
Aus der Klinik für Pädiatrie mit dem Schwerpunkt Nephrologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Barrierefunktion der Claudine
des dicken aufsteigenden Astes der Henle-Schleife

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lea Elisabeth Haisch

aus Berlin

Gutachter: 1.: Priv.-Doz. Dr. med. Do. Müller
2.: Prof. Dr. S. Bachmann
3.: Priv.-Doz. Dr. I. E. Blasig

Datum der Promotion: 19.03.2010

Inhaltsverzeichnis

Einleitung

<i>Die Niere</i>	12
Die Funktion der Niere	12
Der Aufbau der Niere	13
<i>Die Henle-Schleife</i>	15
<i>Die Tight Junctions</i>	18
<i>Die Familie der Claudine</i>	20
<i>Die untersuchten Claudine</i>	23
Claudin-3	23
Claudin-10	23
Claudin-11	26
Claudin-16	28
Claudin-19	30
<i>Zielsetzung dieser Arbeit</i>	32
Materialien und Methoden	
<i>Zelllinien</i>	33
<i>Molekulare Methoden</i>	33
Amplifikation des Gens / RNA-Umschreibung in DNA mittels PCR	33
Aufreinigung von DNA-PCR-Produkten	33
Verdau mit Restriktionsenzymen	34
Ligation des Gens in den Vektor	34
Agarosegel Elektrophorese	34
Transformation des Konstrukts in kompetente Zellen	35
Plasmid Mini-Präparation	35
Sequenzierung von DNA	36
Plasmid Midi-Präparation	37
Quantifizierung der DNA	37
Glycerolstocks	38
Membran-Protein-Extraktion aus eukaryontischen Zellkulturen	38
Proteinquantifizierung	38
SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	39
Elektrotransfer	40

Inhaltsverzeichnis	4
Immundetektion	40
mRNA-Extraktion	41
<i>Zellkulturtechniken</i>	42
Anzucht und Pflege	42
Zellzählung	42
Stabile Transfektion des Konstrukts	42
Selektion der Klone	43
Tranfektionkontrolle	44
<i>Elektrophysiologische Methoden</i>	44
Widerstandsmessungen	44
Dilutions- und biionische Potentialmessungen in der Ussing-Kammer	44
Einleitung	44
Messanordnung	46
Versuchsdurchführung	48
Berechnungen	48
<i>Immunhistochemie und Konfokale Lasermikroskopie</i>	51
Immunhistochemie	51
Konfokale Laserscanningmikroskopie	52
<i>Statistik</i>	52
Ergebnisse	
<i>Vorbemerkungen</i>	53
<i>Die Zellklone der einzelnen Claudine</i>	54
MDCK C7-Kontrollzellen	56
Claudin-10	58
Claudin-11	63
Claudin-16	65
Claudin-19	67
<i>Die Kokulturen</i>	69
Kokultur Claudin-10 Varianten 1 und V.2	69
Kokultur Claudin-10 und Claudin-11	71
Kokultur Claudin-10 und Claudin-16	73
Kokultur Claudin-11 und Claudin-16	77

Inhaltsverzeichnis	5
<hr/>	
<i>Die Kotransfektion</i>	78
Kotransfektion Claudin-10 Variante 1 und Claudin-16	79
Kotransfektion Claudin-10 Variante 2 und Claudin-16	80
Diskussion	
<hr/>	
<i>Diskussion der Methode</i>	83
<hr/>	
<i>Diskussion der Ergebnisse</i>	85
<hr/>	
Die Claudine als Tight Junction-Proteine	85
Die Permeabilität der Tight Junction	85
Die Theorie der Ionensequenzen	86
Der Einfluss der untersuchten Claudine auf die Permeabilität	90
Das Permeabilitätsverhalten der Claudin-10-Klone	91
Das Permeabilitätsverhalten der Claudin-11-Klone	92
Das Permeabilitätsverhalten der Claudin-16-Klone	93
Das Permeabilitätsverhalten der Claudin-19-Klone	93
Die Claudine im Verband	95
Der Zusammenhang zwischen der Permeabilität und dem Widerstand	95
Die Bedeutung der Proteinstruktur	97
Die Theorie der geladenen Bereiche	98
Claudin-10	99
Claudin-11	100
Claudin-16	100
Claudin-19	101
Interaktionen zwischen den Claudinen	101
Interaktion im Kokultur-Experiment	102
Zukünftige Untersuchungen	103
Auswirkungen auf das Tubulussystem und die Niere	105
Zusammenfassung	107
<hr/>	
Literaturverzeichnis	109
<hr/>	
Anhang	121
<hr/>	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1	<i>Aufbau eines Nephrons</i>	14
Abbildung 1-2	<i>Resorption und Sekretion im Nephron</i>	15
Abbildung 1-3	<i>Der Gefäßverlauf innerhalb eines Nephrons</i>	16
Abbildung 1-4	<i>Das Gegenstromprinzip</i>	17
Abbildung 1-5	<i>Transportwege im aufsteigenden dicken Ast der Henle-Schleife</i>	18
Abbildung 1-6	<i>Struktur der Tight Junctions</i>	18
Abbildung 1-7	<i>Funktionen der Tight Junction und freeze-fracture-Aufnahme</i>	19
Abbildung 1-8	<i>Schematische Darstellung der Transmembranproteine</i>	20
Abbildung 1-9	<i>Der Interzellularspalt mit den interagierenden Transmembranproteinen</i>	21
Abbildung 1-10	<i>Verteilung der untersuchten Claudine entlang des Nephrons</i>	22
Abbildung 1-11	<i>Claudin-10 Variante 1 und Variante 2</i>	24
Abbildung 1-12	<i>Alternative Splicevarianten</i>	24
Abbildung 1-13	<i>Claudin-11</i>	26
Abbildung 1-14	<i>Claudin-16</i>	28
Abbildung 1-15	<i>Claudin-19</i>	30
<hr/>		
Abbildung 2-1	<i>Die Transportformen durch einen Zelllayer</i>	44
Abbildung 2-2	<i>Der Ussingkammer-Versuchsaufbau mit im Container befindlichen Epithelfilter, Wärmeaustauscher und Begasung</i>	46
Abbildung 2-3	<i>Detailabbildung des Containers der Ussingkammer und Messanordnung</i>	47
<hr/>		
Abbildung 3-1	<i>Immunhistochemische Färbungen der Claudin-Klone</i>	54
Abbildung 3-2	<i>Immunhistochemische Färbungen der Claudin-10-Klone</i>	55
Abbildung 3-3	<i>Immunhistochemische Färbungen der Claudin-10-Klone mit Deletion des PDZ-Bindungsmotivs (dP)</i>	55
Abbildung 3-4	<i>Die fluoreszierenden Claudine</i>	55
Abbildung 3-5	<i>Widerstände, Na^+/Cl^- Permeabilitätsverhältnis sowie die absoluten Permeabilitäten für P_{Na}/P_{Cl} der MDCK C7-Kontrollzellen</i>	56
Abbildung 3-6	<i>Permeabilitätsverhältnisse P_X/P_{Cl} der MDCK C7-Kontrollzellen für divalente und monovalente Ionen</i>	58
Abbildung 3-7	<i>Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl}, sowie absolute Permeabilitäten der murinen Claudin-10-Klone und deren Deletionsmutanten</i>	59

Abbildung 3-8	<i>Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl}, sowie absolute Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- der humane Claudin-10-Klone</i>	60
Abbildung 3-9	<i>Permeabilitätsverhältnisse P_X/P_{Cl} der murinen Claudin-10-Klone für monovalente und divalente Ionen</i>	62
Abbildung 3-10	<i>Permeabilitätsverhältnisse P_X/P_{Cl} der humanen Claudin-10-Klone für monovalente und divalente Ionen</i>	62
Abbildung 3-11	<i>Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl}, sowie absolute Permeabilitäten für Natrium und Chlorid der Claudin-11-Klone</i>	63
Abbildung 3-12	<i>Permeabilitätsverhältnisse P_X/P_{Cl} der Claudin-11-Klone für monovalente und divalente Ionen</i>	64
Abbildung 3-13	<i>Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl}, sowie absolute Permeabilitäten für Natrium und Chlorid der Claudin-16-Klone</i>	65
Abbildung 3-14	<i>Permeabilitätsverhältnisse P_X/P_{Cl} der Claudin-16-Klone für monovalente und divalente Ionen</i>	66
Abbildung 3-15	<i>Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl}, sowie absolute Permeabilitäten für Natrium und Chlorid der Claudin-19-Klone</i>	67
Abbildung 3-16	<i>Permeabilitätsverhältnisse P_X/P_{Cl} der Claudin-19-Klone für monovalente und divalente Ionen</i>	68
Abbildung 3-17	<i>Immunhistochemische Färbungen der Kokulturen</i>	69
Abbildung 3-18	<i>Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl}, sowie absolute Permeabilitäten für Natrium und Chlorid der Kokultur Claudin-10 V.1 und V.2</i>	70
Abbildung 3-19	<i>Permeabilitätsverhältnisse P_X/P_{Cl} der Kokultur Claudin-10 V.1 und V.2 für monovalente Ionen</i>	71
Abbildung 3-20	<i>Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl}, sowie absolute Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- der Kokultur Claudin-10 V.2 und -11</i>	72
Abbildung 3-21	<i>Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl}, sowie absolute Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- der Kokultur Claudin-10 V.2 und -11 (GFP)</i>	73
Abbildung 3-22	<i>Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl}, sowie absolute Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- der Kokultur Claudin-10 V.1 und -16</i>	74
Abbildung 3-23	<i>Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl}, sowie absolute Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- der Kokultur Claudin-10 V.2 und -16</i>	75
Abbildung 3-24	<i>Permeabilitätsverhältnisse P_X/P_{Cl} der Kokultur Claudin-10 V.2 und -16 für monovalente und divalente Ionen</i>	76
Abbildung 3-25	<i>Permeabilitätsverhältnisse P_X/P_{Cl} der Kokultur Claudin-10 V.1 und -16 für divalente Ionen</i>	77
Abbildung 3-26	<i>Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl}, sowie absolute</i>	78

	<i>Permeabilitäten für Natrium und Chlorid der Kokultur Claudin-11 und -16</i>	
Abbildung 3-27	<i>Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl}, sowie absolute Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- der Kotransfektion Claudin-10 V.1 und -16</i>	79
Abbildung 3-28	<i>Permeabilitätsverhältnisse P_X/P_{Cl} der Kotransfektion Claudin-10 V.1 und -16 für divalente Ionen</i>	80
Abbildung 3-29	<i>Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl}, sowie absolute Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- der Kotransfektion Claudin-10 V.2 und -16</i>	81
Abbildung 3-30	<i>Permeabilitätsverhältnisse P_X/P_{Cl} der Kotransfektion Claudin-10 V.2 und -16 für monovalente und divalente Ionen</i>	82
Abbildung 4-1	<i>Ionen sortiert nach den dehydrierten Radien</i>	87
Abbildung 4-2	<i>Eisenmann-Sequenzen</i>	87
Abbildung 4-3	<i>Starke Interaktion</i>	89
Abbildung 4-4	<i>Schwache Interaktion</i>	89
Abbildung 4-5	<i>Unterschiedliche Splicevarianten des Claudin-19</i>	94
Abbildung 4-6	<i>Aminosäuresequenzen der Claudin-19 Varianten</i>	94
Abbildung 4-7	<i>Widerstandsverteilung eines Zelllayers</i>	95
Abbildung 4-8	<i>Die Tight Junction</i>	96
Abbildung 4-9	<i>Phylogenetischer Baum nach Krause</i>	97
Abbildung 4-10	<i>Eisenmann-Sequenzen: Selektivität als Funktion der Ionenradien</i>	103
Abbildung 4-11	<i>Transportwege des dicken aufsteigenden Astes der Henle-Schleife</i>	106

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4-1	<i>Die Ionenradien nach Nightengale</i>	86
Tabelle 4-2	<i>Die Eisenman-Sequenzen</i>	88
Tabelle 4-3	<i>Die Sherry-Sequenzen</i>	90
Tabelle 4-4	<i>Die Eisenman-Sequenzen der MDCK-Kontrollzellen</i>	90
Tabelle 4-5	<i>Die Eisenman-Sequenzen der Claudin-Klone</i>	91

Abkürzungsverzeichnis

Å	Anström	I	Strom
ADH	Antidiuretische Hormon	JAM	Junction Adhesion Molecule
AK	Antikörper	KD	Knockdown
ap	apikal	(k)Da	(kilo)Dalton
AS	Aminosäuren	L	Leucin
bl	basolateral	LB	lysogeny broth
Bp	Basenpaare	LCC-PK1	Lilly laboratory culture, porcine kidney 1
BSA	Bovines Serum-Albumin	MDCK	Madin Darby Canine Kidney
C	Cystein	miRNA	microRNA
cDNA	Desoxyribonuklein-säure	OAP	OSP-interacting protein
CPE-R2	Clostridium perfringens enterotoxin receptor-2	OSP	Oligodendrocyte specific protein
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid	PBS	Phosphate Buffered Saline
ddNTP	2',3' Di-Desoxy-Nukleosid 5'-triphosphat	PBST	Phosphate Buffered Saline/Tween
DNA	Desoxyribonucleinacid	PCR	Polymerase-chain-reaction
dNTP	2' Desoxy-Nukleosid 5'-triphosphat	PDZ	Postsynaptic density 95/Discs large/Zonula-occludens-1
E _{bl-ap}	Potentialdifferenz	pH	pondus Hydrogenii
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	P _x	Permeabilität des Ions X
F	Faraday-Konstante	P _x /P _z	Verhältnis der Permeabilität des Ions X zu der des Ions Z
FHHNC	Familiäre Hereditäre Hypomagnesiämie und Nephrocalcinose	R	allgemeine Gastkonstante
FLAG	Specific polypeptide protein tag	R	Widerstand
G	Leitfähigkeit	RNA	Ribonucleinacid
G	Glycin	ROMK	Renal Outer Medullary Potassium channel
GFP	Green Fluorescence Protein	rpm	Umdrehungen pro Minute
GUK	guanylate kinase-like	RT	Raumtemperatur
HA	Hämagglutinin	RT-PCR	Realtime-PCR

RVP-1	Rat ventral prostate-1 protein	TM4 SF	tetraspanin super family
SDS	sodium dodecyl sulfate	TSR	template suppression reagent
snRNA	small nuclear RNA	W	Tryptophan
SOC/B	Super Optimal Broth	WT	Wildtyp
T	Temperatur	YFP	Yellow Fluoreszenz Protein
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer	z	Wertigkeit
T/tAL	Thick/thin ascending loop	ZO-1	Zonula occludentes-1
TJ	Tight Junction		

Einleitung

Das Interesse dieser Forschungsarbeit galt einer Gruppe von Membranproteinen in der Niere. Es handelt sich dabei um Transmembranproteine, die den Zellzwischenraum der Tubuluszellen im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife gestalten. Sie werden zu den Tight Junction-Proteinen gezählt, innerhalb derer sie der Familie der Claudine zugerechnet werden. Für das Verständnis der Experimente und deren Ergebnisse ist eine detaillierte Kenntnis der Niere und deren Aufbau und Funktion innerhalb des menschlichen Körpers wichtig. Deshalb werde ich in der Einleitung von der Makroebene, der Niere im Kontext des Körpers, zur Mikroebene, den Claudinen in der Henle-Schleife, führen. In der Diskussion werde ich diesen Weg in umgekehrter Richtung beschreiten, so dass ich vom Fokus auf die Claudine wieder zum Weitblick auf die Niere gelange.

Die Niere

Die Funktion der Niere

Zu den wichtigsten Aufgaben der Nieren zählen: (i) die Ausscheidung der Stoffwechselendprodukte, (ii) die Kontrolle über Volumen und Zusammensetzung der Körperflüssigkeiten sowie die Blutdruckregulation, und (iii) die Bildung wichtiger Endokrine und Hormone.

Die Niere nutzt dabei verschiedene Prinzipien: die Filtration bzw. Ultrafiltration, die Sekretion und die Resorption^a. Filtration bezeichnet den Transport von Lösungsmittel wie z.B. Wasser und Teilchen durch einen Filter aufgrund von hydrostatischen und kolloidosmotischen Druckgradienten. Bei den Nieren spricht man von Ultrafiltration, weil die Porengröße der Filterschicht sehr klein ist und dadurch große gelöste Moleküle zurückgehalten werden.¹⁰

Die Resorption, also Aufnahme oder Wiederaufnahme, kann sowohl passiv als auch aktiv erfolgen. Bei der passiven Resorption gelangen die Stoffe von Orten hoher, zu solchen niedrigerer Konzentration. Wenn dieses Konzentrationsgefälle jedoch in umgekehrte Richtung verläuft, wie der Transport erfolgen soll, können die Stoffe nur durch aktive, d.h. Energie verbrauchende Resorption aufgenommen werden.

Die Sekretion kann ebenfalls passiv entlang eines Konzentrationsgradienten über Kanäle, oder aktiv über Transporter erfolgen.

^a Die Begriffe Sekretion und Resorption kommen aus dem Lateinischen: „secernere = absondern“ sowie „resorbere = aufsaugen“.

(i) Die Ausscheidung von Endprodukten wie Harnstoff, Harnsäure, Kreatinin etc. erfolgt mittels glomerulärer Ultrafiltration und aktiver tubulärer Sekretion. Letztlich entscheidend für die Ausscheidung der Stoffe aus dem Körper ist jedoch die gezielt ausbleibende Resorption im Tubulussystem.

(ii) Die Regulation und Kontrolle über das extrazelluläre Flüssigkeitsvolumen, die Osmolalität der Körperflüssigkeiten und deren Elektrolyt- und Wasserstoffionenkonzentration (pH) erfolgt über Sekretion und Resorption entlang des Tubulussystems.

(iii) Die Regulationsfunktion wird auch über die Produktion von Renin und dem folgenden Renin-Angiotensin- und Aldosteron-Mechanismus unterstützt. Außerdem wird in der Niere das 1,25 Dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol) und in den peritubulären Endothelzellen der Nierengefäße das Glykoprotein Erythropoetin gebildet. Calcitriol ist wichtig für die Regulation des Kalzium-Stoffwechsels und des Knochenwachstums. Erythropoetin ist ein Wachstumsfaktor für Erythrozyten.

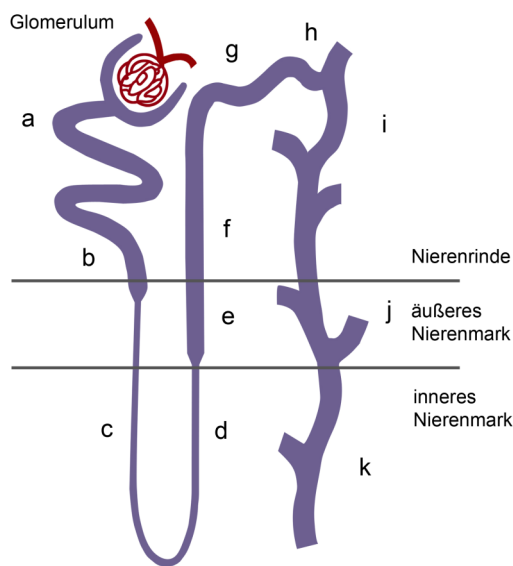
Der Aufbau der Niere

Jede Niere ist aus ca. 1 Millionen Nephronen aufgebaut, den funktionellen Einheiten. Ein Nephron besteht aus einem Glomerulus und einem Abführsystem aus unterschiedlich aufgebauten Tubuli. Diese können unterteilt werden in den proximalen Tubulus, die Henle-Schleife, den distalen Tubulus und schließlich das Sammelrohr.

Der Glomerulus ist ein Kapillarnetz gebildet aus Gefäßschlingen des Vas afferens, das schließlich in das Vas efferens übergeht. Dieses Kapillarknäuel wird vom viszeralen Blatt der Bowmankapsel umschlossen.

Hier erfolgt die Filtration des Blutes: Wasser und alle niedermolekularen Substanzen (Molekulargewicht bis 69 kDa) können die Filtermembran bestehend aus (a) den fenestrierten Endothelzellen, (b) der netto negativ geladenen Basalmembran und (c) dem Schlitzdiaphragma der Podozytenfußfortsätze, passieren. Proteine werden so in Abhängigkeit ihrer Größe und ihrer Ladung filtriert. Dieses als Primärharn bezeichnete Glomerulusfiltrat gelangt über den proximalen Tubulus, die Henle-Schleife und den distalen Tubulus ins Sammelrohr.

Die Sammelrohre mehrerer Nephrone vereinigen sich zu gemeinsamen größeren Sammelrohren. Diese befinden sich im Nierenmark und bilden die renalen Pyramiden, deren Enden in die Nierenkelche ragen. Die Nierenkelche vereinen sich im Nierenbecken, das über die Harnleiter mit der Harnblase in Verbindung steht. Während der Passage durch die verschiedenen Nierensegmente verändert der Harn stetig seine Zusammensetzung und Osmolarität.

**Abbildung 1-1****Aufbau eines Nephrons.**

Dargestellt sind der proximale Tubulus mit dem **(a)** Pars convolutus und dem **(b)** Pars rectus, die Henle-Schleife mit dem **(c)** Pars descendens, dem **(d)** dünnen aufsteigenden Ast und dem **(e)** dicken aufsteigenden Ast, sowie der distale Tubulus mit dem **(f)** Pars rectus und dem **(g)** Pars convolutus und schließlich der Verbindungstubulus mit dem **(i,j)** Sammelrohr und dem **(k)** Ductus papillaris.

Im proximalen Tubulus werden 60% des Ultrafiltrats resorbiert. Die Resorption fast aller frei filterbaren Stoffe wird zu Beginn des proximalen Tubulus direkt an die des Natriums gekoppelt. Dabei erfolgt die Resorption vor allem transzellulär über verschiedene Anti- und Symporter. Das entstehende lumenegative Potential dient als Triebkraft für die noch geringe parazelluläre Resorption von Chlorid. Durch die Resorption all dieser gelösten Stoffe entsteht ein osmotischer Gradient, der zur Wasserresorption führt. Die Wasserresorption und die geringe Chloridresorption führen zum Anstieg der luminalen Chloridkonzentration. Dieser Konzentrationsgradient dient im folgenden Abschnitt als Triebkraft für eine gesteigerte parazelluläre Chlorid-Diffusion. Spätproximal entsteht dadurch ein lumenpositives transepitheliales Potential, das als Triebkraft für die parazelluläre Resorption von Na^+ und anderen Ionen wie K^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} dient. Gleichzeitig werden Na^+ und Cl^- weiterhin aktiv mittels Antiporter resorbiert. Am Ende des proximalen Tubulus sind etwa 60% des filtrierte Na^+ und etwa 50% des filtrierte Cl^- wieder aufgenommen. In der Henle-Schleife werden Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} und NH_4^+ aktiv und teilweise passiv resorbiert. Ziel ist der Aufbau eines osmotischen Gradienten zur Konzentrierung des Urins. Es werden bis zu 90% des freien Wassers resorbiert. Auf die Funktion der Henle-Schleife werde ich weiter unten genauer eingehen.

Im distalen Tubulus ist der transepitheliale chemische Gradient klein. Natriumchlorid wird hier über einen Symporter resorbiert. Die Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Resorption erfolgt Parathormon-abhängig transzellulär. Ein kurzes Segment im vorderen Bereich des distalen Tubulus am Gefäßpol zwischen Vas afferens und efferens gelegen, beherbergt die Zellen der Macula densa. Dieser juxtaglomeruläre Komplex kontrolliert über ein Feedback-System die glomeruläre Filtration und reguliert die Reninsekretion sowie die tubuläre Resorption.

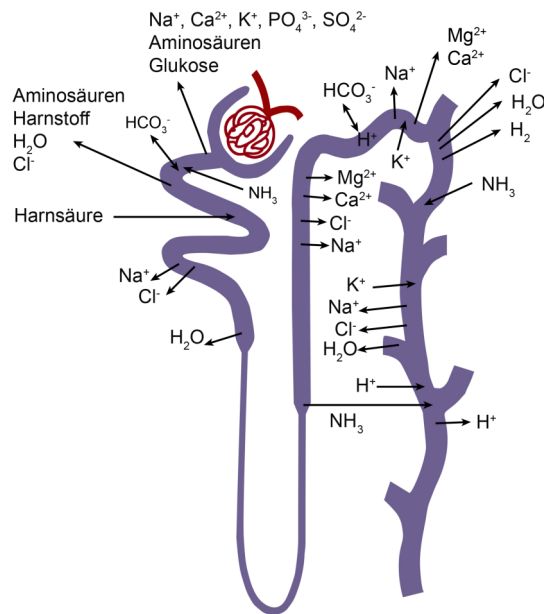


Abbildung 1-2
Die Resorptions- und Sekretionsvorgänge entlang des Nephrons.

Im Sammelrohr erfolgt die endgültige Einstellung des auszuscheidenden Harnvolumens durch transzelluläre ADH-abhängige H_2O -Resorption und Aldosteron-abhängige Natrium-Resorption. Gleichzeitig wird hier der Urin pH-Wert durch H^+ -Elimination reguliert.

Die Henle-Schleife

Die Henle-Schleife bezeichnet den Tubulus-Abschnitt zwischen dem proximalen und distalen Tubulus. Zwei unterschiedlich aufgebaute Henle-Schleifen kommen in der Niere vor. Die kortikalen Nephronen weisen kurze, die juxtamedullären Nephronen d.h. im inneren Drittel der Nierenrinde sich befindende, lange Henle-Schleifen auf. Charakteristisch sind der Haarnadel-förmigen Verlauf dieses Nierensegmentes sowie der wechselnde Durchmesser des Tubulus. Die Henle-Schleife im absteigenden Ast hat einen kleinen Durchmesser, im aufsteigenden Ast bis zum Beginn des distalen Tubulus einen deutlich größeren Durchmesser. Nur bei den juxtamedullären Nephronen, d.h. den langen Henle-Schleifen besitzt der erste Abschnitt des aufsteigenden Astes auch einen kleinen Durchmesser und wird auch als *thin ascending limb of henle's Loop* (tAL) bezeichnet. Den Bereich mit einem größeren Durchmesser bezeichnet man als dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife, *thick ascending limb of Henle's Loop* (TAL). Mit Hilfe des Elektronenmikroskops kann man zwei unterschiedliche Zellpopulationen in diesem Abschnitt differenzieren: die R-Zellen (*rough-surfaced*) mit einer rauen Oberfläche mit prominenten Mikrovilli und die S-Zellen (*smooth-surfaced*) mit glatter Oberfläche. R-Zellen kommen vermehrt in der Rinde, S-Zellen im Nierenmark vor.¹¹

Um die Funktion der Henle-Schleife zu verstehen, muss man sich die parallele Ausrichtung des absteigenden und aufsteigenden Astes der Henle-Schleife, der Sammelrohre sowie der absteigenden und aufsteigenden Gefäße vergegenwärtigen.

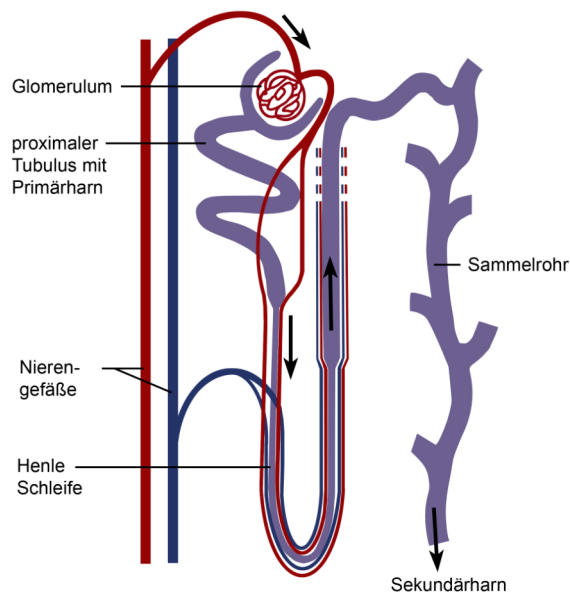


Abbildung 1-3
Der Gefäßverlauf
innerhalb eines Nephrons.

In dieser Abbildung ist der parallele Verlauf der Gefäße entlang eines Nephrons dargestellt. Die Venen sind blau, die Arterien rot markiert.

Der absteigende Ast ist hochpermeabel für Wasser und weniger permeabel für gelöste Substanzen. Die Osmolalität der Tubulusflüssigkeit nimmt bis zur Scheitelspitze der Henle-Schleife von etwa 300 mosm/kg bis auf 1200 mosm/kg zu. 20% des Primärharns wird hier resorbiert. Die Osmolalität des Nierengewebes nimmt also von der Nierenrinde über das äußere Mark zum inneren Mark und den Papillenspitzen hin zu. Der Harn passiert dadurch Zonen zunehmender Osmolalität. Dieser intrarenale osmotische Gradient wird durch zwei Mechanismen ermöglicht: zum einen durch die Resorption von NaCl im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und zum anderen durch die Resorption von Harnstoff aus den medullären und papillären Sammelrohren. Der Harnstoff diffundiert aus dem selektiv permeablen Sammelrohr in den dünnen Ast der Henle-Schleife und zirkuliert über den distalen Tubulus zurück ins Sammelrohr. Fundamental ist hierbei die parallele Anordnung der anatomischen Strukturen.

Die im Interstitium entstehende Osmolalität von 1200 mosmol/kg dient als Triebkraft für die Wasserresorption aus den Sammelrohren und dadurch der Harnkonzentrierung, der die Niere hyperosmolal und konzentriert verlässt. Aufgrund der stets gegenläufigen Flussrichtung zweier benachbarter Bereiche bezeichnet man diesen Mechanismus auch als Gegenstromprinzip (Abbildung 1-4). Im dünnen und dicken aufsteigenden Ast trifft die hyperosmolale Tubulusflüssigkeit auf ein für Wasser impermeables Epithel. Im dünnen Ast werden Cl⁻-Ionen aktiv aus dem Tubuluslumen transportiert, während Na⁺-Ionen primär parazellulär resorbiert

werden.^{12,13} Die Osmolalität der Tubulusflüssigkeit nimmt dadurch stetig ab. Da das Blut in den Vasa recta sehr langsam fließt, wird der Abtransport des resorbierten NaCl verzögert. Es reichert sich im Interstitium zwischen den Ästen der Henle-Schleife an. Die resultierende hohe extrazelluläre Salzkonzentration führt zu einer vermehrten Wasserdiffusion aus dem absteigenden Ast der Henle-Schleife.

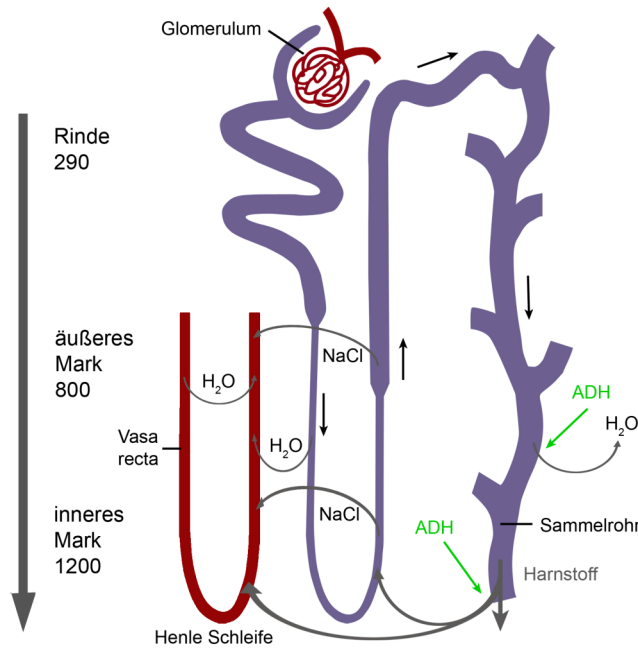


Abbildung 1-4
Das Gegenstromprinzip

Die Wasserresorption ist durch halbrunde Pfeile gekennzeichnet, die Resorption von NaCl durch geschwungene Pfeile. Die Prozesse unter ADH-Kontrolle sind durch grüne Pfeile markiert. Der linke äußere Pfeil zeigt die Veränderung der Osmolalität von der Rinde zum inneren Mark in mosmol/kg H₂O.

Der dicke aufsteigende Ast der Henle-Schleife hat einen besonders niedrigen transepithelialen Widerstand (11-34Ωcm²). Hier besteht eine hohe parazelluläre Permeabilität für mono- und divalente Kationen (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺).¹⁴ Als Triebkraft für diesen passiven parazellulären Transport dient das Lumen-positive transepitheliale Potential. Dieses wird durch einen aktiven NaCl-Transport über den apikal vorhanden NKCC2-Cotransporter und den Rücktransport von K⁺ ins Lumen durch den K-Kanal ROMK aufgebaut (Abbildung 1-5).¹⁵

Zwischen den Zellen befinden sich die Tight Junctions (TJ). Das sind Protein-Protein-Verbindungen von benachbarten Zellen. Diese Transmembranproteine gestalten den parazellulären Weg. Es konnte beobachtet werden, dass Mutationen in den TJ Proteinen Claudin-16 und Claudin-19 zu einer familiären Hypomagnesämie mit Hypercalciurie und Nephrocalcinose (FHHNC) führen.^{16,17}

Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass spezifische TJ Proteine an dem parazellulären Rücktransport von divalenten Kationen im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife beteiligt sind. Betrachten wir nun diese Tight Junction Proteine genauer.

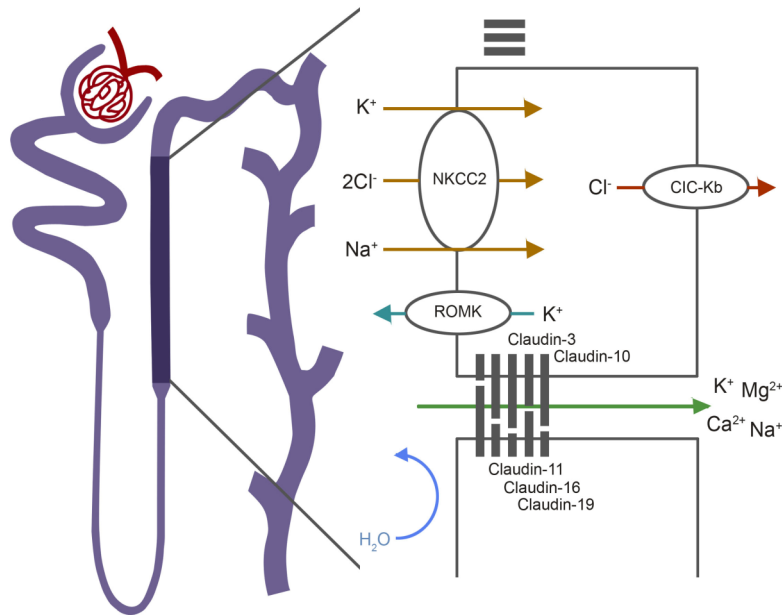


Abbildung 1-5
Transportwege im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife

Der Ausschnitt vergrößert zwei Zellen und deren Interzellularrast im Bereich des dicken aufsteigenden Astes der Henle Schleife. NKCC2: Natrium, Kalium, 2 Chlorid-Transporter; ROMK: Kaliumkanal an der apikalen Membran; ClC-Kb: Chloridkanal an der basolateralen Membran.

Die Tight Junctions

Die Tight Junctions, im Deutschen auch als Schlussleisten bezeichnet, befinden sich im apikalen Teil der lateralen Zellmembran in Epithel- oder Endothelzellen.

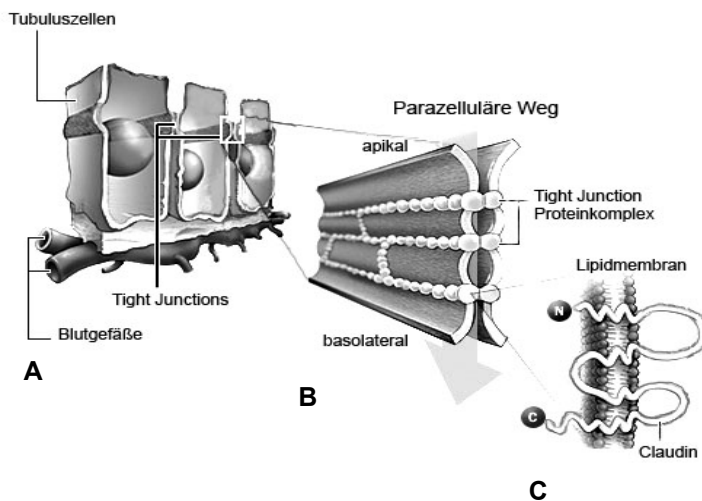


Abbildung 1-6
Struktur der Tight Junctions.

(A) Zu Erkennen ist ein einreihiges Epithel mit Blutgefäßen. Der Membranbereich der Tight Junctions sind dunkelgrau markiert. Der vergrößerte Ausschnitt (B) zeigt die einzelnen Tight Junction Proteinkomplexe, die die benachbarten Membranen durchziehen. Der letzte vergrößerte Ausschnitt (C) stellt ein Claudin dar, das in der Lipidmembran verankert ist, wobei die beiden extrazellulären Schleifen in den Interzellularrast ragen. [modifiziert nach: www.nastech.com/img/img_junction_structure.jpg]

Im Elektronenmikroskop können Tight Junctions als Netzwerke sich verzweigender Einzelstränge beobachtet werden.¹⁸ Sie dienen als Kontaktpunkte zweier benachbarter Zellen und führen zu einer schwächer oder stärker ausgeprägten Abdichtung des Interzellularrastes. Dabei können sie als Diffusionsbarriere für den Transport von Elektrolyten und Wasser dienen, aber auch eine Permeabilität für bestimmte Ionen und gelöste Stoffe induzieren.¹⁹ In der

Zellmembran beeinflussen sie nicht nur den Zellzwischenraum, sondern führen auch zum Erhalt der Zellpolarität.

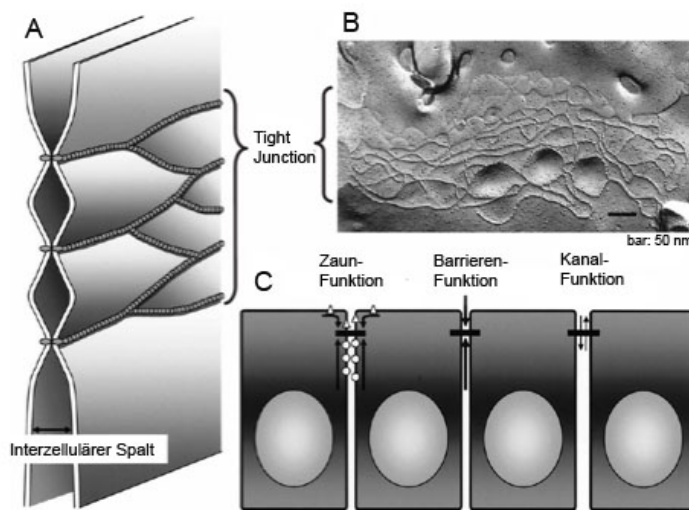


Abbildung 1-7
Funktionen der Tight Junction und freeze-fracture Aufnahme.

(A) Schematische Darstellung zweier benachbarter durch Tight Junctions verbundenen Membranen;
(B) Freeze-fracture Aufnahme mit netz- und fadenförmigen Tight Junctions;
(C) vereinfachte Darstellung der unterschiedlichen Funktionen von Tight Junctions. [modifiziert nach⁶]

Die ‚Zellpolarität‘ definiert man in Bezug auf die Oberfläche des Epitheliums oder der Basalmembran. Der apikale Pol der Zelle ist gegen das äußere, der basolaterale gegen das innere Milieu gerichtet. Die Seitenflächen grenzen an die Nachbarzellen. Außerdem bedeutet ‚Zellpolarität‘ eine für jede Zelle charakteristische Verteilung von Enzymen, Zellorganellen im Zytoplasma und Membranproteinen. Die Tight Junction verhindern die freie Bewegung von Membrankomponenten zwischen apikaler und basolateraler Zellmembran. Diese Aufgabe wird auch als Zaunfunktion bezeichnet.

Die Tight Junction ist eine supramolekulare Struktur verschiedener membranständiger Proteine sowie deren intrazellulären Adapterproteine. Die bekanntesten Vertreter dieser Membranproteine sind Occludin²⁰, *Junctional adhesion molecules* (JAM)²¹, die Familie der Claudine²² und Tricellulin.²³

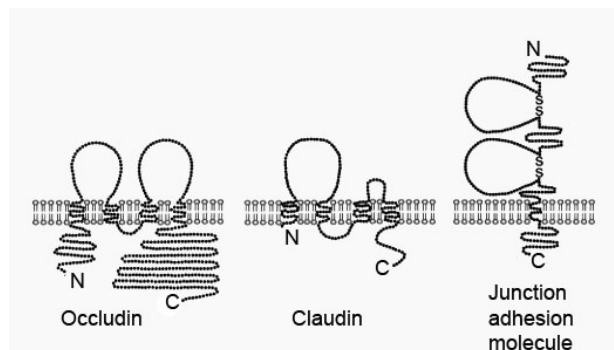


Abbildung 1-8
Schematische Darstellung der Transmembranproteine.

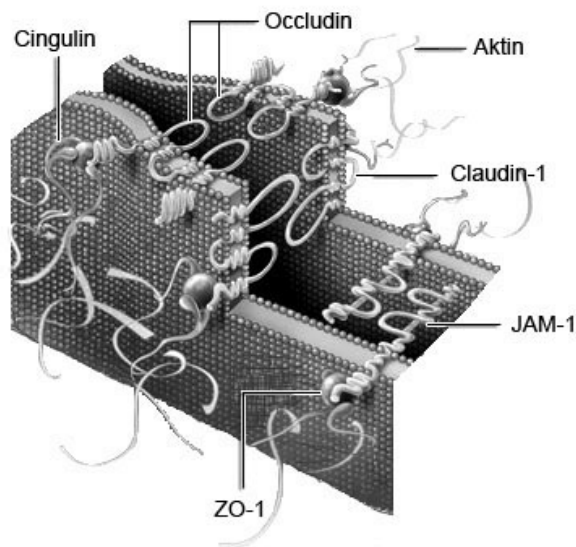
Die sehr ähnlichen Membranproteine Occludin und Claudin mit zwei extrazellulären Schleifen und intrazellulärem N- und C-Terminus. Und die Junction adhesion Moleküle mit zwei extrazellulären Schleifen, N-Terminus und einem intrazellulären C-Terminus. [modifiziert nach⁹]

Früher wurde angenommen, dass die Tight Junctions ausschließlich durch Occludinproteine gebildet werden.^{24,25} Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass Sertoli- und Endothelzellen

auch ohne Occludin Tight Junctions bilden können.²⁶ Auch Occludin-defiziente embryonale Stammzellen konnten sich zu polarisierten Epithelien mit unauffälligen TJ entwickeln.⁹ Daraus lässt sich folgern, dass Occludin zum Aufbau einer Tight Junction nicht unbedingt notwendig ist. Auch die Variabilität der Permeabilitäten unterschiedlicher Epithelien konnte nur ungenügend mit der Variation eines einzigen Moleküls erklärt werden.²⁷ Neuere Untersuchungen zeigen vielmehr, dass je nach den Anforderungen des jeweiligen Epithels die Zusammensetzung der Tight Junctions Proteine variiert.¹⁹

Die Familie der Claudine

Der Name ‚Claudin‘ entspringt dem lateinischen Verb für „schließen – claudere“²² und bezeichnet eine Familie von Tight Junction Proteinen. Mit ihrer Entdeckung begann eine systematische Charakterisierung der einzelnen Mitglieder. Insgesamt sind bei Warmblütern bisher 24 Claudine bekannt. Es handelt sich bei den Claudinen um Membranproteine mit einem Molekulargewicht zwischen 20 und 27 kDa. Sie weisen vier Transmembrandomänen sowie zwei extrazelluläre und eine intrazelluläre Schleife auf. Der kürzere N-Terminus und der längere C-Terminus befinden sich im Zytoplasma. Am C-Terminus konnte das PDZ-Bindemotiv (Postsynaptic density 95/Discs large/Zonulaoccludens-1) identifiziert werden.²⁸ Über das PDZ-Bindemotiv können die Claudine an ZO-1^{28,29}, den wichtigsten Vertreter der Zonula Occludens (ZO)-Proteine, binden und so am Aktin-Zytoskelett der Zelle verankert werden.¹³ Über dieselbe Bindungsdomäne erfolgt auch eine Bindung an JAM, sowie über eine Guanylat-Kinase (GUK)-Domäne an Occludin.^{30,31} Das PDZ-Bindemotiv erlaubt nicht nur Interaktionen mit dem Zytoskelett, sondern erhöht auch die Verweildauer der Claudine in der Zellmembran, wie am Beispiel einer natürlich vorkommenden humanen Claudin-16 Mutation gezeigt werden konnte.³² Allen Claudin-Mitgliedern gemein ist ein stark konserviertes Aminosäuremotiv in der ersten extrazellulären Schleife ‚W-GLW-C-C‘. Dieser Code steht für die Aminosäuren Tryptophan (W), Glycin (G), Cystein (C) und Leucin (L). Die extrazellulären Schleifen sind essentielle Kontaktpunkte für die Bildung der Tight Junctions.³³ Einige Claudine können nicht nur mit identischen Claudinen der gegenüberliegenden Zellmembran, also auf homophile Weise, über ihre extrazellulären Schleifen Kontakte bilden, sondern auch in Form von heterophilen Verbindungen wie zum Beispiel zwischen Claudin-1 und Claudin-3. Es sind jedoch nicht alle denkbaren Kombinationen möglich, so gibt es zum Beispiel keine Interaktion von Claudin-1/Claudin-2.³⁴

**Abbildung 1-9**

Der Interzellularspalt mit den interagierenden Transmembranproteinen.

Dargestellt sind die unterschiedlichen Tight Junction Proteine im Interzellularspalt. Eine Interaktion zwischen den Proteinen erfolgt wahrscheinlich über ihre Extrazellulärschleifen. Gleichzeitig wird die Verankerung der Transmembranproteine im Zytoskelett hier durch ZO-1 und Cingulin verdeutlicht.

[modifiziert nach:

www.nastech.com/img/img_tight_junction.jpg]

Die Claudin-Zusammensetzung der TJs bestimmt die Permeabilität des jeweiligen Epithels.³⁵ Einige Claudine sind spezifisch für bestimmte Gewebe wie zum Beispiel Claudin-16 für den aufsteigenden Teil der Henle-Schleife.¹⁶ Andere kommen in vielen verschiedenen Geweben vor und ermöglichen durch ihre Interaktion untereinander die für dieses Gewebe spezifische Tight Junction Struktur.

Die Namensgebung (s.o.) entstand durch die in den ersten Jahren identifizierten Proteine mit abdichtender Funktion. Zu diesen zählt sowohl Claudin-1³⁶, Claudin-4³⁷ als auch Claudin-5³⁸. In den folgenden Jahren zeigte sich jedoch, dass die Modulation der Permeabilität nicht nur durch eine verminderte Expression dieser abdichtenden Claudine³⁹ möglich ist, sondern auch durch vermehrte Expression porenbildender Claudine, die den parazellulären Transport von Anionen oder Kationen ermöglichen.

Claudin-2 exprimierende hochohmige Hundenieren-Zellen (Madin-Darby Canine Kidney, MDCK C7), die endogen keine Claudin-2 Expression aufwiesen, zeigten eine Erhöhung der Permeabilität der Tight Junctions und eine Erniedrigung des transepithelialen Widerstandes⁴⁰, also eine Konversion von einem dichten zu einem durchlässigen Epithel. Untersuchungen konnten weiter spezifizieren, dass die von Claudin-2 gebildeten parazellulären Poren selektiv für kleine Kationen sind.⁴¹

Diese Erkenntnisse unterstreichen die wichtige Rolle der Claudine bei der Barriere- und Kanalfunktion der Tight Junction.²⁷ Für Occludin wird derzeit eine regulative Funktion innerhalb der Tight Junctions angenommen.⁴² Unterschiedlich zeigt sich auch das Expressionsmuster von Occludin und den Claudinen. Occludin wird in fast allen Geweben exprimiert, die einzelnen Claudine hingegen treten sehr gewebsspezifisch auf. Wie oben beschrieben, besteht die Niere

aus Segmenten mit unterschiedlichen Funktionen: Im späten proximalen Tubulus wird etwa die Hälfte des filtrierte NaCl parazellulär resorbiert.⁴³ In der Henle-Schleife erfolgt die Resorption etwa eines Fünftels des filtrierte NaCl. Im distalen Tubulus und dem Sammelrohr entsteht durch den hormonregulierten aktiven Transport ein hoher transepithelialer Ionenkonzentrationsgradient. Die Rolle der Tight junctions besteht hier darin die Zell-Zell-Kontakte so abzudichten, dass kein parazellulärer Transport mehr möglich ist und dadurch der Gradient aufrecht gehalten werden kann. Diese unterschiedlichen Permeabilitäten entlang des Tubulussystems korrelieren mit der Expression von verschiedenen Claudinen und werden wahrscheinlich durch diese bestimmt.

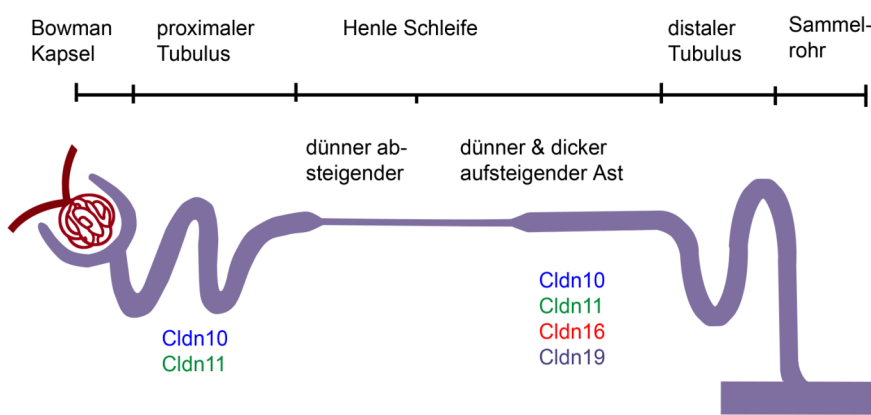


Abbildung 1-10
Verteilung der untersuchten Claudine entlang des Nephrons

Im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife konnten folgende Claudine identifiziert werden: Claudin-10, -11, -16 und -19. Claudin-16 und -19 kommen dort ubiquitär vor. Claudin-10 und -11 konnten außerdem im proximalen Tubulus nachgewiesen werden.

Alle Claudine außer Claudin-6, -9, -13 und -14 wurden im murinen Nierengesamtextrakt durch eine Northern Blot-Analyse isoliert.⁴⁴ Claudin-1 und -2 in der Bowman Kapsel, Claudin-2, -10 und -11 im proximalen Tubulus, Claudin-3, -7, -8 und -16 konnten im distalen nachgewiesen werden.^{16,44,45} Claudin-2, -3, -4 und -8 im dünnen aufsteigenden Ast der Henle-Schleife und Claudin-3, -10, -11, -16 und -19 im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife sowie Claudin-1, -3, -4, -8, -10 im Sammelrohr.^{12,16,17,35,44}

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der elektrophysiologischen Charakterisierung der Claudine des dicken aufsteigenden Astes der Henle-Schleife. Dieser Abschnitt der Henle-Schleife ist besonders wichtig für die Resorption von essentiellen Ionen wie Na^+ und Cl^- , sowie Mg^{2+} oder Ca^{2+} und damit nicht nur für die Blutdruckkontrolle, sondern insgesamt für die Regulation der Körperflüssigkeiten (Volumen und Zusammensetzung). Im Folgenden werden die Claudine, die für diese Arbeit wichtig sind, genauer dargestellt.

Die untersuchten Claudine

Claudin-3

Ursprünglich wurde Claudin-3 als „rat ventral prostate-1 protein“ (RVP-1) oder als „Clostridium perfringens enterotoxin receptor-2“ (CPE-R 2) bezeichnet, bis es als Mitglied der Claudin-Familie erkannt und mit der Nummer drei versehen wurde.⁴⁶ Claudin-3 wird in vielen Geweben exprimiert z.B. in der Lunge, der Leber, der Niere und dem Hoden⁴⁷ und ist schon während der menschlichen Entwicklung in einigen Geweben nachweisbar. In der Niere wird es wie oben erwähnt im dicken und dünnen aufsteigenden Ast der Henle-Schleife, im distalen Tubulus und im Sammelrohr exprimiert.^{44,48} Claudin-3 weist auch vier Transmembrandomänen auf und kann kolokalisiert werden mit ZO-1. Stabil transfiziert in MDCK I-Zellen führt es im Gegensatz zu Claudin-2 oder Claudin-4 zu keiner Veränderung des transepithelialen Widerstandes.⁴⁰

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Man unterscheidet zwischen dem dauerhaften Einbau des gewünschten Gens, hier der genetischen Information für das Claudin-3 Protein, in die DNA der Zellen und dem zeitweiligen Einbringen des Plasmids in die Wirtszelle. Erstes wird als „stabil transfiziert“, zweites als „transient transfiziert“ bezeichnet.

Weitere Untersuchungen zeigten, das Claudin-3 mit Claudin-1, Claudin-2³⁴ und Claudin-5 Interaktionen eingehen kann, jedoch nicht mit Claudin-4. Claudine, die mit Claudin-3 interagieren konnten, konnten dies nicht mit Claudin-4. Es konnte gezeigt werden, dass der Austausch einer Aminosäure in der ersten extrazellulären Domäne für dieses Verhalten verantwortlich war.⁴⁹ Bisher wird die Expression von Claudin-3 mit verschiedenen Neoplasien in Verbindung gebracht.⁵⁰ Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Minderperfusion der Niere zu vermehrter Claudin-3 mRNA führt.³⁹

In der vorliegenden Arbeit wurden stabil transfizierte Zellklone verwendet, die das jeweilige Claudin stets überexprimierten. Claudin-3 wurde nicht stabil transfiziert, da es endogen von der verwendeten Zelllinie (MDCK C7) exprimiert wird. Es kann davon ausgegangen werden, dass die transfizierten Claudine nicht nur auf homophile Weise interagieren können, sondern auch auf heterophile Weise mit den endogen exprimierten Claudinen, also auch Claudin-3. Die Claudine des Hundes weisen zu 95% Homologie zu den humanen Claudinen auf. Eine Interaktion ist dadurch wahrscheinlich.

Claudin-10

Claudin-10 konnte in den Tight Junction von Endothelzellen der Vasa recta, Blutgefäßen der Niere, gemeinsam mit Claudin-15 nachgewiesen werden, sowie in den azinären Zellen exokriner Drüsen wie dem Pankreas, den Speichel- und Tränendrüsen und im Dünndarm, dort besonders im Epithel der Krypten.⁵¹ Außerdem konnte man Claudin-10 im Gehirn⁴⁷, der Niere, der Lunge und dem Uterus nachweisen.

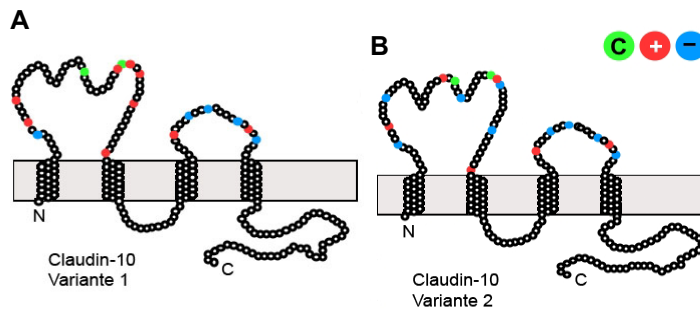


Abbildung 1-11

Claudin-10 Variante 1 und Variante 2.

Die hellblau gekennzeichneten Aminosäuren (AS) sind negativ geladen, die rot gekennzeichneten positiv. Man erkennt deutlich, dass diese beiden Varianten sich in der ersten extrazellulären Schleife unterscheiden. Claudin-10 V.1 (A) besitzt mehr positiv geladenen AS, Variante 2 (B) mehr negativ geladene. Die grün gekennzeichneten AS sind die stark konservierten Cysteine, die in allen Claudinen zu finden sind.

Die Tight Junctions des Dünndarms weisen von den Villi zu den Krypten eine Abnahme in ihrer Komplexität und Anzahl der Stränge auf. Möglicher Weise ist das Epithel der Krypten permeabler als das der Villi.⁵² Die genaue Funktion von Claudin-10 in diesem Bereich ist nicht bekannt. Außerdem konnte Claudin-10 in der basalen Membran von Epithelzellen des Epididymis identifiziert werden.⁵³ Zudem wurde Claudin-10 in der Niere im proximalen Tubulus, im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife und im Sammelrohr gefunden.^{52,54} Inai et al. detektierten Claudin-10 zusätzlich im distalen Tubulus.⁵¹ Die letztgenannten Forschergruppen unterschieden jedoch nicht zwischen den beiden natürlich vorkommenden Isoformen des Claudin-10. Es gibt zwei unterschiedliche Spleißvarianten 10 Variante 1 und V.2 (Abbildung 1-11). Diese Varianten entstehen durch alternatives Spleißen. Spleißen bezeichnet einen Schritt der Ribonukleinsäure (RNA)-Prozessierung auf dem Weg zum Protein: aus der prä-RNA entsteht die reife messenger-RNA (mRNA). Die prä-RNA besteht aus Exons, codierenden Bereichen und Introns, nicht-codierenden Bereichen. Durch das Spleißen werden die Introns entfernt und die angrenzenden Exons miteinander verbunden. Durch alternatives Spleißen, d.h. Überspringen eines Exons, entstehen unterschiedliche Spleißvarianten.

Die Claudin-10 Spleißvarianten weichen in ihrem ersten Exon voneinander ab und kodieren Proteine (Abbildung 1-12), die sich vom N-Terminus begonnen bis zu den letzten sieben Aminosäuren der zweiten extrazellulären Schleife unterscheiden.⁵⁴ Das erste Exon der zweiten Variante ist sechs Basenpaare länger als das der ersten, das Protein ist also zwei Aminosäuren länger. Neben dieser Längendifferenz findet man unterschiedlich geladene erste extrazelluläre

Schleifen. Claudin-10 V.1 weist sieben positiv und zwei (murin) bzw. eine (human) negativ geladene Aminosäure auf. Dagegen befinden sich im Claudin-10 V.2 vier positiv und fünf negativ geladene Aminosäuren in der ersten extrazellulären Schleife (Abbildung 1-11).

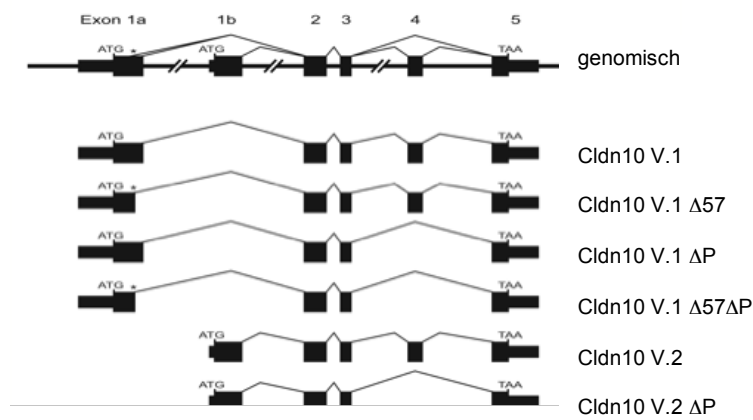


Abbildung 1-12
Alternative Spleißvarianten

Schematische Darstellung des Claudin-10 Gens und der alternativen Spleißvarianten. Sechs Cldn10 messenger-RNAs wurden in der murinen Niere gefunden, die sich in ihrem ersten Exon (alternativer Spleiß-Bereich in Exon 1a ist mit einem Sternchen* markiert) oder durch den Verlust des vierten Exons unterscheiden. Die genomische Sequenz ist in Form einer Linie dargestellt; Exons: schwarze Rechtecke; ATG: Startcodon; TAA: Stoppcodon.

Claudin-10 V.2 wird in vielen Geweben, besonders im Gehirn, Niere und Lunge exprimiert, wohingegen Claudin-10 V.1 nur in der Niere und im Uterus detektiert werden konnte. Innerhalb der Niere scheint das Expressionsmuster der beiden Isoformen gegensätzlich zu sein: Claudin-10 V.1 vermehrt in den Tubuli der Nierenrinde, 10 V.2 vermehrt in denen des Nierenmarks.

Aufgrund des unterschiedlichen Spleißens weist Claudin-10 V.1 mehr positiv geladene, Variante 2 mehr negativ geladene Aminosäuren in der ersten extrazellulären Schleife auf. Diese entgegen gesetzten Ladeverhältnisse der extrazellulären Domänen lassen den Verdacht aufkommen, dass die beiden Varianten zu unterschiedlichen parazellulären Permeabilitäten führen. Van Itallie et al.⁵⁴ transfizierten beide Isoformen stabil in Kationen-selektive Hundennieren-Zellen (MDCK II) und Anionen-selektive Schweinenieren-Zellen (LLC-PK1) und bestätigten diese Hypothese. Während Claudin-10 V.2, exprimiert in MDCK II-Zellen, zu keinen Veränderungen des Na^+/Cl^- Permeabilitätsverhältnisses führte, erniedrigte Claudin-10 V.1 dieses durch eine verminderte Na^+ - und eine erhöhte Cl^- -Leitfähigkeit. Der transepitheliale Widerstand wurde weder durch die Expression von Claudin-10 V.1, noch durch die der Variante 2 beeinflusst. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der Transfektion in die Anion-selektive LLC-PK1 Zellen. Hier führte die Expression von Claudin-10 V.1 und Variante 2 zu einer Verminderung des transepithelialen Widerstandes. Auch die Permeabilitäten für Na^+ - und Cl^- -Ionen veränderten sich: Claudin-10 V.1 führte zu einer signifikanten Erhöhung der Cl^- -Leitfähigkeit, Claudin-10 V.2 zu einer vermehrten Na^+ -Permeabilität.⁵⁴

Untersuchungen von Punktmutanten der beiden Isoformen unterstützen die oben erwähnte Hypothese, dass die geladenen Bereiche der ersten extrazellulären Domäne die Präferenzen der Tight Junctions beeinflussen. ‚Punktmutation‘ bezeichnet eine Mutation, bei der nur eine

Nukleinbase betroffen ist. Es kann sich dabei um einen Austausch (Substitution), einen Verlust (Deletion) oder einen Zugewinn einer Base handeln. Tritt eine Substitution ein, wird das Leseraster nicht verändert. Aufgrund der Redundanz des genetischen Codes muss es dann nicht unbedingt zum Ablesen einer anderen Aminosäure kommen. Man unterscheidet drei Arten von Substitution: „nonsense“, „missense“ und „silent“. Bei der Letzteren tritt der Fall ein, bei dem keine andere Aminosäure codiert wird. Bei einer nonsense-Mutation kommt es zu einem Abbruch der Translation, bei einer „missense“-Mutation zum Ablesen einer anderen Aminosäure.

Kürzlich konnten im Labor von D. Müller, Charité Berlin vier weitere Varianten aus der murinen Niere identifiziert werden (Abbildung 1-12). Diese unterscheiden sich durch alternatives Spleißen des ersten Exons oder des vierten Exons von den ursprünglichen Varianten, letzteres führt zu einem kompletten Verlust der vierten Transmembranregion. Eine dieser Varianten mit einer Deletion von 57 Basenpaaren am Ende des ersten Exons (Exon 1a) des Claudin-10 wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls transfiziert (Cldn10 V.1Δ57) und die Klone untersucht. Die von Van Itallie beschriebenen Ladungen werden durch diese Variante beeinflusst.⁵⁵

Claudin-11

Claudin-11, früher als Oligodendrozyten spezifisches Protein (OSP) bezeichnet, wurde ursprünglich im murinen Rückenmark entdeckt.⁵⁶ Damals konnte eine Ähnlichkeit zum peripheren Myelin Protein 22 (PMP-22) festgestellt werden.

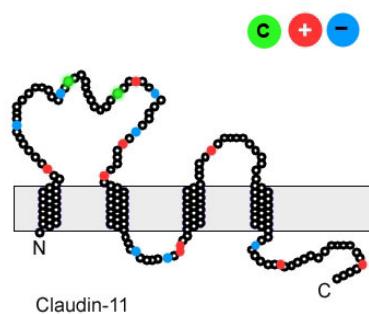


Abbildung 1-13

Claudin-11

Die hellblau gekennzeichneten Aminosäuren (AS) sind negativ geladen, die rot gekennzeichneten positiv. Claudin-11 weist vier negativ geladene AS und vier positiv geladene AS in seiner ersten extrazellulären Schleife auf, die zweite extrazelluläre Schleife zeigt eine positiv geladene AS. Die grün gekennzeichneten AS sind die stark konservierten Cysteine, die in allen Claudinen zu finden sind.

Beide Proteine weisen vier Transmembranregionen auf und sind im Myelin konzentriert.⁵⁷ Mit der Identifizierung der Familie der Claudine wurde auch das OSP aufgrund seiner Homologien und der Fähigkeit Tight Junction zu bilden, in diese aufgenommen.⁵⁸ Zusätzlich wird Claudin-11 im Hoden exprimiert und führt dort zu Tight Junctions zwischen den Sertoli-Zellen.^{58,59} Claudin-11 scheint eine entscheidende Komponente während der Entwicklung der Myelinscheiden des zentralen Nervensystem und der Hoden inne zu haben.^{57,59} Die von Gow et al. untersuchten

Claudin-11-defizienten Mäuse zeigten neurologische und reproduktive Defizite.⁵⁷ Der Verlust der Claudin-11 Expression resultierte im Fehlen der Tight Junction in diesen Geweben. Die Mäuse zeigten eine verlangsamte neuronale Leitungsgeschwindigkeit und Sterilität, letzteres aufgrund abnormer Hodenentwicklung. 2004 konnten Kitajiri und seine Mitarbeiter Claudin-11 auch in den Tight Junction der Basalzellen der Stria vascularis im Innenohr identifizieren.⁶⁰ Das Epithel der Stria vascularis besteht aus einem Zellbilayer, Marginal- und Basalzellen mit jeweils gut entwickelten Tight Junction-Strängen.⁶¹ Die Stria vascularis ermöglicht durch K^+ -Verschiebung von der Perilymphe in die Endolymphe den Aufbau eines endocholearen Potential von +80-90 mV.^{62,63} Die Claudin-11-defizienten Mäusen zeigten in weiteren Experimenten nicht nur die neurologischen und reproduktiven Defizite, sondern auch Defizite in ihrem Hörvermögen. Untersuchungen der Stria vascularis zeigten keine Veränderungen der Marginalzellen, jedoch der Basalzellen. Das Fehlen von Claudin-11 führte hier zum Verlust der Tight Junctions. Interessanter Weise waren die K^+ -Konzentrationen in der Peri- und Endolymphe nicht verändert, der Aufbau des Endocochlearen Potentials jedoch nicht mehr möglich.⁶⁰

In den Sertoli-Zellen, den Oligodendrozyten und den Basalzellen der Stria vascularis konnte nur Claudin-11 als einziges Claudin identifiziert werden. In der Niere, im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife werden neben dem Claudin-11 wie oben beschrieben noch weitere Claudine exprimiert.⁴⁴ Auch im Plexus Choroideus konnte neben Claudin-11, auch Claudin-1 und -2 in den Tight Junctions identifiziert werden.⁶³

Buznikov und Mitarbeiter zeigten, dass Claudin-11 nicht nur mit anderen Claudinen interagieren kann, sondern auch mit zwei OSP-interacting Proteins (OAP1 und 2) über den C-Terminus.⁶⁴ Die OAP 1-cDNA codiert für ein Protein der Tetraspamin Super Familie (TM4SF). Viele TM4SF-Mitglieder werden in Leukozyten exprimiert und assoziieren mit Integrinen und mit einer Vielzahl an Signaltransduktionsproteinen.⁶⁵ Weitere Untersuchungen ergaben, dass Claudin-11 nicht nur mit OAP-1 interagiert, sondern gemeinsam mit OAP-1 und β 1-Integrin einen Komplex in Oligodendrozyten bilden kann.⁵² Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass Claudin-11 auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der Proliferation und Migration der Oligodendrozyten einnimmt.

Mutationen im Claudin-11 Gen sind bisher noch nicht bekannt. Aufgrund der Lokalisation könnte es in das Brachmann-de-Lange Syndrom involviert sein.^{59,66} Außerdem steht es im Verdacht als Autoantigen bei der Entwicklung autoimmun bedingter Demyelinisierungserkrankungen zu dienen wie Multiple Sklerose oder der autoimmunen Enzephalomyelitis.^{59,67,68}

Claudin-16

Claudin-16, auch Paracellin-1 genannt, wird innerhalb der Niere in den Tight Junctions des dicken aufsteigenden Astes der Henle-Schleife und im distalen Tubulus exprimiert.^{69,70} Zudem konnte es auch in Speicheldrüsen⁷¹ und der Milchdrüse⁷² gefunden werden.

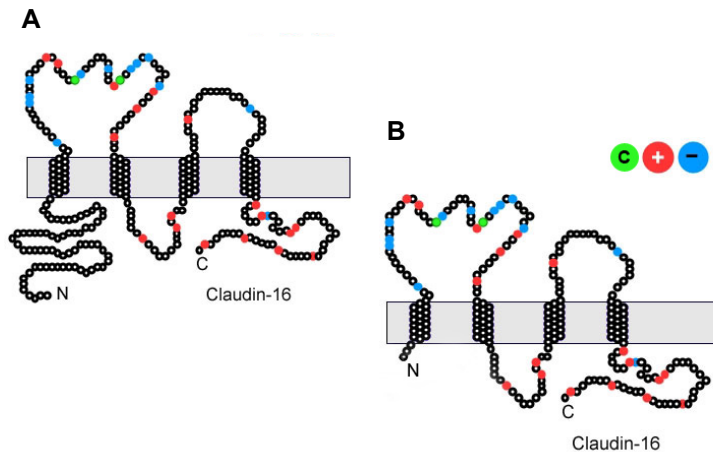


Abbildung 1-14
Claudin-16

Die hellblau gekennzeichneten Aminosäuren (AS) sind negativ geladen, die rot gekennzeichneten sind die stark konservierten Cysteine. **(A)** Version mit langem N-Terminus (73 AS), **(B)** Version mit kurzem N-Terminus (3 AS).

Für das humane Claudin-16 konnten zwei mögliche Startcodons detektiert werden. Es gibt also möglicherweise im Menschen zwei unterschiedliche Formen. Wie in der Abbildung dargestellt konnte eine Version mit einem ungewöhnlich langen N-Terminus von 73 Aminosäuren identifiziert werden, sowohl als auch eine kurze Version mit einem N-Terminus aus 3 Aminosäuren. Dieser Unterschied wird durch ein zweites Startcodon ausgelöst, welches das einzige Startcodon anderer Spezies ist. Ungeklärt ist bisher, welche Version des Claudin-16 die für den Menschen relevante ist. Bisherige Veröffentlichungen konnten nur die kurze Version in den Tight Junction von transfizierten LLC-PK1-Zellen nachweisen.⁷³ Nicht veröffentlichte Lokalisationsuntersuchungen des Labors für Klinische Physiologie, Berlin, zeigen, dass beide Version in transfizierten MDCK C7-Zellen in den Tight Junction anzutreffen sind. Dafür dass sowohl die lange als auch die kurze Version relevant für den Menschen ist, spricht die Tatsache, dass eine Mutation, die die Familiäre Hypomagnesämie mit Hypercalciurie und Nephrocalcinosen (FHHNC, s.u.) auslöst, sich in diesem langen N-Terminus befindet (Position 55). Ursprünglich galt es als sehr wahrscheinlich, dass durch Bildung einer selektiven parazellulären Pore Claudin-16 die parazelluläre Resorption von Mg^{2+} und Ca^{2+} ermöglicht.⁷⁴ Expressionsstudien fanden jedoch, wenn überhaupt, nur eine sehr geringe Erhöhung der Mg^{2+} -Permeabilität⁷⁵ bzw. Ca^{2+} -Permeabilität.⁷⁶ Als Triebkraft dient auch hier der elektrochemische Gradient.¹⁶ Neuere Untersuchungen haben die Expression von Claudin-16 mit einer vermehrten Na^{+} -Permeabilität der Tight Junctions in Verbindung gebracht und dadurch auch in Zusammenhang mit dem Aufbau dieses elektrochemischen Gradienten gesetzt.⁷³ Die Frage, ob

Claudin-16 nicht nur als Kationen-Pore für divalente Ionen, sondern auch als notwendige Tight Junction-Komponente für den elektrochemischen Gradienten fungiert, muss noch weiter untersucht werden.

Mutation im Claudin-16 Gen führen beim Menschen zu einer selektiven Störung der renalen Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Resorption⁷⁷; diese ist charakterisiert durch renalen Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Verlust mit resultierender Hypomagnesiämie, Nierenverkalkung und schließlich Nierenversagen.^{16,69} Mittlerweile sind über 40 Mutationen bekannt, die zur autosomal-rezessiven FHHNC führen.^{16,32,69,77,78}

Die meisten befinden sich jeweils in einer der vier Transmembrandomänen oder in der 1. oder 2. extrazellulären Schleife. Eine am C-Terminus befindliche Mutation führt zu einem Funktionsverlust des PDZ-Bindemotivs und ist mit der selbstlimitierenden kindlichen Hypercalciurie vergesellschaftet. Dieser Verlust der Bindemöglichkeit mit dem ZO-1 führt dazu, dass die Lokalisation innerhalb der Tight Junction des Claudin-16 nicht mehr aufrechterhalten werden kann und sich dieses in den Lysosomen ansammelt.³² Nach Kausalya et al.⁷⁵ können die Mutationen in zwei große Gruppen unterteilt werden: 1) Mutationen, die die intrazelluläre Lokalisation beeinflussen und zur Retention im Endoplasmatischen Reticulum, Akkumulation im Golgi-Apparat oder zur Fehlplatzierung in den Lysosomen führten und 2) Mutationen, die den parazelluläre Transport von divalenten Kationen beeinflussen.

Elektrophysiologische Untersuchungen mit Claudin-16 überexprimierenden Schweinenieren-Zellen (LLC-PK1) und Hundenieren-Zellen (MDCK II) zeigten eine Zunahme der Mg^{2+} -Permeabilität dieser Zelllayer⁷³, wobei die Mg^{2+} -Permeabilität in den MDCK II-Zellen 6mal niedriger war als in den LLC-PK1-Zellen. Die Na^+ -Permeabilität war in den MDCK II-Zellen nicht verändert. Im Gegensatz dazu zeigten durch veränderte mRNA spezifisch erzeugte Claudin-16 Proteine in transfizierten Zellen keine Veränderungen der Mg^{2+} -Permeabilität.⁷⁵

Bisher gibt es keine Veröffentlichungen von Untersuchungen an Claudin-16 Knockout-Mäusen, jedoch an Claudin-16 Knockdown-Mäusen (KD).⁷⁹ In dieser Arbeit wurden Claudin-16 defiziente Mäusen mittels shRNA (short hairpin RNA) und miRNA (microRNA) hergestellt. Klinisch präsentieren sich die KD Mäuse mit den für die FHHNC typischen Symptomen wie Hypomagnesiämie und Hypercalciurie. Die Claudin-16 Knockdown-Mäuse zeigen außerdem einen erhöhten Aldosteron-Plasmaspiegel, der zu einer Hochregulation der Na^+ -Resorption im Sammelrohr führt, sowie eine arterielle Hypotonie. Der mittlere arterielle Blutdruck steht im direkten Zusammenhang zu dem extrazellulären Flüssigkeitsvolumen, das wiederum abhängig von der totalen Natriumkonzentration im Körper ist. Schlussfolgernd reflektiert der verminderte arterielle Mitteldruck wahrscheinlich die Erniedrigung der korporalen Natriumkonzentration und

des Körpervolumens. Andere sekundäre Komplikationen wie Polyurie, Polydipsie, chronischem Nierenversagen oder Harntraktsinfektionen, die beim Menschen oft beobachtet werden, können in diesem Modell nicht nachgewiesen werden. Die Knockdown-Mäuse zeigen ähnlich einiger FHHNC Patienten ein erhöhten 1,25-Dihydroxycholecalciferol-Spiegel, jedoch keinen erhöhten Parathormon-Spiegel. Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten eine Verminderung des Permeabilitätsverhältnisses P_{Na}/P_{Cl} , aber keine Veränderung der Permeabilitätsverhältnisse P_{Na}/P_{Li} oder P_{Na}/P_{Mg} , deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, Claudin-16 fungiere im TAL als nicht-spezifischer Kationen-Kanal.⁷⁹

Claudin-19

Das Claudin-19 ist ein weiteres in der Henle-Schleife anzutreffendes Tight Junction Protein. Die murine Aminosäuresequenz ist zu 95% identisch mit der menschlichen Sequenz. Das murine Gen *Cldn19* besitzt fünf Exons und ein großes Intron zwischen dem 3. und 4. Exon. Eine Sequenzierung legt nahe, dass auch dieses Claudin vier Transmembrandomänen sowie die intrazellulären N- und C-Termini aufweist.

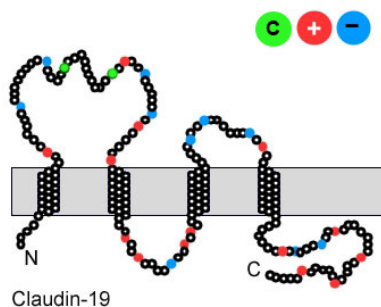


Abbildung 1-15
Claudin-19

Die hellblau gekennzeichneten Aminosäuren (AS) sind negativ geladen, die rot gekennzeichneten positiv. Claudin-19 weist vier negativ geladene AS und vier positiv geladene AS in seiner ersten extrazellulären Schleife auf, die zweite extrazelluläre Schleife zeigt eine positiv und drei negativ geladene AS. Die grün gekennzeichneten AS sind die stark konservierten Cysteine, die in allen Claudinen zu finden sind.

Claudin-19 wird im peripheren Nervensystem und in einigen Organen exprimiert.⁸⁰ Im peripheren Nervensystem bildet es in Schwann'schen Zellen Tight Junction ähnliche Strukturen aus.⁴⁶ Die höchste Expression wird im Auge und der Niere erreicht. Im Auge des Zebrafisches tritt Claudin-19 insbesondere im retinalen Pigmentepithel auf¹⁷, in der Niere besonders im Sammelrohr der Medulla, in der Henle-Schleife sowie im proximalen und distalen Tubulus des Kortexes.⁸⁰ Die Arbeitsgruppe um Konrad konnte mittels mRNA-Analyse feststellen, dass Claudin-16 und -19 ähnliche Expressionsmuster aufweisen.¹⁷ RT-PCR zeigte, dass beide Claudine in denselben Nephronsegmenten exprimiert werden: im medullären und kortikalen dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife und mit einer niedriger Expression im Sammelrohr. Nierensektionen konnten diese Kollokalisierungen bestätigen.¹⁷ Es liegt nahe, aus dieser Verteilung und der Tatsache, dass Mutationen zu der FHHNC führen, auf eine ähnliche Funktion zu schließen. Vermutet wird eine wichtige Rolle für die parazelluläre Resorption von Mg^{2+} , Ca^{2+}

und Wasser in den undurchlässigen Segmenten des Nephrons analog derer von Claudin-16. Claudin-16 und -19 können miteinander interagieren. Untersuchungen Claudin-transfizierter ursprünglich TJ-freier Fibroblasten als auch menschlicher embryonaler Nierenzellen zeigten, dass Claudin-19 Homomere bilden kann. Für Claudin-16 konnte dies nicht beobachtet werden. Wurden beide Claudine exprimiert, konnten als Zeichen heterophiler Interaktion Stränge beobachtet werden. Zusätzlich konnte durch Untersuchungen von Mutationen, die FHHNC hervorrufen, gezeigt werden, dass nicht nur die Fähigkeit hinsichtlich der Kationenpermeabilität verloren ging, sondern auch die Interaktionen nicht mehr möglich waren. Dabei schien die Mutationslokalisation bezüglich eines Claudins (*entweder Claudin-16 oder -19 mutiert mit einem Wildtyp*) nicht relevant. Schlussfolgernd scheinen die Zellen beide Claudinen zu benötigen, um einen synergetischen Effekt zu erzielen.⁸¹ Blasig et al. berichtete von möglichen Interaktionen zwischen Claudin-19 und Claudin-5.⁸²

2006 wurden Familien näher untersucht, deren Symptome nicht von denen der FHHNC-Patienten unterscheidbar waren, bei denen jedoch keine Mutationen im Claudin-16 Gen nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich zeigten die Betroffenen schwerwiegende Sehstörungen charakterisiert durch ein Maculacolobom, Myopie und einen horizontalen Nystagmus. Mittels Positionsklonierung konnten zwei unterschiedliche Mutationen im Claudin-19 Gen identifiziert werden: in der ersten Transmembrandomäne und der ersten extrazellulären Schleife. Beide Mutationen führen zu einem Austausch einer neutralen mit einer negativ geladenen Aminosäure. Eine dieser Mutationen führt zum perinuklearen Verbleib des Proteins, wohingegen das Proteinprodukt des Genes mit der anderen Mutation, trotz der Mutationslokalisation im stark konservierten ‚W-GLW-C-C‘ Aminosäurebereich, in die Zellmembran eingebaut wird. Eine weitere Mutation wurde bei einer türkischen Familie entdeckt. Hier ist ein Austausch von Prolin in der zweiten Transmembrandomäne verantwortlich für die Unterbrechung der Alpha-Helix.¹⁷

Claudin-19 stabil exprimiert in Hundenieren-Zellen (MDCK II) erhöht den transepithelialen Widerstand und vermindert die Permeabilität für monovalente und divalente Kationen. Für Anionen und Harnstoff wird die Permeabilität nicht verändert.⁸³ Claudin-19 könnte also als eine selektive Kationen-Barriere dienen. Dafür spricht auch die physiologische Rolle innerhalb der Tight Junctions der Schwann’schen Zellen myelinisierter Nerven des peripheren Nervensystems. Die Myelinscheiben führen zu einer elektrischen Abschottung des myelinisierten Axons, indem sie als Barriere für Na⁺- und K⁺-Ionen fungieren. Sie ermöglichen dadurch die springende Erregungsweiterleitung von einem Ranvier’schen Schnürring zum Nächsten. Claudin-19-defiziente Mäuse zeigen ein abnormes Verhalten und eine periphere Neuropathie, die durch

disorganisierte Tight Junctions in den Schwann'schen Zellen erklärt werden kann, über den renalen Phänotyp ist nichts bekannt.⁴⁶

Interessanter Weise übernimmt im zentralen Nervensystem ein anderes Claudin diese Barrierefunktion – das oben beschriebene Claudin-11.⁵⁷ Auch dieses führt in MDCK II-Zellen überexprimiert zu einer Zunahme des transepithelialen Widerstandes und zu einer Verminderung der Kationen-Durchlässigkeit.⁵⁵

Ein Fehlen von Claudin-19 in den Tight Junctions wurde auch bei einer anderen Erkrankung auffällig: der polyzystischen Niere. Festgestellt wurde zusätzlich eine stark verminderte Expression im renalen Zystenepithel.⁸⁰ Ob hier das Fehlen von Claudin-19 in den Tight Junction zum Verlust der Barrierefunktion und zur Ausbildung der Zysten beiträgt, muss noch erforscht werden.

Zielsetzung dieser Arbeit

Aufgrund der herausragenden Rolle der Claudine für die Ionenresorption im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife und dadurch für die Regulation der Körperflüssigkeiten, insbesondere der Kontrolle des Blutdruckes, wurden folgende Ziele für die vorliegende Arbeit festgelegt:

1. die elektrophysiologische Charakterisierung der Claudine 10 Variante 1 und Variante 2, 11 und 19 mit besonderem Fokus auf ihre Lokalisation und Barriere- und Kanal-Funktion im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife.
 2. die Untersuchung von Wechselwirkungen und Interaktionen dieser Claudine und ihre Beziehung zu Claudin-16.
-

Materialien und Methoden

Zelllinien

Die originale Zelllinie der MDCK-Zellen (Madin-Darby Canine Kidney) wurde 1957 von Madin et al. von einer heterogenen Population von Tubuli aus einem Nierenkortex des Hundes isoliert.^{84,85} Es ist eine der am besten untersuchten Zelllinien und dient weit verbreitet als Modell für Nierenepithelzellen.⁸⁶ Die Zellen sind in der Lage in der Zellkultur einen polarisierten epithelialen Monolayer zu bilden. Es gibt mehrere Subklone mit jeweils unterschiedlichen transepithelialen Widerständen: die MDCK I und II sowie MDCK C7 und C11.^{87,88} MDCK I bilden Zellmonolayer mit einem hohen transepithelialen Widerstand, ebenso die MDCK C7-Zellen ($\approx 5648 \Omega\text{cm}^2$), die sensitiv auf das antidiuretische Hormon (ADH) reagieren. MDCK II- sowie MDCK C11-Zellen haben einen niedrigen transepithelialen Widerstand ($\approx 330 \Omega\text{cm}^2$) und sind nicht sensitiv gegenüber ADH. Die Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität ist in den MDCK I-Zellen höher als in den MDCK II-Zellen.⁸⁷ In den von uns verwendeten MDCK C7-Zellen wurden folgende Claudine nachgewiesen: Cldn-1, Cldn-3, Cldn-4, Cldn-7, nicht nachgewiesen wurden: Cldn-2, -5, -10, -12, -17, -19. In den von uns verwendeten MDCK C11-Zellen konnten folgende Claudine: Cldn-1, -2, -3, -4, -7, -17, jedoch nicht Cldn-5 und Cldn-12 aufgezeigt werden.

Molekulare Methoden

Amplifikation des Gens bzw. RNA-Umschreibung in DNA mittels PCR

Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten aus cDNA für die Klonierungen wurde eine Standard PCR im 25 μl oder 50 μl Maßstab durchgeführt. Der PCR-Ansatz bestand aus 2,5 oder 5 μl 10x PCR-Puffer, 0,5 μl dNTP Mix (10 mM), je 2 μl Vorwärts- und Rückwärts-Primer, 0,5 μl Taq Polymerase oder PFU-Polymerase, x μl ddH₂O, sowie Template DNA. Die Amplifikation im Thermocycler erfolgte über 25 bis 35 Zyklen bei einer Denaturierung bei 94°C für 30 s, einem den Primerpaaren entsprechendem Annealing für 30 s und einer Elongation bei 72°C für 12 min. Zum Abschluss erfolgte ein finaler Syntheseschritt für 7 min bei 72°C, danach wurde die Reaktion auf 4°C gekühlt.

Aufreinigung von DNA-PCR-Produkten

Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des „Nucleo Spin Extract II“ (Macherey-Nagel, Düren): PCR, Ligations- oder Restriktionsansatz wurde auf 100 μl mit H₂O vermischt. Dann wurden 200 μl Binding Buffer zugeben. Das Gemisch in Filter-Tube (eingehängt in Collection-

Tube) geben und für 1 min bei 11.000 x g in Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Dann wurden 600 µl Wash Buffer auf den Filter gegeben und für 1 min bei 11.000 x g, RT zentrifugiert. Erneut wurde der Durchfluss verworfen. Es folgte eine Zentrifugation für 2 min bei 11.000 x g, RT. Der Durchfluss wurde verworfen und 50 µl Wasser (oder Elution Buffer) auf den Filter gegeben. Das Eluat einer letzten Zentrifugation bei 11.000 x g in RT für 1 min enthielt die gereinigte DNA.

Verdau mit Restriktionsenzymen

Der Verdau mit den Restriktionsenzymen dient der Vorbereitung der Ligation, d.h. der Vereinigung des Vektors mit dem DNA-Fragment. An ausgewählten Schnittstellen setzen die Restriktionsenzyme an und schneiden dann Basenpaare aus dem Vektor, sowie an den Enden des DNA-Fragments heraus. Dadurch entsteht ein geöffneter Vektor, dessen Enden mit den Schnittstellen des DNA-Fragmentes nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip aneinanderpassen. Diese sogenannten Sticky-Ends ermöglichen die gerichtete Insertion des DNA-Fragments in den Vektor. Der Restriktionsverdau erfolgte nach molekularbiologischer Standardmethode.⁸⁹

Enzym-, Puffermengen und Reaktionstemperatur wurden nach Angaben des Herstellers (MBI Fermentas, NEB) gewählt.

Ligation des Gens in den Vektor

PCR-Produkte wurden nach Aufreinigung direkt über TA-Klonierung mit dem pET-TOPO® Vektor (Invitrogen, Karlsbad) nach Anweisung des Herstellers ligiert. Typischerweise wurde ein 2:1 ,Insert zu Vektor'-Mengenverhältnis für die Ligation gewählt.

Für alle anderen Ligationen wurde das DNA-Fragment mit dem Vektor und der T4-Ligase über Nacht bei 15°C im Heizblock inkubiert. Die Ligationskontrolle erfolgte mittels einer Agarosegelelektrophorese, wobei jeweils der leere Vektor als Negativkontrolle fungierte.

Agarosegel Elektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Durch den Einsatz von Markern, d.h. DNA-Fragmenten bekannter Größe und Konzentration, kann so eine Größen- und Mengenbestimmung vorgenommen werden. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose in 1 x TAE-Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in der Mikrowelle aufgeköcht bis die Agarose vollständig geschmolzen war. Die flüssige Gelmasse wurde in einen Gelschlitten gegossen und es wurde ein Kamm eingesetzt, um die Taschen für die spätere Probenaufnahme zu bilden. Das Gel wurde für ca. 30 min bis zum vollständigen Erstarren stehen

gelassen. Der Schlitten wurde in eine Elektrophoresekammer gelegt, die Kammer mit 1 x TAE-Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid aufgefüllt und der Kamm aus dem Gel gezogen. Die zu untersuchenden Proben wurden mit 1/6 Volumen 6fach DNA-Probenpuffer versetzt und zusammen mit geeigneten Markern in die Geltaschen pipettiert. Es wurde eine Spannung von 60 V angelegt. Das Fortschreiten der Elektrophorese konnte anhand der Wanderung des im Probenpuffer enthaltenen Bromphenolblau-Farbstoffs optisch verfolgt werden.

Transformation des Konstrukts in kompetente Zellen

Das Konstrukt wurde in kompetente Zellen transformiert. Hierfür wurde der DH5α-*E.coli*- oder One Shot® TOP10-*E.coli* (Invitrogen, Karlsbad) Bakterienstamm verwendet. Diese können durch eine vorausgegangene chemische Behandlung DNA-Moleküle leicht aufnehmen. Die Bakterienstämme besitzen eine Transformationsrate von ungefähr 10⁸ Transformationen/µg Plasmid-DNA. Die kompetenten Zellen wurden als 50 µl Aliquots vorsichtig auf Eis aufgetaucht. Für jedes Konstrukt wurden 6 µl des Ligationsansatzes zu der Zellsuspension hinzu gegeben. Es folgte eine Inkubation von 30 min auf Eis. Durch einen Hitzeschock bei 42°C für 30 s wurde die Transformation durchgeführt. Danach wurden die Zellen zur Regeneration für 2 min auf Eis gestellt, bevor 950 µl SOC-Medium hinzugegeben und die Zellsuspension für 1 h bei 37°C und 225 rpm horizontal geschüttelt wurden. 100 µl des Ansatzes wurde auf einer Agarkulturplatte mit 100 mg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die gewachsenen Kolonien für weiteren Untersuchungen in 4 ml LB-Medium überimpft und über Nacht bei 37°C und 225 rpm geschüttelt.

Plasmid Mini-Präparation

Zur Plasmid-Präparation wurden 1,5 ml der nach der Transformation entstandenen Übernachtskulturen in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 5000 rpm für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet mit 300 µl Puffer P1 (Miniprep Kit 250, Qiagen, Hilden) resuspendiert. Nach der Zugabe von 300 µl Puffer P2 und leichtem Schwenken wurden die Ansätze für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde 300 µl Puffer P3 hinzugegeben und nun bei 4°C für 15 min inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 14.000 rpm. Danach wurden 800 µl der Überstände in neue Eppendorfgefäße überführt mit 400 µl Isopropanol vermischt und erneut bei 4°C und 14.000 rpm für 15 min zentrifugiert. Danach wurden die Überstände verworfen und die Pellets mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach einer letzten Zentrifugation bei 4°C und 14.000 rpm für 5 min wurden die Überstände abgegossen und die Pellets für ca. 20 min in der Speed Vac® getrocknet. Danach wurden diese

mit 50 µl H₂O resuspendiert. Zur Transformationskontrolle wurden 2,5 µl der Proben mit 0,5 µl 6fach Puffer-Mix vermengt und auf ein Agarosegel aufgetragen.

Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzierung des transformierten Konstruktes wurde der Sequenzierungs-Kit AmpliTaq® FS ¼ BigDye Terminator® (Perkin Elmer) verwendet. Es wurde eine Reaktion nach der Kettenabbruch-Methode von F. Sanger durchgeführt.⁹⁰ Hierzu wurde der zu sequenzierenden DNA ein komplementärer Primer zugegeben. Eine sich ebenfalls im Reaktionsansatz befindende DNA-Polymerase führt zur Verlängerung des Primers nach der DNA-Vorlage. Notwendig für diese Elongation sind Desoxynukleotiden (dNTP), die im Ansatz auch enthalten sind. Wichtig für die Methode sind außerdem fluoreszenzmarkierte Desoxynukleotide (ddNTP). Sie besitzen an ihrem 3'-Ende keine OH-Gruppe und können somit nicht mit einem folgenden Nukleotid verknüpft werden. Sobald diese während der Elongation eingebaut werden, kommt es zum Abbruch der Strangsynthese. Das Verhältnis von dNTPs und ddNTPs bestimmt die Wahrscheinlichkeit eines Einbaus und damit verbunden Abbruchs. Es entsteht je nach Ansatz ein Gemisch unterschiedlich langer DNA-Fragmente.

Nach dieser Reaktion werden die Fragmente über eine Kapillarelektrophorese aufgeteilt und folgend von einem Laser anhand ihrer unterschiedlichen Fluorophoren markierten ddNTPs detektiert. Die gewonnenen Elektropherogramme werden dann durch geeignete Computerprogramme ausgewertet. Von 2 µl Premix, 2 µl Puffer, 1 µl Primer und 500 ng Plasmid-DNA aus der Plasmid Präparation wurde eine Sequenzierungs-PCR durchgeführt. Die Ansätze durchliefen im Thermocycler folgendes Programm:

1 x: 96°C 5 min
25 x: 96°C 10 s
55°C 5 s
60°C 4 min
1 x: 4°C ∞

Nach der Sequenzierungsreaktion wurden die überschüssigen nicht eingebauten Nukleotide durch Aufreinigung entfernt. Hierfür wurden die Centriflex-Säulen bei 750 x g für 2 min zentrifugiert, das Eluat verworfen und die Säule in ein neues Eppendorf-Gefäß platziert. Danach wurde der gesamte Reaktionsansatz (10 µl) auf die Säule getragen und erneut für 2 min bei 750 x g zentrifugiert. Das Eluat wurde in Sequenzer Vials übertragen und dann für 15 min in der Speed Vac eingengt. Zu den verbleibenden 5 µl Probe wurde 20 µl TSR-Puffer hinzupipettiert. Die Sequenzer Vials wurden mit einem Septum verschlossen, die Probe bei 96°C für 3 min

denaturiert und anschließend für 2 min auf Eis inkubiert. Es folgte die Auswertung und Ermittlung der Sequenz mittels Prozessierung in einem ABI 310 Sequencer.

Plasmid Midi-Präparation

100 ml LB-Medium wurden mit 300 µl einer frischen Übernachtskultur angeimpft und über Nacht bei 225 rpm und 37° geschüttelt. Die 100 ml wurden auf drei Falcon Tubes verteilt und dann bei 6.000 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 3,3 ml Puffer P1 pro Tubes (Plasmid Prep 100, Qiagen) resuspendiert. Nun wurden die drei Falcon-Tubes auf eines zusammengeführt und Puffer P2 (10 ml) dazugegeben. Dieser Ansatz wurde 5 min bei Raumtemperatur und erneute 10 min nach Zugabe von 10 ml Puffer P3 inkubiert. Danach folgte die Filtration der Suspension durch Filter-Spritzen. Das Filtrat wurde mit 2,5 ml ER-Puffer versetzt und 30 min auf Eis inkubiert.

Während dessen wurde die im Kit enthaltene Säule (Qiagen-tip) mit 10 ml QBT equilibriert und dann die nun klare Lösung auf die Säule geben und folgend zweimal mit 30 ml QC-Lösung gewaschen. Nun konnte die DNA mit 15 ml QN-Lösung von der Säule in ein Greiner-Tube überführt werden. Dann wurde 10,5 ml Isopropanol hinzugegeben und das Greiner Tube bei 4°C und 15.000 x g 30 min zentrifugiert werden. Der Überstand wurde nun mit 5 ml endotoxinfreiem Ethanol gemischt und erneut bei 15.000 x g für 10 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet ca. 60 min bei Luft getrocknet. Zur Resuspension wurden 400 µl TE-Puffer oder H₂O dazugeben.

Quantifizierung der DNA

Die Quantifizierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Wilmington, Delaware USA). Dieses Gerät kann Nucleotidsäuren von 1,5 ng/µl bis zu 3700 ng/µl detektieren, in dem es die Absorption der Probelösung bei einer Wellenlänge 220-750 nm misst und die Konzentration berechnet. Man benötigt ein Probevolumen von 2 µl. Die Berechnung der 260/280 und 260/230 Ratios erfolgte automatisch.

Glycerolstocks

Die Glycerolstocks dienen der längeren Aufbewahrung der Bakterienkulturen bei -80°C. Um der Gefahr einer Schädigung der Bakterienzellen durch Eiskristalle entgegenzuwirken, wurde dem Medium Glycerol hinzugefügt. 850 µl der ursprünglichen Übernachtskultur wurden in Cryo-

Röhrchen pipettiert und mit 150 µl Glycerol versetzt. Es folgte das Schockgefrieren im flüssigen Stickstoff und die Lagerung bei -80°C.

Membran-Protein-Extraktion aus eukaryontischen Zellkulturen

Zur Zellyse wurden die konfluent bewachsenen kleinen Zellkulturflaschen (25 cm²) vorerst mit PBS gewaschen, um auch Rest des Nährmediums zu eliminieren. Danach wurden sie für kurze Zeit mit 750 µl Lysepuffer pro kleine Falsche inkubiert. Mit Hilfe eines cell-scraper wurden die Zellen von dem Flaschenboden abgeschabt. Die gewonnene Zellsuspension wurde in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und je 10-20 x durch Kanülen mit 0,5 mm Durchmesser und anschließend durch Kanülen von Insulinspritzen mit 0,45 mm Durchmesser gezogen. Dadurch kann die Proteinausbeute erhöht werden. Zur Trennung der Proteine von den übrigen Zellbestandteilen folgte eine Zentrifugation von 5 min bei 200 x g bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde in ein safe-look Eppendorfgefäß überführt und dann bei 43000 x g, 4°C für 30 min zentrifugiert. Im resultierenden Überstand befand sich die gelöste Fraktion. Das Pellet wurde mit 50-100 µl eiskaltem Lysepuffer resuspendiert und bildete die Fraktion der membranständigen Proteine. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

Proteinquantifizierung

Zur Proteinquantifizierung wurden Mikrotiterplatten verwendet. 10 µl je Probe wurden nach spezifischen Schema aufgetragen ggf. verdünnt mit Lysepuffer. Zur Kontrolle diente eine Standardreihe von BSA-Lösungen mit den Konzentrationen 0 mg BSA/ml, 0,2 mg BSA/ml, 0,8 mg BSA/ml und 1,2 mg BSA/ml und 10 µl Lysepuffer. Sowohl für die Kontrollen als auch für die Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Zu den Proben bzw. den Kontrollen wurde je 190 µl BCA Protein Assay-Lösung pipettiert (BCA Protein Assay-Kit, Pierce). Die Mikrotiterplatte wurde dann für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde durch die Messung der Extinktion bei 562 nm mit dem Tecan Spectra Mikrotiterplatten-Photometer der Proteingehalt der Proben bestimmt. Durch die lineare Regression der Standard BSA-Konzentrationen wurde eine Eichgerade ermittelt, mit derer Hilfe die Konzentrationen der Proben festgestellt werden könnte.

SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese, auch SDS-PAGE genannt, ermöglicht ein Auftrennen von Proteinen in Abhängigkeit von ihrer Molekülgröße. Im denaturierten Zustand durchwandern negativ geladene Proteine das Polyacrylgel in einem elektrischen Feld vom

negativen zum positivem Pol. Sie wandern umso schneller, je kleiner ihre Molekülgröße ist, je größer die angelegte Spannung und je niederprozentiger das jeweilige Gel. Das Maschennetz des Gels fungiert dabei als Wanderungswiderstand. Für Occludin mit einem Molekulargewicht von ca. 64 kDa wurde ein 8,5-prozentiges Polyacrylgel vorbereitet, wohingegen für alle Claudine (Molekulargewicht ca. 22-26 kDa) ein 12,5-prozentiges Gel gegossen wurde.

Für das Gießen des Gels wurden zwei Glasscheiben, durch einen 1,5 mm dicken Abstandhalter voneinander getrennt, in einer BioRad-Apparatur befestigt. Vorerst wurde das Trenngel in die Gelkammern gegossen und mit 1 ml absolutem Alkohol beschichtet. Dieser ermöglichte eine gerade, luftblasenfreie Oberkante. Nach der Polymerisation des Gels wurde der Alkohol abgegossen und Reste mit Filterpapier entfernt. Nun wurde das Sammelgel aufgeschichtet. Ein eingesteckter Kamm fungierte als Platzhalter für die späteren Geltaschen. Das Gel mit den Glasscheiben wurde nun in eine Elektrodenhalterung eingespannt und diese in Elektrophoresekammern eingesetzt. Die Kammern wurden mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt und der Kamm im Sammelgel entfernt. Mit einer Kanüle wurden die Taschen mit Elektrophoresepuffer ausgespült, um ggf. Reste des Sammelgels zu entfernen. Die im Elektrophoresepuffer enthaltene Sodiumdodecylphosphat-Lösung (SDS) gewährleistete durch Komplexbildung die Fixierung der Proteine in ihrem denaturierten Zustand. Außerdem sicherte dieses negative geladene Detergenz vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften und verhinderte Wechselwirkungen zwischen den Proteinen.

Die Proben mussten wie folgt vorbereitet werden: für jede Spur wurde ein Volumenanteil der Probe, der 10 µg Protein entsprach mit 3 µl 5 x Laemmli-Puffer gemischt, ggf. wurde die Probe mit Membranlysepuffer auf ein Volumen von 15 µl aufgefüllt. Zur Erleichterung der Arbeiten enthält der Laemmli-Puffer den Farbstoff Bromphenolblau. Zur Denaturierung der Proben und Inhibition von ggf. vorhandenen Proteasen wurde das Probengemisch bei 95°C für 5 min inkubiert. Die Geltaschen wurden mit den Proben und einem Marker (SDS Marker) gefüllt. Das Gel stellte eine Brücke zwischen den flüssigkeitsgefüllten Kammern dar. Durch Anlegen von Spannungspolen in den beiden Kammern befand sich das Gel nun in einem elektrischen Feld. Aufgrund der negativen Ladung wanderten die Proteine zur positiv geladenen Anode. Das elektrische Feld von 100 V wurde beibehalten bis die Proben zum unteren Rand der Gelkammer gelaufen waren, sichtbar anhand der Bromphenolblau Färbung.

Elektrotransfer

Die Proteine waren nun entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Zur spezifischen Proteinanfärbung können nun Antikörper verwendet werden. Da die Proteine im Gel jedoch für

weitere Untersuchungen zu instabil vorlagen und das Gel außerdem für weitere Behandlungen zu wenig widerstandsfähig war, wurden die Proteine auf eine reißfeste Nylonmembran übertragen und dort fixiert. Dies geschah mit Hilfe eines elektrischen Feldes. Die Nylonmembran (Poly Screen PCDF) wurde entsprechend der Größe des Gels zugeschnitten und für 5 min in absoluten Alkohol gelegt. Zusätzlich wurden Schwämme und Filterpapiere benötigt, die gemeinsam mit den Membranen in Transferpuffer für ungefähr 10 min äquilibriert wurden. Während dessen konnte das Polyacrylamidgel aus der Elektrophorese-Apparatur herausgeholt, das Sammelgel entfernt und das Gel ebenfalls in Transferpuffer geschwenkt werden.

Zur Ermöglichung des Transfers der Proteine von dem Gel auf die Membran wurden die Bausteine in folgender Reihenfolge in den „Sandwich-Halter“ eingebaut: Schwamm, Filter, Gel, Membran, Filter, Schwamm. Danach wurde dieses „Sandwich“ mit einem Magnetrührer und einem Kühlakku in die passende Transfer-Apparatur geklemmt und mit Transferpuffer aufgefüllt. Der Transferpuffer enthielt Methanol, das die Lösung der Proteine aus dem Gel bewirkte. Außerdem gewährleistete er ähnlich wie der Elektrophoresepuffer, dass die Proteine denaturiert und negativ geladen vorlagen. Bei einer Spannung von 100 Volt wanderten die negativ geladenen Proteine nun zur positiv geladenen Nylonmembran und wurden dort fixiert.

Immundetektion

Zur spezifischen Proteinfärbung mit Antikörpern (AK) wurde das Verfahren der Immundetektion verwendet. Genutzt wurden spezifische polyklonale Antikörper gegen das jeweilig zu findende Protein. Mit einem sekundären Enzym-konjugierten Antikörper, der gegen den Fc-Teil des ersten, Protein-spezifischen Antikörpers (Maus oder Kaninchen) gerichtet war, konnte das Protein detektiert werden. Die Membran wurde nach dem Elektrotransfer kurz in PBS/Tween gespült und dann für zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer Küvette mit BSA-Blockierungslösung geschwenkt. Dadurch konnten unspezifische Antikörperbindungen an der hoch-proteinaffinen Nitrozellulosemembran vermindert werden. Danach wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper in PBS/Tween/5%BSA/0,2%NaAzid auf einer Wiege inkubiert. Der primäre Antikörper wurde 1:1000 verdünnt. Gegen humane Claudine wurden polyklonale Kaninchen-AK (1:1000-1:10000), gegen Flag oder HA monoklonale Maus-AK (1:1000 -1:10000) verwendet.

Nach erneuten 10 minütigen Spülvorgängen zweimal in PBS/Tween und einmal in TBS/Tween zur Entfernung der unspezifischen AK-Bindungen wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper (anti-Kaninchen, anti-Maus) für eine Stunde bei Raumtemperatur geschwenkt.

Danach wurden die drei Waschschr tte wiederholt und die Membran in einer extra Küvette für 5 min in einer 4 ml Lumi-Light-Lösung im Dunkeln inkubiert.

Anschließend erfolgte die Detektion mit Hilfe des Luminiszenz-Detektor (LAS 1000). Hierfür wurde die Membran zwischen zwei Transparentfolien gelegt. Die CCD-Kamera registriert die Chemoluminiszenz, die durch die enzymatische Reaktion der in der Lumi-Light-Lösung enthaltenen Substrate mit dem sekundären AK entsteht.

mRNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers WAK CHEMIE-Medical. Das Zellmedium wurde abgeschüttet und die Zellen mit PBS gewaschen. In jede kleine Zellkulturflasche wurde 1,5 ml RNAzol B (enthält Phenol und Guanidinthiocyanat) hinzugegeben und die Zellen mit einem Zellscraper abgelöst. Das Homogenisat wurde in 2 Eppendorf-Tubes überführt und jeweils mit 75 μ l Chloroform (CHCl_3) versetzt. Das Gemisch wurde gevortext und dann zur Denaturierung der Proteine für 5 min bei 4°C inkubiert. Zur Trennung der verschiedenen Phasen folgte ein Zentrifugationsschritt bei 12.000 x g für 15 min bei 4 °C. Es entstanden 2 Phasen mit Interphase. Die untere, blaue Phase enthielt die DNA und Proteine. In der wässrigen Oberphase war die RNA lokalisiert. Die Oberphase wurde dann in ein neues Eppendorf Tube überführt und 1 Volumen Isopropanol zugegeben. Die RNA wurde 30 min bei 4 °C präzipitiert und für 15 min bei 4 °C und 12.000 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde ein gelb-weißliches Pellet am Boden des Tubes sichtbar. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 79% Ethanol mittels einer Zentrifugation bei 12.000 x g, 4°C für 10 min gewaschen. Der Überstand wurde vorsichtig abpipetiert und das Pellet in der speed vac für 5 min getrocknet. Danach wurde das Pellet in 50 μ l H_2O resuspendiert und für 5 min in 65°C inkubiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Zellkulturtechniken

Anzucht und Pflege

Die Zellen wurden in kleinen oder großen Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO_2 -Zufuhr gehalten. Einmal wöchentlich wurden die Zellen umgesetzt. Dazu wurde das Nährmedium abgossen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden sie für 5 min in Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert (große 6 ml, kleine Flasche 2 ml). Diese kurze Inkubation mit Trypsin/EDTA sollte das vollständige Ablösen der abgestorbenen bzw. sterbenden Zellen bewirken. Nach Entfernung dieser ersten Zellsuspension wurde erneut Trypsin/EDTA (große 3

ml, kleine Flasche 1 ml) auf die Zellen gegeben. Die Flaschen wurden nun bei 37°C bis zur vollständigen Lösung der Zellen vom Flaschengrund inkubiert ggf. wurden die Zellen durch leichten Klopfen vom Flaschenboden gelöst. Nach der Verdünnung des Trypsin/EDTA-Zellsuspension mit Nährmedium im Verhältnis 1:10 wurde 1,5 ml der Zellsuspension in mit 7 ml Nährmedium vorgelegte kleine Flaschen überführt. Große Flaschen wurden mit 15 ml Nährmedium vorbereitet und erhielten 4 ml der Zellsuspension.

Am nächsten Tag wurde das Nährmedium ausgewechselt. Fütterung erfolgte jeden zweiten Tag mit jeweils 15 ml für große, 7 ml Nährmedium für kleine Flaschen.

Zellzählung

Für die Transfektion wurden die Zellen auf Schalen ausgesät. Um eine gleichmäßige Zellmenge zu erhalten, wurde vor der Aussaat der Zellen eine Zellzählung vorgenommen. Hierbei wurde ein Aliquot der Zellsuspension mittels einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Nach der Zählung der Zellen in vier Eckquadraten wurde die Zellzahl mittels folgender Formel berechnet: (Zellzahl in allen vier Eckquadraten) $\times 2,5 \times 10^3 =$ Zellzahl /ml

Stabile Transfektion des Konstrukts

Die stabile Transfektion bezeichnet eine Methode zum Erhalt von Klonen, die das Konstrukt in ihr Genom stabil integriert haben. Am Tag 1 wurden dafür je 20.000 Zellen in 3-4 mit 8 ml Medium vorgelegte Kulturschalen ausgesät, davon 2-3 Schalen für die Transfektion, eine als Kontrolle. Am Tag 2 wurde die eigentliche Transfektion durchgeführt. Hierfür wurden zwei Ansätze vorbereitet, Ansatz A mit 800 μ l serumfreien Medium und 54 μ l Lipofectamin. Lipofectamin ist ein stark lipides Reagenz, das mit der zu transfizierenden DNA einen Komplex bildet. Ansatz B bestand aus 900 μ l serumfreien Medium, 90 μ l Plus Reagenz und 9 μ g zu transfizierender DNA. Nach 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur der beiden Ansätze, wurden diese vereinigt und erneut 15 min inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die am Tag 1 ausgesäten Zellen mit PBS gewaschen und mit 2,5 ml serumfreiem Medium versehen. Pro Kulturschale wurden 645 μ l des Mixes aus A und B pipettiert und diese bei 37°C für 4 Stunden inkubiert. Danach wurde das Medium vorsichtig entfernt und 10 ml Medium pro Schale hinzugegeben. Die Transfektion war erfolgt. Am Tag 4 wurden die Zellen mittels EDTA/Trypsinlösung von einer Schale auf zwei Schalen umgesetzt. Für die Klone wurden pro Schale 2,5 ml der Zellsuspension überführt, für die Kontrolle nur 1,5 ml (10 ml Medium vorgelegt).

Am Tag 5 begann zur Selektion der positiven Klone die Antibiotikabehandlung. Das Medium wurde durch ein entweder nur G418-haltiges (600 µg/ml) oder bei den Kotransfektionen durch ein zusätzlich Hygromycin-haltiges Medium ausgetauscht. Wenn beide Antibiotika verwendet wurden, wurde aufgrund der Potenzierung der Wirkung eine Konzentration von 500 µg/ml G418 und 25 µg/ml Hygromycin verwendet. Nach Absterben der Kontrollzellen nach ca. 1-2 Wochen wurden zur weiteren Selektion der Positivklone die restlichen Zellinseln vereinzeln.

Selektion der Klone

Unter dem Lichtmikroskop wurden nicht ineinander gewachsene Zellinseln aufgesucht und auf der Kulturschale markiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Ein Glaszylinder wurde kurz in Fett gedrückt und dann mit einer Pinzette auf die zu pickende Insel gestellt und leicht angedrückt. Das Fett dient der Abdichtung des Zylinderinneren gegenüber der Umgebung. Pro Zylinder wurden 50 µl Trypsinlösung hinzu gegeben und bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen gelöst hatten. 100 µl Antibiotika-haltiges Medium aus vorgelegten 1 ml Medium/Well 24-Wellplatten wurden in den Zylinder auf die gelösten Zellen gegeben. Die Zellen gut aufgeschwemmt und dann in das Well überführt. Zur weiteren Aufzucht wurden die Wellplatten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nachdem die Zellen in den 24-Wellplatten konfluent gewachsen waren, wurden sie zuerst auf 12er, dann 6er Wellplatten und schließlich in kleine Zellkulturflaschen überführt.

Transfektionkontrolle

Zur Transfektionskontrolle wurden Westernblotting, mRNA-Nachweis und immunhistochemische Methoden verwendet.

Elektrophysiologische Methoden

Widerstandsmessungen

Als MDCK C7-Kontrollzellen wurden nur Zellfilter mit Widerständen über 800 Ωcm² verwendet. Untersuchungen ergaben, dass Zellen mit niedrigeren Widerständen ihre spezifischen Permeabilitäten verloren. Die Widerstände der Zellen wurden sowohl im Handmessgerät als auch in den Ussingkammern gemessen. Die Messungen erfolgten an den Tagen 5 und 6 nach der Aussaat auf Zellfilter.

Dilutions- und biionische Potentialmessungen an der Ussing-Kammer

Einleitung

Der Transport durch einen Zelllayer/Epithel ist auf zwei Arten möglich: transzellulär oder parazellulär. *Transzellulär* können Substanzen auf verschiedenen Wegen transportiert werden. Zum einen aktiv über Kanäle oder Transporter an der apikalen und dann an der basolateralen Membran, zum anderen über Endozytose an der apikalen und Exozytose an der basolateralen Membran. Letzterer sei nur erwähnt und wird folgend nicht weiter beachtet. Es handelt sich dabei um einen elektroneutralen Transport.

Parazellulär gelangen Substanzen passiv durch den Interzellularspalt zwischen den Zellen von einer Seite auf die andere. Dabei passieren sie die Tight Junctions.

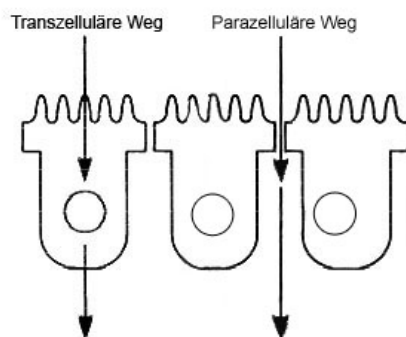


Abbildung 2-1

Die Transportformen durch einen Zelllayer.

Dargestellt ist der Transport durch eine Zelle als transzellulärer Weg gekennzeichnet, sowie der Transport zwischen zwei Zellen hindurch auch als parazellulärer Weg bezeichnet. [modifiziert nach⁵⁾]

Zur Unterscheidung dieser beiden Transportformen – trans- und parazellulär – entwickelte Hans Ussing, ein dänischer Physiologe in den frühen 50iger Jahren des 20. Jahrhunderts die nach ihm benannten Ussingkammern. Hierbei handelt es sich um einen Versuchsaufbau, der experimentell die Abgrenzung des aktiven Ionentransportes vom passiven erlaubt.

Folgende Überlegungen sind für das Verständnis der Ussingkammer notwendig: Der passive Transport erfolgt als Substratfluss entlang eines Konzentrationsgradienten, eines elektrischen Gradienten und/oder eines (hydrostatischen) Druckgradienten. Wenn man alle Gradienten für den passiven Transport ausschaltet, kann der danach verbleibende messbare Transport nur aktiver Natur sein. Hierfür wird das zu untersuchende Epithel zwischen zwei Polylacrylkammerhälften eingespannt, so dass es eine Trennwand innerhalb der Kammer bildet. Es entstehen also zwei Kompartimente, getrennt durch eine Membran – das Epithel. Durch Zugabe identischer Volumina derselben Badlösung auf beiden Seiten des Epithels wird der hydrostatische Druckgradient ausgeschaltet und gleichzeitig der Konzentrationsgradient eliminiert. Nun können passive Ionenbewegungen nur noch entlang des verbliebenen elektrischen Gradienten erfolgen. Doch auch dieser kann beseitigt werden.

Durch aktiven Transport geladener Moleküle wie Na^+ oder Cl^- entsteht eine transepitheliale Potentialdifferenz ($E_{\text{bl-ap}}$), d.h. die Differenz zwischen dem basolateralen und apikalen Potential. Die Netto-Bewegung von Kationen in die eine Richtung bewirkt entweder den passiven Mittransport von Anionen in die gleiche Richtung und/oder von Kationen in die Gegenrichtung. Die Potentialdifferenz hat somit auch den passiven Transport anderer Ionen zur Folge. Mit Hilfe eines Rückkopplungssystems der Ussingkammer ist es möglich diese Potentialdifferenz zu eliminieren. Hierzu wird das transepitheliale Potential kontinuierlich gemessen. Ist das Potential ungleich Null, wird ein kompensatorischer Strom appliziert, bis das Transmembranpotential den Wert Null erreicht. Unter diesen Bedingungen hat der applizierte Strom die gleiche Amplitude wie der vom Epithel generierte Strom, aber mit umgekehrtem Vorzeichen und wird als Kurzschlussstrom (*short-circuit-current*) bezeichnet. Die Höhe des zu amplifizierten Kurzschlussstromes ist somit ein direktes Maß für den aktiven Ionentransport des untersuchten Epithels.

Dieses Experiment wurde erstmals 1951 von Ussing an Froschhautepitehlien durchgeführt und gilt als die klassische Verwendung der Ussingkammern. Mittlerweile sind verschiedene Modifikationen der Ussingkammer-Experimente publiziert worden.

Man kann an der Ussingkammer auch einen anderen Messmodus, den des *open-circuit current* schaffen. Unter physiologischen Bedingungen stellt sich über das Epithel spontan eine charakteristische Potentialdifferenz ein, die nun nicht ausgeglichen, sondern nur gemessen wird. Der transepitheliale elektrische Gradient bleibt also erhalten.

Eine in einem bestimmten zeitlichen Intervall erfolgende epithelferne Applikation eines geeigneten Strompulses führt zur Änderung der transepithelialen Potentialdifferenz $E_{\text{bl-ap}}$. Dies ermöglicht die Berechnung des epithelialen Widerstandes (R) mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes:

$$R = \frac{E_{\text{bl-ap}}}{I}$$

Die Leitfähigkeit (G) entspricht dem reziproken Wert des Widerstandes:

$$G = \frac{1}{R}$$

Mit Hilfe der Formeln können Widerstände und Leitfähigkeiten berechnet und registriert werden. Die *open-circuit current*-Messmethode wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Messanordnung

Der Aufbau der Ussingkammer entspricht im Prinzip der 1951 von Ussing und Zerahn beschriebenen 4-Elektroden-Messanordnung, ist aber gegenüber dem klassischen Modell verkleinert und mit Vorrichtungen zur Minimierung von Randschäden versehen. Zwei Kammer-

hälften aus gefrästem Acrylglas werden durch einen zentral eingespannten Filter mit einem Zelllayer vollständig voneinander getrennt.⁹¹ Nun kann nur noch durch den intakten Zelllayer ein Stoff- und Flüssigkeitstransport erfolgen. Elektrische Ströme können sich ebenfalls nur durch das Epithel ausbreiten. Jede Kammerhälfte enthält einen Hohlraum von 0,5 ml Volumen, in dem die zirkulierende Badlösung nach medial hin einen offenen Kontakt zum Epithel hat. Zugeleitet und abgeleitet wird die Badlösung über je 2 Öffnungen, die in Verbindung mit den oberhalb gelegenen Lösungsreservoirs stehen. In jeder der beiden Kammern befinden sich zwei Elektroden, wobei ein Paar der Registrierung der transepithelialen Potentialdifferenz dient, während über das andere Elektrodenpaar die Strompulse zur Messung des transepithelialen Widerstands vollzogen werden. Die spannungsmessenden Elektroden sind epithelnah lokalisiert (1–2 mm vom Epithel entfernt), um Spannungsabfälle in der zwischen Epithel und Elektrodenspitze befindlichen Flüssigkeit möglichst gering zu halten. Zum besseren Verständnis dient die Abbildung 2-.

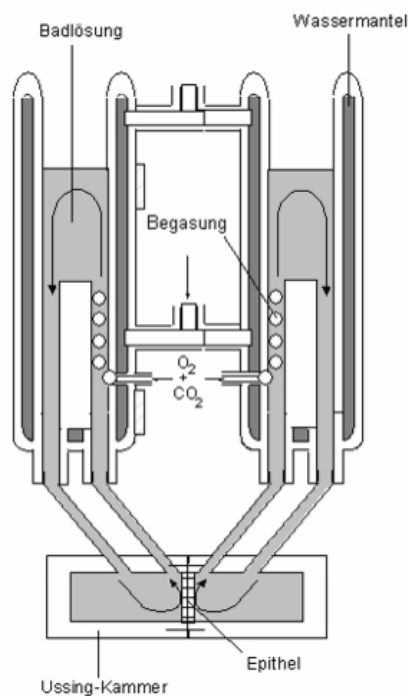
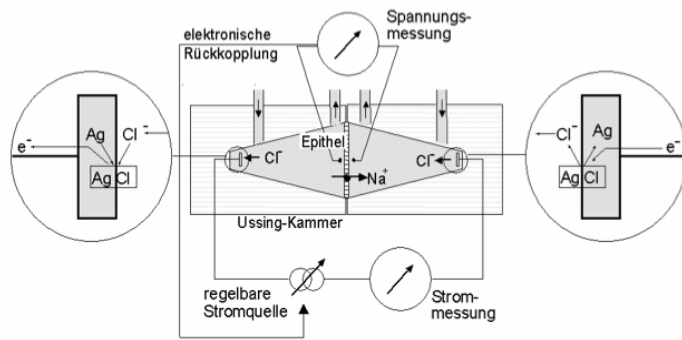


Abbildung 2-2

Der Ussingkammer-Versuchsaufbau mit im Container befindlichen Epithelfilter, Wärmeaustauscher und Begasung.

Der untere Teil der Konstruktion bildet die Ussingkammer, den Container, hier mit eingespanntem Epithel, das die Kammer in zwei Kompartimente trennt. Diese stehen mit einem Röhrensystem in Verbindung, das zum einen durch einen Wassermantel erwärmt werden kann und zum anderen durch Begasung eine Zirkulation der Badlösung erlaubt.
[modifiziert nach⁸⁾]

Die eigentlichen Spannungselektroden sind Kalomelektroden, die über Agarbrücken (bestehend aus einem Kunststoff-Schlauch gefüllt mit 3 g/dl Agar-Agar in 18 g/l NaCl) mit der Badlösung der Ussingkammer in Kontakt stehen. Auch der Strom wird über NaCl-Agarbrücken in die beiden Kammerhälften geleitet.

**Abbildung 2-3**

Detailabbildung des Containers der Ussingkammer und Messanordnung.

Ausgleich des elektrischen Gradienten am Beispiel des aktiven Na^+ -Transports. Durch elektrogeneren Na^+ -Transport entsteht ein elektrischer Gradient, der über die Spannungselektroden detektiert wird. Der Ausgleich dieser Spannungsdifferenz erfolgt durch die Stromelektroden. [modifiziert nach⁸⁾

Die Registrierung des transepithelialen Potentials erfolgte alle 10 s während des gesamten Experiments. Die Steuerung dieser Funktionen erfolgt über einen Computer mit Messprogrammen. Die Potentialmessung erfolgt über ein Voltmeter. Zur Bestimmung der Widerstände wurde ein Strompuls von 10 μA alle 0,3 s amplifiziert.

Zum stabilen Einspannen der Kammern befindet sich seitlich jeder Kammer ein eingefräster Konus. Mittels eines Stativs ist somit eine exakte axiale Positionierung der Konstruktion erlaubt. Hierzu werden alle Teile zwischen zwei Gewindestangen festgeschraubt. Abdichtringe aus Gummi zwischen den Kammerhälften und dem Filter führen zu der vollständigen Abdichtung der Konstruktion.

Oberhalb der Kammer befinden sich zwei doppelwandige, zylinderförmige Lösungsreservoirs, die mit der Kammer über je zwei flexible Silikonschläuche verbunden sind. In diesen Lösungsreservoirs befindet sich ein Großteil der Badlösung und wird dort begast und erwärmt. Die Badlösung wird durch eine Gaszufuhr (ca. 5 ml/min) kontinuierlich in Zirkulation gehalten. Verwendet wurde entsprechend des Experimentes entweder 100% O_2 für Messungen der divalenten Potentiale oder Carbogen, ein Gasgemisch aus 95% O_2 und 5% CO_2 für monovalente Potentialmessungen. Außerdem dient die Begasung der Sauerstoffzufuhr des Zelllayers und bei Lösungen mit Bicarbonatpuffer der Aufrechterhaltung des pH-Wertes der Badlösung. Die Erwärmung der Badlösung erfolgt über ein externes Wasserbad. Mit Hilfe einer Pumpe wird ein Kreislauf von 37°C warmen Wasser aufrechterhalten, der die Badlösung durch Zirkulation innerhalb der beiden Wände des Lösungsreservoirs auf einer konstanten Temperatur hält.

Versuchsdurchführung

Im vorliegenden Versuchsaufbau wurde die Potentialdifferenz ($E_{\text{bl-ap}}$) über zwei epithelnah angebrachte Elektroden alle 10 s aufgezeichnet und der Widerstand und die Leitfähigkeit berechnet. Die Lösungsreservoirs wurden mit jeweils 10 ml pro Seite Badlösung gefüllt. Je nach Versuch wurde nach Äquilibration der Zellen in den Kammern apikal oder basolateral des

Zelllayers 5 ml Badlösung (Lsg. A oder bei divalenten Potentialmessungen Lsg. K; siehe Anhang) durch die entsprechende Ionenlösung (Lsg. B bis J) ausgetauscht. Nach Erreichen eines konstanten Potentials erfolgte die Rückführung des Potentials durch erneuten Austausch von 5 ml Lösung auf der jeweils anderen Seite. Dadurch wurde ein Konzentrationsausgleich erzielt und das Potential erreichte wieder seinen Ausgangswert.

Berechnungen

Zur Auswertung der gewonnenen Daten wurden folgende Berechnungen vorgenommen. Die gemessene Potentialdifferenz E_{bl-ap} ist die Differenz zwischen dem Potential der basolateralen (φ_{bl}) und der apikalen (φ_{ap}) Membranseite:

$$E_{bl-ap} = \varphi_{bl} - \varphi_{ap}$$

Existiert für eine bestimmte Ionensorte ein Konzentrationsgradient über der Membran, dann wird es eine Tendenz dieser Ionensorte geben, zum Ort der niedrigeren Konzentration zu wandern. Diese Wanderung führt zu einer Veränderung des Transmembranpotentials, dass schließlich eine weitere Abwanderung des Ions verhindert, da das entstandene elektrische Feld als rücktreibende Kraft dem Konzentrationsgradienten entgegen gestellt ist und diesen als Triebkraft aufhebt. Diesen Gleichgewichtszustand kann man mit der Nernst-Gleichung beschreiben:

$$E_{ap-bl} = \varphi_{bl} - \varphi_{ap} = \frac{RT}{zF} \times \ln \frac{[x]_{ap}}{[x]_{bl}}$$

T: 310 K

R: allgemeine Gaskonstante = 8,31451 J mol⁻¹ K⁻¹

z: Wertigkeit des Ions

F: Faraday-Konstante = 9,64853 • 10⁴ C mol⁻¹

E_{bl-ap} ist das Gleichgewichtspotential des Ions X. Die Nernst-Gleichung berücksichtigt nur eine Ionensorte. Biologische Membranen sind aber für mehrere Ionen durchlässig. Jedes Ion hat sein eigenes Gleichgewichtspotential, das für die jeweilige Ionensorte bei gegebenem Konzentrationsverhältnis durch die spezifische Permeabilität der Membran entsteht. Es ist nachvollziehbar, dass das sich einstellende Gesamtpotential einen Wert aufweist, der zwischen den einzelnen Ionen-Gleichgewichtspotentialen liegt. Zur Berechnung der Dilutions- bzw. biionischen Potentiale diente deshalb die Goldman-Gleichung von D.E. Goldman, A.L. Hodgkin und B. Katz erarbeitet.⁹²

$$E_{bl-ap} = s \times \log \frac{P_{Na^+} [Na^+]_{ap} + P_{Cl^-} [Cl^-]_{bl}}{P_{Na^+} [Na^+]_{bl} + P_{Cl^-} [Cl^-]_{ap}}$$

Zur Vereinfachung vereint die Variable s sowohl die Temperatur, Gas- und Faraday-Konstante als auch den Umrechnungsfaktor vom natürlichen in den dekadischen Logarithmus zum Term:

$$s = \frac{R \times T \times 2,303}{F}$$

Aufgelöst nach dem Permeabilitätsverhältnis, erhalten wir folgende Gleichung:

$$E_{bl-ap} = s \times \log \frac{\frac{P_{Na^+}}{P_{Cl^-}} [Na^+]_{ap} + [Cl^-]_{bl}}{\frac{P_{Na^+}}{P_{Cl^-}} [Na^+]_{bl} + [Cl^-]_{ap}}$$

$$\frac{P_{Na^+}}{P_{Cl^-}} = \frac{[Cl^-]_{bl} - 10^{\frac{E}{s}} [Cl^-]_{ap}}{10^{\frac{E}{s}} [Na^+]_{bl} + [Na^+]_{ap}}$$

Zur Berechnung der biionischen monovalenten Potentiale wurde die Goldmangleichung wie folgt ergänzt:

$$E_{bl-ap} = s \times \log \frac{P_{Na^+} [Na^+]_{ap} + P_{Cl^-} [Cl^-]_{bl} + P_x [x]_{ap}}{P_{Na^+} [Na^+]_{bl} + P_{Cl^-} [Cl^-]_{ap} + P_x [x]_{bl}}$$

Lösen wir nun diese nach dem Permeabilitätsverhältnis P_x / P_{Cl^-} auf, erhalten wir nachstehende Gleichung:

$$\frac{P_x}{P_{Cl^-}} = \frac{\frac{P_{Na^+}}{P_{Cl^-}} [Na^+]_{ap} + [Cl^-]_{bl} - 10^{\frac{E}{s}} \left(\frac{P_{Na^+}}{P_{Cl^-}} [Na^+]_{bl} + [Cl^-]_{ap} \right)}{10^{\frac{E}{s}} \times [x]_{ap} - [x]_{bl}}$$

Die einzelnen Permeabilitäten wurden im Verhältnis zur Chloridpermeabilität berechnet. Da sich der Chloridgradient bei der Versuchsdurchführung verändert und dadurch Einfluss auf das Membranpotential nimmt.

Zur Berechnung der Permeabilitäten der divalenten Ionen muss man sich die Herleitung der Goldman-Gleichung vergegenwärtigen. Es werden nun nicht mehr nur einwertige, sondern auch zweiwertige Ionen betrachtet. Die Wertigkeit wird mit der Variablen z dargestellt und ist auch schon in der Nernstgleichung enthalten. Betrachtet man die Flussdichte ϕ einer Ionensorte, so stellt man fest, dass diese von seiner Permeabilität P , Konzentration c , dem transepithelialen Potential E_{bl-ap} sowie seiner Wertigkeit z abhängt.

$$\phi = P \times z \times u \frac{[c]_{bl} e^{zu} - [c]_{ap}}{e^{zu} - 1}$$

Die Variable u dient der mathematischen Abkürzung und steht für das reduzierte transepitheliale Potential.

$$u = \frac{F \times E_{bl-ap}}{R \times T}$$

Zur Vereinfachung wird zudem folgende Abkürzung eingeführt:

$$A = z \times u \frac{[c]_{bl} e^{zu} - [c]_{ap}}{e^{zu} - 1}$$

In einem System in Ruhezustand herrscht ein konstantes transepitheliales Potential. Es fließt kein elektrischer Strom, da dieser zu einer Veränderung des transepithelialen Potentials führen würde.

$$z_x \phi_x + z_{Na} \phi_{Na} + z_{Cl} \phi_{Cl} = 0$$

Setzt man nun die Flussdichten der einzelnen Ionen in die obere Gleichung ein, erhält man folgende Gleichung:

$$0 = z_x \times (P_x \times A_x) + z_{Na} \times (P_{Na} \times A_{Na}) + z_{Cl} \times (P_{Cl} \times A_{Cl})$$

Nun kann die Wertigkeit (z; für die divalenten Kationen z = 2, für Na z = 1 und für Cl z = -1) eingesetzt und die Gleichung nach dem Permeabilitätsverhältnis P_x/P_{Cl} aufgelöst werden. Daraus ergibt sich folgende Gleichung:

$$\frac{P_x}{P_{Cl}} = \frac{-A_{Na} \times z_{Na} - \frac{P_{Na}}{P_{Cl}} \times A_{Cl} \times z_{Cl}}{A_{Mg} \times z_{Mg}}$$

Die relative Permeabilität P_x/P_{Cl} kann somit nur ermittelt werden, wenn auch das Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl} z.B. aus Dilutionspotentialmessungen bekannt ist.

Immunhistochemie und konfokale Lasermikroskopie

Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen ermöglichen die spezifische Darstellung von Strukturen durch Verwendung von Antikörpern. In der vorliegenden Arbeit erfolgten immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Tight Junction-Proteine zur Klärung der Lokalisation dieser Proteine und zur Transfektionskontrolle. In MDCK C7-Zellen wird Occludin endogen exprimiert und ist in den Tight Junction lokalisiert. Deshalb diente es bei allen Färbungen als Referenz für

die Tight Junction. Als zweiter primärer Antikörper diente jeweils das zu untersuchende Claudin oder ein bei der Transfektion eingebauter Marker (HA oder Flag). Außerdem erfolgte stets eine Kernfärbung mit DAPI.

Für die Detektion der primären Antikörper wurden sekundäre anti-Kaninchen- oder anti-Maus-Antikörper genutzt, je nach primärem Antikörper. DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid) ist ein Fluoreszenzfarbstoff und bindet an zelluläre DNA. DAPI hat sein Absorptionsmaximum bei $\lambda=340$ nm, kann aber gut mit 405 nm angeregt werden. Es entstehen dabei stark fluoreszierende Zellkerne, während eine zytoplasmatische Fluoreszenz allenfalls als schwacher unspezifischer Hintergrund in Erscheinung tritt. Die Färbungen wurden wie folgt durchgeführt:

Entfernen des Mediums

2 x Waschen in PBS

Fixierung mittels 4% PFA (20 min) (bei Färbungen von Klonen mit YFP/GFP-getaggen Claudinen) oder mit Methanol bei -20°C (10 min)

2 x Waschen in PBS

Permeabilisieren durch 0.5% Triton-X in PBS für 10 min

2 x Waschen in PBS

Blockieren durch 0,5% BSA-Blockierungslösung 60 min (5% Ziegen Serum)

1. Antikörper-Maus für 60 min bei Raumtemperatur:

Occludin 1:100 verdünnt in Blockierungslösung

2 x Waschen in Blockierungslösung

1. Antikörper-Kaninchen über Nacht bei 4°C :

Claudine 1:100 verdünnt in Blockierungslösung

2 x Waschen in Blockierungslösung

2. Antikörper-Maus/Kaninchen für 45 min bei Raumtemperatur im Dunkeln

1:500 verdünnt in Blockierungslösung

2 x Waschen in Blockierungslösung

Kernfärbung mit DAPI für 10 min im Dunkeln.

Spülen in Aqua bidest.

Spülen in Ethanol (dieser Schritt wurde bei Färbungen von Klonen mit YFP/GFP-getaggen Claudinen übersprungen)

Eindecken mit Mountfluor

Konfokale Laserscanningmikroskopie

Die konfokale Laserscanningmikroskopie ist eine Weiterentwicklung der konventionellen Lichtmikroskopie. Entwickelt wurde das Prinzip von Petran in den Fünfziger Jahren. Sie zeichnet sich aus durch die Möglichkeit optische Schnitte mit definiertem Abstand durch ein Präparat zu setzen. Mit diesen Serienschnitten, auch Stack genannt, sind dreidimensionale Rekonstruktionen möglich.

Betrachtet man im herkömmlichen Lichtmikroskop z.B. ein besonders dickes Präparat, so muss man feststellen, dass die eigentlich im Fokus liegende Information von unscharfen Informationen aus anderen Ebenen – unterhalb oder oberhalb der Fokusebene – überlagert ist. Die konfokale Lichtmikroskopie ermöglicht durch ihren speziellen Aufbau, nur Informationen über die im Fokus stehenden Präparatbereiche zu verwenden.

Die konfokale Lokalisation der Tight junction-Proteine erfolgte mit einem Zeiss LSM 510 META Mikroskop. Zur Anregung dienten drei Laser der Wellenlängen 405 nm, 488 nm und 543 nm. Die Emission wurde mit einem Bandpassfilter der Wellenlängenbereiche 420-480 nm für DAPI, 505-550 nm für den Ziege Anti-Maus-Antikörper sowie mit einem Nebenfärber zur Erfassung der Wellenlängen über 545 nm für den Ziege Anti-Kaninchen-Antikörper detektiert.

Statistik

Die statistische Auswertung der Daten und die Erstellung der Diagramme erfolgte mit dem Programm Excel. Alle Daten wurden als unabhängige Mehrfachbestimmungen erhoben (n = Anzahl). Bei den elektrophysiologischen Messungen erfolgte die Darstellung der ermittelten Werte als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes ("standard error of the mean"; SEM). Zu Gunsten einer besseren Lesbarkeit wurde nur die Anzahl der Messungen in die Abbildungsbezeichnung im Ergebnisteil aufgenommen. Die Mittelwerte und Standardfehler jeder Abbildung sind zur besseren Übersicht in Tabellen im Anhang aufgeführt.

Zur Signifikanztestung wurde bei zwei zu vergleichenden Gruppen der Student's t-Test (ungepaart, zweiseitig) durchgeführt. Beim Vergleich verschiedener Gruppen gegen dieselbe Kontrollgruppe wurde die Bonferroni post-hoc-Korrektur angewendet. Die Nullhypothese wurde auf einem Signifikanzniveau von 5 % abgelehnt ($p < 0,05$).

In den Abbildungen bedeuten: *, *' = $p < 0,05$ und **, '**' = $p < 0,01$.

Ergebnisse

Vorbemerkungen

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden stabile Zellklone hergestellt, die eines der folgenden murinen (m) oder humanen (h) Claudine überexprimierten: mClaudin-10 Variante 1 und 2, die mClaudin-10 V.1 Spleißvariante $\Delta 57$ und die ΔP Mutanten dieser drei Varianten, hClaudin-10 Variante 1 und V.2, hClaudin-11, hClaudin-16 sowie hClaudin-19 Variante 1 und V.2. Die Transfektionskontrolle erfolgte mittels Westernblot, immunhistochemischen Färbungen und RNA-Nachweis. Die Zellklone, bei denen die transfizierten Claudine in der Tight Junction nachgewiesen werden konnten, wurden auf ihre elektrophysiologische Funktion hin untersucht. Dabei wurden neben Versuchen in der Ussingkammer auch immunhistochemische Färbungen zur Klärung ihrer Lokalisation und Kolokalisation angefertigt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit galt das Interesse den Wechselwirkungen zwischen den Claudinen. Dafür wurden die im ersten Teil stabil transfizierten Klone in Kokultur auf Filtern kultiviert und folgend ihr elektrophysiologisches Verhalten analysiert. Die gleichmäßige Verteilung der Klone auf dem Filter wurde durch immunhistochemische Färbungen bestätigt.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden stabile Zellklone hergestellt, die jeweils zwei Claudine überexprimierten. Dadurch sollten Zellen entstehen, die eine ähnliche Komposition an Claudinen aufweisen wie die Tubuluszellen des dicken aufsteigenden Astes der Henle-Schleife. Da unsere Basiszelllinie, die MDCK C7-Zellen, endogen Claudin-3 exprimierten, entstanden Zellklone, die sowohl Claudin-3 als auch Claudin-16 und -10 V.1 bzw. Claudin-16 und -10 V.2 exprimierten. Die Transfektionskontrolle erfolgte mittels Westernblot, immunhistochemischen Färbungen und RNA-Nachweis. Im Folgenden wurde die Funktion dieser Zellen in nachstehender Weise elektrophysiologisch charakterisiert.

Zur elektrophysiologischen Untersuchung wurden Dilutions- und biionische Potentiale im Ussingkammer-Versuchsaufbau gemessen und die Permeabilitäten für die jeweiligen Ionen berechnet. Die Darstellung der Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen erfolgt zur besseren Übersicht in den oben schon skizzierten Abschnitten: die einzelnen Claudine, die Kokulturen und die Kotransfektionen. Diese Abschnitte können in drei Bereiche unterteilt werden: (i) die transepithelialen Widerstände der transfizierten MDCK C7-Zellen, (ii) die Dilutionspotentiale, (iii) die biionischen Potentiale monovalenter und divalenter Kationen. Zur besseren Lesbarkeit der Ergebnisse und des Textes werden Balkendiagramme zur Darstellung

genutzt. Im Anhang befinden sich in analoger Anordnung Tabellen mit den jeweiligen Mittelwerten, Anzahl der Messungen und Standardfehlern.

Die Zellklone der einzelnen Claudine

Wie im Methodenteil beschrieben wurde die DNA-Sequenz der jeweiligen Claudine aus menschlicher cDNA isoliert, mittels Blau-Weiß-Selektion kloniert, in den Transfektionsvektor umklont und dieser in MDCK C7-Zellen stabil transfiziert. Für die Claudine 10 V.1 und Variante 2 diente eine humane Genpool-cDNA als Matrize, für Claudin-19 V.1 eine cDNA aus der menschlichen Niere, für Claudin-19 V.2 aus dem menschlichen Auge. Die Claudin-11-Klone, GFP- und FLAG-getagged sowie die Claudin-16-Klone, HA- und FLAG-getagged wurden mir von PD Dr. Dorothee Günzel und PD Dr. Salah Amasheh, Institut für Klinische Physiologie, Berlin, freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

Westernblot-Analysen, immunhistochemische Färbungen und mRNA-Extraktion bestätigten die gelungenen Transfektionen. Untersuchungen zur Lokalisation in der Zelle wurden mittels immunhistochemischen Färbungen vorgenommen. Alle Claudine konnten in den Tight Junctions und kolokalisiert mit Occludin nachgewiesen werden.

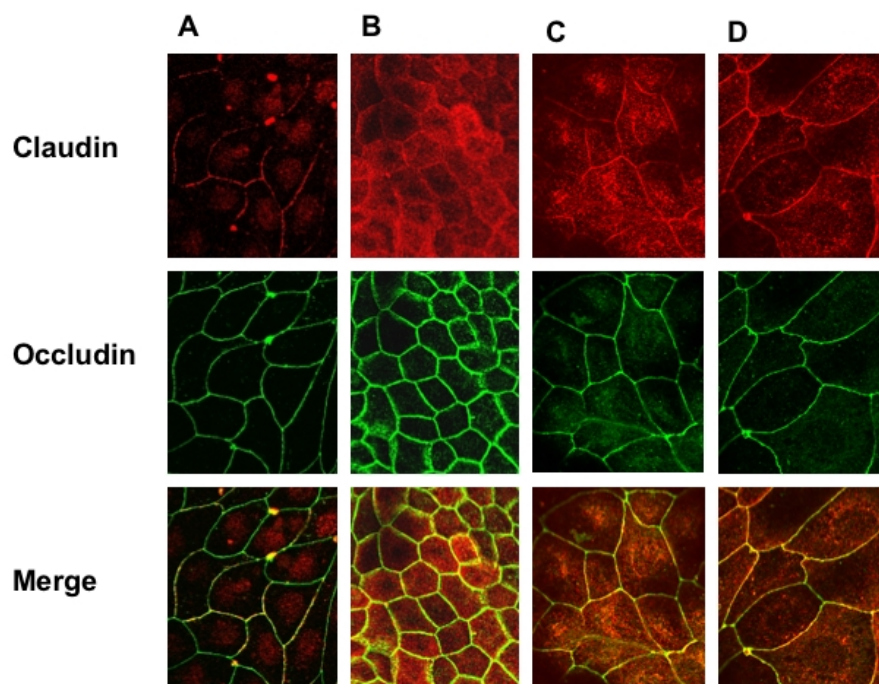


Abbildung 3-1
Immunhistochemische Färbungen der Claudin Klone.
A: Claudin-11
B: Claudin-16
C: Claudin-19 V.1
D: Claudin-19 V.2

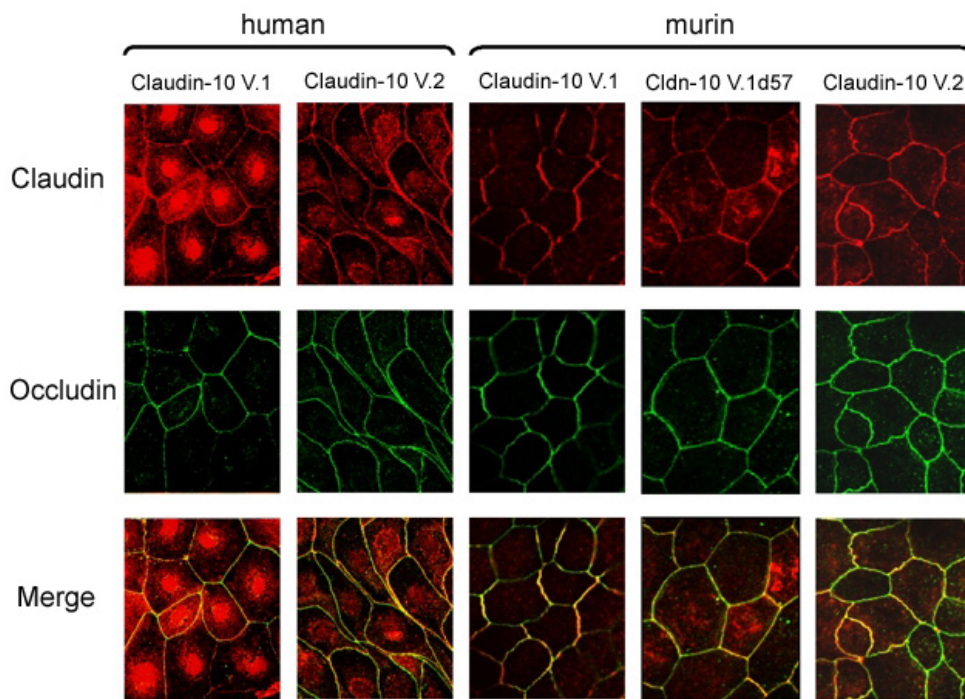


Abbildung 3-2
 Immunhisto-
 chemische
 Färbungen
 der Claudin-
 10 Klone.

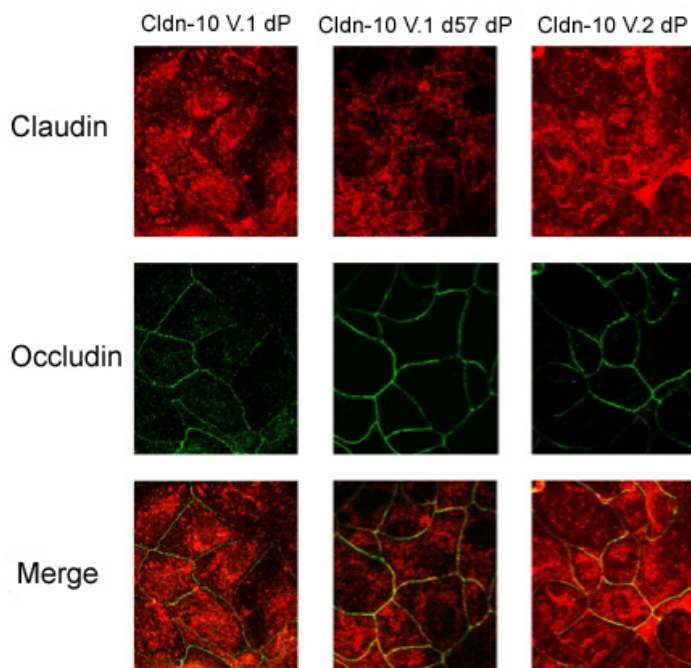


Abbildung 3-3
 Immunhisto-
 chemische
 Färbungen der Claudin-10
 Klone mit Deletion des
 PDZ-Bindungsmotivs (dP).

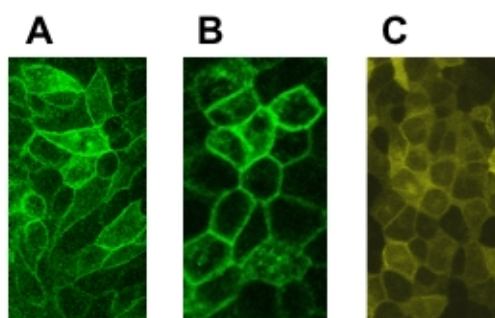


Abbildung 3-4
 Die fluoreszierenden
 Claudine.
 A: Claudin-16 (YFP)
 B: Claudin-11 (GFP)
 C: Claudin-10 V.2 (YFP)

MDCK C7-Kontrollzellen

Widerstand

Die MDCK C7-Zellen sind hochohmige Zellen ($\approx 2000 \Omega\text{cm}^2$). Wie Abbildung 0-3 zeigt bewegten sich ihre Widerstände in einem Bereich zwischen 1500 und 2600 Ωcm^2 . Bei dem verwendeten Leervektor handelt es sich um einen pcDNA3.1-Vektor mit HA-Tagg. Da jedoch einige der Zellklone auch GFP- oder YFP-getagged sind, wurde analog dazu eine GFP-YFP-Kontrolle hergestellt. Beide dienten als Kontrollzellen. In allen folgenden Diagrammen werden die Mittelwerte mit Fehlerindikator (Standardfehler) dargestellt.

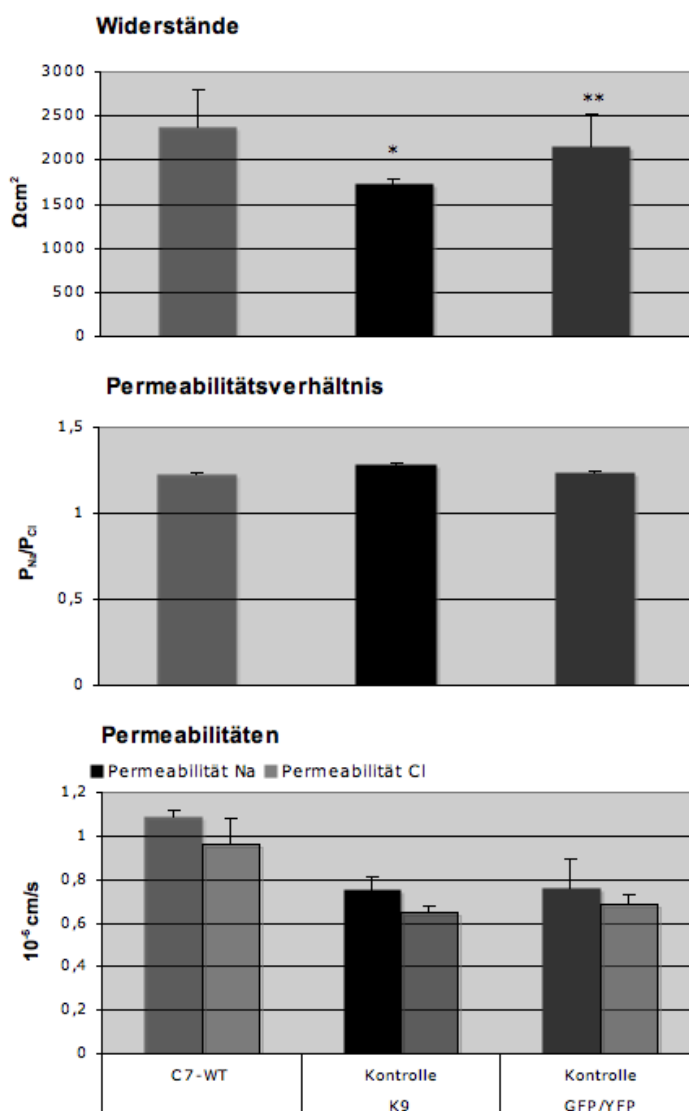


Abbildung 3-5
Widerstände, Na^+/Cl^-
Permeabilitätsverhältnis
sowie die absoluten
Permeabilitäten für
Natrium und Chlorid der
MDCK C7-Kontrollzellen.

Anzahl der Messungen:
C7-WT n=2, K9 n=67, GFP-
K n= 34

Dilutionspotential

Mit Hilfe der Dilutionspotentiale konnte das Verhalten des Zelllayers gegenüber den beiden wichtigsten Ionen für den transepithelialen Strom, Natrium (Na^+) und Chlorid (Cl^-), erfasst

werden. Folgend wurde wie im Methodenteil dargestellt das Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl} sowie die absoluten Permeabilitäten P_{Na} und P_{Cl} berechnet. Die K9 Kontrollzellen zeigten ein marginal erhöhtes Permeabilitätsverhältnis gegenüber den Wildtyp Zellen (C7-WT), sowie den GFP-/YFP-transfizierten Zellen. Betrachtet man die absoluten Permeabilitäten in der Abbildung 3-5 wird deutlich, dass hier jedoch nur geringe Unterschiede auftraten. Die Wildtyp-Zellen wiesen im Vergleich zu den Leervektor-Kontrollzellen gleichmäßig erhöhte Einzelpermeabilitäten auf. Aufgrund der geringen Anzahl der Messungen konnten jedoch keine statistischen Tests angewendet werden. Hier sind weitere Versuche durchzuführen.

Biionische monovalente und divalente Potentiale

Die monovalenten biionische Potentiale wurden für folgende einwertige Ionen durchgeführt: Lithium (Li^+), Natrium (Na^+), Kalium (K^+), Rubidium (Rb^+) und Caesium (Cs^+). Wie im Methodenteil beschrieben wurden die einzelnen Permeabilitäten mit Hilfe der Goldman-Hodgkin-Gleichung berechnet. Aufgrund der Stabilität der Chloridpermeabilität wurden alle Kationen-Permeabilitäten auf diesen Wert bezogen.

Durch eine Reihung der Permeabilitäten erhält man das Permeabilitätsvermögen für die oben genannten Ionen. Die K9 Kontrollzellen waren für Kaliumionen durchlässiger als für Rubidiumionen, für Rubidiumionen durchlässiger als für Caesium- und Natriumionen und am wenigsten durchlässig für Lithiumionen ($K > Rb > Cs = Na > Li$). Betrachtet man Abbildung 3-4 fällt eine unterschiedliche Präferenz der Zelllayer auf. Aufgrund der geringen Versuchsanzahl kann keine Aussage über die Gewichtung vorgenommen werden. Wahrscheinlich entstehen die Abweichungen durch unterschiedliche Widerstände einzelner Filter. Für die Leervektor-transfizierten Zellklone konnte wie oben erwähnt die Sequenz $K > Rb > Cs = Na > Li$ festgelegt werden.

Zur Untersuchung des Verhaltens unserer Kontrollzellen und der unterschiedlichen Klone gegenüber divalenten Ionen, wurden ebenfalls biionische Potentialmessungen durchgeführt, jedoch mit zweiwertigen Ionen. Wie im Methodenteil ausführlich beschrieben, wurde zur Berechnung der Permeabilitäten divalenter Kationen das gemessene Dilutionspotential benötigt. Deshalb erfolgte zuerst eine Dilutionspotential-Messung und nach Stabilisation des transepithelialen Potentials, die Messung des Potentials für divalente Ionen. Als divalente Ionen wurden Magnesium (Mg^{2+}), Calcium (Ca^{2+}), Strontium (Sr^{2+}) und Barium (Ba^{2+}) gewählt. Die MDCK C7-Kontrollzellen, K9 und GFP-K, zeichneten sich durch folgende Permeabilitätssequenz aus: Magnesium besser als Calcium, Calcium besser als Strontium und

Strontium besser als Barium. Die Bariumpermeabilität schwankte bei den K9 Zellklonen sehr, so dass eine Einordnung nicht möglich war.

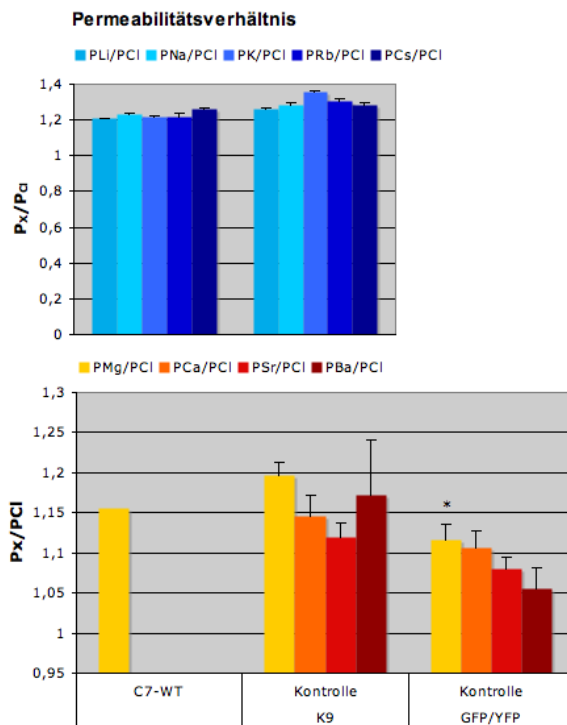


Abbildung 3-6

Permeabilitätsverhältnisse P_x/P_{Cl} der MDCK C7-Kontrollzellen für divalente und monovalente Ionen.

Anzahl der Messungen für Lithium: K9 n=22, C7-WT n=2; Kalium: K9 n=25, C7-WT n=2; Rubidium: K9 n=21, C7-WT n=2; Caesium: K9 n=21, C7-WT n=2; Magnesium: K9 n=15, GFP-K n=9; Calcium: K9 n=11, GFP-K n=9; Strontium: K9 n=14, GFP-K n=6; Barium: K9 n=10, GFP-K n=7

Claudin-10

Widerstand

Vorerst wurden die murinen und humanen Claudin-10 Varianten untersucht. Exprimierten die MDCK C7-Zellen murines Claudin-10 Variante 1 kam es zu einer signifikanten Erhöhung ($p < 0,05$) des transepithelialen Widerstandes, wobei die Expression der zweiten Variante zu einer signifikanten Erniedrigung ($p < 0,01$) des Widerstandes führte. Wie in Abbildung 3- ersichtlich handelte es sich um eine Erniedrigung auf ein Zehntel des Kontrollwertes. Diese Widerstandsverminderung konnte bei den murinen als auch bei den humanen Klonen nachgewiesen werden. Interessanter Weise zeigten die humanen Claudin-10 V.1-Klone einen erniedrigten Widerstand ($p < 0,01$) im Vergleich zu den Kontrollzellen und den murinen Klonen dieses Claudins (Abbildung 3-). Zu Beachten sind die unterschiedlichen Widerstände der YFP- und FLAG-getaggten humanen Claudin-10 V.2-Klone. Die Anwesenheit des YFP-Elements am N-Terminus des Claudins führte zu einer wesentlich schwächeren Widerstandserniedrigung. Folgend wurden verschiedene murine Claudin-10 Varianten untersucht. Neben den vollständigen Proteinen interessierten besonders die in Mäusen und Menschen vorkommenden Proteine der Splice- und Mutationsvarianten.

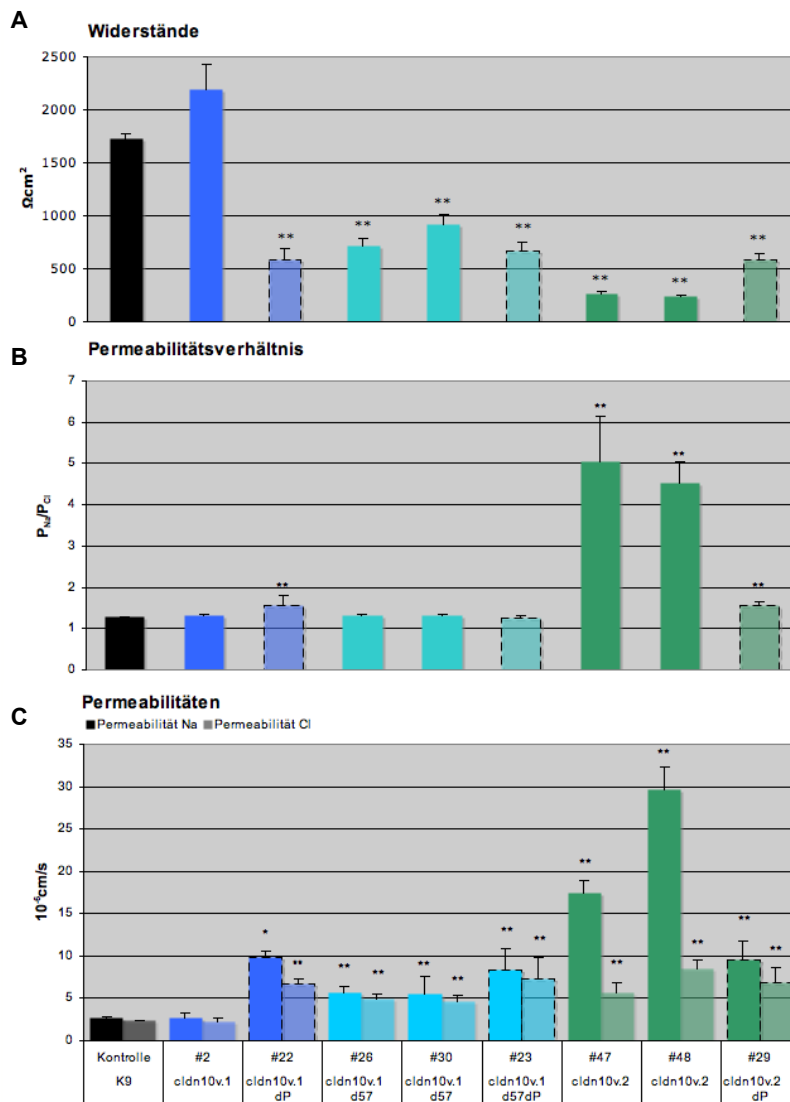


Abbildung 3-7
Widerstände,
Permeabilitätsverhältnis
 $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$, sowie absolute
Permeabilitäten der
murinen Claudin-10-Klone
und deren
Deletionsmutanten.

Anzahl der Messungen: (A) K9
n= 157, #2 n=11; #22 n=15;
#26 n= 31; #30 n=39; #23
n=16; #47 n=27; #48 n=40;
#29 n=16. (B,C) K9 n=67; #2
n=4; #22 n=6; #26 n=15; #30
n=15; #23 n=3; #47 n=11; #48
n=23; #29 n=4.

Hierbei untersuchten wir unter anderem eine Claudin-10 Variante mit Deletion von 57 Basenpaaren im Exon 1B, d.h. innerhalb des ersten extrazellulären Loops ($\Delta 57$). Die Abbildung 3-7 zeigt deutlich die verminderten Widerstände des Claudin-10 V.1 $\Delta 57$ -Klons, im Vergleich zu dem Claudin-10 V.1-Klon und den Kontrollzellen. Interessanter Weise zeigten die künstlich erzeugten Mutanten mit einem PDZ-Bindemotivs (ΔP), das keine Affinität mehr zur PDZ-Bindungsdomäne des ZO-1 aufweist, ebenfalls einen herabgesetzten Widerstand. Jedoch kam es nur bei den Claudin-10 V.1-Klon im Vergleich zu dem Claudin-10 V.1 ΔP -Klon zu einem signifikanten Unterschied (#2: $2186 \pm 849 \Omega\text{cm}^2$; #23: $719 \pm 394 \Omega\text{cm}^2$, $p < 0,01$). Die Mutation des Bindungsmotivs (gerahmter Balken in Abbildung 3-7) führte bei den Claudin-10 V.1 $\Delta 57$ -Klonen zu keiner erneut signifikanten Verminderung des Widerstandes. Der Verlust des PDZ-Bindemotivs des Claudin-10 V.2 hingegen führte zu einem signifikanten Anstieg ($p < 0,01$) des

Widerstandes gegenüber den Claudin-10 V.2-Klonen. Gegenüber den Kontrollzellen zeigte sich weiterhin eine Widerstanderniedrigung (Abbildung 3-7).

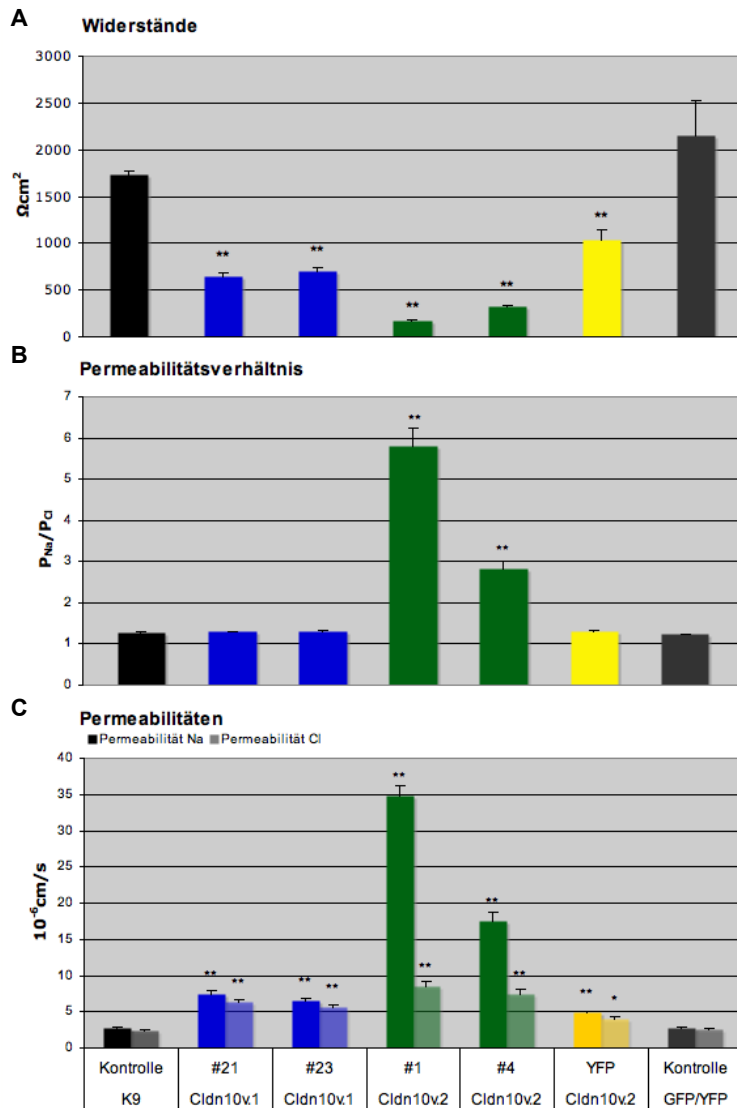


Abbildung 3-8

Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl} , sowie absolute Permeabilitäten für Natrium und Chlorid der humane Claudin-10-Klone.

Anzahl der Messungen: (A) K9 n=157; #21 n=54; #23 n=45; #1 n=109; #4 n=42; YFP n=13; GFP-K n=34. (B,C) K9 n=67; #21 n=33; #23 n=26; #1 n=60; #4 n=21; YFP n=4; GFP-K n=34.

Dilutionspotential

Die Claudin-10 V.1 überexprimierenden Zellen zeigten keine Veränderung des P_{Na}/P_{Cl} - Permeabilitätsverhältnisses. Die Claudin-10 Variante 2 überexprimierenden Zellen hingegen zeichneten sich durch eine deutliche Erhöhung ($p < 0,01$) des Permeabilitätsverhältnisses aus. Diese Permeabilitätserhöhung wird durch eine Verzehnfachung der Permeabilität für Na^+ -Ionen hervorgerufen. Dieses Verhalten konnte nicht nur bei den murinen Varianten beobachtet werden, sondern auch bei den humanen Klonen (Abbildung 3-7, Abbildung 3-8) und bildete gleichzeitig die Grundlage für die Widerstanderniedrigung. Interessanter Weise führte die Expression des YFP-getagged Claudin-10 V.2 Proteins zu einem abgeschwächten Anstieg ($p < 0,01$) der Einzelpermeabilitäten und zu keiner signifikanten Veränderung des P_{Na}/P_{Cl} -

Permeabilitätsverhältnisses (Abbildung 3-8). Die Claudin-10 V.1-Klone, murin oder human, wiesen verglichen mit den Kontrollzellen in den absoluten Permeabilitäten eine leichte Erhöhung ($p < 0,01$) der Einzelpermeabilitäten auf. Dieser Anstieg war für beide Ionen gleichsinnig, deshalb veränderte sich das Permeabilitätsverhältnis nicht. Betrachtet man die murinen Claudin-10 Mutationsvarianten, zeigt die Abbildung 3-7, dass neben dem ΔP -Klon der $\Delta 57$ -Variante, der keine signifikante Veränderung zeigte, die beiden anderen ΔP -Klone durchaus Veränderungen aufwiesen. Die Mutation des PDZ-Bindemotivs führte bei dem Variante 2 ΔP -Klon trotz Widerstandserhöhung zu einer starken Erniedrigung der Permeabilität. Für den ΔP -Klon der Variante 1 konnte eine Permeabilitätssteigerung verzeichnet ($p < 0,01$) werden. Zwar waren beide Einzelpermeabilitäten erhöht, jedoch war die Natriumpermeabilität im Vergleich stärker angestiegen. Der Verlust des Bindungsmotivs der Claudine scheint zu einer allgemeinen Permeabilitätssteigerung der Tight Junction zu führen.

Bionische monovalente und divalente Potentiale

Die Abbildung 3-9 zeigt das Permeabilitätsverhältnis P_X/P_{Cl} der murinen Claudin-10-Klone für mono- und divalente Ionen. Bei den murinen Variante 1- und V.1 $\Delta 57$ -Klonen konnten keine signifikanten Veränderungen der Ionenpermeabilitäten im Vergleich zu den Kontrollzellen nachgewiesen werden. Interessanter Weise zeigte der Claudin-10 V.1 ΔP -Klon eine signifikante Erhöhung ($p < 0,01$) der Permeabilitätsverhältnisse für monovalente Ionen gegenüber den Kontrollzellen, nicht jedoch die Mutationsvariante des $\Delta 57$ -Klons. Bezieht man diese Veränderungen auf den Claudin-10 V.1-Klon fiel das Permeabilitätsverhältnis P_{Li}/P_{Cl} ($p < 0,01$) sowie P_K/P_{Cl} ($p < 0,05$) durch eine signifikante Erhöhung auf. Die Natriumpermeabilität war dagegen nicht signifikant erhöht. In der Abbildung 3-9 sind auch die Permeabilitätsverhältnisse für die Claudin-10 V.2-Klone und deren Mutationsvariante aufgeführt. Hier fiel besonders die signifikante Permeabilitätssteigerung ($p < 0,01$) für mono- als auch divalente Ionen der Claudin-10 V.2-Klone gegenüber den Kontrollzellen auf. Der Claudin-10 V.2 ΔP -Klon zeigte ebenfalls signifikante Unterschiede verglichen mit den Kontrollzellen oder den Claudin-10 V.2-Klonen (Lithium: $p < 0,01$; Natrium: $p < 0,05$; Kalium: $p < 0,01$; Rubidium: $p < 0,05$; Caesium: nicht sig.). Dieser Klon zeigte zwar eine Permeabilitätssteigerung, verlor jedoch die für die Variante 2 spezifische Präferenzsequenz. In den ersten Experimenten für divalente Ionen konnte keine signifikante Permeabilitätssteigerung verzeichnet werden. Aufgrund der geringen Anzahl der Messungen kann jedoch keine definitive Aussage getroffen werden. Die Abbildung 3-10 zeigt die Permeabilitätsverhältnisse der humanen Claudin-10-Klone. Betrachtet man die Abbildungen 3-9 und 3-10 im Vergleich wird das gleichsinnige Verhalten der murinen und humanen Klone

deutlich. Die humanen Claudin-10 V.1-Klone zeigten ein Kontroll-ähnliches Verhalten, die humanen Claudin-10 V.2-Klone die spezifische Permeabilitätssteigerung.

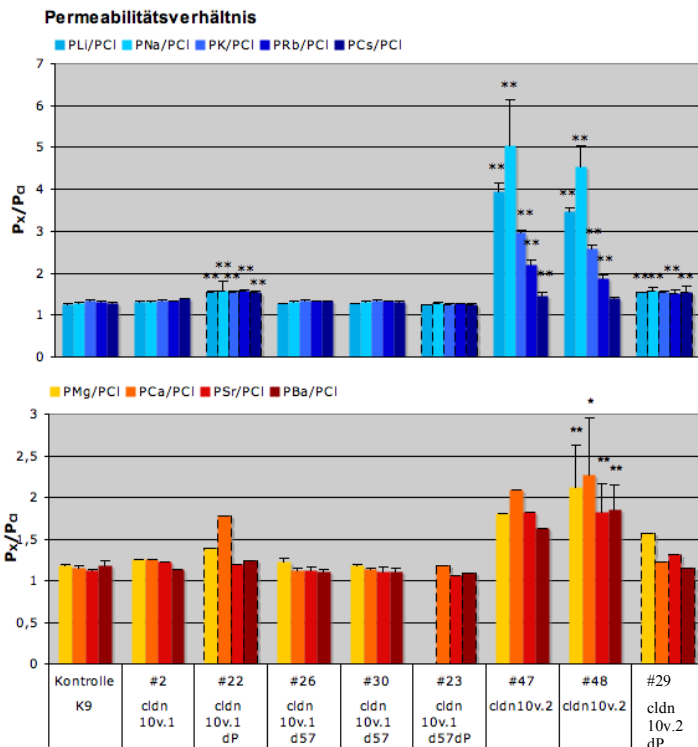


Abbildung 3-9
Permeabilitätsverhältnisse P_x/P_{Cl} der murinen Claudin-10-Klone für mono-valente und divalente Ionen.

Anzahl der Messungen für Lithium: K9 n=22; #2 n=2; #22 n=3; #26 n=3; #30 n=6; #23 n=3; #47 n=3; #48 n=4; #29 n=3; Natrium: K9 n=75, #2 n=4, #22 n=6, #26 n=15, #30 n=15, #23 n=3 #47 n=11; #48 n=23; #29 n=4; Kalium: K9 n=25, #2 n=3, #22 n=2, #26 n=4, #30 n=6, #23 n=3, #47 n=4, #48 n=4, #29 n=3; Rubidium: K9 n=21, #2 n=1, #22 n= 2, #26 n=4, #30 n=6, #23 n=3 #47 n=5, #48 n=5, #29 n=3; Caesium: K9 n=21, #2 n=1, #22 n= 3, #26 n=5, #30 n=6, #23 n=3, #47 n=4, #48 n=3, #29 n=3; Magnesium: K9 n=16, #2 n=1, #22 n=1, #26 n=5, #30 n=4, #23 n=1, #47 n=1, #48 n=8, #29 n=1; Calcium: K9 n=14, #47 n=1, #48 n=7, #29 n=1, #2 n=1, #22 n=1, #26 n=3, #30 n=3, #23 n=1; Strontium: K9 n=16, #2 n=1, #22 n=1, #26 n=3, #30 n=3, #23 n=1, #47 n=1, #48 n=6, #29 n=1; Barium: K9 n=12, #2 n=1, #22 n=1, #26 n=3, #30 n=3, #23 n=1, #47 n=1, #48 n=6, #29 n=1.

Interessanter Weise konnte diese bei dem YFP-getaggten Variante 2-Klon nicht nachgewiesen werden. Das YFP-Element am N-Terminus des Claudins führte zu einem Verlust der spezifischen Präferenzsequenz. Der ΔP-Klon der Variante 1 zeigte analog der vorhergehenden Ergebnisse einen Anstieg der Permeabilitäten, der ΔP-Klon der Δ57-Variante keine Veränderungen. Hier müssen jedoch weitere Versuche erfolgen.

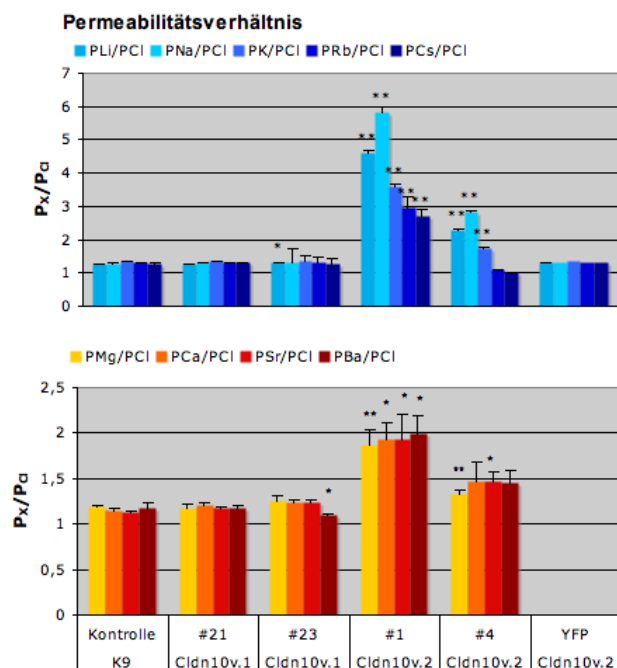


Abbildung 3-10
Permeabilitätsverhältnisse P_x/P_{Cl} der humanen Claudin-10 Klone für mono-valente und divalente Ionen.

Anzahl der Messungen für Lithium: K9 n=22, #21 n=5, #23 n=6, #1 n=12, #4 n=6, YFP n=2; Natrium: K9 n=75, #21 n=33, #23 n=26, #1 n=60, #4 n=21, YFP n=3; Kalium: K9 n=21, #21 n=6, #23 n=6, #1 n=13, #4 n=5, YFP n=3; Rubidium: K9 n=25, #21 n=6, #23 n=5, #1 n=10, #4 n=4, YFP n=2; Caesium: K9 n=25, #21 n=6, #23 n=4, #1 n=13, #4 n=6, YFP n=3; Magnesium: K9 n=15, #21 n=8, #23 n=5, #1 n=15, #4 n=4; Calcium: K9 n=11, #21 n=8, #23 n=7, #1 n=14, #4 n=5; Strontium: K9 n=14, #21 n=8, #23 n=6, #1 n=14, #4 n=5; Barium: K9 n=10, #21 n=7, #23 n=6, #1 n=14, #4 n=5.

Claudin-11

Widerstand

Die Claudin-11-Klone unterschieden sich innerhalb ihrer transepithelialer Widerstände ohne signifikante Veränderungen aufzuweisen. Einige zeigten keine Widerstandsänderung, andere einen erniedrigten Widerstand. Dabei gab es keine Korrelation zwischen den unterschiedlichen Konstrukten und den gemessenen Widerständen. Sowohl in der Charge der GFP-getaggtten als auch in der mit FLAG-getaggtten Klonen wiesen Zellfilter einen erniedrigten transepithelialen Widerstand auf. Die Abbildung 3-11 (A) zeigt deutlich dieses inhomogene Verhalten.

Dilutionspotential

Die Claudin-11-Klone zeigten auch bei den Dilutionspotentialen kein gleichsinniges Verhalten. Betrachtet man die Balkendiagramme (B) und (C) der Abbildung 3-11 stellt man eine signifikante Erhöhung des P_{Na}/P_{Cl} -Permeabilitätsverhältnis bei dem Klon #18 ($p < 0,01$) fest.

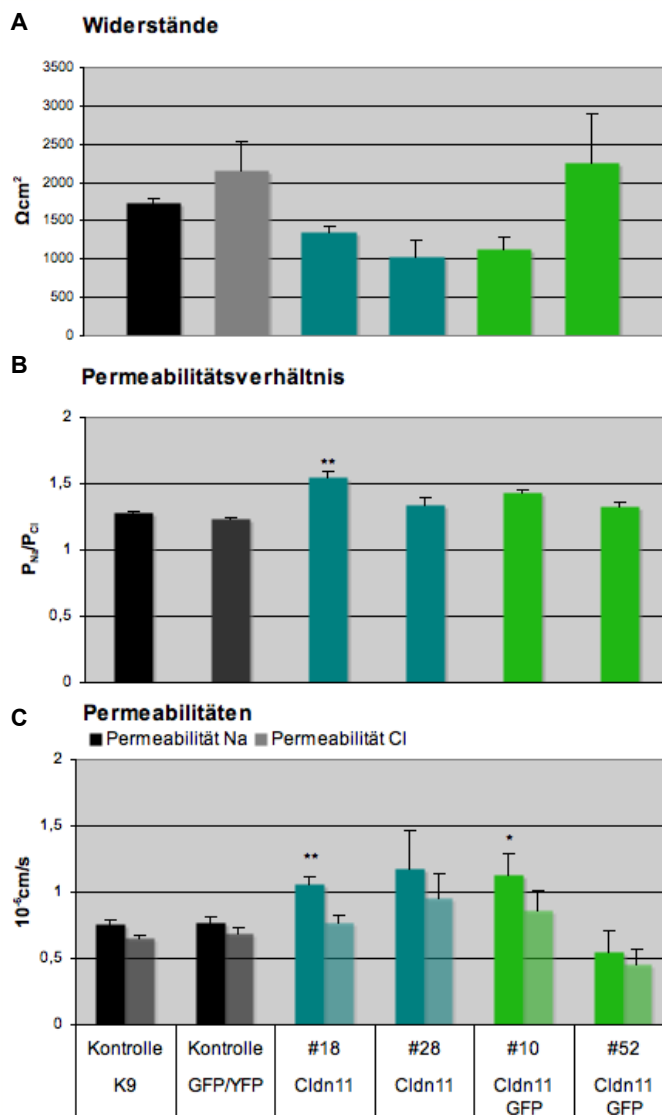


Abbildung 3-11
Widerstände,
Permeabilitätsverhältnis
 P_{Na}/P_{Cl} , sowie absolute
Permeabilitäten für
Natrium und Chlorid
der Claudin-11-Klone,
FLAG-getaggted
und GFP-getaggted.

Anzahl der Messungen:
(A) K9 n=67, GFP-K n=34,
#18 n=19, #28 n=4, #10
n=23, #52 n=12;
(B,C) K9 n=67, GFP-K
n=34, #18 n=19, #28 n=4,
#10 n=23, #52 n=12.

Der Klon #28 wies zwar ebenfalls einen niedrigsten transepithelialen Widerstand auf, zeigte jedoch keine Veränderung des Permeabilitätsverhältnisses, so dass ein unspezifischer Effekt nicht auszuschließen ist. Die absoluten Permeabilitäten zeigen die signifikant erhöhte Natriumpermeabilität der Klone #18 und #10, die ursächlich für den Anstieg des Permeabilitätsverhältnisses ist. Die Chloridpermeabilität veränderte sich nicht signifikant. Interessanter Weise scheint hier das N-Terminale getaggte GFP im Gegensatz zum YFP-Tag der Claudin-10 V.2 transfizierten Zellen keine Auswirkungen auf die Natrium- oder Chloridpermeabilität zu haben.

Biionische monovalente und divalente Potentiale

Der Claudin-11-Klon #18 zeigte eine signifikante Erhöhung ($p < 0,01$) der Permeabilitätsverhältnisse P_X/P_{Cl} der monovalenten Ionen verglichen mit den Kontrollzellen (Abbildung 3-12). Bei den Experimenten zu der Ionenpermeabilität für zweiwertige Ionen konnte kein einheitliches Bild gewonnen werden. Auch hier unterschieden sich die Konstrukte. Die leichte Erhöhung der Magnesium- und Bariumpermeabilität des Klons #18 ist nicht signifikant. Aufgrund der geringen Anzahl an Messungen konnten beim Klon #10 keine statistischen Tests angewendet werden.

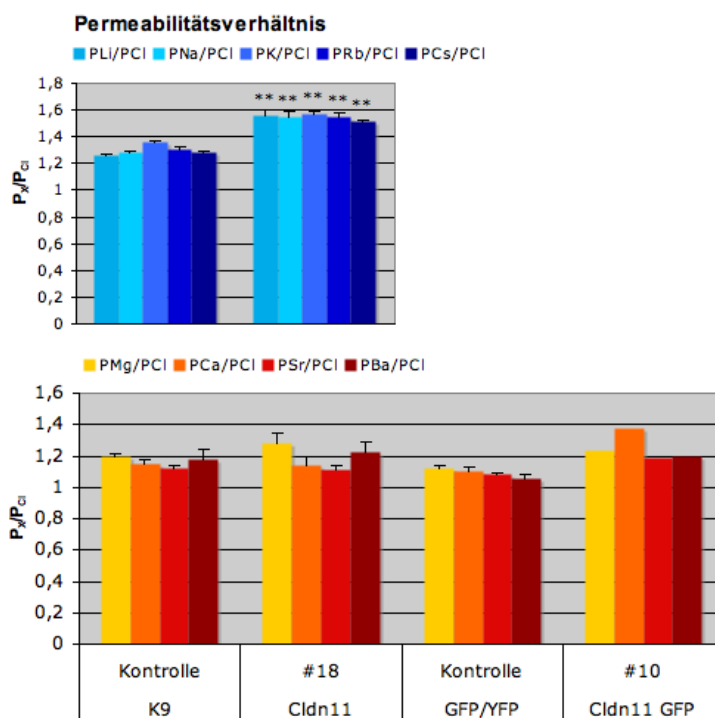


Abbildung 3-12

Permeabilitätsverhältnisse P_X/P_{Cl} der Claudin-11-Klone für monovalente und divalente Ionen.

Anzahl der Messungen für Lithium: K9 n=22, #18 n=3; Kalium: K9 n=25, #18 n=3; Rubidium: K9 n=21, #18 n=2; Caesium: K9 n=21, #18 n=3; Magnesium: K9 n=16, #18 n=5, GFP-K n=9, #10 n=1; Calcium: K9 n=14, #18 n=5, GFP-K n=9, #10 n=1; Strontium: K9 n=16, #18 n=4, GFP-K n=6, #10 n=1; Barium: K9 n=12, #18 n=5, GFP-K n=7, #10 n=1.

Claudin-16

Widerstand

Da in den weiteren Teilen dieser Arbeit Kokulturen und Kotransfektionen mit verschiedenen Claudinen sowie dem Claudin-16 vorgenommen wurden, werden hier auch die Ergebnisse der Claudin-16 Einzel-Untersuchungen aufgeführt. Die folgende Abbildung 3-13 (A) zeigt die trans-

epithelialen Widerstände der Claudin-16-Klone. Sie führten zu keiner signifikanten Veränderung des Widerstandes der Zellschicht. Die Erniedrigung des YFP-getaggten Klones ist nicht signifikant.

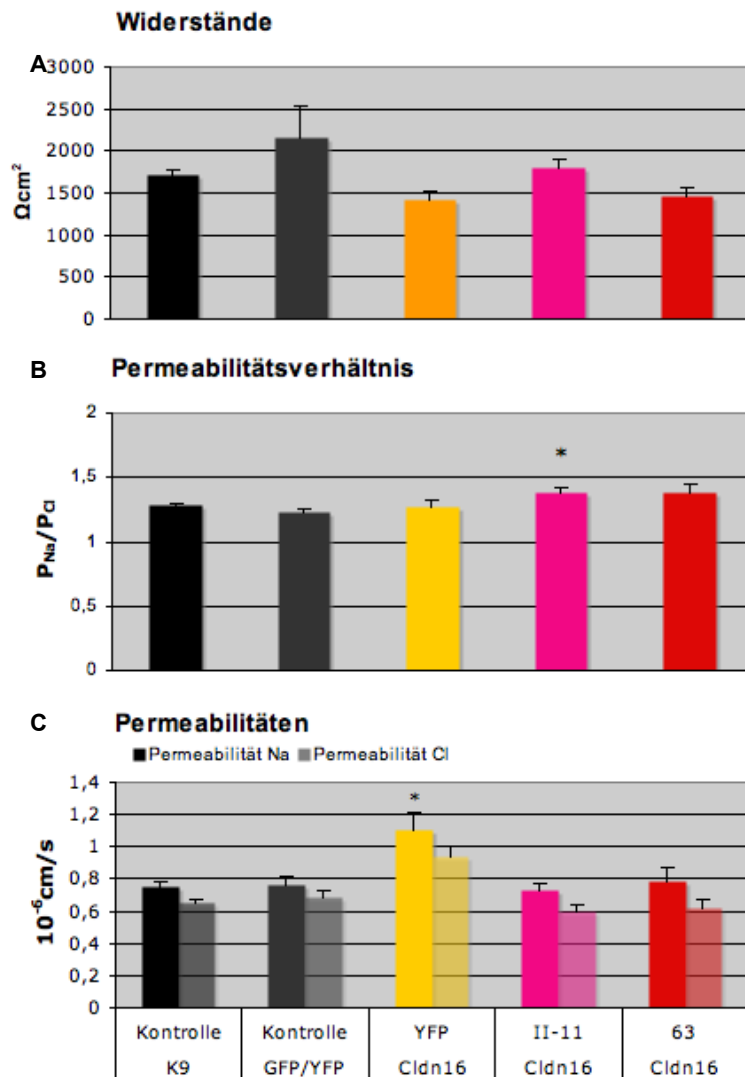


Abbildung 3-13

Widerstände, Permeabilitätsverhältnis $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$, sowie absolute Permeabilitäten für Natrium und Chlorid der Claudin-16-Klone, FLAG-getaggged und YFP-getaggged.

Anzahl der Messungen:
(A) K9 n=75, GFP-K n=34, YFP n=4, II-11 n=37, #63 n=6,
(B,C) K9 n=170, GFP-K n=34, YFP n=18, II-11 n=55, #63 n=14.

Dilutionspotential

Die FLAG-getagggeden Claudin-16-Zellen zeigten ein signifikant erhöhtes Permeabilitätsverhältnis $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ ($p < 0,01$). Diese Erhöhung konnte bei den YFP- und HA-getagggeden Claudin-16 exprimierenden Klonen nicht nachgewiesen werden. Die absoluten Permeabilitäten für Natrium und Chlorid waren bei den Claudin-16-Klonen, FLAG- oder HA-getaggged, im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht signifikant erhöht. Nur der Zellklon, der das YFP-getagggedte Claudin-16 überexprimiert, zeigte eine signifikant erhöhte Natriumpermeabilitäten ($p < 0,01$). Jedoch wiesen die verwendeten Filter einen niedrigeren Widerstand ($1032 \pm 199 \Omega\text{cm}^2$) auf als bei anderen Messungen ($1415 \pm 448 \Omega\text{cm}^2$).

Biionische monovalente und divalente Potentiale

Die Claudin-16-Klone zeigten heterogene Veränderungen hinsichtlich der Permeabilität für die monovalenten Ionen im Vergleich zu den Leervektor-transfizierten Zellen (Abbildung 3-14). Die Claudin-16-Klone wiesen folgende Permeabilitätspräferenz auf: Kalium > Natrium > Lithium > = Rubidium > = Caesium. Das Permeabilitätsverhältnis P_{Rb}/P_{Cl} unterschied sich innerhalb der Claudin-16-Klone nicht signifikant. Der YFP-getaggte Klon wies ein stark den Kontrollzellen ähnelndes Verhalten auf. Die Abbildung 3-14 zeigt außerdem das Permeabilitätsverhältnis P_X/P_{Cl} für zweiwertige Ionen. Die Claudin-16-Klone verhielten sich hinsichtlich der divalenten Ionen heterogen. Aufgrund der zu geringen Stichprobenzahl kann für den Klon #63 keine statistische Aussage getroffen werden. Die Expression von Claudin-16 bei Klon II-11 führte zu einer signifikanten Erhöhung ($p < 0,05$) des Permeabilitätsverhältnisses P_{Mg}/P_{Cl} , gegenüber den Kontrollzellen.

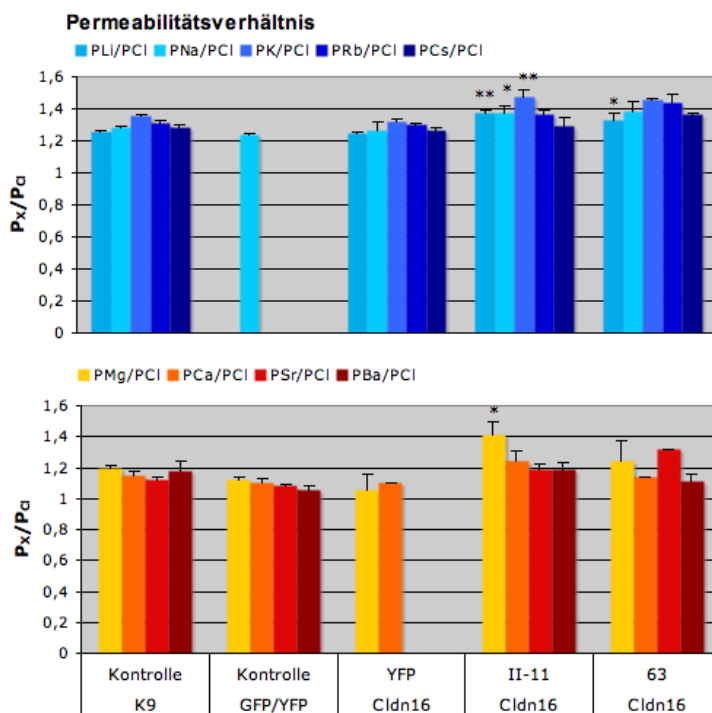


Abbildung 3-14

Permeabilitätsverhältnisse P_X/P_{Cl} der Claudin-16-Klone für monovalente und divalente Ionen.

Anzahl der Messungen für Lithium: K9 n=23, YFP n=4, II-11 n=2, #63 n=2; Natrium: K9 n=170, GFP-K n=34, YFP n=18, II-11 n=55, #63 n=14; Kalium: K9 n=27, YFP n=3, II-11 n=7, #63 n=2; Rubidium: K9 n=27, YFP n=4, II-11 n=7, #63 n=2; Caesium: K9 n=22, YFP n=3, II-11 n=2, #63 n=2; Magnesium: K9 n=16, GFP-K n=9, YFP n=3, II-11 n=10, #63 n=2; Calcium: K9 n=14, GFP-K n=9, YFP n=1, II-11 n=10, #63 n=1; Strontium: K9 n=16, GFP-K n=6, II-11 n=7, #63 n=1; Barium: K9 n=12, GFP-K n=7, II-11 n=12, #63 n=3.

Claudin-19

Widerstand

Anders verhielt es sich mit den Claudin 19 V.1 und V.2 exprimierenden Klonen. Wie in Abbildung 3-15 (A) ersichtlich führte die Expression von humanem Claudin-19 zu einer signifikanten Erniedrigung des Widerstandes der Zellklone im Vergleich zu den Kontrollzellen (#32 & #36: $p < 0,01$; #28: $p < 0,05$). Dabei traten zwischen den beiden Varianten keine

signifikanten Unterschiede auf. Die starke Streuung der Werte des Klons #42 ist auf die niedrige Anzahl an Messungen zurückzuführen.

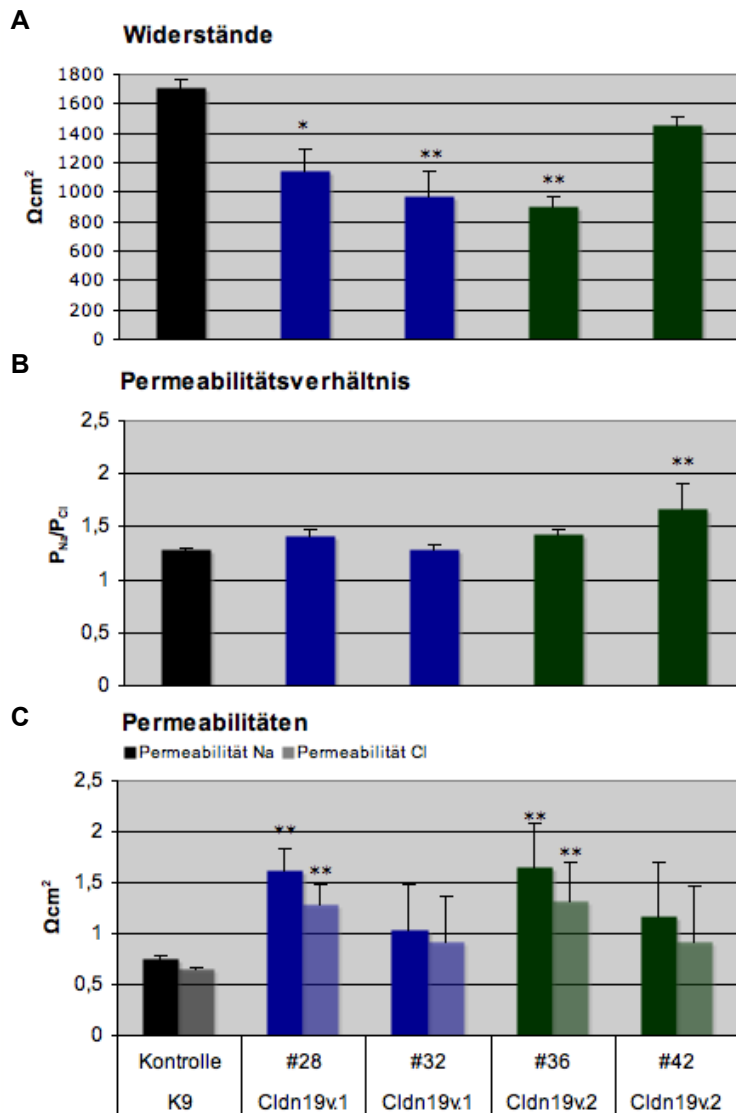


Abbildung 3-15

Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl} , sowie absolute Permeabilitäten für Natrium und Chlorid der Claudin-19 Klone.

Anzahl der Messungen:

(A) K9 n=170; #28 n=18; #32 n=19; #36 n=18; #42 n=3;
 (B,C) K9 n=75; #28 n=5; #32 n=5; #36 n=5; #42 n=3.

Dilutionspotential

Die Mehrzahl der Claudin-19-Klone zeigte keine Veränderung des Permeabilitätsverhältnisses P_{Na}/P_{Cl} (B) im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Abbildung 3-15 (C) zeigt die erhöhten absoluten Permeabilitäten für Natrium und Chlorid. Auch hier ist die Veränderung nur bei den Klonen #28 und #32 signifikant (für Na^+ & Cl^- : $p < 0,01$).

Biionische monovalente und divalente Potentiale

Die Anwesenheit von Claudin-19 in den Tight Junctions führte zu signifikanten Veränderungen in ihrem Verhalten gegenüber den einwertigen Ionen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die errechneten Permeabilitätsverhältnisse wiesen signifikante Erhöhungen der Permeabilitätsverhältnisse auf (Abbildung 3-16). Nimmt man eine Reihung der Permeabilitäten entlang ihrer

Präferenz vor, erhält man folgende Kontrollzellähnliche Sequenz: Kalium > Rubidium > Caesium >= Natrium >= Lithium. Hierbei traten keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Claudin-19 Varianten auf. Der Klon #32 zeigte wie in den anderen Untersuchungen und Versuchen kein verändertes Verhalten gegenüber den Kontrollzellen.

Bei den Untersuchungen der zweiwertigen Ionen verhielten sich die Claudin-19-Klone unterschiedlich. Dabei konnte keine Korrelation zu einer der Varianten aufgezeigt werden. Es konnte jedoch eine allgemeine Verminderung der Permeabilitätsverhältnisse für die Claudin-19 Variante 2-Klone beobachtet werden. Der Klon #32 der Variante 1 zeigte ein signifikant vermindertes P_{Mg}/P_{Cl} -Permeabilitätsverhältnisses ($p < 0,01$). Aufgrund seiner Präsentation und Sonderstellung in den oben aufgeführten Experimenten gegenüber den anderen Klonen ist hier ein falscher oder unvollständiger Einbau zu diskutieren. Die anderen Permeabilitätsverhältnisse zeigten keinen signifikanten Unterschied.

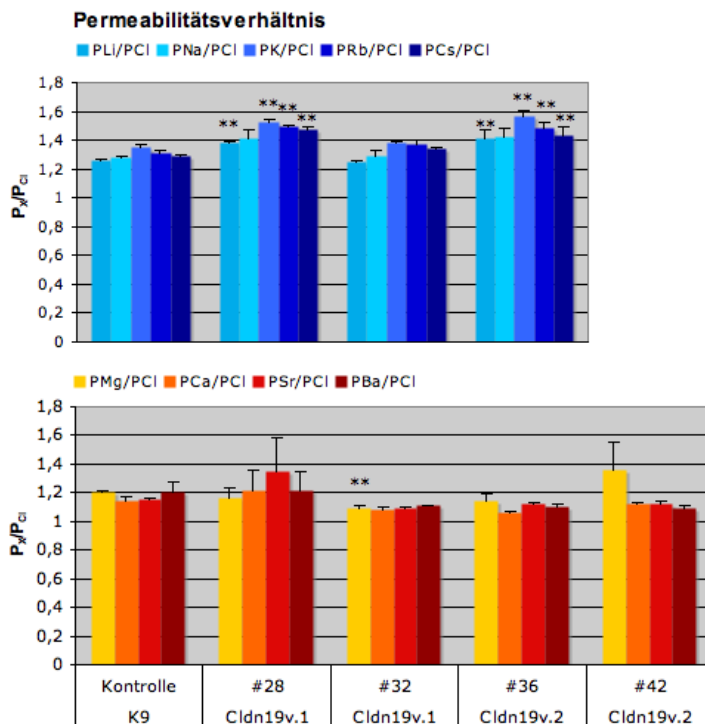


Abbildung 3-16

Permeabilitätsverhältnisse P_x/P_{Cl} der Claudin-19-Klone für monovalente und divalente Ionen.

Anzahl der Messungen für Lithium: K9 n= 23, #28 n=3, #32 n=4, #36 n=3; Kalium: K9 n=27, #28 n=5, #32 n=5, #36 n=5; Rubidium: K9 n=23, #28 n=3, #32 n=3, #36 n=3; Caesium: K9 n=22, #28 n=2, #32 n=2, #36 n=2; Magnesium: K9 n=16, #28 n=5, #32 n=5, #36 n=5, #42 n=4; Calcium: K9 n=14, #28 n=4, #32 n=2, #36 n=4, #42 n=2; Strontium: K9 n=16, #28 n=2, #32 n=2, #36 n=2, #42 n=3; Barium: K9 n=12, #28 n=2, #32 n=1, #36 n=2, #42 n=3.

Die Kokulturen

Zur Kultivierung zweier Zellklone auf einem Zellfilter wurde die gleiche Menge in Nährmedium gelöster Zellen vermischt und folgend auf dem Filter ausgesät. Die gleichmäßige Zellverteilung der Klone auf dem Filter konnte mit immunhistochemischen Färbungen gezeigt werden. Der Filter wurde halbiert und auf den beiden Hälften jeweils eines der beiden Claudine spezifisch angefärbt. Durch das Gegenfärben mit Occludin konnte gezeigt werden, dass die Zellen

durchgehend Occludin in ihren Tight Junction aufwiesen, jedoch nur einzelne Zellinseln das jeweilige Claudin exprimierten.

Hierbei ist interessant, dass nicht nur die erwarteten Zellinseln des jeweiligen Claudins aufgefunden werden konnten, sondern dass einzelne Zellen, hier exogen zugeführtes Claudin nur in bestimmte Zellmembranen einbaute.

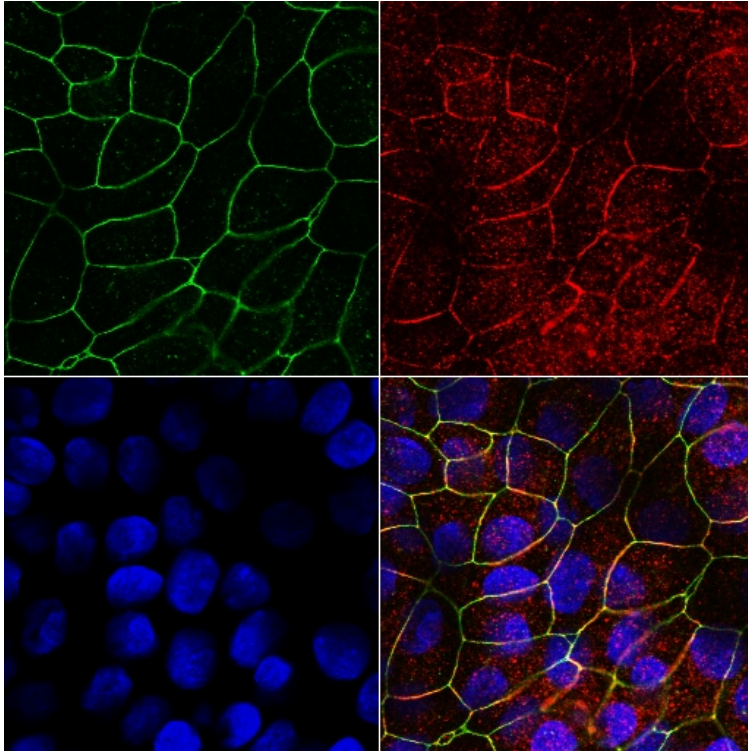


Abbildung 3-17
Immunhistochemische Färbungen der Kokultur

Exemplarisch ist die Kokultur Claudin-16/10 V.1 gezeigt.
Occludin: grün, Claudin-10: rot, Zellkerne: blau

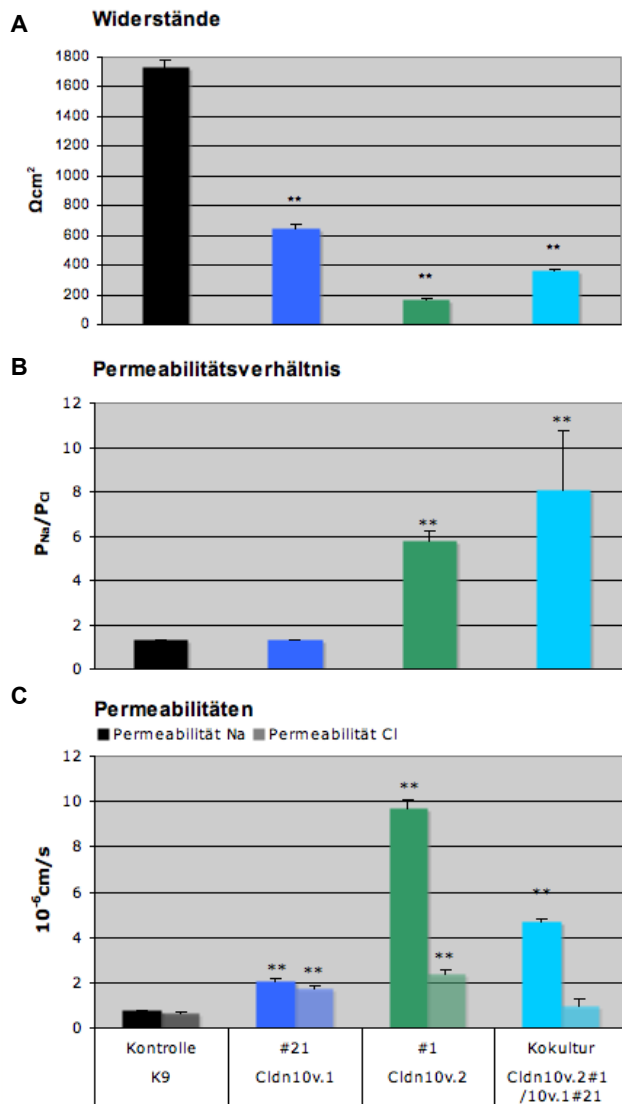
Kokultur Claudin-10 Varianten 1 und 2

Widerstand

Generell zeigte sich, dass die transepithelialen Widerstände der Kokulturen einen Wert zwischen den beiden Widerständen der Einzelkulturen aufwiesen. So verhielt sich auch die Kokultur der Claudin-10 Varianten (Abbildung 3-18). Deutlich ist die Erniedrigung des Widerstandes der Claudin-10-Klone im Vergleich zu den Kontrollzellen zu erkennen. Der Widerstand der Kokultur befindet sich auf einem ‚Mittelwert‘ der Einzelklone.

Dilutionspotentiale

Die Dilutionspotentiale der Claudin-10 Kokultur zeigten im Gegensatz zu den Widerständen keinen ‚Mittelwert‘. Das Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl} der Kokultur war gegenüber der Kontrollzellen um das Vierfache erhöht. Der Unterschied zu den Claudin-10 V.2-Klonen war nicht signifikant.

**Abbildung 3-18**

Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl} , sowie absolute Permeabilitäten für Natrium und Chlorid der Kokultur Claudin-10 V.1 und V.2.

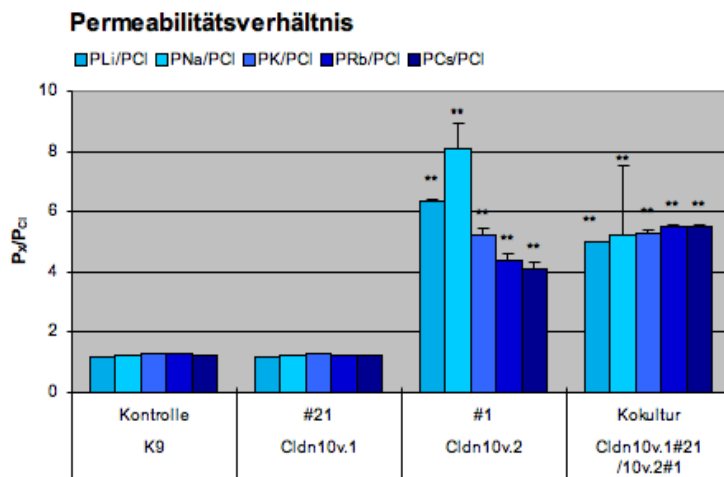
Anzahl der Messungen:

(A) K9 n=157, #21 n=54, #1 n=109, CoCult n=4,
(B,C) K9 n=67, #21 n=33, #1

Möchte man das Permeabilitätsverhältnis näher beleuchten und betrachtet die absolute Permeabilitäten, bemerkt man eine Zunahme der Natriumpermeabilität gegenüber den Kontrollzellen als auch der Variante 1-Einzelkultur. Anders verhielt es sich mit der Chloridpermeabilität. Diese mit den Einzelkulturen verglichen zeigte eine Erniedrigung. Das erhöhte Permeabilitätsverhältnis entstand durch dieses gegensätzliche Verhalten.

Biionische monovalente Potentiale

Die Messungen der biionischen monovalenten Potentiale zeigten, dass sich die Permeabilitätspräferenz der Kokultur Claudin-10 V.1 und V.2 deutlich von der Präferenz der Einzelklone unterscheidet. Nimmt man eine Reihung der Permeabilitätsverhältnisse vor, erhält man die Sequenz: Caesium > Rubidium > Kalium > Natrium > Lithium. Die Veränderungen waren gegenüber der Kontrollzellen, sowie gegenüber der Einzelkulturen signifikant.

**Abbildung 3-19**

Permeabilitätsverhältnisse P_x/P_{Cl} der Kokultur Claudin-10 V.1 und V.2 für monovalente Ionen.

Anzahl der Messungen für Lithium: K9 n=22, #21 n=6, #1 n=, CoCult n=4; Kalium: K9 n=22, #21 n=6, #1 n=15, CoCult n=6; Rubidium: K9 n=22, #21 n=6, #1 n=10, CoCult n=6; Caesium: K9 n=22, #21 n=6, #1 n=13, CoCult n=4;

Kokultur Claudin-10 und Claudin-11

Widerstand

Der transepitheliale Widerstand der Kokultur Claudin-10/Claudin-11 manifestierte sich als eine Mischung der beiden ursprünglichen Widerstände (Abbildung 3-19 (A)). Dabei näherte sich der Widerstandswert der Kokultur dem Wert des Claudin-10 Variante 2-Klons.

Die Kokultur mit dem GFP-getaggtm Claudin-11 zeigte auch einen verminderten Widerstand (Abbildung 3-20 (A nachgewiesen werden. Zu Bemerkem sei auch das höhere Permeabilitätsverhältnis des Klones #18. In (C) sind jeweils die absoluten Permeabilitäten dargestellt. Hier ist die Kokultur #1/#10 auffällig (Abbildung 3-20). Zwar zeigte sie im Vergleich zu der Kokultur #1/#18 ein niedrigeres)). Verglichen mit dem GFP-getaggtm Klon wurde der Widerstand durch die Kokultur mit Claudin-10 Variante 2 auf mehr als die Hälfte reduziert.

Dilutionspotentiale

Betrachtet man vorerst die Kokultur mit dem GFP-getaggtm Klon in der Abbildung 3-20 (B) wird deutlich, dass sich das Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl} zwischen den Werten der Einzelkulturen ansiedelte. Analog dazu konnte auch für die Kokultur mit dem FLAG-getaggtm Claudin-11 eine Erhöhung des Permeabilitätsverhältnisses im Vergleich zu den Kontrollzellen Permeabilitätsverhältnis, ihre absoluten Permeabilitäten, besonders die Natriumpermeabilität, waren jedoch stärker angehoben.

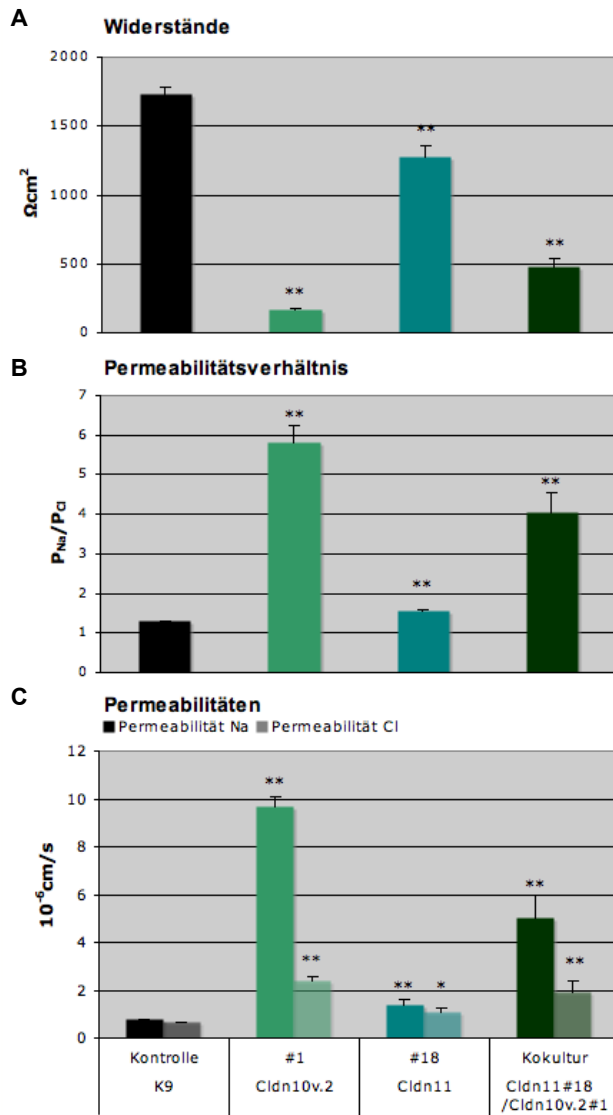


Abbildung 3-20

Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl} , sowie absolute Permeabilitäten für Natrium und Chlorid der Kokultur Claudin-10 V.2 und -11.

Anzahl der Messungen:

(A) K9 n=157, #1 n=109, #18 n=34, Cocult n=16;

(B,C) K9 n=67, GFP-K n=34, #1 n=60, #11 n=19, CoCult n=4.

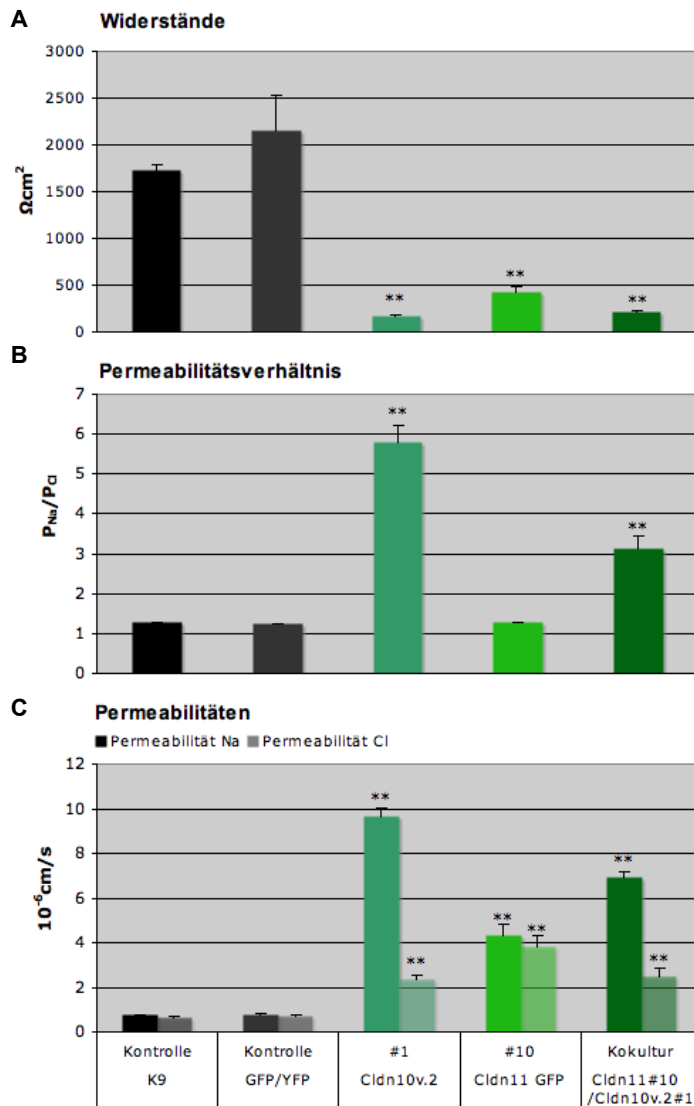


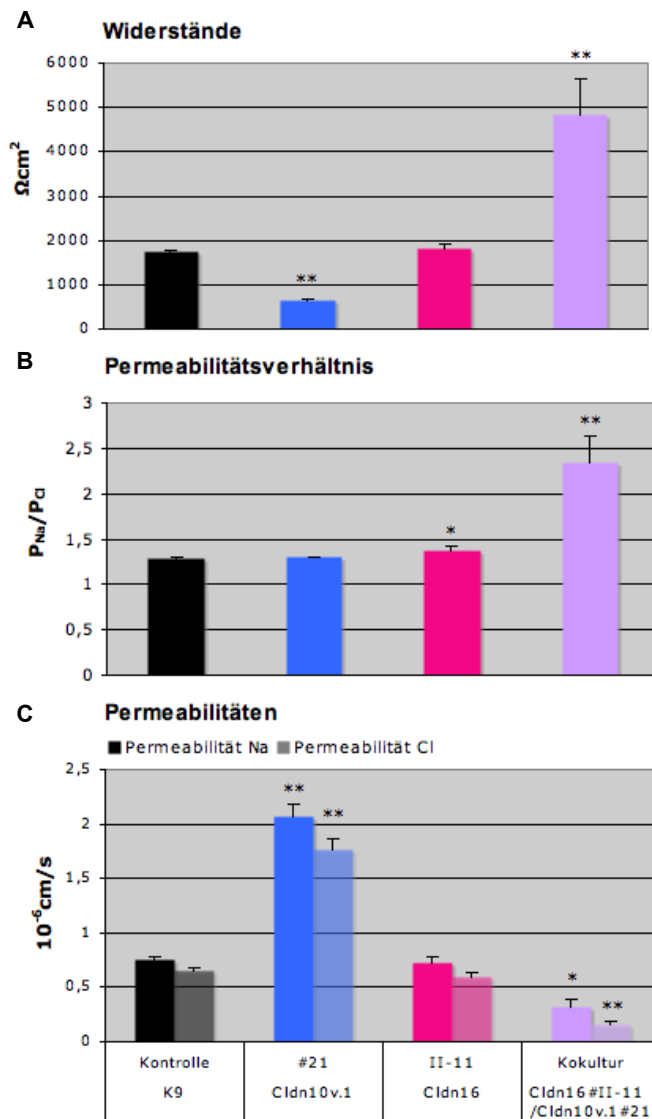
Abbildung 3-21
 Widerstände,
 Permeabilitätsverhältnis
 $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$, sowie absolute
 Permeabilitäten für Natrium
 und Chlorid der Kokultur
 Claudin-10 V.2 und -11
 (GFP-getagged).

Anzahl der Messungen:
 (A) K9 n= 157, GFP-K n=34, #1
 n=109, #10 n=26, CoCult n=4;
 (B,C) K9 n=67, GFP-K n=34, #1
 n=60, #10 n=19, CoCult n=4.

Kokultur Claudin-10 und Claudin-16

Widerstand

Wie oben bereits beschrieben konnte beobachtet werden, dass entsprechend der Einzelkulturen der transepitheliale Widerstand einen Wert zwischen den Einzelwiderständen aufwies. Doch die Kokultur mit Claudin-10 und -16 erfüllte diese Erwartung nicht. Die Zellfilter mit einer Kultur aus den Klonen Claudin-16 (II-11) und Claudin-10 V.1 (#21) zeigten einen deutlichen Anstieg des transepithelialen Widerstandes (Abbildung 3-21). Der Widerstand dieser Kokultur war um das 2,5fache erhöht im Vergleich zum Wert der MDCK C7-Kontrollzellen. Die Kokulturen aus der Claudin-16-Klone (II-11 und #63) und Claudin-10 V.2-Klon (#1) wiederum entsprachen der Beobachtung weitgehend (Abbildung 3-22). Sie zeigten eine Erniedrigung des Widerstandes auf ein Zehntel des Kontrollwertes, wobei die Verminderung bei der Kokultur mit dem Claudin-16-Klon #63 stärker ausfiel.

**Abbildung 3-22**

Widerstände,
Permeabilitätsverhältnis
 $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$, sowie absolute
Permeabilitäten für
Natrium und Chlorid der
Kokultur Claudin-10 V.1
und -16.

Anzahl der Messungen:

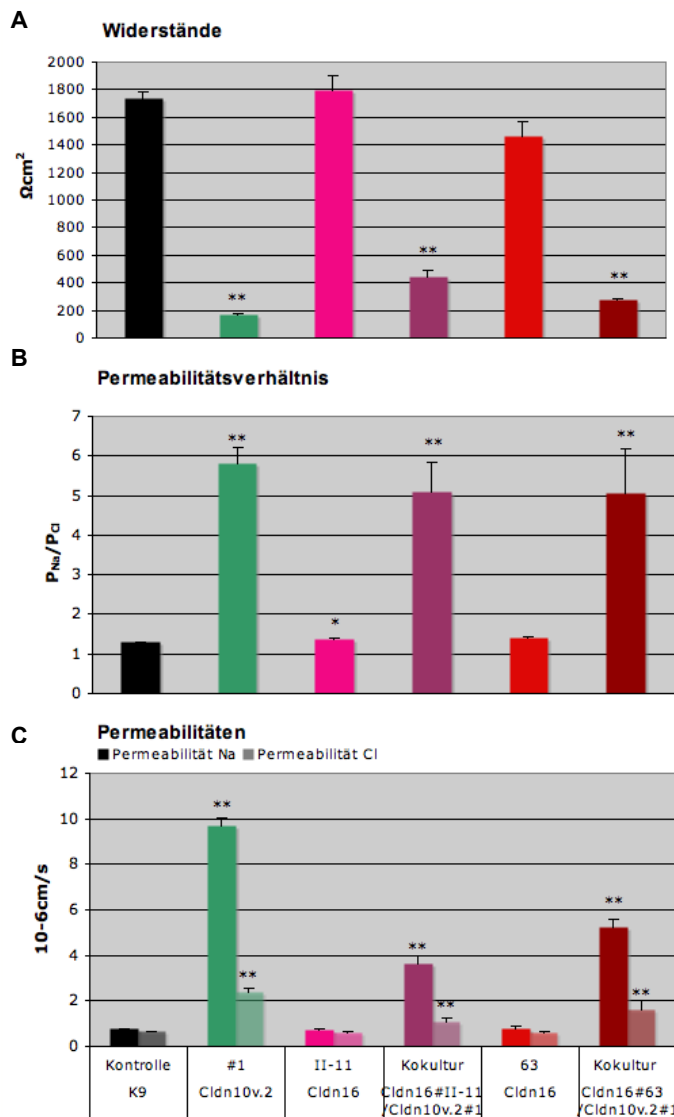
(A) K9 n= 157, #21 n=54, II-11 n=55, CoCult n=4;

(B,C) K9 n=67, #21 n=33, II-11 n=37, CoCult n=4.

Diese Diskrepanz kann mit dem transepithelialen Widerstand dieses Klons #63 in Einzelkultur erklärt werden. Wie Abbildung 3-13 zeigt, fiel dieser niedriger aus als der des Klons II-11.

Dilutionspotentiale

Analog zu den Widerständen konnte bei den Dilutionspotentialen ein ähnliches Verhalten registriert werden. Die Claudin-16-Kokultur mit Claudin-10 V.1 imponierte durch ein verdoppeltes Permeabilitätsverhältnis $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ im Vergleich zu den Kontrollzellen sowie der Einzelkulturen (Abbildung 3-21 (C)). Auch die Claudin-16-Kokultur mit Claudin-10 V.2 beeindruckte durch ein vielfach erhöhtes Permeabilitätsverhältnis $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ (Abbildung 3-22). Hierbei näherte sich das Permeabilitätsverhältnis dem der Claudin-10 V.2 Einzelkultur an.

**Abbildung 3-23**

Widerstände,
Permeabilitätsverhältnis
 P_{Na}/P_{Cl} , sowie absolute
Permeabilitäten für Natrium
und Chlorid der Kokultur
Claudin-10 V.2 und -16.

Anzahl der Messungen:

(A) K9 n= 157, #1 n= 109, II-11
n=55, CoCult mit II-11 n=34,
#63 n=14, CoCult mit #63 n=18;
(B,C) K9 n=67, #1 n=60, II-11
n=37, CoCult mit II-11 n=21,
#63 n=10, CoCult mit #63 n=6.

Betrachtet man nun die absoluten Permeabilitäten für Natrium und Chlorid (C) zeigt sich eine Erhöhung beider Permeabilitäten im Vergleich zu den Kontrollzellen und den Claudin-16 Einzelkulturen. Es konnte eine um das vier- bis sechsfache erhöhte Natriumpermeabilität für die Kokulturen nachgewiesen werden. Die Chloridpermeabilität war um eine wesentlich geringere Potenz erhöht. Interessanter Weise näherte sich der transepitheliale Widerstand der Claudin-16-Kokulturen mit Claudin-10 V.2 dem Wert der Claudin-10 V.2-Einzelkultur. Die Natrium- und Chloridpermeabilität der Kokulturen erhöhte sich in diesem Sinne ebenfalls, erreichte aber eine ähnlich starke Annäherung nicht. In Abbildung 3-21 (C) sind die Ergebnisse der Berechnungen für die Claudin-16-Kokultur mit dem Claudin-10 V.1-Klon dargestellt. Die Permeabilität für Natrium ($p < 0,05$) und Chlorid ($p < 0,01$) war signifikant erniedrigt im Vergleich zu den Einzelkulturen und den Kontrollzellen. Dabei war die Chloridpermeabilität um ein Vielfaches

niedriger als die Natriumpermeabilität. Diese starke Erniedrigung führte zu dem erhöhten Permeabilitätsverhältnis.

Biionische monovalente und divalente Potentiale

Die Messungen der biionischen Potentiale ergaben ein ähnliches Verhalten. So konnte man besonders bei der Claudin-16-Klon II-11-Kokultur mit Claudin-10 V.2 eine Permeabilitätspräferenz für die monovalenten Ionen in Anlehnung an die des Claudin-10 V.2 Klons nachweisen. Die Kokultur mit dem Claudin-16-Klon #63 zeigte diese Ähnlichkeit nicht (Abbildung 3-23). Von der Kokultur mit Claudin-10 V.1 und Claudin-16 liegen leider noch keine Werte vor.

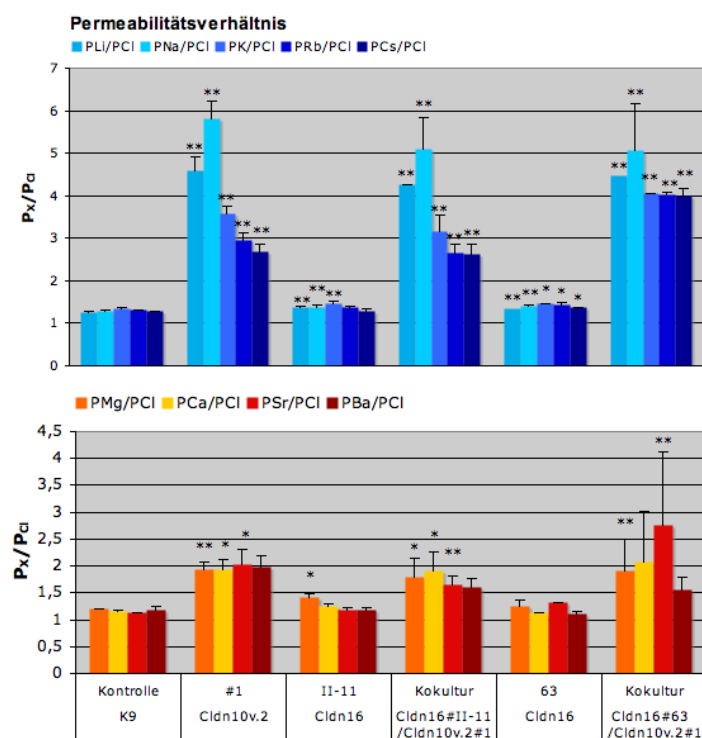


Abbildung 3-24

Permeabilitätsverhältnisse P_X/P_{Cl} der Kokultur Claudin-10 V.2 und -16 für monovalente und divalente Ionen.

Anzahl der Messungen für Lithium: K9 n=22, #1 n=12, II-11 n=2, CoCult mit II-11 n=4, #63 n=2, CoCult mit #63 n=2; Kalium: K9 n=25, #1 n=13, II-11 n=7, CoCult mit II-11 n=2, #63 n=2, CoCult mit #63 n=3; Rubidium: K9 n=21, #1 n=13, II-11 n=7, CoCult mit II-11 n=2, #63 n=2, CoCult mit #63 n=3; Caesium: K9 n=21, #1 n=13, II-11 n=2, CoCult mit II-11 n=2, #63 n=2, CoCult mit #63 n=3; Magnesium: K9 n=15, #1 n=15, II-11 n=10, CoCult mit II-11 n=5, #63 n=2, CoCult mit #63 n=2; Calcium: K9 n=11, #1 n=14, II-11 n=10, CoCult mit II-11 n=5, #63 n=1, CoCult mit #63 n=2; Strontium: K9 n=14, #1 n=14, II-11 n=7, CoCult mit II-11 n=5, #63 n=1, CoCult mit #63 n=2; für Barium: K9 n=10, #1 n=14, II-11 n=9, CoCult mit II-11 n=5, #63 n=2, CoCult mit #63 n=2.

Die Messungen der biionischen Potentiale ergaben ein von den Klonen abweichendes Verhalten der Kokultur Claudin-16/Claudin-10 V.1 gegenüber den divalenten Ionen. So zeigt die Abbildung 3-24 das stark erhöhte Permeabilitätsverhältnis P_X/P_{Cl} für Calcium und Strontium. Das kann entweder an der stark erniedrigten Chloridpermeabilität (Abbildung 3-21) liegen oder an den erhöhten Permeabilitäten für die divalenten Ionen. Außerdem ist ein im Vergleich zu den Claudin-16-Klonen herabgesetztes Permeabilitätsverhältnis für Magnesium berechnet worden. Ein anderes Bild präsentierten die Kokulturen mit dem Claudin-10 V.2-Klon (Abbildung 3-23). Die Kokulturen zeigten unterschiedliche Permeabilitätsverhältnisse P_X/P_{Cl} in Anlehnung an die Claudin-16-Klone. Besonders auffällig waren im Vergleich zu den Claudin-10 V.2-Klonen eine fast unveränderte Magnesium- und Bariumpermeabilität.

Interessanter Weise unterschieden sich die beiden Kokulturen durch die Strontiumpermeabilität: So beeindruckte die Kokultur mit Claudin-16-Klon #63 durch eine im Vergleich zum Klon #63 verdoppelte Strontiumpermeabilität. Hier stehen weitere Versuchswiederholungen zur genaueren Abklärung an.

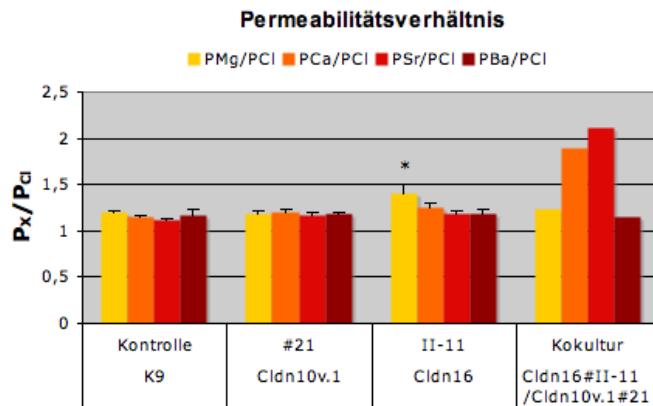


Abbildung 3-25

Permeabilitätsverhältnisse P_x/P_{Cl} der Kokultur Claudin-10 V.1 und -16 für divalente Ionen.

Anzahl der Messungen für Magnesium: K9 n=15, #21 n=15, II-11 n=10, CoCult mit II-11 n=1; Calcium: K9 n=11, #21 n=14, II-11 n=10, CoCult mit II-11 n=1; Strontium: K9 n=14, #21 n=14, II-11 n=7, CoCult mit II-11 n=1; Barium: K9 n=10, #21 n=14, II-11 n=9, CoCult mit II-11 n=1.

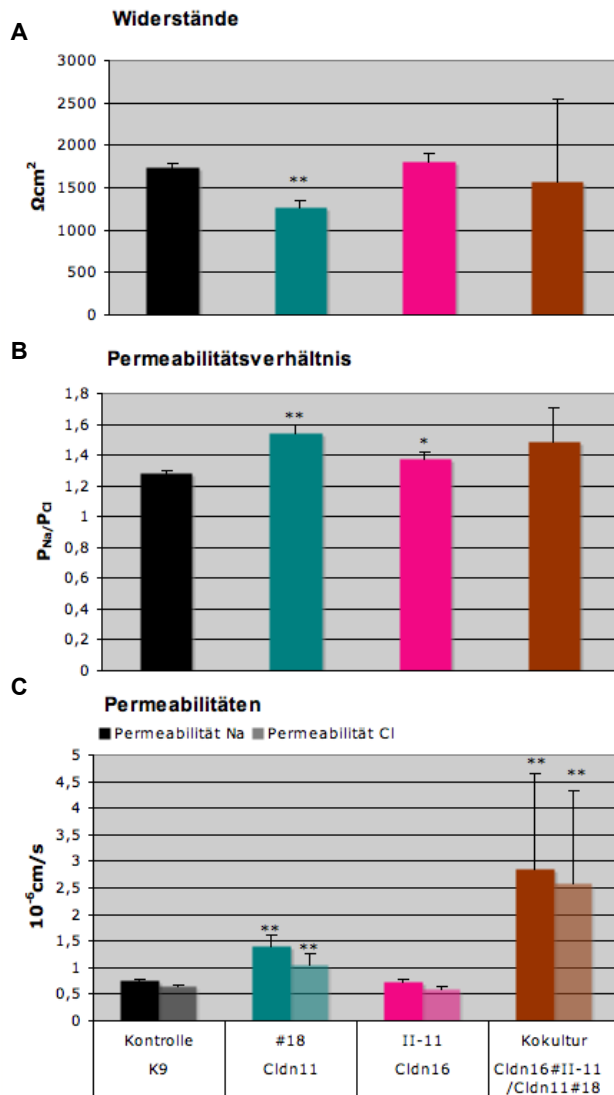
Kokultur Claudin-11 und Claudin-16

Widerstand

Die Kokultur mit den beiden hochohmigen Claudin-11- und Claudin-16-Klonen zeigte kein einheitliches Bild. So resultieren aus allen Messungen ebenso uneinheitliche Ergebnisse (Abbildung 3-25 (A)). Einige Zellfilter imponierten durch eine starke Zunahme, andere durch eine Verminderung des Widerstandes.

Dilutionspotentiale

Trotz der großen Unterschiede innerhalb ihrer transepithelialen Widerstände zeigten die Zellfilter mit der Kokultur Claudin-16 und Claudin-11 ein relativ homogenes Verhalten gegenüber den Natrium- und Chloridionen (B, C). Hinsichtlich ihres Permeabilitätsverhältnisses P_{Na}/P_{Cl} konnte keine signifikante Veränderung verglichen mit den Kontrollzellen oder Einzelkulturen nachgewiesen werden. Berechnet man die absoluten Permeabilitäten zeigte sich ein heterogenes Bild. Trotz starker Schwankungen konnte eine signifikante Steigerung ($p < 0,01$) der Permeabilität für beide Ionen nachgewiesen werden.

**Abbildung 3-26**

Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl} , sowie absolute Permeabilitäten für Natrium und Chlorid der Kokultur Claudin-11 und -16.

Anzahl der Messungen:

(A) K9 n= 157, #18 n=34, II-11 n=55, CoCult n=4;
 (B,C) K9 n=67, #18 n=23, II-11 n=37, CoCult n=4.

Die Kotransfektion

Für die Kotransfektion wurde vorerst ein stabiler Klon mit einem Claudin hergestellt und folgend in einem zweiten Schritt ein zweites Claudin in diesen MDCK-Klon stabil transfiziert. Die Transfektionskontrolle erfolgte mittels mRNA-Extraktion. Eine Lokalisationsanalyse wurde mit immunhistochemischen Färbungen vorgenommen. Beide Claudine wurden in den Tight Junctions, colocalisiert mit Occludin angetroffen. Interessant ist auch hier die in den immunhistochemischen Färbungen erkennbare Verteilung der Claudine innerhalb der Zellmembranen. Obwohl die Zellen beide Claudine in die Zellmembran einbauen könnten, findet man mit der konfokalen Lichtmikroskopie neben Zellinseln mit der spezifischen Claudinexpression in der gesamten Zellmembran, auch Zellen mit einer Aussparung einer Zellgrenze.

Kotransfektion Claudin-10 Variante 1 und Claudin-16

Widerstand

Die Widerstände der Zellklone, die jeweils zwei exogen zugeführte Claudine überexprimierten, waren verschiedenen denen der Kokultur der Einzelklone. Wie in Abbildung 3-26 zu sehen, wies die Kokultur von Claudin-16 und Claudin-10 V.1 einen sehr hohen Widerstand auf. Die Kotransfektionsklone präsentieren sich hingegen mit einem gegenüber den Kontrollzellen signifikant erniedrigten Widerstand wie in der folgenden Abbildung dargestellt.

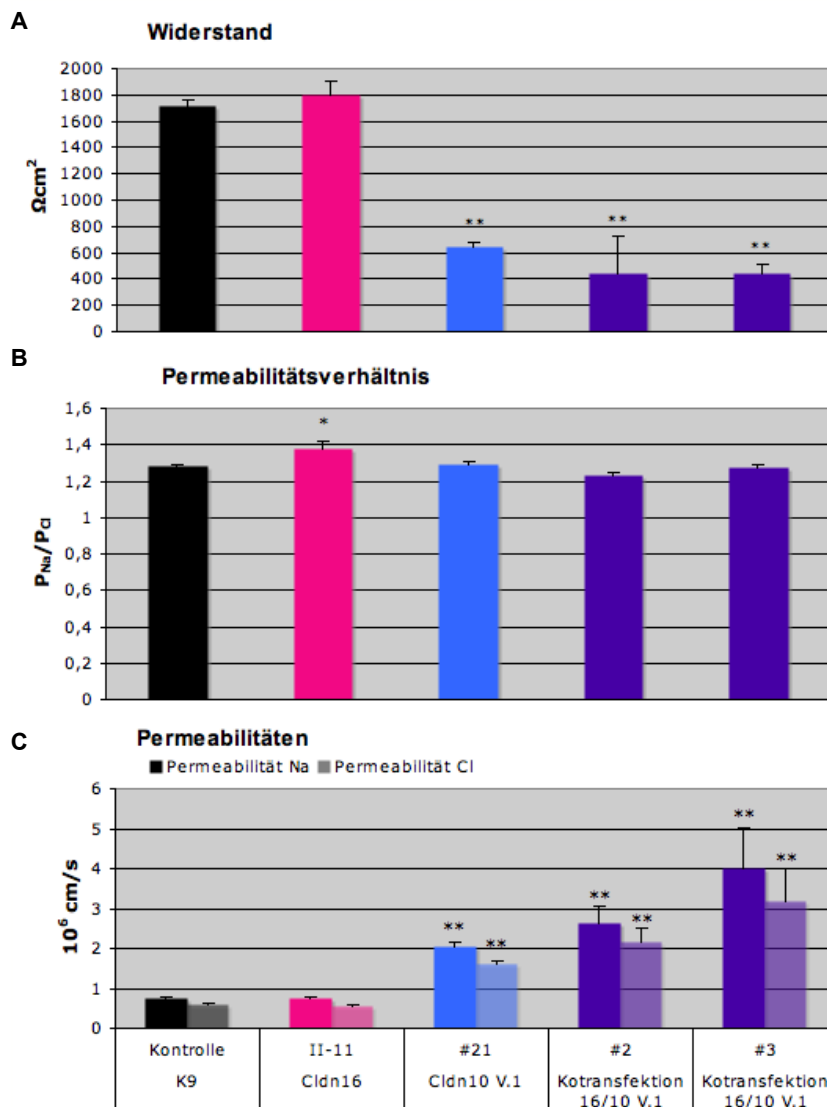


Abbildung 3-27
Widerstände,
Permeabilitätsverhältnis
 P_{Na}/P_{Cl} , sowie absolute
Permeabilitäten für Natrium
und Chlorid der Kotransfektion
Claudin-10 V.1 und -16.

Anzahl der Messungen:
(A) K9 n=170; II-11 n=55; #2 n=4;
#3 n=8;
(B,C) K9 n=75; II-11 n=37; #21
n=34; #2 n=4; #3 n=8.

Dilutionspotentiale

Die Dilutionspotentiale der Kotransfektion Claudin-16/Claudin-10 V.1 zeigten ein Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl} , das im Vergleich zu den Kontrollzellen und dem Claudin-16-Zellklon stark erniedrigt war. Der Unterschied zu dem Claudin-10 V.1-Einzelklon ist nicht signifikant. Betrachtet man nun die absoluten Permeabilitäten zeigen sich signifikant erhöhte

Permeabilitäten für Natrium und Chlorid. Da die Permeabilitätssteigerung für beide Ionen gleichsinnig ist, wird das Permeabilitätsverhältnis nicht verändert. Auch hier sind die Unterschiede im Vergleich zu dem Claudin-10 V.1-Klon nicht signifikant.

Biionische divalente Potentiale

Die Untersuchungen der divalenten Ionen ergaben keine starken Veränderungen gegenüber den Kontrollzellen oder des Claudin-10 V.1-Klones. Hier müssen weitere Untersuchungen folgen, um genauere Aussagen treffen zu können.

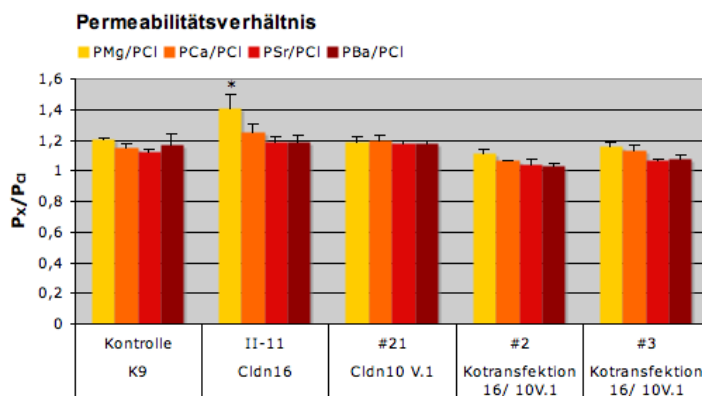


Abbildung 3-28

Permeabilitätsverhältnisse P_x/P_{Cl} der Kotransfektion Claudin-10 V.1 und -16 für divalente Ionen.

Anzahl der Messungen für Magnesium: K9 n=15, #21 n=15, II-11 n=10, #2 n=3, #3 n=3; Calcium: K9 n=11, #21 n=14, II-11 n=10, #2 n=3, #3 n=3; Strontium: K9 n=14, #21 n=14, II-11 n=7, #2 n=3, #3 n=2; Barium: K9 n=10, #21 n=14, II-11 n=9, #2 n=3, #3 n=3.

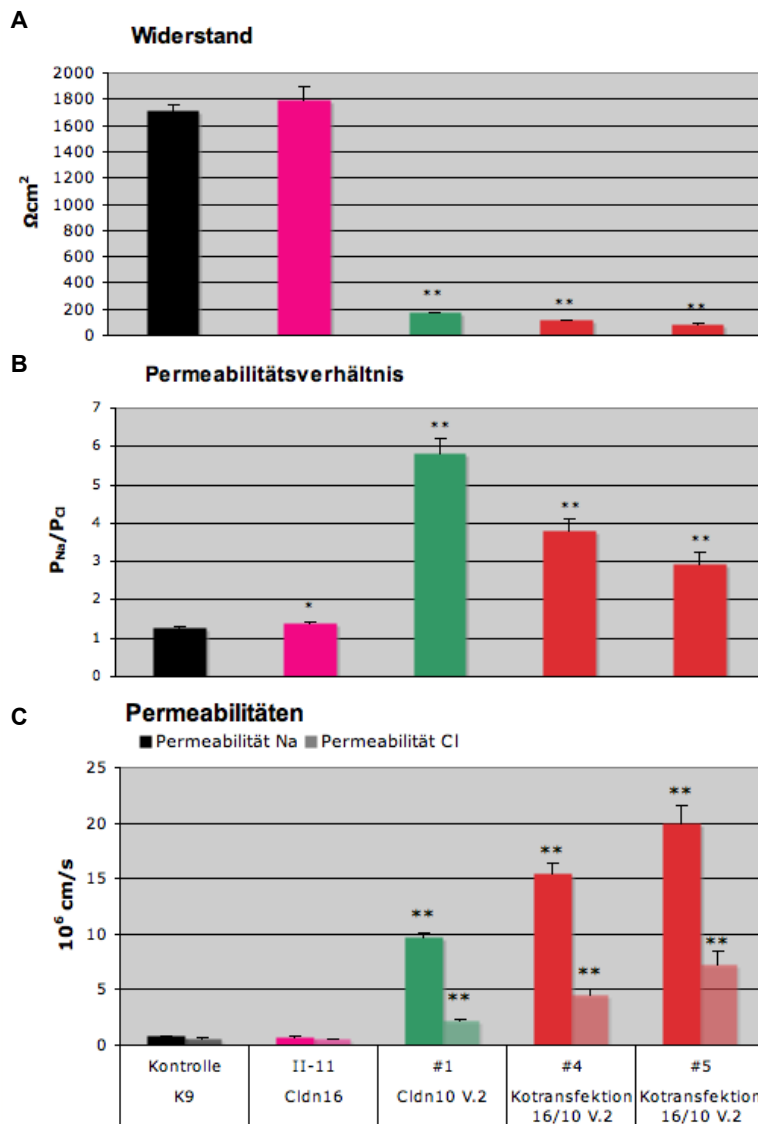
Die Kotransfektion Claudin-10 Variante 2 und Claudin-16

Widerstand

Die Zellen der Kotransfektionen Claudin-10 V.2 und Claudin-16 zeigten signifikant erniedrigte Widerstände gegenüber der Kontrollzellen und des Claudin-16-Klons. Sogar gegenüber den Claudin-10 V.2-Zellklonen konnte eine Erniedrigung nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind denen der Kokultur (Abbildung 3-22) sehr ähnlich.

Dilutionspotentiale

Die Dilutionspotentiale der Kotransfektionen zeigen ein Permeabilitätsverhältnis, das stark erhöht war, jedoch niedriger ausfiel als das der Claudin-10 V.2 Einzelkultur. Dies resultierte aus den beiden absoluten Permeabilitäten. Diese zeigten einen starken Anstieg für beide Ionen. Wobei die Permeabilität für Natrium um ein Vielfaches stärker gesteigert war. Auch gegenüber des stark natriumpermeablen Claudin-10 V.2-Klons konnte eine signifikante Erhöhung festgestellt werden. Da hier die Chloridpermeabilität ebenfalls um ein Vielfaches gesteigert ist, kommt es zu den niedrigen Permeabilitätsverhältnissen.

**Abbildung 3-29**

Widerstände,
Permeabilitätsverhältnis
 P_{Na}/P_{Cl} , sowie absolute
Permeabilitäten für
Natrium und Chlorid der
Kotransfektion Claudin-10
V.2 und -16.

Anzahl der Messungen:

(A) K9 n=170; II-11 n=55; #4
n=27; #5 n=20;

(B,C) K9 n=75; II-11 n=37; #1
n=60; #4 n=10; #5 n=6.

Biionische monovalente und divalente Potentiale

Betrachtet man nun die Ergebnisse der divalenten Potentialmessungen fällt auf, dass die Permeabilitätsverhältnisse P_X/P_{Cl} sich in einem Bereich zwischen den Werten der beiden Einzelklone befinden (Abbildung 3-29). Interessanter Weise fällt eine Permeabilitätspräferenz mit starker Ähnlichkeit der der Claudin-10 V.2-Klone auf. Die niedrigen Permeabilitätsverhältnisse entstehen durch die stark erhöhte Chloridpermeabilität. Zum Vergleich können hier die Permeabilitätsverhältnisse der Kokultur betrachtet werden (Abbildung 3-24). In der Kotransfektion scheint der Einfluss des Claudin-10 V.2 etwas geringer zu sein. Jedoch müssen auch hier weitere Experimente durchgeführt werden.

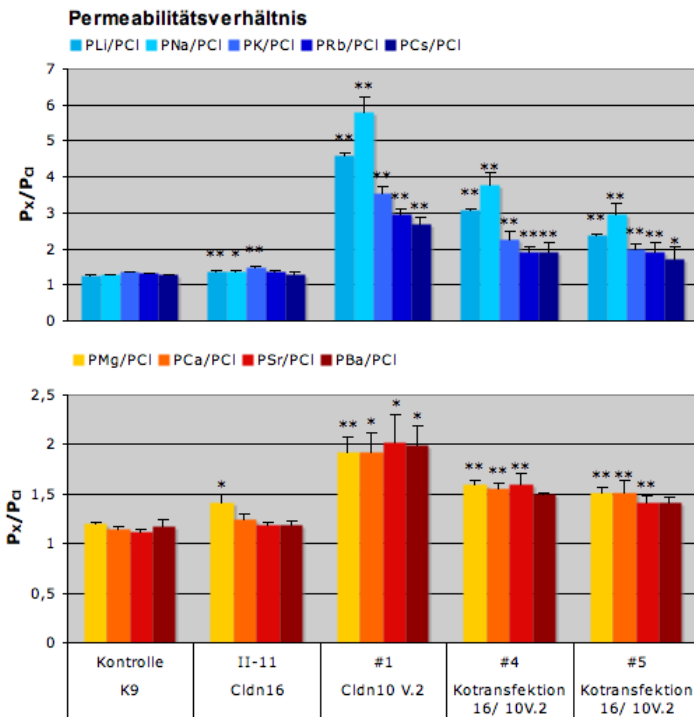


Abbildung 3-30

Permeabilitätsverhältnisse P_x/P_{Cl} der Kofunktions Claudin-10 V.2 und -16 für monovalente und divalente Ionen.

Anzahl der Messungen für Lithium: K9 n=22, II-11 n=2, #1 n=12, #4 n=4, #5 n=2; Natrium: K9 n=25, II-11 n=7, #1 n=13, #4 n=10, #5 n=6; Kalium: K9 n=27, II-11 n=7, #1 n=14, #4 n=4, #5 n=5 Rubidium: K9 n=21, II-11 n=7, #1 n=13, #4 n=4, #5 n=4; Caesium: K9 n=21, II-11 n=2, #1 n=13, #4 n=4, #5 n=4; Magnesium: K9 n=15, II-11 n=10, #1 n=15, #4 n=5, #5 n=4; Calcium: K9 n=11, II-11 n=10, #1 n=14, #4 n=5, #5 n=4; Strontium: K9 n=14, II-11 n=7, #1 n=14, #4 n=4, #5 n=4; Barium: K9 n=10, II-11 n=9, #1 n=14, #4 n=3, #5 n=3.

Diskussion

Diskussion der Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden Methoden aus unterschiedlichen Bereichen genutzt. Jede einzelne Methode hat ihre Grenzen und könnte Gegenstand dieses Abschnittes sein, doch möchte ich diejenige diskutieren, deren kritische Betrachtung von besonderer Bedeutung ist. Es handelt sich dabei um die Zellkultur, die zum einen Grundlage aller Experimente, ob molekularbiologisch oder elektrophysiologisch und zum anderen auch Grundlage der Interpretation der Ergebnisse ist.

Die Komplexität der Nieren bzw. des Nephrons führt zu dem Problem der vielen Variablen und erschwert die Rückführung der beobachteten Veränderungen auf eine dieser Variablen. Um eine einzige dieser Variablen auf ihre Funktion hin zu untersuchen, muss die Komplexität so stark reduziert werden – ohne jedoch die Grundbedingungen zu verändern –, dass konkrete Aussagen getroffen werden können. Man muss also das System erst einmal vereinfachen, um später die einzelnen Aspekte wieder zu einem komplexen zusammenhängenden Ganzen zu vereinen. Hierfür bietet sich die Zellkultur an. In der Literatur ist für verschiedene Zelllinien gezeigt, dass die *in vitro* gehaltenen Zellen sehr ähnliche Eigenschaften im Vergleich zu diesen *in vivo* aufweisen. Für die hier beschriebenen Experimente verwendeten wir eine Zelllinie aus der Hundeniere, die MDCK-Zellen. Untransfiziert zeigen diese Zellen bezüglich ihres Claudin-Expressionsmusters Eigenschaften von Sammelrohrzellen, ohne jedoch z.B. den für Sammelrohrzellen typischen Mineralocorticoidrezeptor zu exprimieren.

Grundsätzlich bietet die Zellkultur mehrere Vorteile: (1) Die physiologischen Bedingungen können imitiert werden, z.B. durch Kultur auf Filtermembranen, die den Zellen eine Differenzierung in einen basolateralen und apikalen Bereich erlauben, und (2) können gleichzeitig die externen Einflüsse kontrolliert und Störfaktoren ausgeschaltet werden. (3) Die Versorgung der Zellen kann durch spezielles Kulturmedium sichergestellt bzw. den besonderen Bedingungen der Versuche angepasst werden. (4) Die auf Filtermembranen kultivierten Zellen können für die elektrophysiologischen Versuche oder für immunhistochemische Färbungen mit relativ wenig Aufwand sowie ohne Veränderung ihrer Lage oder des Zusammenhalts der Zellen verwendet werden.

Doch dürfen auch die Nachteile bzw. Grenzen einer Zellkultur nicht außer Betracht gelassen werden. Zwar wurde versucht die Störfaktoren zu kontrollieren und wenn dies nicht möglich war, sie zu minimieren, jedoch wirken auf die Zellen in Zellkultur von Beginn an andere

Faktoren als *in vivo*. Diese wurden zwar bisher nicht als Störfaktoren beschrieben, jedoch ist denkbar, dass die Zellen auf diese reagieren und ihr Verhalten verändern. So ist es z.B. schwierig, organtypische Bedingungen zu erhalten. Unter physiologischen Bedingungen werden die Zellen *in vivo* apikal und basolateral von zwei unterschiedliche Flüssigkeiten superfundiert, während unsere Zellkultur eher einem biologischer Kurzschluss entspricht, da die Zellen von oben und unten das gleiche Kulturmedium erhalten. Ein anderer Mangelpunkt ist die unnatürliche Verankerung der Zellen auf den undurchlässigen Kulturschalenböden. Die Zellen können zwar nach einer gewissen Wachstumsphase in Kulturschalen auch auf Filtern kultiviert und mit unterschiedlichen Medien versorgt werden, jedoch wurde dies in dem genutzten Protokoll nicht berücksichtigt. Es ist außerdem nicht klar, ob nicht schon in dieser ersten Phase Veränderungen innerhalb der Zellen stattfinden, sie Eigenschaften verlieren oder neue gewinnen. So zeigten unsere Zellen ein unterschiedliches Verhalten hinsichtlich der gleichen äußeren Einwirkungen. Es fiel vor allem eine unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit auf, die auch innerhalb der Zellen eines Konstruktes auffindbar war. Ebenso war eine gewisse Resistenz oder Anfälligkeit gegenüber Manipulationen z.B. bei der Fütterung oder Widerstandsmessung zu beobachten. Ein Grund für ein unterschiedliches oder schlechtes Zellwachstum könnten allgemeine Ursachen wie fehlerhaften Inkubationsbedingungen (O_2 - und CO_2 -Gehalt, Temperatur, pH-Wert und Feuchtigkeit) oder Medien sein. Diese Fehlerquellen können jedoch ausgeschlossen werden, da die Kontrollkulturen, die im gleichen Brutschank und denselben Medien ausgesetzt waren, ein gleichsinnig gutes Wachstum zeigten. Einige Zellen zeigten nach schnellen Temperaturänderungen, Raumwechsel, Einbau in die Ussing-Kammer oder bei einer Widerstandsmessung schnellere und stärkere Änderungen ihrer elektrophysiologischen Parameter als andere. Durch aufgewärmte Lösungen, wenig Raumwechsel und Widerstandsmessungen wurde versucht die Manipulationen auf ein Minimum zu reduzieren. Außerdem wurde eine „individuelle Eingewöhnungszeit“ von max. 30 min eingeräumt, wenn die Zellen nach dem Einbau in die Ussing-Kammer einen, im Vergleich zum vorher gemessenen, verminderten Widerstand aufwiesen. In der Regel konnte innerhalb dieser Zeitspanne eine Stabilisierung beobachtet werden.

Trotz der genannten Nachteile ist die Zellkultur der ideale methodische Ansatz, um ein kompliziertes System unter definierten Bedingungen detailliert zu untersuchen und ggf. gezielt zu verändern. Die dabei gewonnenen Ergebnisse und gesammelten Erfahrungen können und sollten dann genutzt werden, um in anderen Versuchsansätzen wie z.B. in *in-vivo* Versuchen mit Knockdown- oder Knockout-Tieren, die Komplexität Schritt für Schritt wieder herzustellen.

Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde das Ziel verfolgt, die Funktion der Claudine der Henle-Schleife und deren Auswirkungen auf den Zellverband elektrophysiologisch zu charakterisieren. Hierzu wurden stabile Zellklone der Claudine-10, -11, -16 und -19 sowie deren Varianten und einzelne Mutanten hergestellt und diese hinsichtlich ihres Einflusses auf die Permeabilität des Zelllayers gegenüber monovalenten und divalenten Ionen untersucht. Immunhistochemische Färbungen konnten eine analoge Expression und Lokalisation endogener Claudine zwischen den Claudin-transfizierten und Leervektor-transfizierten Zellen belegen.

Die in den Ergebnissen beschriebenen Veränderungen des Verhaltens der transfizierten MDCK-Zellen werden somit entweder direkt von den exogenen Claudinen oder ihrer Interaktion mit den endogenen Claudinen hervorgerufen, wahrscheinlicher jedenfalls als von einer Verdrängung der endogen vorhandenen Tight Junction-Proteine. Dies kann jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden, da nicht alle Proteine unseren Analysen zugänglich waren oder deren Analysen den Rahmen dieser Arbeit bei Weitem überschritten hätten.

In der Diskussion möchte ich zuerst den Schwerpunkt auf die Claudine als Tight Junction-Proteine legen, um danach die Claudine im Verband zu betrachten, und schließlich die Auswirkungen auf das Tubulussystem und die Niere in Bezug auf den menschlichen Organismus zu diskutieren. Das heißt ich werde zum Abschluss den in der Einleitung begonnen Kreis schließen und von der Mikroebene, den Claudine, zurück zur Makroebene, der Niere, im Kontext des Körpers gelangen.

Die Claudine als Tight Junction Proteine

Die Permeabilität der Tight Junction

Permeabilität ist die Durchlässigkeit einer Barriere für verschiedene Stoffe. In den Nierentubuli bildet das Epithel die Barriere zwischen dem Tubuluslumen auf der apikalen und dem Gefäßlumen auf der basolateralen Seite. Die Tight Junction bzw. ihre Zusammensetzung bestimmt entscheidend die Permeabilität dieser Barriere. Ihre abdichtende Barriere- oder durchlassende Kanalfunktion ist spezifisch für bestimmte Ionen oder Moleküle.

Grundsätzlich ist die Permeabilität einer Barriere zusätzlich abhängig von der Größe des passierenden Moleküls. Da Ionen eine Wechselwirkung mit Wassermolekülen eingehen können, verändert sich je nach Zustand des Ions dessen Molekülgröße (Tabelle 4-1) und folglich dessen Permeabilitätsvermögen.

Ist eine Barriere nur für bestimmte Stoffe durchlässig und für andere nicht, wird sie als semipermeabel oder selektiv permeabel bezeichnet.^b Eine Erklärung für diese Selektivität der Tight Junction ist das Vorhandensein von unterschiedlichen Porentypen: für kleine und große Moleküle.^{38,93} Dabei weisen die Poren für kleine Moleküle mit einem Porenradius von maximal 4 Å eine hohe Durchtrittskapazität und die Poren für große Moleküle mit einem Porenradius mit letztlich 7 Å eine niedrige Kapazität auf.¹

Hydrierte und dehydrierte Ionenradien bei 25 °C		
Monovalente Ionen	Dehydrierter Radius	Hydrierter Radius
Lithium (Li ⁺)	0,6	3,82
Natrium (Na ⁺)	0,95	3,58
Kalium (K ⁺)	1,33	3,31
Rubidium (Rb ⁺)	1,48	3,29
Caesium (Cs ⁺)	1,69	3,29
Divalente Ionen		
Magnesium (Mg ²⁺)	0,65	4,28
Calcium (Ca ²⁺)	0,99	4,12
Strontium (Sr ²⁺)	1,13	4,12
Barium (Ba ²⁺)	1,35	4,04

Tabelle 4-1

Ionenradien nach Nightengale

Dargestellt sind die Ionenradien für monovalente und divalente Ionen in Å.¹

Betrachtet man hierzu Tabelle 4-1 wird deutlich, dass die untersuchten divalenten Ionen alle einen hydrierten Radius von 4 Å aufweisen und damit hydratisiert zu groß für die kleinen Poren mit der hohen Durchtrittskapazität wären. Eine Passage durch diese Poren wäre nur bei vollständigem oder teilweisem Verlust der Hydrathülle möglich, d.h. nur durch eine Pore mit starker Interaktion zwischen dem Ion und dem Kanalprotein (s.u.). Die untersuchten monovalenten Ionen könnten diese kleinen Poren auch hydratisiert passieren. Eine Variation der Permeabilität wäre hier durch Veränderung des Mengenverhältnisses der Porentypen denkbar.¹⁹ Eine andere Möglichkeit, die vorherige nicht ausschließend, besteht in einer unterschiedlichen Interaktion zwischen der Tight Junction und dem Ion. Bei besonders selektiven Tight Junctions wird von einer starken, bei nicht-selektiven von einer schwachen Interaktion zwischen Tight Junction Protein und Ion ausgegangen.

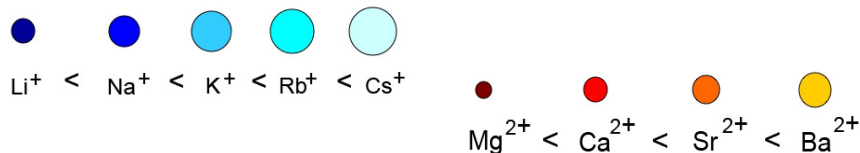
Die Theorie der Ionensequenzen

Der Fokus dieser Arbeit lag auf den Ionen der beiden ersten Hauptgruppen des Periodensystems der Elemente. Zuerst wurden die monovalenten Kationen der 2. bis 6. Periode der ersten Hauptgruppe betrachtet: Li⁺, Na⁺, K⁺, Rb⁺ und Cs⁺, folgend die divalenten Kationen der 3. bis 6. Periode der zweiten Hauptgruppe: Mg²⁺, Ca²⁺, Sr²⁺ und Ba²⁺ (siehe Tabelle 4-1).

^b Hierbei beschreibt „selektiv“ die Fähigkeit aus einer Gesamtheit von Auswahlmöglichkeiten systematisch bestimmte auszuwählen.

Die Ionenradien ändern sich periodisch: Da durch die steigende positive Kernladung die negativen Elektronen stärker angezogen werden, nehmen die Ionenradien innerhalb einer Periode von links nach rechts ab. Das zweifach positiv geladene Kation hat deshalb gegenüber dem einfach geladenen Kation einer Periode einen wesentlich kleineren Radius ($\text{Mg}^{2+} < \text{Na}^+$).

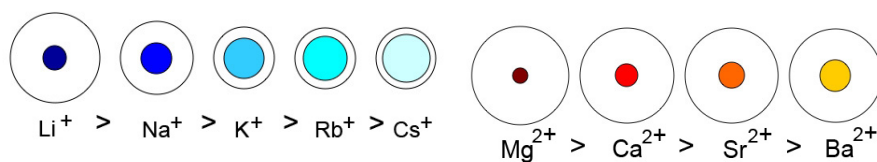
Innerhalb einer Hauptgruppe nehmen diese, von oben nach unten, also mit steigender Ordnungszahl zu, da jeweils neue, weiter außen liegende Schalen mit Elektronen besetzt werden.

**Abbildung 4-1**

Ionen sortiert nach den dehydrierten Radien

Die ausgefüllten Kreise symbolisieren die dehydrierten Ionenradien.

In einer wässrigen Lösung werden Ionen von Wassermolekülen umhüllt. Es tritt eine Ion-Dipol-Wechselwirkung zwischen dem Ion und den Wassermolekülen ein. Die Ionen werden hydratisiert. Weisen Ionen die gleiche Ladung auf, variiert die Hydrathülle je nach Größe des Ions: da sich die positive Ladung kleiner Ionen auf einer kleineren Fläche verteilt, bauen diese größere Hydrathüllen auf. Daraus folgt, dass die Radien der hydratisierten Ionen X^+_{aq} mit steigender Ordnungszahl abnehmen, wohingegen die Ionenradien der unhydrierten Ionen mit steigender Ordnungszahl zunehmen (s.o.):

**Abbildung 4-2**

Ionen sortiert nach den hydratisierten Radien


Hydrathülle dargestellt als Ring um das dehydrierte Ion, das als farblich ausgefüllter Kreis entsprechend seiner Größe dargestellt ist.

Es ist möglich, die Permeabilität für Ionen einer Tight Junction/Pore für Ionen durch thermodynamische Berechnungen bzw. durch die physikalischen Eigenschaften der Bindestelle zu erklären. Ein Vorreiter auf diesem Gebiet war George Eisenman. In den 60iger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts untersuchte er die Ionenpermeabilität und -selektivität von Aluminiumsilicat-Glaselektroden. Eisenman entwickelte die These, dass die Selektivität der Glaselektroden durch die unterschiedliche Feldstärken^c der negativ geladenen Kation-Bindungsstelle bedingt ist.³ Weitere Experimente zeigten, dass sich die an Glaselektroden gewonnenen Ergebnisse auch auf biologische Systeme übertragen lassen. Aus den Ergebnissen

^c Feldstärke bezeichnet das Maß für die Fähigkeit eines physikalischen Feldes, eine Kraft auf einen Körper auszuüben, der eine bestimmte Eigenschaft besitzt, auf die das Feld wirken kann.

seiner Versuche leitete Eisenman schließlich Permeabilitätssequenzen ab.^{2,3} Später konnten diese Vermutungen durch energetische Überlegungen bestätigt und erweitert werden.⁹⁴

Betrachten wir zuerst die oben genannten fünf einwertigen Ionen: Lithium, Natrium, Kalium, Rubidium und Caesium. Mit fünf Variablen ergeben sich maximal 5! (sprich: Fakultät) = 120 Kombinationsvarianten. Eisenman zeigte in seinen Versuchen, dass aber nur 11 der theoretisch möglichen Sequenzen an den untersuchten ionenselektiven Gläsern vorkommen.



Nr.	Eisenman-Sequenz
I	Cs ⁺ > Rb ⁺ > K ⁺ > Na ⁺ > Li ⁺
II	Rb ⁺ > Cs ⁺ > K ⁺ > Na ⁺ > Li ⁺
IIa	Cs ⁺ > K ⁺ > Rb ⁺ > Na ⁺ > Li ⁺
III	Rb ⁺ > K ⁺ > Cs ⁺ > Na ⁺ > Li ⁺
IIIa	K ⁺ > Cs ⁺ > Rb ⁺ > Na ⁺ > Li ⁺
IV	K ⁺ > Rb ⁺ > Cs ⁺ > Na ⁺ > Li ⁺
V	K ⁺ > Rb ⁺ > Na ⁺ > Cs ⁺ > Li ⁺
VI	K ⁺ > Na ⁺ > Rb ⁺ > Cs ⁺ > Li ⁺
VII	Na ⁺ > K ⁺ > Rb ⁺ > Cs ⁺ > Li ⁺
VIII	Na ⁺ > K ⁺ > Rb ⁺ > Li ⁺ > Cs ⁺
IX	Na ⁺ > K ⁺ > Li ⁺ > Rb ⁺ > Cs ⁺
X	Na ⁺ > Li ⁺ > K ⁺ > Rb ⁺ > Cs ⁺
XI	Li ⁺ > Na ⁺ > K ⁺ > Rb ⁺ > Cs ⁺

Tabelle 4-2
Eisenman-Sequenzen.

Dargestellt sind die Eisenman-Sequenzen für monovalente Ionen. Die Sequenz I gibt die hydrierten Radien in aufsteigender Reihenfolge wieder, die Sequenz XI die dehydrierten Radien in aufsteigender Reihenfolge. Der Pfeil zeigt den Übergang von einer schwachen Interaktion (blau) zu einer starken Interaktion (rot) zwischen Ion und der Tight Junction (s.u.).³

Die elf Eisenman-Sequenzen sind in Tabelle 4-2 aufgeführt. Dabei spiegelt die I. Sequenz die *hydrierten* Radien, die XI. Sequenz die *dehydrierten* Radien in aufsteigender Reihenfolge wieder. Diese Beobachtung kann durch folgende Überlegungen erklärt werden:

Ein Kation muss in einem biologischen System in seiner näheren Umgebung einige negativ geladene Atome haben. Wenn Wasser in seiner Nähe ist, wird es mit dem negativen Bereich des Wassermoleküls eine Verbindung eingehen, es wird hydriert. Nehmen wir nun an, dass in der näheren Umgebung des Kations sich nicht nur Wasser befindet, sondern auch ein Kanalprotein innerhalb einer Membran. Das Ion mit der größten freiwerdenden Energie bei einem Transfer wird dann vom Wasser zum Ionenkanal transferiert. Die Triebkraft für diesen Transfer ist die Differenz zwischen der freien Energie der Ion-Kanalprotein-Interaktion und der freien Energie des Kations.⁹⁴ Die Ion-Kanalprotein-Interaktion ist abhängig von der Feldstärke des negativ geladenen Bindungsbereiches des Ionenkanals. Man kann nun zwei Extremfälle betrachten: (i) einen sehr stark geladenen Bindungsbereich bzw. Ion-Bindestelle-Interaktion oder (ii) einen sehr schwach geladenen Bindungsbereich bzw. Ion-Bindestelle-Interaktion.

Im ersten Falle (i) wird das Ion mit dem kleinsten dehydrierten Radius bevorzugt, da die Ion-Bindestelle-Interaktion stärker ist als die freie Hydratationsenergie. Die Ionen verlieren bei

ihrem Durchtritt die Hydrathülle komplett und werden nach ihrem dehydrierten Radius sortiert. Die Bindungssequenz ist einfach die aufsteigende Ionenradien-Sequenz (entspricht Eisenman-Sequenz XI).

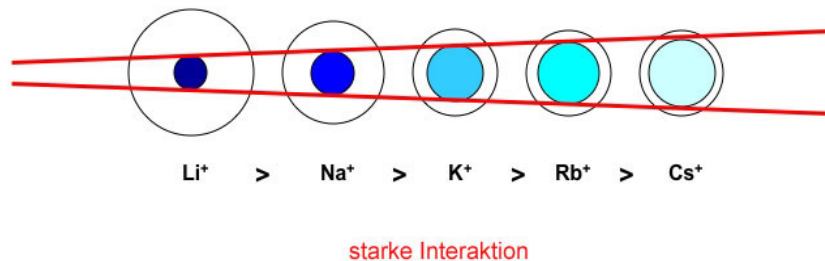


Abbildung 4-3
Starke Interaktion.

Sortierung der Ionen entlang ihrer dehydrierten Radien bei starker Interaktion zwischen dem Ion und dem Bindungsbereich.

Im zweiten Fall (ii) dominiert die freie Energie der Hydratation den Austausch oder Transfer des Ions, da die Ion-Bindestelle-Interaktion schwächer ist als die Ion-Wasser-Bindung. Das bevorzugte Ion ist jenes mit dem größten dehydrierten und kleinsten hydrierten Radius. Da praktisch keine Interaktion zwischen dem Ion und der Bindungsstelle stattfindet, werden die hydrierten Ionen nach ihrer Größe sortiert. Dabei verliert das jeweilige Ion bei dem Durchtritt seinen Wassermantel nicht. Die Bindungssequenz ist die absteigende Ionenradien-Sequenz (entspricht der Eisenman-Sequenz I).

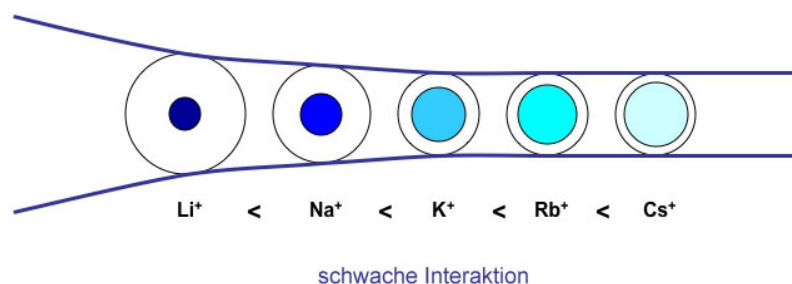


Abbildung 4-4
Schwache Interaktion.

Sortierung der Ionen entlang ihrer hydrierten Radien bei schwacher Interaktion zwischen dem Ion und dem Bindungsbereich.

Analog zu den monovalenten Ionen wurden auch die Erdalkali-Kationen Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} und Ba^{2+} untersucht. Von den maximal $4! = 24$ möglichen Kombinationen konnten 7 in biologischen Systemen gefunden werden⁴. Dieselben Sequenzen wurden von Sherry hergeleitet.⁴ Auch hier zeigt die erste Sequenz die Hydrationsradien in aufsteigender Reihenfolge auf, die siebende die aufsteigende Reihenfolge der dehydrierten Ionenradien auf.

Nr.	Sherry-Sequenzen
I	Ba ²⁺ > Sr ²⁺ > Ca ²⁺ > Mg ²⁺
II	Ba ²⁺ > Ca ²⁺ > Sr ²⁺ > Mg ²⁺
III	Ca ²⁺ > Ba ²⁺ > Sr ²⁺ > Mg ²⁺
IV	Ca ²⁺ > Ca ²⁺ > Mg ²⁺ > Sr ²⁺
V	Ca ²⁺ > Mg ²⁺ > Ba ²⁺ > Sr ²⁺
VI	Ca ²⁺ > Mg ²⁺ > Sr ²⁺ > Ba ²⁺
VII	Mg ²⁺ > Ca ²⁺ > Sr ²⁺ > Ba ²⁺

Tabelle 4-3
Sherry-Sequenzen.

Dargestellt sind die Sherry-Sequenzen für divalente Ionen. Die Sequenz I die hydrierten Radien in aufsteigender Reihenfolge wieder, die Sequenz XI die dehydrierten Radien in aufsteigender Reihenfolge.⁴

Der Einfluss der untersuchten Claudine auf die Permeabilität

Die Eisenman-Sequenzen wurden aufgrund ihrer allgemeinen Gültigkeit für die monovalenten Kationen verwendet. Für die divalenten Kationen verwendeten wir die Sherry-Sequenzen, da diese die Versuchsergebnisse, vor allem bei biologischen Systemen, besser erklären. Mit Hilfe der berechneten Permeabilitäten für monovalente Ionen können die Klone teilweise den Eisenman-Sequenzen zugeordnet werden. Für die divalenten Ionen konnte in den hier vorgestellten Ergebnissen keine eindeutige Zuordnung erfolgen. Die wahrscheinlichste Erklärung für das Fehlen einer eindeutigen Abstufung der Permeabilitäten liegt darin, dass der theoretische Unterschied zwischen den einzelnen Permeabilitäten kleiner ist als der Messfehler. Betrachtet man vorerst die Permeabilitätssequenz für monovalente Ionen der Kontrollzellen, fällt auf, dass diese der Eisenman-Sequenz IV entspricht. Diese Sequenz spiegelt eine schwächere Interaktion zwischen Ion und Bindungsstelle wieder (Tabelle 4-3). In der Tabelle 4-4 sind die Klone den Sequenzen zugeordnet. Besonders interessant ist die Verschiebung der Permeabilitätssequenz der Claudin-10 Variante 2-Klone. Die Permeabilitätspräferenzen der anderen Zellklone konnten keiner Eisenman-Sequenz zugeordnet werden. Es veränderten sich zwar die einzelnen Permeabilitäten und eine Tendenz zu einer stärkeren Interaktion zwischen Ion und Pore konnte beobachtet werden, aber es kam zu keiner signifikanten Verschiebung.

Nr.	Eisenman-Sequenz
I	Cs ⁺ > Rb ⁺ > K ⁺ > Na ⁺ > Li ⁺
II	Rb ⁺ > Cs ⁺ > K ⁺ > Na ⁺ > Li ⁺
IIa	Cs ⁺ > K ⁺ > Rb ⁺ > Na ⁺ > Li ⁺
III	Rb ⁺ > K ⁺ > Cs ⁺ > Na ⁺ > Li ⁺
IIIa	K ⁺ > Cs ⁺ > Rb ⁺ > Na ⁺ > Li ⁺
IV	K ⁺ > Rb ⁺ > Cs ⁺ > Na ⁺ > Li ⁺
V	K ⁺ > Rb ⁺ > Na ⁺ > Cs ⁺ > Li ⁺
VI	K ⁺ > Na ⁺ > Rb ⁺ > Cs ⁺ > Li ⁺
VII	Na ⁺ > K ⁺ > Rb ⁺ > Cs ⁺ > Li ⁺
VIII	Na ⁺ > K ⁺ > Rb ⁺ > Li ⁺ > Cs ⁺
IX	Na ⁺ > K ⁺ > Li ⁺ > Rb ⁺ > Cs ⁺
X	Na ⁺ > Li ⁺ > K ⁺ > Rb ⁺ > Cs ⁺
XI	Li ⁺ > Na ⁺ > K ⁺ > Rb ⁺ > Cs ⁺

MDCK C7
Kontrollzellen

Tabelle 4-4

Eisenmann-Sequenz der MDCK C7-Kontrollzellen.

Der blaue Kasten hebt die Eisenmann-Sequenz der Kontrollzellen hervor.

Das Permeabilitätsverhalten der Claudin-10-Klone

Wie man deutlich in der Tabelle 4-5 erkennt, führt die Expression des Claudin-10 Variante 2-Proteins zu einer Verschiebung der Permeabilitätssequenz hin zu einer stärkeren Interaktion

(Eisenman-Sequenz X) zwischen dem Ion und der Pore. Die Ionen verlieren also bei dem Transfer der Tight Junction teilweise oder vollständig ihre Hydrathülle und werden dementsprechend nach ihren unhydrierten Radien sortiert.

Nr.	Eisenman-Sequenz
I	Cs ⁺ > Rb ⁺ > K ⁺ > Na ⁺ > Li ⁺
II	Rb ⁺ > Cs ⁺ > K ⁺ > Na ⁺ > Li ⁺
IIa	Cs ⁺ > K ⁺ > Rb ⁺ > Na ⁺ > Li ⁺
III	Rb ⁺ > K ⁺ > Cs ⁺ > Na ⁺ > Li ⁺
IIIa	K ⁺ > Cs ⁺ > Rb ⁺ > Na ⁺ > Li ⁺
IV	K ⁺ > Rb ⁺ > Cs ⁺ > Na ⁺ > Li ⁺
V	K ⁺ > Rb ⁺ > Na ⁺ > Cs ⁺ > Li ⁺
VI	K ⁺ > Na ⁺ > Rb ⁺ > Cs ⁺ > Li ⁺
VII	Na ⁺ > K ⁺ > Rb ⁺ > Cs ⁺ > Li ⁺
VIII	Na ⁺ > K ⁺ > Rb ⁺ > Li ⁺ > Cs ⁺
IX	Na ⁺ > K ⁺ > Li ⁺ > Rb ⁺ > Cs ⁺
X	Na ⁺ > Li ⁺ > K ⁺ > Rb ⁺ > Cs ⁺
XI	Li ⁺ > Na ⁺ > K ⁺ > Rb ⁺ > Cs ⁺

MDCK C7 Kontrollzellen
CLDN 10V.1 Zellen
CLDN 19 Zellen

CLDN 11 Zellen
CLDN 16 Zellen

CLDN 10V.2 Zellen

Tabelle 4-5

Eisenmann-Sequenzen der Claudin-Klone.

Den Claudin-10 V.2 Klonen konnte eine Eisenmann-Sequenz (roter Kasten), den restlichen Klonen konnten nur teilweise Sequenzen (Linien) zugeordnet werden.

Wie in den Ergebnissen dargestellt erhöhte die Anwesenheit von Claudin-10 V.2 in den Tight Junction das Na⁺/Cl⁻-Permeabilitätsverhältnis, mit einer extremen Steigerung der Na⁺-Permeabilität. Weitere Untersuchungen der gleichen Klone bestätigten die Ergebnisse (D. Günzel, Institut für Klinische Physiologie, Berlin, persönliche Mitteilung): Für die Ionen NO³⁻ und Pyruvat wurde eine Erniedrigung des Permeabilitätsverhältnisses $P_{NO_3^-}/P_{Na^+}$ sowie $P_{Pyruvat}/P_{Na^+}$ gefunden, die mit einem Anstieg Na⁺-Permeabilität erklärbar ist. Diese Verschiebung zu einer stärkeren Interaktion konnte bei der Variante 1 des Claudin-10 Proteins nicht nachgewiesen werden. Dies impliziert, dass ein bedeutender Unterschied zwischen diesen Varianten vorliegt. Daher erscheinen vorliegende Ergebnisse vorerst widersprüchlich zu den bisher veröffentlichten Beobachtungen für Claudin-10.⁵⁴ Stabil transfiziert in MDCK II-Zellen führte Claudin-10 Variante 2 bei den Experimenten der Arbeitsgruppe um Van Itallie zu keiner Veränderung des Na⁺/Cl⁻-Permeabilitätsverhältnisses, wohingegen Claudin-10 Variante 1 zu einem verminderten Permeabilitätsverhältnis führte. Diese Veränderung wurde durch eine verminderte Na⁺- und eine erhöhte Cl⁻-Permeabilität hervorgerufen.⁵⁴ Vergleicht man unsere Methoden mit denen Van Itallies fällt die verwendete Zelllinie auf. Zwar stammen beide Zelllinien von Hundenieren (MDCK-Zellen), jedoch gehören sie nicht demselben Subklon an. So weisen die von Van Itallie verwendeten MDCK II-Zellen einen niedrigen transepithelialen Widerstand auf, die von uns verwendeten MDCK C7-Zellen gehören hingegen zu einem Subklon mit einem hohen Widerstand. Neben einem unterschiedlichen Verhalten gegenüber dem antidiuretischen Hormon (ADH), unterscheiden sich die beiden Subklone außerdem durch ihre endogene Claudin-Expression. Die MDCK II-Zellen exprimieren Claudin-2, das bekannt ist für die Ausbildung

einer parazellulären Kationenpore.⁴¹ Die von uns verwendeten MDCK C7-Zellen exprimieren dieses Claudin nicht. Der bei Van Itallie beobachtete Anstieg der Permeabilität könnte durch eine Interaktion zwischen Claudin-10 Variante 1 und Claudin-2 bedingt sein. Dies würde auch die ausbleibende Permeabilitätssteigerung in unseren Experimenten erklären. Die Expression von Claudin-2 ist bisher nicht im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife beschrieben worden. Deshalb könnte man davon ausgehen, dass die vermutete Interaktion für die Funktion dieses Nierenabschnittes nicht von Bedeutung ist.

Van Itallie et al.⁵⁴ transfizierten beide Isoformen außerdem stabil in Schweinenieren-Zellen (LLC-PK1). Die LLC-PK1-Zellen weisen einen niedrigen transepithelialen Widerstand ($\approx 127 \Omega \text{ cm}^2$)⁹⁵ und die Charakteristika des proximalen Tubulus auf, weswegen sie als ein Modell für diesen genutzt werden. Mit den endogenen Claudinen 1, 2, 3, 4 und 7 unterscheiden sie sich in der Claudinexpression gegenüber den MDCK II- und C7-Zellen. Generell gelten sie als Anionen-selektive Zellen.⁹⁶ Die Überexpression von exogenen Claudin-10 V.1 sowie der Variante 2 führte hier zu einer Verminderung des transepithelialen Widerstandes. Auch die Permeabilitäten für Na^+ - und Cl^- -Ionen veränderten sich: Claudin-10 V.1 führte zu einer signifikanten Erhöhung der Cl^- -Permeabilität, Claudin-10 V.2 zu einer gesteigerten Na^+ -Permeabilität.¹⁹ Betrachtet man die Beobachtungen der verschiedenen Transfektionen gemeinsam, wird die bedeutende Rolle der endogen exprimierten Claudine deutlich.

Permeabilitätsverhalten der Claudin-11-Klone

Claudin-11 zeigte sich in unseren Versuchen nicht einheitlich. Ursachen für dieses Verhalten waren unseren Analysen nicht zugänglich. Es konnte auch keine Korrelation zwischen den unterschiedlichen Konstrukten und den Ergebnissen gefunden werden, so dass eine Interaktion oder Behinderung durch die verwendeten Vektoren bzw. das Green Fluorescence Protein (GFP) unwahrscheinlich ist. Murines Claudin-11 wurde auch von der Arbeitsgruppe um Van Itallie untersucht: Überexpression in MDCK II-Zellen führte zu einer Zunahme des transepithelialen Widerstandes und Abnahme der Na^+ -Permeabilität, transfiziert in LLC-PK1-Zellen zeigten sich keine Veränderungen.⁵⁵

In zwei Claudin-11-Klonen konnten wir jedoch eine signifikante Erhöhung der Na^+ -Permeabilität feststellen. Trotz des widersprüchlichen Verhaltens der anderen Klone, könnte Claudin-11 wichtig für die Kationenpermeabilität eines Epithels sein. Diese Vermutung bestärkend ist folgende Beobachtung: Claudin-11 konnte in den Tight Junction der Stria vascularis im Innenohr nachgewiesen werden.⁹⁷ Die Stria vascularis ermöglicht den Aufbau eines endocholearen Potentials, das primär durch die Verschiebung von Kaliumionen aus der

Perilymphe in die Endolympe entsteht. Fehlt Claudin-11 in den Tight Junction, ist der Aufbau dieses Potentials nicht mehr möglich.⁶⁰ Zwei Schlüsse könnten daraus gezogen werden: entweder fungiert Claudin-11 in den Stria Zellen als Pore für Kationen übereinstimmend mit unseren Beobachtungen oder es hat eine abdichtende Funktion.

Permeabilitätsverhalten der Claudin-16-Klone

Claudin-16 zeigte eine leichte Verschiebung zu einer stärkeren Interaktion von Ion und Pore jedoch ohne eine Stufung einer bestimmten Eisenman-Sequenz entsprechend. Unsere Untersuchungen zu den divalenten Ionen bestärkten die Hypothese, dass Claudin-16 an der Bildung einer selektiven Kationenpore entscheidend mitwirkt und dadurch die parazelluläre Resorption von Mg^{2+} und Ca^{2+} ermöglicht. Wir konnten in den Claudin-16 überexprimierenden MDCK C7-Zellen eine (marginale) Erhöhung der Mg^{2+} - und Na^{+} -Permeabilität nachweisen. Unsere Beobachtungen sprechen damit auch für eine Beteiligung von Claudin-16 am Aufbau des elektrochemischen Gradienten durch eine gesteigerte Na^{+} -Permeabilität und damit für eine direkte Beeinflussung der Triebkraft für den parazellulären Transport von Mg^{2+} und Ca^{2+} . Die Arbeitsgruppe um Goodenough hatte Claudin-16 auch bezüglich der Permeabilität für divalente Ionen untersucht. Hier scheint die Funktion des Claudin-16 hinsichtlich der parazellulären Resorption unabhängiger von den endogen exprimierten Claudinen zu sein: Sowohl Claudin-16 überexprimierende LLC-PK1-Zellen als auch MDCK II-Zellen zeigten eine Zunahme der Mg^{2+} -Permeabilität dieser Zelllayer.⁷³ Hierbei gilt zu beachten, dass die verwendeten LLC-PK1-Zellen kein Claudin-2 exprimierten. Gleichzeitig konnten sie nur in den transfizierten LLC-PK1-, nicht jedoch in den MDCK II-Zellen eine Erhöhung der Na^{+} -Permeabilität feststellen⁷³.

Permeabilitätsverhalten der Claudin-19-Klone

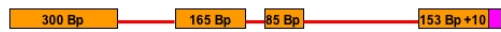
Claudin-16 und -19 weisen ähnliche Expressionsmuster auf. Mutationen in den entsprechenden humanen Genen führen zu einer fast identischen Erkrankung (FHHNC). Diese Aspekte ließen die Vermutung aufkommen, dass sie eine ähnliche Funktion hinsichtlich der Mg^{2+} -Resorption innerhalb des dicken aufsteigenden Astes der Henle-Schleife einnehmen. Bei den Untersuchungen der divalenten Ionen zeigten die Claudin-19-Klone keine Permeabilitätsveränderungen gegenüber den Kontrollzellen. Jedoch konnten wir bei zwei Claudin-19-Zellklonen eine signifikante Erhöhung der Natrium- und Chloridpermeabilität nachweisen. Und es konnte außerdem eine Steigerung der Permeabilität für die anderen monovalente Kationen beobachtet werden. Eine Beteiligung an dem Aufbau des elektrochemischen Gradienten wäre damit auch hier denkbar, ebenso eine Interaktion von Claudin-16

und -19 zur Optimierung der Mg²⁺- und Ca²⁺-Resorption. Bei den Untersuchungen konnten wir zwei unterschiedliche Claudin-19 Spleißvarianten identifizieren: Claudin-19 V.1 und V.2.

CLDN 19.1



CLDN 19.2



Exons
Introns

Abbildung 4-5

Unterschiedliche Spleißvarianten des Claudin-19.

Die Exons sind als orange-farbende Rechtecke, die Introns als rote Linie dargestellt. Der pink markierte Bereich des vierten Introns der Claudin-19 Variante 1 entspricht dem letzten Abschnitt des vierten Exons der V.2 (pink markiert). Bp: base pairs

Claudin-19 V.1 weist fünf Exons, Claudin-19 V.2 vier Exons auf. Die ersten drei Exons sind identisch. Das vierte Exon ist ebenfalls identisch, nur bei der zweiten Variante durch zehn zusätzliche Basenpaare verlängert, die sich bei der ersten Variante bereits in dem Intron-Bereich befinden. Die entstehenden Proteine unterscheiden sich nur durch ihre verschieden langen C-Termini. In den extrazellulären Schleifen finden sich keine Unterschiede bezüglich der geladenen Aminosäuren.

Außerdem sind zwei Transkripte in humaner cDNA zu finden: die 137. Base kann entweder ein Cytosin oder ein Thymin sein (Triplett CTC oder CCC). Diese Variation führt bei Translation zu zwei unterschiedlichen Aminosäuren in Position 46: Prolin oder Leucin. Prolin ist bekannt als „Helixbrecher“ und meist zu finden am Übergang von einer Alpha-Helix in eine gerade Struktur. Dieser Bereich befindet sich in der ersten extrazellulären Schleife. Unsere Claudin-19 Varianten weisen beide Leucin in Position 46 auf (rot markiert in der Abbildung 4-6). Zu welchem Unterschied diese Variation innerhalb der Funktion des Claudin-19 führt, ist bisher unbekannt.

CLDN 19.1

	10	20	30
MANSGLQL	LLG YFLALGGWVG	IIASTALPQW	
	40	50	60
KQSSYAGDAI	ITAVGLYEGL WMSCASQSTG		
	70	80	90
QVQCKLYDSL	LALDGHQISA RALM	MVVAVLL	
	100	110	120
GFVAMVLSV	GMKCTRVGDS NPIAKGRVAI		
	130	140	150
AGGALFILAG	LCTLTAVSWY	ATLVTQEFFN	
	160	170	180
PSTPVNARYE	FGPALFVGWA	SAGLAVLGGS	
	190	200	210
FLCCTCPEPE	RPNSSQPYP	PGPSAAARE	P
	220		
VKLPASAKG	PLGV		

Molekulargewicht: 23.229 Da
Länge: 224 AA

CLDN 19.2

	10	20	30
MANSGLQL	LLG YFLALGGWVG	IIASTALPQW	
	40	50	60
KQSSYAGDAI	ITAVGLYEGL WMSCASQSTG		
	70	80	90
QVQCKLYDSL	LALDGHQISA RALM	MVVAVLL	
	100	110	120
GFVAMVLSV	GMKCTRVGDS NPIAKGRVAI		
	130	140	150
AGGALFILAG	LCTLTAVSWY	ATLVTQEFFN	
	160	170	180
PSTPVNARYE	FGPALFVGWA	SAGLAVLGGS	
	190	200	210
FLCCTCPEPE	RPNSSQPYP	PGPSAAARE	Y V

Molekulargewicht: 22.077 Da
Länge: 211 AA

Abbildung 4-6

Aminosäuresequenz der Claudin-19 Varianten.

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz der Claudin-19 Varianten. Die Transmembranbereich sind türkis und die extrazellulären dunkelblau markiert. Die unterschiedlichen C-Termini sind pink markiert. Das rote ‚L‘ steht für das Leucin in Position 59.

Da sich die von uns verwendeten Klone unabhängig der Variante unterscheiden, können keine Rückschlüsse auf die eventuelle spezifische Funktion einer der Varianten vorgenommen werden. Welche Bedeutung diese Unterschiede für die Funktion des Claudin-19 haben, könnte in

zukünftigen Untersuchungen geklärt werden. Insgesamt konnte eine Erhöhung der Permeabilität für monovalente Ionen nachgewiesen werden, ohne Änderung der Ionenpräferenz. Erst kürzlich konnte die Arbeitsgruppe um Angelow zeigen, dass die kurze Variante des Claudin-19 stabil transfiziert in MDCK II-Zellen die Permeabilität für monovalente und divalente Kationen vermindert.⁸³ Auch hier scheinen die endogen vorhandenen Claudine eine entscheidende Rolle zu spielen.

Die Claudine im Verband

Der Zusammenhang zwischen der Permeabilität und dem Widerstand

Wie für Ionenkanäle schon bekannt bestätigen unsere Ergebnisse, dass die unterschiedlichen Ladungen, positiv oder negativ, der Bindungsbereiche der Claudine die Spezifität der TJ bedingen. Doch bevor wir uns der Struktur der Claudine widmen, möchte ich kurz auf einen wichtigen Sachverhalt eingehen: die Korrelation zwischen der Permeabilität und dem Widerstand. Der transepitheliale Widerstand ist ein Maß für die Durchlässigkeit eines Zelllayers. Der elektrische Widerstand einer Membran R_m (Ωcm^2), d.h. der transepitheliale Widerstand, ist umgekehrt proportional zur Membranfläche A definiert nach dem ohmschen Gesetz mit:

$$R = \frac{R_m}{A}$$

Dieser kann zwischen $>100.000 \Omega\text{cm}^2$ in der Harnblase bis zu weniger als $10 \Omega\text{cm}^2$ im proximalen Tubulus der Niere variieren⁵. Diese starke Bandbreite wird durch die einzelnen Komponenten ermöglicht.

Um sich diesen vorerst vereinfacht zu nähern, kann das Epithel als ein einfacher elektrischer Schaltkreis betrachtet werden. Der Gesamtwiderstand R_{ges} dieses Epithels setzt sich wie in Abbildung 4-7 zu sehen aus drei unterschiedlichen Teilwiderständen zusammen.

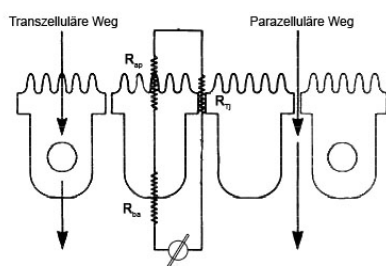


Abbildung 4-7

Widerstandsverteilung eines Zelllayers.

Vereinfachte Darstellung eines Zelllayers. Neben dem trans- und parazellulärem Transportweg ist ein Schaltkreis-Modell eingezeichnet mit in Reihe geschalteten Widerständen (R). R_{ap} : apikaler Widerstand; R_{ba} : basolateraler Widerstand; R_{TJ} : Widerstand der Tight Junction. [modifiziert nach⁵]

Zwei Widerstände R_{ap} und R_{ba} sind in Serie über der apikalen und der basolateralen Membran der Zelle geschaltet. Sie bilden den zellulären Widerstand R_{cell} . Der Dritte ist der Widerstand R_{TJ} des parazellulären Weges, der primär durch die Tight Junction bestimmt wird.

Schaltet man zwei Teilwiderstände in Reihe, so addieren sich ihre Widerstände. Wenn sie parallel geschaltet sind, ist der Gesamtwiderstand kleiner als die Einzelwiderstände. Es addieren sich ihre Leitwerte. Der Gesamtwiderstand unseres Epithels setzt sich deshalb wie folgt zusammen:

$$\frac{1}{R_{ges}} = \frac{1}{R_{para}} + \frac{1}{R_{ap} + R_{ba}}$$

In der Literatur wird die Einteilung des Epithels als „undicht“ bzw. „dicht“ in Abhängigkeit zu dem Verhältnis der parazellulären zur transzellulären Permeabilität bzw. Leitfähigkeit vorgenommen. Wenn das Verhältnis der parazellulären zur transzellulären Leitfähigkeit größer als 1 ist, wird das Epithel als undicht, wenn es kleiner als 1 ist, als dicht bezeichnet.

Einige Autoren haben gezeigt, dass es eine exponentielle Korrelation zwischen der Anzahl an Tight Junction-Strängen und der Permeabilität des Epithels bzw. transepithelialen Widerstand gibt.^{5,98,99}

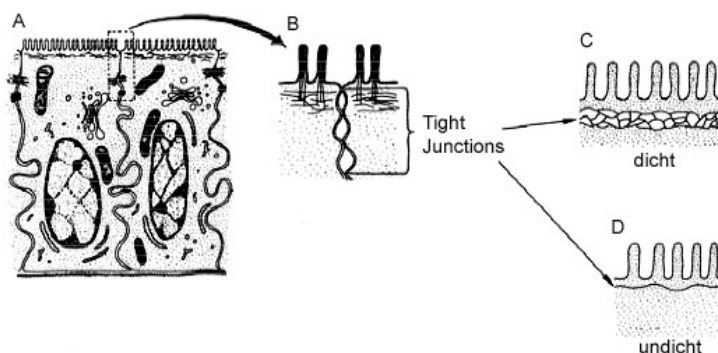


Abbildung 4-8

Die Tight Junction (TJ).

(A) Epithel

(B) Zellzwischenraum mit der Tight Junction

(C) vereinfachte Darstellung eines abdichtenden Epithels mit mehreren TJ-Strängen/Fibrillen

(D) vereinfachte Darstellung eines undichten Epithels mit nur 1-2 TJ-Strängen/Fibrillen
[modifiziert nach⁵]

Einzelne Tight Junction sind in der Regel aus mehreren verschiedenen Claudinen zusammengesetzt. In dieser Arbeit wurden zuerst die einzelnen Claudine untersucht und folgend deren Zusammenwirken in Kokulturen und Kotransfektionen. Es wird bisher davon ausgegangen, dass der transepitheliale Widerstand die Permeabilität widerspiegelt. Zu bedenken wäre, dass dieser Widerstand wie oben erläutert aus zwei Teilwiderständen zusammengesetzt ist: dem transzellulären und parazellulären Widerstand. Sobald der transzelluläre Widerstand überwiegt, würde man keine Abhängigkeit zwischen der parazellulären Permeabilität und dem Widerstand erwarten, da die transzelluläre Permeabilität weniger durch den Widerstand als vielmehr durch die Kanal- und Transporterzusammensetzung der Zelle bestimmt wird.

Andere Autoren zeigten, dass der Widerstand entweder durch die Anzahl an TJ-Proteinen wie den Claudinen oder durch die Anzahl an TJ-Komplexen bzw. -Strängen zwischen benachbarten Zellen bestimmt werden könnte.⁹⁸ Als Gefahr für eine Fehlinterpretation sind hier mögliche Strangbrüche zu erwähnen. Bei gleicher Anzahl an Strängen wäre eine TJ mit Brüchen

wahrscheinlich durchlässiger als diese ohne Brüche. Vermutungen sehen auch eine mögliche Verbindung zwischen der Variation der Anordnung und der Anzahl von TJ-Proteinen.¹⁰⁰ Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass einige wenige Bereiche der ersten extrazellulären Schleife der Claudine (Claudin-5 in u.a.¹⁰¹) ausschlaggebend sind für den Widerstand und nicht die Anzahl der TJ-Stränge. Auch Arbeiten von Furuse und Colegio belegen diese Hypothese.⁵⁵

Bevor wir uns diesem interessanten Aspekt nähern, möchte ich auf unsere gemessenen Widerstände eingehen. Wie im entsprechenden Kapitel beschrieben, fanden wir Claudine, die zu einem hohen bzw. niedrigen transepithelialen Widerstand führten. Zu den Erstgenannten zählen die Claudine-10 V.1, -11, -16 und -19. Zu den letztgenannten die Variante 2 des Claudin-10 und zwei Klone des Claudin-11. Diese Ergebnisse bestätigen die bisher veröffentlichten Beobachtungen.^{54,55,102} Abgesehen von Claudin-16 und -11 gehören die untersuchten Claudine mit einem hohen Widerstand in die von Krause et al. definierte Gruppe der *klassischen Claudine*, diese zeichnen sich durch weite Sequenzhomologien aus. Claudin-11 und -16 werden nach Krause der *nicht-klassischen* Gruppe zugeordnet.

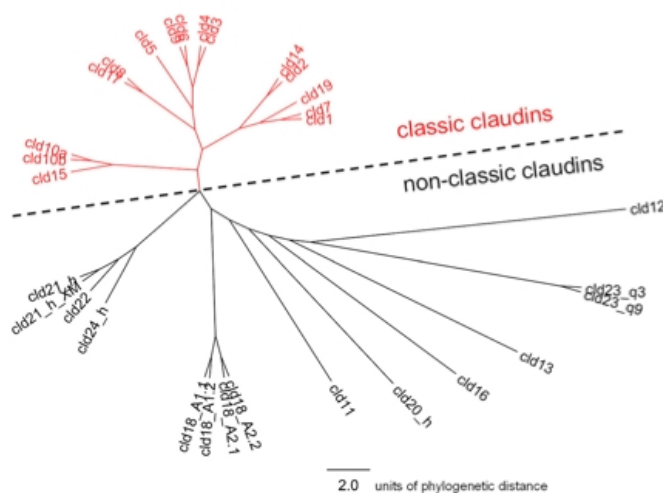


Abbildung 4-9
Phylogenetischer Baum
nach Krause.

Klassische Claudine: 1-10, 14, 15, 17 und 19 dargestellt in Rot; Nicht-Klassische Claudine 11-13, 16, 18 und 20-24 in Schwarz. Als Grundlage dienten murine Sequenzen. Claudin-21 und -24 ist bisher nur im Menschen nachgewiesen worden.⁷

Die Bedeutung der Proteinstruktur

Für das Verständnis der Claudine innerhalb der Tight Junction muss man deren extrazelluläre Schleifen berücksichtigen, denn diese gestalten den Zellzwischenraum und bestimmen dadurch die Durchtrittsbedingungen für die Moleküle. So führen Genmutationen, die veränderte extrazelluläre Schleifen des Claudin-16 bedingen, zu der Familiären Hypomagnesämie mit Hypercalciurie und Nephrocalcinosen (FHHNC).^{16,32,75,103} Auch durch Genmutation veränderte extrazelluläre Schleife des Claudin-19 konnten als verantwortlich für diese Erkrankung mit zusätzlicher Beteiligung des Auges erkannt werden.¹⁷ Andere Veröffentlichungen konnten die Bedeutung der extrazellulären Schleifen aufzeigen und auch als ursächliche Determinanten der

parazellulären Permeabilität identifizieren.^{15,17,73,101,103,104} Eine Interaktion beider Schleifen eines Claudins scheint für die Funktion essentiell zu sein, wie am Beispiel des Claudin-3 und -4 gezeigt werden konnte.⁴⁹ Doch der ersten extrazellulären Schleife wird in den bisherigen Publikationen eine bedeutendere Rolle zugesprochen. Besonders anschaulich wird dies am Beispiel des Claudin-7: Der Austausch von negativ geladenen Bereichen durch positiv geladene führte zu einem Anstieg der Cl⁻-Permeabilität, aber nur, wenn diese in der ersten extrazellulären Schleife und nicht in der zweiten Schleife ausgetauscht wurden.⁷

Die erste extrazelluläre Schleife besteht aus 50-56 Aminosäuren, wobei die nicht-klassische Gruppe an Claudinen (s.o.) eine größere Variabilität als die der klassischen Claudine aufzeigt.⁷ Trotzdem findet man einige stark konservierte Bereiche in der ersten extrazellulären Schleife aller Claudine wie z.B. das Aminosäuren-Motiv ‚W-GLW-C-C‘ (siehe Einleitung). Außerdem befinden sich wichtige Cysteine in der ersten extrazellulären Schleife, die zu Bildung von Disulfidbrücken führen. Behinderungen dieser Bindungen könnten verantwortlich für Veränderungen der Permeabilität sein. Auch Interaktionen der Claudine oder die Modulation ihrer Aktivität über diese Cysteine wären denkbar.¹⁰¹ Als Verweis zur der denkbaren Kanal-Homologie wäre hier die wichtige Rolle von Cysteinen im Zusammenhang mit Kanälen zu erwähnen.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷

Die zweite extrazelluläre Schleife besteht aus ungefähr 25 Aminosäuren bei klassischen Claudinen, bei den nicht-klassischen Claudinen variiert die Länge erheblich.

Die Theorie der geladenen Bereiche

Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass entweder die negativ-geladenen oder die positiv-geladenen Bereiche für die Bildung der Pore mit der jeweils entgegen gesetzter Präferenz für Kationen oder Anionen verantwortlich sind. So führte der Austausch von basischen gegen saure Bereiche bei Claudin-4 innerhalb der ersten Schleife zu einer Erhöhung der Kationenpermeabilität und umgekehrt bei Claudin-15 der Austausch eines sauren Bereiches gegen einen basischen zu einer Verschiebung der Permeabilitätspräferenz von Kationen zu Anionen^{d,104}. Diese Beobachtungen führten zu der Vorstellung die Permeabilität werde durch die geladenen Aminosäuren bestimmt, die einen Durchtrittskreis von Ladungen bilden, eine Pore. Eine gleiche Ladung wie dieser Ladungsring führt in diesem Modell zu Abstoßung des Moleküls, die gegensätzliche Ladung zum Durchtritt.⁷

^d Die Seitenketten basischer Aminosäuren sind in ihrer protonierten Form einfach positiv geladen und in ihrer deprotonierten Form ungeladen. Die Seitenketten der sauren Aminosäuren (einschließlich Cystein und Tyrosin) sind in ihrer protonierten Form ungeladen und in ihrer deprotonierten Form einfach negativ geladen. Deswegen spielt der pH-Wert für die Eigenschaften der Aminosäuren und damit für die gesamte Tight Junction eine wichtige Rolle (s.o.).

Die geladenen Bereiche des Claudin-10 Proteins

Die Claudin-10 V.1 weist mehr positiv geladene Aminosäuren in der ersten extrazellulären Schleife auf als die Variante 2 und umgekehrt die zweite Variante mehr negativ geladene. Entsprechend des oben genannten Modells konnten wir für Claudin-10 V.2 eine Erhöhung der Kationenpermeabilität in den transfizierten Zellen nachweisen. Widersprüchlich erschienen jedoch die Ergebnisse der Variante 1-Klone. Die zu erwartende höhere Anionenpermeabilität stellte sich in Experimenten nicht ein. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der Arbeiten der Gruppe um Van Itallie, die einen Anstieg der Cl⁻-Permeabilität verzeichnen konnten.⁵⁴ Mittels spezifischer Mutationen einzelner geladener Aminosäuren (AS) in der ersten extrazellulären Schleife konnte diese Arbeitsgruppe zusätzlich zeigen, dass zwei Aminosäuren im Besonderen für den Anstieg der Cl⁻-Permeabilität der Claudin-10 V.1 transfizierten Zellen verantwortlich sind, die positiv geladenen Aminosäuren in Position R32 und R61. Auch den von uns untersuchten Klonen der Claudin-10 V.1 Spleißvariante *delta 57* ($\Delta 57$) fehlt die Aminosäuren R61. Im Vergleich zu Claudin-10 V.1 besitzt Claudin-10 V.1 $\Delta 57$ 19 Aminosäuren weniger in der ersten extrazellulären Schleife, damit fehlen auch die fünf positiv geladenen Aminosäuren, darunter auch die positiv geladene AS R61 (in der murinen Form noch zusätzlich eine negativ geladene AS). Gleichzeitig fehlt diesem Claudin-10 auch das zweite Cystein der konservierten Cysteine der Claudin-Familie. Mutationen dieser Cysteine zeigten bei Experimenten an Claudin-5 einen vollständigen Funktionsverlust¹⁰¹, da sie vermutlich eine wichtige Rolle für die Interaktion der Claudine und für die Stabilität eines einzelnen Claudins spielen(s.o.). Dies ist auch von Bedeutung für die Spleißvariante $\Delta 57$, da hier diese beiden stark konservierten Cysteine fehlen. Umgekehrt gibt es hier ein anderes Cystein, das die Funktion zumindest teilweise übernehmen könnte.

Diese Variante 1 $\Delta 57$ hat letztlich eine Gesamtladung der ersten extrazellulären Schleife von plus zwei (murin und human). Für den Vergleich: das Claudin-10 V.1 weist insgesamt eine Ladung von plus sechs (human) bzw. plus fünf (murin) auf, das Claudin-10 V.2 eine Gesamtladung von minus vier (murin und human).

In unseren Experimenten konnten wir keinen signifikanten Unterschied zwischen der V.1 $\Delta 57$ Variante und der Variante 1 feststellen. Auch Untersuchungen der Labors für Klinische Physiologie der Charité, Berlin, die Anionenpermeabilität betreffend konnten nur einen geringen Anstieg des $P_{\text{Pyruvat}}/P_{\text{Na}}$ -Permeabilitätsverhältnisses feststellen und wiesen sonst ein Kontrollähnliches Verhalten nach. Die Variante 1 zeigte in Untersuchungen des Instituts eine Erniedrigung der Permeabilitätsverhältnisse $P_{\text{NO}_3}/P_{\text{Na}}$ sowie $P_{\text{Pyruvat}}/P_{\text{Na}}$ (s.o.). Interessanter

Weise zeigte eine Kokultur der Claudin-10 Variante 1 und der V. 1 $\Delta 57$ -Klone weiterhin den P_{NO_3} -Effekt, der $P_{Pyruvat}/P_{Na}$ -Effekt war jedoch nicht mehr vorhanden. Eine Funktion der $\Delta 57$ Variante könnte also die Modulation des Claudin-10 Variante 1 sein.

Schlussfolgernd bleibt festzuhalten, dass die beiden von Van Itallie identifizierten positiv geladenen Aminosäuren R32 und R59 vielleicht notwendig für die Funktion als Anionenkanal sind, jedoch nicht ausreichend und dass daher noch andere Variablen eine wichtige Rolle spielen müssen.

Die Funktion der $\Delta 57$ Variante konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht umfassend geklärt werden. Aufgrund der ähnlichen Präsentation der $\Delta 57$ Variante und der Claudin-10 V.1 bleibt eine unterstützende Wirkung gegenüber der Funktion der Claudin-10 V.1 denkbar. Ebenfalls könnte eine Feinregulation auf transkriptioneller Ebene durch vermehrte oder verminderte Expression diese Variante erfolgen.

Die geladenen Bereiche des Claudin-11 Proteins

Claudin-11 weist fünf negativ und sechs positiv geladene Aminosäuren in der ersten extrazellulären Schleife auf, also eine Gesamtbilanz von plus eins. Die zweite extrazelluläre Schleife zeigt jeweils eine negativ sowie positiv geladene Aminosäure. Falls eine Porenbildung stattfindet, wäre eine Anionenpräferenz denkbar. Untersuchungen der Anionenpermeabilität müssten zur genaueren Einschätzung erfolgen. Zwei der untersuchten Klone zeigten jedoch eher eine Kationenpräferenz, so dass eine Modulation der Permeabilität durch andere Faktoren wie z.B. die Porengröße oder die Interaktion mit anderen Claudinen wahrscheinlich ist.

Die geladenen Bereiche des Claudin-16 Proteins

Die erste extrazelluläre Schleife des Claudin-16 zeigt eine negative Gesamtladung von minus vier (10 negativ (*Bereiche sind nicht stark konserviert*) und sechs positiv geladenen AS). Die zweite Schleife weist zwei negativ und drei positiv geladenen AS auf, also eine Bilanz von plus eins. Die negative Gesamtladung der ersten Schleife könnte die erhöhte Permeabilität für divalente Ionen durch Bildung eines negativ geladenen Porenringes erklären.⁷³ Auch Claudin-16 besitzt in der ersten Schleife viele negativ geladene Aminosäuren (siehe Einleitung), tauscht man diese durch nicht geladene aus, führte dies zu einem Verlust der spezifischen Na^+ -Permeabilität. Interessanter Weise führte ein Austausch der positiv geladenen Aminosäuren zu keiner Veränderung.⁷³ Außerdem betrifft keine der untersuchten Mutationen des Claudin-16, die die Familiären Hypomagnesämie mit Hypercalciurie und Nephrocalcinoses auslösen, die negativ geladenen Bereiche der zwei extrazellulären Schleifen. Die geladene Bereiche verändernde

Mutationen betreffen fünf der sechs positiven Ladungen der ersten Schleife und eine der drei positiven Ladungen der zweiten Schleife. Der oben genannten Hypothese folgend müsste die aus den negativ geladenen Bereichen geformte Pore der mutierten Claudin-16-Tight Junction für positiv geladene Ionen prinzipiell nicht verändert sein. Die Störung der parazellulären Permeabilität für Mg^{2+} müsste dann durch andere Fehlfunktionen ausgelöst werden.

Die geladenen Bereiche des Claudin-19 Proteins

Im Gegensatz zum Claudin-16 zeigen die kurze wie auch die lange Isoform von Claudin-19 eine neutrale Bilanz der ersten extrazellulären Schleife (vier positiv sowie negativ geladene AS). Diese Beobachtung könnte man als Hinweis auf eine andere unterstützende Funktion innerhalb des parazellulären Transportes von divalenten Ionen verstehen. Untersuchungen der Interaktion dieser Claudine von der Arbeitsgruppe um Hou bestärken diese Vermutung.⁷³

Interaktionen zwischen den Claudinen

Claudine können auf zwei unterschiedliche Arten interagieren: Innerhalb der Plasmamembran ein und derselben Zelle auch *cis*-Interaktion genannt oder zwischen den Plasmamembranen sich opponierender Zellen, auch als *trans*-Interaktion bezeichnet. Man vermutete, dass die in Freeze-Fractur Aufnahmen beobachteten TJ-Stränge durch *cis*-Interaktion gebildet werden.³⁴ Das konnte nun auch kürzlich durch Untersuchungen am Claudin-5 bestätigt werden.¹⁵ Claudin-16 und -19 können durch *cis*-Interaktion miteinander kommunizieren. Untersuchungen zeigten, dass Claudin-19 homophil sowohl in *cis*- als auch in *trans*-Formation interagieren kann, für Claudin-16 konnte dies nicht beobachtet werden. Koexpression dieser Claudine führte zu einer Strang-Bildung innerhalb der TJ als Zeichen heterophiler Interaktion. Zusätzlich konnte durch Untersuchungen von Mutationen, die FHHNC hervorrufen, gezeigt werden, dass nicht nur die Fähigkeit hinsichtlich der Kationenpermeabilität verloren ging, sondern auch die Interaktionen nicht mehr möglich waren. Dabei schien die Mutationslokalisierung bezüglich eines Claudins (*entweder Claudin-16 oder -19 mutiert mit einem Wildtyp*) nicht relevant. Interessant ist hierbei die Beobachtung, dass die Permeabilitätsverhältnisse der kombinierten Klone (Mutation und Wildtyp) denen des nicht mutierten Claudins entsprachen. Schlussfolgernd scheinen die Zellen beide Claudine zu benötigen, um einen synergetischen Effekt zu erzielen.⁸¹

Interaktionen im Kokultur-Experiment

Die von uns untersuchten Kokulturen präsentierten sich in unseren elektrophysiologischen Untersuchungen meist als „Mischform“ der Einzelklone. Theoretisch wären homophile *cis*-

Interaktionen des Claudins einer Zelle und heterophile *trans*-Interaktionen zweier unterschiedlicher Claudine benachbarter Zellen möglich gewesen. Generell zeigte sich, dass die transepithelialen Widerstände und die Permeabilitätsverhältnisse P_{Na}/P_{Cl} der Kokulturen einen Wert zwischen denen der Einzelkulturen aufwiesen. Falls in diesen Kokulturen zusätzliche heterophile *trans*-Interaktionen stattgefunden haben, führten diese nicht zu einem unseren Analysen zugänglichen veränderten Verhalten der Zelllayer.

In zwei Kokulturen mit Claudin-10 V.1 konnten jedoch Abweichungen beobachtet werden: Die Kokultur der beiden Claudin-10 Varianten zeigte eine Erhöhung des Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl} gegenüber den Kontrollzellen ähnlich der Claudin-10 V.2-Zellklone, nur dass dieses wesentlich stärker ausfiel (um das Vierfache). Als ursächlich konnte eine deutliche Verminderung der Chloridpermeabilität identifiziert werden. Der transepitheliale Widerstand verhielt sich dabei erwartungsgemäß (s.o.). *Trans*-Interaktionen zwischen Claudin-10 V.1 und V.2 könnten somit wichtig für die parazelluläre Abdichtung gegenüber Anionen sein. Die Untersuchung der monovalenten Kationen zeigte eine Verschiebung der Eisenman-Sequenz: $P_{Cs} > P_{Rb} > P_{K} > P_{Na} > P_{Li}$. Diese Präferenz entspricht der Eisenman-Sequenz I, d.h. eine Kombination dieser Claudine führt zu einer geringeren Interaktion der Pore mit dem Ion im Vergleich zu den Kontrollzellen.

Die zweite abweichende Ergebnisse zeigende Kokultur war die Kombination von Claudin-10 V.1 und Claudin-16. Diese Kokultur zeigte einen Anstieg des transepithelialen Widerstandes um das 2,5fache im Vergleich zu den MDCK C7-Kontrollzellen. Gleichzeitig imponierte die Kokultur durch eine Verdoppelung des Permeabilitätsverhältnisses P_{Na}/P_{Cl} im Vergleich zu den Kontrollzellen sowie der Einzelkulturen. Die Chloridpermeabilität war um ein Vielfaches niedriger als die ebenfalls erniedrigte Natriumpermeabilität. Auch hierfür könnte eine heterophile *trans*-Interaktion zwischen Claudin-10 V.1 und Claudin-16 verantwortlich sein und zu einer Abdichtung gegenüber Anionen führen. Claudin-10 V.1 hat eine sehr positiv geladene erste extrazelluläre Schleife, Claudin-16 und Claudin-10 V.2 demgegenüber eine negativ geladene. Vielleicht führen diese gegensätzlichen Ladungsverhältnisse zu einer starken elektrostatischen Anziehung und somit zur Abdichtung. Diese Untersuchungen anderer monovalenter und divalenter Kationen sowie der Anionen könnte weitere Erkenntnisse bringen.

Zukünftige Untersuchungen

Doch nicht nur die Interaktionen zwischen den Claudinen, sondern auch andere Faktoren und Regulationsmechanismen sollten nicht aus dem Blickfeld geraten. Wie kann ein und dasselbe Claudin zwei gegensätzlichen Funktionen ausüben? Als Beispiel sei Claudin-19 genannt, das in

Schwann'schen Zellen zu der Abdichtung gegenüber Natrium und Kalium führt und auf der anderen Seite die Durchlässigkeit für diese Ionen in den Tubuluszellen erhöhen soll. Einige Autoren spekulieren, ob Claudine nicht den modifizierbaren Ionenkanälen ähnlicher sind, als allgemein bekannt ist.

Ein Beispiel für eine Modifikationsmöglichkeit einer Pore sind die Ergebnisse von Bungenberg de Long.¹⁰⁸ Diese zeigten, dass die Selektivitätseigenschaften eines Zelllayers für divalente Kationen sich proportional mit dem pH verändern. Ein Abfall des pHs führte zu einer Verschiebung der Permeabilitätssequenz von der starken Interaktion zu einer schwachen Interaktion der Bindungsstelle mit dem Ion. Dies gilt auch für monovalente Kationen¹⁰⁹. Es handelt sich hierbei vermutlich um eine Titration der O=C-O⁻-Kette zu O=C-OH der Aminosäure in der Pore. Hierdurch wird die Ladung in der Pore neutralisiert, die Pore verliert ihre Selektivität, d.h. die Eisenman-Sequenz geht gegen Sequenz I. Dies könnte durch einen Abfall der Ladung in der Pore erklärt werden und damit mit veränderten Bindungsbedingungen einhergehen. Bei unseren Versuchen wurden deshalb Lösungen mit einem konstanten pH verwendet.

Wenn man sich die Eisenman Sequenzen in einer anderen Darstellung vor Augen führt (Abbildung 4-10), fällt auf, dass die Eisenman Sequenzen X der Claudin-10 Variante 2-Zellen stärker permeabel für Protonen (H⁺) ist als z.B. die Sequenz der Kontrollzellen (IV).

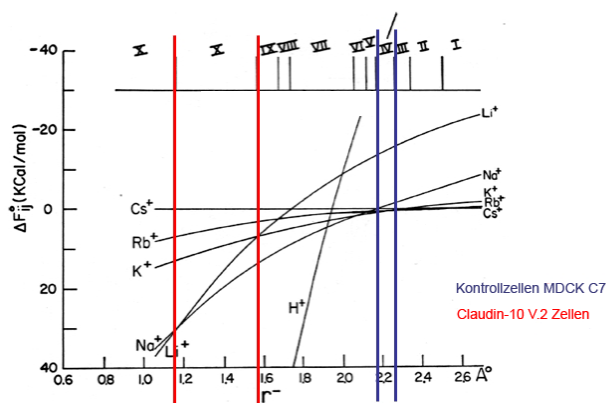


Abbildung 4-10

Eisenmann-Sequenzen: Selektivität als Funktion der Ionenradien.

Darstellung der Eisenmann-Sequenzen im Koordinatensystem. Auf der y-Achse ist die Selektivität in KCal/mol aufgetragen, auf der x-Achse die Ionenradien in Å. Die korrespondierenden Sequenzen der MDCK C7 Kontrollzellen (blau) und der Claudin-10 V.2 Klone (rot) sind durch Grenzlinien markiert. [modifiziert nach²]

Ein weiterer funktionaler Unterschied der beiden Claudin-10 Varianten könnte die H⁺-Permeabilität sein. Solche Experimente konnten bisher nicht erfolgen, da ein pH-Gradient über dem Epithel notwendig wäre. Dieser führt jedoch wie oben angeführt zu einem veränderten Verhalten der Tight Junction.

Eine weitere interessante Struktur der Claudine ist der C-Terminus. Das dort befindliche PDZ-Bindemotiv ist wichtig für die Verankerung der Claudine im Aktin-Zytoskelett²⁸ und vielleicht notwendig für die Lokalisation in der Plasmamembran und den Tight Junction. Innerhalb der klassischen Claudine sind die Position 1 und 0 des Bindemotivs am C-Terminus zu 100%

konserviert, innerhalb der *nicht-klassischen* Claudinen trifft man eine große Bandbreite an. Dabei weisen sehr viele die Kombination ‚YV‘ (Thr-Val) auf, darunter sind auch die von uns untersuchten Claudin-10 Varianten (*Claudine 2, 8, 10, 14, 17 und 20*) und assoziieren mit ZO-1.⁸² Ein Unterschied zwischen den beiden Claudin-19-Proteinen ist der C-Terminus. Das Claudin-19 V.1 ist 13 Aminosäuren länger und endet mit einer ‚GV‘-Sequenz (Gly-Val), während Claudin-19 V.2 entsprechend kürzer ist und am Ende die klassische Kombination ‚YV‘ aufweist. Als einziges *nicht-klassisches* Claudin weist Claudin-16 die ‚RV‘-Kombination (Arg-Val) auf und bindet an ZO-1.⁷⁶ Initial ist man davon ausgegangen, dass die PDZ-Bindungsdomäne des ZO-1, -2 und -3 spezifisch mit dem Carboxyende ‚ES/TDV‘ (Glu-Ser/Thr-Asp-Val) bindet. Mittlerweile ist bekannt, dass es mit unterschiedlichen Enden binden kann, meistens enden diese wie bei den Claudinen der Henle-Schleife mit dem Val.^{28,110} Eine Deletion des C-terminalen PDZ-Bindemotivs kann zu einem Verlust der Lokalisation in den Tight Junction führen. So konnten wir die Claudin-10 Spleißvarianten mit Mutation dieses Bereiches mittels immunhistochemischen Färbungen im endoplasmatischen Retikulum, jedoch nur noch schwach in den Tight Junctions nachweisen. Um dies zu verhindern und weiterhin eine Interaktion zwischen dem PDZ-Bindemotiv und der PDZ-Domäne des z.B. ZO-1 zu gewährleisten, markierten wir unsere Konstrukte (GFP oder YFP) am N-Terminus. Am konfokalen Lichtmikroskop konnte gezeigt werden, dass sich unsere Konstrukte alle in den Tight Junction befanden. Anders verhielt es sich bei einer Publikation von 2004. Hier wurde das am N-Terminus GFP-markierte Claudin-11 nicht in der Plasmamembran angetroffen, sondern akkumulierte in intrazellulären Vesikeln.⁶ Interessanter Weise führte das Vorhandensein eines Yellow Fluorescent Proteins am N-Terminus sowohl bei Claudin-10 V.2 als auch beim Claudin-16 zu einem anderen Verhalten bezüglich der Ionenpermeabilität als auch des transepithelialen Widerstandes. Bei Claudin-10 V.2 kam es zu einem vollständigen Verlust der spezifischen Funktion, sichtbar in einer den Kontrollzellen ähnlichen Eisenman-Sequenz, trotzdem das Protein durch immunhistochemische Färbungen als in den Tight Junctions befindlich identifiziert werden konnte. Bei Claudin-16 konnte eine verminderte, aber nicht signifikant, Mg²⁺-Permeabilität im Vergleich zu den FLAG- oder HA-markierten Klonen aufgefunden werden. Diese Beobachtung könnte durch eine stereochemische Bocklade einer für die Funktion notwendigen *cis*-Interaktion erklärt werden. Bei unseren Claudin-11-Klonen, GFP- und FLAG-markiert konnten wir keine Unterschiede feststellen. Da sich die beiden Fluoreszenz-Proteine nur in fünf Aminosäuren unterscheiden, ist es recht unwahrscheinlich, dass dies direkt mit dem beobachteten Funktionsverlust zusammenhängt. Dies lässt zwei Schlüsse zu: (i) der N-terminale

Floureszent-Marker behindert die Funktion der anderen Claudine nicht, (ii) die Funktion der Claudine, in der es störend ist, wurde noch nicht detektiert.

Auswirkungen auf das Tubulussystem und die Niere

Der dicke aufsteigende Ast der Henle-Schleife hat zwei Hauptaufgaben: die Resorption von Kationen und die Bildung eines osmotischen Gradienten zur Regulation des Wasserresorption in den folgenden Abschnitten. Die Kationen-Resorption erfolgt über zwei Wege: aktiv und passiv. Das Natrium nimmt dabei eine Schlüsselrolle ein. Es wird aktiv über den NKCC2-Transporter in die Zellen aufgenommen und gelangt gleichzeitig getrieben vom lumenpositiven transepithelialen Potential über die TJ parazellulär ins Blut. Gleichzeitig wird dieser aktive Natriumtransport sekundär zur aktiven Resorption von Kalium- und Chloridionen (NKCC2-Transporter) genutzt. Wobei das gesamte Chlorid über Chloridkanäle und nur ein Teil des Kaliums über Kaliumkanäle auf der basolateralen Seite ins Blut gelangen. Der größere Teil des Kaliums rezirkuliert über spezifische Kanäle an der apikalen Membran zurück ins Lumen und verstärkt dadurch das lumenpositive Potential. Dieses lumenpositive Potential wird dann als Triebkraft genutzt zur passiven Resorption von anderen Kationen. Der dicke aufsteigende Ast der Henle-Schleife ist wasserdicht. Durch den zellulären und parazellulären Transport von Teilchen wird im Laufe des aufsteigenden Astes ein osmotischer Gradient aufgebaut. Dieser wird benötigt, um in den folgenden Abschnitten das extrazelluläre Flüssigkeitsvolumen über Wasseraufnahme aus dem Tubuluslumen zu regulieren.

Das lumenpositive Potential wird durch die hohe Natriumpermeabilität in Gegenwart des Claudin-10 V.2 Proteins in den Tight Junctions verstärkt. Das führt zu einem Anstieg der Triebkraft für die parazelluläre Resorption besonders von Calcium und Magnesium.

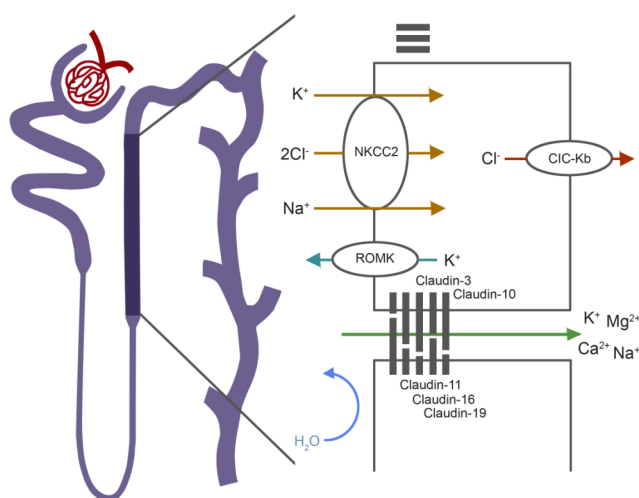


Abbildung 4-11
Transportwege des dicken aufsteigenden Astes der Henle-Schleife.

Der Ausschnitt vergrößert zwei Zellen und deren Interzellularspalt im Bereich des dicken aufsteigenden Astes der Henle-Schleife. NKCC2: Natrium, Kalium, 2 Chlorid-Transporter; ROMK: Kaliumkanal an der apikalen Membran; CIC-Kb: Chloridkanal an der basolateralen Membran.

Die Permeabilitäten für diese divalenten Ionen sind in Gegenwart des Claudin-10 V.2 Proteins ebenfalls erhöht. Damit gibt es neben Claudin-16 und -19 ein weiteres Mitglied der Claudin-Familie mit einer wichtigen Rolle für die Resorption von divalenten Ionen. Claudin-10 V.1 könnte hier ebenfalls unterstützend wirken, besonders in Hinblick auf mögliche Interaktionen mit den anderen Claudinen der Henle-Schleife. Die spezifische Funktion von Claudin-11 in der Henle-Schleife bleibt weiterhin unklar. Aufgrund der Ergebnisse ist eine abdichtende Funktion am wahrscheinlichsten. Claudin-16 und -19 scheinen in Kooperation die Resorption von divalenten Ionen besonders von Magnesium zu gewährleisten. Die Erforschung deren Interaktion und die Bedeutung der Claudin-19 Varianten könnten Zielsetzungen zukünftiger Projekte sein. Außerdem hat die Vielzahl an Untersuchungen die Bedeutung der endogenen Claudine gezeigt, so dass das Wissen über die genaue Claudin-Zusammensetzung der Tubuluszellen der Henle-Schleife und der verwendeten Zelllinie für weitere Charakterisierung essentiell ist. Gleichzeitig müsste die Veränderung der anderen für den parazellulären Transport wichtigen Proteine durch die Überexpression des transfizierten Claudins besser verstanden und analysiert werden.

Letztlich ist die detaillierte Aufklärung der spezifischen elektrophysiologischen und molekularen Eigenschaften der Claudine im TAL, wie in dieser Arbeit vorgelegt, die Grundlage für eine mögliche Entwicklung von Substanzen, die diesen Transport beeinflussen können. Mit solchen Substanzen könnte beispielsweise wesentlich die Kalzium-Rückresorption im TAL blockiert werden und akute Hyperkalziämien therapeutisch kontrolliert behandelt werden.

Zusammenfassung

Einleitung

Die Tight Junction (TJ) ist eine supramolekulare Struktur aus verschiedenen Membranproteinen und deren intrazellulären Adapterproteinen. Sie gestaltet den Zellzwischenraum und reguliert damit die parazelluläre Permeabilität eines Epithels.

Die Claudine, eine Familie von TJ-Proteinen, durchspannen die Zellmembran viermal und bilden zwei extrazelluläre Schleifen. Sie können als Diffusionsbarriere dienen, aber auch eine spezifische Kanalfunktion ausüben. Die Claudin-Zusammensetzung der TJs bestimmt die Permeabilität des Epithels. Einige Claudine sind spezifisch für bestimmte Gewebe. Andere kommen in vielen verschiedenen Geweben vor und ermöglichen durch ihre Interaktion untereinander die für dieses Gewebe spezifische TJ-Struktur und -Durchlässigkeit. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der elektrophysiologischen Charakterisierung der Claudine des dicken aufsteigenden Astes der Henle-Schleife. Dieses Nephronsegment ist vor allem wichtig für die Resorption anorganischer Ionen wie Na^+ , Cl^- , Mg^{2+} und Ca^{2+} und spielt dadurch eine herausragende Rolle in der Regulation der Körperflüssigkeiten, insbesondere der Kontrolle des Blutdruckes.

Methoden

Die murinen (m) oder humanen (h) Claudine 10, 11, 16 und 19 wurden stabil in hochohmige MDCK C7-Zellen (Madin-Darby Canin Kidney) transfiziert. Neben den Wildtyp-Proteinen interessierten besonders die in Mäusen und Menschen vorkommende Proteine der Spleißvarianten und Mutanten. Leervektor-transfizierte Zellen dienten als Kontrollzellen. Die Transfektionskontrolle erfolgte mittels Westernblot und RNA-Nachweis. Immunhistochemische Färbungen dienten der Klärung der Lokalisation. Die Zellklone, bei denen die transfizierten Claudine in der TJ nachgewiesen werden konnten, wurden in Ussing-Kammern auf ihre elektrophysiologische Funktion hin untersucht. Der transepitheliale elektrische Widerstand wurde gemessen und die Ionenselektivität mit Hilfe der Dilutions- und biionischen Potentiale analysiert. Dabei fokussierten wir uns auf die monovalenten (Lithium, Natrium, Kalium, Rubidium und Caesium) und divalenten Kationen (Calcium, Magnesium, Strontium, Barium). Die Berechnung der Permeabilitätsverhältnisse und der absoluten Permeabilitäten erfolgte mittels einer modifizierten Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung.

Ergebnisse

Die konfokale Laserscanningmikroskopie zeigte die überexprimierten Claudine kolokalisiert mit Occludin, einem TJ-Marker. Expressierten die MDCK C7-Zellen Claudin-10 Variante 1 kam es

zu keiner Veränderung der Permeabilität für mono- und divalente Kationen. Exprimierten die Zellen hingegen die Variante 2 des Claudin-10 konnte eine signifikante Erniedrigung des Widerstandes und eine starke Erhöhung der Permeabilität aufgezeigt werden. Besonders interessant ist die Verschiebung der Permeabilitätssequenz für monovalente Kationen der Claudin-10 Variante 2-Klone von der Eisenman-Sequenz IV der Kontrollzellen zur Sequenz X. Die Eisenman-Sequenz IV spiegelt eine schwächere, die Sequenz X eine stärkere Interaktion zwischen dem durchtretenden Ion und der TJ wieder. Die Anwesenheit von Claudin-10 V.2 führt wahrscheinlich zu der Bildung einer Kation-selektiven Pore. Auch die Claudin-11 und Claudin-19-transfizierten Zellen zeigten eine signifikante Erhöhung der Kationenpermeabilität, jedoch ohne Einfluss auf die Permeabilitätssequenz. Claudin-16-transfizierte Zellen zeigten eine schwache Erhöhung der Na^+ - und Mg^{2+} -Permeabilität. In den Kokultur- und Kotransfektionsexperimenten zeigten die Klone im Allgemeinen ein im Vergleich zu den Einzelklonen verändertes Verhalten mit einer Ionenpermeabilität und einem transepithelialen Widerstand zwischen denen der Einzelklone. Die Kokultur der Claudin-10 Varianten hingegen wies ein Verlust der Selektivität auf. Die Permeabilitätssequenz verschob sich hin zu einer schwächeren Interaktion im Vergleich zu den Kontrollzellen (Eisenman-Sequenz I). Diese Veränderung wird wahrscheinlich durch eine Interaktion der Claudinvarianten hervorgerufen.

Diskussion

Der dicke aufsteigende Ast der Henle-Schleife hat zwei Hauptaufgaben: die Resorption von Kationen und die Bildung eines osmotischen Gradienten zur Regulation der Wasserresorption in den folgenden Abschnitten. Die Kationenresorption erfolgt über zwei Wege: aktiv und passiv. Das durch den aktiven Transport von Natrium-, Kalium- und Chloridionen geschaffene lumenpositive Potential dient als Triebkraft für die passive Kationenresorption entlang der TJ. Dieses lumenpositive Potential wird durch die hohe Natriumpermeabilität in Gegenwart des Claudin-10 V.2 verstärkt. Das führt zu einem Anstieg der Triebkraft für die parazelluläre Resorption besonders von Calcium- und Magnesiumionen. Die Permeabilitäten für diese divalenten Ionen sind in Gegenwart des Claudin-10 V.2 ebenfalls erhöht. Claudin-16 und -19 scheinen in Kooperation die Resorption von divalenten Ionen besonders von Magnesium zu gewährleisten. Damit scheint Claudin-10 V.2 neben Claudin-16 und -19 als ein weiteres Mitglied der Claudin-Familie eine wichtige Rolle für die Resorption von divalenten Ionen einnehmen.

Literaturverzeichnis

1. Nightingale ERJ. Phenomenological theory of ion solvation. Effective radii of hydrated ions. *J Phys Chem* 1959;63:1381-7.
 2. Eisenman G. Cation selective glass electrodes and their mode of operation. *Biophys J*. 1962 Mar;2(2 Pt 2):259-323.
 3. Eisenman G, Horn R. Ionic selectivity revisited: the role of kinetic and equilibrium processes in ion permeation through channels. *J Membr Biol*. 1983;76(3):197-225.
 4. Diamond JM, Wright EM. Biological membranes: the physical basis of ion and nonelectrolyte selectivity. *Annu Rev Physiol*. 1969;31:581-646.
 5. Powell DW. Barrier function of epithelia. *Am J Physiol*. 1981 Oct;241(4):G275-88.
 6. Ruffer C, Gerke V. The C-terminal cytoplasmic tail of claudins 1 and 5 but not its PDZ-binding motif is required for apical localization at epithelial and endothelial tight junctions. *Eur J Cell Biol*. 2004 May;83(4):135-44.
 7. Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Mar;1778(3):631-45.
 8. Barmeyer C, Horak I, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. The interleukin-2-deficient mouse model. *Pathobiology*. 2002;70(3):139-42.
 9. Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, et al. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol*. 1998 Apr 20;141(2):397-408.
 10. Fromm M, Hierholzer K. Epithelien. In: Schmidt RF, Thews G, Lang F (eds). *Physiologie des Menschen*. 28 ed. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 2000:719-36.
 11. Allen F, Tisher CC. Morphology of the ascending thick limb of Henle. *Kidney Int*. 1976 Jan;9(1):8-22.
 12. Li WY, Huey CL, Yu AS. Expression of claudin-7 and -8 along the mouse nephron. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004 Jun;286(6):F1063-71.
 13. Imai M, Taniguchi J, Yoshitomi K. Transition of permeability properties along the descending limb of long-loop nephron. *Am J Physiol*. 1988 Mar;254(3 Pt 2):F323-8.
 14. Burg M, Good D. Sodium chloride coupled transport in mammalian nephrons. *Annu Rev Physiol*. 1983;45:533-47.
 15. Piontek J, Winkler L, Wolburg H, et al. Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J*. 2008 Jan;22(1):146-58.
 16. Simon DB, Lu Y, Choate KA, et al. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science*. 1999 Jul 2;285(5424):103-6.
 17. Konrad M, Schaller A, Seelow D, et al. Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *Am J Hum Genet*. 2006 Nov;79(5):949-57.
 18. Staehelin LA. Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J Cell Sci*. 1973 Nov;13(3):763-86.
 19. Van Itallie CM, Colegio OR, Anderson JM. The cytoplasmic tails of claudins can influence tight junction barrier properties through effects on protein stability. *J Membr Biol*. 2004 May 1;199(1):29-38.
 20. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*. 1993 Dec;123(6 Pt 2):1777-88.
 21. Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, et al. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular
-

-
- junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol.* 1998 Jul 13;142(1):117-27.
22. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol.* 1998 Jun 29;141(7):1539-50.
 23. Riazuddin S, Ahmed ZM, Fanning AS, et al. Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. *Am J Hum Genet.* 2006 Dec;79(6):1040-51.
 24. Balda MS, Whitney JA, Flores C, Gonzalez S, Cerejido M, Matter K. Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol.* 1996 Aug;134(4):1031-49.
 25. Bamforth SD, Kniesel U, Wolburg H, Engelhardt B, Risau W. A dominant mutant of occludin disrupts tight junction structure and function. *J Cell Sci.* 1999 Jun;112 (Pt 12):1879-88.
 26. Hirase T, Staddon JM, Saitou M, et al. Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci.* 1997 Jul;110 (Pt 14):1603-13.
 27. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004 Jun;286(6):C1213-28.
 28. Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol.* 1999 Dec 13;147(6):1351-63.
 29. Ebnet K, Schulz CU, Meyer Zu Brickwedde MK, Pendl GG, Vestweber D. Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. *J Biol Chem.* 2000 Sep 8;275(36):27979-88.
 30. Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 1998 Nov 6;273(45):29745-53.
 31. Sawada N, Murata M, Kikuchi K, et al. Tight junctions and human diseases. *Med Electron Microsc.* 2003 Sep;36(3):147-56.
 32. Muller D, Kausalya PJ, Claverie-Martin F, et al. A novel claudin 16 mutation associated with childhood hypercalciuria abolishes binding to ZO-1 and results in lysosomal mistargeting. *Am J Hum Genet.* 2003 Dec;73(6):1293-301.
 33. Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol.* 2003 Jan;81(1):1-44.
 34. Furuse M, Sasaki H, Tsukita S. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol.* 1999 Nov 15;147(4):891-903.
 35. Reyes JL, Lamas M, Martin D, et al. The renal segmental distribution of claudins changes with development. *Kidney Int.* 2002 Aug;62(2):476-87.
 36. Furuse M, Hata M, Furuse K, et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol.* 2002 Mar 18;156(6):1099-111.
 37. Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest.* 2001 May;107(10):1319-27.
 38. Watson CJ, Rowland M, Warhurst G. Functional modeling of tight junctions in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 Aug;281(2):C388-97.
 39. Kieran NE, Doran PP, Connolly SB, et al. Modification of the transcriptomic response to renal ischemia/reperfusion injury by lipoxin analog. *Kidney Int.* 2003 Aug;64(2):480-92.
-

-
40. Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S. Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol.* 2001 Apr 16;153(2):263-72.
 41. Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, et al. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci.* 2002 Dec 15;115(Pt 24):4969-76.
 42. Matter K, Balda MS. Occludin and the functions of tight junctions. *Int Rev Cytol.* 1999;186:117-46.
 43. Berry CA, Rector FC, Jr. Mechanism of proximal NaCl reabsorption in the proximal tubule of the mammalian kidney. *Semin Nephrol.* 1991 Mar;11(2):86-97.
 44. Kiuchi-Saishin Y, Gotoh S, Furuse M, Takasuga A, Tano Y, Tsukita S. Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Apr;13(4):875-86.
 45. Enck AH, Berger UV, Yu AS. Claudin-2 is selectively expressed in proximal nephron in mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001 Nov;281(5):F966-74.
 46. Miyamoto T, Morita K, Takemoto D, et al. Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice. *J Cell Biol.* 2005 May 9;169(3):527-38.
 47. Heiskala M, Peterson PA, Yang Y. The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport. *Traffic.* 2001 Feb;2(2):93-8.
 48. Ohta H, Adachi H, Takiguchi M, Inaba M. Restricted localization of claudin-16 at the tight junction in the thick ascending limb of Henle's loop together with claudins 3, 4, and 10 in bovine nephrons. *J Vet Med Sci.* 2006 May;68(5):453-63.
 49. Daugherty BL, Ward C, Smith T, Ritzenthaler JD, Koval M. Regulation of heterotypic claudin compatibility. *J Biol Chem.* 2007 Oct 12;282(41):30005-13.
 50. Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer.* 2006;6:186.
 51. Inai T, Sengoku A, Guan X, Hirose E, Iida H, Shibata Y. Heterogeneity in expression and subcellular localization of tight junction proteins, claudin-10 and -15, examined by RT-PCR and immunofluorescence microscopy. *Arch Histol Cytol.* 2005 Dec;68(5):349-60.
 52. Madara JL. Sodium-glucose cotransport and epithelial permeability. *Gastroenterology.* 1994 Jul;107(1):319-20.
 53. Guan X, Inai T, Shibata Y. Segment-specific expression of tight junction proteins, claudin-2 and -10, in the rat epididymal epithelium. *Arch Histol Cytol.* 2005 Sep;68(3):213-25.
 54. Van Itallie CM, Rogan S, Yu A, Vidal LS, Holmes J, Anderson JM. Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006 Dec;291(6):F1288-99.
 55. Van Itallie CM, Fanning AS, Anderson JM. Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003 Dec;285(6):F1078-84.
 56. Bronstein JM, Popper P, Micevych PE, Farber DB. Isolation and characterization of a novel oligodendrocyte-specific protein. *Neurology.* 1996 Sep;47(3):772-8.
 57. Gow A, Southwood CM, Li JS, et al. CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/claudin-11 null mice. *Cell.* 1999 Dec 10;99(6):649-59.
 58. Morita K, Sasaki H, Fujimoto K, Furuse M, Tsukita S. Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis. *J Cell Biol.* 1999 May 3;145(3):579-88.
-

-
59. Bronstein JM, Tiwari-Woodruff S, Buznikov AG, Stevens DB. Involvement of OSP/claudin-11 in oligodendrocyte membrane interactions: role in biology and disease. *J Neurosci Res.* 2000 Mar 15;59(6):706-11.
 60. Kitajiri S, Miyamoto T, Mineharu A, et al. Compartmentalization established by claudin-11-based tight junctions in stria vascularis is required for hearing through generation of endocochlear potential. *J Cell Sci.* 2004 Oct 1;117(Pt 21):5087-96.
 61. Jahnke K. [Intercellular junctions in the guinea pig stria vascularis as shown by freeze-etching (author's transl)]. *Anat Embryol (Berl).* 1975 Aug 9;147(2):189-201.
 62. Wangemann P. Comparison of ion transport mechanisms between vestibular dark cells and strial marginal cells. *Hear Res.* 1995 Oct;90(1-2):149-57.
 63. Bekesy G. Direct observation of the vibrations of the cochlear partition under a microscope. *Acta Otolaryngol.* 1952 Jun;42(3):197-201.
 64. Tiwari-Woodruff SK, Buznikov AG, Vu TQ, et al. OSP/claudin-11 forms a complex with a novel member of the tetraspanin super family and beta1 integrin and regulates proliferation and migration of oligodendrocytes. *J Cell Biol.* 2001 Apr 16;153(2):295-305.
 65. Maecker HT, Todd SC, Levy S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J.* 1997 May;11(6):428-42.
 66. Aqua MS, Rizzu P, Lindsay EA, et al. Duplication 3q syndrome: molecular delineation of the critical region. *Am J Med Genet.* 1995 Jan 2;55(1):33-7.
 67. Stevens DB, Chen K, Seitz RS, Sercarz EE, Bronstein JM. Oligodendrocyte-specific protein peptides induce experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL/J mice. *J Immunol.* 1999 Jun 15;162(12):7501-9.
 68. Swanborg RH. Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995 Oct;77(1):4-13.
 69. Weber S, Schneider L, Peters M, et al. Novel paracellin-1 mutations in 25 families with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *J Am Soc Nephrol.* 2001 Sep;12(9):1872-81.
 70. Smith AN, Skaug J, Choate KA, et al. Mutations in ATP6N1B, encoding a new kidney vacuolar proton pump 116-kD subunit, cause recessive distal renal tubular acidosis with preserved hearing. *Nat Genet.* 2000 Sep;26(1):71-5.
 71. Kriegs JO, Homann V, Kinne-Saffran E, Kinne RK. Identification and subcellular localization of paracellin-1 (claudin-16) in human salivary glands. *Histochem Cell Biol.* 2007 Jul;128(1):45-53.
 72. Markov AG, Shadrin LV, Veshniakova A, Amasheh S, Fromm M. [The tight junction proteins claudin-2 and -16 expression in mammary epithelium of mice]. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova.* 2006 Nov;92(11):1382-6.
 73. Hou J, Paul DL, Goodenough DA. Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions. *J Cell Sci.* 2005 Nov 1;118(Pt 21):5109-18.
 74. Bronstein JM, Kozak CA, Chen XN, et al. Chromosomal localization of murine and human oligodendrocyte-specific protein genes. *Genomics.* 1996 Jun 1;34(2):255-7.
 75. Kausalya PJ, Amasheh S, Gunzel D, et al. Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg²⁺ transport function of Claudin-16. *J Clin Invest.* 2006 Apr;116(4):878-91.
 76. Ikari A, Hirai N, Shiroma M, et al. Association of paracellin-1 with ZO-1 augments the reabsorption of divalent cations in renal epithelial cells. *J Biol Chem.* 2004 Dec 24;279(52):54826-32.
 77. Blanchard A, Jeunemaitre X, Coudol P, et al. Paracellin-1 is critical for magnesium and calcium reabsorption in the human thick ascending limb of Henle. *Kidney Int.* 2001 Jun;59(6):2206-15.
-

-
78. Gunzel D, Stuiver M, Kausalya PJ, et al. Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function. *J Cell Sci.* 2009 May 15;122(Pt 10):1507-17.
 79. Hou J, Shan Q, Wang T, et al. Transgenic RNAi depletion of claudin-16 and the renal handling of magnesium. *J Biol Chem.* 2007 Jun 8;282(23):17114-22.
 80. Lee NP, Tong MK, Leung PP, et al. Kidney claudin-19: localization in distal tubules and collecting ducts and dysregulation in polycystic renal disease. *FEBS Lett.* 2006 Feb 6;580(3):923-31.
 81. Hou J, Renigunta A, Konrad M, et al. Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J Clin Invest.* 2008 Feb;118(2):619-28.
 82. Blasig IE, Winkler L, Lassowski B, et al. On the self-association potential of transmembrane tight junction proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2006 Feb;63(4):505-14.
 83. Angelow S, El-Husseini R, Kanzawa SA, Yu AS. Renal localization and function of the tight junction protein, claudin-19. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007 Jul;293(1):F166-77.
 84. Madin SH, Andriese PC, Darby NB. The in vitro cultivation of tissues of domestic and laboratory animals. *Am J Vet Res.* 1957 Oct;18(69):932-41.
 85. Leighton J, Estes LW, Mansukhani S, Brada Z. A cell line derived from normal dog kidney (MDCK) exhibiting qualities of papillary adenocarcinoma and of renal tubular epithelium. *Cancer.* 1970 Nov;26(5):1022-8.
 86. Taub M, Saier MH, Jr. An established but differentiated kidney epithelial cell line (MDCK). *Methods Enzymol.* 1979;58:552-60.
 87. Richardson JC, Scalera V, Simmons NL. Identification of two strains of MDCK cells which resemble separate nephron tubule segments. *Biochim Biophys Acta.* 1981 Feb 18;673(1):26-36.
 88. Gekle M, Wunsch S, Oberleithner H, Silbernagl S. Characterization of two MDCK-cell subtypes as a model system to study principal cell and intercalated cell properties. *Pflugers Arch.* 1994 Sep;428(2):157-62.
 89. Sambrook JG, Russell R, Umrانيا Y, et al. Fugu orthologues of human major histocompatibility complex genes: a genome survey. *Immunogenetics.* 2002 Sep;54(6):367-80.
 90. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec;74(12):5463-7.
 91. Kreusel KM, Fromm M, Schulzke JD, Hegel U. Cl⁻ secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6). *Am J Physiol.* 1991 Oct;261(4 Pt 1):C574-82.
 92. Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol.* 1952 Apr;116(4):424-48.
 93. Van Itallie CM, Holmes J, Bridges A, et al. The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2. *J Cell Sci.* 2008 Feb 1;121(Pt 3):298-305.
 94. Diamond JM. Water-solute coupling and ion selectivity in epithelia. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1971 Aug 20;262(842):141-51.
 95. Nielsen R, Birn H, Moestrup SK, Nielsen M, Verroust P, Christensen EI. Characterization of a kidney proximal tubule cell line, LLC-PK1, expressing endocytotic active megalin. *J Am Soc Nephrol.* 1998 Oct;9(10):1767-76.
 96. Alexandre MD, Lu Q, Chen YH. Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl⁻ conductance and increases the paracellular Na⁺ conductance in LLC-PK1 cells. *J Cell Sci.* 2005 Jun 15;118(Pt 12):2683-93.
 97. Kitajiri SI, Furuse M, Morita K, et al. Expression patterns of claudins, tight junction adhesion molecules, in the inner ear. *Hear Res.* 2004 Jan;187(1-2):25-34.
-

-
98. Claude P, Goodenough DA. Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *J Cell Biol.* 1973 Aug;58(2):390-400.
 99. Staehelin LA. Structure and function of intercellular junctions. *Int Rev Cytol.* 1974;39:191-283.
 100. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Apr;2(4):285-93.
 101. Wen H, Watry DD, Marcondes MC, Fox HS. Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: role of the first extracellular domain of claudin-5. *Mol Cell Biol.* 2004 Oct;24(19):8408-17.
 102. Angelow S, Yu AS. Claudins and paracellular transport: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2007 Sep;16(5):459-64.
 103. Weber S, Schlingmann KP, Peters M, et al. Primary gene structure and expression studies of rodent paracellin-1. *J Am Soc Nephrol.* 2001 Dec;12(12):2664-72.
 104. Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, Rahner C, Anderson JM. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 Jul;283(1):C142-7.
 105. Benitah JP, Tomaselli GF, Marban E. Adjacent pore-lining residues within sodium channels identified by paired cysteine mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jul 9;93(14):7392-6.
 106. Choi Y, Chen HV, Lipton SA. Three pairs of cysteine residues mediate both redox and zn²⁺ modulation of the nmda receptor. *J Neurosci.* 2001 Jan 15;21(2):392-400.
 107. Hisatome I, Kurata Y, Sasaki N, et al. Block of sodium channels by divalent mercury: role of specific cysteinyl residues in the P-loop region. *Biophys J.* 2000 Sep;79(3):1336-45.
 108. Bungenberg De Jong HG. [Colloids and biology.]. *Ned Tijdschr Geneesk.* 1952 Jun 14;96(24):1489-94.
 109. Cereijido M, Robbins ES, Dolan WJ, Rotunno CA, Sabatini DD. Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J Cell Biol.* 1978 Jun;77(3):853-80.
 110. Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jan 19;96(2):511-6.
-

Danksagung

Diese Arbeit ist das Ergebnis einer Kooperation der Arbeitsgruppe Müller der Klinik für Pädiatrie mit dem Schwerpunkt Nephrologie am Campus Virchow-Klinikum und des Institutes für Klinische Physiologie am Campus Benjamin Franklin. Hierbei ist im Rahmen des gemeinsamen Forschungsinteresses für Tight Junctions eine von beiden Seiten betreute Doktorarbeit entstanden, ganz im Sinne einer von zwei Zellen gebildeten Tight Junction. Mein besonderer Dank gilt deshalb Prof. Michael Fromm vom Institut für Klinische Physiologie und meinem Doktorvater PD Dr. Dominik Müller für die Initialisierung der Kooperation und Vergabe der Forschungsarbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dominik Müller und meiner Betreuerin im Institut für Klinische Physiologie, PD Dorothee Günzel. Meinem Doktorvater möchte ich zudem für die hervorragende Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft und stete Förderung herzlich danken. Für die Themenausarbeitung, die umfassende Einführung in die von mir angewandten molekularbiologischen und elektrophysiologischen Methoden, sowie für die vielen fruchtbaren Gespräche und Anregungen möchte ich PD Dorothee Günzel danken. Ihre Sachkenntnis, Geduld und Erfahrung haben die Durchführung der Arbeit erst ermöglicht.

Weiterhin möchte ich den beiden Nachwuchswissenschaftlerinnen Susanne Krug und Sandra Pfaffenbach danken. Sie haben mich in die Zellkulturtechniken eingearbeitet und so manche Transfektion für mich durchgeführt. Die gemeinsame Zeit an der Bench und an Laborsonntagen werde ich nicht vergessen. Bei der Durchführung der elektrophysiologischen Versuche unterstütze mich außerdem Zahnärztin Christina Papadopoulos.

Mein Dank gilt Anja Fromm für ihr stets offenes Ohr und die sofortige Hilfe bei anfallenden Problemen jeglicher Art, Detlef Sorgenfrei für die schnelle Lösung technischer Probleme und Dr. Jan Richter für die Hilfe beim Arbeiten am konfokalen Mikroskop.

Iwan Meij, Marchel Stuiver und Constanze Will unterstützten mich durch hilfreiche, konstruktive Kritik, gezieltes Nachfragen und stetige Aufmunterung.

Nicht zuletzt möchte ich allen Mitarbeitern des Institutes für Klinische Physiologie und der Arbeitsgruppe Müller für die zuvorkommende Hilfe, die außerordentlich gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima bei der Verwirklichung dieser Arbeit danken.

Ohne den ausdauernden Zuspruch und die Aufmunterungen meiner Eltern, sowie meiner gesamten Familie wäre die Umsetzung meiner Promotion nicht möglich gewesen, die Unterbrechung des Studiums ohne ihre finanzielle Unterstützung nicht denkbar. Ein wichtiger Ansporn und sicherer Rückhalt war und ist mein Freund Gabriel Wollner.

Lebenslauf

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

Lea Elisabeth Haisch

Publikationsliste

Mitautorenschaften

Günzel, D, **Haisch L**, Pfaffenbach, S, Krug SM, Milatz S, Amasheh S, Hunziker W, Müller D. Claudin function in the thick ascending limb of Henle's loop. Annals of the New York Acadademy of Science 1463:152-162

Günzel D, Stuiver M, Kausalya PJ, **Haisch L**, Krug SM, Rosenthal R, Meij IC, Hunziker W, Fromm M, Müller D. Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms which exhibit distinct localization and function. Journal of Cell Science 2009 May 15;122(Pt 10):1507-17.

Konferenzbeiträge

Haisch L, Stuiver M, Kausalya PJ, Meij IC, Krug SM, Hunziker W, Fromm M, Müller D and Günzel D. Functional characterisation of six alternatively spliced claudin-10 isoforms found in renal epithelia. Pediatric Nephrology Spring Meeting 2009, Amsterdam (Vortrag & Poster)

Haisch L, Stuiver M, Kausalya PJ, Meij I, Krug SM, Hunziker W, Fromm M, Müller D and Günzel D. Functional characterization of claudin-10 isoforms found in renal epithelia. European Students Conference 2007, Berlin (Vortrag)

Günzel D, Stuiver M, Kausalya PJ, Meij IC, **Haisch L**, Papadopoulos C, Krug SM, Hunziker W, Fromm M, Müller D. Functional characterisation of claudin-10 isoforms. Acta Physiology 189 Suppl. 653: 151 (Abstract)

Auszeichnung

Else-Kröner-Fresenius Preis für Nachwuchswissenschaftler der deutschen Gesellschaft für pädiatrische Nephrologie 2009, Amsterdam

Erklärung

„Ich, Lea Elisabeth Haisch, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Barrierefunktion der Claudine des dicken aufsteigenden Astes der Henle-Schleife“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den

Lea E. Haisch

Anhang

Zum Methodenteil

Laborgeräte

Denton DC 502	Denton Vacuum Inc., Cherry Hill, New Jersey, USA
Brutschrank	Heraeus, Berlin
Elektrophoresekammer-Halter	Biorad, München
Elektrophorese Kammern	Biorad, München
Fluoreszenzmikroskop	Olympus BX 60, Olympus, Hamburg
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer, Weiterstadt
Heizblock	Grant, Berlin
Inkubator 1000, Uni max 1010	Heidolph
Kryostat MTC	SLEE Technik GmbH
Luminiszenz-Detektor (LAS 1000)	Fuji, Düsseldorf
Luminometer LB9507	Berthold, Wildbad
Mikroelektrodenhalter	MEH3SF, WP-Instruments, New Haven, CT, USA
Mini-Protean 3 Elektrophoresesystem	Biorad, München
Mini-Trans-Blot Transfer-Zelle	Biorad, München
Power pac 200	Biorad, München
Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Sequenziergerät ABI310	Perkin Elmer, Langen
Silikonscheibe	Drawin Vertriebs GmbH, Ottobrunn
Speed Vac Uniequip	MS Laborgeräte, Heidelberg
Tecan Spectra Classic	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Trägerscheiben	Astralon N, Hüls Troisdorf, Troisdorf
Wasserbad SW21, TWB5	Julabo, Schilbach
Wippe WT12	Biometra
Zeiss LSM 510 META	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Zentrifuge Z233MK	Hermle, Wehingen
Zentrifuge 5414 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge AvantiJ25	Beckman, Palo Alto, CA, USA

Verbrauchsmaterialien

Acrylamid-Bis	Serva, Heidelberg
Agarose	Gibco BRL, Paisley, Scotland
Alexa Fluor 488 nm	
Alexa Fluor 594 nm	
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm
Bacto Agar	Difco, Frankreich
BCA Protein Assay Reagenz A+B	Pierce, Rockford, Illinois
BigDye Terminator Sequencing Kit	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen
BSA (100 ×)	BioLabs, Frankfurt am Main
BSA (100 x)	NEB, Frankfurt
Complete-Mini	Roche, Mannheim
dATP, dTTP, dCTP, dGTP	Perkin Elmer, Weiterstadt
Deckgläser	Marienfeld GmbH & Co. KG,
DMSO	Sigma, Taufkirchen
DTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

EDTA 0,5 M	Serva, Heidelberg
EGTA 0,5 M	Serva, Heidelberg
Ethanol	J.T.Backer, Deventer, Niederlande
FKS	Biochrom, Berlin
Fugene 6 Reagenz	Roche, Mannheim
Glycerol	Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen
Glycin	Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen
Hämatoxylin n. Mayer	Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen
Isopropanol	J.T. Backer, Deventer, Holland
Kaleidoscope Prestained Standards	Bio-Rad, München
Kaninchen anti-Claudin-10 polyklon. AK	
Kaninchen anti-Claudin-11 polyklon. AK	
Kaninchen anti-Claudin-16 polyklon. AK	
Kaninchen anti-Occludin polyklon. AK	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
Kaninchen anti-ZO-1 polyklon. AK	Cytomed, Berlin
Lipofectamin Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Lumi-Light Western-Blotting Kit	Roche, Mannheim
Lumi-Light POD-Substratlg.	
Anti-Kaninchen IgG-POD AK	
Anti-Maus IgG-POD Fab	
10 × TBS-Tween	
Blockierreagenz	
Luminometer Röhrrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Magnetrührer	Ika-Combimag, München
Magnetrührstäbchen	Merck, Berlin
Maus anti-Occludin monoklon. AK	
Maus anti-ZO-1 monoklon. AK	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
Methanol	J.T. Backer, Deventer, Niederlande
MountFluor	Biocyc GmbH & Co. KG, Luckenwalde
Natriumhypochlorid	KMF Laborchemie Handels GmbH, Berlin
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
PBS-Lösung	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
PBS-Tabletten	Life Technologies, Karlsruhe
Pipetten	Eppendorf, Köln
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Plus Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Poly Screen PVDF-Transfer Membran	NEN, Köln
Prestained SDS MW Markers	Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen
Primer	Metabion, Martinsried
QuickChange Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Reaktionsgefäße	Plastibrand, Wertheim
Reaktionsröhrchen (PCR)	Perkin Elmer, Fostercity, CA, USA
Restriktionsendonukleasen	NEB, Frankfurt
Sequenzieröhrchen mit Septum	Applied Biosystems, Fostercity, CA, USA
Skalpell	Feather Safety Razor Co., Japan
SOC	Invitrogen, Karlsruhe
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Merck, Berlin
Stadtrade DAPI	Roche, Mannheim
Standardtips 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Köln
TAE 50 x	Invitrogen, Karlsruhe
TBE 10 x	Invitrogen, Karlsruhe
TEMED	Life Technologies, Karlsruhe
Tris	Merck, Darmstadt
TSR-Lösung	Applied Biosystems, Fostercity, CA, USA
Zellkulturgefäße	Nunc, Wiesbaden

Zellkulturmedien	Invitrogen, Karlsruhe
Ziege anti-Kaninchen AK	Molecular Probes, Eugene
Ziege anti-Maus AK	Molecular Probes, Eugene

Puffer und Lösungen

BSA-Blockierungslösung

5,0%	BSA
0,02%	Natriumazid
ad 50 ml	PBS/Tween

Elektrophoresepuffer

100 ml	10× Puffer West
10 ml	10% SDS
ad 1 l	Aqua bidest.

5 x Laemmli-Puffer

2,0 g	SDS
1,54 g	Dithiothreitol (500 mM)
3,0 ml	Tris-HCl (pH 6,8 300 mM)
20,0 µl	Bromphenolblau 1%
10,0 ml	Glycerol

Lösung für Proteinquantifizierung

je Probe:

196 µl	Pierce BCA Protein Assay Reagenz A
4 µl	Pierce BCA Protein Assay Reagenz B

Lösungen für Ussing-Kammer-Versuche

für Dilutionspotentialmessungen:

Lsg. A

140,0 mmol	Na ⁺
126,8 mmol	Cl ⁻
5,4 mmol	K ⁺
1,2 mmol	Ca ²⁺
1,0 mmol	Mg ²⁺
1,0 mmol	SO ₄
3,0 mmol	Hepes
21,0 mmol	HCO ₃ ⁻
10,0 mmol	D(+)-Glucose

Lsg. B

21,0 mmol	Na ⁺
238 mmol	Mannitol
7,8 mmol	Cl ⁻
5,4 mmol	K ⁺
1,2 mmol	Ca ²⁺
1,0 mmol	Mg ²⁺
1,0 mmol	SO ₄
10,0 mmol	Hepes
21,0 mmol	HCO ₃ ⁻
10,0 mmol	D(+)-Glucose

für monovalente Potentialmessungen:

Lsg. C

21,0 mmol	Na ⁺
119,0 mmol	Li ⁺
126,8 mmol	Cl ⁻
5,4 mmol	K ⁺
1,2 mmol	Ca ²⁺
1,0 mmol	Mg ²⁺
1,0 mmol	SO ₄
3,0 mmol	Hepes
21,0 mmol	HCO ₃ ⁻
10,0 mmol	D(+)-Glucose

Lsg. D

21,0 mmol	Na ⁺
124,4 mmol	K ⁺
126,8 mmol	Cl ⁻
1,2 mmol	Ca ²⁺
1,0 mmol	Mg ²⁺
1,0 mmol	SO ₄
3,0 mmol	Hepes
21,0 mmol	HCO ₃ ⁻
10,0 mmol	D(+)-Glucose

Lsg. E

21,0 mmol	Na ⁺
119,0 mmol	Rb ⁺
126,8 mmol	Cl ⁻
5,4 mmol	K ⁺
1,2 mmol	Ca ²⁺
1,0 mmol	Mg ²⁺
1,0 mmol	SO ₄
3,0 mmol	Hepes
21,0 mmol	HCO ₃ ⁻
10,0 mmol	D(+)-Glucose

Lsg. F

21,0 mmol	Na ⁺
119,0 mmol	Cs ⁺
126,8 mmol	Cl ⁻
5,4 mmol	K ⁺
1,2 mmol	Ca ²⁺
1,0 mmol	Mg ²⁺
1,0 mmol	SO ₄
3,0 mmol	Hepes
21,0 mmol	HCO ₃ ⁻
10,0 mmol	D(+)-Glucose

für divalente Potentialmessungen:

Lsg. G

94,5 mmol	Ca ²⁺
196,4 mmol	Cl ⁻
5,4 mmol	K ⁺
1,0 mmol	Mg ²⁺
10,0 mmol	Hepes
10,0 mmol	D(+)-Glucose

Lsg. H

94,3 mmol	Mg ²⁺
196,4 mmol	Cl ⁻
5,4 mmol	K ⁺
1,2 mmol	Ca ²⁺
10,0 mmol	Hepes
10,0 mmol	D(+)-Glucose

Lsg. I

93,3 mmol	Ba ²⁺
196,4 mmol	Cl ⁻
5,4 mmol	K ⁺
1,0 mmol	Mg ²⁺
1,2 mmol	Ca ²⁺
10,0 mmol	Hepes
10,0 mmol	D(+)-Glucose

Lsg. J

93,3 mmol	Sr ²⁺
196,4 mmol	Cl ⁻
5,4 mmol	K ⁺
1,0 mmol	Mg ²⁺
1,2 mmol	Ca ²⁺
10,0 mmol	Hepes
10,0 mmol	D(+)-Glucose

Puffer P1 (Resuspensionspuffer)

50 mM	Tris-Cl, pH 8,0
10 mM	EDTA
100 µg/ml	RNase A

Puffer P2 (Lysepuffer)

200 mM	NaOH
1%	SDS

Puffer P3 (Neutralisationspuffer)

3,0 M	K(OAc), pH 5,5
-------	----------------

Puffer QBT(Equilibrierungspuffer)

750 mM	NaCl
50 mM	Mops pH 7,0
15%	Isopropanol
0,15%	Triton X-100

Puffer QC (Waschpuffer)

1,0 M	NaCl
50 mM	Mops, pH 7,0
15%	Isopropanol

Puffer QN (Elutionspuffer)

1,6 M NaCl
 50 mM Mops, pH 7,0
 15% Isopropanol

TE-Puffer

10 mM Tris-Cl, pH7,6
 1 ml EDTA, pH8,0

PBS

8 g NaCl
 0,2 g KCl
 1,44 g Na₂HPO₄⁻
 0,24 g KH₂PO₄⁻
 800 ml H₂O
 pH 7,4 mit HCl einstellen
 ad 1 l Aqua bidest.

LB-medium, flüssig

10 g/l Bacto-Trypton
 5 g/l Bacto-Yeast extract
 10 g/l NaCl
 100 µg/ml Ampicillin

Die Zugabe von Ampicillin oder Kanamycin erfolgt nach dem Autoklavieren, wenn das Medium auf unter 55°C abgekühlt ist.

LB-medium, fest

10 g/l Bacto-Trypton
 5 g/l Bacto-Yeast extract
 10 g/l NaCl
 100 µg/ml Ampicillin

Die Zugabe von Ampicillin oder Kanamycin erfolgt nach dem Autoklavieren, wenn das Medium auf unter 55°C abgekühlt ist.

Transferpuffer

100 ml 10× Puffer West
 100 ml Methanol
 ad 1 l Aqua bidest.

Trenngel 8,5%

5,6 ml Bis-Acrylamid
 4,7 ml Tris-HCl 1,5 M pH 8,8
 9,2 ml Aqua bidest
 200,0 µl SDS 10%
 200,0 µl Ammoniumpersulfat 10%
 10,0 µl TEMED

Trenngel 12,5%

8,2 ml Bis-Acrylamid
 4,7 ml Tris-HCl 1,5 M pH 8,8
 7,1 ml Aqua bidest
 200,0 µl SDS 10%
 200,0 µl Ammoniumpersulfat 10%
 10,0 µl TEMED#

Sammelgel

1,7 ml Bis-Acrylamid
 625,0 µl Tris-HCl 2 M pH 6,8
 7,4 ml Aqua bidest
 100,0 µl SDS 10%
 100,0 µl Ammoniumpersulfat 10%
 10,0 µl TEMED

Primer

Bezeichnung	Sequenz	Anwendung
hClaudin 10-1 FOR	gcggcgcgacatgtccagg	Sequenzierung
hClaudin 10-2 FOR	ccggcgcatggctagca	Sequenzierung
hClaudin 10 REV	aaaagcttgatggctagcagggcttcggagatca	Sequenzierung
mClaudin 10-1 For	atgtccagggcacagatctca	Sequenzierung
mClaudin 10-2 For	atggctagcagggccttgaa	Sequenzierung
mClaudin 10 Rec	ttagacataggcattttatcaaaactgtt	Sequenzierung
Claudin 10-1 HindIII For	aaaagcttgatgtccagggcgcactctgggct	Klonierung
Claudin 10-2 HindIII For	aaaagcttatggctagcagggcttcggagatcat	Klonierung
Claudin 10 XbaI Rev	aaaatctagattagacataagcattttatcaaaactg	Klonierung
Claudin 11 FOR	tggcgccaccatggggc	Sequenzierung
Claudin 11 REV	gcagccctttatagctgggc	Sequenzierung
Claudin 11 BamHI Rev	aaaagatccctatacgtgggcactcttcgcat	Klonierung
Claudin 11 HindIII For	aaaagcttcgatggggccacgtgctgca	Klonierung
Claudin 19 FOR	atggccaactcaggcctccagc	Sequenzierung
Claudin 19.1 REV	ttacacaccagggggcccttg	Sequenzierung
Claudin 19.2 REV	tcagacgtactctcgggcagcag	Sequenzierung
Claudin 19.1 HindIII For	aaaagcttatggccaactcaggcctccagc	Klonierung
Claudin 19.2 HindIII For	aaaagcttcgatggccaactcaggcctcca	Klonierung
Claudin 19 BamHI Rev	aaaaggatccttacacaccagggggccct	Klonierung
Claudin 16 FOR	atgaaggatcttctcagtacgctg	Sequenzierung
Claudin 16 REV	ttatactctggtgtctacagcatacat	Sequenzierung
Claudin 16 XbaI Rev	aaaagcatctagagcttacaccctgtgtctacagcatac	Klonierung
Claudin 16 HindIII For	aaaagcttgatgacctccaggaccccactgt	Klonierung

Plasmide

pFLAG-CMV-4	Expressionsvektor (Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen)
cpDNA3.1 +	Expressionsvektor (Invitrogen, Karlsruhe)
pEGFP-N1	Expressionsvektor (Bioscience Clontech, Heidelberg)
pE/YFP-N1	Expressionsvektor (Bioscience Clontech, Heidelberg)

Zu den Ergebnissen**MDCK C7 Kontrollzellen**

Abbildung 3-5 *Widerstände, Na^+/Cl^- Permeabilitätsverhältnis sowie die absoluten Permeabilitäten für Natrium und Chlorid der MDCK C7-Kontrollzellen*
S.56

Mittelwert ± Standardfehler, Anzahl (n)	MDCK C7-Wildtyp	K9-Kontrolle	GFP-Kontrolle
Widerstand	2367,82 ± 435,53 n=2	1724,43 ± 52,36 n=67	2144,69 ± 382,22 n=34
P_{Na}/P_{Cl}	1,23 ± 0,007 n=2	1,28 ± 0,013 n=67	1,23 ± 0,014 n=34
Permeabilität Na^+	1,09 ± 0,13 n=2	0,76 ± 0,03 n=67	0,76 ± 0,06 n=34
Permeabilität Cl^-	0,96 ± 0,12 n=2	0,65 ± 0,03 n=67	0,68 ± 0,05 n=34

Abbildung 3-6 *Permeabilitätsverhältnisse P_X/P_{Cl} der MDCK C7 – Kontrollzellen für divalente und monovalente Ionen*
S.58

Mittelwert ± Standardfehler	MDCK C7-Wildtyp	K9-Kontrolle	GFP-Kontrolle
P_{Li}/P_{Cl}	1,21 ± 0,005 n=2	1,26 ± 0,006 n=22	-

P_{Na}/P_{Cl}	$1,23 \pm 0,007$ n=2	$1,28 \pm 0,013$ n=67	$1,23 \pm 0,014$ n=34
P_K/P_{Cl}	$1,22 \pm 0,007$ n=2	$1,35 \pm 0,01$ n=25	-
P_{Rb}/P_{Cl}	$1,21 \pm 0,02$ n=2	$1,31 \pm 0,01$ n=21	-
P_{Cs}/P_{Cl}	$1,26 \pm 0,01$ n=2	$1,28 \pm 0,01$ n=21	-
P_{Mg}/P_{Cl}	-	$1,2 \pm 0,02$ n=15	$1,11 \pm 0,02$ n=9
P_{Ca}/P_{Cl}	-	$1,15 \pm 0,03$ n=11	$1,11 \pm 0,02$ n=9
P_{Sr}/P_{Cl}	-	$1,12 \pm 0,02$ n=14	$1,08 \pm 0,02$ n=6
P_{Ba}/P_{Cl}	-	$1,17 \pm 0,07$ n=10	$1,06 \pm 0,03$ n=7

Die einzelnen Claudine

Claudin-10

Abbildung 3-7 *Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl} , sowie absolute Permeabilitäten der murinen Claudin-10 Klone und deren Deletionsmutanten*

Mittelwert \pm Standardfehler	#2	#22	#26	#30	#23	#47	#48	#29
Widerstand	2186,2 5 \pm 245,4 n=11	580,62 \pm 112,94 n=15	719,25 \pm 70,76 n=31	919,16 \pm 98,02 n=39	664,54 \pm 87,92 n=16	266,93 \pm 22,24 n=27	234,97 \pm 13,76 n=40	584,01 \pm 57,42 n=16
P_{Na}/P_{Cl}	1,31 \pm 0,02 n=4	1,57 \pm 0,24 n=6	1,30 \pm 0,03 n=15	1,31 \pm 0,02 n=15	1,27 \pm 0,05 n=3	5,03 \pm 1,11 n=11	4,53 \pm 0,52 n=23	1,56 \pm 0,08 n=4
Permeabilität Na^+	0,73 \pm 0,19 n=4	2,73 \pm 0,58 n=6	1,58 \pm 0,2 n=15	1,53 \pm 0,19 n=15	2,31 \pm 0,69 n=3	4,85 \pm 0,42 n=11	8,25 \pm 0,71 n=23	2,64 \pm 0,62 n=4
Permeabilität Cl^-	0,6 \pm 0,16 n=4	1,85 \pm 0,2 n=6	1,36 \pm 0,19 n=15	1,27 \pm 0,16 n=15	1,54 \pm 0,09 n=3	1,56 \pm 0,34 n=11	2,35 \pm 0,28 n=23	1,9 \pm 0,49 n=4

Abbildung 3-8 *Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl} , sowie absolute Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- der humane Claudin-10-Klone.*

Mittelwert \pm Standardfehler	#21	#23	#1	#4	YFP
Widerstand	643,19 \pm 34,44 n=54	697,95 \pm 40,83 n=45	170,53 \pm 4,12 n=109	317,07 \pm 11,91 n=42	1037,3 \pm 105,94 n=13
P_{Na}/P_{Cl}	1,29 \pm 0,01 n=33	1,3 \pm 0,02 n=26	5,8 \pm 0,43 n=60	2,81 \pm 0,2 n=21	1,3 \pm 0,03 n=4
Permeabilität Na^+	2,07 \pm 0,12 n=33	1,83 \pm 0,1 n=26	9,67 \pm 0,34 n=60	4,86 \pm 0,34 n=21	1,34 \pm 0,08 n=4
Permeabilität Cl^-	1,76 \pm 0,1 n=33	1,54 \pm 0,09 n=26	2,36 \pm 0,18 n=60	2,04 \pm 0,19 n=21	1,12 \pm 0,09 n=4

Abbildung 3-9 *Permeabilitätsverhältnisse P_X/P_{Cl} der murinen Claudin-10-Klone für monovalente und divalente Ionen.*

Mittelwert \pm Standardfehler	#2	#22	#26	#30	#23	#47	#48	#29
P_{Li}/P_{Cl}	1,3 \pm 0,03 n=2	1,55 \pm 0,006 n=3	1,26 \pm 0,009 n=3	1,27 \pm 0,01 n=6	1,53 \pm 0,01 n=3	3,94 \pm 0,21 n=3	3,48 \pm 0,07 n=4	1,25 \pm 0,009 n=3
P_{Na}/P_{Cl}	1,31 \pm	1,57 \pm	1,30 \pm	1,31 \pm	1,27 \pm	5,03 \pm	4,53 \pm	1,56 \pm

	0,02 n=4	0,24 n=6	0,03 n=15	0,02 n=15	0,05 n=3	1,11 n=11	0,52 n=23	0,08 n=4
P_{K}/P_{Cl}	1,32 ± 0,04 n=3	1,54 ± 0,02 n=2	1,34 ± 0,02 n=4	1,34 ± 0,02 n=6	1,55 ± 0,03 n=3	2,96 ± 0,06 n=4	2,58 ± 0,09 n=4	1,26 ± 0,02 n=3
P_{Rb}/P_{Cl}	1,32 n=1	1,56 ± 0,03 n=2	1,33 ± 0,01 n=4	1,33 ± 0,004 n=6	1,51 ± 0,08 n=3	2,19 ± 0,11 n=5	1,86 ± 0,09 n=5	1,27 ± 0,01 n=3
P_{Cs}/P_{Cl}	1,39 n=1	1,56 ± 0,01 n=3	1,33 ± 0,008 n=5	1,31 ± 0,02 n=6	1,55 ± 0,14 n=3	1,45 ± 0,09 n=4	1,38 ± 0,05 n=3	1,26 ± 0,01 n=3
P_{Mg}/P_{Cl}	1,25 n=1	1,38 n=1	1,22 ± 0,04 n=5	1,18 ± 0,01 n=4	-	1,8 n=1	2,13 ± 0,49 n=8	1,57 n=1
P_{Ca}/P_{Cl}	1,25 n=1	1,77 n=1	1,12 ± 0,04 n=3	1,13 ± 0,02 n=3	1,18 n=1	2,09 n=1	2,27 ± 0,69 n=7	1,22 n=1
P_{Sr}/P_{Cl}	1,22 n=1	1,19 n=1	1,12 ± 0,04 n=3	1,1 ± 0,05 n=3	1,31 n=1	1,83 n=1	1,83 ± 0,34 n=6	1,06 n=1
P_{Ba}/P_{Cl}	1,12 n=1	1,23 n=1	1,1 ± 0,03 n=3	1,11 ± 0,03 n=3	1,14 n=1	1,63 n=1	1,85 ± 0,31 n=6	1,09 n=1

Abbildung 3-10 *Permeabilitätsverhältnisse P_X/P_{Cl} der humanen Claudin-10-Klone für monovalente und divalente Ionen.*

Mittelwert ± Standardfehler	#21	#23	#1	#4	YFP
P_{Li}/P_{Cl}	1,27 ± 0,005 n=5	1,29 ± 0,01 n=6	4,59 ± 0,06 n=12	2,27 ± 0,07 n=6	1,29 ± 0,002 n=2
P_{Na}/P_{Cl}	1,29 ± 0,01 n=33	1,3 ± 0,02 n=26	5,8 ± 0,43 n=60	2,81 ± 0,2 n=21	1,3 ± 0,03 n=3
P_{K}/P_{Cl}	1,33 ± 0,02 n=6	1,35 ± 0,03 n=6	3,57 ± 0,18 n=13	1,74 ± 0,1 n=5	1,34 ± 0,02 n=3
P_{Rb}/P_{Cl}	1,3 ± 0,01 n=6	1,31 ± 0,02 n=5	2,95 ± 0,18 n=10	1,09 ± 0,32 n=4	1,32 ± 0,002 n=2
P_{Cs}/P_{Cl}	1,29 ± 0,01 n=6	1,26 ± 0,03 n=4	2,68 ± 0,18 n=13	0,99 ± 0,22 n=6	1,33 ± 0,03 n=3
P_{Mg}/P_{Cl}	1,17 ± 0,04 n=8	1,25 ± 0,06 n=5	1,87 ± 0,16 n=15	1,33 ± 0,05 n=4	-
P_{Ca}/P_{Cl}	1,2 ± 0,03 n=8	1,23 ± 0,03 n=7	1,93 ± 0,19 n=14	1,47 ± 0,21 n=5	-
P_{Sr}/P_{Cl}	1,17 ± 0,02 n=8	1,23 ± 0,04 n=6	2,02 ± 0,28 n=14	1,36 ± 0,1 n=5	-
P_{Ba}/P_{Cl}	1,18 ± 0,02 n=7	1,09 ± 0,02 n=6	1,99 ± 0,2 n=14	1,45 ± 0,13 n=5	-

Claudin-11

Abbildung 3-11 *Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl} , sowie absolute Permeabilitäten für Natrium und Chlorid der Claudin-11-Klone*

Mittelwert ± Standardfehler	#18	#28	#10	#52
Widerstand	1355,6 ± 77,32 n=19	1016,1 ± 227,86 n=4	1117,3 ± 176,42 n=23	2243,5 ± 650,96 n=12

P_{Na}/P_{Cl}	$1,54 \pm 0,05$ n=19	$1,33 \pm 0,06$ n=4	$1,43 \pm 0,03$ n=23	$1,32 \pm 0,03$ n=12
Permeabilität Na^+	$1,05 \pm 0,06$ n=19	$1,18 \pm 0,28$ n=4	$1,12 \pm 0,17$ n=23	$0,55 \pm 0,16$ n=12
Permeabilität Cl^-	$0,768 \pm 0,06$ n=19	$0,95 \pm 0,19$ n=4	$0,86 \pm 0,15$ n=23	$0,45 \pm 0,12$ n=12

Abbildung 3-12 *Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl} , sowie absolute Permeabilitätsverhältnisse P_X/P_{Cl} der Claudin-11-Klone für monovalente und divalente Ionen*

Mittelwert \pm Standardfehler	#18	#28	#10	#52
P_{Li}/P_{Cl}	$1,55 \pm 0,05$ n=3	-	-	-
P_{Na}/P_{Cl}	$1,54 \pm 0,05$ n=3	-	$1,43 \pm 0,03$ n=23	-
P_K/P_{Cl}	$1,57 \pm 0,01$ n=3	-	-	-
P_{Rb}/P_{Cl}	$1,55 \pm 0,02$ n=2	-	-	-
P_{Cs}/P_{Cl}	$1,51 \pm 0,01$ n=5	-	-	-
P_{Mg}/P_{Cl}	$1,27 \pm 0,07$ n=5	-	$1,23$ n=1	-
P_{Ca}/P_{Cl}	$1,14 \pm 0,06$ n=3	-	$1,37$ n=1	-
P_{Sr}/P_{Cl}	$1,11 \pm 0,03$ n=4	-	$1,19$ n=1	-
P_{Ba}/P_{Cl}	$1,22 \pm 0,06$ n=5	-	$1,19$ n=1	-

Claudin-16

Abbildung 3-13 *Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl} , sowie absolute Permeabilitäten für Natrium und Chlorid der Claudin-16-Klone*

Mittelwert \pm Standardfehler	YFP	II-11	#63
Widerstand	$1415,4 \pm 105,66$ n=4	$1797,3 \pm 102,76$ n=37	$1464,1 \pm 103,88$ n=6
P_{Na}/P_{Cl}	$1,26 \pm 0,06$ n=18	$1,38 \pm 0,04$ n=55	$1,39 \pm 0,06$ n=14
Permeabilität Na^+	$1,1 \pm 0,11$ n=18	$0,73 \pm 0,05$ n=55	$0,79 \pm 0,08$ n=14
Permeabilität Cl^-	$0,94 \pm 0,07$ n=18	$0,59 \pm 0,05$ n=55	$0,62 \pm 0,06$ n=14

Abbildung 3-14 *Permeabilitätsverhältnisse P_X/P_{Cl} der Claudin-16-Klone für monovalente und divalente Ionen*

Mittelwert \pm Standardfehler	YFP	II-11	#63
P_{Li}/P_{Cl}	$1,24 \pm 0,02$ n=4	$1,37 \pm 0,02$ n=2	$1,33 \pm 0,04$ n=2
P_{Na}/P_{Cl}	$1,26 \pm 0,06$ n=18	$1,38 \pm 0,04$ n=55	$1,39 \pm 0,06$ n=14
P_K/P_{Cl}	$1,32 \pm 0,02$ n=3	$1,47 \pm 0,04$ n=7	$1,46 \pm 0,01$ n=2
P_{Rb}/P_{Cl}	$1,29 \pm 0,01$ n=4	$1,36 \pm 0,03$ n=7	$1,43 \pm 0,06$ n=2
P_{Cs}/P_{Cl}	$1,27 \pm 0,02$ n=3	$1,29 \pm 0,06$ n=2	$1,37 \pm 0,0004$ n=2
P_{Mg}/P_{Cl}	$1,06 \pm 0,1$ n=3	$1,41 \pm 0,09$ n=10	$1,25 \pm 0,13$ n=2
P_{Ca}/P_{Cl}	$1,1$ n=1	$1,25 \pm 0,06$ n=10	$1,14$ n=1
P_{Sr}/P_{Cl}	-	$1,18 \pm 0,04$ n=7	$1,31$ n=1
P_{Ba}/P_{Cl}	-	$1,19 \pm 0,05$ n=12	$1,12$ n=1

Claudin-19

Abbildung 3-15 *Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl} , sowie absolute Permeabilitäten für Natrium und Chlorid der Claudin-19-Klone.*

Mittelwert \pm Standardfehler	#28	#32	#36	#42
---------------------------------	-----	-----	-----	-----

Widerstand	1143,7 ± 144,88 n=18	964,55 ± 173,05 n=19	901,82 ± 68,8 n=18	1452,7 ± 53,65 n=3
P_{Na}/P_{Cl}	1,41 ± 0,06 n=5	1,29 ± 0,04 n=5	1,42 ± 0,06 n=5	1,67 ± 0,24 n=3
Permeabilität Na^+	1,62 ± 0,21 n=5	1,04 ± 0,45 n=5	1,65 ± 0,43 n=5	1,17 ± 0,53 n=3
Permeabilität Cl^-	1,28 ± 0,2 n=5	0,92 ± 0,44 n=5	1,31 ± 0,39 n=5	0,92 ± 0,55 n=3

Abbildung 3-16 Permeabilitätsverhältnisse P_X/P_{Cl} der Claudin-19-Klone für monovalente und divalente Ionen.
S.68

Mittelwert ± Standardfehler	#28	#32	#36	#42
P_{Li}/P_{Cl}	1,38 ± 0,008 n=3	1,25 ± 0,01 n=4	1,42 ± 0,05 n=3	-
P_{Na}/P_{Cl}	1,41 ± 0,06 n=5	1,29 ± 0,04 n=5	1,42 ± 0,06 n=5	1,67 ± 0,24 n=3
P_K/P_{Cl}	1,53 ± 0,02 n=5	1,38 ± 0,009 n=5	1,57 ± 0,03 n=5	-
P_{Rb}/P_{Cl}	1,45 ± 0,006 n=3	1,37 ± 0,02 n=3	1,49 ± 0,04 n=3	-
P_{Cs}/P_{Cl}	1,47 ± 0,02 n=2	1,34 ± 0,01 n=2	1,43 ± 0,06 n=2	-
P_{Mg}/P_{Cl}	1,17 ± 0,07 n=5	1,09 ± 0,02 n=5	1,15 ± 0,05 n=5	1,36 ± 0,19 n=4
P_{Ca}/P_{Cl}	1,21 ± 0,15 n=4	1,08 ± 0,01 n=2	1,05 ± 0,01 n=4	1,12 ± 0,009 n=2
P_{Sr}/P_{Cl}	1,35 ± 0,23 n=2	1,09 ± 0,007 n=2	1,12 ± 0,009 n=2	1,12 ± 0,02 n=3
P_{Ba}/P_{Cl}	1,22 ± 0,13 n=2	1,1 n=1	1,09 ± 0,02 n=2	1,09 ± 0,02 n=3s

Die Kokulturen

Kokultur Claudin-10 Varianten 1 und V.2

Abbildung 3-18 Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl} , sowie absolute Permeabilitäten für Natrium und Chlorid der Kokultur Claudin-10 V.1 und V.2.
S.70

Mittelwert ± Standardfehler	#21	#1	Kokultur #21/#1
Widerstand	643,19 ± 34,44 n=54	170,53 ± 4,12 n=109	358,84 ± 17,58 n=4
P_{Na}/P_{Cl}	1,29 ± 0,01 n=33	5,8 ± 0,43 n=60	8,05 ± 2,7 n=4
Permeabilität Na^+	2,07 ± 0,12 n=33	9,67 ± 0,34 n=60	4,67 ± 0,16 n=4
Permeabilität Cl^-	1,76 ± 0,1 n=33	2,36 ± 0,18 n=60	0,96 ± 0,35 n=4

Abbildung 3-19 Permeabilitätsverhältnis P_X/P_{Cl} der Kokultur Claudin-10 V.1 und V.2 für monovalente Ionen
S.71

Mittelwert ± Standardfehler	#21	#1	Kokultur #21/#1
P_{Li}/P_{Cl}	1,19 ± 0,005 n=6	6,21 ± 0,09 n=13	4,99 ± 0,01 n=4
P_{Na}/P_{Cl}	1,23 ± 0,01 n=35	8,09 ± 0,85 n=61	5,23 ± 2,28 n=9
P_K/P_{Cl}	1,28 ± 0,02 n=33	5,23 ± 0,22 n=15	5,29 ± 0,12 n=6
P_{Rb}/P_{Cl}	1,24 ± 0,1 n=33	4,5 ± 0,23 n=10	5,45 ± 0,06 n=6
P_{Cs}/P_{Cl}	1,23 ± 0,1 n=33	4,1 ± 0,26 n=13	5,49 ± 0,09 n=4

Kokultur Claudin-10 und Claudin-11

Abbildung 3-20 Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl} , sowie absolute Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- der Kokultur Claudin-10 V.2 und -11.
S.72

Mittelwert ± Standardfehler	#1	I#18	Kokultur #1/#18
Widerstand	170,53 ± 4,12 n=109	1355,6 ± 77,32 n=34	473,82 ± 67,59 n=4

P_{Na}/P_{Cl}	$5,8 \pm 0,43$ n=60	$1,54 \pm 0,05$ n=19	$4,02 \pm 0,52$ n=4
Permeabilität Na^+	$9,67 \pm 0,34$ n=60	$1,05 \pm 0,06$ n=19	$5,03 \pm 0,96$ n=4
Permeabilität Cl^-	$2,36 \pm 0,18$ n=60	$0,768 \pm 0,06$ n=19	$1,88 \pm 0,49$ n=4

Abbildung 3-21 *Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl} , sowie absolute Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- der Kokultur Claudin-10 V.2 und -11 (GFP)*

Mittelwert \pm Standardfehler	#1	I#10	Kokultur #1/#10
Widerstand	$170,53 \pm 4,12$ n=109	$1117,3 \pm 176,42$ n=55	$215,85 \pm 11,09$ n=4
P_{Na}/P_{Cl}	$5,8 \pm 0,43$ n=60	$1,43 \pm 0,03$ n=37	$3,14 \pm 0,32$ n=4
Permeabilität Na^+	$9,67 \pm 0,34$ n=60	$1,12 \pm 0,17$ n=37	$6,94 \pm 0,25$ n=4
Permeabilität Cl^-	$2,36 \pm 0,18$ n=60	$0,86 \pm 0,15$ n=37	$2,49 \pm 0,34$ n=4

Kokultur Claudin-10 und Claudin-16

Abbildung 3-22 *Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl} , sowie absolute Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- der Kokultur Claudin-10 V.1 und -16.*

Mittelwert \pm Standardfehler	#21	II-11	Kokultur #21/II-11
Widerstand	$643,19 \pm 34,44$ n=54	$1797,3 \pm 102,76$ n=55	$4841,8 \pm 803,12$ n=4
P_{Na}/P_{Cl}	$1,29 \pm 0,01$ n=33	$1,38 \pm 0,04$ n=37	$2,35 \pm 0,29$ n=4
Permeabilität Na^+	$2,07 \pm 0,12$ n=33	$0,73 \pm 0,05$ n=37	$0,32 \pm 0,08$ n=4
Permeabilität Cl^-	$1,76 \pm 0,1$ n=33	$0,59 \pm 0,05$ n=37	$0,15 \pm 0,03$ n=4

Abbildung 3-23 *Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl} , sowie absolute Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- der Kokultur Claudin-10 V.2 und -16.*

Mittelwert \pm Standardfehler	#1	II-11	Kokultur #1/II-11	#63	Kokultur #1/#63
Widerstand	$170,53 \pm 4,12$ n=109	$1797,3 \pm 102,76$ n=55	$444,68 \pm 42,23$ n=34	$1464,1 \pm 103,88$ n=14	$271,92 \pm 15,35$ n=18
P_{Na}/P_{Cl}	$5,8 \pm 0,43$ n=60	$1,38 \pm 0,04$ n=37	$5,09 \pm 0,74$ n=21	$1,39 \pm 0,06$ n=10	$5,06 \pm 1,12$ n=6
Permeabilität Na^+	$9,67 \pm 0,34$ n=60	$0,73 \pm 0,05$ n=37	$3,64 \pm 0,34$ n=21	$0,79 \pm 0,08$ n=10	$5,23 \pm 0,36$ n=6
Permeabilität Cl^-	$2,36 \pm 0,18$ n=60	$0,59 \pm 0,05$ n=37	$1,09 \pm 0,17$ n=21	$0,62 \pm 0,06$ n=10	$1,63 \pm 0,37$ n=6

Abbildung 3-24 *Permeabilitätsverhältnisse P_X/P_{Cl} der Kokultur Claudin-10 V.2 und -16 für monovalente und divalente Ionen.*

Mittelwert \pm Standardfehler	#1	II-11	Kokultur #1/II-11	#63	Kokultur #1/#63
P_{Li}/P_{Cl}	$4,59 \pm 0, n=12$	$1,37 \pm 0,02$ n=2	$4,25 \pm 0,32$ n=4	$1,33 \pm 0,04$ n=2	$4,46 \pm 0,007$ n=2
P_{Na}/P_{Cl}	$5,8 \pm 0,43$ n=60	$1,38 \pm 0,04$ n=55	$5,09 \pm 0,74$ n=21	$1,39 \pm 0,06$ n=6	$5,06 \pm 1,12$ n=3
P_K/P_{Cl}	$3,57 \pm 0,18$ n=13	$1,47 \pm 0,04$ n=7	$3,17 \pm 0,38$ n=2	$1,46 \pm 0,01$ n=2	$4,06 \pm 0,003$ n=3
P_{Rb}/P_{Cl}	$2,95 \pm 0,18$ n=13	$1,36 \pm 0,03$ n=7	$2,64 \pm 0,22$ n=2	$1,43 \pm 0,06$ n=2	$4,02 \pm 0,06$ n=3

P_{Cs}/P_{Cl}	$2,68 \pm 0,18$ n=13	$1,29 \pm 0,06$ n=2	$2,63 \pm 0,23$ n=2	$1,37 \pm 0,0004$ n=2	$4,004 \pm 0,18$ n=2
P_{Mg}/P_{Cl}	$1,87 \pm 0,16$ n=15	$1,41 \pm 0,09$ n=10	$1,8 \pm 0,34$ n=5	$1,25 \pm 0,13$ n=2	$1,9 \pm 0,61$ n=2
P_{Ca}/P_{Cl}	$1,93 \pm 0,19$ n=14	$1,25 \pm 0,06$ n=10	$1,92 \pm 0,34$ n=5	$1,14$ n=1	$2,08 \pm 0,93$ n=2
P_{Sr}/P_{Cl}	$2,02 \pm 0,28$ n=14	$1,18 \pm 0,04$ n=7	$1,64 \pm 0,18$ n=5	$1,31$ n=1	$2,75 \pm 1,38$ n=2
P_{Ba}/P_{Cl}	$1,99 \pm 0,2$ n=14	$1,19 \pm 0,05$ n=9	$1,6 \pm 0,17$ n=5	$1,12$ n=1	$1,56 \pm 0,23$ n=2

Abbildung 3-25 Permeabilitätsverhältnisse P_X/P_{Cl} der Kokultur Claudin-10 V.1 und -16 für divalente Ionen.

Mittelwert \pm Standardfehler	#21	II-11	Kokultur #21/II-11
P_{Mg}/P_{Cl}	$1,17 \pm 0,04$ n=15	$1,41 \pm 0,09$ n=10	$1,24$ n=5
P_{Ca}/P_{Cl}	$1,2 \pm 0,03$ n=14	$1,25 \pm 0,06$ n=10	$1,9$ n=5
P_{Sr}/P_{Cl}	$1,17 \pm 0,02$ n=14	$1,18 \pm 0,04$ n=7	$2,11$ n=5
P_{Ba}/P_{Cl}	$1,18 \pm 0,02$ n=14	$1,19 \pm 0,05$ n=9	$1,14$ n=5

Kokultur Claudin-11 und Claudin-16

Abbildung 3-26 Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl} , sowie absolute Permeabilitäten für Natrium und Chlorid der Kokultur Claudin-11 und -16.

Mittelwert \pm Standardfehler	#18	II-11	Kokultur #18/II-11
Widerstand	$1355,6 \pm 77,32$ n=34	$1797,3 \pm 102,76$ n=55	$1562,38 \pm 983,81$ n=4
P_{Na}/P_{Cl}	$1,54 \pm 0,05$ n=23	$1,38 \pm 0,04$ n=37	$1,48 \pm 0,23$ n=4
Permeabilität Na^+	$1,05 \pm 0,06$ n=23	$0,73 \pm 0,05$ n=37	$2,84 \pm 1,83$ n=4
Permeabilität Cl^-	$0,768 \pm 0,06$ n=23	$0,59 \pm 0,05$ n=37	$2,57 \pm 1,76$ n=4

Die Kotransfektionen

Kotransfektion Claudin-10 V.1 und Claudin-16

Abbildung 3-27 Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl} , sowie absolute Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- der Kotransfektion Claudin-10 V.1 und -16.

Mittelwert \pm Standardfehler	#21	II-11	#2	#3
Widerstand	$643,19 \pm 34,44$ n=54	$1797,3 \pm 102,76$ n=55	$446,34 \pm 69,34$ n=4	$442,17 \pm 118,76$ n=8
P_{Na}/P_{Cl}	$1,29 \pm 0,01$ n=33	$1,38 \pm 0,04$ n=37	$1,23 \pm 0,01$ n=4	$1,28 \pm 0,01$ n=8
Permeabilität Na^+	$2,07 \pm 0,12$ n=33	$0,73 \pm 0,05$ n=37	$2,64 \pm 0,43$ n=4	$3,99 \pm 1,03$ n=8
Permeabilität Cl^-	$1,76 \pm 0,1$ n=33	$0,59 \pm 0,05$ n=37	$2,15 \pm 0,37$ n=4	$3,17 \pm 0,85$ n=8

Abbildung 3-28 Permeabilitätsverhältnisse P_X/P_{Cl} der Kotransfektion Claudin-10 V.1 und -16 für divalente Ionen.

Mittelwert \pm Standardfehler	#21	II-11	#2	#3
P_{Mg}/P_{Cl}	$1,17 \pm 0,04$ n=15	$1,41 \pm 0,09$ n=10	$1,11 \pm 0,03$ n=3	$1,16 \pm 0,03$ n=3

P_{Ca}/P_{Cl}	$1,2 \pm 0,03$ n=14	$1,25 \pm 0,06$ n=10	$1,06 \pm 0,004$ n=3	$1,13 \pm 0,03$ n=3
P_{Sr}/P_{Cl}	$1,17 \pm 0,02$ n=14	$1,18 \pm 0,04$ n=7	$1,04 \pm 0,03$ n=3	$1,07 \pm 0,006$ n=3
P_{Ba}/P_{Cl}	$1,18 \pm 0,02$ n=14	$1,19 \pm 0,05$ n=9	$1,03 \pm 0,02$ n=3	$1,08 \pm 0,02$ n=3

Kotransfektion Claudin-10 V.2 und Claudin.16

Abbildung 3-29 *Widerstände, Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl} , sowie absolute Permeabilitäten für Na^+ und Cl der Kotransfektion Claudin-10 V.2 und -16.*
S.81

Mittelwert \pm Standardfehler	II-11	#1	#4	#5
Widerstand	$1797,3 \pm 102,76$ n=55	$170,53 \pm 4,12$ n=109	$113,6 \pm 5,2$ n=4	$81,81 \pm 6,24$ n=20
P_{Na}/P_{Cl}	$1,38 \pm 0,04$ n=37	$5,8 \pm 0,43$ n=60	$3,78 \pm 0,35$ n=10	$2,94 \pm 0,31$ n=6
Permeabilität Na^+	$0,73 \pm 0,05$ n=37	$9,67 \pm 0,34$ n=60	$15,41 \pm 1,008$ n=10	$19,9 \pm 1,63$ n=6
Permeabilität Cl^-	$0,59 \pm 0,05$ n=37	$2,36 \pm 0,18$ n=60	$4,47 \pm 0,64$ n=10	$7,28 \pm 1,14$ n=6

Abbildung 3-30 *Permeabilitätsverhältnisse P_X/P_{Cl} der Kotransfektion Claudin-10 V.2 und -16 für monovalente und divalente Ionen.*
S.82

Mittelwert \pm Standardfehler	II-11	#1	#4	#5
P_{Li}/P_{Cl}	$1,37 \pm 0,02$ n=2	$4,59 \pm 0,06$ n=12	$3,05 \pm 0,05$ n=4	$2,36 \pm 0,05$ n=2
P_{Na}/P_{Cl}	$1,38 \pm 0,04$ n=7	$5,8 \pm 0,43$ n=13	$3,78 \pm 0,35$ n=10	$2,94 \pm 0,31$ n=6
P_K/P_{Cl}	$1,47 \pm 0,04$ n=7	$3,57 \pm 0,18$ n=14	$2,27 \pm 0,21$ n=4	$1,97 \pm 0,16$ n=5
P_{Rb}/P_{Cl}	$1,36 \pm 0,03$ n=7	$2,95 \pm 0,18$ n=13	$1,92 \pm 0,16$ n=4	$1,9 \pm 0,27$ n=4
P_{Cs}/P_{Cl}	$1,29 \pm 0,06$ n=2	$2,68 \pm 0,18$ n=13	$1,91 \pm 0,25$ n=4	$1,72 \pm 0,35$ n=4
P_{Mg}/P_{Cl}	$1,41 \pm 0,09$ n=10	$1,87 \pm 0,16$ n=15	$1,6 \pm 0,04$ n=5	$1,5 \pm 0,06$ n=4
P_{Ca}/P_{Cl}	$1,25 \pm 0,06$ n=10	$1,93 \pm 0,19$ n=14	$1,56 \pm 0,05$ n=5	$1,51 \pm 0,12$ n=4
P_{Sr}/P_{Cl}	$1,18 \pm 0,04$ n=7	$2,02 \pm 0,28$ n=14	$1,6 \pm 0,11$ n=4	$1,41 \pm 0,07$ n=5
P_{Ba}/P_{Cl}	$1,19 \pm 0,05$ n=9	$1,99 \pm 0,2$ n=14	$1,5 \pm 0,02$ n=3	$1,42 \pm 0,05$ n=3