3.4 und Abb. 3.5.

3.1.1. In HEK-293-Zellen findet kaum *cross-over* Endozytose statt

Zunächst wurde die *cross-over* Endozytose in TJ-freien HEK-293-Zellen untersucht. In diesem Zellsystem können exogen exprimierte Claudine isoliert von anderen TJ-Proteinen betrachtet werden. Claudine reicherten sich in den Zellkontakten an und bildeten morphologisch unauffällige Zellkontakte aus. In YFP-Cldn5/mCherry-Cldn5 Kokulturen wurde selten *cross-over* endozytiertes Cldn5 in der Nachbarzelle gefunden (Abb. 3.2, Pfeilköpfe). Aufgrund des geringen Vorkommens *cross-over* endozytierter Vesikel sind HEK-293-Zellen jedoch nur begrenzt als Zellsystem zur Untersuchung dieser Art von Endozytose geeignet.

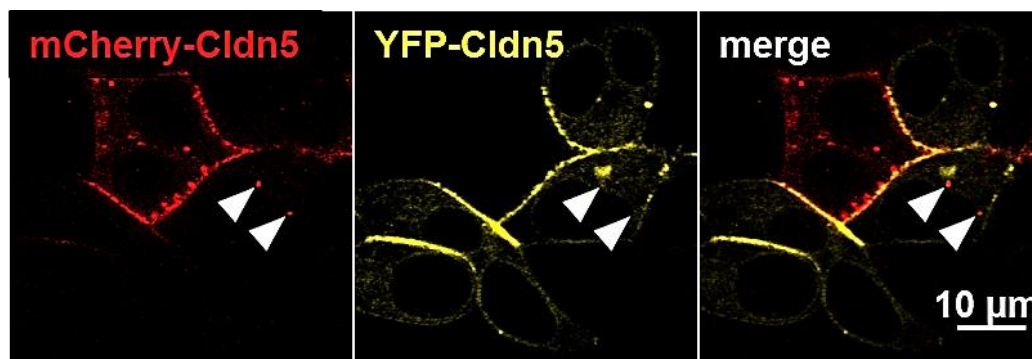


Abb. 3.2: *Cross-over* Endozytose in HEK-293-Zellen. In HEK-293-Zellen wurde transgenes Claudin-5 (Cldn5) an die Membran transportiert und reicherte sich an den Zellkontakten an. In YFP-Cldn5/mCherry-Cldn5 monotransfizierten Kokulturen wurde in manchen YFP-Cldn5-Zellen *cross-over* endozytiertes mCherry-Cldn5 gefunden (Pfeilköpfe).

3.1.2. *Cross-over* Endozytose in MDCK-II-Zellen

3.1.2.1. MDCK-II-Zellen als Zellsystem zur Untersuchung von *cross-over* Endozytose

MDCK-II-Zellen enthalten endogene TJs und exprimieren zumindest Cldn1, -2, -3, -4, und -7. Daher wurde die Expression von endogenem Cldn5 in diesen Zellen überprüft. Im *Western blot* ließ sich in YFP-Cldn1 oder YFP-Cldn5 exprimierenden Zellen eine klare Bande mit endogenem Cldn1 (Abb. 3.3) bei etwa 20 kDa detektieren, aber kein endogenes Cldn5 (unbeschrifteter Pfeil). Dagegen fand sich in YFP-Cldn5 exprimierenden Zellen in der Färbung gegen Cldn5 eine Bande bei etwas über 40 kDa, diese fehlte in YFP-Cldn1 exprimierenden Zellen. Zusätzlich ließ sich in YFP-Cldn5 exprimierenden Zellen eine Bande bei etwa 100 kDa detektieren. Es handelt sich vermutlich um dimerisiertes YFP-Cldn5.

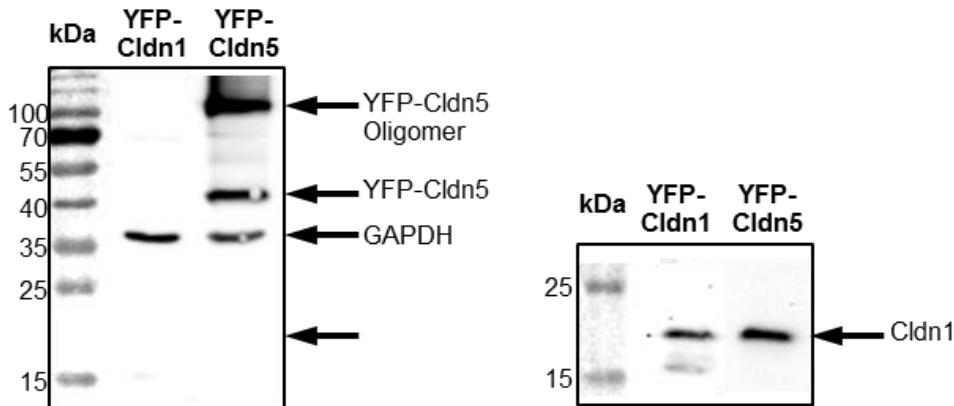


Abb. 3.3: MDCK-II-Zellen enthalten kein endogenes Cldn5. Im *Western blot* ließ sich in Zelllysaten YFP-Cldn1 bzw. YFP-Cldn5 exprimierender Zellen endogenes Cldn1 detektieren (rechte Seite), aber kein endogenes Cldn5 (unbeschrifteter Pfeil). In YFP-Cldn5 exprimierenden Zellen ließ sich YFP-Cldn5 als Monomer bzw. als Oligomer (vermutlich Dimer) nachweisen.

3.1.2.2. Homophile und heterophile *cross-over* Endozytose

In homophilen YFP-Cldn1/TRQ-Cldn1 bzw. YFP-Cldn5/TRQ-Cldn5 Kokulturen monotransfizierter Zellen wurden *cross-over* endozytierte Vesikel sowohl in den Cldn1- als auch Cldn5-transfizierten Zellen gefunden (Abb. 3.4). Die Richtung der Endozytose war unabhängig vom Fluorophor, es wurden YFP-Vesikel in den TRQ-Cldn exprimierenden Zellen gefunden, aber auch TRQ-Vesikel in den YFP-Cldn exprimierenden Zellen. Die *cross-over* endozytierten Vesikel enthielten in den meisten Fällen Claudine aus beiden Zellen. Dies deutet auf einen allgemeinen Mechanismus der Endozytose von Claudinen hin, bei dem das Claudin aus der Plasmamembran der Nachbarzelle, inklusive der intrazellulären Termini zusammen mit dem eigenen Cldn endozytiert wurde.

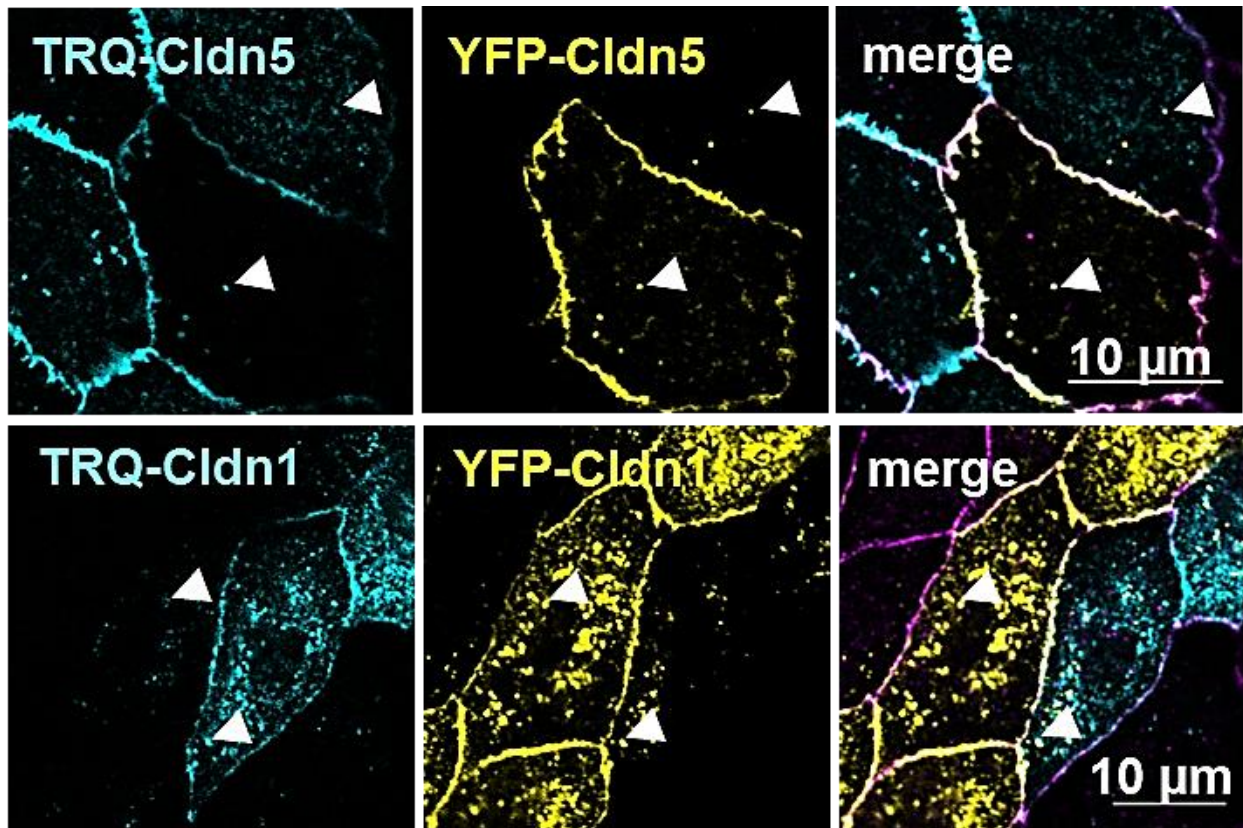


Abb. 3.4: Homophile *cross-over* Endozytose von Claudin-1 und -5. In homophilen Kokulturen monotransfizierter Zellen wurden sowohl für YFP-Cldn1/TRQ-Cldn1 als auch für YFP-Cldn5/TRQ-Cldn5 Kokulturen *cross-over* endozytierte Vesikel gefunden. Diese Vesikel enthielten sowohl YFP- als auch TRQ-Fluoreszenz (Pfeilköpfe). Lila: ZO-1 als Zellkontaktmarker.

Cross-over endozytierte Vesikel wurden auch in heterophilen Cldn1/Cldn5 Kokulturen monotransfizierter Zellen (Abb. 3.5) gefunden. Auch hier gelangten Claudine aus beiden Zellen in dieselben Vesikel und der Transport lief in beide Richtungen. TRQ-Cldn1 wurde in YFP-Cldn5 exprimierende Zellen internalisiert, sowie YFP-Cldn5 in TRQ-Cldn1 exprimierende Zellen. Dieses Verhalten änderte sich auch nicht mit getauschten Fluorophoren, also in YFP-Cldn1/TRQ-Cldn5 Kokulturen monotransfizierter Zellen.

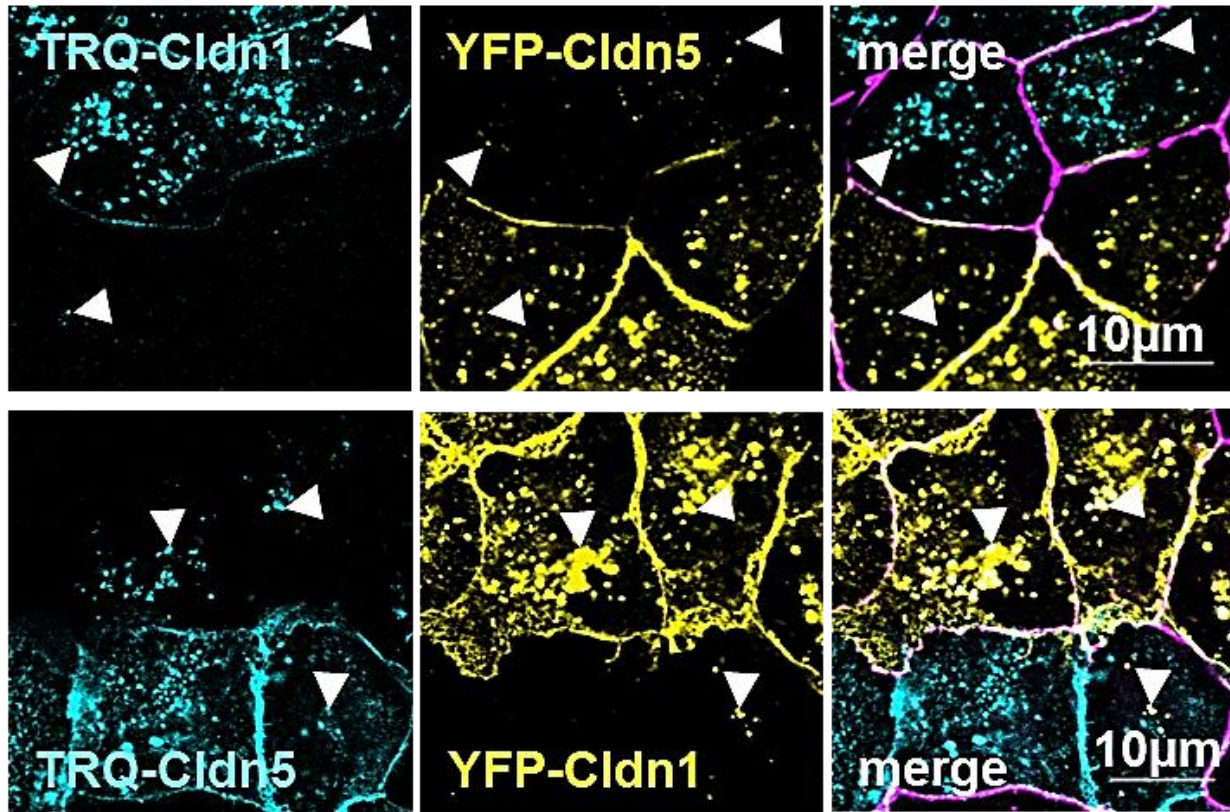


Abb. 3.5: Heterophile *cross-over* Endozytose. An den Kontakten zwischen TRQ-Cldn1 exprimierenden und YFP-Cldn5 (bzw. TRQ-Cldn5 oder YFP-Cldn1) exprimierenden mono-transfizierten Zellen wurde *cross-over* endozytiertes Claudin in der jeweiligen Nachbarzelle gefunden. Lila: ZO-1 als Zellkontaktmarker. Pfeilköpfe: *cross-over* endozytiertes Claudin.

3.2. Eigenschaften der Cldn5-Aminosäuresubstitutionen Cldn5_{F147A} und Cldn5_{Q156E}

Die Bindungseigenschaften von Claudinen werden maßgeblich von ihren extrazellulären Schleifen bestimmt. Um den Einfluss der transzellulären Interaktionen von Claudinen auf die *cross-over* Endozytose zu untersuchen wurden zwei Cldn5-Aminosäureaustauschvarianten ausgewählt, welche zu verringerten *trans*-Interaktionen führen. Die beiden AS-Substitutionen Cldn5_{F147A} und Cldn5_{Q156E} liegen in der zweiten EZS, die Proteine werden in HEK-293-Zellen zwar an die Plasmamembran transportiert, aber nicht in die TJs eingebaut (Piontek et al., 2008).

3.2.1. Lokalisation von Cldn5_{F147A} und Cldn5_{Q156E}

Die Cldn5 Varianten Cldn5_{F147A} und Cldn5_{Q156E} wurden als TRQ- und YFP-Fusionsproteine N-terminal Fluoreszenz-markiert und zunächst auf ihre funktionellen Eigenschaften untersucht. In MDCK-II-Zellen lokalisierten beide Proteine in der Plasmamembran (Abb. 3.6A-C), wobei die Anreicherung an Zell-Zell-Kontakten bei Wildtyp Cldn5 stärker ausgeprägt war. Zellen, welche eine der Austauschvarianten exprimierten beinhalteten im Durchschnitt kleinere Vesikel (Abb. 3.6D). Von den Cldn5 enthaltenden Vesikel haben etwa 15% einen größeren Durchmesser als 200 nm. Von Cldn5_{Q156E} enthaltenden Vesikeln haben dagegen nur knapp 7% Vesikel einen größeren Durchmesser als 200 nm, in Cldn5_{F147A} exprimierenden Zellen waren fast alle Vesikel kleiner als 200 nm. Die unterschiedliche Größenverteilung deutet darauf hin, dass es sich hier um unterschiedliche intrazelluläre Kompartimente handelt.

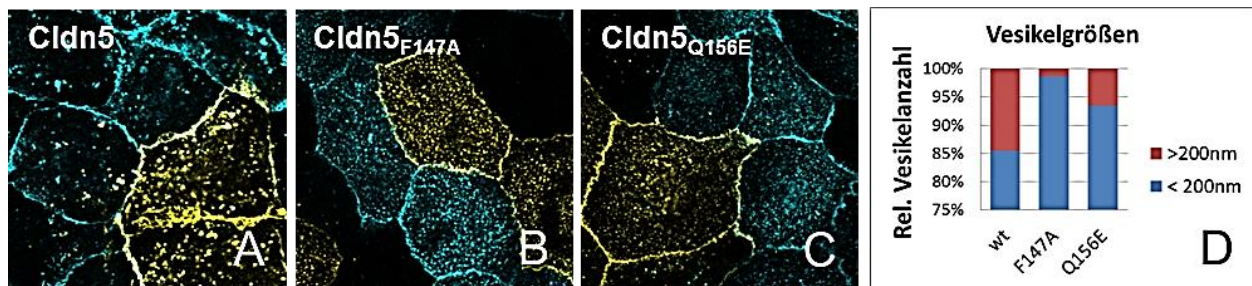


Abb. 3.6: Claudin-5-Aminosäureaustauschvarianten der zweiten extrazellulären Schleife lokalisieren in der Plasmamembran von MDCK-II-Zellen. A-C: Fixierte TRQ/YFP Kokulturen von monotransfizierten Zellen, welche Cldn5, Cldn5_{F147A} oder Cldn5_{Q156E} exprimieren. Alle Konstrukte lokalisieren in der Plasmamembran. D: Größenverteilung aller intrazellulärer Vesikel. Cldn5 enthält einen größeren Anteil an Vesikeln die einen Radius von mehr als 200 nm haben. n > 24 ausgewertete Zellen.

3.2.2. Einfluss der Claudin-5-Mutanten auf die Permeabilität der Zellbarriere

3.2.2.1. Einfluss auf den Transepithelialen Elektrischen Widerstand

Cldn5 ist dafür bekannt, Zellbarrieren abzudichten, eine Eigenschaft, welche durch die starken *trans*-Interaktionen vermittelt wird. Da die AS-Substitutionen F147A und Q156E in Cldn5 zu einer Verringerung der *trans*-Interaktionen führen stellte sich die Frage, ob die Proteine noch in der Lage sind, die Barriere abzudichten.

Die Durchlässigkeit der Zellbarriere gegenüber Ionen wurde durch Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TER) bestimmt. In MDCK-II Zellen bildeten die TER-Werte eine charakteristische Kurve aus (Abb. 3.7A). Zunächst stieg der TER auf ein wenige Stunden

andauerndes Maximum und fiel dann auf ein Plateau ab, welches über mehrere Tage stabil blieb. Transfektion von Cldn5 führte zu einer Verdopplung der TER-Werte gegenüber untransfizierten Zellen am Anfang des Plateaus (Abb. 3.7B, $85 \Omega \cdot \text{cm}^2$ bzw. $55 \Omega \cdot \text{cm}^2$). Der vorhergehende Höchstwert war im Gegensatz zu untransfizierten Zellen leicht erhöht ($160 \Omega \cdot \text{cm}^2$ bzw. $140 \Omega \cdot \text{cm}^2$, allerdings war dieser auch sehr variabel, wie an den Fehlerbalken zu sehen ist).

Cldn5_{F147A} oder Cldn5_{Q156E} exprimierende Zellen zeigten im Vergleich mit Wildtyp Cldn5 einen verringerten TER sowohl im Maximum als auch im Plateau (Abb. 3.7A). Die Expression von Cldn5_{F147A} oder Cldn5_{Q156E} führte im Vergleich zu untransfizierten Zellen zu einer drastischen Reduktion des Maximums ($80 \Omega \cdot \text{cm}^2$ bzw. $65 \Omega \cdot \text{cm}^2$), welches auch um etwa 20 h verzögert auftrat. Bei Cldn5_{Q156E} war das Maximum sogar fast gar nicht mehr vorhanden. Am Anfang des Plateaus lagen die TER-Werte der Cldn5_{F147A} oder Cldn5_{Q156E} exprimierenden Zellen ($60 \Omega \cdot \text{cm}^2$ bzw. $65 \Omega \cdot \text{cm}^2$) nur leicht über denen der untransfizierten Zellen. Die Verminderung des Maximums der TER-Werte im Vergleich mit untransfizierten Zellen durch die Cldn5-AS-austauschvarianten deutet auf einen Einbau der Proteine in die TJs hin, wo aber aufgrund fehlender *trans*-Interaktionen (Piontek et al., 2008) keine abdichtende Funktion aufgebaut wurde.

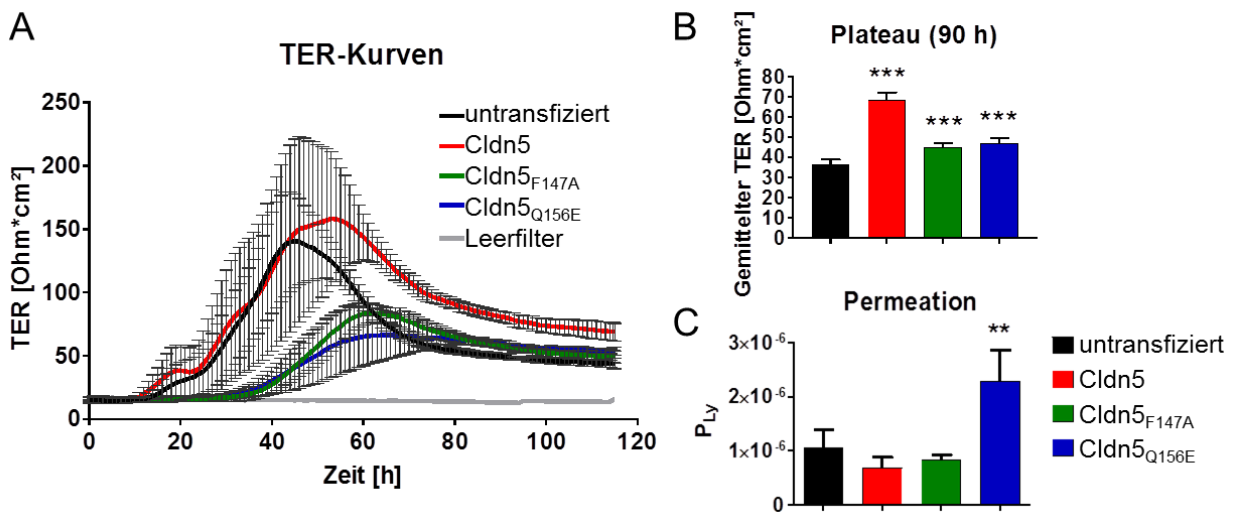


Abb. 3.7: Claudin-5-Varianten zeigen beeinträchtigte Zellbarriereigenschaften. **A:** MDCK-II-Zellen wurden auf Zellkultur-Einsätzen ausgesät, die Entwicklung der TER-Werte wurde im Cellscope jede Stunde gemessen. Jeder Punkt der Kurve repräsentiert den Mittelwert \pm SEM, $n=9$ aus 3 Experimenten. Die TER-Werte zeigten in MDCK-II-Zellen eine charakteristische Kurve mit einem Maximum nach etwa 2 Tagen, welcher auf ein relativ stabiles Plateau abfiel. **B:** TER-Werte 90 h nach Aussaat (nach Abzug der Leerfilter-Werte). Die Expression von Cldn5 führte zu einer Verdopplung des TER, Transfektion der Aminosäuresubstituenten führte nur zu einer leichten Erhöhung. Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Post-Test. **C:** Permeabilität für Lucifer Yellow, für jedes Zellkulturinsert wurde eine Dreifachbestimmung vorgenommen. Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Post-Test.

3.2.2.2. Einfluss auf die Permeabilität für kleine Moleküle

Die verminderte Barrierefunktion zeigte sich auch in der erhöhten Permeabilität für Lucifer Yellow, einem etwa 450 Da großen Fluoreszenzfarbstoff (Abb. 3.7C). Cldn5 dichtet bekanntermaßen die Zellbarriere gegen den Durchtritt von Molekülen <800 Da ab (Nitta et al., 2003). Transfektion von Cldn5 führte zu einer leichten Verminderung der Permeabilität für Lucifer Yellow, also zu einer Abdichtung der Barriere für kleine Moleküle. Cldn5_{Q156E} führte zu einer starken Erhöhung der Permeabilität, während Cldn5_{F147A} keine Veränderungen in der Permeabilität für Lucifer Yellow zeigt. Cldn5_{F147A} hatte also nur einen Einfluss auf die Permeabilität der Barriere gegenüber Ionen, während Cldn5_{Q156E} auch einen Einfluss auf die Permeabilität für kleine Moleküle hatte. Zusätzlich interferierten sowohl Cldn5_{F147A} als auch Cldn5_{Q156E} mit der Barrierefunktion anderer Claudine, da die TER-Werte im Maximum nach Transfektion noch unter denen der untransfizierten Zellen lagen, eventuell durch Verdrängung von abdichtenden Claudinen aus den TJs.

3.2.3. Cldn5_{F147A} und Cldn5_{Q156E} führen zu einer Veränderung der Proteinstruktur

Um strukturelle Unterschiede zwischen Cldn5 und den AS-austauschvarianten darzustellen wurde für alle drei Proteine mittels iTASSER eine Proteinstrukturvorhersage erstellt (Abb. 3.8). Diese Methode nutzt die vorhandenen Kristallstrukturen von Cldn15 und -19 als Vorlage um wahrscheinliche Tertiärstrukturen zu berechnen. Die Modelle der drei Proteine weichen nicht sehr stark voneinander ab, in der *Ribbon*-Struktur ließen sich kaum Unterschiede feststellen (Abb. 3.8A). Die vier Transmembrandomänen bildeten jeweils eine Helix und waren zu einem Bündel zusammengeschlossen. Die beiden EZS bilden eine Ebene aus fünf β -Strängen, von denen vier von der ersten Schleife und der fünfte von der zweiten Schleife gebildet wurden. Die Positionen der beiden Substitutionen in der zweiten EZS sind dargestellt. In den Modellen der sind sowohl die Helices als auch die β -Stränge erhalten. Allerdings waren die Stränge β 3 und β 4 sowohl bei Cldn5_{F147A} als auch bei Cldn5_{Q156E} verlängert, bei Cldn5_{Q156E} fehlte außerdem die kurze extrazelluläre Helix.

Im Oberflächenmodell (Abb. 3.8B) zeigte Cldn5_{F147A} nur geringe Konformationsänderungen im Vergleich zu Cldn5. Auffällig war jedoch, dass die zusätzliche negative Ladung der Glutaminsäure, welche in Cldn5_{Q156E} eingeführt wurde, im Modell nach außen gerichtet war und

im postulierten Bindungsareal für Claudine gegenüber liegender Zellen (Abb. 3.8B, weißer Kreis) auftauchte. Diese Ladungsänderung könnte der Grund für die erhöhte Permeabilität für *lucifer yellow* (Abb. 3.7C) von Cldn5_{Q156E} exprimierenden Zellen sein. Bei beiden Mutanten fiel eine Konformationsänderung der aromatischen Seitenketten von Y148 und Y158 auf (Abb. 3.8C,D), welche innerhalb der Claudine konserviert sind (Anhang 1) und zusammen mit F147 ein Bindungsinterface bilden (Piontek et al., 2008).

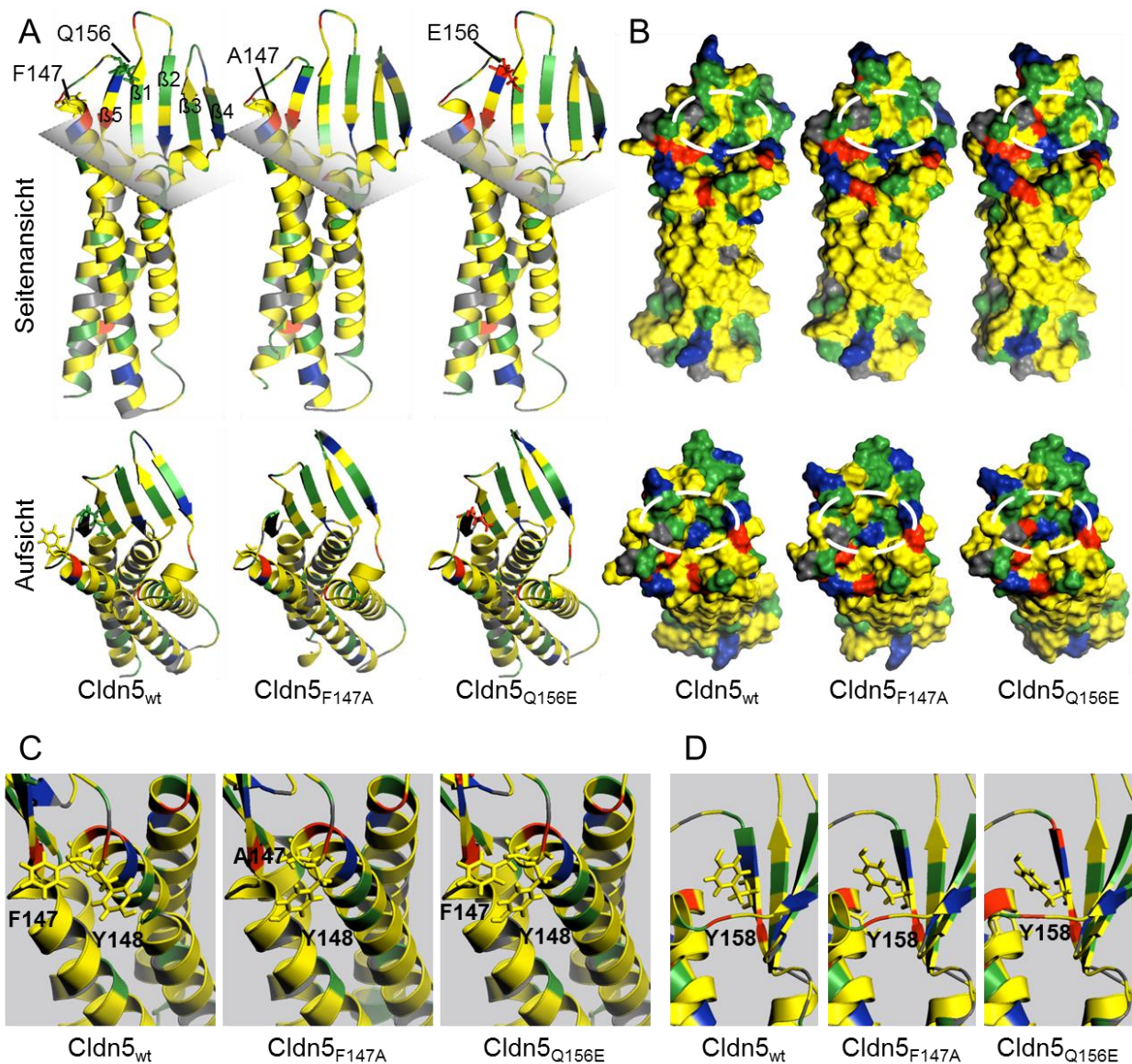


Abb. 3.8: Strukturmodelle von murinem Cldn5, Cldn5_{F147A} und Cldn5_{Q156E}. Die Strukturmodelle wurden von den Aminosäuren (AS) 1 – 190 (Protein ohne C-Terminus) mit iTASSER erstellt. **A:** *Ribbon*-Darstellung. Zu sehen sind die vier Transmembrandomänen, welche eine helikale Konformation haben und als Bündel angeordnet waren, sowie die 5 β -Faltblattstränge, welche von den zwei extrazellulären Schleifen gebildet werden. Graue Ebene: Oberfläche der Plasmamembran. **B:** Oberflächen-Darstellung. Rot: basische AS, Blau: saure AS, Gelb: lipophile AS, Grün: hydrophile AS. Weißes Oval: Bindungsareal für *trans*-Interaktionen. **C,D:** Die Seitenketten der AS Y148 und Y158 ist bei Cldn5_{F147A} und Cldn5_{Q156E} im Vergleich zu Cldn5 gedreht.

3.2.4. Cldn5_{F147A} bildet keine *tight junction* Stränge

Cldn5 bildete in transfizierten HEK-293-Zellen und MDCK-II-Zellen maschenartige TJ-Stränge (Abb. 3.9). In STED-mikroskopischen Aufnahmen von Kokulturen monotransfizierter MDCK-II-Zellen fanden sich an den Zellkontakten zwischen TRQ-Cldn5 und YFP-Cldn5 TJ-Stränge (Abb. 3.9A). In diesen Strängen war eine Überlappung der von beiden Nachbarzellen beigesteuerten Claudine zu erkennen. Solche Stränge wurden weder für Cldn5_{F147A}, noch für Cldn5_{Q156E} gefunden. In Gefrierbruchelektronenmikroskopie von Cldn5 und Cldn5_{F147A}-exprimierenden HEK-293-Zellen zeigten Cldn5-exprimierende Zellen deutliche TJ-Stränge (Abb. 3.9B), welche *E-face* assoziiert waren. In Cldn5_{F147A}-exprimierenden Zellen wurden jedoch keine Stränge festgestellt, sondern nur einzelne Partikel, welche größtenteils *P-face* assoziiert waren.

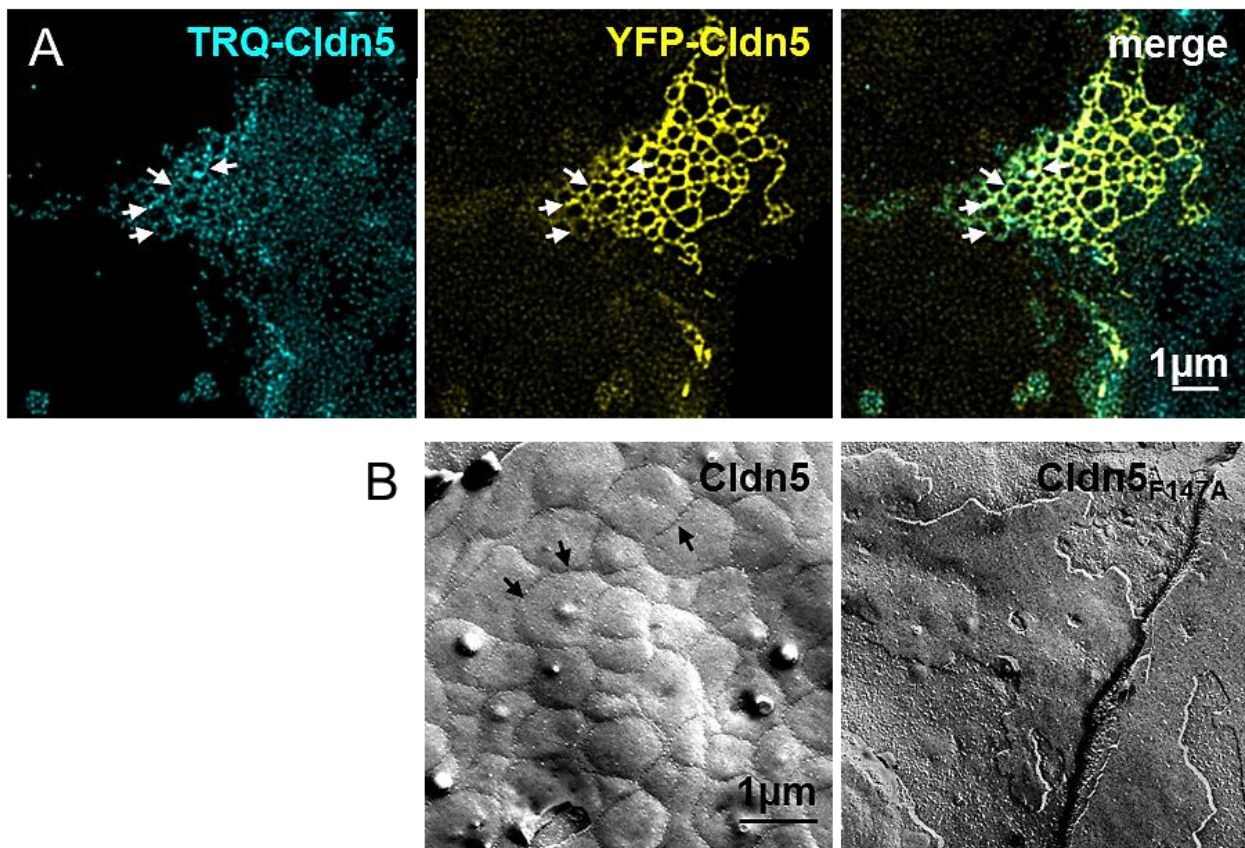


Abb. 3.9: Die Aminosäuresubstitution Cldn5_{F147A} bildet keine *tight junction* (TJ)-Stränge. **A:** TJ-Stränge in TRQ-Cldn5/YFP-Cldn5 Kokultur monotransfizierter MDCK-II-Zellen. Aufnahmen von Zellkontakten mit *stimulated emission depletion* (STED)-Mikroskopie. In Cldn5-transfizierten Zellen fanden sich Netzwerke von TJ-Strängen, abhängig von der Ebene war die Überlappung der Claudine beider Zellen zu erkennen (Pfeile). **B:** Gefrierbruch-elektronenmikroskopische Darstellung monotransfizierter HEK-293-Zellen. Cldn5 bildete TJ-Stränge (Pfeile), während in Cldn5_{F147A} keine Stränge gefunden wurden.

3.2.5. Einfluss der Aminosäuresubstitutionen auf Claudin-Claudin-Interaktionen

3.2.5.1. Cldn5_{F147A} und Cldn5_{Q156E} beeinträchtigen die *cis*-Interaktionen

Die *cis*-Interaktionen wurden mittels FRET-Messungen in TJ-freien HEK-293-Zellen bestimmt. Bei einer Distanz von weniger als 10 nm zwischen den Fluorophoren kommt es zu einem Energietransfer vom Donor (hier TRQ) auf den Akzeptor (hier YFP), was zu einem *quenching* der TRQ-Fluoreszenz führt. Durch Ausbleichen des Akzeptors kommt es zu einer Zunahme der Donorfluoreszenz (Abb. 3.10A), welche umso stärker ausfällt, je näher die Fluorophore beieinander liegen. So lässt sich die Stärke der *cis*-Interaktionen von Claudinen in der Membran abschätzen (Van Munster et al., 2005).

Im Gegensatz zu vorangegangenen Messungen (Piontek et al., 2008) wurden allerdings nicht Wildtyp Cldn5 als FRET-Partner gewählt, sondern jeweils Cldn5_{F147A} gegen Cldn5_{F147A}, bzw. Cldn5_{Q156E} gegen Cldn5_{Q156E} gemessen. In diesem Versuchsaufbau zeigten beide Varianten eine geringere FRET-Effizienz als Wildtyp Cldn5 (Abb. 3.10B), Cldn5_{Q156E} hatte eine um 30% verringerte FRET-Effizienz, bei Cldn5_{F147A} war die FRET-Effizienz sogar um 70% verringert. Dies lässt auf verminderte *cis*-Interaktionen beider AS-Substitutionsvarianten schließen, wobei Cldn5_{F147A} zu einer stärkeren Beeinträchtigung führte.

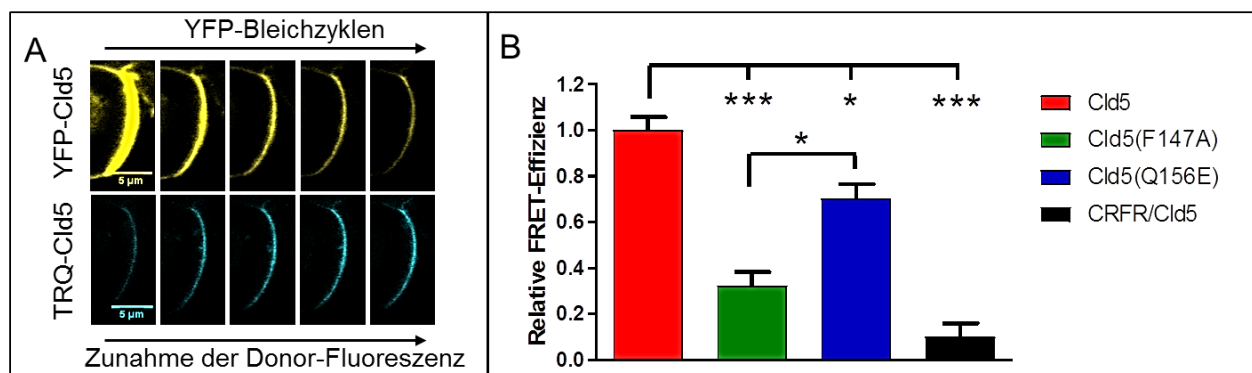


Abb. 3.10: Cldn5_{F147A} und Cldn5_{Q156E} zeigen verringerte FRET-Effizienzen. FRET-Messungen wurden in transient transfizierten HEK-293-Zellen durchgeführt. **A:** Zunahme der TRQ-Fluoreszenz nach dem Bleichen von YFP. **B:** Durchschnittliche FRET-Effizienzen normiert auf Cldn5. Als Negativkontrolle wurde der *Corticotropin-releasing factor receptor 1* (CRFR) gemessen. Cldn5_{F147A} und Cldn5_{Q156E} zeigten eine signifikant verringerte FRET-Effizienz, was auf verminderte *cis*-Interaktionen schließen lässt. Cldn5 n=27; Cldn5_{F147A} n=11; Cldn5_{Q156E} n=38; CRFR n=12 aus insgesamt 3 Experimenten. Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Post-Test.

3.2.5.2. Cldn5_{F147A} zeigt eine erhöhte Mobilität in der Plasmamembran

Da in beiden Cldn5-Varianten sowohl *cis*- als auch *trans*-Interaktionen vermindert sind, wurde als nächstes der Effekt der AS-Substitution auf die Stabilität der Proteine in der Plasmamembran untersucht. Hierzu wurde die Mobilität der Cldn5-Mutanten in der Membran mittels *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP)-Messungen in MDCK-II-Zellen ermittelt (Abb. 3.11).

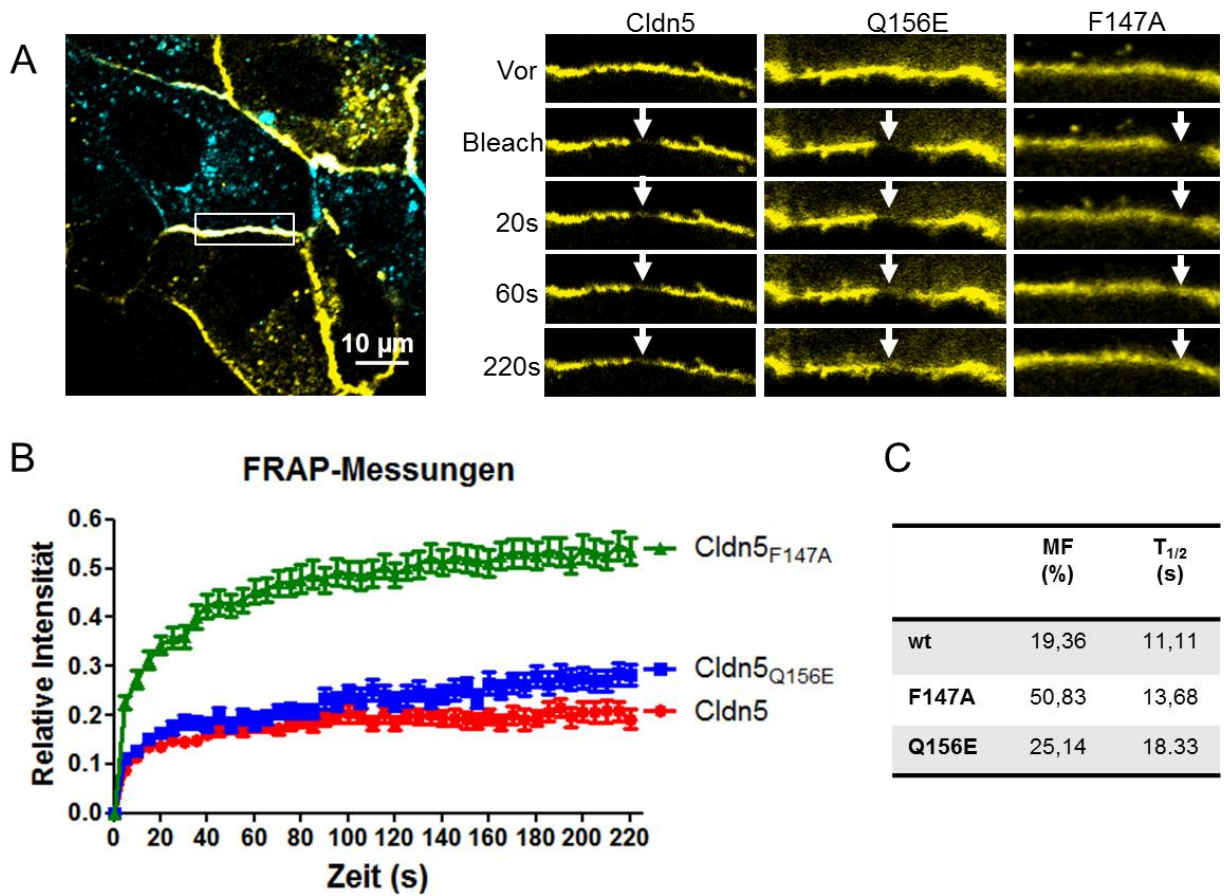


Abb. 3.11: Cldn5_{F147A} aber nicht Cldn5_{Q156E} zeigt eine erhöhte Mobilität im Zellkontakt. FRAP-Messungen wurden in Kokulturen monotransfizierter MDCK-II-Zellen an Zellkontakten durchgeführt, die von einer YFP-Cldn und einer TRQ-Cldn exprimierenden Zelle gebildet wurden (weißer Kasten in A). **A:** Zeitserie nach Ausbleichen eines Teils des YFP im Zellkontakt. Pfeile: Lokalisation der gebleichten Region. **B:** Normalisierte FRAP-Kurven. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert aus allen gemessenen Kurven \pm SEM. Nur Cldn5_{F147A} zeigte eine deutlich erhöhte Mobilität. **C:** Mobile Fraktion (MF) und Halbwertszeit (T_{1/2}) berechnet nach Anpassung einer Sättigungskurve. Cldn5 n=32; Cldn5_{F147A} n=46; Cldn5_{Q156E} n=26 aus 4 Experimenten.

Um sicherzustellen, dass nur die Plasmamembran einer einzelnen Zelle gemessen wird, wurde in Kokulturen monotransfizierter Zellen, welche entweder TRQ-Cldn oder YFP-Cldn exprimierten, an YFP/TRQ-Kontakten die Mobilität bestimmt. Nach Ausbleichen des YFP-Signals an einem Teil des Zellkontaktes (Abb. 3.11A, Pfeile) wurde die Rückkehr des Fluoreszenzsignals an der ausgebleichten Stelle gemessen. Cldn5 hatte eine mobile Fraktion von 19% (Abb. 3.11 B,C), die mobile Fraktion von Cldn5_{Q156E} liegt bei 25%, während Cldn5_{F147A} eine deutlich höhere mobile

Fraktion von etwa 51% zeigte. Die Halbwertszeit der Fluoreszenz-Rückkehr lag für Cldn5 am niedrigsten (11 s), gefolgt von Cldn5_{F147A} (14 s), am längsten brauchte Cldn5_{Q156E} (18 s).

3.3. Faktoren der *cross-over* Endozytose

3.3.1. Claudin-Claudin-Interaktionen beeinflussen die *cross-over* Endozytose

Da die vorherigen Ergebnisse zeigten, dass Cldn5_{F147A} und Cldn5_{Q156E} verringerte *cis*- und *trans*-Interaktionen aufweisen, wurde nun untersucht inwiefern sich diese auf die *cross-over* Endozytose auswirken. Die in den Zellen enthaltenen Vesikelzahlen wurden für Cldn5, Cldn5_{F147A} und Cldn5_{Q156E} quantifiziert. Die Zahl der *cross-over* endozytierten Vesikel betrug etwa 20% der gesamten Anzahl an intrazellulären Claudin-haltigen Vesikeln (Abb. 3.12A). Die Gesamtzahl der Cldn5_{F147A} und Cldn5_{Q156E}-positiven Vesikel übersteigt die der Cldn5 enthaltenden Vesikel (Abb. 3.12B), bei Cldn5_{F147A} wurde eine signifikante Erhöhung auf fast das Doppelte gemessen. Bei Cldn5_{Q156E} sind es etwa 50% mehr Vesikel als in Cldn5-exprimierenden Zellen. Dieser Anstieg ist jedoch nicht signifikant. Dagegen ist die Anzahl der *cross-over* endozytierten Vesikel signifikant reduziert, sie liegt bei beiden Mutanten etwa bei 30% im Vergleich mit Cldn5 (Abb. 3.12B). In Cldn5_{Q156E}-exprimierenden Zellen wurden etwas mehr *cross-over* endozytierte Vesikel gefunden als in Cldn5_{F147A}-exprimierenden Zellen, dieser Unterschied war allerdings signifikant.

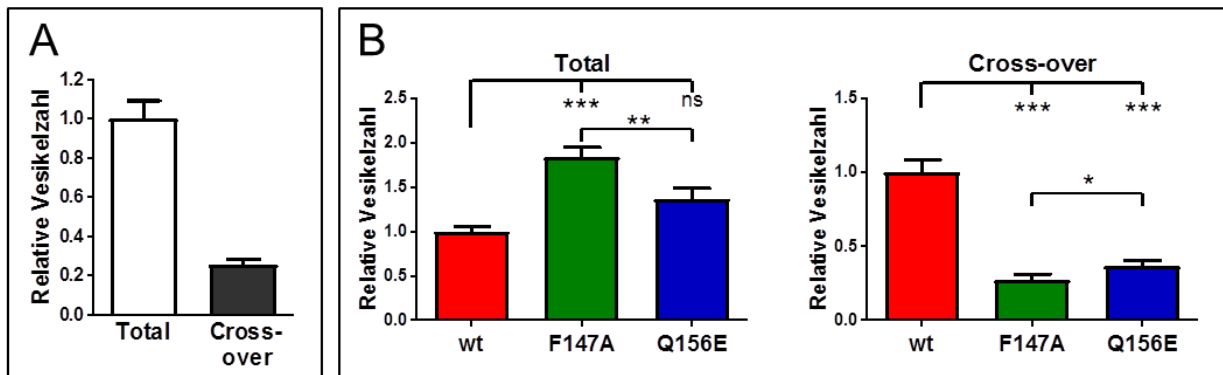


Abb. 3.12: Cross-over Endozytose ist abhängig von Claudin-Interaktionen. In TRQ-Cldn5/YFP-Cldn5 Kokulturen monotransfizierter MDCK-II Zellen wurden die Zahl *cross-over* endozytierter und die Gesamtzahl der Vesikel analysiert. Es wurde der Mittelwert aus den Vesikelzahlen mehrerer Schnitte eines Z-Stacks gebildet und die gezählten Vesikel wurden entweder auf den Zellumfang (Gesamtzahl) oder die Länge des Kontaktes mit Zellen, die das andere Fluorophor exprimierten, normiert (*cross-over*). **A:** Relative Anzahl von TRQ-Cldn5-Vesikeln in TRQ-Cldn5 exprimierenden Zellen (total) und in YFP-Cldn5-exprimierenden Zellen (*cross-over*) normiert auf die Gesamtanzahl. $n > 100$ analysierte Zellen aus 4 Experimenten. **B:** Vesikelzahlen (total und *cross-over*) von Cldn5, Cldn5_{F147A} und Cldn5_{Q156E} jeweils normiert auf Cldn5. $n > 79$ analysierte Zellen aus 4 Experimenten. Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Post-Test.

3.3.2. *Cross-over* endozytierte Vesikel enthalten mehrere TJ-Proteine

Aus der Reduktion der *cross-over* endozytierten Vesikel (Abb. 3.12) ist ersichtlich, dass Claudin-Claudin-Interaktionen maßgeblich an der *cross-over* Endozytose beteiligt sind. TJs sind allerdings ein Proteinkomplex aus verschiedenen Claudin-Subtypen und anderen Proteinen, welche miteinander wechselwirken. Daher wurde als nächstes untersucht, welche endogen in MDCK-II-Zellen exprimierten TJ-Proteine mit *cross-over* endozytiertem Cldn5 kolokalisieren.

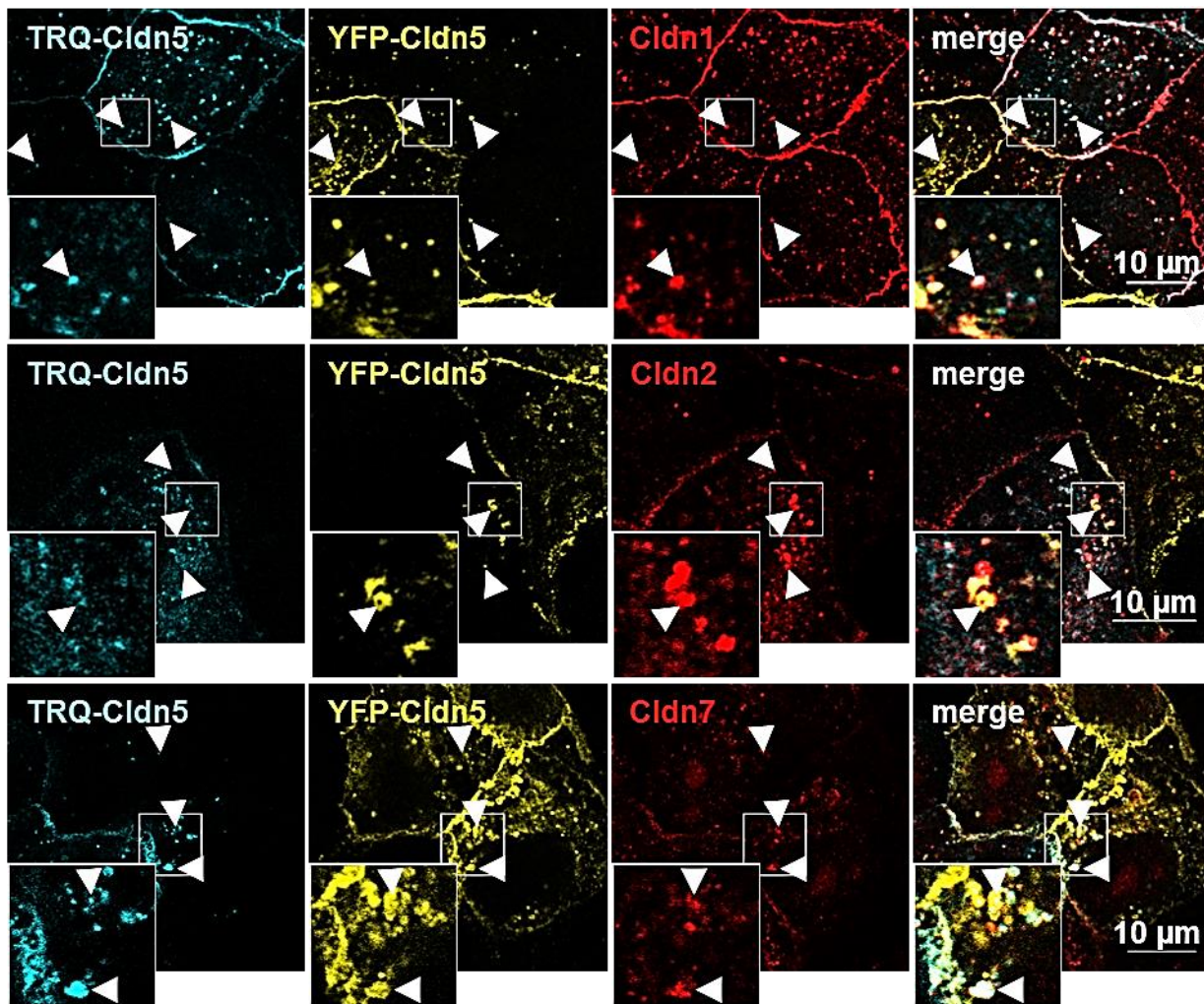


Abb. 3.13: *Cross-over* endozytierte Vesikel kolokalisieren mit endogenen Claudinen. Fixierte Kokulturen von monotransfizierten MDCK-II Zellen welche entweder YFP-Cldn5 oder TRQ-Cldn5 exprimierten. Immunofluoreszenz-Färbungen gegen Cldn1, Cldn2 oder Cldn7 zeigten eine Kolokalisation mit *cross-over* endozytiertem Cldn5 (Pfeile).

3.3.2.1. Claudine

TJ-Stränge beinhalten meist nicht nur einen Claudin-Subtyp, sondern eine gewebespezifische Zusammensetzung. Um festzustellen, wie spezifisch bestimmte Claudine via *cross-over* Endozytose internalisiert werden, wurden Immunfluoreszenzfärbungen gegen endogene Claudine durchgeführt. Cldn1, -2 und -7 zeigten eine gute Überlappung mit TRQ- bzw. YFP-Cldn5 an den Zellkontakten, die *cross-over* endozytierten Vesikel enthielten endogenes Cldn1 (Abb. 3.13) und Cldn7, aber Weise auch Cldn2, welches zu den porenbildenden Claudinen gehört (Rosenthal et al., 2010). Innerhalb der Claudine sind Cldn1 und Cldn7 nah miteinander verwandt, wie ein *Alignment* der humanen Pfam00822-Familie zeigt (Anhang 1). Cldn2 und Cldn5 liegen weiter entfernt von Cldn1 und -7, alle sind sich in ihrer vorhergesagten 3D-Struktur allerdings relativ ähnlich. Zum Vergleich wurden die Mitglieder der Pfam00822-Familie als 3D-Modelle dargestellt (Anhang 2).

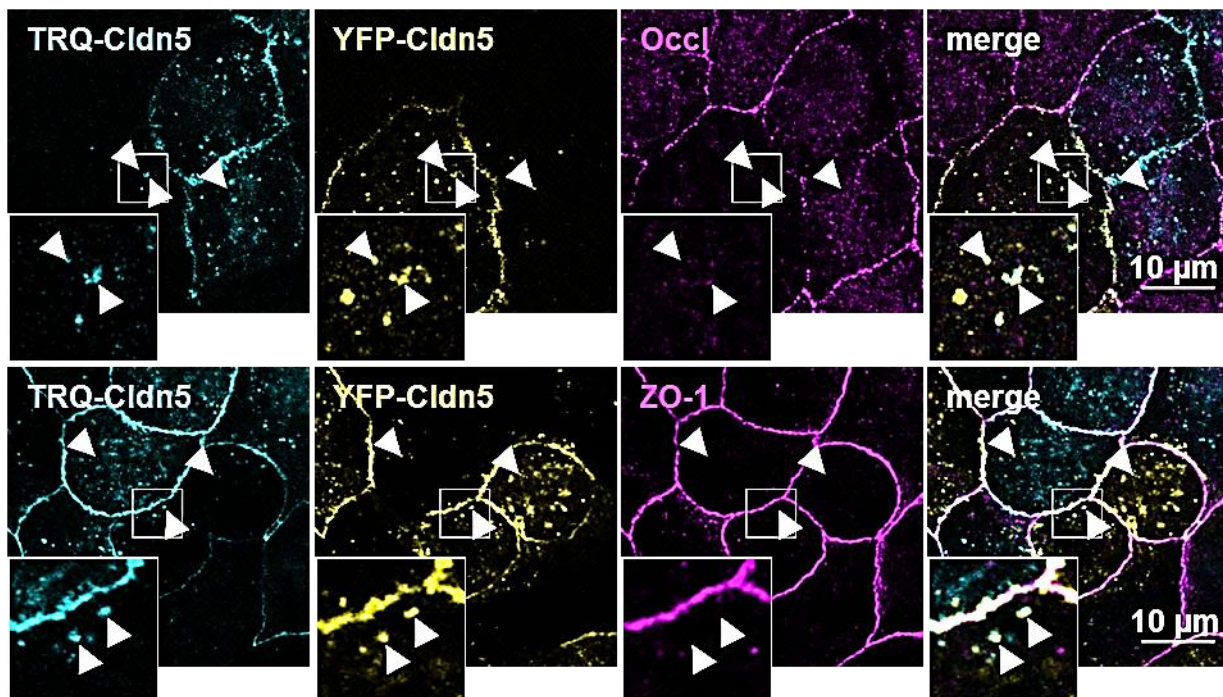


Abb. 3.14: *Cross-over* endozytierte Claudine kolokalisieren mit Occludin, aber nicht mit ZO-1. Fixierte Kokulturen monotransfizierter MDCK-II Zellen welche entweder YFP-Cldn5 oder TRQ-Cldn5 exprimierten, wurden gegen Occludin oder ZO-1 gefärbt. In Vesikeln, welche *cross-over* endozytiertes Cldn5 enthielten (Pfeilköpfe) wurde ein schwaches Signal für Occludin gefunden, aber nicht für ZO-1.

3.3.2.2. Andere Tight Junction Proteine

In der Immunfluoreszenz-Färbung von ZO-1 wurden fast keine Vesikel gefunden (Abb. 3.14), aber eine intensive Färbung der Zellkontakte. Bei Occludin waren Vesikel sichtbar, allerdings

wesentlich weniger und auch mit schwächerer Intensität als Claudin-haltige Vesikel. Die *cross-over* endozytierten Cldn5-Vesikel enthielten kein ZO-1, aber in einigen Fällen wurde ein schwaches Occludin-Signal in den Vesikeln gefunden (Abb. 3.14, Pfeile). Demnach scheint es sich bei der *cross-over* Endozytose um einen Mechanismus zu handeln, mit welchem vornehmlich Claudine aus den TJs entfernt werden, aber teilweise auch andere Transmembranproteine internalisiert werden. Dies spricht für eine Internalisierung des gesamten Membranabschnitts innerhalb der TJs.

3.3.3. *Cross-over* Endozytose in lebenden Zellen

Auch in lebenden Zellen wurde *cross-over* endozytiertes Claudin in den benachbarten Zellen gefunden (Abb. 3.15). Allerdings fand sich nur eine geringe Menge an YFP-positiven Vesikeln in TRQ-exprimierenden Zellen (Abb. 3.15A, Pfeile), TRQ-positive Vesikel fanden sich dagegen häufig in YFP-Cldn exprimierenden Zellen (Abb. 3.15A, Pfeilköpfe). In der XZ und YZ-Projektion sieht man auch die dreidimensionale Ausdehnung des Vesikels, das vollständig von der Plasmamembran getrennt war.

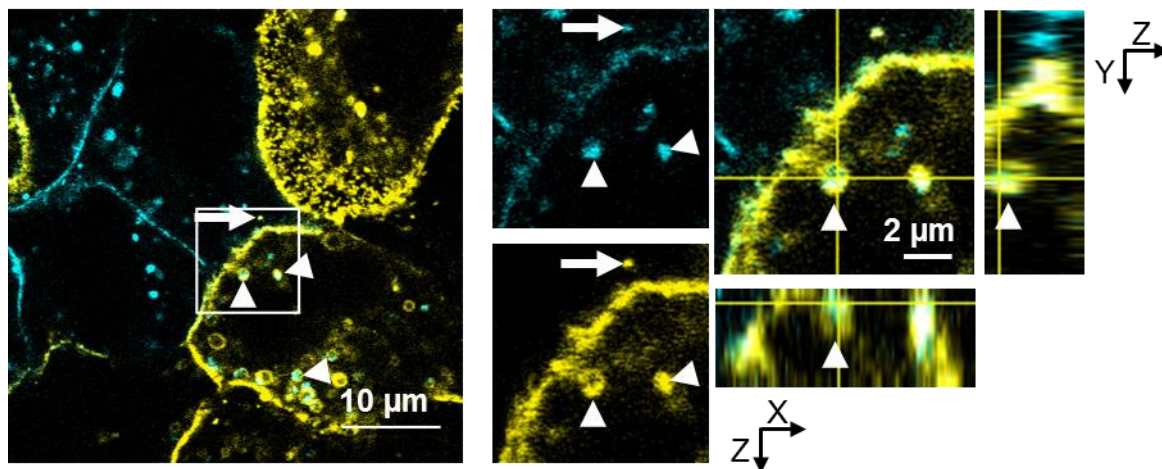


Abb. 3.15: Die Sichtbarkeit von *cross-over* endozytiertem Claudin-5 in lebenden Zellen ist abhängig vom Typ des Fusionsprotein. Monotransfizierte MDCK-II-Zellen wurden in TRQ-Cldn5/YFP-Cldn5 Kokulturen auf gläsernen Coverslips ausgesät und in HBSS (mit Ca²⁺ und Mg²⁺) mikroskopiert. Pfeilköpfe: *cross-over* endozytiertes TRQ-Cldn5, Pfeil: *cross-over* endozytiertes YFP-Cldn5. Links: Übersichtsbild. Rechts: Vergrößerter Ausschnitt und XZ bzw. YZ-Projektionen. *Cross-over* endozytiertes YFP-Cldn5 ist wesentlich seltener zu beobachten als *cross-over* endozytiertes TRQ-Cldn5.

Der Unterschied zwischen den Fluorophoren deutet darauf hin, dass sich das *cross-over* endozytierte Cldn5 im Inneren der Vesikel befindet. Ein wesentlicher Unterschied zwischen YFP

und TRQ sind ihre unterschiedliche pH-Sensitivität. Der pK_a-Wert von YFP (also der pH-Wert, bei dem ein Fluorophor die Hälfte seiner Fluoreszenzintensität verliert) liegt bei 6,5 (Chudakov et al., 2010), der von TRQ liegt dagegen bei 3,1 (Goedhart et al., 2012). Während sich Vesikel entlang der endozytischen Route bewegen, kommt es zu einem starken Abfall des pH-Wertes von annähernd neutralem pH im Zytoplasma, zu einem pH-Wert von 6.0–6.5 in frühen Endosomen bis 4.5–5.5 in späten Endosomen und Lysosomen (Hu et al., 2015; Pillay et al., 2002). Bei Eintritt ins Lysosom verliert YFP also seine Fluoreszenz, während TRQ (noch) nicht betroffen ist. Dies gab auch einen ersten Hinweis auf den Abbauweg der *cross-over* endozytierten Vesikel über den lysosomalen Abbauweg.

3.4. Endozytoseweg der *cross-over* endozytierten Vesikel

3.4.1. Einfluss von Endozytose-Inhibitoren auf *cross-over* Endozytose

Für die Charakterisierung des Endozytosewegs wurden die Vesikelzahlen nach Behandlung mit Endozytosehemmern analysiert, sowie Vesikelmarker eingesetzt, um das intrazelluläre Kompartiment, in welchem sich *cross-over* endozytiertes Claudin befindet zu identifizieren. Die Behandlung mit Filipin III und Chlorpromazin führte bereits nach einer Stunde zu einer drastischen Reduktion der Vesikelzahlen von Cldn5 (Abb. 3.16). Dieser Effekt ließ sich sowohl für *cross-over* endozytierte Vesikel, als auch die gesamte Vesikelzahl zeigen. Im Fall von Filipin III handelte es sich jedoch nur um einen transienten Effekt, der nach 1,5 h wieder nachließ. Chlorpromazin senkte dagegen die Vesikelzahlen dauerhaft. Inhibition von Dynamin führte zwar nach 2 h zu einer leichten Reduktion der Gesamtanzahl der Vesikel, hatte jedoch keinen Effekt auf *cross-over* endozytierte Vesikel. Alle Inhibitoren waren in den eingesetzten Konzentrationen nicht zytotoxisch, wie durch MTT-Test verifiziert wurde (Anhang 3). Der Effekt von Chlorpromazin und Filipin auf die Cldn5-Vesikelzahlen deutete darauf hin, dass sowohl Komponenten der Clathrin-abhängigen, als auch der Caveolin-abhängigen Endozytose in den Mechanismus der *cross-over* Endozytose involviert waren. Allerdings scheint es sich nicht um den konventionellen Endozytoseweg zu handeln, da Dynamin offenbar nicht zur Abschnürung der Vesikel benötigt wurde (Abb. 3.16).

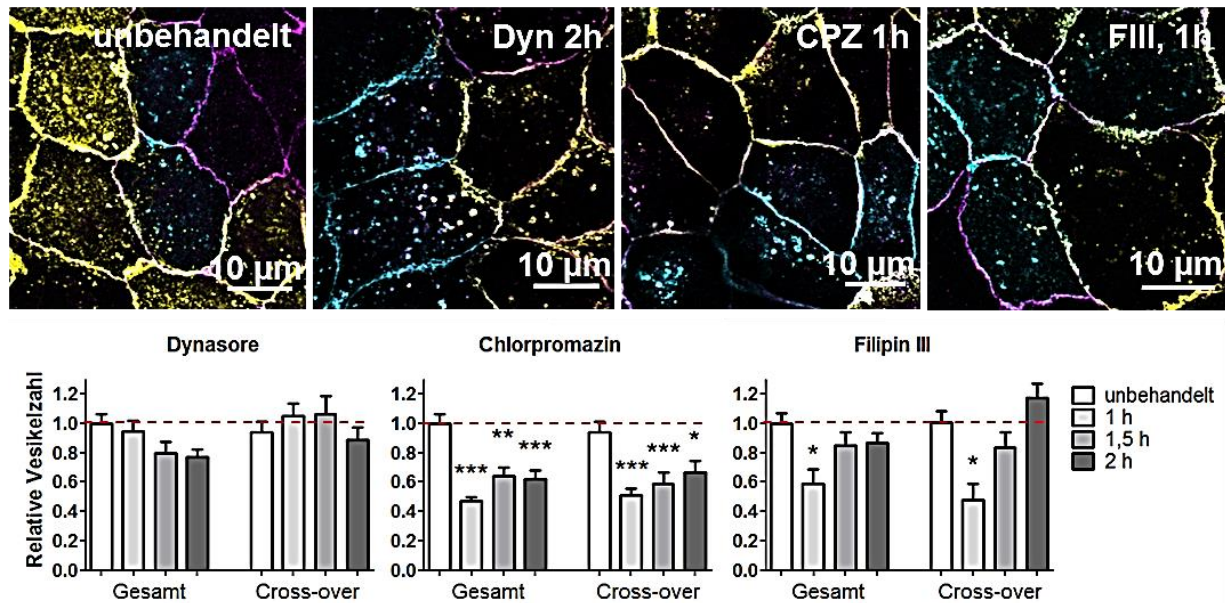


Abb. 3.16: Inhibitor der Clathrin-vermittelten Endozytose reduziert *cross-over* endozytierte Vesikel. Der Einfluss von Endozytosehemmern wurde in YFP-Cldn5/TRQ-Cldn5 Kokulturen monotransfizierter MDCK-II-Zellen quantifiziert. Clathrin-vermittelte Endozytose wurde durch Chlorpromazin (CPZ, 50 µM) inhibiert, Caveolae-vermittelte Endozytose durch Filipin III (F3, 1 µg/ml) und Dynamin durch Dynasore (Dyn, 100 µM) gehemmt. CPZ und F3 führen zu einer signifikanten Reduktion der *cross-over* endozytierten Vesikel. $n > 70$ analysierte Zellen für alle Inhibitoren aus 3 Experimenten. Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Post-Test.

3.4.2. Kolokalisation von *cross-over* endozytiertem Claudin-5 mit Endosomenmarkern

3.4.2.1. Kolokalisation von *cross-over* endozytiertem Cldn5 mit Rab-Proteinen

Als nächstes sollte das Vesikel, in welchem sich die *cross-over* endozytierten Claudine befanden, näher charakterisiert werden. Hierzu wurden Immunfluoreszenzfärbungen gegen die Endosomenmarker Rab4, Rab5, Rab7, Rab9 und Rab11 durchgeführt (Abb. 3.17). Rab4 ist ein Marker für Recycling Endosomen, Rab5 für frühe Endosomen, Rab7 für späte Endosomen und Lysosomen, Rab9 für späte Endosomen und Rab11 für Recycling Endosomen mit Ursprung im *Trans*-Golgi-Netzwerk (Stenmark, 2009). Ein Teil des *cross-over* endozytierten Cldn5 kolokalisierte in Vesikeln mit Rab4, Rab5, Rab7, Rab9 und Rab11 (Abb. 3.17, Pfeile). Ein anderer Teil zeigt diese Kolokalisation allerdings nicht (Abb. 3.17, Pfeilköpfe). Dies wurde auch für *cross-over* endozytierte Cldn1 gefunden (Anhang 4).

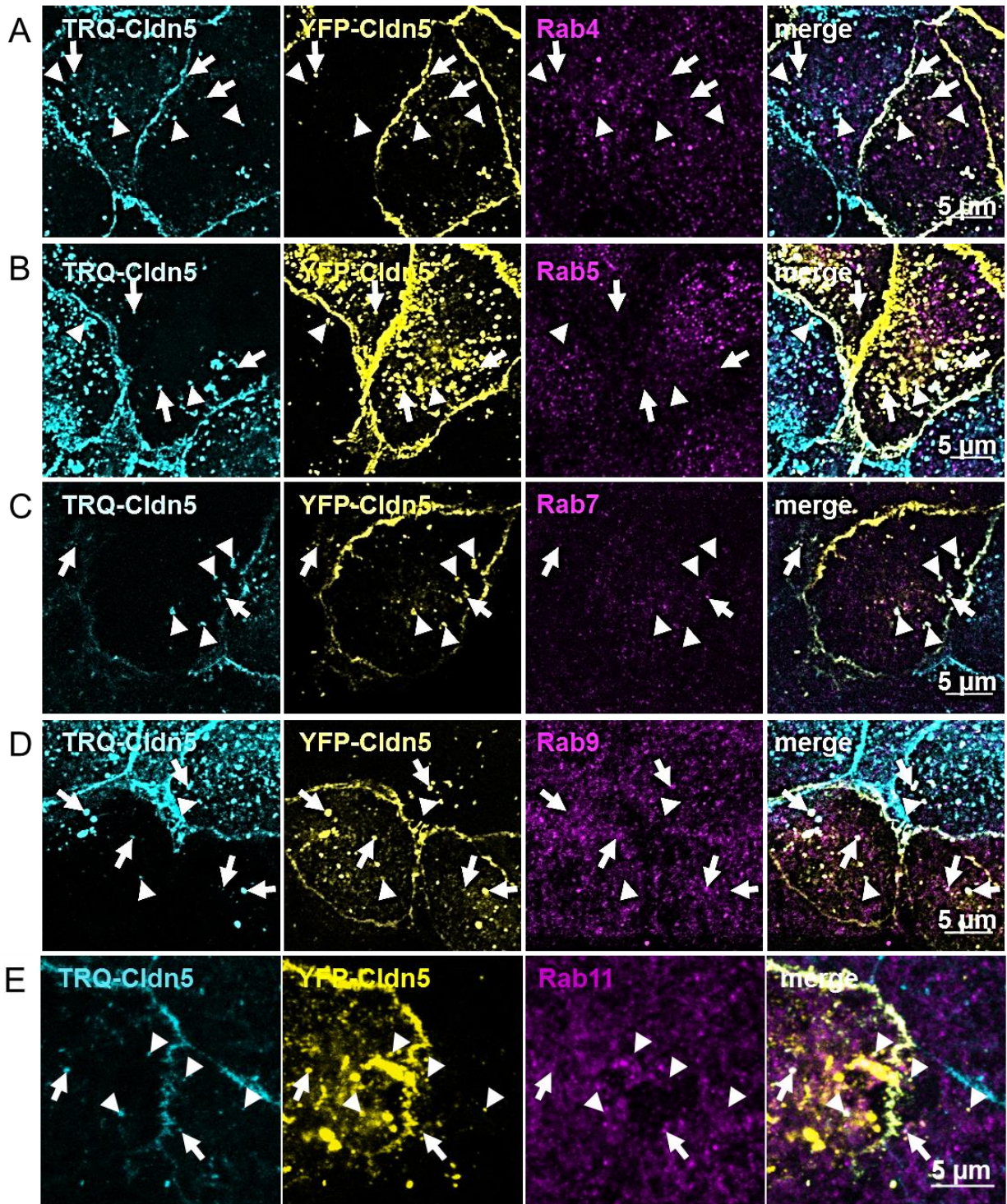


Abb. 3.17: *Cross-over* endozytiertes Cldn5 kolokalisiert zum Teil mit endosomalen Markern. Fixierte Kokulturen monotransfizierter YFP-Cldn5 oder TRQ-Cldn5 exprimierender MDCK-II-Zellen wurden mit Antikörpern gegen Rab4, -5, -7, -9 und -11 gefärbt. Abgebildet sind konfokale Z-Projektionen. Pfeile: *cross-over* endozytiertes Cldn5 Vesikel welches das jeweilige Rab-Protein enthält. Pfeilköpfe: *cross-over* endozytiertes Vesikel ohne Rab-Protein.

3.4.2.2. *Cross-over* endozytiertes Claudin kolokalisiert mit lysosomalen Markern

Immunfluoreszenzfärbungen gegen den Lysosomenmarker Lamp-1 zeigte häufig Überlappungen zwischen *cross-over* endozytiertem Cldn5 und dem Lysosom (Abb. 3.18A, Pfeile), jedoch waren nicht alle *cross-over* endozytierten Vesikel markiert (Pfeilköpfe). In lebenden Zellen wurde eine Kolokalisation des *cross-over* endozytierten Cldn5 mit LysoTracker gefunden (Abb. 3.18 B, Pfeile). Allerdings gab es auch hier Vesikel, welche *cross-over* endozytiertes Cldn5 enthielten, aber negativ für LysoTracker waren (Pfeilköpfe). Da LysoTracker in sauren Organellen akkumuliert, haben diese Vesikel also noch einen neutralen pH-Wert. In Übereinstimmung damit war in TRQ-Zellen in den LysoTracker-negativen Vesikeln auch *cross-over* endozytiertes YFP-Cldn5 sichtbar.

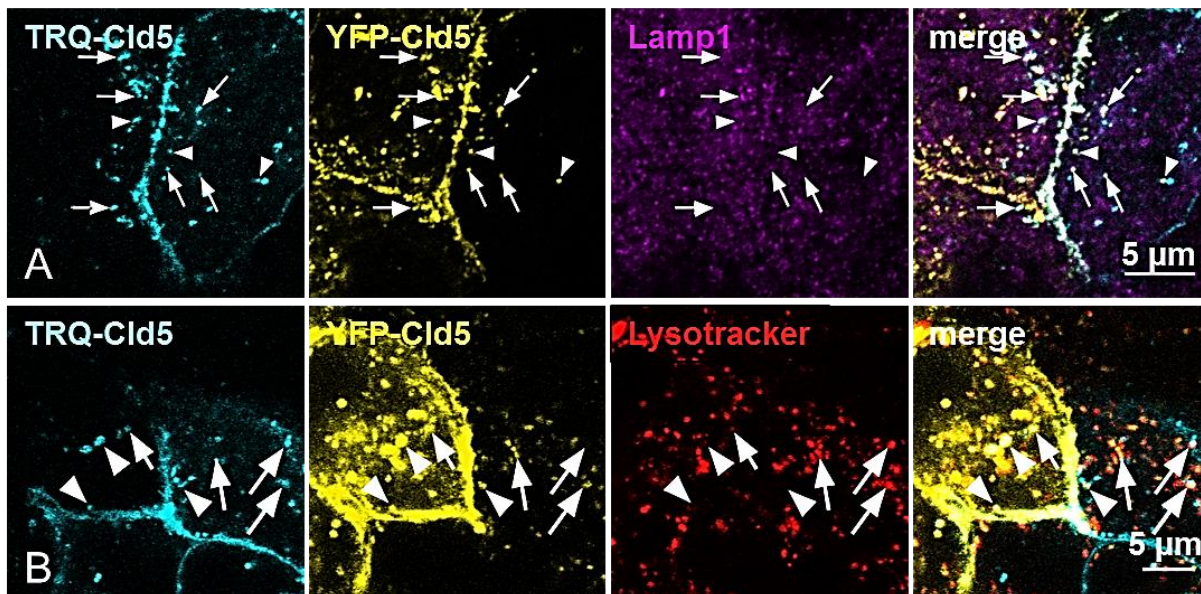


Abb. 3.18: *Cross-over* endozytiertes Claudin-5 kolokalisiert mit Lysosomenmarkern. TRQ-Cldn5/YFP-Cldn5 Kokulturen monotransfizierter MDCK-II-Zellen. Abgebildet ist jeweils eine konfokale Z-Projektion. **A:** Immunfluoreszenz gegen Lamp-1 an fixierten Zellen. Pfeile: positiv für LAMP-1. Pfeilköpfe: negativ für LAMP-1. **B:** Lebende Zellen inkubiert mit LysoTracker (2 h, 100 nM). Pfeile: positiv für LysoTracker. Pfeilköpfe: negativ für LysoTracker.

3.4.2.3. Kolokalisationsanalyse

Eine Analyse der Kolokalisation der Endosomenmarker mit Cldn5 mittels des Pearson-Korrelationskoeffizienten und des Manders-Koeffizienten lieferte keine eindeutigen Ergebnisse. Die Pearson-Koeffizienten (Abb. 3.19) zwischen TRQ-Cldn5 und den Endosomenmarkern waren höher, als die Koeffizienten zwischen YFP-Cldn5 und Endosomenmarkern. Die Verhältnisse zwischen den einzelnen Endosomenmarkern waren allerdings für beide Fluorophore ähnlich. Alle Endosomenmarker korrelierten stärker mit dem Cldn5 in der eigenen Zelle als mit *cross-over*

endozytiertem Cldn5. *Cross-over* endozytisiertes Cldn5 korrelierte am stärksten mit Rab7 und Rab11. Allerdings sind die Unterschiede zu den anderen Rab-Proteinen nicht besonders groß. Das gesamte Cldn5 in einer Zelle korrelierte am stärksten mit Rab5 und Rab7. Der Manders-Koeffizient unterschied sich nicht zwischen YFP-Cldn5 und TRQ-Cldn5-Zellen (Anhang 5), daher konnten alle Werte gemittelt werden. Allerdings lassen sich auch keine Unterschiede zwischen dem gesamten intrazellulären Cldn5 und *cross-over* endozytiertem Cldn feststellen.

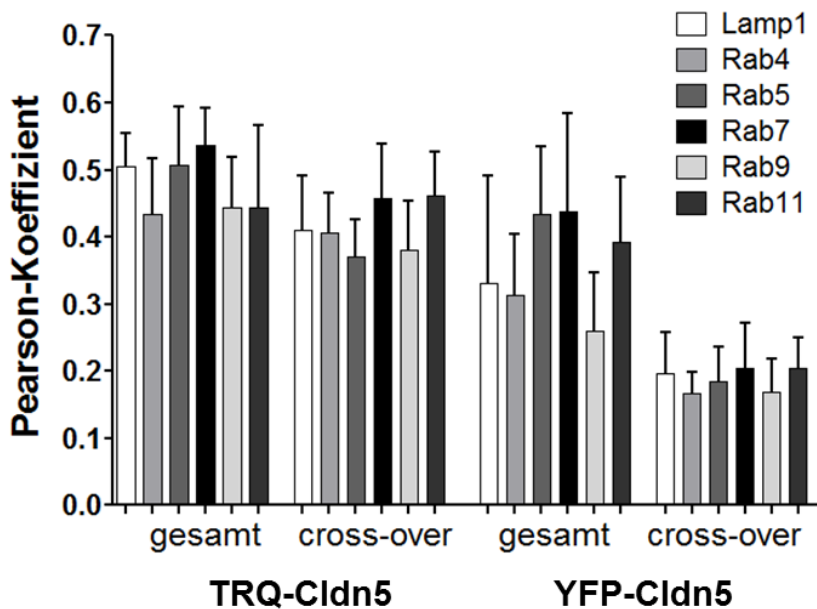


Abb. 3.19: Pearson-Koeffizient der Kolokalisation zwischen *cross-over* endozytiertem Claudin und Endosomen-Markern. Kokulturen von TRQ-Cldn5 oder YFP-Cldn5 exprimierenden monotransfizierten MDCK-II-Zellen wurden gegen verschiedene Endosomenmarker gefärbt (Lamp1, Rab4, -5, -7, -9, und -11; Marker für Lysosomen, Rezyklosomen, frühe Endosomen, späte Endosomen/Lysosomen, späte Endosomen/*Trans*-Golgi-Netzwerk, *Trans*-Golgi-Netzwerk/Rezyklosomen). Der Pearson-Koeffizient wurde sowohl für YFP-Cldn5 als auch TRQ-Cldn5 mit dem jeweiligen Marker bestimmt.

3.5. Abbau der *cross-over* endozytierten Vesikel

3.5.1. Hemmung des lysosomalen Abbaus

3.5.1.1. Chloroquin führt zu einer Akkumulation von *cross-over* endozytiertem Cldn5, aber nicht von Cldn5_{F147A} und Cldn5_{Q156E}

Die Kolokalisation des *cross-over* endozytierten Cldn mit Lamp-1 und LysoTracker deutete auf einen lysosomalen Abbau hin, daher wurde dieser Abbauweg genauer untersucht. Nach Behandlung der Zellen mit Chloroquin kam es zu einer konzentrationsabhängigen Verringerung

der Gesamtzahl an Cldn5-Vesikeln (Abb. 3.20). Nach dreistündiger Inkubation mit 100 μM Chloroquin erfolgte eine Reduktion um etwa 20%, nach Inkubation mit 200 μM waren es sogar 50%. Allerdings kam es auch zu einer drastischen Erhöhung der *cross-over* endozytierten Vesikel. Hier wurde bei beiden Konzentrationen eine etwa 2,5-fach höhere Anzahl an Vesikeln gefunden, wobei der Wert nach Einsatz von 200 μM Chloroquin etwas höher lag als nach Einsatz von 100 μM Chloroquin. Die Vesikelzahlen, sowohl insgesamt als auch *cross-over* endozytiert, waren bei Cldn5_{F147A} und Cldn5_{Q156E} durch die Behandlung mit Chloroquin nur leicht beeinflusst.

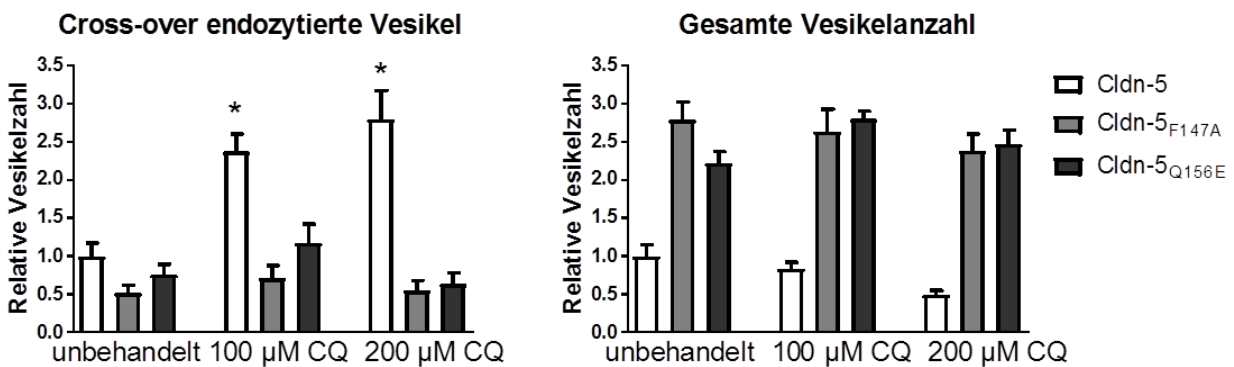


Abb. 3.20: Hemmung der lysosomalen Degradation führt zu einer Akkumulation von *cross-over* endozytiertem Cldn5. Kokulturen von YFP-Cldn oder TRQ-Cldn monozitotransfizierten MDCK-II-Zellen wurden mit Chloroquin (CQ, 100 bzw. 200 μM) behandelt. Bei Cldn5 kommt es nach Inhibition des lysosomalen Abbaus zu einer drastischen Erhöhung der *cross-over* endozytierten Vesikel, bei den Mutanten kommt es nur zu einer geringen Erhöhung. $n \geq 20$ analysierte Zellen, Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Post-Test.

3.5.1.2. Einfluss von Chloroquin auf die Fluoreszenz von *cross-over* endozytiertem YFP

In Experimenten an lebenden Zellen wurde *cross-over* endozytiertes Cldn5, in den vergrößerten Lysosomen nach Chloroquin-Behandlung gefunden (Abb. 3.21A). Da Chloroquin zu einer Erhöhung des pH-Wertes in den Lysosomen führt (Geng et al., 2010), sollte die Behandlung zu einer Erhöhung der Fluoreszenz-Intensität von *cross-over* endozytiertem YFP-Cldn führen. Es wurde allerdings nur ein leichter *rescue*-Effekt für YFP-Cldn5 gemessen (Abb. 3.21A). Es wurde weiterhin eine Zunahme von *cross-over* endozytierten TRQ-Cldn5 nach 2 h Behandlung mit Chloroquine (200 μM) festgestellt. Nach 20 Stunden Behandlung wurde ein signifikanter Anstieg auf den dreifachen Wert im Vergleich zu unbehandelten Zellen gemessen. Der *rescue*-Effekt ließ sich auch für eine Inkubation mit 100 μM Chloroquin sowohl für Cldn1 als auch für Cldn5 feststellen (Anhang 6).

Um die Identität der vergrößerten Vesikel als Lysosomen zu bestätigen, wurde eine gleichzeitige Inkubation mit Chloroquin und LysoTracker Red durchgeführt. In unbehandelten Zellen akkumuliert LysoTracker in sauren Organellen (Abb. 3.21B) und kolokalisiert mit Cldn5. Die Behandlung mit Chloroquin führte zu einer Verringerung der Intensität von LysoTracker in den vergrößerten Lysosomen (Abb. 3.21C), welche auch *cross-over* endozytiertes Cldn5 enthalten. Die Verringerung der Intensität von LysoTracker nach Behandlung mit Chloroquin zeigte auch, dass es tatsächlich zu einer Deazidifizierung der Lysosomen kam.

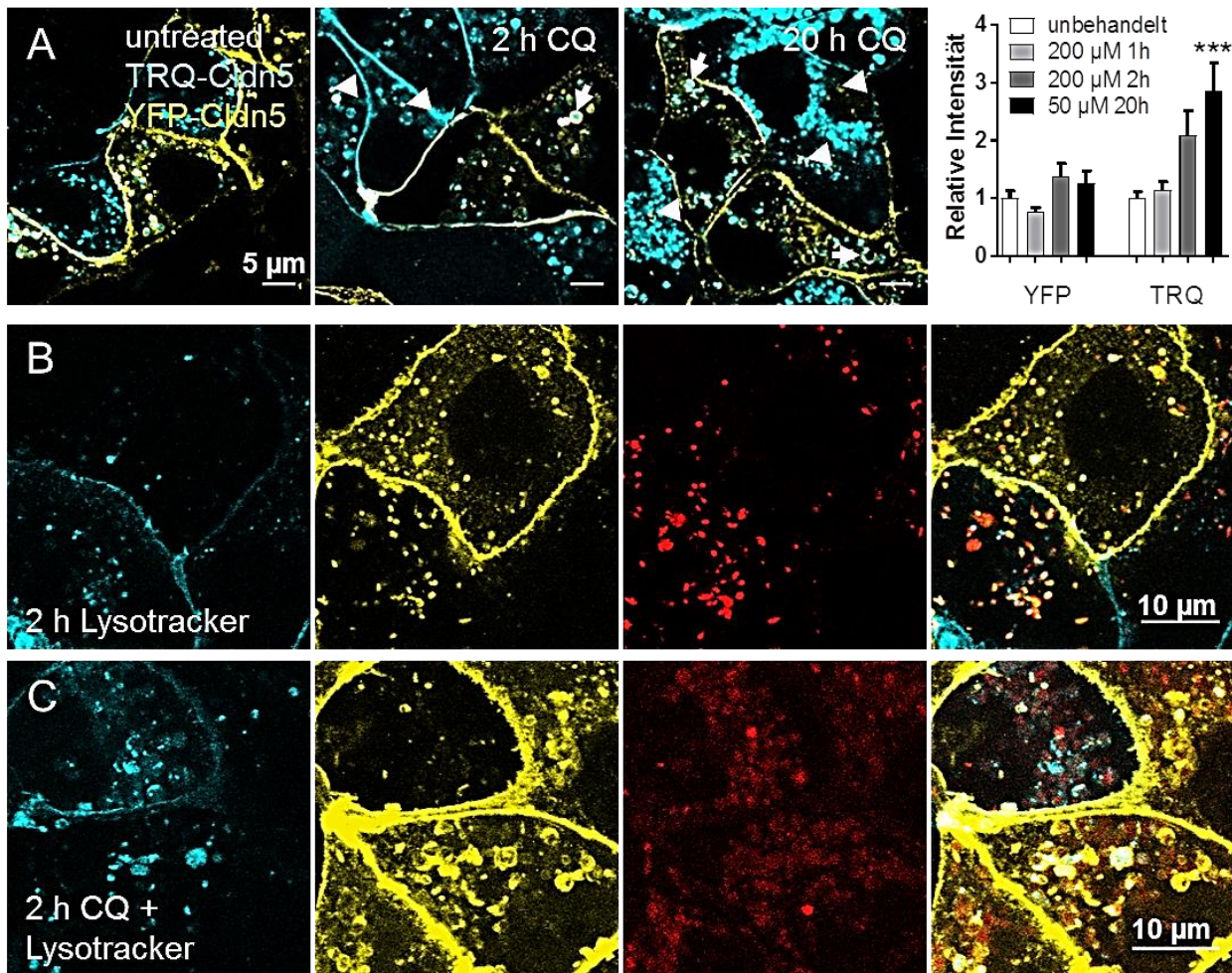


Abb. 3.21: Chloroquin führt zu einer Vergrößerung und Akkumulation der *cross-over* endozytierten Vesikel. YFP-Cldn5/TRQ-Cldn5 Kokulturen monotransfizierter MDCK-II-Zellen wurden mit 200 µM Chloroquin (CQ) behandelt. Die Werte wurden jeweils auf den unbehandelten Wert normiert. 20 h: n > 18 aus 2 Experimenten; Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Post-Test. **A:** Behandlung mit CQ führte zu einer leichten Erhöhung der Intensität von *cross-over* endozytiertem YFP-Cldn5. Pfeilköpfe: *cross-over* endozytiertes YFP-Cldn5. Pfeile: *cross-over* endozytiertes TRQ-Cldn5. **B:** In unbehandelten Zellen färbte LysoTracker saure Vesikel, welche auch Cldn5 enthielten. **C:** Behandlung mit CQ und LysoTracker führte zu einer Akkumulation von LysoTracker in den vergrößerten Lysosomen.

3.5.1.3. Einfluss von Bafilomycin auf die Fluoreszenz von *cross-over* endozytiertem YFP-Cldn5

Bafilomycin A1 hemmt die V-ATPase Protonenpumpe, welche den pH-Wert in Lysosomen reguliert, und führt so zu einer Hemmung der Azidifizierung von Lysosomen (Crider et al., 1994). Zusätzlich verhindert es die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen, so kommt es zu einer Akkumulation von Autophagosomen in der Zelle (Mauvezin 2015). In unbehandelten Kokulturen von TRQ-Cldn5/YFP-Cldn5 monotransfizierten MDCK-II-Zellen war normalerweise nur *cross-over* endozytiertes TRQ-Cldn5 sichtbar (Abb. 3.22A, Pfeilkopf). *Cross-over* endozytiertes YFP-Cldn5 wurde dagegen nur relativ selten detektiert (Abb. 3.22A, Pfeil). Nach Behandlung mit Bafilomycin wurden dagegen wesentlich mehr *cross-over* endozytierte YFP-Cldn5 Vesikel sichtbar (Abb. 3.22 B, Pfeile).

Bafilomycin A1 führte schon nach einer Stunde zu einer drastischen Erhöhung der YFP-Cldn5-Intensität in TRQ-Cldn5 exprimierenden Zellen (Abb. 3.22 C), während sich die Intensität des *cross-over* endozytierten TRQ-Cldn5 nur leicht erhöhte. Nach dreistündiger Inkubation mit Bafilomycin wurde eine etwa siebenmal höhere YFP-Intensität in TRQ-Cldn5 exprimierenden Zellen gemessen als in unbehandelten Proben. Bei Verlängerung der Inkubationszeit auf fünf Stunden fiel die YFP-Intensität wieder ab. Dieser Effekt stand im Kontrast zu *cross-over* endozytiertem TRQ-Cldn5, welches die höchste Intensität erst nach fünf Stunden Inkubation mit Bafilomycin zeigte. Diese Erhöhung war allerdings nicht so stark wie bei *cross-over* endozytiertem YFP-Cldn5 und erreichte nur den dreifachen Wert der unbehandelten Zellen. Da YFP bei saurem pH-Wert an Fluoreszenz verliert, lässt sich die starke Erhöhung des YFP-Signals als Effekt der Inhibition der lysosomalen Azidifizierung deuten (Griesbeck et al., 2001). Noch intaktes YFP, welches aufgrund des niedrigen pH-Wertes nicht fluoreszierte, wurde nach Behandlung mit Bafilomycin wieder sichtbar. Dagegen war die Erhöhung der TRQ-Intensität auf eine Akkumulation von Cldn5 zurückzuführen, welche durch die Verhinderung des lysosomalen Abbaus zustande kam.

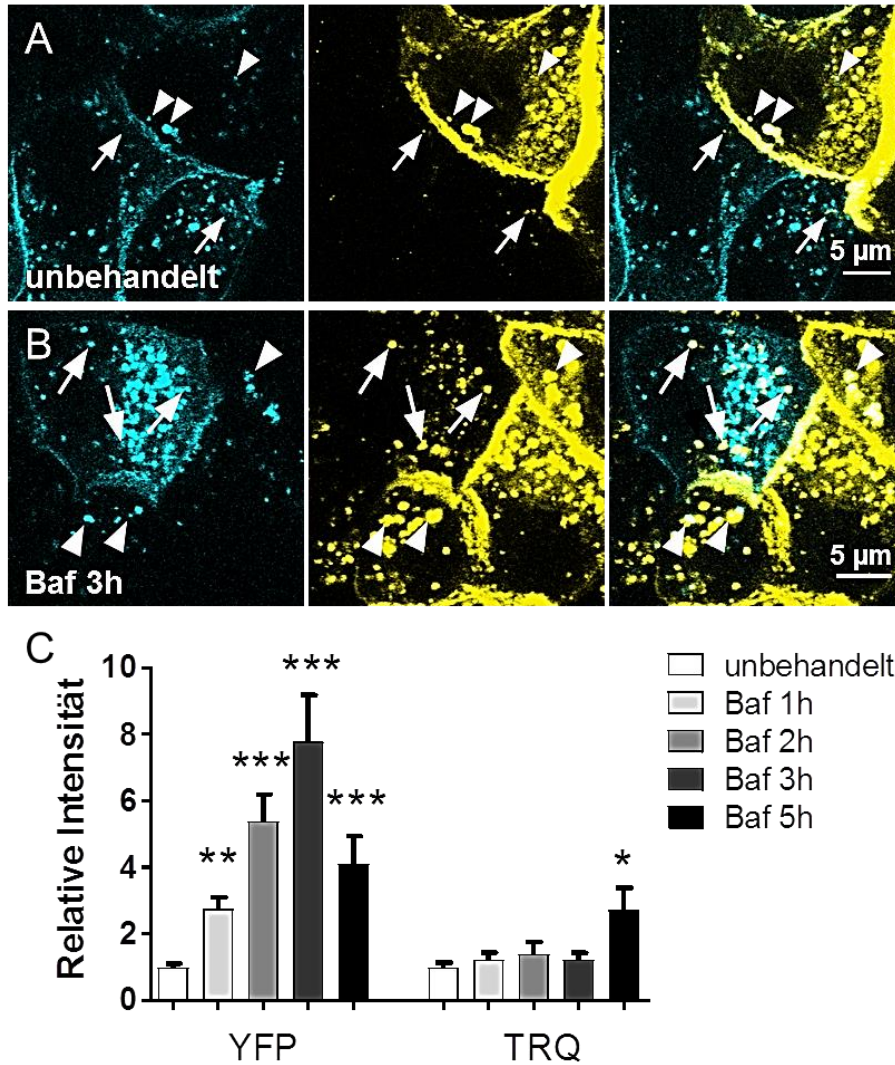


Abb. 3.22: Bafilomycin (Baf) führt zu einer Akkumulation von *cross-over* endozytiertem Cldn5. TRQ/YFP-Cldn5 Kokulturen von lebenden monotransfizierten MDCK-II-Zellen wurden mit Baf (100 nM) inkubiert. Durch die Inhibition der Vesikel-Azidifizierung war nach der Behandlung auch *cross-over* endozytisiertes YFP-Cldn5 sichtbar. **A, B:** Pfeile: *cross-over* endozytisiertes YFP-Cldn5. Pfeilköpfe: *cross-over* endozytisiertes TRQ-Cldn5. **C:** Mittlere Intensität von *cross-over* endozytiertem Cldn5. n=16 - 23, aus 2 Experimenten. Kruskal-Wallis-Test mit Dunns Post-Test.

3.5.2. Beteiligung von Autophagie am Abbau *cross-over* endozytierter Claudine

Da die Kolokalisation mit verschiedenen Rab-Proteinen keine eindeutigen Ergebnisse lieferte und die Effekte von Chloroquin und Bafilomycin auf einen autolysosomalen Abbauweg hinwiesen, wurden MDCK-II Zellen mit dem Autophagosomenmarker Tandem-RFP-GFP-LC3 transfiziert. Das RFP-GFP-Konstrukt dient in lebenden Zellen als pH-Sensor, da GFP (wie auch YFP) pH-sensitiv ist, während RFP auch in saurem Milieu fluoresziert. Fluoreszenz von GFP indiziert

einen etwa neutralen pH-Wert der Umgebung des Proteins, im Falle von LC3 bedeutet das eine Lokalisation im Zytoplasma oder in Autophagosomen vor Fusion mit dem Lysosom. Nach der Fusion kommt es zur Ansäuerung des Autophagosoms, was dazu führt, dass nur noch RFP detektiert wird (Maulucci et al., 2015).

3.5.2.1. *Cross-over* endozytiertes Cldn5 kolokalisiert mit dem Autophagiemarker LC3

In Kokulturen von monotransfizierten TRQ-Cldn5 oder RFP-GFP-LC3 exprimierenden MDCK-II-Zellen wurde *cross-over* endozytiertes TRQ-Cldn5 in RFP-GFP-LC3 exprimierenden Zellen gefunden (Abb. 3.23). TRQ-Cldn5 kolokalisierte in fast allen Vesikeln mit RFP (Pfeile), was auf das Vorhandensein von *cross-over* endozytiertem Cldn5 in Autolysosomen schließen ließ. In einigen Fällen wurde auch eine Kolokalisation mit GFP-Fluoreszenz gefunden (Pfeilköpfe), *cross-over* endozytiertes Cldn5 war also vor der Fusion mit dem Lysosom in Autophagosomen vorhanden. Eine Kolokalisation mit GFP wurde allerdings relativ selten gefunden, was dafür spricht, dass die Zeit zwischen Autophagosom-Entstehung und Fusion mit dem Lysosom relativ kurz war

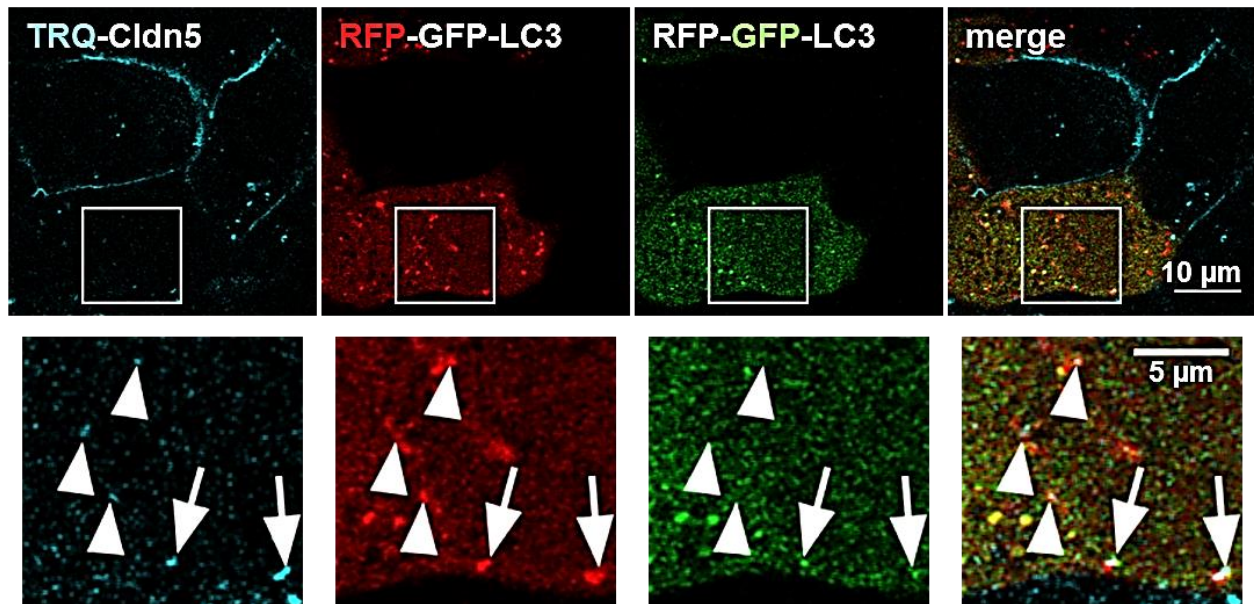


Abb. 3.23: *Cross-over* endozytiertes Cldn5 kolokalisiert mit dem Autophagosomenmarker LC3. Monotransfizierte Tandem-RFP-GFP-LC3 oder TRQ-Cldn5 exprimierende MDCK-II-Zellen wurden als Kokulturen kultiviert. *Cross-over* endozytiertes Cldn5 lokalisierte in RFP-positiven Vesikeln (Pfeilköpfe) und in RFP-GFP-positiven Vesikeln (Pfeile).

Nach Inkubation von TRQ-Cldn5/RFP-GFP-LC3 Kokulturen monotransfizierter MDCK-II-Zellen mit Chloroquin vergrößerten sich die LC3-positiven Autolysosomen (Abb. 3.24). In unbehandelten Zellen, sowie nach einstündiger Inkubation war RFP-GFP-LC3 im Zytosol sichtbar. Die vergrößerten Autolysosomen enthielten *cross-over* endozytiertes TRQ-Cldn5, welches am Rand der Vesikel lokalisierte (Abb. 3.24A, Pfeilköpfe). In einigen Vesikeln war an der Membran eine GFP und RFP-Färbung zu erkennen (Pfeile). Außerdem waren teilweise Vakuolen zu erkennen, welche kein LC3 enthielten (Sterne). Nach drei Stunden Inkubation mit Chloroquin lokalisierte LC3 nur noch membranständig (Abb. 3.24B), fast alle Autolysosomenmembranen waren GFP und RFP-positiv. Die Lokalisation von *cross-over* endozytiertem Cldn5 war unverändert wie nach einstündiger Inkubation seitlich innerhalb der Autolysosomen (Abb. 3.24B, Pfeilköpfe). Selten fanden sich auch kleine GFP-, RFP- und TRQ- positive Vesikel (Pfeil). Das Innere der größeren Autolysosomen war allerdings nie GFP-positiv, analog zu dem nur leichten YFP-*rescue* Effekt (Abb. 3.21) wurde der pH-Wert der Autolysosomen durch Chloroquin möglicher Weise nicht genug angehoben um GFP im Inneren sichtbar werden zu lassen.

Diese Kolo-kalisierung deutete auf eine Funktion von LC3 während der *cross-over* Endozytose hin. Ein *knock-down* von LC3 ergab jedoch keinen eindeutigen Effekt auf die *cross-over* endozytierten Vesikelzahlen (Anhang 7), außerdem konnte der *knock-down* nicht mittels *Western blot* bestätigt werden, da die Banden zu schwach für eine aussagekräftige densitometrische Auswertung waren. Da die humane SI-RNA nur eine Übereinstimmung von 85% mit der entsprechenden caninen Sequenz hatte, ist der *knock-down* eventuell nicht effizient genug um eindeutige Effekte zu erzielen.

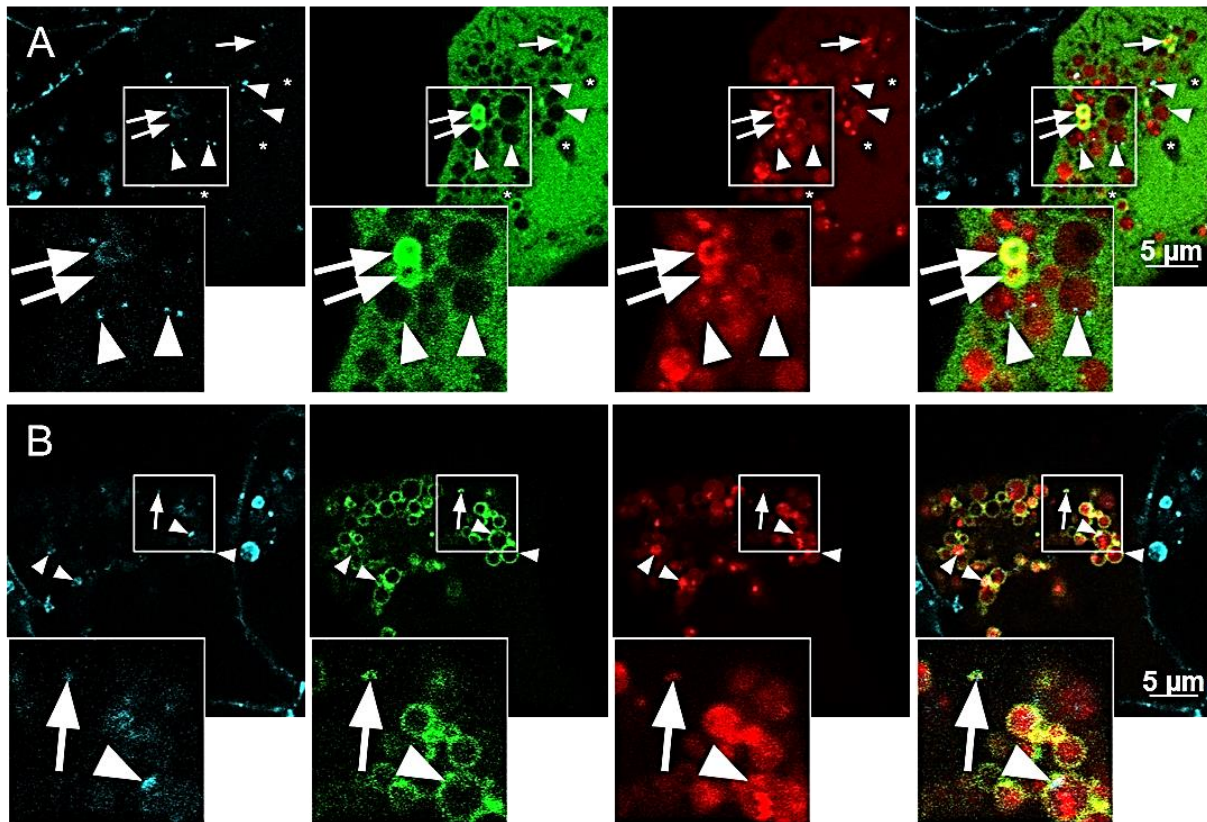


Abb. 3.24: RFP-GFP-LC3 kolokalisiert mit *cross-over* endozytiertem Cldn5 in vergrößerten Lysosomen nach Chloroquin (CQ) Behandlung. Kokulturen TRQ-Cldn5/RFP-GFP-LC3 monotransfizierter MDCK-II-Zellen wurden mit 200 µM CQ behandelt. *Cross-over* endozytiertes TRQ-Cldn5 befand sich am Rand der vergrößerten Autolysosomen (Pfeilköpfe) und kolokalisierte dort mit RFP. **A:** 1 h CQ. GFP-Fluoreszenz befindet sich überwiegend im Zytoplasma, zum Teil auch in der Membran von Autolysosomen (Pfeile). **B:** 3 h CQ. GFP-Fluoreszenz befindet sich nicht mehr im Zytoplasma, sondern in der Membran von Autolysosomen. Kleine TRQ-Cldn5 enthaltene Vesikel, welche für GFP und RFP positiv sind (Pfeil).

3.5.2.2. *Cross-over* endozytiertes Cldn5 kolokalisiert mit *autophagy related protein 16L*, einem Marker für frühe Autophagosomen

ATG16L ist ein Protein, welches an der Initiierung von Autophagosomen-Formation beteiligt ist. Im Komplex mit ATG12 und ATG5 lipidiert ATG16L LC3 am Ort der Autophagosomen-Biogenese (Fujita et al., 2008). ATG16L wurde auch an der Plasma-Membran nachgewiesen (Ravikumar et al., 2010). In Immunfluoreszenz-Färbungen gegen ATG16L konnte dieses überlappend mit Claudinen an der Plasmamembran nachgewiesen werden (Abb. 3.25, Pfeilköpfe). Außerdem wurde eine Kolokalisation von ATG16L mit *cross-over* endozytiertem Cldn5 gefunden (Abb. 3.25, Pfeile). Da sich ATG16L kurz nach der Induktion des Autophagosoms von dessen Membran löst (Fujita et al., 2008), waren diese ATG16L-positiven Vesikel frühe Stadien der Vesikelbildung. Die Kolokalisation von ATG16L mit Claudinen an TJs deutete auf eine Rolle von ATG16L bei der Initiation der *cross-over* Endozytose hin.

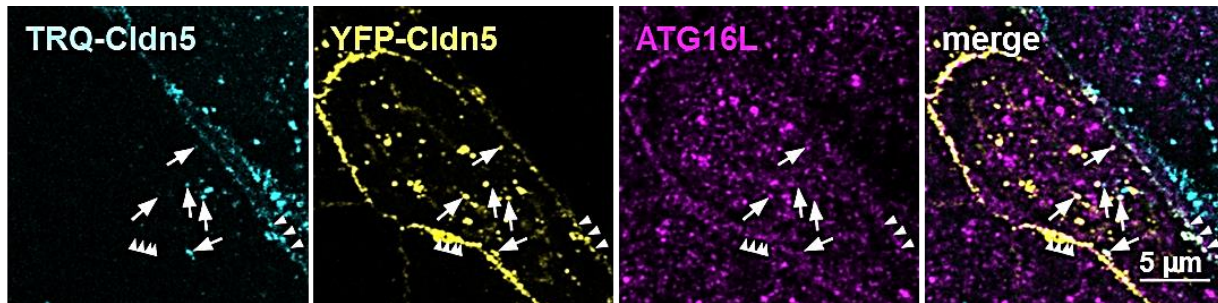


Abb. 3.25: *Autophagy related protein 16L (ATG16L) kolokalisiert mit Cldn5 in der Plasmamembran und in cross-over endozytierten Vesikeln.* Immunfluoreszenz-Färbung von Kokulturen TRQ-Cldn5/YFP-Cldn5 monotransfizierter MDCK-II-Zellen gegen ATG16L, welches an der Biogenese von Autophagosomen beteiligt ist. Gezeigt ist eine Z-Projektion. ATG16L kolokalisiert in Vesikeln mit *cross-over* endozytiertem Cldn5 (Pfeile), aber auch mit Cldn5 an den *tight junctions* (Pfeilköpfe).

3.5.2.3. Hemmung von Kinasen, welche an der Initiierung von Autophagosomen-Entstehung beteiligt sind, führt zu verringerter *cross-over* Endozytose

Zur Verifizierung des autolysosomalen Abbauweges wurden PI3-Kinasen (Klasse 3) und die PIK-FYVE Kinase mittels LY294002 bzw. YM201636 gehemmt. PI(3)P und PI(5)P sind involviert in die Initiierung der Bildung von Autophagosomen (Noda et al., 2009; Vicinanza et al., 2015). Inhibition der PI3-Kinasen durch LY294002 führte nach 2,5 h zur Reduktion der *cross-over* endozytierten Vesikel (Abb. 3.26A). Die Gesamtzahl der Vesikel stieg nach 1,5 h auf mehr als das 1,5-fache der unbehandelten Proben an, fiel dann jedoch wieder ab, sodass nach 2,5 h eine signifikante Verringerung der Vesikelzahlen zu erkennen war. Behandlung mit YM201636 führte zu einer zeitabhängigen Reduktion der *cross-over* endozytierten Vesikel, sowie der Gesamtzahl der Vesikel (Abb. 3.26B). Allerdings war der Effekt auf *cross-over* endozytierte Vesikel größer als der auf die Gesamtanzahl der Vesikel. Nach dreistündiger Behandlung war nur die Reduktion der *cross-over* endozytierten Vesikel signifikant verändert. Für endogenes Cldn1 wurde auch eine signifikante Reduktion nach zwei- und dreistündiger Behandlung gefunden (Anhang 8).

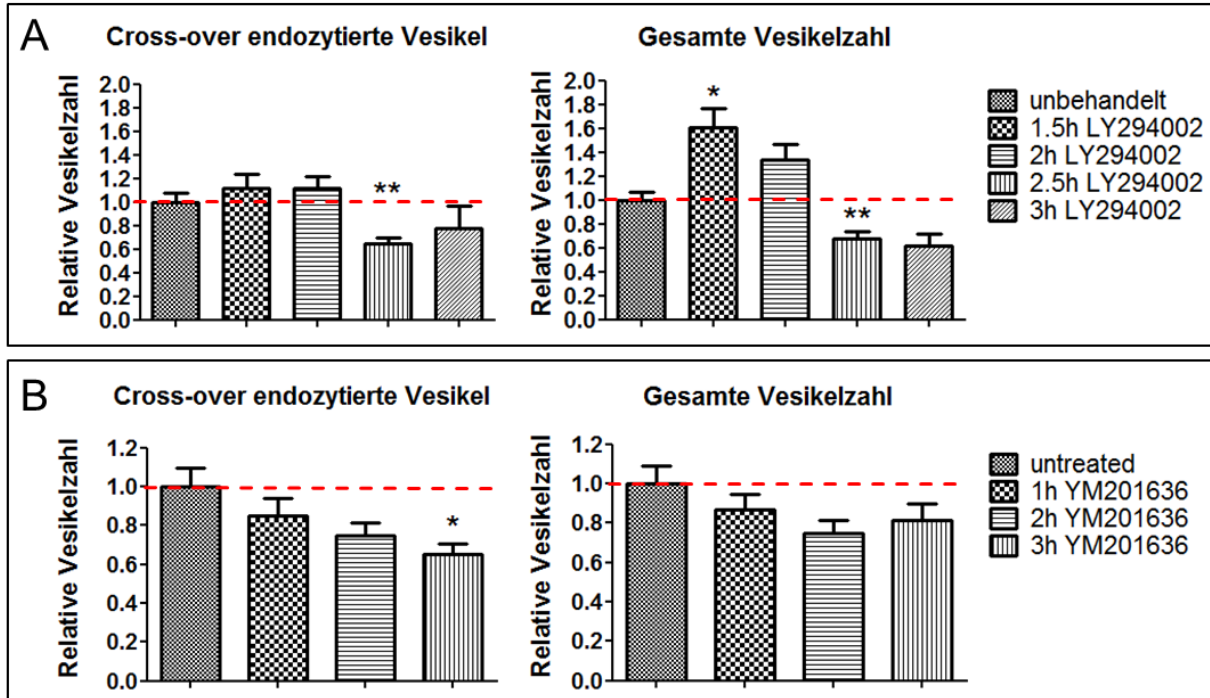


Abb. 3.26: Hemmung von Kinasen, die zur Bildung von Autophagosomen beitragen, führt zu einer Reduktion von *cross-over* endozytiertem Cldn5. **A:** Inhibition der PI3-Kinase durch LY294002 (100 μ M) führte nach 2,5 h zu einer signifikanten Reduktion der *cross-over* endozytierten Vesikel und der gesamten Vesikelanzahl. $n \geq 30$ aus 2 Experimenten. **B:** Inhibition der PIK-FYVE Kinase durch YM201636 (1 μ M) führte nach dreistündiger Inkubation zu einer signifikanten Reduktion der *cross-over* endozytierten Vesikel und zu einer nicht signifikanten Reduktion der Gesamtzahl der Vesikel. $n \geq 50$ aus 2 Experimenten. 1-way ANOVA mit Dunn-Post-Test. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3.5.2.4. Induktion von Autophagie mittels Rapamycin führt zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der *cross-over* endozytierten Vesikel

Inkubation mit Rapamycin führt zu verstärkter Induktion von Autophagie indem ATG-Proteine aktiviert werden und außerdem die lysosomale Degradation angeregt wird (He and Klionsky, 2009). Inkubation mit 100 – 500 nM Rapamycin führte zu einer Reduktion *cross-over* endozytierter Vesikel (nur bei 300 nM signifikant), allerdings nicht zu einer Reduktion der gesamten Vesikelzahl (Abb. 3.27). Eine Konzentration von 50 nM führte dagegen nicht zu einer Reduktion der *cross-over* endozytierten Vesikel, sondern zu einer Erhöhung der gesamten Vesikelzahl.

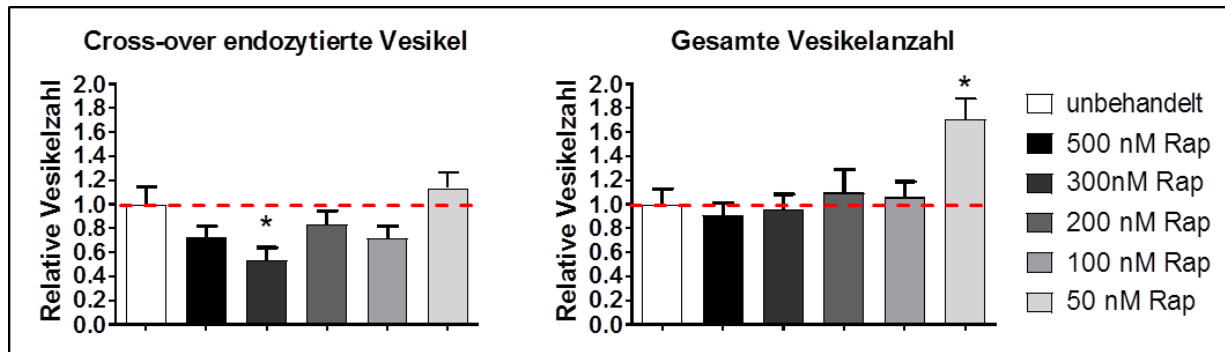


Abb. 3.27: Induktion von Autophagie durch Rapamycin führt zu einer Verringerung der *cross-over* endozytierten Cldn5-Vesikel. TRQ-Cldn5/YFP-Cldn5 Kokulturen monotransfizierter MDCK-II-Zellen. Rapamycin zeigte eine konzentrationsabhängige Wirkung auf die Vesikelzahlen. Konzentrationen von 100 – 500 nM führten zu einer Verringerung *cross-over* endozytierter Vesikel, hatten aber keinen Einfluss auf die Gesamtanzahl. 50 nM Rapamycin zeigten dagegen keine Wirkung auf die *cross-over* endozytierten Vesikel, dafür aber eine Erhöhung der Gesamtanzahl. Zellen wurden nach fünfstündiger Behandlung für die Vesikelanalyse fixiert. Normiert auf unbehandelt. n > 40 analysierte Zellen aus zwei Experimenten. 1-way ANOVA mit Dunns Post-Test. * p<0,05.

3.5.3. Chloroquin und Rapamycin beeinflussen die Proteinmengen von Cldn5

Die Proteinmengen nach Inkubation mit Inhibitoren wurden mittels densitometrischer Auswertung von *Western blots* bestimmt. Nach dreistündiger Inkubation mit Chloroquin ließen sich leicht erhöhte Cldn5-Mengen detektieren (Abb. 3.28), was für eine Blockierung des lysosomalen Abbaus spricht. Nach einstündiger Behandlung mit Chlorpromazin wurde keine Veränderung der Proteinmenge von Cldn5 festgestellt. Behandlung mit Rapamycin führte dagegen zu einer Reduktion der Proteinmenge von Cldn5. Sowohl Chloroquin als auch Chlorpromazin führten zu einer Erhöhung der LC3-II-Menge, dagegen führte Rapamycin zu einer leichten Reduktion. Rapamycin hat jedoch keinen Einfluss auf Cldn5_{F147A}-Proteinmengen.

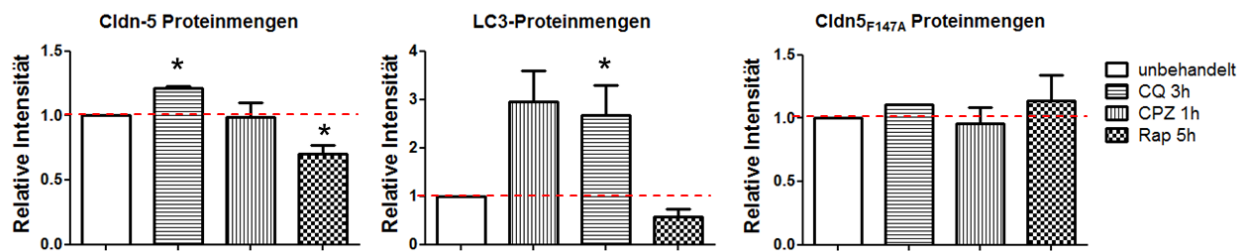


Abb. 3.28: Chloroquin (CQ) und Rapamycin (Rap) beeinflussen die Proteinmenge von Cldn5. Cldn5 oder Cldn5_{F147A} exprimierende MDCK-II-Zellen wurden mit CQ (200 µM), Chlorpromazin (CPZ, 50 µM) oder Rap (500 nM) behandelt. Die Zelllysate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Proteinmengen von Cldn5 und LC3-II bzw. Cldn5_{F147A} wurden densitometrisch bestimmt, wobei jede Spur auf GAPDH normiert wurde. Alle Werte wurden anschließend auf den Wert der unbehandelten Probe bezogen. n = 2 für Cldn5_{F147A} CQ; n ≥ 4 für alle anderen Gruppen. Einstichproben t-Test. * p<0,05.

3.6. Struktur der *cross-over* endozytierten Vesikel

3.6.1. *Stimulated emission depletion* (STED)-Mikroskopie

3.6.1.1. *Stimulated emission depletion*-Mikroskopie in lebenden Zellen zeigt doppelwandige Vesikelstruktur

Um die Struktur der *cross-over* endozytierten Vesikel genauer zu untersuchen, wurde hochauflösende STED-Mikroskopie eingesetzt. Im Vergleich zur konfokalen Mikroskopie, ließ sich bei STED-Aufnahmen eine klare Trennung der Claudine aus den aneinander grenzenden Zellen erkennen (Abb. 3.29). *Cross-over* endozytiertes TRQ-Cldn lokalisierte im Inneren des Vesikels, während YFP-Cldn sich außen befand. Diese Verteilung war auch im Intensitäts-Profil der Fluoreszenz zu erkennen (Abb. 3.29, rechts). Im Profil der STED-Aufnahme sind zwei klare Maxima der YFP-Fluoreszenz außerhalb der TRQ-Fluoreszenz zu erkennen. Auch in der Plasmamembran lagen die Fluorophore getrennt voneinander vor. Da es sich bei Claudinen um integrale Membranproteine handelt, lässt sich davon ausgehen, dass die Plasmamembranen beider Zellen zu dem Vesikel beitragen. Für Cldn5_{F147A} und Cldn5_{Q156E} wurden solche Vesikel nicht gefunden, vermutlich weil sie nicht stabil in die TJs eingebaut werden können und daher nicht so häufig *cross-over* endozytiert wurden.

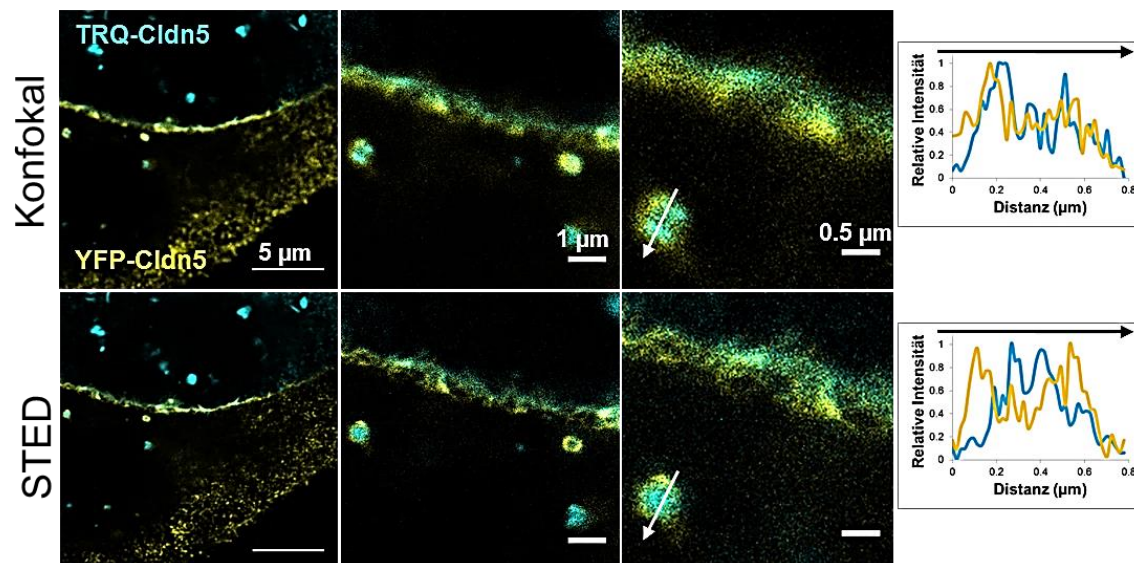


Abb. 3.29: Super-resolution Mikroskopie zeigt eine klare Trennung der beiden Fluorophore an der Plasmamembran und in *cross-over* endozytierten Vesikeln. Konfokale und *stimulated emission depletion* (STED)-Mikroskopie in lebenden Zellen (TRQ-Cldn5/YFP-Cldn5 Kokulturen monotransfizierter MDCK-II-Zellen). Die Zellen wurden in eiskaltem HBSS-Puffer (mit Ca²⁺ und Mg²⁺) mikroskopiert um die Bewegung der Vesikel möglichst gering zu halten. Oben: Konfokale Aufnahme. Unten: STED-Aufnahme. Rechts: Intensitätsprofil der beiden Fluorophore durch das Vesikel.

Nach Behandlung mit Chloroquin vergrößerten sich die Cldn5-enthaltenden Vesikel (Abb. 3.30). Das *cross-over* endozytierte TRQ-Cldn5 lokalisiert im Inneren des Vesikels, allerdings konzentriert an einer Seite der äußeren Membran, während YFP-Cldn5 in der äußeren Membran lokalisierte. Bei Inkubation mit Chloroquin erweiterte sich nur der äußere Radius, nicht aber der Radius des *cross-over* endozytierten TRQ-Cldn5. Die *cross-over* endozytierten Vesikel hatten ohne Zugabe von Chloroquin schon einen relativ großen Durchmesser zwischen 400 und 900 nm (Abb. 3.30, rechts). Nach zweistündiger Behandlung mit Chloroquin vergrößert sich der Durchmesser auf bis zu 2 μm .

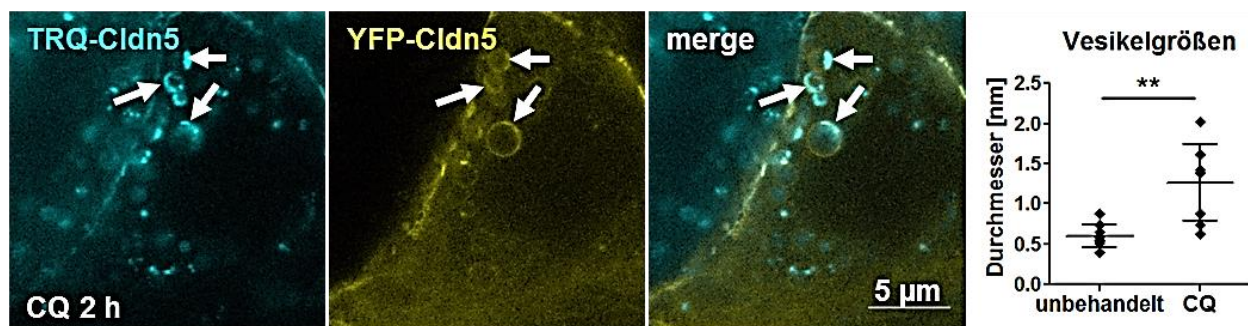


Abb. 3.30: Super-Resolution-Mikroskopie *cross-over* endozytierter Vesikel nach Behandlung mit Chloroquin. Lebende, monotransfizierte MDCK-II-Zellen in TRQ-Cldn5/YFP-Cldn5 Kokulturen nach zweistündiger Behandlung mit Chloroquin (CQ, 200 μM) aufgenommen mit *stimulated emission depletion* (STED)-Mikroskopie. Pfeile: *cross-over* endozytiertes Cldn5 in vergrößerten Lysosomen. Rechte Seite: Durchmesser der Außenwand der Vesikel, welche *cross-over* endozytiertes Cldn5 enthalten. Unbehandelt n=9, CQ n=8 gemessene Vesikel. Zweiseitiger t-Test. ** p<0,01.

3.6.1.2. In fixierten Proben ließ sich keine gute Auflösung der Vesikel erzielen

Um eine genauere Darstellung der Vesikel zu erhalten, wurden STED-Bilder von fixierten Zellen aufgenommen (Abb. 3.31). Es wurden drei verschiedene Fixierungsmöglichkeiten getestet: PFA, Methanol und Aceton. Von diesen war allerdings keine geeignet die Vesikelmembran zu konservieren. Selbst nach Dekonvolution (mathematische Methode zu Erhöhung von Kontrast und Auflösung der Bilder) des STED-Bildes wurde keine klare Trennung der Fluorophore in *cross-over* endozytierten Vesikeln erreicht, die bei STED-Mikroskopie von lebenden Zellen gefunden wurde (3.6.1.1). Dies ist vermutlich auf eine Kondensation der Membranen während der Fixierung zurückzuführen, welche die Trennung beider Zellen erschwert. Allerdings konnte die Kolokalisation von *cross-over* endozytiertem Cldn5 mit endogenem Cldn1 verifiziert werden (Abb. 3.31, roter Kanal).

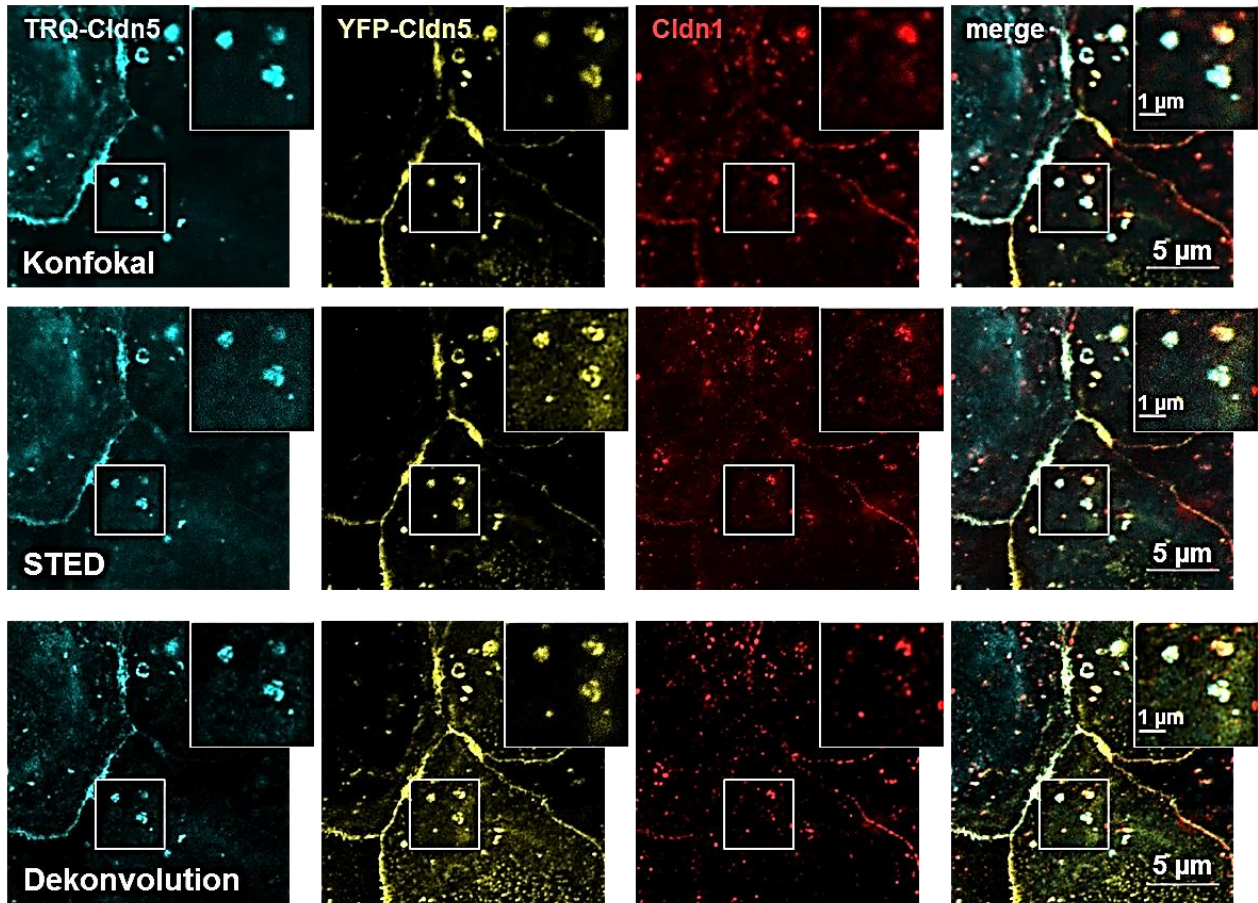


Abb. 3.31: Fixierung der Zellen führt zu einer veränderte Membranstruktur. Aceton-fixierte TRQ-Cldn5/YFP-Cldn5 Kokulturen monotransfizierter MDCK-II-Zellen mit Immunfluoreszenz gegen endogenes Cldn1. Im Vergleich mit dem konfokalen Bild (oben) wurden nach STED-Mikroskopie die Vesikel schärfer (Mitte), durch Dekonvolution konnte etwas Hintergrundfluoreszenz reduziert werden und die Bildschärfe noch einmal erhöht werden (unten). Allerdings wurden durch die Fixierung offenbar die Membranen zusammengezogen und es lässt sich keine klare Abgrenzung zwischen den Fluorophoren erkennen.

3.6.2. *Cross-over* endozytiertes Claudin befindet sich im Vesikellumen

Die Kolokalisation von *cross-over* endozytiertem Cldn5 mit LC3 lässt sich auf verschiedenen Wegen erklären: 1) Das ohnehin schon doppelwandige Vesikel wird vom Autophagosom umschlossen und dann dem Lysosom als Ganzes zugeführt. 2) Das doppelwandige Vesikel, welches aus der Plasmamembran gelöst wird ist selbst ein Autophagosomen-ähnliches Vesikel, dessen äußere Membran direkt mit dem Lysosom fusioniert. Um zu klären, um welchen Fall es sich handelt, wurde ein *fluorescence protease protection* (FPP)-Assay durchgeführt. Dabei wird selektiv die Plasmamembran permeabilisiert, während die Membranen der Zellorganellen intakt bleiben. So wurden nur zytosolische Proteine abgebaut, aber Proteine im Inneren von Organellen waren vor der Protease geschützt.

Nach der Permeabilisierung der Plasmamembran war die Claudin-Fluoreszenz zunächst unbeeinträchtigt (Abb. 3.32). Nach Zugabe von Protease K wurden innerhalb von 26 min die zytosolischen Fluorophore verdaut, sowohl an der Plasmamembran, als auch an der dem Zytosol zugewandten Seite der Vesikelmembranen. *Cross-over* endozytierte Vesikel waren zu Beginn positiv für sowohl YFP, als auch TRQ (Abb. 3.32, Pfeile). Im Verlauf des Proteolyse ging die Fluoreszenz in der eigenen Zelle verloren und nur das *cross-over* endozytierte Cldn5 blieb erhalten. Das ließ sich sowohl für YFP-Cldn5 als auch für TRQ-Cldn5 feststellen.

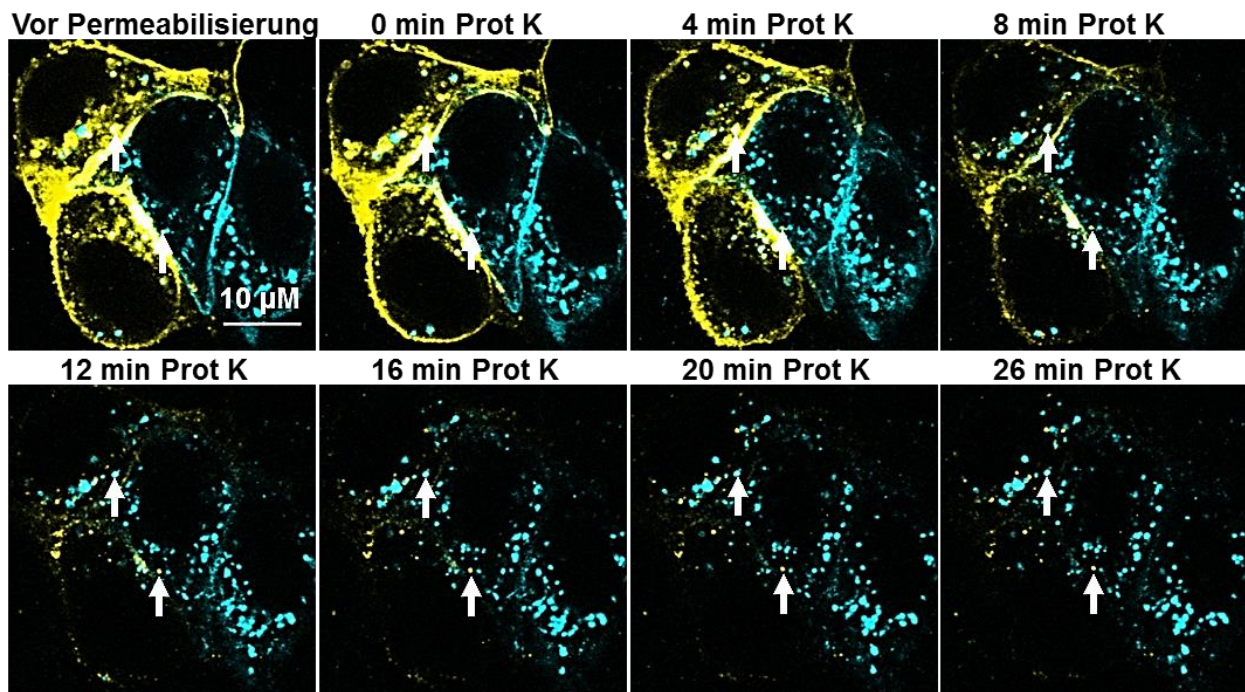


Abb. 3.32: *Cross-over* endozytiertes Cldn5 wird im *fluoreszenz protease protection* Assay nicht degradiert. TRQ-Cldn5/YFP-Cldn5 Kokulturen von monotransfizierten MDCK-II-Zellen wurden mit Digitonin (100 µM, 3 min) permeabilisiert und anschließend mit Protease K (300 µg/ml) verdaut. Während der Proteolyse wurde alle 2 min ein *Z-stack* aufgenommen, in der Abbildung sind *Z-Projektionen* der einzelnen Zeitpunkte gezeigt. Pfeile: *cross-over* endozytiertes Cldn5.

Um den Anteil des degradierten Cldn5 zu berechnen wurde zunächst die Veränderung der Fluoreszenz-Intensität im Verlauf der Messungen an unbehandelten Proben bestimmt. In den unbehandelten Proben ließ sich erkennen, dass die Intensität von YFP schon durch Ausbleichen mit jedem Messzyklus nachließ, während TRQ wesentlich fotostabiler war und sich in seiner Intensität kaum veränderte (Abb. 3.33A). Nach 14 Messzyklen hatten YFP-Cldn5 Zellen einen Intensitätsverlust von über 40%. TRQ-Zellen zeigten dagegen am Ende der Messung eine unveränderte Intensität. *Cross-over* endozytiertes YFP-Cldn5 verlor in unbehandelten Zellen knapp 30% seiner ursprünglichen Intensität, während es bei *cross-over* endozytiertem TRQ-Cldn5

nur knapp 10% waren. Die Diskrepanz zwischen der Gesamtfluoreszenz und der *cross-over* Fluoreszenz der Fluorophore ist vermutlich auf die Bewegung der Zelle während der Messung zurückzuführen. Da viel weniger *cross-over* endozytiertes Cldn5 vorhanden war, hatte es einen größeren Einfluss, wenn sich ein Vesikel aus dem Messbereich entfernte.

Nach 25 min Inkubation mit Protease K wurden über 50% des intrazellulären TRQ abgebaut (Abb. 3.33 B,C). *Cross-over* endozytiertes TRQ-Cldn war nicht betroffen und behielt die ursprüngliche Intensität bei. *Cross-over* endozytiertes YFP-Cldn konnte aufgrund des Bleichens nach 14 Messzyklen und der ohnehin schon seltenen Existenz dieser Vesikel nur in wenigen Proben quantitativ ausgewertet werden. Aber auch hier zeigte sich ein geringerer Verlust der Intensität als YFP-Cldn5 in der eigenen Zelle. Dies zeigte, dass sich das *cross-over* endozytierte Cldn5 tatsächlich im Inneren der Vesikel befanden, während die äußere Membran Kontakt mit dem Zytoplasma hatte.

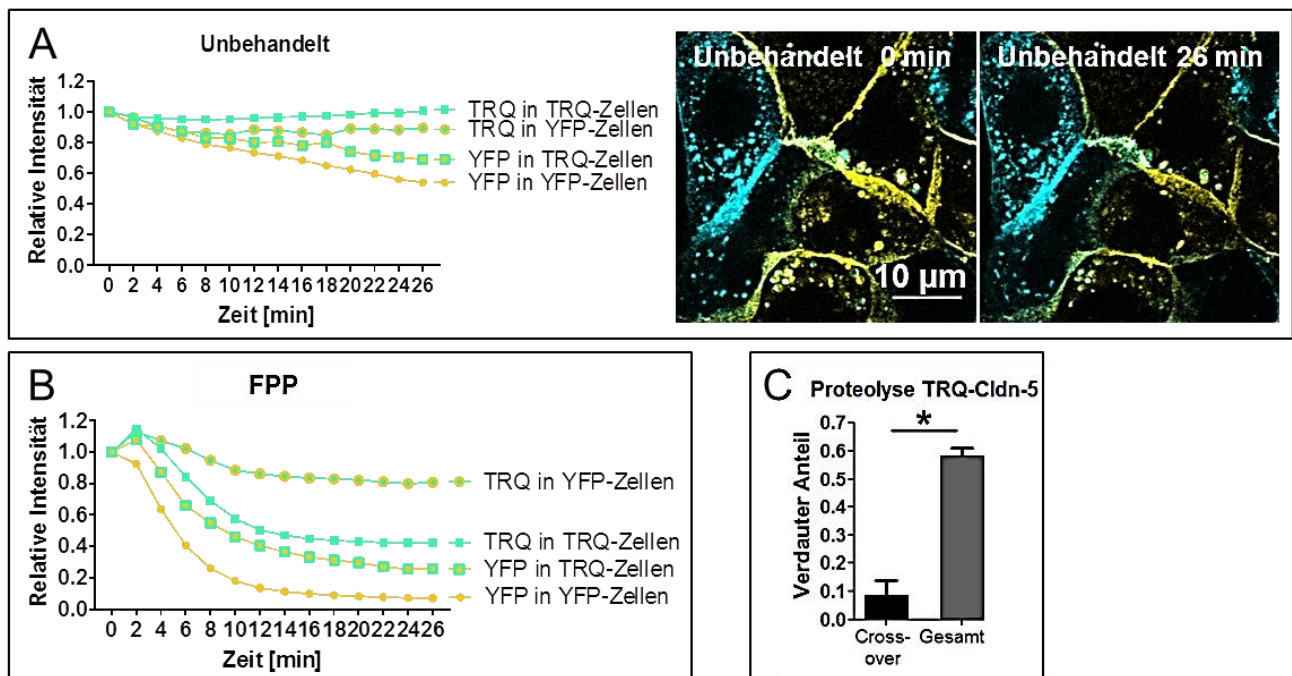


Abb. 3.33: *Cross-over* endozytiertes Cldn5 ist vor der Proteolyse durch Proteinase K geschützt. TRQ-Cldn5/YFP-Cldn5 Kokulturen von monotransfizierten MDCK-II-Zellen. Für die Messung des degradierten Cldn5 wurden insgesamt 14 *Z-stacks* in zweiminütigen Intervallen von einem Zellbereich aufgenommen und der zeitliche Verlauf der Intensität in *Z*-Projektionen ausgewertet. **A:** Messung des Ausbleichens der Fluorophore in unbehandelten Zellen. $n=7$; für YFP in TRQ $n=4$. **B:** Messung der Intensität nach Permeabilisierung der Plasmamembran und Zugabe von Protease K. $n > 12$ analysierte Zellen aus zwei Experimenten. **C:** Proteolysierter Anteil an TRQ-Cldn5 nach Abzug des Ausbleichens. $n = 16$; zweiseitiger t-Test. * $p < 0,05$.

3.7. Internalisierung Claudin-abgeleiteter Peptide

Zur Modulierung der TJs können Claudin-abgeleitete Peptide eingesetzt werden. Diese Erhöhen die parazelluläre Permeabilität für Ionen und Tracermoleküle durch Herunterregulierung von Claudinen. Die Peptide binden an die EZS von Claudinen und werden zusammen mit diesen internalisiert (Zwanziger et al., 2012a). Jedoch ist der Mechanismus, durch welchen diese Internalisierung erfolgt noch nicht vollständig geklärt. Es stellte sich die Frage, ob das Peptid im TJ-Bereich an Claudine bindet, oder an freie Claudine außerhalb der TJs.

3.7.1. Cldn1, -2 und -5 abgeleitete Peptide unterscheiden sich nicht in ihrer Lokalisation

Das Cldn5-abgeleitete Peptid C5C2 wurde mit TAMRA markiert und mit Kokulturen von TRQ-Cldn oder YFP-Cldn-exprimierender Zellen inkubiert. TAMRA-C5C2 befand sich zum Teil in Vesikeln, welche auch *cross-over* endozytiertes TRQ- oder YFP-Cldn5 enthielten (Abb. 3.34, weiße Kästen). Im Fluoreszenzprofil sieht man jedoch, dass eine unterschiedliche Verteilung der Fluorophore innerhalb des Vesikels existiert. Allerdings findet sich TAMRA-C5C2 auch in Vesikeln mit *cross-over* endozytiertem YFP-Cldn5 (Abb. 3.34, Vesikel 2), also in Vesikeln, welche noch einen annähernd neutralen pH-Wert haben. In den Intensitätsprofilen ließ sich allerdings keine eindeutige Trennung oder Überlappung der Fluoreszenz von YFP-Cldn5, TRQ-Cldn5 und TAMRA-Peptid erkennen.

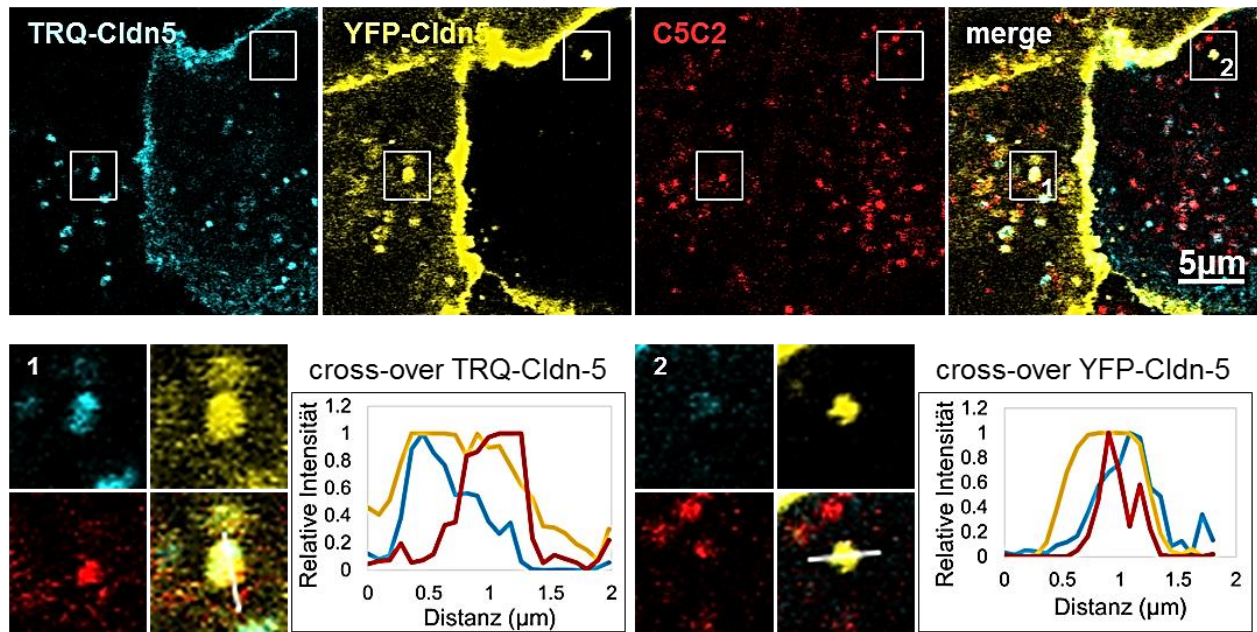


Abb. 3.34: Internalisiertes TAMRA-Peptid kolokalisiert zum Teil mit *cross-over* endozytierten Vesikeln. YFP-Cldn5/TRQ-Cldn5 Kokulturen monotransfizierter MDCK-II-Zellen wurden 2 h mit TAMRA-C5C2 inkubiert. In Lebendzell-Mikroskopie befand sich internalisiertes Peptid in denselben Vesikeln wie *cross-over* endozytiertes Cldn5 (weiße Kästen). Die Intensitätsprofile der einzelnen Fluorophore (entlang der weißen Linien) zeigen eine leicht abweichende Lokalisation.

Cldn1 und Cldn2-abgeleitete Peptide C1C2 und C2C2 zeigten eine ähnliche Lokalisation wie C5C2 (Abb. 3.35). Auch diese Peptide befanden sich in Vesikeln, welche *cross-over* endozytiertes Cldn5 enthielten (Abb. 3.35, Pfeile). Es wurden aber auch teilweise Cldn5 haltige Vesikel gefunden, welche kein Peptid enthielten (Abb. 3.35, Pfeilkopf). Dies war ebenso bei C5C2 der Fall. Die Peptide wurden also zum Teil über die Bindung an Cldn5, welches in den TJs eingebaut war, internalisiert.

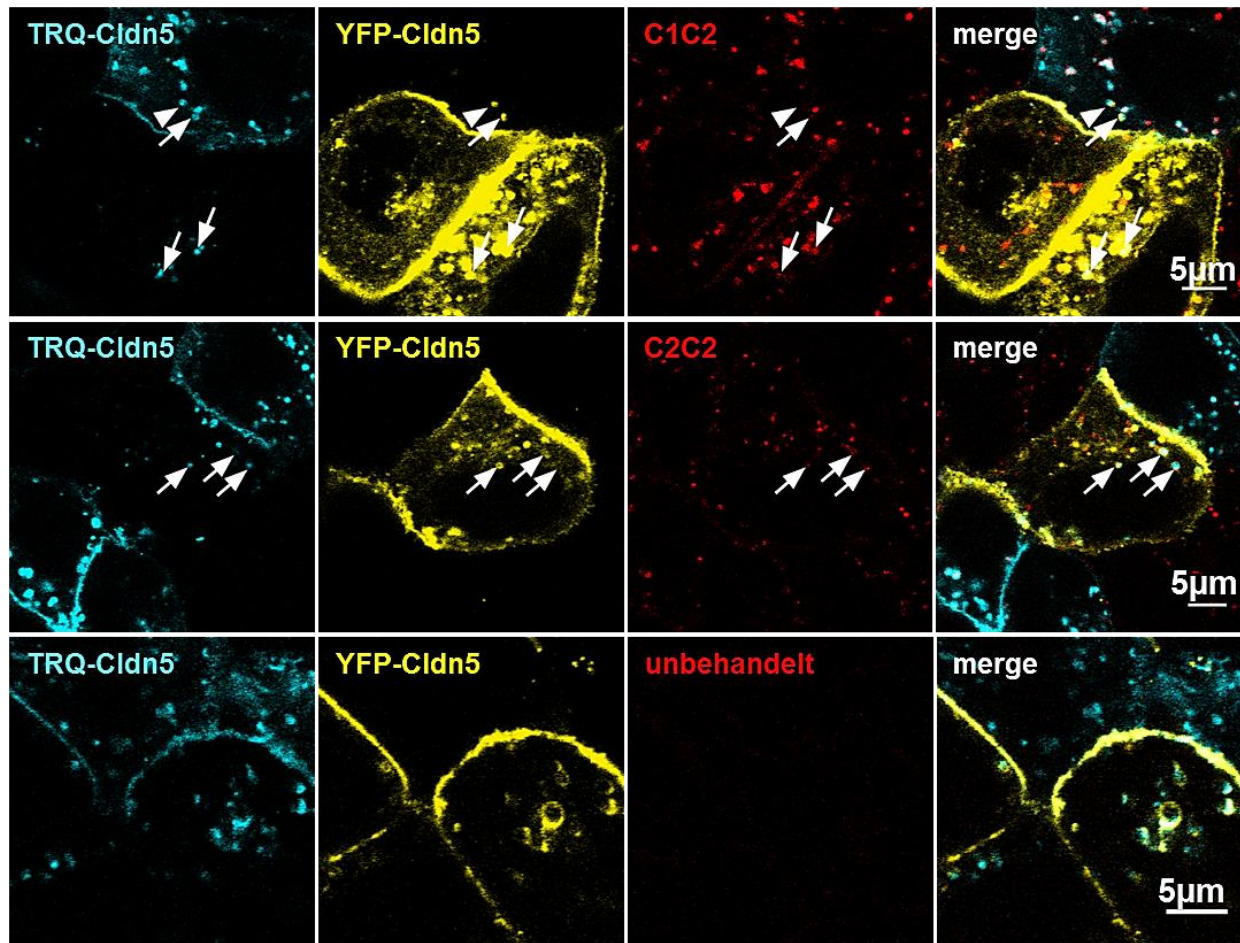


Abb. 3.35: Verschiedene Claudin-abgeleitete Peptide zeigen eine ähnliche Lokalisation. YFP-Cldn5/TRQ-Cldn5 Kokulturen monotransfizierter MDCK-II-Zellen wurden mit TAMRA-markiertem Cldn1-abgeleitetem Peptid (TAMRA-C1C2) oder Cldn2-abgeleitetem Peptid (TAMRA-C2C2) 2 h inkubiert. Pfeile: Cldn5-haltige Vesikel positiv für TAMRA-Peptid. Pfeilkopf: Cldn5-haltiges Vesikel negativ für TAMRA-Peptid.

3.7.2. Claudin-abgeleitete Peptide unterscheiden sich in der Menge des internalisierten Peptids

Die Mengen der internalisierten Peptide wurden in lebenden Zellen analysiert, welche mit TAMRA-gekoppeltem Peptid inkubiert wurden. Es wurden YFP- oder TRQ-Cldn exprimierende Zellen für Cldn1, Cldn5 und Cldn5_{F147A} mit TAMRA-C2C2, TAMRA-C1C2 oder TAMRA-C5C2 inkubiert. In allen Zelllinien wurde mehr TAMRA-C5C2 aufgenommen als TAMRA-C1C2 (Abb. 3.36). In Cldn1 exprimierenden Zellen wurde sowohl nach zwei, als auch nach drei Stunden signifikant mehr TAMRA-C5C2 aufgenommen als TAMRA-C1C2, in Cldn5 exprimierenden Zellen war nur der 3 h Wert signifikant höher. In Cldn5_{F147A} exprimierenden Zellen wurden insgesamt etwas höhere Mengen an TAMRA-C1C2 und TAMRA-C5C2 gefunden, dies war jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Die Aufnahme von TAMRA-C2C2

war nach zwei Stunden nicht signifikant niedriger als die Aufnahme von TAMRA-C1C2 oder TAMRA-C5C2.

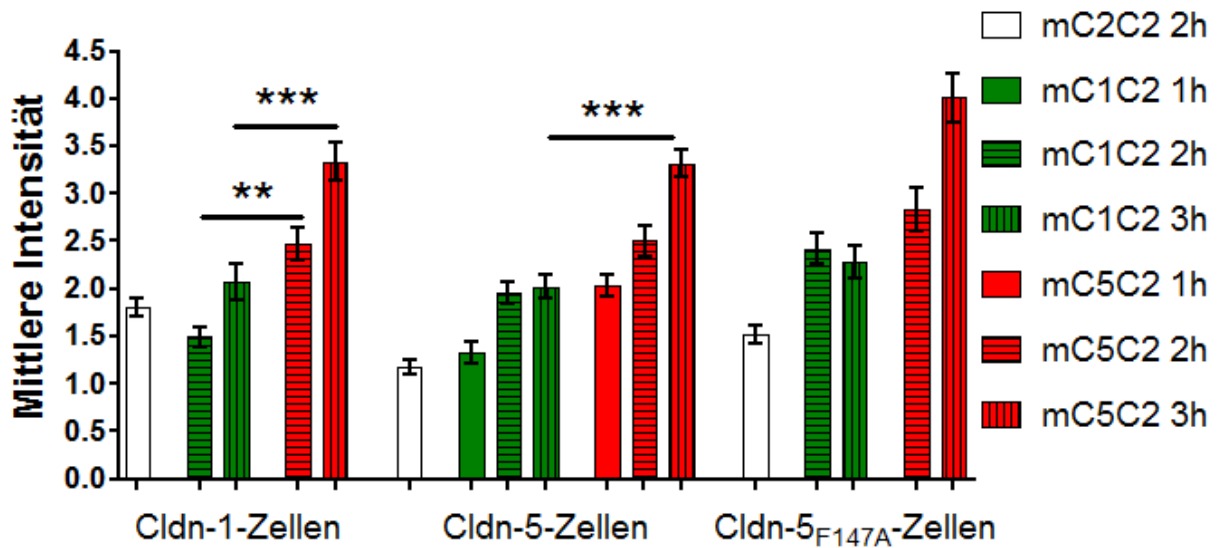


Abb. 3.36: C5C2 zeigt eine höhere Internalisierung als C1C2. YFP-Cldn5/TRQ-Cldn5 Kokulturen monotransfizierter MDCK-II-Zellen. In lebenden Zellen wurde die durchschnittliche TAMRA-Intensität ermittelt. Die Zellen exprimierten TRQ- oder YFP-markiertes Cldn1, Cldn5 oder Cldn5_{F147A}. n > 20 ausgewertete Zellen aus 2 Experimenten. Kruskal-Wallis Test, Dunn Post-Test.

Zusätzlich wurde der Endozytoseweg von TAMRA-C1C2 in YFP- oder TRQ-Cldn1-Zellen untersucht. Nach zweistündiger Inkubation hatte Filipin III, also Hemmung der Caveolin-abhängigen Endozytose, keinen Effekt auf die Aufnahme von TAMRA-C1C2 in (Abb. 3.37A), Hemmung der Clathrin-abhängigen Endozytose mit Chlorpromazin führte dagegen zu einer leicht, jedoch nicht signifikant, verringerten Aufnahme von TAMRA-C1C2. Inhibition der PIK-FYVE Kinase führte dagegen zu einer leichten Erhöhung der TAMRA-C1C2-Intensität. Nach 3 h fielen die Effekte geringer aus. Hier zeigten sowohl Filipin III als auch Chlorpromazin einen leichten Effekt, YM201636 jedoch nicht.

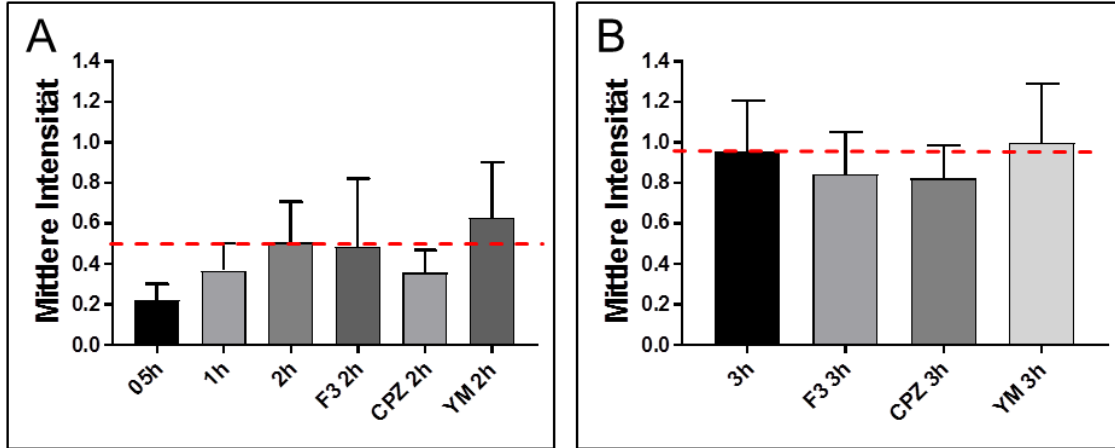


Abb. 3.37: Endozytosehemmer haben nur einen leichten Effekt auf die Internalisierung des von Claudin-1-abgeleiteten Peptids. Kokulturen von YFP-Cldn1 oder TRQ-Cldn1 monotransfizierter MDCK-II-Zellen wurden mit Chlorpromazin (CPZ, 50 μ M – Clathrin-vermittelte Endozytose), Filipin III (F3, 1 μ g/ml – Caveolin-vermittelte Endozytose) oder YM201636 (YM, 2 μ M – Inhibition der PIK-FYVE Kinase) behandelt. **A:** Internalisiertes Peptid nach 2 h. n= 15, 16, 16, 21, 26, 20 ausgewertete Zellen in den einzelnen Gruppen. **B:** Internalisiertes Peptid nach 3 h. n=18, 20, 22, 21. Kruskal-Wallis Test, Dunn Post-Test.

3.7.3. Einfluss von C5C2 auf die *cross-over* Endozytose

Behandlung von Cldn5 exprimierenden Zellen mit C5C2 führte zu einer nicht signifikanten Verringerung der Vesikelzahlen (Abb. 3.38). Dabei war die Gesamtzahl der Vesikel stärker betroffen, als die Anzahl *cross-over* endozytierter Vesikel. C5C2 führte also verstärkt zum Abbau von Claudinen, welche nicht in die TJs eingebaut waren

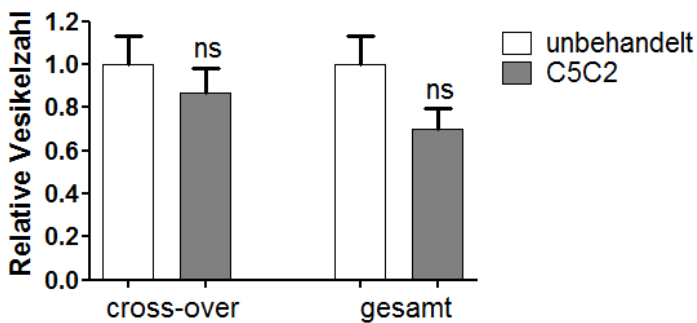


Abb. 3.38: Behandlung mit C5C2 führt zu einer Reduktion der Claudin-5-Vesikel. Kokulturen monotransfizierter TRQ-Cldn5 oder YFP-Cldn5 exprimierender MDCK-II-Zellen wurden mit C5C2 (300 μ M, 5 h) behandelt. n>30 analysierte Zellen aus 2 Experimenten. Zweiseitiger t-Test.

4. Diskussion

Claudine gehören zur den Tetraspanninen und besitzen vier TMs, eine intrazelluläre Schleife und zwei EZS (Morita et al., 1999a). Beide Termini sind zum Zytoplasma orientiert, und die EZS einiger Claudine können starke *trans*-Interaktionen mit den Claudinen der gegenüber liegenden Zelle ausbilden (Piehl et al., 2010; Piontek et al., 2008). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die *cross-over* Endozytose von Claudin-Interaktionen abhängig ist und dass *cross-over* endozytierte Claudine in der Nachbarzelle in Autophagosomen-ähnlichen, doppelwandigen Vesikeln lokalisieren, welche über Lysosomen abgebaut werden.

4.1. Einfluss von Claudin-Claudin-Interaktionen auf die

Für die Untersuchungen der *cross-over* Endozytose von Cldn5 wurden HEK-293- und MDCK-II-Zellen mit YFP-Cldn5 oder TRQ-Cldn5 transfiziert. In Kokulturen monotransfizierter Zellen welche unterschiedliche Fluoreszenzmarker exprimierten, wurden *cross-over* endozytierte Vesikel gefunden. Das heißt also, dass die Claudine aus der TJ-Membran in die benachbarte Zelle endozytiert wurden, zusammen mit dem Claudin der Nachbarzelle. HEK-293-Zellen sind TJ-freie Zellen, welche daher für Untersuchungen zu Interaktionen einzelner Claudine geeignet sind (Piontek et al., 2008). Allerdings wurden in HEK-293-Zellen kaum *cross-over* endozytierte Cldn5-Vesikel beobachtet, was diese Zellen zu einem weniger geeigneten Modellsystem zur Untersuchung von *cross-over* Endozytose macht. MDCK-II-Zellen exprimieren dagegen endogenen TJs, enthalten aber kaum Cldn5, wie mittels *Western blot* überprüft wurde. Somit kann in diesem Zellsystem die Endozytose von Cldn5 untersucht werden, ohne dass die Ergebnisse durch endogenes Cldn5 verfälscht werden.

Um den Einfluss der Claudin-*trans*-Interaktionen auf die *cross-over* Endozytose zu untersuchen wurden die AS-Substitutionsvarianten Cldn5_{F147A} und Cldn5_{Q156E} zunächst genauer analysiert. Aus vorhergegangenen Experimenten (Piontek et al., 2008) war bekannt, dass beide Varianten zwar in die Plasmamembran von HEK-293-Zellen eingebaut werden, aber nicht wie Wildtyp Cldn5 an den Kontakten zwischen den Zellen anreichern. Daraus lässt sich schließen, dass durch das Fehlen dieser AS die *trans*-Interaktionen gestört werden. Daher wurde davon ausgegangen, dass durch mangelnde *trans*-Interaktionen kein korrekter Einbau in die TJs möglich ist. Allerdings wurde in dieser Arbeit festgestellt, dass die Expression von Cldn5_{F147A} oder

Cldn5_{Q156E} in MDCK-II-Zellen zu einer Veränderung im Aufbau des transepithelialen Widerstands führt. Die Erhöhung der TER-Werte im Plateau in Cldn5_{F147A} oder Cldn5_{Q156E} exprimierenden Zellen ist zwar nur gering, allerdings ist das charakteristische Maximum der Widerstandskurve im Vergleich mit untransfizierten MDCK-II-Zellen deutlich reduziert. Die Mutanten stören also vermutlich die Interaktionen von endogenen Claudinen, indem sie fehlerhaft in die TJs eingebaut werden, aber dort keine abdichtende Funktion ausüben. Expression von Cldn5_{Q156E} führt außerdem zu einer signifikanten Erhöhung der Durchlässigkeit der Barriere für *lucifer yellow*. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass beide Cldn5-Varianten in MDCK-II-Zellen in die endogenen TJs eingebaut werden, allerdings vermindert und irregulär. Neben dem Einfluss von Cldn5_{F147A} und Cldn5_{Q156E} auf die funktionellen Eigenschaften der TJs wurde bei FRET-Messungen auch eine reduzierte *cis*-Interaktion für beide Mutanten gefunden, wobei Cldn5_{F147A} einen stärkeren Effekt hatte. Die *cis*-Interaktionen mit Wildtyp Cldn5 waren jedoch in früheren Messungen bei beiden Varianten nicht gestört (Piontek et al., 2008). Daraus ist ersichtlich, dass durch Interaktion mit Wildtyp Cldn5 die Störung der *cis*-Interaktionen zumindest teilweise ausgeglichen werden kann. Die dreidimensionalen Strukturmodelle, die mit iTASSER erstellt wurden, ließen erkennen, dass bei beiden Varianten die Konformation der aromatischen Seitenketten von Y148 und Y158 verändert ist. Diese bilden vermutlich ein Interface für *trans*-Interaktionen mit der gegenüberliegenden Membran (Piontek et al., 2008). Zwei dieser Aromaten wurden in Cldn15 auch als wichtige Vermittler der *cis*-Interaktionen gefunden (Suzuki et al., 2014). Die AS F146 und F147 in murinem Cldn15 korrespondieren mit F147 bzw. Y148 in murinem Cldn5 (vgl. Anhang 1). Die Rotation von Y148 in Cldn5_{F147A} und Cldn5_{Q156E} erklärt also die Effekte der Mutationen auf *cis*-Interaktionen. AS-Substitutionen von F146 und F147 bei Cldn15 bilden keine TJ-Stränge, wie durch Gefrierbruchanalyse gezeigt wurde (Suzuki et al., 2014). Analog dazu wurden keine durchgängigen TJ-Stränge in Gefrierbruchanalyse von Cldn5_{F147A}-transfizierten HEK-293-Zellen und STED-Mikroskopie von Cldn5_{F147A}-transfizierten MDCK-II-Zellen gefunden.

Die *cis*-Interaktionen haben auch einen Einfluss auf die Mobilität der Claudine in der Membran. Zwar zeigen beide Cldn5-Varianten verringerte FRET-Werte, aber nur Cldn5_{F147A} zeigt eine stark erhöhte Mobilität. Allerdings sind die FRET-Werte bei Cldn5_{F147A} stärker reduziert als bei Cldn5_{Q156E}. Weiterhin ist die *cross-over* Endozytose bei Cldn5_{F147A} stärker reduziert als bei Cldn5_{Q156E}, allerdings ist der Unterschied relativ gering. Aus den Daten ergibt sich insgesamt, dass die Interaktionen über die Position F147 einen Einfluss auf die Mobilität in der Membran

hat. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit (Piontek et al., 2011), hier wurde für AS-Substitution des Nachbararomaten Cldn5_{Y148A} eine erhöhte Mobilität gefunden. Die Mobilität in der Membran hat aber nicht zwangsläufig Auswirkungen auf die Dichtheit der Barriere, da die Permeation für *lucifer yellow* nur bei Cldn5_{Q156E} erhöht ist.

Insgesamt betrachtet wird deutlich, dass anhand von AS-Substitutionsvarianten wohl keine absolute Trennung des Einflusses von *cis*- und *trans*-Interaktionen möglich ist. Diese beeinflussen einander möglicher Weise gegenseitig, indem sie die Dichte der TJ-Stränge verändern (Milatz et al., 2015). Allerdings können beeinträchtigte *cis*-Interaktionen offenbar durch Interaktion mit anderen Claudinen ausgeglichen werden (s.o). Da Cldn5 starke *cis*-Wechselwirkungen mit Cldn1 eingeht (Piontek et al., 2011) können die beeinträchtigten *cis*-Interaktionen von Cldn5_{F147A} und Cldn5_{Q156E} in MDCK-II-Zellen durch Wechselwirkungen mit endogenen Cldn1 ausgeglichen werden. Daher können trotzdem begrenzt Rückschlüsse auf den Einfluss von *cis*- und *trans*-Interaktionen auf die *cross-over* Endozytose gezogen werden.

Bei beiden Cldn5-Varianten zeigt sich eine Verminderung der Anzahl *cross-over* endozytierter Vesikel. Daraus lässt sich schließen, dass dieser Mechanismus speziell für in die TJs fest eingebaute Claudine genutzt wird. Offenbar werden hierbei nicht einzelne Claudine entfernt, sondern es werden ganze Abschnitte der TJs herausgetrennt, wie sich aus der Präsenz von endogenem Cldn1, -2 und -7 in *cross-over* endozytierten Vesikeln erschließen lässt. Zusätzlich wurde Occludin in den Vesikeln gefunden, was im Kontrast zu vorherigen Ergebnissen steht. Bei der Endozytose von Cldn3 in die Nachbarzelle wurde in den Vesikeln kein Occludin gefunden (Matsuda et al., 2004). Allerdings ist war das in dieser Arbeit gefundene Signal auch relativ schwach, daher ist anzunehmen, dass nur wenig Occludin in den Vesikeln vorhanden ist. Übereinstimmend mit (Matsuda et al., 2004) wurde kein ZO-1 gefunden, dieses wird offenbar vor Beginn der Endozytose von den Claudinen gelöst. Insgesamt bestätigen die o.g. Zusammenhänge, dass die *cross-over* Endozytose von Claudin-Claudin-Bindung abhängig ist.

4.2. Endozytoseweg und Transport

Für die *cross-over* Endozytose von Cldn5 in MDCK-II-Zellen wurde ein Einfluss sowohl von Clathrin- als auch Caveolin-Inhibition nachgewiesen. Beides führt zu einer Verringerung der *cross-over* endozytierten Vesikel, sowie der gesamten Vesikelanzahl. Dabei führt die Behandlung mit Filipin III, welches die Caveolin-abhängige Endozytose inhibiert (Schnitzer et al., 1994), nur

zu einer transienten Verringerung nach einstündiger Inkubation, anschließend steigen die Vesikalzahlen wieder an. Chlorpromazin, welches die Clathrin-abhängige Endozytose durch Verlagerung von Clathrin und AP2 von der Plasmamembran an Endosomen inhibiert (Wang et al., 1993), führt dagegen zu einer dauerhaften Verringerung der Vesikelzahlen, welche mindestens zwei Stunden anhält. Caveolin-abhängige Endozytose von Cldn5 konnte bereits in Endothelzellen gezeigt werden (Stamatovic et al., 2009), Clathrin-abhängige Endozytose wurde in Epithelzellen beispielsweise für Cldn4 (Cong et al., 2015) und Cldn2 (Ikari et al., 2015) gefunden. Allerdings ist sowohl bei Clathrin- als auch bei Caveolin-abhängiger Endozytose Dynamin für die Abschnürung der Vesikel nötig (Cocucci et al., 2014; Oh et al., 1998). Inhibition von Dynamin führte dagegen nicht zur Reduktion des *cross-over* endozytierten Cldn5. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die *cross-over* Endozytose von Claudinen nicht über den konventionellen Clathrin- oder Caveolin-abhängigen Internalisierungsweg verläuft, obwohl Bestandteile beider Wege involviert sind.

Teilweise konnten die *cross-over* endozytierten Vesikel mit Endosomenmarkern angefärbt werden. Dabei ergab sich kein klarer Unterschied zwischen der Kolo-kalisation mit unterschiedlichen Rab-Proteinen und auch nicht zwischen der Gesamtheit der Vesikel und *cross-over* endozytierten Vesikeln. Deshalb lässt sich über die Kolo-kalisation mit Vesikelmarkern keine eindeutige Aussage zu dem endosomalen Kompartiment treffen. Allerdings führt die Inhibition des lysosomalen Abbaus durch Chloroquin oder Bafilomycin zu einer Anreicherung von *cross-over* endozytiertem Cldn5, für die AS-Substituenten wurde jedoch keine signifikante Anreicherung der *cross-over* endozytierten Vesikel nach Behandlung mit Chloroquin festgestellt. Dies spricht für eine Degradation des *cross-over* endozytierten Cldn5 über das Lysosom, was durch die Kolo-kalisation mit Lysotracker und Lamp1 bestätigt wird.

Statt mit Markern des endosomalen Transportweges wurde eine Kolo-kalisation von *cross-over* endozytiertem Cldn5 mit LC3 und ATG16L festgestellt. Beide Proteine sind für den autophagosomalen Abbau nötig. Die Beteiligung von Autophagie am Abbau *cross-over* endozytierter Claudine wurde durch die Verringerung *cross-over* endozytierter Vesikel, aber nicht der Gesamtzahl der Vesikel, nach Induktion von Autophagie mittels Rapamycin untermauert. Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig, bei einer niedrigen Konzentration (50 nM) kam es nicht zu einer Reduktion der *cross-over* endozytierten Vesikel, sondern zu einer Erhöhung der Gesamtanzahl der Vesikel. Auch die gesamte Proteinmenge (Cldn5 in der Plasmamembran und intrazellulär) von Cldn5 war im *Western blot* nach Induktion von

Autophagie verringert, während die Menge von Cldn5_{F147A}, welches nur in geringen Mengen *cross-over* endozytiert wird, unverändert bleibt.

Diese Befunde deuten darauf hin, dass nach Induktion von Autophagie der Abbau von Claudinen beschleunigt ist. Die Kolokalisation von ATG16L mit *cross-over* endozytiertem Cldn5 und mit Cldn5 in den TJs unterstützt die Annahme, dass die autophagosomale Maschinerie direkt an der Endozytose von Claudinen in den TJs beteiligt ist und nicht nur deren Abbau nach Endozytose koordiniert. ATG16L ist nur anfänglich im entstehenden Autophagosom enthalten und ist somit ein Marker früher Autophagosomen (Walczak and Martens, 2013). Autophagie ist also initial an der *cross-over* Endozytose beteiligt. Dies zeigt sich auch durch die Kolokalisation von Cldn5 mit GFP-RFP-LC3, da GFP nur in frühen Endosomen fluoresziert (Maulucci et al., 2015). Die Halbwertszeit von GFP-LC3-positiven Vesikeln liegt dabei bei 13 min (Jahreiss et al., 2008). Der Einfluss von Autophagie-assoziierten Proteinen an der Endozytose von Cldn5 wird durch die Reduzierung von *cross-over* endozytierten Vesikeln nach Inhibition von PI3K und PIKfyve untermauert, da beide Kinasen an der Autophagosomen-Biogenese beteiligt sind (Blommaart et al., 1997; Vicinanza et al., 2015).

Im *Western blot* ließ sich ein Anstieg des Autophagosomenmarkers LC3 nach Behandlung mit Chlorpromazin und Chloroquin feststellen. Da beide einen gegensätzlichen Effekt auf *cross-over* endozytiertes Cldn5 haben, lässt sich davon ausgehen, dass hier unterschiedliche Prozesse beobachtet werden. Nach Chloroquin-Behandlung kommt es zu einer Anreicherung von LC3, da der lysosomale Abbau gestört ist. Dementsprechend kommt es auch zu einer leichten Erhöhung von Cldn5. Die Anreicherung von RFP-GFP-LC3 im Lumen und an der Membran der vergrößerten Vesikeln nach Chloroquin-Behandlung bestätigt die Inhibition des Abbaus von LC3. Während dessen kommt es nach Inhibition durch Chlorpromazin zu einer Hochregulation des autolysosomalen Abbaus. Chlorpromazin induziert Autophagie, indem es den mTOR-Signalweg inhibiert und die Bildung von LC3-II, der membranständigen Form von LC3, fördert (Shin et al., 2013). Allerdings ändert sich die Gesamtmenge an Cldn5 im *Western blot* nicht, daher lässt sich schließen, dass Chlorpromazin gleichzeitig zu einer Inhibition der Endozytose von Cldn5 führt, welches an der Plasmamembran verbleibt.

Vor dem Hintergrund der Autophagie ist auch der Einfluss der Endozytosehemmer zu bewerten. AP2 und Clathrin interagieren mit *autophagy related protein 9* (ATG9), welches an der Vergrößerung des Phagophors beteiligt ist (Popovic and Dikic, 2014), und ATG16L (Ravikumar et al., 2010) und regulieren die Initiation von Autophagie. Die Verlagerung von Clathrin und AP2

von der Plasmamembran in Endosomen durch Chlorpromazin hemmt möglicherweise die Interaktion mit ATG16L, welches an der Plasmamembran mit Claudinen kolokalisiert, und verhindert so die Bildung von *cross-over* endozytierten Vesikeln. Caveolin hat dagegen einen inhibitorischen Effekt auf die Autophagie: ein *knock-down* von Caveolin in Endothelzellen bewirkt Aktivierung von Autophagie (Chen et al., 2014; Shiroto et al., 2014). Außerdem gibt es Hinweise, dass Cholesterolentzug zur Einleitung von Autophagie führt (Cheng et al., 2006). Somit ist es wahrscheinlich, dass durch die eingesetzten Endozytoseinhibitoren auch der Autophagie-Signalweg beeinflusst wird.

Für eine effiziente Regulierung des parazellulären Stofftransportes ist auch eine strikte Regulierung der TJs nötig. Obwohl ein Großteil der abdichtenden Claudine innerhalb der TJ relativ immobil ist (Cording et al., 2013; Shen et al., 2008), werden TJs kontinuierlich umgebaut. Jedoch ist bislang unklar, wie bestimmte Claudine gezielt aus den TJs entfernt werden, ohne dass die Barrierefunktion darunter leidet. Selektive Regulation durch Autophagie ist für Cldn2 im Darmepithel beschrieben, allerdings wurden keine morphologischen Entsprechungen, die denen in dieser Arbeit charakterisierten Vesikeln entsprechen untersucht (Nighot et al., 2015). Durch welche Mechanismen diese spezifische Regulierung erfolgt ist allerdings unklar. Der gezielte Abbau von Transmembranproteinen über Clathrin/AP2 ist für einige GJ-Proteine bekannt. Connexine bilden Hemi-Kanäle innerhalb einer Membran, diese interagieren mit Hemi-Kanälen der gegenüber liegenden Membran und bilden so funktionsfähige GJs (Sosinsky and Nicholson, 2005). Der Abbau dieser Kanäle stellt also ähnliche Anforderungen wie der Abbau von Claudinen. Tatsächlich wurde für Connexin-31.1 ein Abbauweg nachgewiesen, der sowohl Clathrin- als auch Autophagie-abhängig ist (Zhu et al., 2015). In Endothelzellen wurde eine *cross-over* Endozytose von Cadherin gefunden, welche Dynamin-unabhängig ist (Sakurai et al., 2014) und der Transmembranrezeptor EphB2 wird von Neuronen in benachbarte Gliazellen *cross-over* endozytiert (Lauterbach and Klein, 2006). Diese Befunde sprechen für einen generellen Endozytosemechanismus für Transmembranproteine mit starken *trans*-Interaktionen. Ein Problem beim Arbeiten mit transfizierten Zellen sind mögliche Auswirkungen der Transfektion auf endogene Claudine. Expression von exogenem Claudin kann das Expressionslevel endogener Claudine beeinflussen (Tian et al., 2014). Dieses wurde hier in geringem Maße für YFP-Cldn5-transfizierte Zellen festgestellt, welche etwas geringere Mengen an endogenen Cldn1-Vesikeln aufwiesen als TRQ-Cldn5-transfizierte Zellen. Ein Großteil der Auswertungen wurde jedoch an TRQ-Cldn5-transfizierten Zellen vorgenommen und ist daher in

sich vergleichbar. Außerdem waren Ergebnisse zwischen YFP-Cldn5 und TRQ-Cldn5 in ihren Tendenzen vergleichbar. Die Wechselwirkungen zwischen der Expression endogener und exogener Claudine wurden auch für Cldn1-transfizierte Zellen beobachtet. Hier äußerten sich diese durch eine weniger stabile Expression von TRQ-Cldn1/YFP-Cldn1 als die von TRQ-Cldn5/YFP-Cldn5. Während Cldn5-transfizierte Zellen über viele Passagen verwendet werden konnten, war für Cldn1-transfizierte Zellen oft eine erneute FACS-Sortierung nötig, um nicht fluoreszierende Zellen auszusortieren. Bei der Quantifizierung der Vesikelzahlen wurden diese Unterschiede in Betracht gezogen, indem nicht die Gesamtfluoreszenz analysiert wurde, sondern die Vesikelzahlen. Dies lässt auch bei geringerem Expressionsniveau einen Schluss auf einzelne Endozytose-Ereignisse zu.

Viele in die Endozytose involvierte Proteine und Moleküle haben vielfältige zelluläre Funktionen. Bafilomycin wird oft als Autophagieinhibitor eingesetzt. Es inhibiert die Azidifizierung von Autophagosomen, Lysosomen und Endosomen (Yamamoto et al., 1998), außerdem hemmt es die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen, aber auch die Fusion von Endosomen und Lysosomen (Klionsky et al., 2008). Daher ist Bafilomycin nicht spezifisch für Autophagie, sondern inhibiert allgemein die Fusion von intrazellulären Vesikeln. Ähnliche Probleme bestehen auch für andere Inhibitoren, da beispielsweise PI(3)P auch in andere Prozesse involviert ist, wie die Makropinozytose (Swanson, 2008) oder Vesikeltransport (Simonsen et al., 2001). Diese Sachverhalte müssen bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden. Daher wurden hier die Ergebnisse nach Möglichkeit mit Inhibitoren unterschiedlicher Pathways (beispielsweise Chloroquin und Bafilomycin, YM201626 und LY294002) oder Immunfluoreszenzfärbungen verifiziert.

4.3. Vesikelstruktur

Die doppelwandige Struktur der *cross-over* endozytierten Vesikel wurde unabhängig mit STED-Mikroskopie und einem *fluorescence protease protection* (FPP)-Assay nachgewiesen. Die dabei auftretende optische Trennung der beiden Fluorophore, welche von beiden Nachbarzellen beigesteuert wurden, zeigt, dass beide Membranen in dieses Vesikel inkorporiert wurden. Zwar wurde die Lokalisation von Claudinen in der Membran doppelwandiger Vesikel bereits postuliert (Matsuda et al., 2004), allerdings wurde hier zum ersten Mal der direkte Nachweis erbracht. Die

durch supraauflösende STED-Mikroskopie erzeugten Bilder haben zwar eine höhere Auflösung als konfokale Aufnahmen, allerdings hat diese Methode den Nachteil, dass nicht alle Fluorophore geeignet sind und dass sich die Membranen nicht gut fixieren lassen. Somit konnten in dieser Arbeit nur lebende Zellen mikroskopiert werden. Dies bedeutet, dass die Zielstrukturen während der Aufnahme in Bewegung sind und somit nicht die maximale Auflösung erreicht werden kann. Daher wurde diese Vesikelstruktur durch den FPP-Assay als unabhängige Methode verifiziert. Da sich beide Termini von Claudinen im Zytosol befinden (Morita et al., 1999a) liegt bei Einstülpung des Vesikels an der Plasmamembran das Fluorophor des *cross-over* endozytierten Claudins im Lumen des Vesikels, während das Fluorophor des eigenen Claudins der Zytoplasma zugewandt ist (Abb. 4.1B). Während des FPP-Assays wird selektiv zytoplasmatisches Protein durch Protease K abgebaut, während Proteinen im Lumen von Vesikeln vor dem Abbau geschützt sind (Lorenz et al., 2006). Im Fall der *cross-over* endozytierten Vesikel wurde festgestellt, dass Claudin aus der Nachbarzelle vor der Proteolyse geschützt ist, sich also im Inneren der Vesikel befinden. Nicht *cross-over* endozytiertes Claudin (also das Claudin aus der eigenen Zelle) wird dagegen abgebaut, ist also dem Zytoplasma zugewandt. Für Connexine wurde angenommen, dass endozytiertes Connexin von einem Autophagosom umschlossen wird, und dann zum Lysosom transportiert wird (Fong et al., 2012). Dies ist bei Claudinen nicht der Fall, da Claudine in der äußeren Membran während des FPP-Assays abgebaut werden, was bei einer Umschließung mit einer weiteren Membran nicht der Fall wäre. Zusätzlich wird diese Schlussfolgerung auch durch die Erweiterung der äußeren Membran nach Behandlung mit Chloroquin widerlegt. Chloroquin führt zum Anschwellen der Lysosomen (de Duve et al., 1974), vermutlich durch hyperosmotischen Druck. Für Claudin-enthaltende Vesikel wurde eine solche Vergrößerung nur an der äußeren Vesikelmembran gefunden, welche das eigene Claudin enthielt, also entspricht diese Membran der Lysosomenmembran. Das *cross-over* endozytierte Claudin befindet sich währenddessen konzentriert an einer Seite des vergrößerten Lysosoms. Diese Situation ist vergleichbar mit der Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen, wodurch die äußere Autophagosomenmembran ein Teil der Lysosomenmembran wird, während die innere Membran abgebaut wird (Tsuboyama et al., 2016). Diese Schlussfolgerung deckt sich auch mit Literaturangaben, welche sowohl für Claudine als auch für Connexine nur doppelwandige, aber nicht 4-wandige Vesikel in ultrastrukturellen Abbildungen beschreibt (Falk et al., 2009; Matsuda et al., 2004).

Weiterhin lässt auch die Fluoreszenz von YFP in Lebendzell-Experimenten Rückschlüsse auf den Transportweg *cross-over* endozytierter Vesikel zu. Wie GFP ist YFP pH-sensitiv: es fluoresziert nur in nahezu neutraler Umgebung. Der pK_a -Wert von YFP, also der pH-Wert, bei dem YFP-Fluoreszenz um die Hälfte reduziert ist, liegt bei 6,5 (Griesbeck et al., 2001) für TRQ liegt er bei 3,1 (Goedhart et al., 2012). In unbehandelten lebenden Zellen finden sich nur wenig YFP-positive *cross-over* endozytierte Vesikel, da sich das Fluorophor im Inneren des Vesikels befindet. Durch das dort herrschende saure Milieu verliert es seine Fluoreszenz. Die existierenden YFP-positiven Vesikel sind daher frühe Stadien, da sich der pH-Wert von Autophagosomen und Endosomen erst entlang der Transportroute zum Lysosom absenkt (Mukherjee et al., 1997). Entsprechend ließ sich ein *rescue*-Effekt mit Chloroquin, einer leichten membranpermeablen Base, und Bafilomycin, einem Inhibitor der V-ATPase, beobachten. Beide heben den intravesikulären pH-Wert an und führen so zu einer Rückkehr der YFP-Fluoreszenz.

4.4. Internalisierung von Claudin-abgeleiteten Peptiden

Claudin-abgeleitete Peptidomimetika modulieren die Eigenschaften von Zellbarrieren, indem sie zur Herabregulierung von Claudinen führen. Das Cldn1-abgeleitete Peptid C1C2 führt in monotransfizierten HEK-293-Zellen, welche keine endogenen TJs bilden, zu einer selektiven Endozytose von Cldn1 und Cldn5. In MDCK-II-Zellen, welche einen endogenen TJ-Apparat exprimieren, bewirkt es dagegen eine zelluläre Umverteilung von Cldn1 bis -4, sowie von Occludin (Staat et al., 2015). Außerdem wurde mehr internalisiertes Peptid in Cldn1-exprimierenden HEK-293-Zellen gefunden, als in Cldn5-exprimierenden Zellen. *In vitro* Studien zeigten auch, dass Cldn1-abgeleitetes Peptid mit höherer Affinität an Cldn1 ($K_d=157\pm98$ nM) bindet, als an Cldn5 ($K_d=1113\pm391$ nM) (Dabrowski et al., 2015). Hier wurde die Aufnahme von C1C2, sowie dem Cldn5-abgeleiteten C5C2 und Cldn2-abgeleiteten Peptid C2C2 in MDCK-II-Zellen getestet, welche mit exogenem Cldn1, Cldn5 oder Cldn5_{F147A} transfiziert wurden. Im Gegensatz zur Aufnahme in HEK-293-Zellen, wurde in MDCK-II-Zellen von allen transfizierten Zelllinien mehr C5C2-Peptid aufgenommen, als C1C2-Peptid, obwohl MDCK-II-Zellen kein endogenes Cldn5 aufweisen. Die Menge an aufgenommenem C1C2 unterschied sich auch nicht zwischen Cldn1-transfizierten und Cldn5 transfizierten Zellen. Auch C5C2 wurde von Cldn1-transfizierten und Cldn5-transfizierten Zellen gleich stark aufgenommen. Allerdings wurden beide Peptide von Cldn5_{F147A}-exprimierenden Zellen in leicht höheren Mengen aufgenommen. In

HEK-293-Zellen wurde eine höhere Oberflächenfraktion von Cldn5_{F147A} als von Cldn5 festgestellt (Piontek et al., 2008). Das heißt also, dass an der Oberfläche der Zellen mehr freies Claudin für die Bindung von Peptid zur Verfügung stand. Daher spricht die erhöhte Aufnahme von Peptid in Cldn5_{F147A}-exprimierenden Zellen für Bindung des Peptides an freies Claudin in der Membran, welches keine *trans*-Interaktionen ausbildet.

Auch die größere Reduktion der gesamten Vesikelzahl als der *cross-over* endozytierten Vesikel nach C5C2-Behandlung spricht für einen Wirkmechanismus, welcher durch freies Claudin vermittelt wird und nicht von TJ-gebundenem Claudin. Allerdings zeigt die Präsenz von TAMRA-Peptid in Vesikeln mit *cross-over* endozytiertem Claudin dass zumindest ein Teil der Peptide auch innerhalb der TJ binden und endozytiert werden. Lokalisation im selben Vesikel mit intaktem *cross-over* endozytiertem YFP-Cldn schließt auch aus, dass die Peptide nur in dasselbe Lysosom transportiert wurden wie die Claudine, da diese Vesikel aufgrund der pH-Sensitivität von YFP ein frühes Stadium des Vesikels darstellen (siehe oben). Somit wirkt C5C2 vermutlich auf neu synthetisiertes oder recyceltes Claudin, da die *cross-over* endozytierten Vesikel, welche von den TJs stammen, weniger betroffen sind als die gesamte Vesikelzahl. Dieses Ergebnis passt zu der Beobachtung, dass C1C2 nach zwei Stunden verstärkt im Rezyklosom vorkommt (Staat et al., 2015). Der Wirkung dieser Peptide wird also vermutlich über Bindung an nicht in die TJ integrierte Claudine vermittelt, nicht über die Einleitung der Endozytose von TJ-integrierten Claudinen.

Die Endozytose von C1C2 konnte mittels Chlorpromazin-Behandlung leicht reduziert werden, was die Internalisierung über Clathrin-abhängige Endozytose bestätigt. Filipin hatte nach zwei Stunden keinen Einfluss auf die Menge internalisierten Peptids, nach dreistündiger Behandlung wurde eine Tendenz gefunden. Inkubation mit dem PIKfyve-Inhibitor YM201636 führte zu einer leichten Erhöhung des intrazellulären Peptids. Für YM201636 wurde gezeigt, dass es das konstitutive Recycling von Cldn1 und -2 inhibiert (Dukes et al., 2012). Die Erhöhung von intrazellulärem C1C2 nach YM201636-Behandlung ist ein weiterer Hinweis darauf, dass C1C2-Peptid in Rezyklosomen gelangt.

4.5. Mechanismus der *cross-over* Endozytose

Zusammengefasst lässt sich eine schematische Darstellung der *cross-over* Endozytose erstellen (Abb. 4.1). *Cross-over* endozytiertes Claudin befinden sich in doppelwandigen Vesikeln bestehend aus Teilen der Plasmamembran beider angrenzender Zellen, wobei das Claudin der Nachbarzelle im Inneren des Vesikels lokalisiert, während die äußere Membran Claudin aus der eigenen Zelle enthält. Somit unterscheidet sich der Mechanismus der *cross-over* Endozytose entscheidend von konventioneller Endozytose, da hier zwei Membranen endozytiert und von der Plasmamembran abgeschnürt werden. Dies erklärt auch, dass Dynamin an diesem Schritt nicht beteiligt ist. Dynamin bildet Röhren mit einem Außendurchmesserdurchmesser von 50 nm (Sweitzer and Hinshaw, 1998), aber nur einem Innendurchmesser von 7 nm (Cocucci et al., 2014). Die Breite der Zellkontaktmembran im Bereich der TJ liegt bei 7 bis 9 nm (Farquhar and Palade, 1963). Dies erklärt, dass Dynamin an der Abschnürung einer Doppelmembran vermutlich nicht beteiligt sein kann, da deren Durchmesser zu groß ist.

Dieses doppelwandige Vesikel wird durch die V-H⁺ATPase angesäuert und fusioniert schließlich mit dem Lysosom. Hier wird die innere Vesikelmembran, welche aus der Nachbarzelle stammt, mitsamt dem enthaltenen Claudin degradiert, während die äußere Membran Teil der Lysosomenmembran wird. Daraus geht auch hervor, dass nur das Claudin aus der eigenen Zelle durch lysosomale Rückbildung recycelt werden kann. Aus der Nachbarzelle aufgenommenes Material wird dagegen abgebaut. In der sauren Umgebung des Lysosoms werden auch die *trans*-Interaktionen von Claudinen gelockert (Lim et al., 2008).

Claudine, welche nicht in die TJs eingebaut sind, sondern frei in der Plasmamembran vorliegen, können dagegen über konventionelle Endozytoseweg endozytiert, recycelt, oder abgebaut werden (Abb. 4.1). Cldn5 kolokalisiert zum Beispiel in Endothelzellen nach CCL2-Behandlung mit Rab4 (Rezyklosomenmarker) und EEA1 (Marker für frühe Endosomen) (Stamatovic et al., 2009) in Rezyklosomen und frühen Endosomen, von wo aus sie zurück an die Plasmamembran recycelt werden. Auch für Cldn1 konnte eine Kolokalisation mit EEA1 nachgewiesen werden (Asaka et al., 2011).

Insgesamt lässt sich folgender Mechanismus des TJ *turn-over* ableiten: TJ-Teile werden via *cross-over* Endozytose entfernt, im Lysosom werden die *trans*-Interaktionen getrennt und das Claudin der Nachbarzelle abgebaut. Neu synthetisiertes oder recyceltes Claudin, welches aus nicht-TJ-Bereichen der Zellmembran endozytiert wurde und in Rezyklosomen lokalisiert, wird

zur TJ transportiert. Das Vesikel fusioniert mit der Plasmamembran, wo Claudin oder Claudin *cis*-Oligomere in die TJ diffundieren, bis *trans*-Interaktionen mit freien Claudinen aus der Nachbarmembran etabliert werden. Solch eine laterale Diffusion wurde beispielsweise für Cldn1 und Occludin nachgewiesen (Shen et al., 2008).

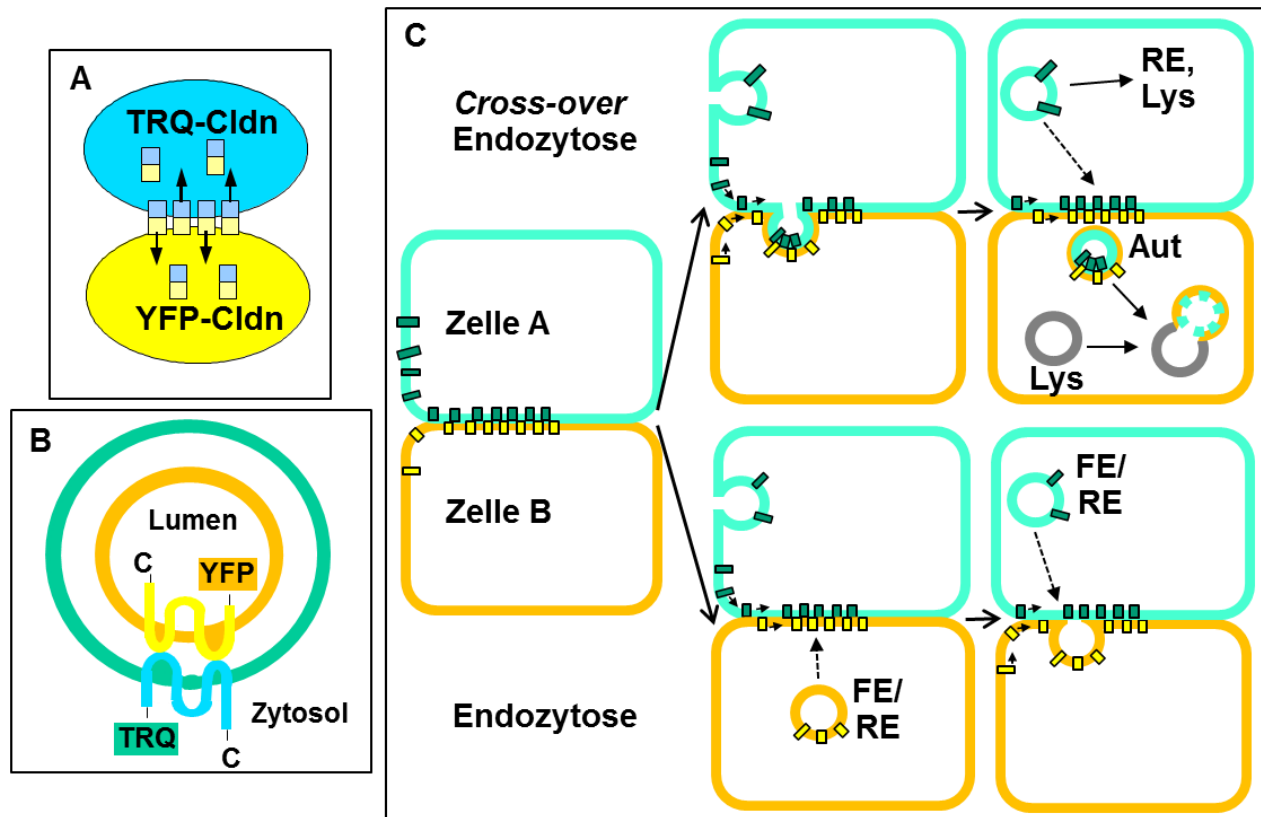


Abb. 4.1: Mechanismus der *cross-over* Endozytose. **A:** Schematische Darstellung der *cross-over* Endozytose. **B:** Struktur des resultierenden Vesikels. *Cross-over* endozytiertes Claudin lokalisiert im Lumen des doppelwandigen Vesikels, während das Claudin aus der eigenen Zelle direkt im Kontakt mit dem Zytoplasma steht. **C:** Schema des TJ-Remodelings. Claudine werden über *cross-over* Endozytose internalisiert und in einem Autophagosomen-ähnlichen Vesikel dem Lysosom zugeführt (oben). Durch laterale Diffusion von ungebundenen Claudinen oder Fusion von Vesikeln, welche neu synthetisiertes oder recyceltes Claudin enthalten, wird der Claudin-Gehalt der TJ reguliert (unten). Aut: Autophagosom, FE: frühes Endosom, Lys: Lysosom, RE: Rezyklosom.

4.6. Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Arbeit sollte ein Endozytosemechanismus charakterisiert werden, durch welchen Claudine in eine Nachbarzelle gelangen können. Es wurde der Beweis erbracht, dass doppelwandige Vesikel, welche aus der Plasmamembran gelöst werden, Claudine aus beiden Nachbarzellen enthalten, was bisher nur spekulativ war. Es wurde ein Autophagosomen-

ähnliches Vesikel nachgewiesen, welches aus der Internalisierung von Zell-Zell-Kontakten hervor geht. Im Gegensatz zur Autophagosomen-Biogenese entsteht dieses doppelwandige Vesikel nicht über ein Omegasom/Phagophor, sondern direkt aus der gleichzeitigen Endozytose von zwei benachbarten Membranen. Dieses Modell illustriert einen Mechanismus über den Claudine und andere Membranproteine mit starken transzellulären Wechselwirkungen endozytiert werden können, ohne dass vorher die *trans*-Interaktionen im extrazellulären Bereich gelöst werden.

Im Zuge der *cross-over* Endozytose kommt es zur Entfernung großer TJ-Abschnitte aus der Membran, wodurch sich eine Möglichkeit zum raschen Umbau der TJs und somit zur Modulation der Barriereeigenschaften ergibt. Eine Modulation kann beispielsweise durch den Einbau anderer Claudin-Subtypen anstelle der entfernten Subtypen realisiert werden. Der konstitutive *turn-over* von Claudinen im stabilen Zustand der TJs kann durch den Einbau derselben Subtypen bewerkstelligt werden. *Cross-over* Endozytose ermöglicht ein synchronisiertes Remodeling von Zellkontakten zwischen zwei Zellen, zum Beispiel die Reorganisation von TJs im Zusammenhang mit Wundheilung (Matsuda et al., 2004). Daher ist ein besseres Verständnis der Grundlagen und der Regulation dieser Form von Endozytose von Relevanz für die Erfassung entsprechender Krankheitszustände.

Es wurde auch untersucht, wie die autophagosomale Maschinerie in den Abbau von TJ-Proteinen involviert ist. Diese scheint an der Initiierung der Internalisierung von *cross-over* endozytiertem Claudin beteiligt zu sein, welche dann zum Lysosom transportiert und abgebaut werden. Es bleiben jedoch viele Fragen offen. Eine davon ist, wie die Invagination eines doppelwandigen Vesikels vonstattengeht und welche Proteine daran beteiligt sind. Die Krümmung einer doppelwandigen Membran, welche zusätzlich durch die enthaltenen Transmembranproteine an Rigidität gewinnt, ist vermutlich ein energieaufwändiger Prozess. Um eine solche Krümmung zu erzeugen wird das Vorhandensein spezifischer Proteine angenommen. So wird während der Bildung von *clathrin coated pits* die Biegung der Membran durch Insertion von Epsin vermittelt, welches an membranständiges PI(4,5)P₂ bindet (Ford et al., 2002). Für doppelwandige Vesikel wie Autophagosomen kann die Membrankrümmung durch eine Asymmetrie in den Proteinmengen, welche in der inneren und äußeren Membran inserieren erzeugt werden (Knorr et al., 2012). Makroskopische Biegung der Membran kann auch durch Interaktionen mit dem Zytoskelett erzeugt werden (Doherty and McMahon, 2008). Dieser Mechanismus wurde bereits mit der *cross-over* Endozytose von Cadherinen in Verbindung gebracht (Sakurai et al., 2014) und

erscheint daher ein vielversprechender Ausgangspunkt für weiterführende Untersuchungen an der *cross-over* Endozytose von Claudinen.

Die von den TJs endozytierten Vesikel enthalten nicht nur Cldn5, sondern auch Cldn1, -2, -7, sowie Occludin, daher scheinen nicht selektiv einzelne Claudine endozytiert zu werden, sondern vielmehr ganze TJ-Abschnitte. Dies steht im Kontrast zu Literatur, in welcher die spezifische Regulation von Cldn2 über einen Autophagie-abhängigen Mechanismus beschrieben wird. Die Autoren gehen von einer selektiven Internalisierung von Cldn2 aus der TJ aus (Nighot et al., 2015). In Zusammenhang mit den hier erzielten Ergebnissen ist allerdings wahrscheinlicher, dass es sich bei dieser selektiven Regulierung von Cldn2 um zwei verschiedene Prozesse handelt. Zum einen wird Cldn2 unspezifisch als Teil der TJs entfernt, zusammen mit anderen Claudinen. Zum anderen werden selektiv andere Claudinsubtypen an dessen Stelle in die TJ eingebaut.

Für die Stabilisierung einiger Claudine in der Membran, zum Beispiel Cldn2 und Cldn4, ist eine Phosphorylierung im C-terminalen Bereich notwendig (Aono and Hirai, 2008; Van Itallie et al., 2012). Dagegen induziert Ubiquitinierung die Endozytose von Claudinen, Cldn5 wird nach Ubiquitinierung über Proteasomen, aber auch über das Lysosom abgebaut (Mandel et al., 2012). Polyubiquitinierung von Cldn1 führt zum Abbau durch das Lysosom (Takahashi et al., 2009) und Ubiquitinierung von Cldn8 führt zu dessen Abbau über einen nicht untersuchten Abbauweg (Gong et al., 2015b). Die Regulation von TJs durch das Zusammenspiel von Ubiquitinierung und Phosphorylierung wurde für Occludin bereits demonstriert (Murakami et al., 2009) und käme so auch für Claudine in Frage.

Weiterhin stellt sich die Frage, wie das doppelwandige Vesikel von der Membran abgeschnürt wird. Es wurde kein Einfluss von Dynasore auf die *cross-over* Endozytose gefunden. In Frage kommt zum Beispiel der ESCRT-III Komplex. Dieser ist in die Schließung der Autophagosomen involviert, ein nicht funktionierender ESCRT-III-Komplex führt zu einer Anreicherung an Autophagosomen, die nicht abgebaut werden können (Lee et al., 2007). Der ESCRT-III-Komplex steht auch in Verbindung mit TJs und wird für konstitutives Recycling von Cldn1 benötigt (Dukes et al., 2011).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Arbeit ein Mechanismus des TJ-Umbaus näher charakterisiert wurde, in welchem *trans*-interagierende Proteine aus zwei Nachbarzellen zusammen endozytiert werden. Diese *cross-over* Endozytose erfolgt in Autophagosomen-ähnlichen, doppelwandigen Vesikeln, welche mit Autophagiemarkern kolokalisieren und zu Lysosomen transportiert werden. Autophagie reguliert also direkt die

Claudine in den TJs, und ist nicht nur für deren Abbau nach Endozytose zuständig. Beobachtungen an anderen Zellkontaktproteinen wie Connexinen und Cadherin, lassen die Hypothese zu, dass es sich hier um einen generellen Mechanismus handelt, der für die Reorganisation von Zellkontakten genutzt wird.

Zusammenfassung

Claudine (Cldn) sind transmembranale *tight junction* (TJ)-Proteine, welche den parazellulären Spalt in Epithelien und Endothelien abdichten. Durch Interaktionen mit Claudinen in derselben Membran (*cis*) und in der gegenüberliegenden Membran benachbarter Zellen (*trans*) regulieren sie den parazellulären Stoffaustausch. TJ-Umbau durch Endozytose und Neueinbau von Claudinen sind essentielle Regulatoren der TJ-Zusammensetzung, worüber die Barriereigenschaften von Zellschichten bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurde der Mechanismus der *cross-over* Endozytose charakterisiert, bei welcher Claudine aus der gegenüberliegenden Membran in die Nachbarzelle endozytiert werden, zusammen mit dem eigenen Claudin. Aminosäuresubstitutionen in der zweiten extrazellulären Schleife von Cldn5 (Cldn5_{F147A} und Cldn5_{Q156E}) führten in MDCK-II-Zellen zu gestörten *cis*- und *trans*-Interaktionen und zu beeinträchtigten Barriereigenschaften, die mit reduzierter Bildung von TJ-Strängen einhergingen. Es wurde gezeigt, dass *cross-over* Endozytose von Claudin-Claudin-Interaktionen abhängt, da Cldn5_{F147A} und Cldn5_{Q156E} wesentlich seltener *cross-over* endozytiert wurden als Cldn5. Mittels *stimulated emission depletion* (STED)-Mikroskopie wurden doppelwandige, Cldn5-haltige Vesikel nachgewiesen. Die äußere Membran dieser Vesikel war in Kontakt mit dem Zytosol, wie durch selektive Proteolyse des zytoplasmatischen Materials bewiesen wurde. *Cross-over* endozytiertes Cldn5 lokalisierte dagegen im Vesikelinneren. In diesen Vesikeln kolokalisierten verschiedene Claudin-Subtypen sowie Occludin. Es handelt sich somit um einen Prozess, über den zusammenhängende Membranbereiche, nicht aber einzelne Claudine endozytiert werden. Die *cross-over* Endozytose von Cldn5 war abhängig von Clathrin/Adapterprotein 2 sowie von Caveolin/Cholesterol, aber unabhängig von Dynamin. Außerdem wurde der Abbau *cross-over* endozytierter Vesikel über den Autophagie/Lysosom-abhängigen Weg nachgewiesen. *Cross-over* endozytiertes Cldn5 kolokalisierte mit Lysosomen sowie mit Autophagosomen-Markern (LC3 und ATG16L). Die Inhibition des lysosomalen Abbaus führte zur Akkumulation von *cross-over* endozytiertem Cldn5. ATG16L ist bekanntermaßen an der Autophagosomenbiogenese beteiligt und ist typisch für frühe Autophagosomen. Die Präsenz von ATG16L, sowie GFP-LC3 in *cross-over* endozytierten Vesikeln deutet auf eine direkte Rolle der autophagosomalen Maschinerie für die Endozytose von in die TJs integrierten Claudinen hin. Die Internalisierung von Claudin-abgeleitetem Peptiden erfolgte teilweise über *cross-over* endozytierte Vesikel, also nach Bindung an Claudine innerhalb der TJ, aber auch über die Bindung an freie Claudine außerhalb der TJs.

Insgesamt wurde ein Mechanismus charakterisiert, welcher im Kontext früherer Untersuchungen generelle Bedeutung für das Remodeling von Zellkontakten und die Endozytose *trans*-interagierender Transmembranproteine aufzeigt. Als Mittel zur Regulierung der Permeabilität von Zellbarrieren spielt *cross-over* Endozytose von Claudinen eine wichtige Rolle unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.

Summary

Claudins (Cldns) are transmembranous tight junction (TJ) proteins that seal the paracellular cleft in epithelia and endothelia. They regulate the paracellular solute exchange through Cldn-Cldn interactions along the same membrane (*cis*) and with Cldns in neighboring cells (*trans*). TJ-remodeling via endocytosis and incorporation of different Cldns is an essential regulator of TJ-composition which determines the barrier properties of a cell layer.

In this study, cross-over endocytosis was characterized, a mechanism during which Cldns are endocytosed into the neighboring cell together with the cell's own Cldns. Amino acid substitutions in the second extracellular loop of Cldn5 (Cldn5_{F147A}, Cldn5_{Q156E}) led to reduced *cis*- and *trans*-interactions, and to impaired barrier function in MDCK-II cells which was accompanied by reduced TJ-strand formation. Cross-over endocytosis was shown to depend on Cldn-Cldn interactions, as Cldn5_{F147A} und Cldn5_{Q156E} were less frequently cross-over endocytosed than wildtype Cldn5. Using *stimulated emission depletion* (STED)-microscopy the existence of Cldn5-containing, double membrane vesicles was demonstrated. The outer membrane of this vesicle was oriented towards the cytosol, which was confirmed by selective proteolysis of cytoplasmic material. Cross-over endocytosed Cldn5 located towards the lumen of the vesicle. Different Cldn-subtypes as well as occludin were found to colocalize with these vesicles. Therefore cross-over endocytosis is a process that internalizes coherent membrane sections, but not individual Cldn molecules. Cross-over endocytosis depended on clathrin/adaptor protein 2 and caveolin/cholesterol but was independent of dynamin. Moreover, degradation of cross-over endocytosed vesicles via the autophagy/lysosomal pathway was demonstrated. Cross-over endocytosed Cldn5 was shown to colocalize with the lysosome, as well as with autophagy markers (LC3, ATG16L). Inhibition of lysosomal degradation led to an accumulation of cross-over endocytosed Cldn5. ATG16L is known to be involved in autophagosome biogenesis and is typically found in early stages of autophagosome formation. The presence of ATG16L and GFP-LC3 in cross-over endocytosed vesicles suggests a direct role for the autophagosomal machinery in the endocytosis of Cldns integrated in the TJs. Internalization of Cldn-derived peptides occurred via binding of the peptides to Cldns inside the TJs and to free Cldns outside the TJs.

In conclusion this study characterized a mechanism that, in the context of existing knowledge, has relevance for the remodeling of cell contacts and for the endocytosis of transmembrane proteins with strong associations with the opposing membrane. As a means for the regulation of the permeability of cell barriers cross-over endocytosis plays an important role for physiologic and pathologic conditions.

Literaturverzeichnis

- Aktories, K., and J.T. Barbieri. 2005. Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nature reviews. Microbiology*. 3:397-410.
- Amasheh, S., T. Schmidt, M. Mahn, P. Florian, J. Mankertz, S. Tavalali, A.H. Gitter, J.D. Schulzke, and M. Fromm. 2005. Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell Tissue Res*. 321:89-96.
- Aono, S., and Y. Hirai. 2008. Phosphorylation of claudin-4 is required for tight junction formation in a human keratinocyte cell line. *Experimental cell research*. 314:3326-3339.
- Asaka, M., T. Hirase, A. Hashimoto-Komatsu, and K. Node. 2011. Rab5a-mediated localization of claudin-1 is regulated by proteasomes in endothelial cells. *Am.J.Physiol Cell Physiol*. 300:C87-C96.
- Awsare, N.S., T.A. Martin, M.D. Haynes, P.N. Matthews, and W.G. Jiang. 2011. Claudin-11 decreases the invasiveness of bladder cancer cells. *Oncology reports*. 25:1503-1509.
- Balda, M.S., J.A. Whitney, C. Flores, S. González, M. Cerejido, and K. Matter. 1996. Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *The Journal of cell biology*. 134:1031-1049.
- Balla, T. 2013. Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiological reviews*. 93:1019-1137.
- Baumgartner, H.K., N. Beeman, R.S. Hodges, and M.C. Neville. 2011. A D-peptide analog of the second extracellular loop of claudin-3 and -4 leads to mislocalized claudin and cellular apoptosis in mammary epithelial cells. *Chemical biology & drug design*. 77:124-136.
- Bhuin, T., and J.K. Roy. 2014. Rab proteins: the key regulators of intracellular vesicle transport. *Experimental cell research*. 328:1-19.
- Blommaert, E.F., U. Krause, J.P. Schellens, H. Vreeling-Sindelarova, and A.J. Meijer. 1997. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur.J.Biochem*. 243:240-246.
- Bruewer, M., M. Utech, A.I. Ivanov, A.M. Hopkins, C.A. Parkos, and A. Nusrat. 2005. Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process. *FASEB J*. 19:923-933.
- Chen, H., H.L. Puhl, S.V. Koushik, S.S. Vogel, and S.R. Ikeda. 2006. Measurement of FRET Efficiency and Ratio of Donor to Acceptor Concentration in Living Cells. *Biophysical journal*. 91:L39-L41.
- Chen, Z.H., J.F. Cao, J.S. Zhou, H. Liu, L.Q. Che, K. Mizumura, W. Li, A.M. Choi, and H.H. Shen. 2014. Interaction of caveolin-1 with ATG12-ATG5 system suppresses autophagy in lung epithelial cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 306:L1016-1025.
- Cheng, J., Y. Ohsaki, K. Tauchi-Sato, A. Fujita, and T. Fujimoto. 2006. Cholesterol depletion induces autophagy. *Biochemical and biophysical research communications*. 351:246-252.
- Chudakov, D.M., M.V. Matz, S. Lukyanov, and K.A. Lukyanov. 2010. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiological reviews*. 90:1103-1163.
- Cocucci, E., R. Gaudin, and T. Kirchhausen. 2014. Dynamin recruitment and membrane scission at the neck of a clathrin-coated pit. *Molecular biology of the cell*. 25:3595-3609.
- Colegio, O.R., C. Van Itallie, C. Rahner, and J.M. Anderson. 2003. Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *American journal of physiology. Cell physiology*. 284:C1346-1354.
- Cong, X., Y. Zhang, J. Li, M. Mei, C. Ding, R.L. Xiang, L.W. Zhang, Y. Wang, L.L. Wu, and G.Y. Yu. 2015. Claudin-4 is required for modulation of paracellular permeability by muscarinic acetylcholine receptor in epithelial cells. *Journal of cell science*. 128:2271-2286.
- Cording, J., J. Berg, N. Kading, C. Bellmann, C. Tscheik, J.K. Westphal, S. Milatz, D. Gunzel, H. Wolburg, J. Piontek, O. Huber, and I.E. Blasig. 2013. In tight junctions, claudins regulate the

- interactions between occludin, tricellulin and marvelD3, which, inversely, modulate claudin oligomerization. *Journal of cell science*. 126:554-564.
- Crider, B.P., X.S. Xie, and D.K. Stone. 1994. Bafilomycin inhibits proton flow through the H⁺ channel of vacuolar proton pumps. *The Journal of biological chemistry*. 269:17379-17381.
- Dabrowski, S., C. Staat, D. Zwanziger, R.S. Sauer, C. Bellmann, R. Gunther, E. Krause, R.F. Haseloff, H. Rittner, and I.E. Blasig. 2015. Redox-sensitive structure and function of the first extracellular loop of the cell-cell contact protein claudin-1: lessons from molecular structure to animals. *Antioxidants & redox signaling*. 22:1-14.
- Damke, H., T. Baba, D.E. Warnock, and S.L. Schmid. 1994. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *The Journal of cell biology*. 127:915-934.
- Daugherty, B.L., C. Ward, T. Smith, J.D. Ritzenthaler, and M. Koval. 2007. Regulation of heterotypic claudin compatibility. *J.Biol.Chem*. 282:30005-30013.
- de Duve, C., T. de Barsey, B. Poole, A. Trouet, P. Tulkens, and F. Van Hoof. 1974. Commentary. Lysosomotropic agents. *Biochemical pharmacology*. 23:2495-2531.
- Doherty, G.J., and H.T. McMahon. 2008. Mediation, modulation, and consequences of membrane-cytoskeleton interactions. *Annual review of biophysics*. 37:65-95.
- Dukes, J.D., L. Fish, J.D. Richardson, E. Blaikley, S. Burns, C.J. Caunt, A.D. Chalmers, and P. Whitley. 2011. Functional ESCRT machinery is required for constitutive recycling of claudin-1 and maintenance of polarity in vertebrate epithelial cells. *Mol.Biol.Cell*. 22:3192-3205.
- Dukes, J.D., P. Whitley, and A.D. Chalmers. 2012. The PIKfyve inhibitor YM201636 blocks the continuous recycling of the tight junction proteins claudin-1 and claudin-2 in MDCK cells. *PLoS One*. 7:e28659.
- Falk, M.M., S.M. Baker, A.M. Gumpert, D. Segretain, and R.W. Buckheit, III. 2009. Gap junction turnover is achieved by the internalization of small endocytic double-membrane vesicles. *Mol.Biol.Cell*. 20:3342-3352.
- Farquhar, M.G., and G.E. Palade. 1963. Junctional complexes in various epithelia. *The Journal of cell biology*. 17:375-412.
- Fong, J.T., R.M. Kells, A.M. Gumpert, J.Y. Marzillier, M.W. Davidson, and M.M. Falk. 2012. Internalized gap junctions are degraded by autophagy. *Autophagy*. 8:794-811.
- Ford, M.G., I.G. Mills, B.J. Peter, Y. Vallis, G.J. Praefcke, P.R. Evans, and H.T. McMahon. 2002. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature*. 419:361-366.
- Fujii, N., Y. Matsuo, T. Matsunaga, S. Endo, H. Sakai, M. Yamaguchi, Y. Yamazaki, J. Sugatani, and A. Ikari. 2016. Hypotonic Stress-induced Down-regulation of Claudin-1 and -2 Mediated by Dephosphorylation and Clathrin-dependent Endocytosis in Renal Tubular Epithelial Cells. *The Journal of biological chemistry*. 291:24787-24799.
- Fujita, H., H. Chiba, H. Yokozaki, N. Sakai, K. Sugimoto, T. Wada, T. Kojima, T. Yamashita, and N. Sawada. 2006. Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 54:933-944.
- Fujita, N., T. Itoh, H. Omori, M. Fukuda, T. Noda, and T. Yoshimori. 2008. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Molecular biology of the cell*. 19:2092-2100.
- Furuse, M., K. Fujita, T. Hiiragi, K. Fujimoto, and S. Tsukita. 1998. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *The Journal of cell biology*. 141:1539-1550.
- Furuse, M., M. Hata, K. Furuse, Y. Yoshida, A. Haratake, Y. Sugitani, T. Noda, A. Kubo, and S. Tsukita. 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *The Journal of cell biology*. 156:1099-1111.
- Furuse, M., H. Sasaki, and S. Tsukita. 1999. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J.Cell Biol*. 147:891-903.
- Garrod, D., and M. Chidgey. 2008. Desmosome structure, composition and function. *Biochimica et biophysica acta*. 1778:572-587.

- Geng, Y., L. Kohli, B.J. Klocke, and K.A. Roth. 2010. Chloroquine-induced autophagic vacuole accumulation and cell death in glioma cells is p53 independent. *Neuro-oncology*. 12:473-481.
- Giepmans, B.N. 2004. Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovasc.Res.* 62:233-245.
- Goedhart, J., S.D. von, M. Noirclerc-Savoie, M. Lelimosin, L. Joosen, M.A. Hink, W.L. van, T.W. Gadella, Jr., and A. Royant. 2012. Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nat.Commun.* 3:751.
- Gong, Y., V. Renigunta, Y. Zhou, A. Sunq, J. Wang, J. Yang, A. Renigunta, L.A. Baker, and J. Hou. 2015a. Biochemical and biophysical analyses of tight junction permeability made of claudin-16 and claudin-19 dimerization. *Molecular biology of the cell*. 26:4333-4346.
- Gong, Y., J. Wang, J. Yang, E. Gonzales, R. Perez, and J. Hou. 2015b. KLHL3 regulates paracellular chloride transport in the kidney by ubiquitination of claudin-8. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112:4340-4345.
- Griesbeck, O., G.S. Baird, R.E. Campbell, D.A. Zacharias, and R.Y. Tsien. 2001. Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *J Biol.Chem.* 276:29188-29194.
- Gunzel, D., and A.S. Yu. 2013. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev.* 93:525-569.
- Haseloff, R.F., S. Dithmer, L. Winkler, H. Wolburg, and I.E. Blasig. 2015. Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: structural and functional aspects. *Seminars in cell & developmental biology*. 38:16-25.
- He, C., and D.J. Klionsky. 2009. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annual review of genetics*. 43:67-93.
- Henley, J.R., E.W. Krueger, B.J. Oswald, and M.A. McNiven. 1998. Dynamin-mediated internalization of caveolae. *The Journal of cell biology*. 141:85-99.
- Hou, J., A. Renigunta, A.S. Gomes, M. Hou, D.L. Paul, S. Waldegger, and D.A. Goodenough. 2009. Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:15350-15355.
- Hou, J., A. Renigunta, J. Yang, and S. Waldegger. 2010. Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:18010-18015.
- Hu, Y.B., E.B. Dammer, R.J. Ren, and G. Wang. 2015. The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Translational neurodegeneration*. 4:18.
- Ikari, A., S. Taga, R. Watanabe, T. Sato, S. Shimobaba, H. Sonoki, S. Endo, T. Matsunaga, H. Sakai, M. Yamaguchi, Y. Yamazaki, and J. Sugatani. 2015. Clathrin-dependent endocytosis of claudin-2 by DFYSP peptide causes lysosomal damage in lung adenocarcinoma A549 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1848:2326-2336.
- Ikonomov, O.C., D. Sbrissa, and A. Shisheva. 2009. YM201636, an inhibitor of retroviral budding and PIKfyve-catalyzed PtdIns(3,5)P2 synthesis, halts glucose entry by insulin in adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 382:566-570.
- Itoh, M., M. Furuse, K. Morita, K. Kubota, M. Saitou, and S. Tsukita. 1999. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *The Journal of cell biology*. 147:1351-1363.
- Ivanov, A.I., A. Nusrat, and C.A. Parkos. 2004. Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment. *Mol.Biol.Cell*. 15:176-188.
- Jahreiss, L., F.M. Menzies, and D.C. Rubinsztein. 2008. The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic*. 9:574-587.
- Kimura, S., T. Noda, and T. Yoshimori. 2007. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy*. 3:452-460.
- Klionsky, D.J., Z. Elazar, P.O. Seglen, and D.C. Rubinsztein. 2008. Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? *Autophagy*. 4:849-850.

- Knorr, R.L., R. Dimova, and R. Lipowsky. 2012. Curvature of double-membrane organelles generated by changes in membrane size and composition. *PLoS One*. 7:e32753.
- Kobayashi, J., T. Inai, and Y. Shibata. 2002. Formation of tight junction strands by expression of claudin-1 mutants in their ZO-1 binding site in MDCK cells. *Histochemistry and cell biology*. 117:29-39.
- Kumari, S., S. Mg, and S. Mayor. 2010. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res*. 20:256-275.
- Lauterbach, J., and R. Klein. 2006. Release of full-length EphB2 receptors from hippocampal neurons to cocultured glial cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 26:11575-11581.
- Lee, D.B., N. Jamgotchian, S.G. Allen, M.B. Abeles, and H.J. Ward. 2008. A lipid-protein hybrid model for tight junction. *Am.J.Physiol Renal Physiol*. 295:F1601-F1612.
- Lee, J.A., A. Beigneux, S.T. Ahmad, S.G. Young, and F.B. Gao. 2007. ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Current biology : CB*. 17:1561-1567.
- Li, J., S. Angelow, A. Linge, M. Zhuo, and A.S. Yu. 2013. Claudin-2 pore function requires an intramolecular disulfide bond between two conserved extracellular cysteines. *American journal of physiology. Cell physiology*. 305:C190-196.
- Li, J., Y.X. Li, M.H. Chen, J. Li, J. Du, B. Shen, and X.M. Xia. 2015. Changes in the phosphorylation of claudins during the course of experimental colitis. *International journal of clinical and experimental pathology*. 8:12225-12233.
- Lim, T.S., S.R. Vedula, S. Hui, P.J. Kausalya, W. Hunziker, and C.T. Lim. 2008. Probing effects of pH change on dynamic response of Claudin-2 mediated adhesion using single molecule force spectroscopy. *Experimental cell research*. 314:2643-2651.
- Liu, J., X. Jin, K.J. Liu, and W. Liu. 2012. Matrix metalloproteinase-2-mediated occludin degradation and caveolin-1-mediated claudin-5 redistribution contribute to blood-brain barrier damage in early ischemic stroke stage. *J.Neurosci*. 32:3044-3057.
- Lorenz, H., D.W. Hailey, C. Wunder, and J. Lippincott-Schwartz. 2006. The fluorescence protease protection (FPP) assay to determine protein localization and membrane topology. *Nature protocols*. 1:276-279.
- Macia, E., M. Ehrlich, R. Massol, E. Boucrot, C. Brunner, and T. Kirchhausen. 2006. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev.Cell*. 10:839-850.
- Maher, G.J., E.N. Hilton, J.E. Urquhart, A.E. Davidson, H.L. Spencer, G.C. Black, and F.D. Manson. 2011. The cataract-associated protein TMEM114, and TMEM235, are glycosylated transmembrane proteins that are distinct from claudin family members. *FEBS letters*. 585:2187-2192.
- Mandel, I., T. Paperna, A. Volkowich, M. Merhav, L. Glass-Marmor, and A. Miller. 2012. The ubiquitin-proteasome pathway regulates claudin 5 degradation. *J.Cell Biochem*. 113:2415-2423.
- Martinez, O., and B. Goud. 1998. Rab proteins. *Biochimica et biophysica acta*. 1404:101-112.
- Matsuda, M., A. Kubo, M. Furuse, and S. Tsukita. 2004. A peculiar internalization of claudins, tight junction-specific adhesion molecules, during the intercellular movement of epithelial cells. *J.Cell Sci*. 117:1247-1257.
- Maulucci, G., M. Chiarpotto, M. Papi, D. Samengo, G. Pani, and M. De Spirito. 2015. Quantitative analysis of autophagic flux by confocal pH-imaging of autophagic intermediates. *Autophagy*. 11:1905-1916.
- Mauvezin, C., P. Nagy, G. Juhasz, and T.P. Neufeld. 2015. Autophagosome-lysosome fusion is independent of V-ATPase-mediated acidification. *Nature communications*. 6:7007.
- Maxfield, F.R., and D. Wustner. 2012. Analysis of cholesterol trafficking with fluorescent probes. *Methods in cell biology*. 108:367-393.
- Mayor, S., and R.E. Pagano. 2007. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 8:603-612.
- McMahon, H.T., and E. Boucrot. 2011. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol*. 12:517-533.
- Mellman, I., and W.J. Nelson. 2008. Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol*. 9:833-845.

- Milatz, S., J. Piontek, J.D. Schulzke, I.E. Blasig, M. Fromm, and D. Gunzel. 2015. Probing the cis-arrangement of prototype tight junction proteins claudin-1 and claudin-3. *The Biochemical journal*. 468:449-458.
- Mineta, K., Y. Yamamoto, Y. Yamazaki, H. Tanaka, Y. Tada, K. Saito, A. Tamura, M. Igarashi, T. Endo, K. Takeuchi, and S. Tsukita. 2011. Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett*. 585:606-612.
- Misinzo, G., P.L. Delputte, and H.J. Nauwynck. 2008. Inhibition of endosome-lysosome system acidification enhances porcine circovirus 2 infection of porcine epithelial cells. *Journal of virology*. 82:1128-1135.
- Mizushima, N., Y. Ohsumi, and T. Yoshimori. 2002. Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct.Funct.* 27:421-429.
- Morita, K., M. Furuse, K. Fujimoto, and S. Tsukita. 1999a. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96:511-516.
- Morita, K., M. Furuse, K. Fujimoto, and S. Tsukita. 1999b. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96:511-516.
- Mukherjee, S., R.N. Ghosh, and F.R. Maxfield. 1997. Endocytosis. *Physiol Rev*. 77:759-803.
- Murakami, T., E.A. Felinski, and D.A. Antonetti. 2009. Occludin phosphorylation and ubiquitination regulate tight junction trafficking and vascular endothelial growth factor-induced permeability. *J.Biol.Chem*. 284:21036-21046.
- Nighot, P.K., C.A. Hu, and T.Y. Ma. 2015. Autophagy enhances intestinal epithelial tight junction barrier function by targeting claudin-2 protein degradation. *The Journal of biological chemistry*. 290:7234-7246.
- Nitta, T., M. Hata, S. Gotoh, Y. Seo, H. Sasaki, N. Hashimoto, M. Furuse, and S. Tsukita. 2003. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *The Journal of cell biology*. 161:653-660.
- Noda, T., N. Fujita, and T. Yoshimori. 2009. The late stages of autophagy: how does the end begin? *Cell death and differentiation*. 16:984-990.
- Oh, P., D.P. McIntosh, and J.E. Schnitzer. 1998. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *The Journal of cell biology*. 141:101-114.
- Peppi, M., and M.N. Ghabriel. 2004. Tissue-specific expression of the tight junction proteins claudins and occludin in the rat salivary glands. *Journal of anatomy*. 205:257-266.
- Piehl, C., J. Piontek, J. Cording, H. Wolburg, and I.E. Blasig. 2010. Participation of the second extracellular loop of claudin-5 in paracellular tightening against ions, small and large molecules. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 67:2131-2140.
- Pillay, C.S., E. Elliott, and C. Dennison. 2002. Endolysosomal proteolysis and its regulation. *The Biochemical journal*. 363:417-429.
- Piontek, J., S. Fritzsche, J. Cording, S. Richter, J. Hartwig, M. Walter, D. Yu, J.R. Turner, C. Gehring, H.P. Rahn, H. Wolburg, and I.E. Blasig. 2011. Elucidating the principles of the molecular organization of heteropolymeric tight junction strands. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 68:3903-3918.
- Piontek, J., L. Winkler, H. Wolburg, S.L. Muller, N. Zuleger, C. Piehl, B. Wiesner, G. Krause, and I.E. Blasig. 2008. Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 22:146-158.
- Plutner, H., H.W. Davidson, J. Saraste, and W.E. Balch. 1992. Morphological analysis of protein transport from the ER to Golgi membranes in digitonin-permeabilized cells: role of the P58 containing compartment. *The Journal of cell biology*. 119:1097-1116.
- Popovic, D., and I. Dikic. 2014. TBC1D5 and the AP2 complex regulate ATG9 trafficking and initiation of autophagy. *EMBO reports*. 15:392-401.

- Powell, D.W. 1981. Barrier function of epithelia. *The American journal of physiology*. 241:G275-288.
- Rahner, C., L.L. Mitic, and J.M. Anderson. 2001. Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology*. 120:411-422.
- Raleigh, D.R., D.M. Boe, D. Yu, C.R. Weber, A.M. Marchiando, E.M. Bradford, Y. Wang, L. Wu, E.E. Schneeberger, L. Shen, and J.R. Turner. 2011. Occludin S408 phosphorylation regulates tight junction protein interactions and barrier function. *The Journal of cell biology*. 193:565-582.
- Ramirez, S.H., S. Fan, H. Dykstra, S. Rom, A. Mercer, N.L. Reichenbach, L. Gofman, and Y. Persidsky. 2013. Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta promotes tight junction stability in brain endothelial cells by half-life extension of occludin and claudin-5. *PLoS One*. 8:e55972.
- Ravikumar, B., K. Moreau, L. Jahreiss, C. Puri, and D.C. Rubinsztein. 2010. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nature cell biology*. 12:747-757.
- Rosenthal, R., S. Milatz, S.M. Krug, B. Oelrich, J.D. Schulzke, S. Amasheh, D. Gunzel, and M. Fromm. 2010. Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J.Cell Sci*. 123:1913-1921.
- Rossa, J., J. Protze, C. Kern, A. Piontek, D. Gunzel, G. Krause, and J. Piontek. 2014. Molecular and structural transmembrane determinants critical for embedding claudin-5 into tight junctions reveal a distinct four-helix bundle arrangement. *The Biochemical journal*. 464:49-60.
- Roy, A., A. Kucukural, and Y. Zhang. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc*. 5:725-738.
- Sakurai, T., M.J. Woolls, S.W. Jin, M. Murakami, and M. Simons. 2014. Inter-cellular exchange of cellular components via VE-cadherin-dependent trans-endocytosis. *PLoS One*. 9:e90736.
- Sasaki, H., C. Matsui, K. Furuse, Y. Mimori-Kiyosue, M. Furuse, and S. Tsukita. 2003. Dynamic behavior of paired claudin strands within apposing plasma membranes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 100:3971-3976.
- Schmid, S.L. 1997. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annual review of biochemistry*. 66:511-548.
- Schnitzer, J.E., P. Oh, E. Pinney, and J. Allard. 1994. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *The Journal of cell biology*. 127:1217-1232.
- Shen, L., and J.R. Turner. 2005. Actin depolymerization disrupts tight junctions via caveolae-mediated endocytosis. *Mol.Biol.Cell*. 16:3919-3936.
- Shen, L., C.R. Weber, and J.R. Turner. 2008. The tight junction protein complex undergoes rapid and continuous molecular remodeling at steady state. *J.Cell Biol*. 181:683-695.
- Shin, S.Y., K.S. Lee, Y.K. Choi, H.J. Lim, H.G. Lee, Y. Lim, and Y.H. Lee. 2013. The antipsychotic agent chlorpromazine induces autophagic cell death by inhibiting the Akt/mTOR pathway in human U-87MG glioma cells. *Carcinogenesis*. 34:2080-2089.
- Shinoda, T., N. Shinya, K. Ito, N. Ohsawa, T. Terada, K. Hirata, Y. Kawano, M. Yamamoto, T. Kimura-Someya, S. Yokoyama, and M. Shirouzu. 2016. Structural basis for disruption of claudin assembly in tight junctions by an enterotoxin. *Scientific reports*. 6:33632.
- Shiroto, T., N. Romero, T. Sugiyama, J.L. Sartoretto, H. Kalwa, Z. Yan, H. Shimokawa, and T. Michel. 2014. Caveolin-1 is a critical determinant of autophagy, metabolic switching, and oxidative stress in vascular endothelium. *PLoS One*. 9:e87871.
- Simonsen, A., A.E. Wurmser, S.D. Emr, and H. Stenmark. 2001. The role of phosphoinositides in membrane transport. *Current opinion in cell biology*. 13:485-492.
- Sosinsky, G.E., and B.J. Nicholson. 2005. Structural organization of gap junction channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1711:99-125.
- Staat, C., C. Coisne, S. Dabrowski, S.M. Stamatovic, A.V. Andjelkovic, H. Wolburg, B. Engelhardt, and I.E. Blasig. 2015. Mode of action of claudin peptidomimetics in the transient opening of cellular tight junction barriers. *Biomaterials*. 54:9-20.
- Stamatovic, S.M., R.F. Keep, M.M. Wang, I. Jankovic, and A.V. Andjelkovic. 2009. Caveolae-mediated internalization of occludin and claudin-5 during CCL2-induced tight junction remodeling in brain endothelial cells. *J.Biol.Chem*. 284:19053-19066.

- Stenmark, H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 10:513-525.
- Suzuki, H., T. Nishizawa, K. Tani, Y. Yamazaki, A. Tamura, R. Ishitani, N. Dohmae, S. Tsukita, O. Nureki, and Y. Fujiyoshi. 2014. Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. *Science.* 344:304-307.
- Swanson, J.A. 2008. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nature reviews. Molecular cell biology.* 9:639-649.
- Sweitzer, S.M., and J.E. Hinshaw. 1998. Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell.* 93:1021-1029.
- Takahashi, S., N. Iwamoto, H. Sasaki, M. Ohashi, Y. Oda, S. Tsukita, and M. Furuse. 2009. The E3 ubiquitin ligase LNX1p80 promotes the removal of claudins from tight junctions in MDCK cells. *J.Cell Sci.* 122:985-994.
- Tian, R., Y. Luo, Q. Liu, M. Cai, J. Li, W. Sun, J. Wang, C. He, Y. Liu, and X. Liu. 2014. The effect of claudin-5 overexpression on the interactions of claudin-1 and -2 and barrier function in retinal cells. *Current molecular medicine.* 14:1226-1237.
- Tooze, S.A., and T. Yoshimori. 2010. The origin of the autophagosomal membrane. *Nature cell biology.* 12:831-835.
- Tscheik, C., I.E. Blasig, and L. Winkler. 2013. Trends in drug delivery through tissue barriers containing tight junctions. *Tissue Barriers.* 1:e24565.
- Tsuboyama, K., I. Koyama-Honda, Y. Sakamaki, M. Koike, H. Morishita, and N. Mizushima. 2016. The ATG conjugation systems are important for degradation of the inner autophagosomal membrane. *Science.* 354:1036-1041.
- Tsukita, S., M. Furuse, and M. Itoh. 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nature reviews. Molecular cell biology.* 2:285-293.
- Twiss, F., M. Oldenkamp, A. Hiemstra, H. Zhou, L. Matheron, S. Mohammed, and J. de Rooij. 2013. HGF signaling regulates Claudin-3 dynamics through its C-terminal tyrosine residues. *Tissue Barriers.* 1:e27425.
- Umeda, K., J. Ikenouchi, S. Katahira-Tayama, K. Furuse, H. Sasaki, M. Nakayama, T. Matsui, S. Tsukita, M. Furuse, and S. Tsukita. 2006. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell.* 126:741-754.
- Ungewickell, E., and D. Branton. 1981. Assembly units of clathrin coats. *Nature.* 289:420-422.
- Utech, M., R. Mennigen, and M. Bruewer. 2010. Endocytosis and recycling of tight junction proteins in inflammation. *J.Biomed.Biotechnol.* 2010:484987.
- Van Itallie, C.M., and J.M. Anderson. 2006. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annual review of physiology.* 68:403-429.
- Van Itallie, C.M., O.R. Colegio, and J.M. Anderson. 2004. The cytoplasmic tails of claudins can influence tight junction barrier properties through effects on protein stability. *The Journal of membrane biology.* 199:29-38.
- Van Itallie, C.M., A.S. Fanning, and J.M. Anderson. 2003. Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *American journal of physiology. Renal physiology.* 285:F1078-1084.
- Van Itallie, C.M., T.M. Gambling, J.L. Carson, and J.M. Anderson. 2005. Palmitoylation of claudins is required for efficient tight-junction localization. *J.Cell Sci.* 118:1427-1436.
- Van Itallie, C.M., A.J. Tietgens, K. LoGrande, A. Aponte, M. Gucek, and J.M. Anderson. 2012. Phosphorylation of claudin-2 on serine 208 promotes membrane retention and reduces trafficking to lysosomes. *J Cell Sci.* 125:4902-4912.
- Van Munster, E.B., G.J. Kremers, M.J. Adjobo-Hermans, and T.W. Gadella, Jr. 2005. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurement by gradual acceptor photobleaching. *Journal of microscopy.* 218:253-262.
- Vicinanza, M., Viktor I. Korolchuk, A. Ashkenazi, C. Puri, Fiona M. Menzies, Jonathan H. Clarke, and David C. Rubinsztein. 2015. PI(5)P Regulates Autophagosome Biogenesis. *Molecular Cell.* 57:219-234.

- Walczak, M., and S. Martens. 2013. Dissecting the role of the Atg12-Atg5-Atg16 complex during autophagosome formation. *Autophagy*. 9:424-425.
- Wang, L.H., K.G. Rothberg, and R.G. Anderson. 1993. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J.Cell Biol.* 123:1107-1117.
- Yamamoto, A., Y. Tagawa, T. Yoshimori, Y. Moriyama, R. Masaki, and Y. Tashiro. 1998. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell structure and function*. 23:33-42.
- Yamamoto, M., S.H. Ramirez, S. Sato, T. Kiyota, R.L. Cerny, K. Kaibuchi, Y. Persidsky, and T. Ikezu. 2008. Phosphorylation of claudin-5 and occludin by rho kinase in brain endothelial cells. *Am.J.Pathol.* 172:521-533.
- Yamazaki, Y., R. Tokumasu, H. Kimura, and S. Tsukita. 2011. Role of claudin species-specific dynamics in reconstitution and remodeling of the zonula occludens. *Mol.Biol.Cell.* 22:1495-1504.
- Yeaman, C., K.K. Grindstaff, and W.J. Nelson. 1999. New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. *Physiological reviews*. 79:73-98.
- Yguerabide, J., J.A. Schmidt, and E.E. Yguerabide. 1982. Lateral mobility in membranes as detected by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophysical journal*. 40:69-75.
- Yoshimori, T., A. Yamamoto, Y. Moriyama, M. Futai, and Y. Tashiro. 1991. Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *The Journal of biological chemistry*. 266:17707-17712.
- Zavala-Zendejas, V.E., A.C. Torres-Martinez, B. Salas-Morales, T.I. Fortoul, L.F. Montaña, and E.P. Rendon-Huerta. 2011. Claudin-6, 7, or 9 Overexpression in the Human Gastric Adenocarcinoma Cell Line AGS Increases Its Invasiveness, Migration, and Proliferation Rate. *Cancer Investigation*. 29:1-11.
- Zeissig, S., N. Burgel, D. Gunzel, J. Richter, J. Mankertz, U. Wahnschaffe, A.J. Kroesen, M. Zeitz, M. Fromm, and J.D. Schulzke. 2007. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*. 56:61-72.
- Zhu, X., Z. Ruan, X. Yang, K. Chu, H. Wu, Y. Li, and Y. Huang. 2015. Connexin 31.1 degradation requires the Clathrin-mediated autophagy in NSCLC cell H1299. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 19:257-264.
- Zwanziger, D., D. Hackel, C. Staat, A. Bocker, A. Brack, M. Beyermann, H. Rittner, and I.E. Blasig. 2012a. A peptidomimetic tight junction modulator to improve regional analgesia. *Molecular pharmaceutics*. 9:1785-1794.
- Zwanziger, D., C. Staat, A.V. Andjelkovic, and I.E. Blasig. 2012b. Claudin-derived peptides are internalized via specific endocytosis pathways. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1257:29-37.

Eidesstattliche Erklärung

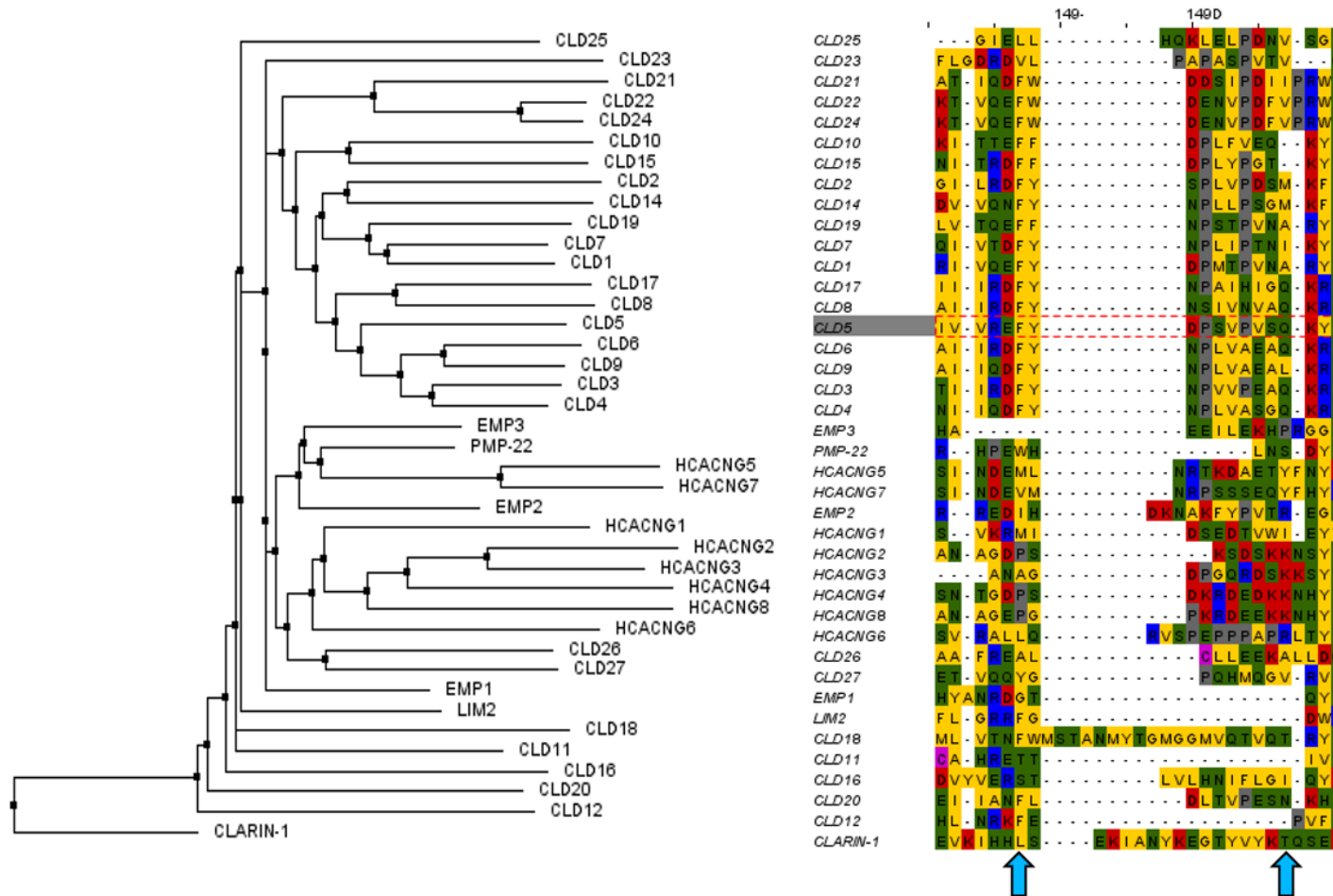
Mit meiner Unterzeichnung erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig, ohne fremde Hilfe und nur mit den von mir im Verzeichnis aufgeführten Hilfsmitteln angefertigt habe.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

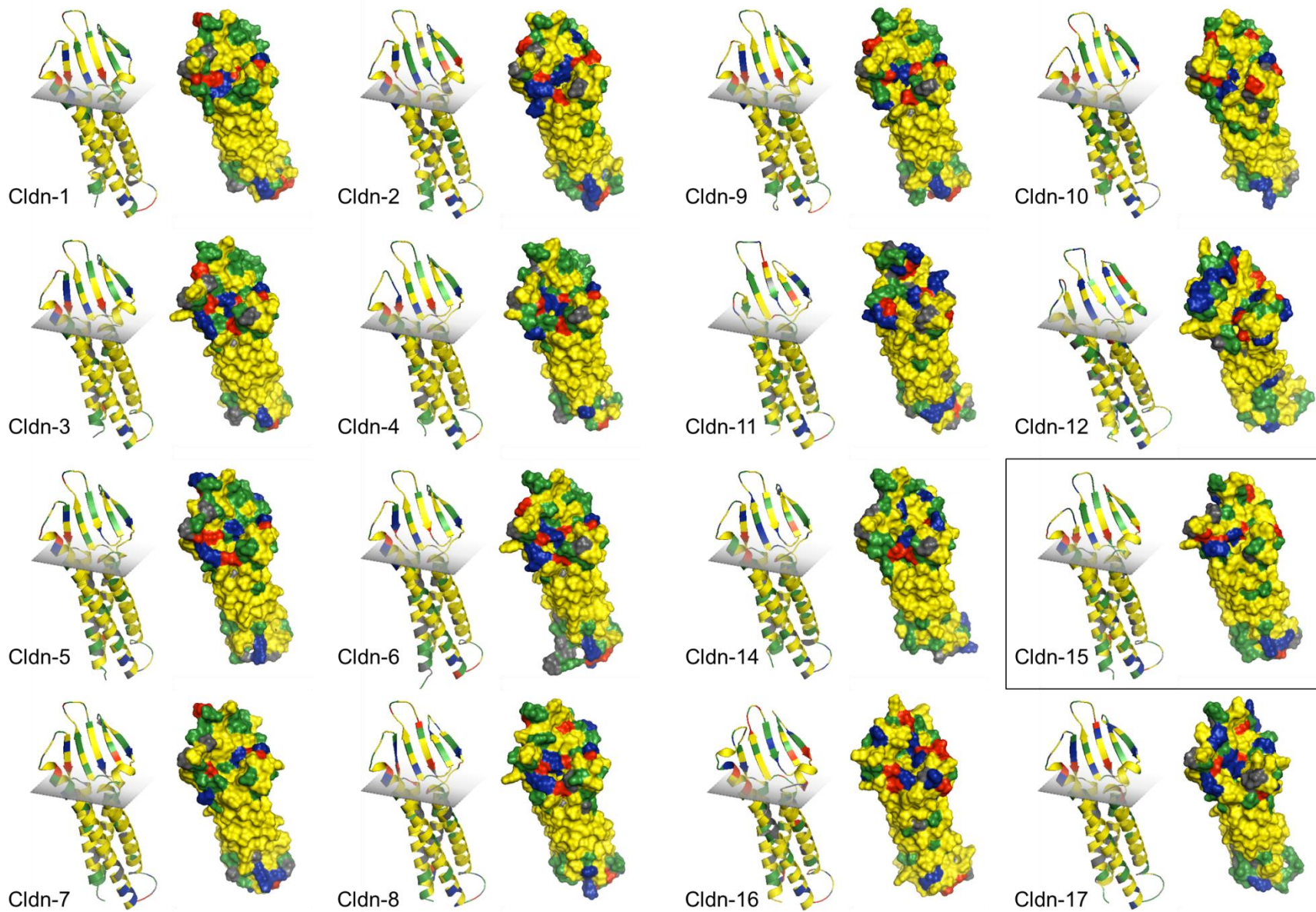
Berlin, den 30.1.2017

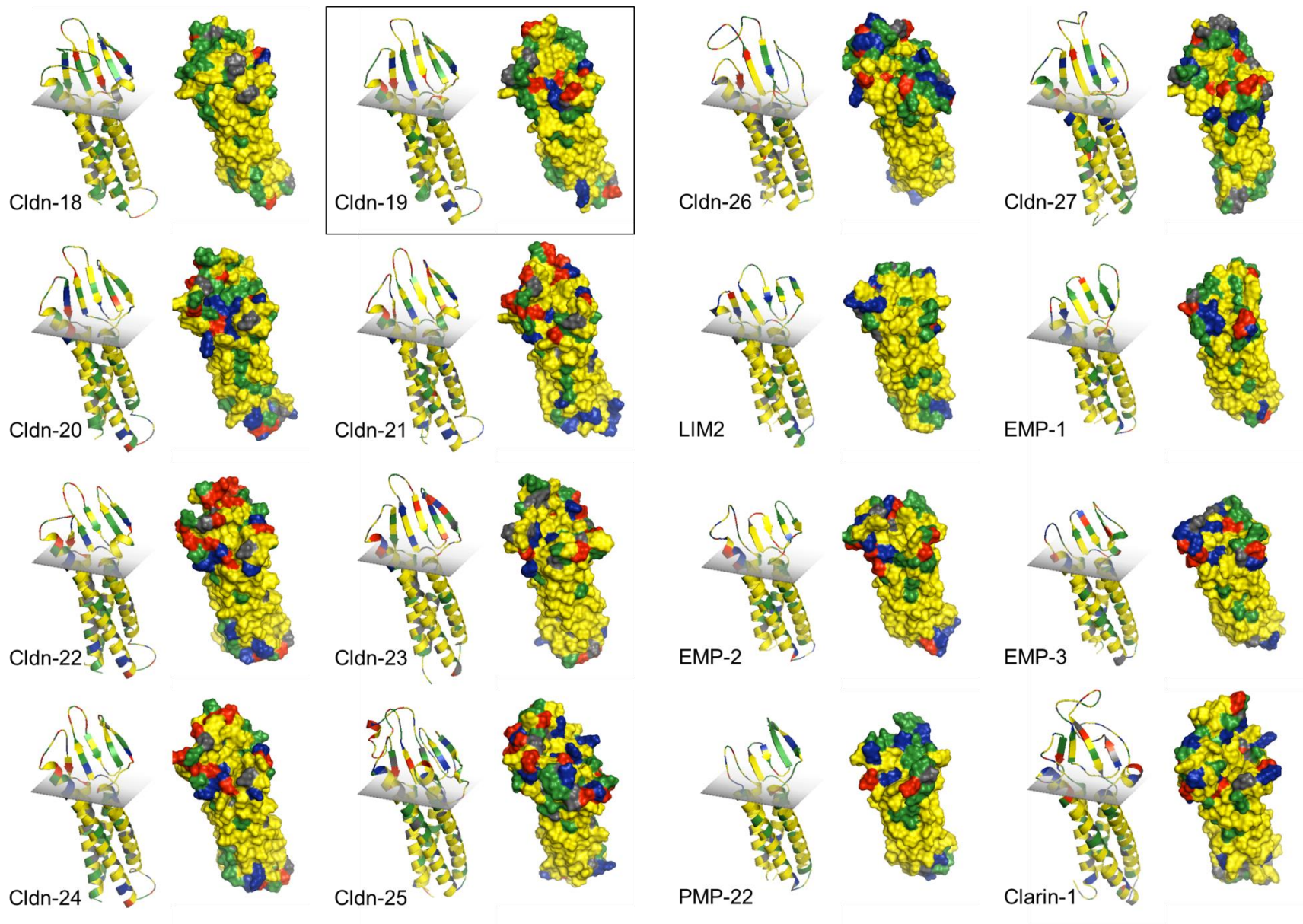
Nora Gehne

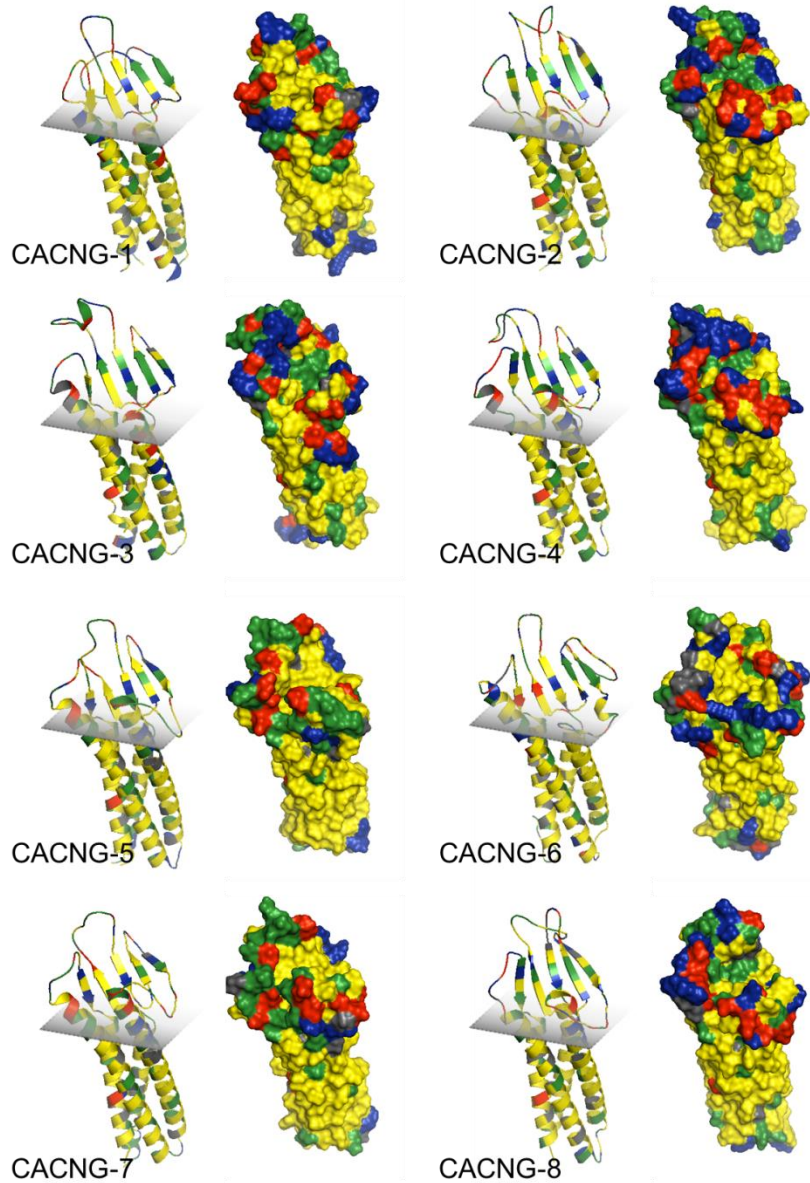
Anhang



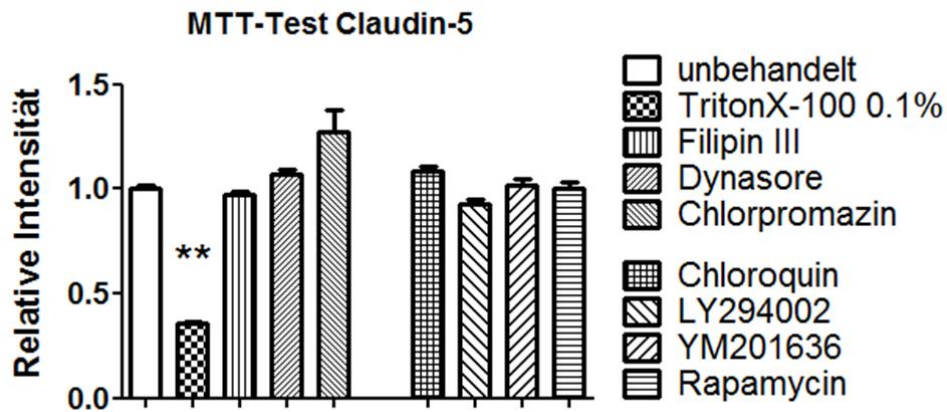
Anhang 1: Stammbaum der humanen Pfam00822-Superfamilie. Das Alignment wurde mit MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle>) durchgeführt und mit Jalview (<http://www.jalview.org>) bearbeitet. Der Stammbaum wurde nach der Neighbourhood Joining Methode (nach prozentualer Übereinstimmung in den Sequenzen) erstellt. **Rechts:** Alignment der zweiten extrazellulären Schleife. Die Positionen der Mutationen F147 und Q156 sind mit blauen Pfeilen markiert. F147 ist innerhalb der Claudine konserviert. Rot: basische Aminosäure (AS), Blau: saure AS, Gelb: lipophile AS, Grün: hydrophile AS, Lila: Cystein, Grau: Prolin.



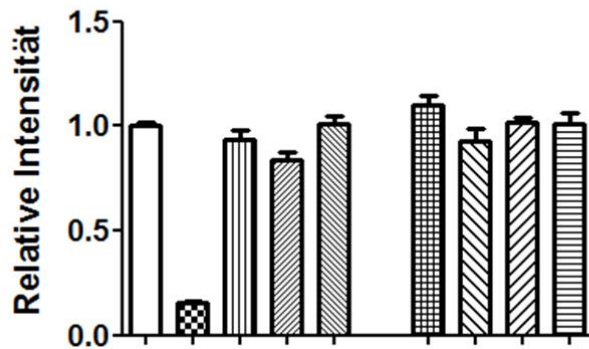




Anhang 2: iTASSER-Modelle der humanen Pfam00822-Familie. Die Modelle wurden für Cldn13, die bisher nur in der Maus gefunden wurde, erstellt. Als Grundlage der Modelle dienten die bekannten Kristallstrukturen von Cldn15 und Cldn19 (Kästen). Graue Ebene: ungefähre Position der Plasmamembran. Rot: basische Aminosäure (AS), Blau: saure AS, Gelb: lipophile AS, Grün: hydrophile AS, Grau: Prolin.

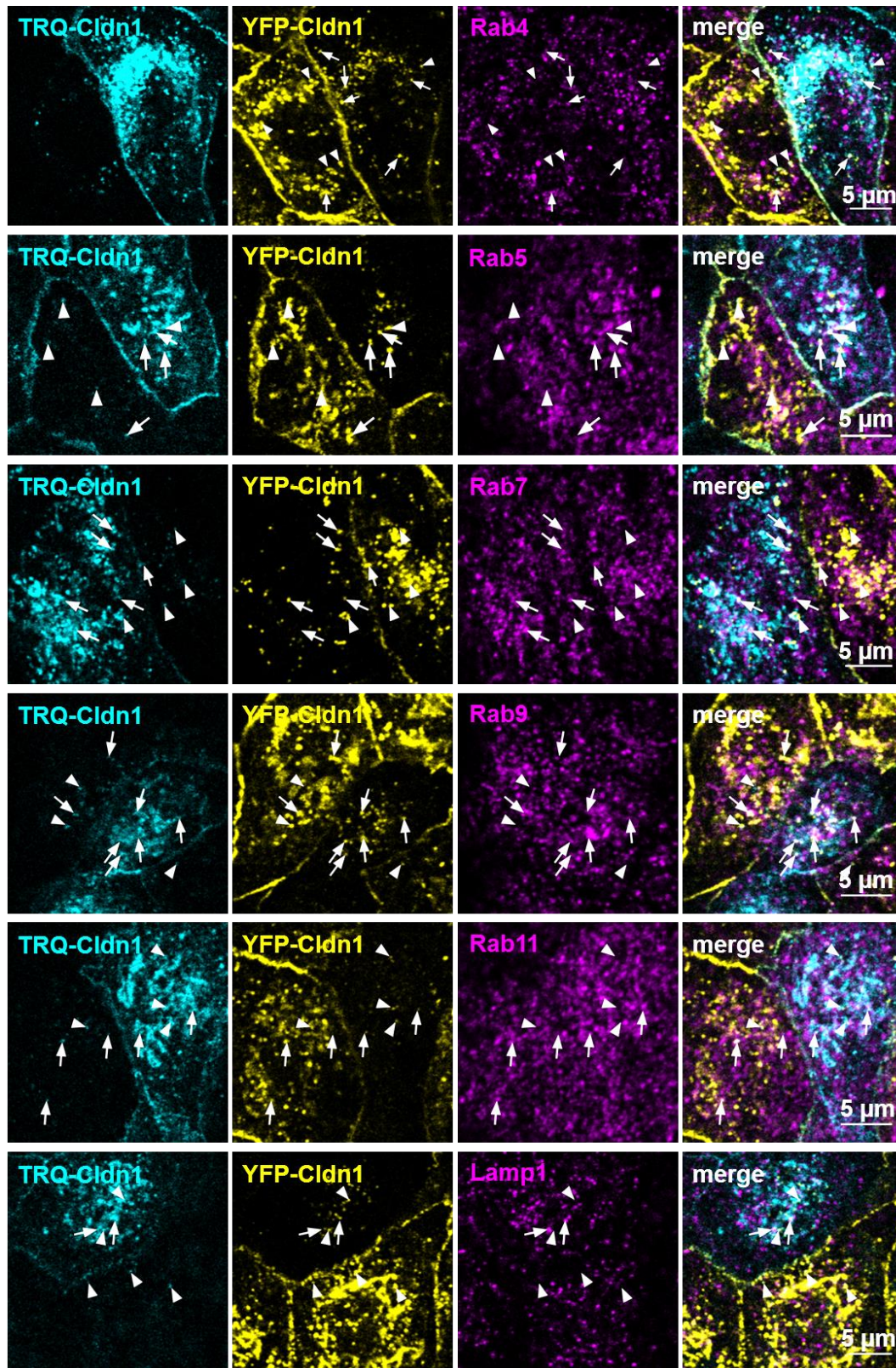


MTT-Test untransfizierte Zellen

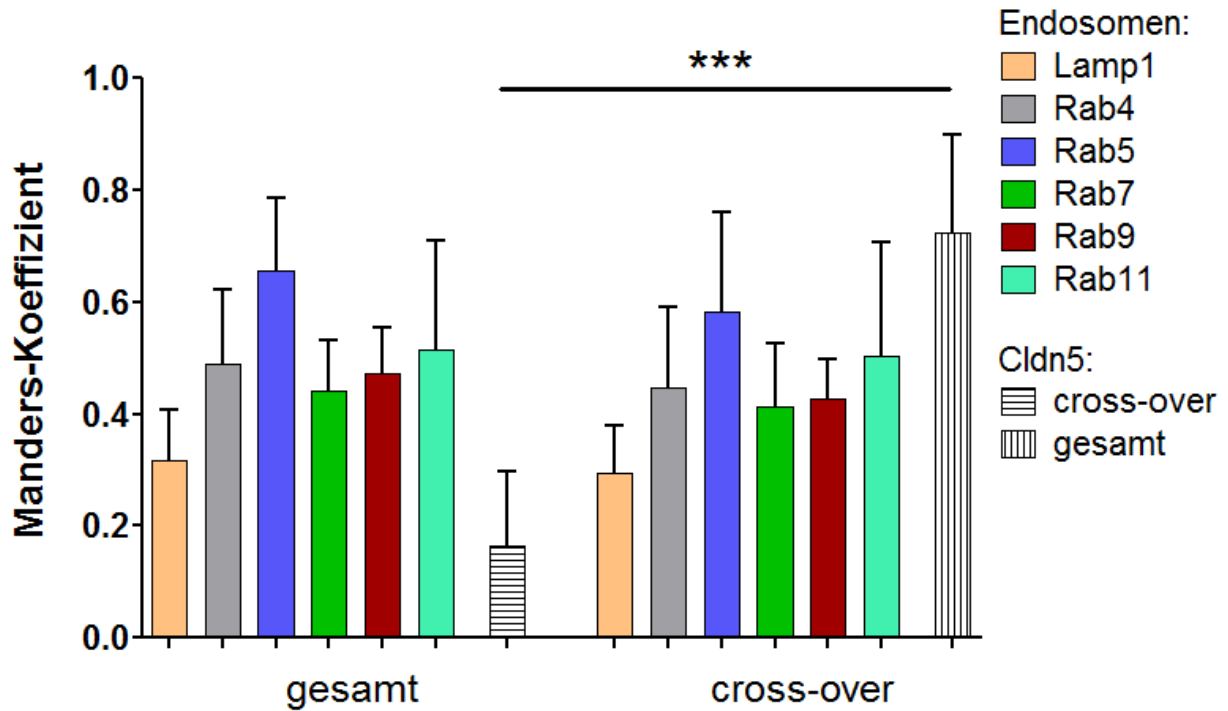


n	Cldn5	Untr.
Unbehandelt	21	8
TritonX-100	6	3
Filipin III	6	3
Dynasore	6	3
Chlorpromazin	24	11
Chloroquin	21	8
LY294002	3	6
YM201636	17	6
Rapamycin	17	5

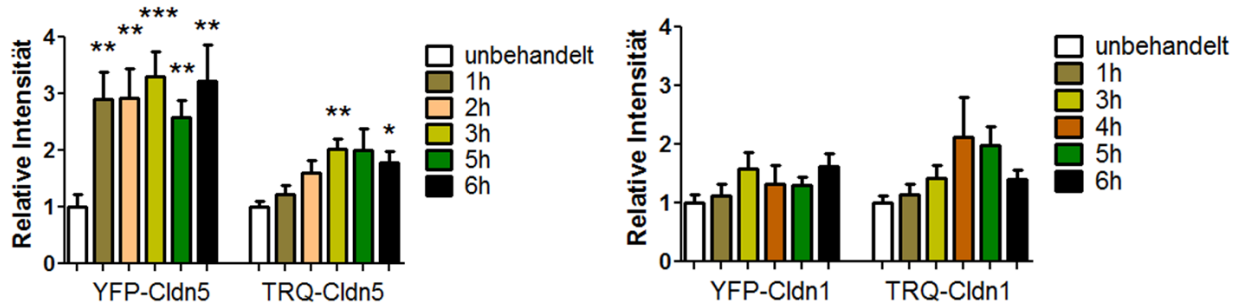
Anhang 3: Die eingesetzten Inhibitor-Konzentrationen sind nicht zytotoxisch. MTT-Test an TRQ-Cldn5 oder YFP-Cldn5 transfizierten MDCK-II-Zellen (oben), oder untransfizierten MDCK-II-Zellen. Die Zellen wurden mit TritonX-100 (0,1%, 15 min) als Positivkontrolle behandelt. Behandlung mit Filipin III (15 μ M, 2 h), Dynasore (100 μ M, 2 h), Chlorpromazin (50 μ M, 1 h), Chloroquin (200 μ M, 3 h), LY294002 (100 μ M, 3 h), YM201636 (1 μ M, 3h) oder Rapamycin (200 nM, 5 h) hatte keinen Einfluss auf die Zellproliferation. Kruskal Wallis Test mit Dunns Post-Test.



Anhang 4: Kolokalisation von Claudin-1 mit Endosomenmarkern. Kokulturen monotransfizierter YFP-Cldn1 oder TRQ-Cldn1 exprimierender MDCK-II-Zellen wurden mit Antikörpern gegen Rab4, -5, -7, -9 und -11 gefärbt. Abgebildet sind konfokale Z-Projektionen. Pfeile: *cross-over* endozytiertes Cldn1-Vesikel, welches den jeweiligen Marker enthält. Pfeilköpfe: *cross-over* endozytiertes Vesikel ohne Endosomenmarker.

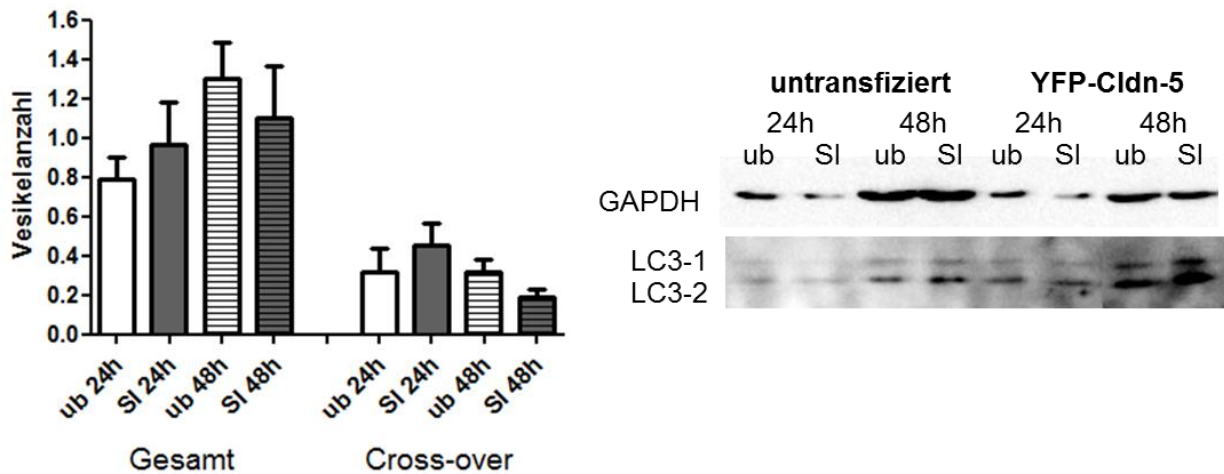


Anhang 5: Manders-Koeffizient von Claudin-5 mit Endosomen-Markern in MDCK-II-Zellen. Der Manders-Koeffizient wurde in YFP-Cldn5/TRQ-Cldn5 Kokulturen monotransfizierter Zellen zwischen Cldn5 und dem jeweiligen Endosomenmarker bestimmt (also der Anteil von Cldn5, welcher mit dem Marker überlappte). Die Koeffizienten unterschieden sich nicht zwischen YFP-Cldn5-Zellen und TRQ-Cldn5-Zellen (bestimmt mit zweiseitigem t-Test) und wurden daher zusammengelegt. Die Anteile des gesamten Claudins, welcher mit dem Marker überlappt war genauso hoch wie der Anteil des *cross-over* endozytierten Cldn5. Nur etwas mehr als 10% des gesamten Cldn5 überlappte mit *cross-over* endozytiertem Cldn5, während etwa 70% des *cross-over* endozytierten Cldn5 mit der Gesamtmenge an Cldn5 überlappte. $n > 10$ für alle Endosomenmarker, $n > 100$ für *cross-over* endozytiertes vs. gesamtes Cldn5. Kruskal Wallis Test mit Dunns Post-Test.

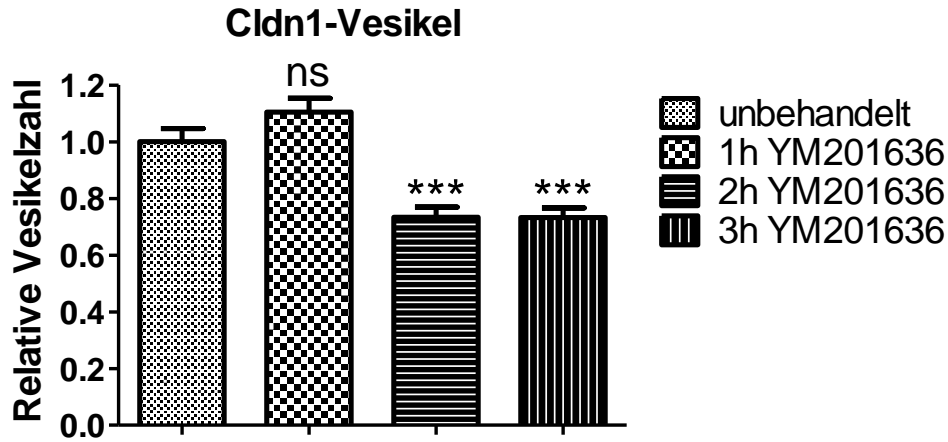


N-Zahlen	Unbeh.	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
YFP-Cldn-5	11	19	17	16		14	17
TRQ-Cldn-5	10	16	13	16		12	16
YFP-Cldn-1	14	12		12	8	14	16
TRQ-Cldn-1	14	19		12	8	16	12

Anhang 6: 100 μ M Chloroquin (CQ) führt zum *rescue* der Intensität des cross-over endozytierten YFP-Claudins. Kokulturen monotransfizierter MDCK-II-Zellen wurden mit CQ (100 μ M) behandelt und die durchschnittliche Fluoreszenzintensität bestimmt. Links: YFP-Cldn5/TRQ-Cldn5 Kokultur. Rechts: YFP-Cldn1/TRQ-Cldn1 Kokultur. Es wurde jeweils das *cross-over* endozytierte Claudin ausgewertet. Kruskal Wallis Test mit Dunns Post-Test.



Anhang 7: Humane si-RNA gegen LC3 hat keine eindeutigen Effekte in MDCK-II-Zellen. YFP-Cldn5/TRQ-Cldn5 Kokulturen monotransfizierter Zellen wurden 24 h bzw. 48 h mit si-RNA gegen LC3 behandelt. Ub: unbehandelt, SI: LC3 *knock-down* mit si-RNA. **A:** Die Vesikelzahlen waren nicht signifikant verändert (zweiseitiger Mann Whitney Test). Nach 24 h bzw. 48 h zeigten sich gegensätzliche Tendenzen. n = 9 – 16 analysierte Zellen. **B:** Western blot von Zelllysaten untransfizierter und YFP-Cldn5 transfizierter MDCK-II-Zellen.



Anhang 8: Inhibition von PIKfyve führt zu reduzierten Vesikelzahlen von endogenem Claudin-1. Die Vesikelzahlen von endogenem Cldn1 wurden in TRQ-Cldn5/YFP-Cldn5 exprimierenden Kokulturen monotransfizierter MDCK-II-Zellen quantifiziert. Die Cldn1-Vesikelzahlen wurden sowohl in YFP-Cldn5 als auch in TRQ-Cldn5 transfizierten Zellen bestimmt und auf den unbehandelten Wert der jeweiligen Zelllinie normiert. n > 50 analysierte Zellen. One-way Anova.