

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

DISSERTATION

**Entwicklung und Etablierung einer Methode zur Messung des
epithelialen Wassertransports an Claudin-2 exprimierenden MDCK-
Zellen**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Beibei Oelrich
aus Beijing, VR China

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

Datum der Promotion: 30. Januar 2009

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
1.1	Epithelien	5
1.1.1	Aufbau und Funktion von Epithelien	5
1.1.2	Epithelialer Wassertransport in vivo	6
1.2	Tight Junctions	7
1.2.1	Struktur und Funktion der Tight Junctions	7
1.2.2	Claudine	10
1.2.3	Struktur und Funktion von Claudin-2	13
1.2.4	Tight Junctions und der parazelluläre Wassertransport	14
1.3	Ziele der Arbeit	16
2.	Material und Methoden	17
2.1	Chemikalien	17
2.2	Materialien	18
2.3	Geräte	18
2.4	Puffer und Lösungen	19
2.5	Zellkultivierung	20
2.5.1	Claudin-2 transfizierte MDCK-Zellen	21
2.6	Entwicklung des Messstandes	21
2.6.1	Konstruktion eines neuen Kammersystems	22
2.6.2	Versuchsablauf der Wasserflux-Messung	24
2.6.3	Ermittlung der Versuchszeit an vitalen Zellen	25
2.6.4	Änderung der Zusammensetzung der Standardlösung	25
2.6.5	Vergrößerung der Transportfläche und digitale Aufzeichnung	26
2.7	Vorexperimente an MDCK-Zellen	26
2.7.1	Überprüfung des Einflusses der modifizierten Versuchslösung auf die Zellkultur	26
2.7.2	Wachstumsvergleich zwischen kleinen Filter und großen Filtern	26
2.7.3	Induktion des Vektors mit Natrium-Butyrat	27
2.7.4	Aquaporin-Inhibition	27
2.8	Experimente mit Mannitol- und Natrium-Gradienten	28
2.8.1	Experimente mit Mannitol-Gradient	28

2.8.2	Experimente mit Natrium-Gradient	28
2.8.3	Experimente mit Mannitol- und Natrium-Gradient	38
2.9	Elektrophysiologie	29
2.9.1	Widerstandsmessung	29
2.10	Molekularbiologie	30
2.10.1	Nachweis der Proteinexpression mit Western-Blot-Analyse	30
2.11	Immunfluoreszenz-Färbung von Zellen auf Zellfiltern	33
2.12	Statistische Analyse	34
3.	Ergebnisse	35
3.1	Claudin-Expression	35
3.2	Elektrophysiologie	37
3.3	Wassertransport	39
3.3.1	Mannitol-Gradient	39
3.3.2	Natrium-Gradient	41
3.3.3	Natrium-Mannitol-Gradient	42
4.	Diskussion	44
4.1	Optimierung des Versuchsaufbaus	44
4.2	Expressionsstudien an Zellkultur	45
4.3	Claudin-2 und Wassertransport	47
4.4	Beeinflussung und Regulation des Wassertransports	48
4.4.1	Einfluss von ADH auf den Wasserflux	50
4.4.2	Aquaporine und deren Inhibition mit Quecksilberdichlorid und Silber-Sulfadiazin	50
4.5	Parazelluläre Pore	52
4.6	Wasserpermeabilitätsmessung	53
5.	Zusammenfassung	55
6.	Abkürzungsverzeichnis, Abbildungen und Tabellen	57
7.	Literaturverzeichnis	59
8.	Vorpublikationen im Zusammenhang mit der Dissertation	67
9.	Danksagung	68
10.	Lebenslauf	69

1. Einleitung

1.1 Epithelien

Epithelien stellen Grenzflächen zwischen verschiedenen Kompartimenten dar. Sie bekleiden die inneren und die äußeren Oberflächen des Körpers, wie die des gastrointestinalen und urogenitalen Traktes, der Lunge und der Epidermis. Die Innenfläche der Blutgefäße ist mit einer Sonderform von Epithel bedeckt, dem Endothel. Je nach Lokalisation sind die Epithelien unterschiedlich gestaltet: ein- bis mehrschichtig, ein- bis mehrreihig, hochprismatisch, platt, zilien- oder mikrovillitragend. Epithelien sind Verbände aus Einzelzellen. Die Zellen liegen auf der Basalmembran und sind untereinander verankert. Durch den Zusammenschluss der einzelnen Zellen entsteht eine funktionelle Einheit.

1.1.1 Aufbau und Funktion von Epithelien

Epithelien sind polare Zellen mit einer apikalen und einer basolateralen Membran. Apikal (luminal / mukosal) stehen die Zellen je nach Organ unmittelbar in Kontakt zum Beispiel mit Stuhl oder Urin. Die basolaterale (interstitielle / serosale) Seite umfasst die basale Kontaktfläche mit der Basalmembran und die laterale Fläche zu den benachbarten Zellen. Auf dieser Seite befindet sich das Interstitium mit den Lymph- und Blutgefäßen.

Epithelien erfüllen zwei Hauptfunktionen: 1. Barriere und 2. gerichteter Transport. Zur Stabilisierung des inneren Milieus sind beide Funktionen unerlässlich. Die Barrierefunktion ist notwendig, um Kompartimente, die sich in der physikalischen und chemischen Zusammensetzung (pH, Druck, Substratkonzentration) teilweise erheblich voneinander unterscheiden, abzugrenzen. Physiologische Beispiele für funktionell besonders wichtige Epithelschranken sind die Blut-Hirn-Schranke, Blut-Hoden/Nebenhoden-Schranke und die Blut-Nieren-Schranke.

Epithelien gestatten zugleich aber auch die Passage von Substanzen durch die Zellschicht. Grundlage für den gerichteten Transport ist die Polarität des Epithelverbands und die Abdichtung des Spaltes zwischen den Zellen, um eine passive Diffusion von Soluten und Wasser zu verhindern. Die Polarität entsteht infolge der charakteristischen Verteilung der Membranproteine wie Ionenkanäle, Pumpen und Transporter auf beiden Seiten des Epithels, wodurch unidirektionaler Transport im Sinne der Resorption (von apikal nach basolateral) oder Sekretion (von basolateral nach apikal) ermöglicht wird.

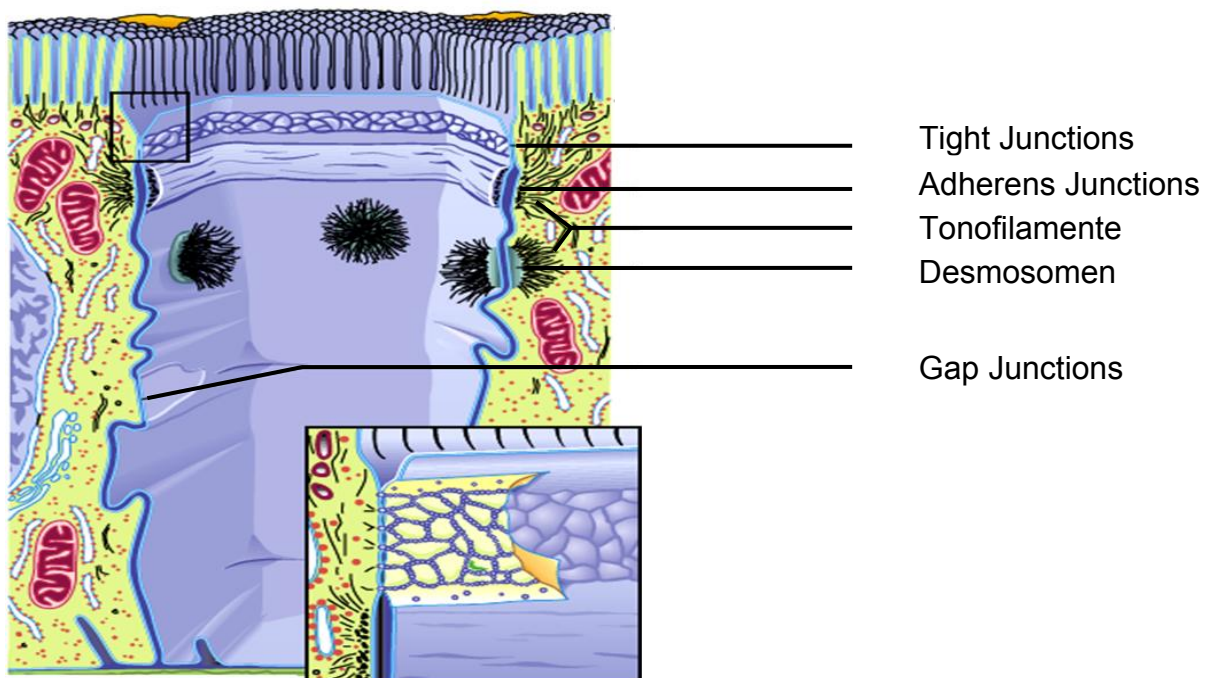


Abb. 1: Schematische Darstellung einer Epithelzelle und der Zell-Zell-Verbindungen. Kl. Bild: Tight Junction Stränge. Quelle: Physiologie des Menschen, Schmidt Thews Lang Springer Berlin; 28. Auflage

1.1.2 Epithelialer Wassertransport in vivo

1988 gelang zum ersten Mal der Nachweis spezifischer integraler Membranproteine, die für den Wassertransport in und durch die Zelle verantwortlich sind [1]. Diese Membranproteine wurden zunächst CHIP genannt und später in Aquaporine (AQP) umbenannt. Zur Zeit sind 13 AQP im Säugetier bekannt [2]. Für Wasser besteht prinzipiell die Möglichkeit, entweder transzellulär oder parazellulär die Epithelschicht zu überwinden. Beide Transportwege tragen zusammen zu einem Flüssigkeitsaustausch von ca. 200 L pro Tag im menschlichen Organismus bei [3].

In der menschlichen Niere wird pro Tag ca. 180 L Plasma filtriert, aber nur 0.5 bis 3 L Urin ausgeschieden. Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) entspricht in etwa dem 10fachen des Extrazellulärvolumens und dem 60fachen des Plasmas. Es ist daher notwendig, einen Großteil des Filtrats über Resorption wieder dem systemischen Kreislauf zurückzuführen. Aus dem Primärfiltrat werden essentielle Solute gemeinsam mit Wasser isoosmolar resorbiert. Den größten Anteil der Resorptionsleistung hat der proximale Tubulus (ca. 60% der GFR) und die Henle-Schleife (ca. 20% der GFR). Im medullären Sammelrohr findet eine Feinjustierung der Urinzusammensetzung statt. Die Hauptzellen resorbieren Natriumchlorid (NaCl) und sezernieren Kalium (K^+) unter dem Einfluss von Aldosteron. Die Zwischenzellen nehmen K^+ auf und sezernieren H^+ . Die transzelluläre Wasserpermeabilität und hiermit die Wasserresorption wird durch das antidiuretische Hormon (ADH bzw. Vasopressin) in einem Bereich zwischen <1% und 15% der GFR geregelt.

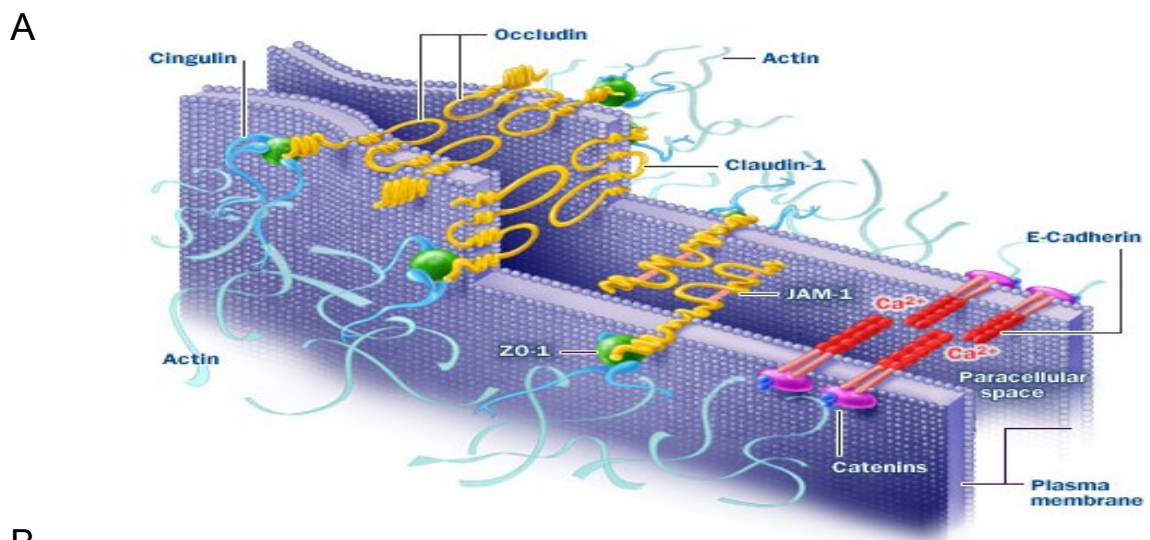
1.2 Tight Junctions

1.2.1 Struktur und Funktion der Tight Junctions

Parazellulär lassen sich drei unterschiedliche Zellverbindungen finden: *Adherens Junctions / Zonula adhaerentes*, *Nexus / Gap Junctions* und die am weitesten apikal angeordnete *Tight Junctions (TJ) / Zonula occludens* (Abb. 1). Erstere befinden sich unterhalb der TJ und sorgen für den mechanischen Zusammenhalt des Zellverbands. Gap Junctions sind direkt kommunizierende Zellverbindungen. Bei den TJ handelt es sich um spezialisierte Zell-Zell-Kontakte, die sich funktionell und morphologisch von anderen Zellverbindungen unterscheiden.

Die TJ stellen eine selektiv-permeable Barriere dar, die die Zelle netzförmig umspannt, Hierdurch wird das interzelluläre Kompartiment am luminalen Rand unterteilt (Abb.1). Im Bereich der TJ nähern sich die benachbarten Zellen, so dass dieser Spalt, normal ca. 20-30 nm breit, dabei obliteriert [4]. Lichtmikroskopisch sind die TJ nicht darstellbar. Elektronenmikroskopisch fusionieren die gegenüberliegenden Zellmembranen an der Stelle, wo die TJ lokalisiert sind und imponieren als punktuelle Verdichtungen [5, 6]. In Gefrierbruchschnitten lassen sich parallel angeordnete und miteinander vernetzte Stränge erkennen, deren Anzahl je nach Epithel variieren [7].

TJ erfüllen verschiedene Funktionen im Epithel: der Erhalt der Polarität, die Regulierung des parazellulären Transports und die Signalübertragung. Zur Aufrechterhaltung der Polarität der Epithelzelle verhindern die TJ die freie Diffusion der membranständigen Proteine innerhalb der Lipiddoppelschicht. Damit verbleiben die am epithelialen Transport beteiligten Ionenkanäle, Pumpen und Transporter auf der apikalen und basolateralen Seite der Plasmamembran. Diese spezifische Verteilung gewährleistet den gerichteten epithelialen Transport. Die Passage von Ionen und Molekülen über ein Epithel kann auf zwei Wegen erfolgen, transzellulär und parazellulär. Beim ersteren führt der Transport durch die apikale Zellmembran, das Zytoplasma und die



B

basolaterale Membran. Der parazelluläre Transport erfolgt unter Umgehung der Zelle im Interzellularraum statt, der durch die TJ reguliert wird.

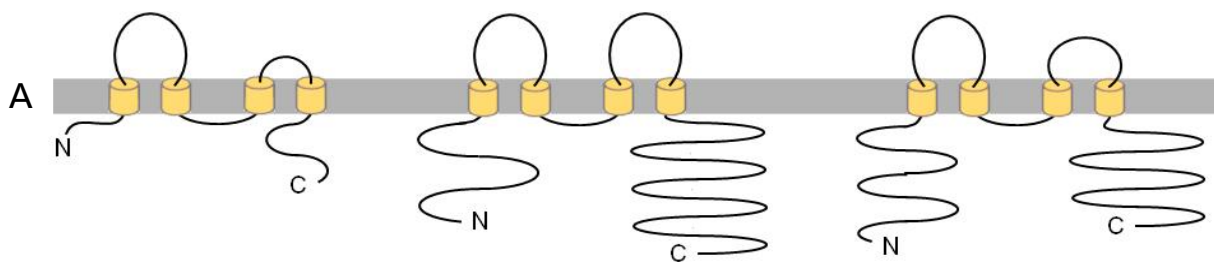


Abb. 2: Aufbau der Tight Junctions. A: Modell der Tight Junctions. Quelle: http://www.nastech.com/nastech/junctions_biology. B: Molekulare Struktur der Tight Junction Proteine.

Inzwischen ist bekannt, dass die TJ sich aus verschiedenen Proteinen zusammensetzen: Claudin, Occludin, Junction Adhesion Molekül (JAM) und dem

Claudin

Occludin

Tricellulin

kürzlich entdeckten Tricellulin [8, 9]. Die Membranproteine zweier benachbarter Zellen interagieren untereinander [10, 11]. Das Protein JAM mit zwei transmembranären Schleifen ist allein nicht in der Lage, TJ-Fibrillen zu bilden [12, 13]. Beim Occludin handelt es sich um ein transmembranäres Molekül von ca. 65 kDa. Die Präsenz von Occludin allein erklärt jedoch nicht die Struktur und die Funktion der TJ. Denn Endothel- und Sertolizellen enthalten kein Occludin und bilden dennoch TJ-Fibrillen aus [14-16]. Mäuse, in denen Occludin ausgeschaltet wurde, zeigen weder morphologische noch elektrophysiologische Veränderung der TJ [17].

Einen maßgeblichen Einfluss auf die Eigenschaft der TJ als Barriere haben die Claudine, dabei scheint nicht allein die Gesamtmenge der vorkommenden Claudine von Bedeutung zu sein, sondern die Zusammensetzung und das Verhältnis der einzelnen Claudinsubtypen innerhalb der TJ-Stränge [18]. Claudine verfügen über spezifische Proteininteraktionssequenzen (PDZ-Domänen) am C-Terminus, worüber sie mit weiteren zytoplasmatischen Proteinen mit PDZ-Domänen interagieren können, die mit dem Zytoskelett verbunden oder an der Signalübertragung beteiligt sind. Beispiele sind Zonula occludens-1, -2, -3 (ZO-1, ZO-2, ZO-3), Membran-assoziierte Guanylatkinase (MAGIs) und Multi-PDZ-Domäne Protein 1 (MUPP1). Über die zytoplasmatischen, peripheren Proteine Cingulin und Zonula occludens-1, -2, -3, mit einer Molekularmasse zwischen 100 und 220 kDa, entsteht ein direkter Kontakt mit Zytoskelettfilamenten wie Aktin [19, 20] (Abb. 2 und 3). ZO-1 scheint ebenfalls an der Regulation von Transkription und Zellproliferation beteiligt zu sein, indem es über den Transkriptionsfaktor ZONAB die Expression vom Protoonkogen ErbB-2 moduliert [21].

Verschiedene pathologische Zustände gehen mit einer gestörten TJ-Funktion einher. Der Verlust der Barrierefunktion und der Zellpolarität sind mit der autosomal-dominanter Polyzystischer Nierenerkrankung (ADPKD) oder Karzinogenese und Metastasierung assoziiert. Ein morphologisch wichtiger Schritt in der Tumorprogression ist der Verlust der epithelialen Architektur und die zunehmende Auflösung des Zellverbandes. Beides wird durch die TJ aufrechterhalten. Die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) beschreibt modellhaft die maligne Transformation, wobei Zellen den epithel- und organspezifischen Phänotyp verlieren [22]. Auf diesem Weg gewinnen die veränderten Zellen bindegewebige Erscheinung. Das retrovirale Onkogen Raf-1 induziert unter Downregulation von Claudin-2 eine Signalkaskade, die über EMT in der Leberzelllinie

der Maus zum Hepatoblastom führt [23]. Aktuell werden Claudine als Biomarker in der Tumordiagnose und Therapie diskutiert [24-27]. Durch Kenntnis der gewebsspezifischen Lokalisation der Claudine ist eine epitheliale Zuordnung von Metastasen unbekanntem Ursprungs möglich [28]. Beim Prostata- und Mammakarzinom wurde gezeigt, dass die Claudin-2-Expression bis unterhalb der Detektionsgrenze erniedrigt ist. In 2% der Magenkarzinome und 25% der kolorektalen Karzinome ist Claudin-2 exprimiert [29] bzw. hochreguliert [30].

1.2.2 Claudine

Zur Zeit sind 24 homologe Isoformen der Claudine bekannt [31]. Es sind ca. 23 kD große Proteine, die vom Aufbau dem Occludin sehr ähnlich sind, aber keine Ähnlichkeit bezüglich der Aminosäuresequenz mit Occludin aufzeigen (Abb. 2) [32]. Tabelle 1 listet die Claudine nach der Lokalisation, der Eigenschaft die parazelluläre Permeabilität zu erniedrigen (dicht) oder zu erhöhen (leck) und deren klinische Bedeutung auf. Claudin-1 und -2 waren die ersten identifizierten Mitglieder dieser Familie. Beide sind eng verwandt und zeigen 38% Homologien in ihrer Aminosäuresequenz [13, 33]. Wenn Claudin-1 und -2 jeweils isoliert in Fibroblasten ohne genuine TJ eingebracht werden, entstehen TJ Stränge, die sich morphologisch nicht von nativen TJ unterscheiden [33]. Über die funktionelle Rolle der einzelnen Claudine werden zunehmend mehr Erkenntnisse gewonnen.

Der Transport durch die TJ im Organismus erfolgt passiv entlang eines elektrochemischen Gradienten, der zuvor durch energieabhängige Transportprozesse aufgebaut wurde. Die parazelluläre Passage findet selektiv statt und wird dynamisch reguliert. Die Up- und Downregulation einzelner Claudine als Anpassungsreaktion auf physiologische und pathologische Änderungen externer Gegebenheiten spiegelt die dynamische Funktion der TJ wider. Die Dichtigkeit der Barriere wird durch die Höhe des transepithelialen Widerstands (R_{epi}) widergegeben. Anhand von R_{epi} lassen sich niederohmige Lecke von dichten Epithelien mit hohem R_{epi} unterscheiden [14, 34]. Übersteigt die parazelluläre die transzelluläre Durchlässigkeit, wird das Epithel als Leck bezeichnet und umgekehrt als dicht. An Abschnitten des Nierentubulus lässt sich die physiologische Relevanz dieser Eigenschaft besonders gut nachvollziehen (Tab. 1). Im proximalen Tubulus mit hoher transzellulärer Transportrate ist R_{epi} klein, im Gegensatz

zum hohen R_{epi} in distalen Segmenten, in denen die Aufrechterhaltung des aufgebauten Gradienten zwischen Lumen und Interstitium im Vordergrund steht. Die TJ verhindern die Rückdiffusion von Soluten zwischen den Zellen und unterstützen somit den Aufbau eines elektrochemischen Gradienten. Lange Zeit galt, dass die TJ in erster Linie eine Abdichtungsfunktion erfüllen und wenig durchlässig sind. Eine ganze Reihe von Arbeiten haben inzwischen bestätigt, dass die molekulare Zusammensetzung und die heterogene Expression der Claudine die detaillierte Funktion der TJ bestimmen [35-37]. Während große organische Moleküle zurückgehalten werden, können kleinere Ionen die Schranke passieren.

Tab. 1: Lokalisation und klinische Bedeutung der Claudine.

Claudin	Vorkommen	Charakteristik	Klinische Bedeutung	Literatur
1	dist. T, SR	dicht	Dehydration	[38, 39]
2	selektiv prox. T	leck	siehe Tab. 2	
3	prox. T, Henle, SR	nicht eindeutig	Toxin-Rezeptor	[40]
4	prox. T, SR, Lunge	nicht eindeutig	Toxin-Rezeptor Williams-Beuren-Syndrom	[35]
5	Endothel	dicht	Velokardiofaziales Syndrom	[36, 41]
6	embryonal, SR		Ko-Rezeptor für Hepatitis C	[42, 43]
7	prox. T, SR, Lunge	leck	Nierenzellkarzinom	[44]
8	prox. T, Henle, Lunge	dicht	Morbus Crohn	[45]
9	Embryonal, Leber		Ko-Rezeptor Hepatitis C	[37, 42]
10	prox. T	leck	Hepatozelluläres Karzinom	[46]
11	Hoden		Blut-Hoden-Schranke	[47, 48]
12	Darm		Kalziumabsorption	[49]
13	nur in Maus			[27]
14	Innenohr		auto-rez. Taubheit	[50]
15	Darm		Megaintestinum	[51]
16	Henle	leck	fam. Hypomagnesämie	[52]
17	Haut			[53]
18	Lunge, Magen	dicht	Magenkarzinom	[54]
19	Henle, dist. T, SR	dicht	fam. Hypomagnesämie Polyzystische Niere	[55]

dist. = distal, prox. = proximal, SR = Sammelrohr, T = Tubulus

Eine Beteiligung an der parazellulären Ionenleitfähigkeit wurde erstmals für Claudin-16 berichtet [52]. Die Überexpression von Claudin-1, -4, -8, -11 und -15 führt zu einem Anstieg von R_{epi} und Permeabilitätssenkung [34, 38, 56-58], während die Überexpression von Claudin-2, -6 und -7 zu einem Abfall des R_{epi} und damit zu einem Permeabilitätsanstieg führen [58, 59]. Aus funktionellen Studien an kultivierten Zellmodellen ist bekannt, dass Claudin-5 das Epithel abdichtet [36]. Claudin-3 und -4 kommen dagegen sowohl in dichten wie auch in lecken Epithelien vor und lassen sich daher nicht eindeutig zuordnen. Sie fungieren als Rezeptor für das Enterotoxin vom Durchfallerreger *Clostridium perfringens* [40, 60].

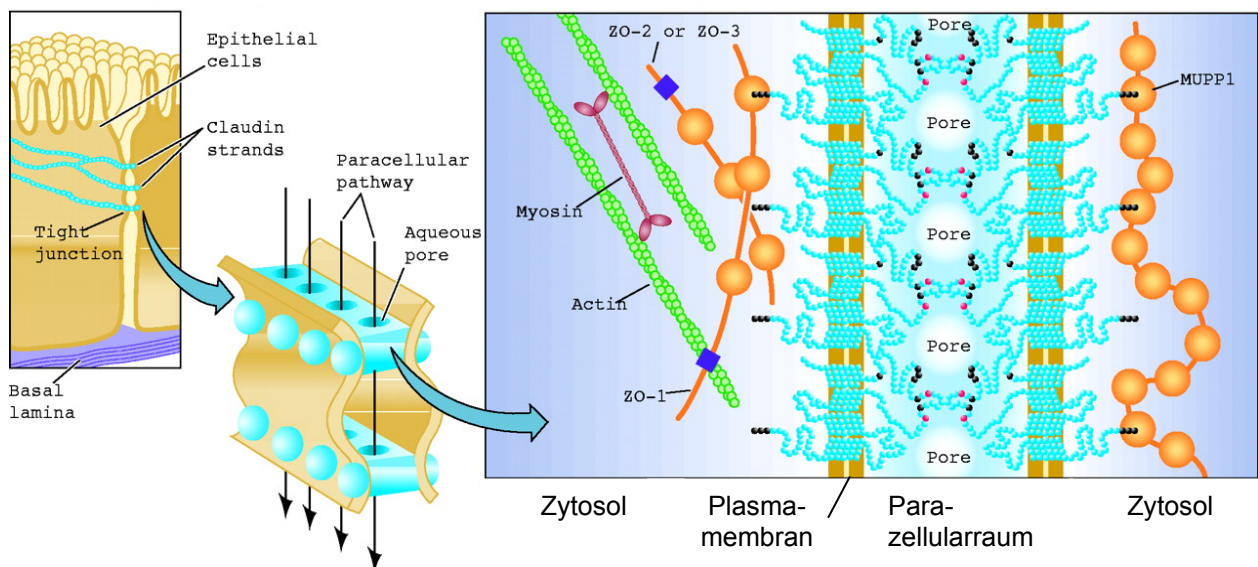


Abb. 3: Parazelluläre "wässrige" Poren. Quelle: Van Itallie and Anderson. 2004. Physiology 19 :331-338.

Als porenbildende Claudine sind bisher Claudin-16 [61] und Claudin-2 [62] bekannt. Die Beschaffenheit einer solchen Pore ist spekulativ (Abb. 3). Bisher wurden drei transportbezogene Eigenschaften beschrieben: 1. elektrische Konduktivität, 2. Ladungsselektivität und 3. Größenselektivität [18, 63, 64]. Die Ladung der Innenseite der Pore legt die Ladungsselektivität fest. Verschiedene Arbeiten mit anderen Claudinen haben gezeigt, dass die selektive Permeabilität des Epithels durch chemische Veränderungen der Claudine modulierbar ist. Wenn anionische Reste am Claudin-15 modifiziert werden, entsteht eine Anionenpräferenz. Durch mutagene Änderungen der Nettoladung der ersten extrazellulären Schleife am Claudin-4

verschwand die Kationenselektivität [58]. Claudine sind in der Lage Polymere miteinander auszubilden. Während Claudin-3 sowohl mit Claudin-1 als auch -2 heteropolymere Komplexe bildet, ist das zwischen Claudin-1 und -2 nicht möglich [13].

1.2.3 Struktur und Funktion von Claudin-2

Die Barriereeigenschaft wird primär bestimmt durch die An- oder Abwesenheit von einzelnen TJ-Proteinen aus der Claudin-Familie. Den potentesten Effekt auf die parazelluläre Permeabilität besitzt Claudin-2 [62]. Claudin-2 ist wie andere Mitglieder der Claudin-Familie ein integrales Membranprotein mit vier transmembranären Domänen und zwei extrazellulären Schleifen (Abb. 2). Der in den Parazellularraum hineinragende Anteil ist funktionell von besonderem Interesse, da er direkt mit Soluten im Parazellularraum in Berührung steht. Daher sind Claudine die vielversprechendsten Kandidaten, um die unterschiedliche Permeabilität der Epithelien zu erklären. Endogen befindet sich Claudin-2 in zahlreichen epithelialen Organen wie Leber und Niere (Tab. 2), jedoch nicht in Lymphgewebe und Haut [26, 65].

Claudin-2 ist in der Lage, eine parazelluläre Pore zu bilden. Durch die Expression von Claudin-2 wird ein dichtes Epithel in ein leckes transformiert unter Abfall des transepithelialen Widerstands [62, 66]. Die physiologische Bedeutung für die Funktion wird hervorgehoben durch die organ- und gewebsspezifische Expression. Charakteristischerweise lässt sich eine hohe Claudin-2-Expression in den lecken, proximalen Segmenten der röhrenförmigen Epithelien der exkretorischen Drüsen, des Darms und der Niere finden [67, 68]. Claudin-2 beeinflusst entscheidend die parazelluläre Ionendurchlässigkeit. Amasheh et al. zeigten, dass Claudin-2 Poren bildet, die selektiv die Passage von kleinen Kationen ermöglichen [62]. In unserem Labor durchgeführte Flux-Studien zeigen eine Durchlässigkeitsgrenze für ungeladene Moleküle wie Mannitol von maximal 182 Da. Die Ionenleitfähigkeit beträgt in absteigender Reihenfolge: $K^+ = Na^+ > N\text{-Methyl-D-Glucamin (NMDG}^+) > Cholin^+ \gg Cl^- = Br^-$. der Proteine [68]. Das neonatale Urothel mit einem niedrigen R_{epi} enthält zugleich auch einen 4fach höheren Anteil an Claudin-2 im Vergleich zu adulten proximalen Tubuli. Für urotheliales Epithel wurde eine Downregulation von Claudin-2 während der Ausdifferenzierung zu reifem Urothel mit einem hohen R_{epi} gezeigt, was die Funktion von Claudin-2 unterstreicht [69]. Eine Störung der Abdichtungsfunktion durch das

porenbildende Protein führt klinisch zur Diarrhoe. In Darmbiopsien von Patienten mit Colitis ulcerosa ist die Claudin-2-Expression um das 10fache erhöht [70].

Tab. 2: Expression und klinische Bedeutung von Claudin-2

Claudin	Lokalisation	Klinische Bedeutung	Literatur
Claudin-2	Niere (höchste Vorkommen)	kollagene Kolitis	[70, 71]
	Magen, Leber, Pankreas	Morbus Crohn	[45]
	Darm, Mamma, Auge, Schilddrüse,	kolorektales Karzinom	[26, 29]
	Prostata, Lunge, Gehirn		

1.2.4 Tight Junctions und der parazelluläre Wassertransport

Die Literatur zum Thema parazellulärer Wassertransport reicht bis in die 70er und 80er Jahre zurück [72-76]. Nach wie vor ist die Frage „Sind die Tight Junctions durchlässig für Wasser?“ umstritten. Die Aussagen variieren stark. Auf der einen Seite steht der lange akzeptierte „solvent drag“ Mechanismus, wobei Solute mit dem transportierten Wasser mitgenommen werden. Auf der anderen Seite lassen sich Aussagen finden, wobei TJ als Barriere im transepitheliale Wassertransport fungieren [77]. Abhängig vom Autor wird der Anteil des parazellulären Wassertransports zwischen 0 [78, 79] und 100% angegeben [80-82]. Funktionelle Studien weisen daraufhin, dass die TJ Poren enthalten, die größen- und ladungsselektiv sind. Obwohl einige Autoren von „wässrigen Poren“, also wassergefüllte Poren im stationären Zustand sprechen [13, 56, 83, 84] (Abb.3), konnten Kovbasnjuk et al. [78] mit optischen Methoden keinen parazellulären Wassertransport feststellen.

Hinweise auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen Claudin-Expression und Homöostase des Wasserhaushalts liefern zwei Arbeiten im Tiermodell. Claudin-1 defiziente Mäuse und transgene Mäuse, die Claudin-6 überexprimieren, zeigen auffällige Permeabilitätssteigerung für Wasser [39, 43]. Durch Mangel an Claudin-1 sterben die Mäuse innerhalb eines Tages postpartal infolge des Defektes in der epidermalen Barriere.

Die Untersuchung des Wassertransports ist experimentell schwierig. Die methodischen Möglichkeiten zur direkten Messung und Visualisierung des Wassertransports sind

limitiert [85]. Die bisher in der Literatur zu findenden Methoden sind:

- analytische Kalkulation [82, 86]
- radioaktive Markierung von Wasser D₂O [87]
- Elektronenmikroskopie der Passage von ultrastrukturell darstellbaren Markern [76]
- konfokale Mikroskopie von fluoreszenz-markierten Substanzen [88]
- konfokale Laser Scanning-Mikroskopie des Zellvolumens [77]
- indirekte Messung von Abnahme der Perfusionsflüssigkeit [79]
- optische Systeme [89]

Bei diesen Messungen wurde versucht, direkt experimentell zwischen trans- und parazellulärem Wassertransport zu unterscheiden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine andere Methode angewandt: Zunächst wurde der gesamte transepitheliale Wassertransport gemessen. Anschließend wurde der Einfluss einer Veränderung der TJ-Zusammensetzung durch die stabile Transfektion mit Claudin-2 cDNA auf den epithelialen Wassertransport untersucht.

Die überwiegende Zahl der bisherigen Untersuchungen wurde ohne Berücksichtigung des Aufbaus der TJ durchgeführt. Die Kenntnisse der molekularbiologischen Details der TJ sowie deren physiologische Bedeutung sind erst in den letzten Jahren hinzugekommen. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit liegen keine publizierten Daten über den funktionellen Einfluss von Claudin-2 auf den parazellulären Wassertransport vor. Die Klärung des Beitrags von Claudin-2 zum parazellulären Wassertransport trägt entscheidend für das allgemeine Verständnis des Netto-Wassertransports in Epithelien bei.

In der vorliegenden Dissertation wird eine neuartige Messmethode zur direkten quantitativen Bestimmung des epithelialen Wassertransports entwickelt und etabliert. Mit dieser Methode wird der Wassertransport unter Berücksichtigung der molekularbiologischen Zusammensetzung der TJ untersucht. Für die Versuche wurden Madin-Darby Canine Kidney-Zellen (MDCK)-Zelllinien verwendet. MDCK sind Sammelrohrzellen aus der Hundeniere, die konfluent zu einem Monolayer wachsen. MDCK wurde nach SH Madin und NB Darby benannt, die 1958 erstmalig Zellen aus einer weiblichen Hundeniere isolierten [90]. Die Zellen sind besonders geeignet als

Untersuchungsmodell für einschichtige Epithelien, da sie zuverlässig konfluent wachsen und TJ ausbilden. Über die Messung des transepithelialen Widerstands R_{epi} kann die parazelluläre Dichtigkeit der TJ beurteilt werden. Die MDCK-Zellreihen C7-Wildtyp (wt) und C11-wt unterscheiden sich morphologisch und funktionell. MDCK-C7-wt repräsentiert die höherohmigen Hauptzellen der Niere ($R_{\text{epi}} \geq 1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$), während C11-wt die niederohmigen Zwischenzellen darstellt ($R_{\text{epi}} \sim 50 \Omega \cdot \text{cm}^2$) [91].

MDCK-C7-wt exprimiert endogen kein Claudin-2, während MDCK-C11-wt stark Claudin-2 exprimieren. Die Wassertransportmessungen wurden mit zwei Subklonen der MDCK-C7-Zelllinie (C7-cld2M, C7-cld2H) und Zellen der MDCK-C11-Zelllinie durchgeführt. Bei C7-cld2M handelt es sich um einen stabil transfizierten Klon mit Claudin-2 der Maus und bei C7-cld2H mit humanem Claudin-2. Als Kontrolle diente jeweils der Klon, der nur einen leeren Plasmidvektor enthielt. Während die MDCK-C11-wt-Zelllinie aufgrund der Claudin-2 Expression niedrige Werte für R_{epi} aufweist, wurde bei der C7-Zellreihe erst durch die Transfektion mit Claudin-2 der R_{epi} erniedrigt.

1.3 Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung des Beitrags von Claudin-2 auf den transepithelialen Wassertransport. Da für diese Fragestellung keine geeignete Messmethode zur Verfügung stand, wurde zunächst eine neue Messmethode zur Messung des epithelialen Wassertransports entwickelt, etabliert und optimiert. Im Anschluss wurden Versuchsreihen zur Bearbeitung der Fragestellung unter Vergleich von niederohmigen MDCK-C11-Zellen, hochohmigen MDCK-C7-wt-Zellen und MDCK-C7-Zellen, in denen Claudin-2 stabil transfiziert wurde, durchgeführt:

1. Messung des epithelialen Wassertransports unter dem Einfluss eines osmotischen Mannitol-Gradienten
2. Messung des epithelialen Wassertransports unter dem Einfluss eines Natrium-Gradienten
3. Messung des epithelialen Wassertransports unter Kombination beider Gradienten

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

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

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

2.2 Materialien

Elektroden	Mettler-Toledo GmbH, Urdorf, Schweiz
Kryo-Röhrchen	Brand, Wertheim
Zellkulturplatte 8-Well	Nunc, Roskilde, Dänemark
Magnetrührstäbchen	Merck, Berlin
Nylon Membran	Roche, Mannheim
Objektträger	Menzel, Braunschweig
Pipetten	Eppendorf, Köln
Poly Screen PVDF-Transfer Membran	NEN, Köln
Zellkulturflaschen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellschaber	Costar, Corning, NY
Kunststoff-Zellfilter	Millipore Corp., MA, USA

2.3 Geräte

Agarosegel-Elektrophorese Kammern	Biorad, München
Fluoreszenzmikroskop BX 60	Olympus, Hamburg
Luminiszenzbild Analysator (LAS 1000)	Fuji, Düsseldorf
Magnetrührer	Ika-Combimag, München
Mini-Protean 3 Elektrophoresesystem	Biorad, München
Mini Trans-Blot Transfer-Zelle	Biorad, München
Inkubator 1000, Uni max 1010	Heidolph, Kelheim
Heizblock	Grant, Berlin
Plattenlesegerät Spectra Classic	Tecan, Crailsheim

Power Pac 300	Biorad, München
Speed Vac	Uniequip, Martinsried
Ussing-Kammer	Inst. Klin. Physiologie, Charité, Berlin
Zentrifugen Hermle Z233MK	Wehingen
Wippe	Fröbel Labor Technik Lindau
Widerstandsmessgerät Inst.	Inst. Klin. Physiologie, Charité, Berlin
Wasserbad SW 21/ TWB 5	Julabo, Selbach
Zentrifugen Hermle Z233MK	Wehingen
Zentrifuge Eppendorf 5414 C,	Köln
Zentrifuge Beckman Ti 70.1 AvantiJ25,	Unterschleissheim Lohhof
Rollerpumpe	Ismatec, Zürich, Schweiz
Wasserbad	Haake, Berlin
Objektiv Fujinon TV Zoon Lens	Soft Imaging System GmbH, Münster
E6X14AM Colorview12	
Leuven-Clamp	
ADDI-Data APCI-3120 analog Interface	
pH-Meter 761	Knick, Berlin
Begasungsbrutschrank, B 5060 EC/CO2	Heraeus, Hanau

2.4 Puffer und Lösungen

5% Magermilchpulver in PBS	5 g Magermilchpulver PBS ad 100 ml
5% BSA in PBS:	5 g BSA PBS ad 100 ml
Pierce BCA (je Probe):	196 µl Protein Assay Reagenz A 4 µl Protein Assay Reagenz B
Transferpuffer:	100 ml 10 × Puffer West 100 ml Methanol Aqua bidest ad 1 l
Elektrophoresepuffer:	100 ml 10 × Puffer West 10 ml 10% SDS Aqua bidest ad 1 l

PBS/Tween/5% Magermilchpulver:	5 g Magermilchpulver PBS/Tween ad 100 ml
PBS/Tween:	2 PBS-Tabletten 1 ml Tween Aqua bidest ad 1 l
10 × Puffer West:	144 g Glycin 30,4 g Tris Base Aqua bidest ad 1 l
BSA-Blockierungslösung:	5 % BSA 0,02 % Natriumazid in PBS/Tween
Membran-Lysepuffer:	2 ml Tris HCl, pH 7,4 500 µl 1M MgCl ₂ 200 µl 0,5M EDTA 120 µl 0,5M EGTA Aqua bidest. ad 100 ml
zu ergänzen für je 5 ml frischen Lysepuffer:	5 µl 1000 × SBTI 100 µl 50 × PPI 50 µl 100 × PIC 5 µl Aprotinin

2.5 Zellkultivierung

Die für diese Arbeit verwendeten Zellklone MDCK-C7-wt und C11-wt stammten aus der Arbeitsgruppe Oberleithner, Institut für Physiologie der Universität Münster. Sie sind ursprünglich aus kommerziell verfügbaren MDCK-Zellen der American Type Culture Collection (ATCC) hervorgegangen.

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

Lichtmikroskopisch wurde das Wachstum des Zellrasens kontrolliert. Für die Experimente wurden Millicell®-HA-Filter (Porengröße 0.45 µm, effektive Transportfläche 0.6 bzw. 4.2 cm² eingesetzt. Dazu wurden die konfluenten Zellen von der Kulturflasche auf Zellfilter überführt. Nach Zugabe von 0.05% Trypsin-EDTA Lösung, lösten sich die Zellen vom Boden der Flasche und wurden anschließend auf Zellfilter ausgesät. Pro Filter wurde eine Zellsuspension verwendet, die die gleiche Zellzahl enthielt ($2 \cdot 10^6$). Am 7. Tag nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellfilter für die Versuche entnommen. Testung auf Infektion durch Mycoplasmen (VenorGeM® Mycoplasma PCR Detection Kit) wurden regelmäßig durchgeführt.

2.5.1 Claudin-2 transfizierte MDCK-Zellen

Für die Wassertransportmessungen verwendete Zellen enthielten entweder das Claudin-2 der Maus (C7-cld2M) oder humanes Claudin-2 (C7-cld2H). Verwendet wurden Zellen zwischen der sechzigsten und achtzigsten Passage. Als Kontrolle diente die Zellreihe, die den leeren Plasmidvektor (eukaryontischer Expressionsvektor pcDNA3.1 bei C7-cld2M, CMV4-Vektor bei C7-cld2H) enthält (C7-vec) [62]. Die Plasmidvektoren sowohl der Kontrolle als auch des Claudin-2 Klons enthielten das Resistenzgen für das Aminoglykosid Geneticin (G418). Das Aminoglykosid Geneticin (G418) wurde dem Nährmedium für C7-cld2 und C7-vec (800 µg/ml) hinzugegeben, um die Zellen zu selektieren, die erfolgreich transfiziert wurden.

2.6 Entwicklung des Messstandes

Die von dem Physiologen Hans Ussing beschriebene Versuchsanordnung dient als heutiger Standard bei der Untersuchung transepithelialer Transportprozesse [92]. Das Prinzip lässt sich kurz darstellen: Zwischen zwei Kammern wird ein durchlässiges zellbewachsenes Filtersystem eingelassen, wodurch das System zweigeteilt wird in ein apikales und ein basolaterales Kompartiment. Auf beiden Seiten herrschen die gleichen physikalischen Bedingungen bezüglich Druck, Temperatur und Zirkulation. Das Ussing-System diente bei dieser Arbeit als prinzipielle Orientierung. Anhand dessen wurden schrittweise Modifikationen vorgenommen, um eine neue Messapparatur zu entwickeln, welches für die zu bearbeitende Fragestellung geeignet war.

2.6.1 Konstruktion eines neuen Kammersystems

Für die Versuche wurde eine modifizierte Ussing-Kammer verwendet. Die Glasröhrchen wurden durch zwei Steigröhrchen ersetzt, die sich in einer mit Flüssigkeit gefüllten Plexiglaskammer befand (*Zellkammer*, Abb. 4). Beide Kammern waren vollständig durch den eingesetzten Zellfilter unterteilt in ein apikales und ein basolaterales Kompartiment. Um wasserdichten Verschluss sicherzustellen wurden O-förmige *Dichtungsringe* an beiden Seiten des Filters platziert. Von jeder Kammer führte die geschlossene und seitengetrennte Zirkulationsschleife durch ein Glasröhrchen (Durchmesser 8.5 mm, Innenlänge 80 mm). Mithilfe einer Rollerpumpe (*Pumpe*) konnte eine kontinuierliche Zirkulation des Mediums gewährleistet werden, die verhinderte, dass während des Messvorgangs unmittelbar am Filter lokale Konzentrationsgradienten entstehen. Die Überprüfung des Effektes erfolgte mit dem Farbstoff Methylen-Blau. Die Perfusionsrate wurde konstant bei 20 ml/min aufrechterhalten. Die Temperatur wurde über ein *Wasserbad* kontrolliert, das mit einer optisch durchsichtigen *Wärmeisoliationsbox* verbunden war. In der kontinuierlich mit Wasser durchspülten Wärmeisoliationsbox waren die *Glasröhrchen* eingelassen.

Direkt über dem Epithel befanden sich Agarbrücken (1,8 g % NaCl = 3 g / 100 ml) für die Registrierung der epithelialen Spannung U_{epi} . Die Elektroden zur Detektion der Spannung standen in einer Lösung aus 3% KCl, in der sich die Agarbrücken befanden. Seitlich in der Kammer befanden sich die Agarbrücken zur Einspeisung von Strom, die mit einer Stromquelle verbunden waren. Zur Bestimmung des transepithelialen Widerstands R_{epi} wurde ein Rechteckstrom von $\pm 20 \mu\text{A}$ appliziert. Der R_{epi} wurde im Minutentakt registriert und mithilfe der Software (Ing. grad. D. Sorgenfrei) als fortlaufende Graphik dargestellt. Widerstand und Spannung wurden nach Ussing-Technik kontinuierlich mit Leuven-Clamp gemessen und über ein Computerinterface aufgenommen. Der Flüssigkeitspegel wurde videoptisch anhand der Position des Meniskus innerhalb der Glasröhrchen detektiert (Abb. 4).

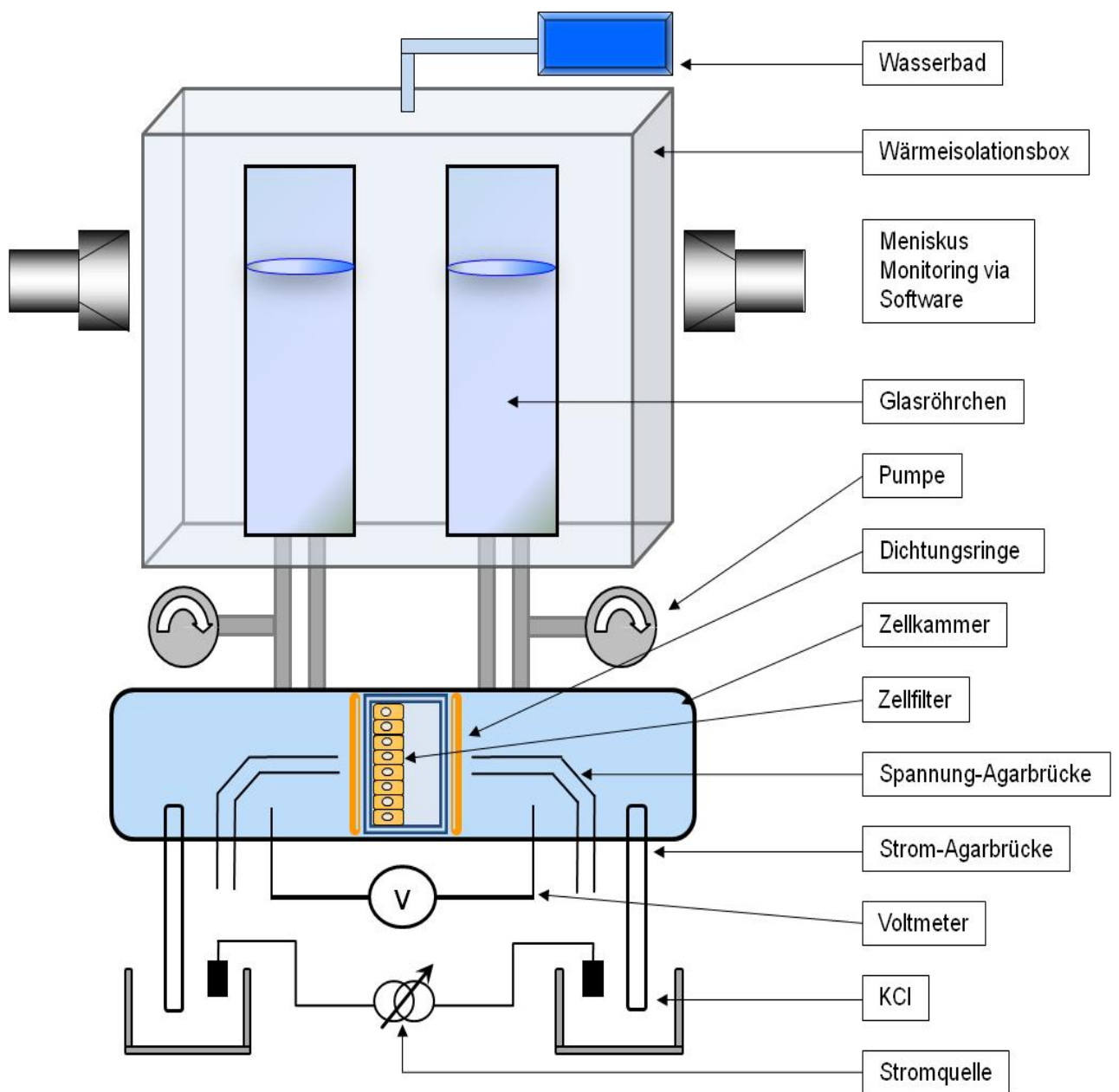


Abb. 4: Schematische Darstellung des Versuchsstands. Erläuterung der Elemente (*in Kursiv*) siehe Text.

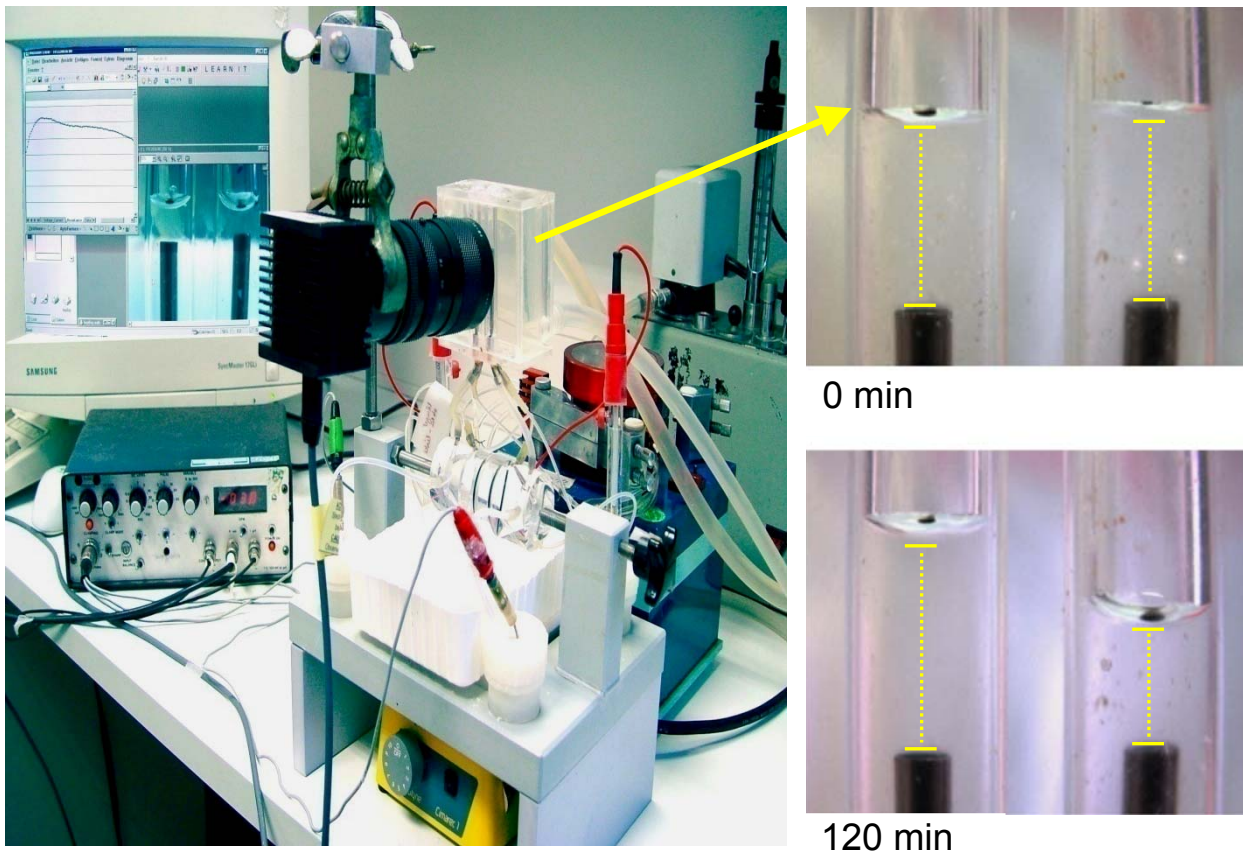


Abb. 5: Foto des Versuchsstands. Rechts sind die Menischi auf beiden Seiten des Epithels (apikal = rechts, basolateral = links) zu Beginn des Versuchs und nach 120 min dargestellt.

2.6.2 Versuchsablauf der Wasserflux-Messung

Das System wurde vor dem Versuchsbeginn auf Temperatur, Perfusionsrate und Trockenheit überprüft. Die Wasserzylinder und die Kammern wurden vor jedem Versuch mit Aqua dest. durchspült und getrocknet. Anschließend wurden die Glasröhrchen mit 2% Dichlormethylsilan dünnsschichtig silanisiert, um Ablesefehler infolge der Hysterese an der Grenzschicht Glas/Lösung zu minimieren. Die verwendete Lösung wurde jeweils ein Tag zuvor angesetzt und kühl gelagert. Am Versuchstag wurde Glucose hinzugefügt. Zur Äquilibrierung wurde die Lösung erwärmt und anschließend im Brutschrank ca. 20 min begast. Unmittelbar vor dem Versuch wurde ein Zellfilter aus der Inkubationsschale entnommen und nach vorsichtigem Abtupfen des Restmediums eingesetzt. Beide Kammersysteme wurden simultan auf optisch kontrollierten Gleichstand gefüllt. Nach Einschaltung der Transportpumpe vergingen insgesamt 10 min zur Stabilisierung des Zellkammersystems.

Der Wassertransport wurde insgesamt über 2 h gemessen, wobei alle 15 min abgelesen wurde. Aus den Differenzen der Flüssigkeitspegel wurde der Transport bestimmt. Die Sensitivität des Systems betrug 1 μ l.

Die Zellen wurden vom 7. bis zum 10. Tag nach der Aussaat auf Filtern für die Untersuchungen genutzt. Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass die Zellen ab dem 6. Tag einen konfluenten Zelllayer ausbilden.

2.6.3 Ermittlung der Versuchszeit an vitalen Zellen

Nachdem die technischen Voraussetzungen erfüllt sind, wurde in Vorversuchen die Durchführbarkeit der geplanten Experimente mit vitalen Zellen auf Zellfiltern überprüft (Daten nicht aufgeführt). Die Vitalität der Zellen konnte indirekt über einen konstanten R_{epi} und durch Stimulation mittels Forskolin am Ende des Versuchs beurteilt werden. Forskolin ist ein Wirkstoff aus dem Harfenkraut (*Coleus forskohlii*). Es aktiviert die Adenylatzyklase und erhöht den intrazellulären Spiegel von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), wodurch eine Chloridsekretion ausgelöst wird. Reagierten die Zellen auf die Stimulierung, so fällt der R_{epi} unmittelbar ab. Da die Zellen zuverlässig eine Vitalität über eine Zeit von 100 min erwiesen, wurde die Versuchszeit der durchgeführten Experimente auf 90 min beschränkt.

2.6.4 Änderung der Zusammensetzung der Standardlösung

Die für herkömmliche Ussing-Versuche verwendete laborinterne Standardlösung erforderte eine kontinuierliche Begasung zur Konstanthaltung des pH-Wert. Da die Begasung zur Verwirbelung der Flüssigkeitsoberfläche führte und ein genaues Ablesen des Flüssigkeitsspiegels erschwerte, wurde eine modifizierte Lösung verwendet. Die Bicarbonat-Pufferung (NaHCO_3) wurde durch HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure)-Puffer ersetzt.

Die modifizierte Lösung für Versuche mit Mannitol setzte sich zusammen aus (in mM): 113.6 NaCl, 10 D-Glukose, 10.59 HEPES, 2.4 Na_2HPO_4 , 0.6 NaH_2PO_4 , 5.4 KCl, 1.2 MgCl_2 , 1.2 CaCl_2 , titriert auf ein pH = 7.4 mit 1M NaOH. Die Lösung mit erhöhter Na^+ -

Konzentration hatte folgende Zusammensetzung (in mM): 130.7 NaCl, 10 D-Glucose, 10.59 HEPES, 2.4 Na₂HPO₄, 0.6 NaH₂PO₄, 5.4 KCl, 1.2 MgCl₂, 1.2 CaCl₂, 3.3 NaOH, pH = 7.4, Osmolarität 314.99 mosmol/kg. Die erniedrigte Na⁺ Lösung hat die gleiche Zusammensetzung mit Ausnahme der NaCl-Konzentration, diese betrug 33.6 mM. Der Na⁺-Gradient betrug median 88.45 mosmol. Alle Lösungen für elektrophysiologische Versuche wurden auf 37°C gebracht.

2.6.5 Vergrößerung der Transportfläche und digitale Aufzeichnung

Um ein möglichst exaktes Aufzeichnen der Transportrate zu gewährleisten, wurde das Ablesen der Messwerte im Verlauf von manuell auf ein Software-unterstütztes digitalisiertes Verfahren umgestellt.

Zur Maximierung des Transporteffektes wurden in den ersten Untersuchungen große Zellfilter verwendet. Die effektive Transportfläche betrug hier 4.2 cm². Da die Handhabung (Zellkultur, Widerstandsmessung in der Kulturphase) der großen Filter sich als schwierig erwies und die Messwerte der kleinen Filter durch die zwischenzeitlich verbesserte Ablesetechnik vergleichbar waren mit denen der großen Filter, wurde im weiteren Verlauf die Experimente auf kleinen Zellfiltern durchgeführt.

2.7 Vorexperimente an MDCK-Zellen

2.7.1 Überprüfung des Einflusses der modifizierten Versuchslösung auf die Zellkultur

Die Vitalität der Zellen in der modifizierten Versuchslösung wurde in herkömmliche Ussing-Kammern unter Versuchsbedingungen überprüft. Am Ende der Versuchszeit wurde durch Zugabe von Forskolin die Stimulierbarkeit des Epithels getestet. Über die gesamte Versuchsdauer von 90 min wurden konstante R_{epi} gemessen. Die Zellen waren über die 90 min hinaus noch stimulierbar nach basolateraler Zugabe von Forskolin.

2.7.2 Wachstumsvergleich zwischen kleinen Filtern und großen Filtern

Unter dem Lichtmikroskop wurde während der Kulturphase das konfluente Wachstum in Monolayer in Zellkulturflaschen kontrolliert, bevor die Zellen auf Zellfiltern ausgesät wurden. Der transepithelialer Widerstand wurde regelmäßig am Zellfilter gemessen. Zusätzlich wurden Immunfluoreszenzfärbungen der Zellen auf Zellfiltern durchgeführt und das einschichtige Wachstums unter dem konfokalen Mikroskop beurteilt.

2.7.3 Induktion des Vektors mit Natrium-Butyrat

Butyrat, eine kurzkettige Fettsäure, wird zur Induktion vom pcDNA-Promotor eingesetzt [93]. Um zu testen, ob mit Butyrat die Claudin-Expression erhöht und damit in Folge R_{epi} gesenkt werden kann, wurden die Zellen mit Butyrat behandelt. Dabei wurde 10 mM Na-Butyrat im erwärmten Kulturmedium gelöst und die Zellen mit diesem Medium für 10 h inkubiert. Der R_{epi} wurde stündlich dokumentiert. C7-cld2M und C7-vec wurden jeweils Butyrat zugesetzt und die Wirkung gegen Kontrollen ohne Butyratzugabe verglichen. Unter Butyrat nahm in der Gruppe C7-vec der R_{epi} ebenfalls signifikant ab. Da ein toxischer Effekt vermutet wurde und kein zusätzlich günstiger Effekt bezüglich der Claudin-Expression erkennbar war, wurden die folgenden Versuche ohne Butyrat durchgeführt.

2.7.4 Aquaporin-Inhibition

In den Hauptzellen der Sammelrohre der Niere, von denen die C7-Zellreihe der MDCK-Zellen abstammen, sind am Wassertransport apikal AQP2 und basolateral AQP3 und 4 beteiligt [94]. Silber-Sulfadiazin ist ein neuer potenter Inhibitor der AQP [95]. Um den Einfluss von AQP auf den transepithelialen Wassertransport auszuschalten, wurde Silber-Sulfadiazin verwendet. Bei Verwendung von chloridfreien Lösung zur Verhinderung des Ausfallens von Silber-Sulfadiazin, ließ sich die Substanz nicht lösen. Um Silber-Sulfadiazin in Lösung zu bringen, wurde es daher zuvor in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. DMSO dient aufgrund seiner Löslichkeit in Wasser als Lösungsmittel für die Substanz. Es kam darunter zu einem rapiden Abfall des R_{epi} , was auf die bekannte toxische Wirkung von DMSO zurückzuführen ist.

Quecksilberverbindungen sind bisher die bekanntesten Inhibitoren der AQP. Nachteile sind jedoch die Toxizität und die unterschiedliche Hemmwirkung auf einzelne AQP.

Versuche mit Quecksilberchlorid (HgCl_2) zeigten einen rapiden Abfall des epithelialen Widerstands innerhalb weniger Minuten (Daten nicht aufgeführt), so dass von einem weiteren experimentellem Einsatz Abstand genommen wurde. Zum aktuellen Zeitpunkt sind keine weiteren Substanzen als spezifische Inhibitoren der AQP bekannt.

2.8 Experimente mit Mannitol- und Natrium-Gradienten

2.8.1 Experimente mit Mannitol-Gradient

Mannitol ist ein epithelial nicht-permeables Molekül mit osmotischen Eigenschaften. Die Wirkung des osmotisch-induzierten Wassertransports wurde für C11-wt, C7-cld2M, C7-cld2H und C7-vec untersucht. Dabei wurde die höhere Konzentration abwechselnd sowohl apikal als auch basolateral appliziert. Der transepithelialer osmotische Gradient mit Mannitol betrug 100 mM.

2.8.2 Experimente mit Natrium-Gradient

Um den Effekt des Kationen-gekoppelten Wassertransports zu testen, wurde ein Gradient für Natriumionen (Na^+) angelegt. Das Na^+ ist bei Claudin-2-exprimierenden Zellen parazellulär permeabel und bewegt sich daher entlang des chemischen Konzentrationsgradienten. Zur Überprüfung des experimentellen Aufbaus und der prinzipiellen Durchführbarkeit wurde in Vorversuchen zunächst die Wirkung des Na^+ -Gradienten mit erniedrigter Konzentration auf der basolateralen Seite untersucht. Die osmotische Differenz wurde hierbei nicht ausgeglichen. Anschließend wurde die Wirkung des entgegengerichteten Na^+ -Gradienten mit einer erniedrigten Na^+ -Konzentration auf der apikalen und der höheren auf der basolateralen Seite des Epithels untersucht. Alle Versuche mit Na^+ -Gradient wurden unter Kurzschlussbedingung durchgeführt, um sekundär induzierte elektrische Gradienten zu verhindern. Dabei wurde die durch die Ionenbewegung aufgebaute Potentialdifferenz ΔU_{epi} durch externe Stromspeisung entgegengeregelt, so dass U_{epi} auf 0 gehalten wurde.

2.8.3 Experimente mit Mannitol- und Natrium-Gradient

Bei diesen Versuchen wurde die entstandene osmotische Differenz infolge der Ungleichverteilung von Natriumionen durch Mannitol äquiosmolar ausgeglichen. Um den Effekt des Na^+ -gekoppelten Wassertransports zusätzlich zu verstärken, wurde ein zusätzlicher Gradient mit 100 mM Mannitol apikal angelegt.

2.9 Elektrophysiologie

Der transepitheliale Widerstand R_{epi} wird in $\Omega \cdot \text{cm}^2$ angegeben. Für alle Werte wurde der Mittelwert errechnet und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Der Kurzschlussstromwert und der transepitheliale Widerstand bezogen auf die Fläche wurden automatisch während des gesamten Versuchs kontinuierlich registriert (*Standard PC with ADC-DAC cards*). Stromimpulse von 10 μA und 1 s Dauer wurden in 25 s Abstände appliziert, um den R_{epi} zu ermitteln. Der Leerwert der Zellkammer mit Zellfilter und der Leerwert der Lösung wurden vor jedem Versuch neu bestimmt und vom Messwert abgezogen.

2.9.1 Widerstandsmessung

Die etablierte Kurzschlussstromtechnik ist eine standardisierte In-vitro-Technik zur Messung des aktiven Ionentransports (Kurzschlussstrom I_{sc}) und die Ionenpermeabilität (Leitfähigkeit) [92]. Ein PC mit einem Mehrkanal-AD-DA-Wandler steuert einen Messverstärker, der einen Rechteckstrom generiert. Der Wandler bestimmt die transepitheliale Spannung U_{epi} und den Zustand der Elektroden in „offen“ oder „kurzgeschlossen“. Um den Kurzschlussstrom I_{sc} zu erfassen, wurde U_{epi} auf den Wert 0 im kurzgeschlossenen Kreis geklemmt. Die automatisierte Registrierung der Daten erfolgte über eine neu entwickelte Software (Ing. grad. D. Sorgenfrei). Badwiderstand und Filterwiderstand ohne Zellen sowie Asymmetriespannung der Spannungselektroden wurden vor dem Versuch gemessen und vom Messwert abgezogen. Der Rechteckgenerator speist Ströme I_1 und I_2 auf beiden Seiten des Epithels in das Kammersystem. Nach dem Ohm'schen Gesetz wurde der transepitheliale Widerstand R_{epi} errechnet aus den Potentialdifferenzen U_1 und U_2 überm Epithel:

$$U_1 = U_{\text{epi}} + R \times I_1 \text{ und } U_2 = U_{\text{epi}} + R \times I_2$$

$$R_{\text{epi}} = (U_1 - U_2) / (I_1 - I_2).$$

Dabei wurde die transepitheliale Spannung U_{epi} direkt gemessen. Der Kurzschlussstrom ergab sich aus dem Quotient:

$$I_{\text{sc}} = U_{\text{epi}} / R_{\text{epi}}$$

2.10 Molekularbiologie

2.10.1 Nachweis der Proteinexpression mittels Western-Blot-Analyse

Der Nachweis der Membranproteine Occludin, Claudin-1, 2, 3, 4 und 5 erfolgte mittels Western-Blot-Analyse. Die Reihenfolge der einzelnen Schritte war dabei:

- Membranproteinextraktion, Proteinquantifizierung, Gelelektrophorese
- Western-Blot
- Immundetektion

Zur Gewinnung der Membranproteinfraktion wurden Proteine aus Zellmonolayer, angezüchtet in Kulturflaschen, extrahiert. Die Zellen wurden nach Abgießen des Mediums mit PBS gewaschen und mit eiskaltem Lysepuffer (20 mM Tris, 5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 0.3 mM EGTA, Proteinaseinhibitoren, Complete, Boehringer, Mannheim, Germany) lysiert. Nach dem Abschaben der Zellen von dem Flaschenboden wurde die Zellsuspension zur Homogenisierung durch eine 26 G Insulinnadel 20 mal durchgezogen und in ein Eppendorfröhrchen überführt. Die Suspension wurde 5 min bei 200 g und 4°C zentrifugiert. Das Zelllysat, das dem Überstand entspricht, wurde separiert und 30 min bei 43000 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet mit den enthaltenen Membranproteinen wurde im frischen eiskaltem Lysepuffer resuspendiert

Proteinquantifizierung

Die Proteinkonzentration der Membranproteinfraktion wurde durch Messung der Lichtabsorption bei 562 nm Wellenlänge mithilfe des Plattenlesers (Tecan Spectra,

Österreich) quantifiziert. Dazu wurde das BCA (Bicinchoninsäure) Protein Assay Reagenz (Pierce, Rockford, IL, USA) verwendet. Eine Standardreihe von BSA-Lösungen bekannter Konzentration und Lysepuffer wurde zur Erstellung einer Eichkurve eingesetzt und diente als Kontrolle. Der Wert des Lysepuffers wurde vom Probenmittelwert abgezogen. Die Mikrotiterplatte mit den Proben wurde 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert und wieder auf RT abgekühlt. Die Proben wurden anschließend bei -80°C konserviert.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese – PAGE

Die isolierten Proteine wurden mit Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Ladung und Molekülgröße aufgetrennt. Die dabei angelegte Spannung bestimmt die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine durch das Gel. Die Substanzen des 12,5% Trenngels wurden vermischt, in ein Mini-Protean-Apparatur (Biorad) pipettiert und zum Polymerisieren 30 min stehengelassen. Anschließend wurde das Sammelgel über das Trenngel aufgetragen und ebenfalls 30 min polymerisieren lassen. Durch Einbringen von Kämmen ins Sammelgel entstanden Geltaschen zur Beladung mit Proteinproben. Die 25 µl Probe enthielt 20 µl Protein und 4 µl Bromphenolblau. Vor Beladung des Gels wurden die Proben 5 min bei 95°C denaturiert. Das Gel wird in Elektrophoresekammern eingesetzt, die mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt wurden. Unter konstanter Spannung von 100 V ist die Elektrophorese nach ca. 60 min beendet, wenn das Bromphenolblaufärbelösung noch ca. 1 cm vom Gelrand entfernt ist.

Western-Blot

Die aufgetrennten Proteine im Gel wurden auf Membranen als Trägermatrix geblottet, auf dessen Oberfläche sie immobilisiert sind. Eine zuvor für 5 min in Alkohol getränkte Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF) wird zusammen mit dem Polyacrylamidgel, zwei Schwämmen sowie zwei Whatman 3MM Filterpapiere 5 min lang in Transferpuffer equilibriert. Anschließend wurden die Komponenten des „Sandwiches“ nach folgendem Schema zusammengeschichtet:

- Schwamm
- Whatman-Filter

- Nylonmembran
- Gel
- Whatman-Filter
- Schwamm

Das Sandwich wurde zwischen zwei Panels platziert und in das Transferkammersystem eingesetzt. Das System wird mit Transferpuffer aufgefüllt und mit Kühlakku und Rührstäbchen vervollständigt. Während des Transfers befand sich der gesamte Aufbau auf einem Magnetrührer. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran geschah mittels einer extern angelegten Spannung von 100 V und 0.2-0.4 A für 1 h.

Immundetektion

Die Claudin-Detektion erfolgte mittels Antikörperbindung und Lumineszenzmarkierung. Der 1. Antikörper bindet an die zu detektierenden Proteine Claudin und Occludin. Der 2. Antikörper entspricht einem Anti-Antikörper, da es gegen den 1. Antikörper gerichtet ist. Erst die Bindung des Anti-Antikörpers an den Primärantikörper ermöglicht den Lumineszenznachweis. Alle primären Antikörper waren vom Zymed Laboratories Inc. (San Francisco, CA, USA).

Die Membran mit den Proteinen wurde in einer Lösung (50 ml PBS/Tween/5 % Magermilchpulver) über mindestens 2 h bei RT „blockiert“, um restliche Proteinbindestellen der Membran zu besetzen und unspezifische Bindung der Nachweisreagenzien zu verhindern. Anschließend wurde die Membran bei RT in PBS/Tween gespült und in 50 ml PBS/Tween + 5 % BSA + 0,02 % Natriumazid weitere 2 h inkubiert. Die Inkubation mit dem Erst-Antikörper (polyklonaler Anti-human oder Anti-Maus Antikörper 1:10.000) erfolgte 2 h bei RT in 50 ml PBS/Tween/5 % BSA/0,02 % NaAzid. Es folgten 2 Waschgänge mit PBS/Tween und 1 Waschgang mit TBS/Tween. Die Membran wurde mit 10 µl des mit Peroxidase konjugierten Zweit-Antikörpers in 10 ml TBST/1 % Blockier-Reagenz inkubiert für 90 min bei RT inkubiert. Nach den drei Waschschritten wie zuvor wurde die Membran in einer Küvette für exakt 5 min in 10 ml Lumi-Light-Lösung inkubiert. Die Lumineszenz-Lösung führt zur Emission von Licht durch die Peroxidasereaktion an dem Zweit-Antikörper und ermöglicht somit die Visualisierung der Proteinbanden auf der Membran. Die Lumineszenzsignale wurden mit einem Lumineszenzbildanalysator (Luminescence imaging LAS-1000,

Fujifilm, Japan) und Quantifikations Software (AIDA, Raytest, Germany) quantifiziert. Für die Densitometrie wurden die Bilder als Computerdatei abgespeichert. Die Blots wurden zur Archivierung auf Röntgenfilmen abgebildet.

2.11 Immunfluoreszenz-Färbung von Zellen auf Zellfilter

Für die Fluoreszenz-Färbung wurden Occludin, Claudin-1 und Claudin-2 immunspezifisch nachgewiesen. Die Immunfluoreszenzanalyse und die bildliche Dokumentation erfolgten wie von Weiske et al. 2001 beschrieben [96].

Konfluent bewachsene HA-Zellfilter wurden mit phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) zweimal gewaschen. Anschließend wurden die Zellfilter 15 min lang bei 35°C mit PFA 4 % (12 g Paraformaldehyd in 300 ml PBS erwärmen auf 60-70°, dann abkühlen lassen und pH 7,4 einstellen) fixiert. Die Zellfilter wurden nochmals mit PBS plus Mg²⁺/ Ca²⁺ zweimal gewaschen. Glycin wurde auf beiden Seiten der Membran zugegeben und für 5 min belassen. Danach wurde die Membran nochmals gewaschen mit PBS. Die Filter wurden mit dem Skalpell herausgeschnitten und in 8-Well Zellkulturplatte gelegt. Nach Permeabilisierung in PBS mit 0,5 % Triton X-100 (1,5 ml 0,5 % Triton-x auf 300 ml PBS lösen mit Rührer) bei RT für 10 min erfolgte wieder ein Waschschriff mit PBS. Es folgte eine 60minütige Blockierung bei RT mit 5 % Goat-Serum (1,5 ml Goat Serum auf 30 ml PBS). Die Inkubationszeit mit dem 1. Anti-Claudin-Antikörper in einer Konzentration von 20 µl / ml bei RT betrug 30 min. Es wurde eine Doppelfärbung mit Anti-Occludin-Antikörper durchgeführt. Anschließend folgte die Behandlung mit dem 2. Antikörper (*Alexa Fluor 488 goat anti-mouse und Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit* 2 µl/ml und die Markierung mit DAPI. Am Ende der Färbeschritte wurden die Filter mit Aqua dest. und Alkohol gewaschen. Die Filter wurden mit ProTaqMountFlour eingedeckt zwischen Deckgläschen gelegt und im Dunkeln aufbewahrt. Auf diese Weise halten sich die Zellen 4-6 Wochen und lassen sich unter dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Zeiss LSM510) beurteilen. Die Bildaufnahme erfolgte unter Anregung mit Licht der Wellenlänge 543 nm und 488 nm.

Zur Darstellung der Expression und der Bestimmung der Lokalisation des klonierten Claudin-Proteins wurden Doppelmarkierungen mit Claudin-2 und Occludin durchgeführt.

Da Occludin nur in den TJ exprimiert wird, ist die Überlagerung der Signale von Claudin-2 und Occludin ein Hinweis für den korrekten Einbau von Claudin-2 in den TJ.

DAPI-Färbung

Zur Nachweis der eindeutigen membranständigen Lokalisation der TJ-Proteine wurde gleichzeitig eine DAPI-Färbung durchgeführt. Der blaue Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4,6-Diamidin-2-Phenylindol-Dihydrochlorid) bildet mit DNA stark leuchtende Komplexe. Dadurch lassen sich gleichzeitig die Zellkerne darstellen, wodurch eine Differenzierung zwischen Kernsignale und Membransignale möglich wird. Das Occludin wird in die TJ-Stränge eingebaut. Im Falle der erwünschten Kolokalisation der Claudine im TJ überlagern sich die Farbsignale von Occludin (grün) mit Claudin (rot) resultierend in Orange.

2.12 Statistische Analyse

Alle Ergebnisse sind als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Die Anzahl der Einzelversuche wurde mit n bezeichnet. Die statistische Analyse wurde mittels doppelseitiger t-test nach Student für unabhängige Stichproben durchgeführt. $P < 0.05$ gilt als signifikant (n.s. = nicht signifikant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

3. Ergebnisse

3.1 Claudin-Expression

Die Expression der TJ-Proteine und insbesondere die Expression von Claudin-2 in den transfizierten Zellen wurden mit Western-Blot analysiert. Darüber hinaus erfolgte mittels Immunhistochemie und konfokalen Laser Scanning Mikroskopie die Detektion von Occludin und Claudin-2, um die Lokalisation der detektierten Proteine auf Zellebene und den korrekten Einbau von Claudin-2 in die TJ der transfizierten Zellen zu zeigen.

Western-Blot

In der Kontrollgruppe C7-vec von beiden transfizierten Zelllinien (C7-cld2M, C7-cld2H) war keine Expression von Claudin-2 detektierbar. Dagegen enthielt C11-wt und die beiden Klone C7-cld2M und C7-cld2H ein sehr deutliches Signal für Claudin-2 (Abb. 5 und 6). Die nachgewiesenen Proteine zeigten eine Bande bei ca. 22 kDa, das dem Molekulargewicht des Claudins entspricht. Occludin zeigte eine typische Doppelbande mit einer Größe zwischen 55 und 67 kDa.

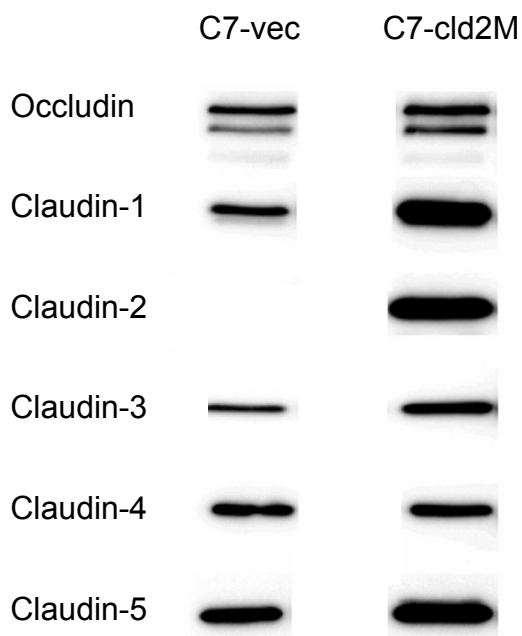


Abb. 6: Western-Blot-Analyse. Expression von Occludin und Claudin-1 bis -5 in der Kontrollgruppe C7-vec und der transfizierten Zelllinie C7-cld2M.

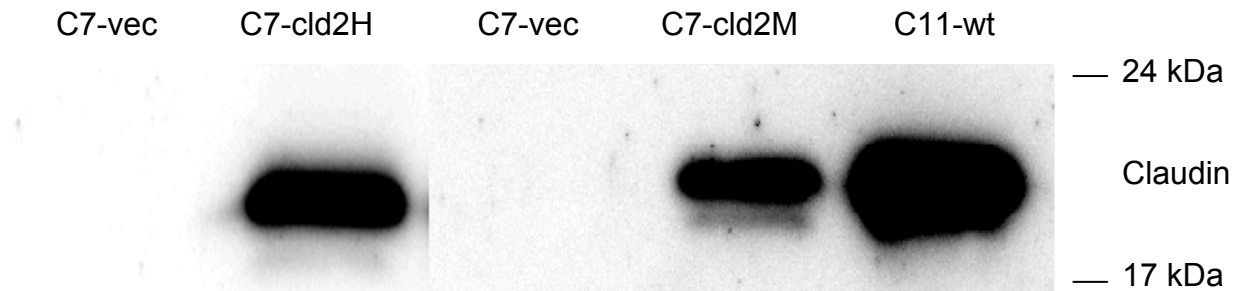


Abb. 7: Western-Blot-Analyse. Expression von Claudin-2 in der Kontrollgruppe C7-vec und der transfizierten Zelllinie C7-cld2H und den C11-wt-Zellen.

Immunfluoreszenzfärbung

Nach der Immunfluoreszenzfärbung (siehe Kap. 2.11) wurde mittels konfokaler Mikroskopie die Kolokalisation von Occludin (grün) und Claudin-2 (rot) in der TJ-Region in beiden Zellgruppen untersucht. Eine Überlagerung der Farbsignale (orange) entsprach einer Kolokalisation der detektierten Proteine. Während bei den transfizierten Zellen C7-cld2M eine Kolokalisation von Claudin-2 mit Occludin vorlag, wurde bei der Kontrolle C7-vec kein Claudin-2 nachgewiesen. Die Kernsignale in der DAPI-Färbung (nicht abgebildet) zeigten ein einschichtiges Zellwachstum.

Im Seitenanschnitt (Z-Scan) konnte die Höhenlokalisierung der Signale näher beurteilt werden. Dabei wurde eine Kolokalisation beider Proteine in der TJ ebenfalls bestätigt (Abb. 8). Ein ähnliches Ergebnis wurde mit Zellen erzielt, die mit humanem Claudin-2 transfiziert wurden.

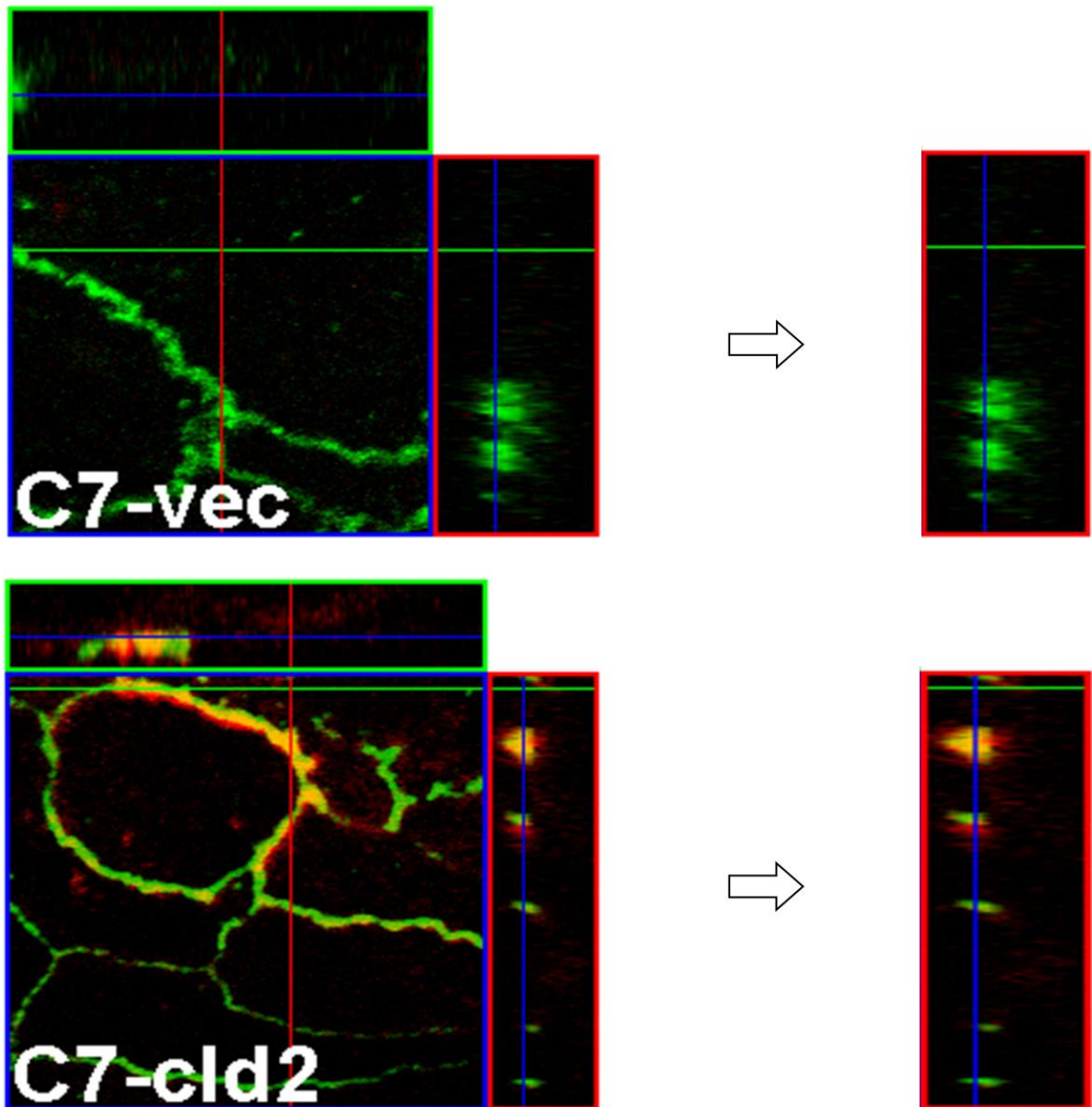


Abb. 8: Konfokale Laser Scanning Mikroskopie von der Kontrollgruppe C7-vec und der transfizierten Zelllinie C7-cld2M. Aufsicht (großes Bild) und Seitenansicht (rechteckige Bilder oberhalb und rechts). Occludin (grün), Claudin (rot), Überlagerung und Kolokalisation (orange).

3.2 Elektrophysiologie

Um den Einfluss der Claudin-2-Expression auf den transepithelialen Widerstand R_{epi} der Zellen zu analysieren, wurden die Widerstände der Zellfilter vor und während des Versuchs gemessen und die Mittelwerte ermittelt. In Abb. 8 und 9 sind die transepithelialen Widerstände von C7-cld2M und C7-cld2H den Werten der korrespondierenden Kontrolle C7-vec und C11-wt gegenübergestellt.

Während C11-wt den niedrigsten R_{epi} aufzeigte ($39.8 \pm 1.9 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n = 18$), wies die Kontrollgruppe C7-vec einen höheren R_{epi} ($2975.4 \pm 223 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n = 8$) auf als die Claudin-2-exprimierenden C7-cld2M ($1382.8 \pm 114.8 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n = 13$) (Abb. 9).

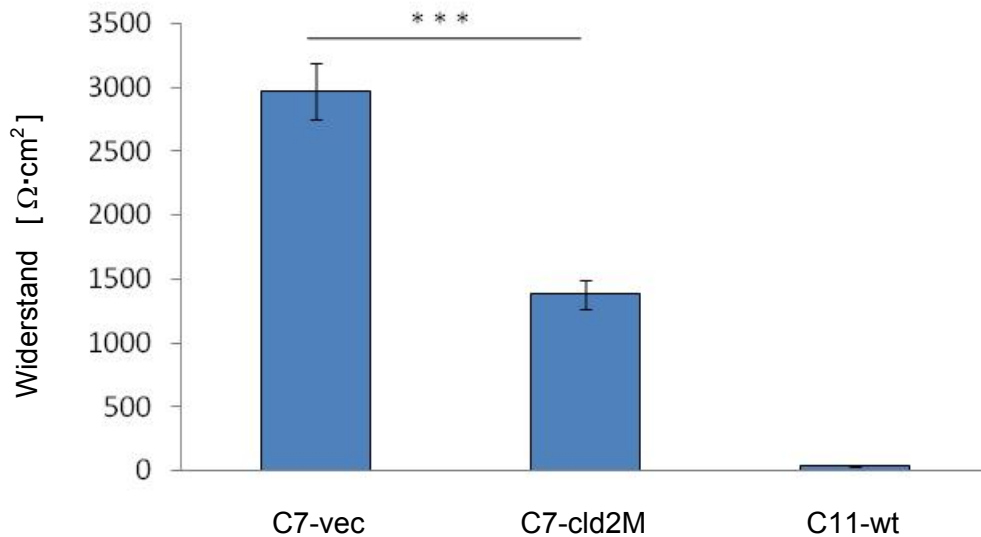


Abb. 9: Die transepithelialen Widerstände der Kontrollgruppe C7-vec und der transfizierten Zelllinie C7-cld2M im Vergleich zu C11-wt.

In der gleichen Reihenfolge stellten sich die Werte für C7-cld2H ($328.1 \pm 39.2 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n = 13$), C7-vec ($3748.4 \pm 171.8 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n = 8$) zu C11-wt ($79.5 \pm 2.2 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n = 6$) dar (Abb. 10). Dabei war das Verhältnis für R_{epi} zwischen der Kontrolle C7-vec und der Gruppe mit humanem Claudin-2 (C7-cld2H) mit Faktor 11.4 größer als das Verhältnis zwischen C7-vec und C7-cld2M mit murinem Claudin-2 (Faktor 2.2).

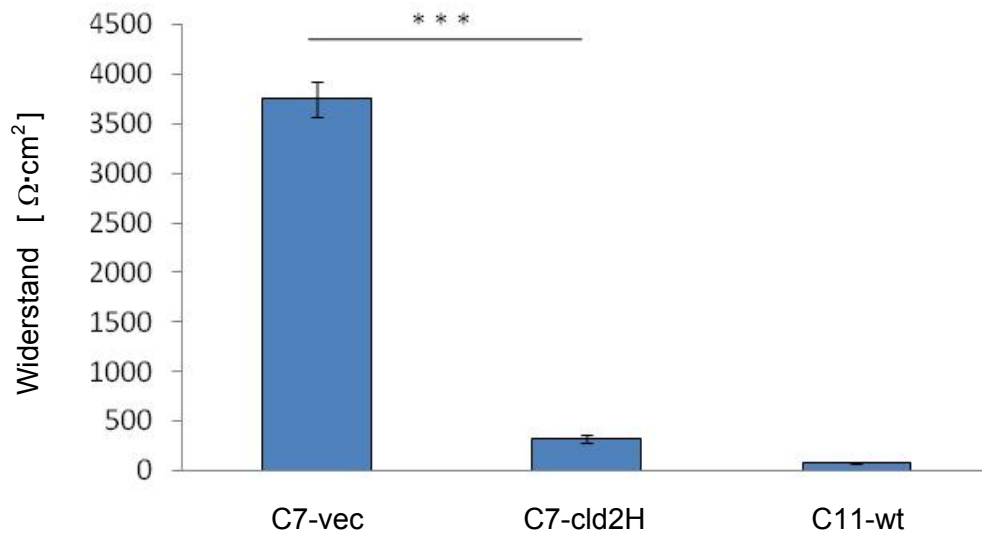


Abb. 10: Die transepithelialen Widerstände der Kontrollgruppe C7-vec und der transfizierten Zelllinie C7-cld2H im Vergleich zu C11-wt.

3.3 Wassertransport

3.3.1 Mannitol-Gradient

In den ersten Experimenten wurde der Wassertransport durch einen osmotischen Gradienten induziert. Unter der Wirkung des osmotischen Mannitol-Gradienten fiel der gemessene Wert für Wassertransport ($\mu\text{l} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) bei den niederohmigen C11-wt ($17.3 \pm 0.6 \mu\text{l} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, $n = 19$) höher aus als C7-vec ($6.8 \pm 0.9 \mu\text{l} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, $n = 8$) bzw. C7-cld2M ($5.6 \pm 0.8 \mu\text{l} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, $n = 13$). Es bestand jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den mit murinem Claudin-2 transfizierten C7-cld2M und der Kontrollgruppe C7-vec (Abb. 11). Der Wassertransport erfolgte in beiden Richtungen je nach Ausrichtung des Gradienten entweder apikal-basolateral oder basolateral-apikal und zeigte keinen Unterschied.

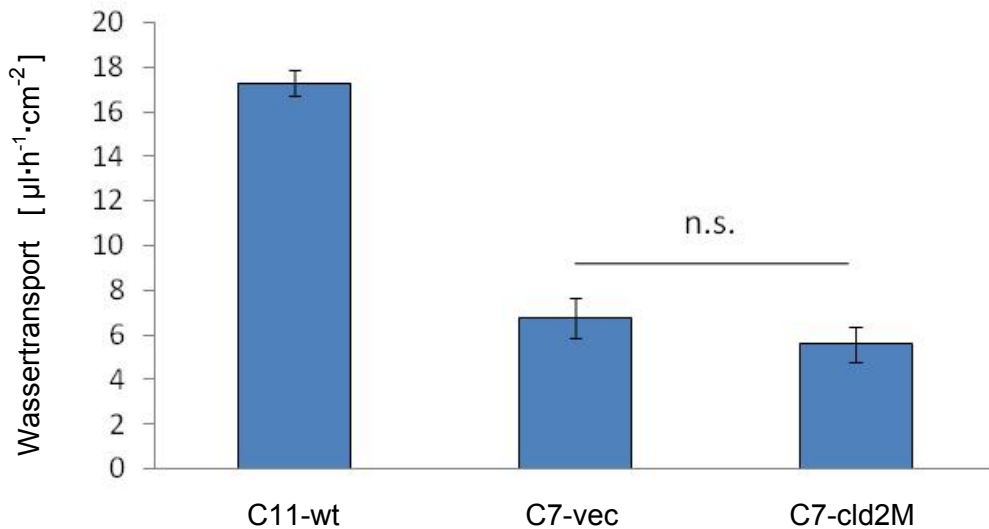


Abb. 11: Wassertransport induziert durch einen osmotischen Mannitol-Gradienten. Vergleich zwischen der Kontrollgruppe C7-vec, der transfizierten Zelllinie C7-cld2M und C11-wt.

In der nächsten Versuchsreihe wurde der Wassertransport von C7-cld2H, C7-vec denen von C11-wt und C7-wt gegenübergestellt (Abb. 12). Da sich der Wassertransport unabhängig von der Transportrichtung gleichwertig verhielt, wurde die höhere Mannitol-Konzentration einheitlich apikal appliziert.

Die Zellen C7-cld2H ($21.1 \pm 1.0 \mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, $n = 7$), die das humane Claudin-2 exprimierten, zeigten höhere Werte für den gemessenen Wassertransport als die Kontrollgruppe C7-vec ($10.6 \pm 1.1 \mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, $n = 7$) und der Wildtyp C7-wt ($7.9 \pm 1.3 \mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, $n = 7$). Die höchsten Transportwerte für Wasser wurden für C11-wt ($21.0 \pm 2.0 \mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, $n = 7$) und C7-cld2H ($21.1 \pm 1.0 \mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, $n = 7$) gemessen, gefolgt von der Kontrollgruppe C7-vec und dem korrespondierenden Wildtyp C7-wt. Die Differenz zwischen C7-vec und C7-cld2H war hoch signifikant ($*** p < 0.001$). Dagegen bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen C7-wt und C7-vec ($p = 1.68$).

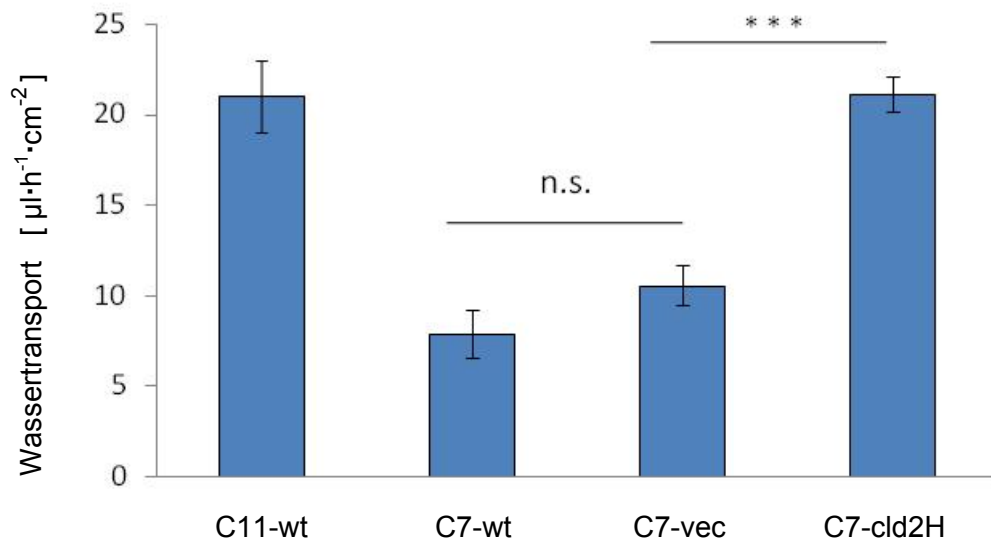


Abb. 12: Wasserflux induziert durch osmotischen Mannitol-Gradienten. Vergleich zwischen der Kontrollgruppe C7-vec, der transfizierten Zelllinie C7-cld2H und C11-wt.

3.3.2 Natrium-Gradient

Zur Klärung der Wirkung von Na^+ auf den parazellulären Wassertransport wurde ein Na^+ -Gradient angelegt. Wie bereits unter 2.8.2 (S. 29) erläutert, erfolgte zunächst am C7-cld2M die Untersuchung mit der höheren Na^+ -Konzentration auf der apikalen Seite. Dabei wurde die entstandene osmotische Differenz nicht ausgeglichen.

Die Untersuchung zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied im Wasserflux zwischen der Vektorkontrolle C7-vec ($6.5 \pm 0.3 \mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, $n = 11$) und dem Klon C7-cld2M ($6.4 \pm 0.5 \mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, $n = 10$) (Abb. 13).

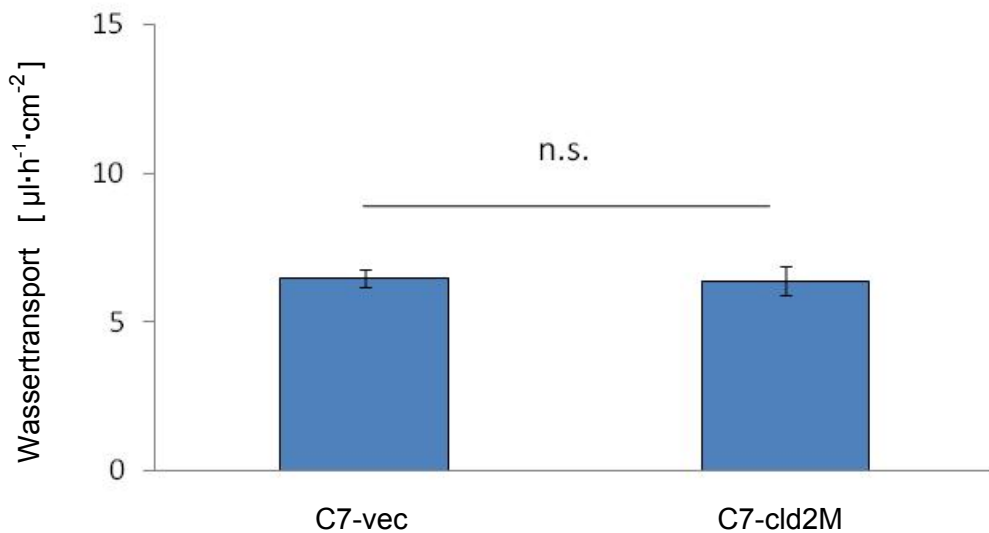


Abb. 13: Wasserflux induziert durch kationischen Natrium-Gradienten. Vergleich zwischen der Kontrollgruppe C7-vec und der transfizierten Zelllinie C7-cld2M.

3.3.3 Natrium-Mannitol-Gradient

Im nächsten Ansatz wurde der durch die höhere Na⁺-Konzentration auf der basolateralen Seite induzierte osmotische Gradient zunächst durch 160 mM Mannitol ausgeglichen. Der Effekt des Ionengradienten wurde nun zusätzlich kombiniert mit einem osmotischen Gradienten durch Zugabe von 100 mM Mannitol auf der Seite der höheren Na⁺-Konzentration.

Hierunter kam es zu einem deutlichen Effekt bei den Zellen C7-cld2H ($38.2 \pm 5.0 \mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, n = 11). Der Wassertransport unterschied sich von C7-cld2H zu C7-vec ($10.2 \pm 1.5 \mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, n = 8) um Faktor 3.7 (***) p < 0.001). Dabei zeigte sich, dass der Wassertransport von C7-cld2H vergleichbar war mit C11-wt ($48.6 \pm 2.5 \mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, n = 11, * p < 0.05) (Abb. 14). Wie bereits zuvor unter Mannitol-Gradienten wurde auch hier beim kombinierten Natrium-Mannitol-Gradienten kein signifikanter Unterschied zwischen C7-wt ($12.6 \pm 1.1 \mu\text{l}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, n = 8) und C7-vec festgestellt (p = 0.20).

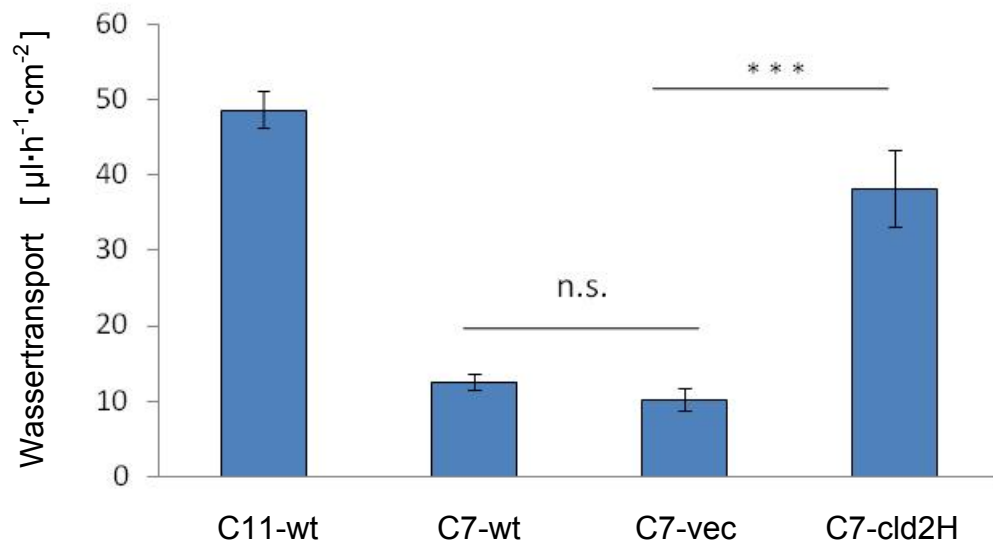


Abb. 14: Wassertransport unter kombiniertem Natrium-Mannitol-Gradienten.

4. Diskussion

Die epitheliale Wasserresorption ist ein essentieller physiologischer Vorgang zur Aufrechterhaltung des Flüssigkeitshaushalts im menschlichen Organismus. Der Fokus lag bisher überwiegend auf der Aufklärung von Mechanismen, die in der Zellmembran lokalisiert sind (SGLT, AQP). In den bisherigen Arbeiten über den parazellulären Wassertransport fanden die molekularen Gegebenheiten der TJ keine ausreichende Berücksichtigung. Kovbasnjuk et al. berichteten 1998, dass die TJ der MDCK-Zellen nicht durchgängig sind für Wasser [78]. Die zitierte Arbeit erfolgte jedoch damals zu einem Zeitpunkt, als molekulare Einzelheiten der TJ noch nicht vorlagen. Candia et al. berichteten 2006 während der Messung des transzellulären Wasserfluxes an Ussing-Kammern, dass ein unbekannter Anteil des Wasseraustauschs parazellulär stattfinden könnte [97]. Claudin-2 ist ein vorwiegend in lecken Epithelien exprimiertes TJ-Protein, welches eine parazelluläre Pore mit Eigenschaften eines Kanals ausbildet. Mit der neuen Kenntnis über die Struktur und Funktion der Claudine stellt sich erneut die Frage, wie und in welchem Ausmaß ein parazellulärer Wassertransport stattfindet. In der vorliegenden Arbeit wird anhand einer für diese Fragestellung entwickelten und etablierten Messvorrichtung gezielt dieser Frage nachgegangen.

In dieser Arbeit fand ein experimenteller Vergleich zwischen Zellen statt, die sich bezüglich der Proteinzusammensetzung der TJ durch ein einziges Claudin, dem Claudin-2, unterscheiden. Es konnte gezeigt werden, dass Claudin-2 exprimierende Zellen einen höheren transepithelialen Wassertransport aufweisen als Kontrollzellen.

4.1 Optimierung des Versuchsaufbaus

Das Ussing-System ist eine standardisierte Methode zur Untersuchung von epithelialen Transportprozessen. Eine Reihe von Modifikationen war erforderlich, um die quantitative Erfassung des Wassertransports auf der Basis der Ussing-Kammer zu ermöglichen. Dabei wurde die Auflösung des Systems Schritt für Schritt auf das erforderliche Niveau optimiert. Zunächst wurde die effektive Transportfläche vergrößert. Später erfolgte dann eine Maximierung der Auflösung über Verringerung des Querschnittes der Glasröhrchen. Hierdurch wurde gleichzeitig auch die Verdunstungsfläche minimiert. Die Zirkulation der Perfusionslösung findet mithilfe der

Rollerpumpe statt. Von Anfang an wurde an der synchronen Messung auf beiden Kammerseiten festgehalten, da auf diesem Weg eine doppelseitige Kontrolle möglich ist und ein anderweitiger Flüssigkeitsverlust ausgeschlossen wurde. Zwischen jedem Versuch wurde das System sorgfältig gereinigt und getrocknet, da minimale Flüssigkeitsreste das Messergebnis verfälschen würden. Ein optisch durchlässiges Medium war unerlässlich für die Ausmessung des Flüssigkeitsmeniskus. Um periodische Schwankung der Pumpleistung auszuschließen, wurde bei der Messung die relative minimale Position des Meniskus unter niedrigster Förderrate genommen. Da eine kontinuierliche Umwälzung des Mediums in den Kammern stets gegeben war, ist ein Effekt durch „unstirred layer“ zu vernachlässigen [97].

4.2 Expressionsstudien an Zellkultur

MDCK-Zellen dienen als Standardzellmodell für Untersuchung von Epithelien. Sie bilden zuverlässig einen Monolayer, der für die Erfassung der epithelialen Transportprozesse Voraussetzung ist. MDCK-C7-wt stammt aus dem Sammelrohr der Hundeniere. Native Zellen, wie die in der Arbeit verwendeten C7-wt, exhibieren einen hohen transepithelialen Widerstand. C7-Zellen repräsentieren die höherohmigen Hauptzellen der Niere ($R_{\text{epi}} \geq 1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$) während MDCK-C11-wt die niederohmigen Zwischenzellen darstellen ($R_{\text{epi}} \sim 50 \Omega \cdot \text{cm}^2$) [91]. In der Niere sind Hauptzellen resorptiv, die Zwischenzellen sekretorisch tätig [98]. In der Western-Blot Analyse wurde in MDCK-C7-wt kein Vorkommen von Claudin-2 nachgewiesen. Dieser Befund stimmt mit Untersuchungen an in vivo Präparaten der Niere überein [46]. Mit der Expression von Claudin-2 sank der R_{epi} in diesen Zellen der beiden Klone C7-cld2M und C7-cld2H deutlich ab im Vergleich zur Kontrollgruppe C7-vec. Dabei war der R_{epi} von C7-cld2H um Faktor 11.4 niedriger und der Wassertransport unter dem Mannitol-Gradienten um Faktor 2.0 und unter dem kombinierten Mannitol-Natrium-Gradienten um Faktor 3.7 höher als die Kontrolle. Der epitheliale Widerstand als kennzeichnender Parameter für die Permeabilität des Epithels lässt indirekt Rückschlüsse bezüglich der Stärke der Claudin-2-Expression an den hier untersuchten Zellen C7-cld2M und C7-cld2H zu.

Da die Transfektion mit dem leeren Vektor und die Expression des Vektors möglicherweise Zelleigenschaften verändert, wurde die Vektorkontrolle C7-vec ebenfalls mit den C7-Zellen vom Wildtyp (C7-wt) verglichen. Dazu wurde der

Wassertransport von C7-wt für Versuche mit Mannitol-Gradienten und Natrium-Mannitol-Gradienten jeweils parallel gemessen, um zu verifizieren, dass die Vektorexpression keinen Einfluss auf die Funktion der C7-Zellen des Wildtyps hat. Hierbei zeigte sich in beiden Versuchsreihen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen C7-vec und C7-wt bestand.

Überexpressionsstudien von Claudinen finden gegenwärtig in Zelllinien statt, die bereits endogen TJ-Proteine exprimieren. Um zu gewährleisten, dass ausschließlich die Zellen zum Messergebnis beitragen, die tatsächlich das transfizierte Protein enthielten, fand eine Selektion statt. Dazu diente das Aminoglykosid Geneticin (G418). Sowohl der leere Vektor in der Kontrollgruppe als auch der Claudin-2 Vektor enthielten das Gen für die Antibiotikaresistenz. Durch Zugabe von G418 in das Medium beider Zellkulturen wurde das Wachstum der nicht transfizierten Zellen unterdrückt. Die überlebenden Zellen stellen somit die Fraktion der erfolgreich transfizierten Zellen dar. Außerdem verhindert G418, dass der Vektor ausgeschleust wird. Trotz dieser Vorkehrung ist die Interpretation der Ergebnisse aus Studien an Zellen mit Proteinüberexpression nicht unproblematisch [57, 99]. Zur Untersuchung von Claudin auf die parazelluläre Permeabilität wird in der Regel ein Claudin in einer Einzelzellschicht überexprimiert. Umgekehrt können einzelne Claudinisoformen gezielt ausgeschaltet werden durch *knock-out* [39]. Die epitheliale Veränderungen werden mittels Fluxstudien und elektrophysiologische Techniken evaluiert. Es ist jedoch denkbar, dass die Manipulation und Veränderungen der Zellen einen metabolisch belastenden und pathophysiologischen Einfluss haben könnten. Daher wurde die Entwicklung der Zellen insbesondere während der Wachstumsphase anhand des R_{epi} regelmäßig verfolgt. Die messbaren Parameter des Zellklons reflektieren das resultierende Verhalten aller parazellulär beteiligten Proteine zu einem bestimmten Zeitpunkt. Für eine korrekte Interpretation ist daher die Beurteilung der anderen TJ-Proteine und deren Interaktion untereinander notwendig. Es ist nicht bekannt, ob die überexprimierten Claudine andere Komponente der TJ ersetzen oder sich ergänzend den endogenen TJ Strukturen hinzufügen. Am Beispiel von Claudin-8 zeigten Angelow et al., dass die Überexpression zu einer reduzierten Genexpression und zur Downregulation von Claudin-2 führt [57]. Es wird anstelle von Claudin-2 in die Membran eingebaut, wodurch die Zahl der Kationenporen abnimmt und die epitheliale Kationen-Barriere verstärkt wird [100]. Hier konnte die Beeinflussung der Expressionsmuster anderer bekannter Claudine

ausgeschlossen werden [62]. Im Falle von Claudin-2 wird berichtet, dass die Anzahl der TJ-Stränge infolge einer Überexpression nicht verändert ist [66]. Die Expression anderer Claudine ist ebenfalls unverändert [62]. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der Wassertransport ein auf Claudin-2 zurückzuführender Effekt ist. Es ist dennoch möglich, dass das eingeführte Protein über andere bisher unbekannte Mechanismen die Funktion der endogenen TJ-Proteine beeinflusst und die resultierende parazelluläre Leitfähigkeit erhöht [62]. Ferner wäre denkbar, dass die Claudin-2-Expression die Expression der AQP verändert. Kawedia et al. berichteten, dass durch das gezielte Ausschalten von AQP5 in Zellen der Speicheldrüsen, die parazelluläre Permeabilität abnimmt. Dabei wurde eine reduzierte Expression der Tight Junction Proteine Claudin-7, -3 und Occludin festgestellt [101].

4.3 Claudin-2 und Wassertransport

Claudine sind die wesentlichen Determinanten des parazellulären Transports. In den Strängen paaren sich jeweils zwei Claudine aus den adherenten lateralen Membranen zu einem homo- oder heterotypischen Dimer [10]. Der Zwischenraum innerhalb der Dimere entspricht diesen Poren (Abb. 3). Claudin-2 induziert die Bildung von Poren. Im Fall von Claudin-2 stellen sie Ionenkanäle dar, die selektiv kleine Kationen durchlassen. Claudin-2 bestimmt somit wesentlich die parazelluläre Kationenpermeabilität. Die parazelluläre Leitfähigkeit erhöht sich durch Claudin-2 auf das 5.6fache, aber bleibt unverändert für Mannitol (MW 184 Da), Laktulose (MW 342.5 Da) und Dextran (MW 4 kDa) [62]. Die Größenbarriere für ungeladene Moleküle betrug maximal 182 Da. Daher war eine parazelluläre Passage von Na^+ jedoch nicht für Mannitol möglich.

Es ist allgemein akzeptiert, dass Wasser transmembranär direkt durch die Lipiddoppelschicht oder via spezialisierte Proteine passieren kann. Dabei unterliegt die Passage durch die Lipidbarriere weniger einer Regulation im Vergleich zum Transport via Membranroteine [97]. Verkman et al. argumentierten, dass die Passage von Wasser durch die Lipidschicht im Vergleich zu proteinvermittelten Transport über APQ wesentlich geringer ist aufgrund einer höheren Aktivierungsenergie [102]. Der transepithelialer Wassertransport im Organismus erfolgt passiv. Die treibende Kraft ist ein elektrochemischer Gradient, der durch die Aktivität von membranären Transportern generiert wird [78]. Im Nephron findet man Claudin-2 in der Bowman-Kapsel, im

proximalen Tubulus und in der dünnen absteigenden Henle-Schleife [46]. Die äußerst selektive Expression von Claudin-2 unterstreicht den funktionellen Beitrag des Proteins zur parazellulären Leckheit des Epithels. Kennzeichnenderweise ist Claudin-2 in niederohmigen C11-wt Zellen exprimiert, jedoch nicht in hochohmigen C7-wt. Der Wasserflux in C11-wt Zellen betrug das 2.7fache der C7-wt unter dem Mannitol-Gradienten. Eine naheliegende Ursache könnte die Expression von Claudin-2 sein. Weitere Untersuchungen zum Wassertransport bei C11-wt gibt es bisher nicht. Es existieren extensive Arbeiten, die die Mechanismen des transzellulären Flüssigkeitstransports untersuchen [103-105]. Neben AQP wurde für weitere membranäre Transportproteine wie der Glucosetransporter GLUTS, Natrium-Glucose-Symporter (SGLT) und ein spezifischer Chloridkanal (CFTR) auch ein Wassertransport berichtet [106-108]. SGLT ist ein gut untersuchtes Beispiel für transzelluläre Wassertransport, der auch unabhängig vom Gradienten stattfindet [109, 110]. Ionenkanäle wie der CFTR sind in der Lage, auf getrennten Wegen Elektrolyte und Wasser durch den Kanal zu transportieren, die sich unterschiedlich inhibieren lassen [111, 112].

4.4 Beeinflussung und Regulation des Wassertransports

Als Antrieb für den parazellulären Wassertransport dienten in dieser Arbeit ein osmotischer und ein ionaler Gradient. Mannitol ist ein kleines ungeladenes Zuckeralkohol und dient als Standardmarker für den parazellulären Transport, da es weder membrangängig ist noch transzellulär transportiert wird. Aus der Arbeit von Amasheh et al. 2002 war bekannt, dass die TJ-Barriere der mit Claudin-2 transfizierten Zellen nicht permeabel sind für Mannitol [62]. Daher wurde Mannitol als Substanz für den osmotischen Gradienten eingesetzt. Klinisch findet Mannitol aufgrund seiner osmotischen Wirkung als Osmodiuretikum Einsatz. Es wird im menschlichen Körper nicht metabolisiert. Physiologisch wird es nach intravenöser Applikation renal filtriert und weder sezerniert noch resorbiert.

Da ein osmotischer Ausgleich des Gradienten durch Diffusion von Mannitol bei den Versuchen in dieser Arbeit nicht zu erwarten ist, folgt Wasser passiv zum Ort der höheren Mannitolkonzentration. Unter einem osmotischen Gradienten von 100 mM Mannitol nahm der messbare Wassertransport zu je niedriger der transepithelialer

Widerstand der Zellen ausfiel. Obwohl C7-cld2M und C7-cld2H beide im Western-Blot ein Signal für Claudin-2 zeigten, konnte nur für die deutlich niederohmigeren C7-cld2H ein signifikanter Wassertransport festgestellt werden.

Da die durch Claudin-2 induzierte parazelluläre Pore eine selektive Permeabilität für Kationen besitzt, stellte sich die Frage, ob durch einen Kationengradienten ein Wassertransport induziert werden kann. Die Vorstellung dabei ist, dass durch die passive Diffusion von permeablen, osmotischen Soluten Wasser über den „solvent drag“ Mechanismus mittransportiert wird [72]. Da unter physiologischen Bedingungen in der Niere Na^+ ausschließlich resorbiert wird über transzelluläre Mechanismen, besteht für das Na^+ dem chemischen Gradienten folgend nur die parazelluläre Route, um auf die apikale Seite zu gelangen. Um den prinzipiellen experimentellen Aufbau und die Durchführbarkeit zu überprüfen, fanden die ersten Versuche zunächst an großen Zellfiltern mit C7-cld2M statt. Dabei zeigte sich, dass sehr negative Potentiale entstehen, die in den großen Kammern aufgrund technischer Probleme nicht auf 0 mV geklemmt werden konnten. Daher wurden für die weiteren Versuche mit C7-cld2H wurden ausschließlich kleine Filter verwendet. Der deutlich niedrigere R_{epi} von C7-cld2H im Vergleich zu C7-cld2M war ausschlaggebend, weshalb für weitere Experimente ausschließlich C7-cld2H verwendet wurde. Wegen des bekannten Zusammenhangs zwischen R_{epi} und der Permeabilität des Epithels, konnte vermutet werden, dass der niedrigere R_{epi} infolge einer höheren Expression von Claudin-2 zu erklären ist. Da für C7-cld2H bereits unter Mannitol ein deutlicher Wassertransport zu verzeichnen war, wurde ein zusätzlicher Mannitol-Gradient apikal appliziert, um den messbaren Effekt maximal zu steigern. Der Wassertransport unter der Wirkung des kombinierten osmotisch-kationischen Gradienten betrug für C11-wt, C7-vec und C7-cld2H im Mittel das 1.7fache des Wertes unter Mannitol allein. Unidirektionale Wasserfluxe von basal nach apikal wurden gemessen unter Kurzschließen des Stromkreises beider Epithelseiten. Auf diese Weise wurde ein passiver elektrischer Gradient ausgeschaltet, der mit der Sekretion von geladenen Na^+ sekundär entsteht. Ein solcher Gradient würde als zusätzlicher Antrieb für weitere elektrogene Transportprozesse dienen. Mit jedem passierten Na^+ wird auf der Gegenseite über die Strombrücken ein Ion, das gegengerichtet geladen ist, eingespeist.

Insgesamt zeigen die Versuche dieser Arbeit, dass die Expression von humanem

Claudin-2 in hochohmigen MDCK-C7-Zellen eine deutliche Steigerung des Wasserflusses bewirkt. Ob das Wasser direkt parazellulär transportiert wird, oder die Expression von Claudin-2 die Expression anderer zellulärer Proteine wie z.B. der AQP verändert, vermag aufgrund der bisherigen Ergebnisse nicht postuliert werden.

4.4.1 Einfluss von ADH auf den Wasserfluss

Das antidiuretische Hormon (ADH), auch Vasopressin genannt, ist ein Peptidhormon. Physiologisch bewirkt ADH den Einbau von AQP2 in die Zellmembran, wodurch eine Wasserresorption im distalen Tubulus und im Sammelrohr der Niere ermöglicht wird. Um einen zusätzlichen Effekt von ADH auf den Wassertransport an C7-cld2M zu testen, wurden Vorversuche durchgeführt. Es konnte keine Wirkung von ADH im hier beschriebenen Versuchsaufbau verzeichnet werden (Daten nicht aufgeführt). Aus der Literatur ist bekannt, dass ADH keinen Effekt auf die parazelluläre Permeabilität ausübt. Der Flux von Sucrose, Insulin oder Mannitol änderte sich unter Wirkung von ADH nicht [113].

4.4.2 Aquaporine und deren Inhibition mit Quecksilberdichlorid und Silber-Sulfadiazin

Bisher bekannte renal exprimierte AQP sind AQP1, 2, 3, 4, 6 und 7 [114, 115]. Das AQP1 ist konstitutiv im proximalen Tubulus und in der absteigenden Henle vorhanden, sowohl apikal als auch basolateral, während kein AQP1 in der aufsteigenden Henle und im Sammelrohr immunologisch nachgewiesen wurde [116]. Es soll bis zu 90% zur Reabsorption des glomerulären Filtrates beitragen [107].

Eine Beteiligung der AQP am gemessenen transepithelialen Wassertransport ist wahrscheinlich. In den Hauptzellen der renalen Sammelrohre kommen AQP2, 3, 4 und in den Zwischenzellen AQP6 vor. Dabei befindet sich AQP2 apikal und AQP3 und 4 basolateral. AQP2 und 4 sind selektiv für Wasser, während AQP3 und 6 auch permeabel für kleinere Solute sind wie Glycerol (AQP3) und eventuell Chlorid (AQP6) [2, 117]. Die Permeabilität für Wasser ist je nach AQP ebenfalls unterschiedlich [118]. Obwohl die C7-Zelllinie den Hauptzellen und die C11-Zelllinie den Zwischenzellen ähneln, ist bisher nicht untersucht, welche AQP in den jeweiligen MDCK-Zellen nativ

vorhanden sind. Bis auf das über ADH induzierbare AQP2, unterliegen alle AQP eher der transkriptionale Regulation. Zusätzlich kann die Hypertonizität des Kulturmediums ebenfalls den transzellulären Transport beeinflussen. Die Exposition von MDCK-Zellen in hypertone Medien aus Raffinose oder NaCl führte zur Upregulation der Expression von AQP3 [94]. Eine andere Arbeit zeigte, dass der Transporter für Taurin, ein intrazelluläres Osmolyt, das zur Volumenregulation beiträgt, auf der Ebene der mRNA hochreguliert wird, wenn MDCK-Zellen in hypertone Medien kultiviert werden [119]. Obwohl diese Effekte durch den experimentellen Zugang in dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden können, ist der signifikante Unterschied im gemessenen Wassertransport zwischen den Claudin-2-transfizierten Zellen und der korrelierenden Vektorkontrolle vermutlich auf die Funktion von Claudin-2 zurückzuführen, das parazellulär nicht nur eine Pore für kleine Kationen bildet, sondern auch für Wasser permeabel ist.

Um die Beteiligung von AQP an dem gemessenen Wasserflux zu evaluieren, wurden Versuche mit einem bekannten AQP-Inhibitor, Quecksilberdichlorid (HgCl_2), durchgeführt. Die Substanz wurde zunächst ab Versuchsbeginn zur Badlösung hinzugegeben. Da die bereits in der Literatur ausführlich dokumentierte Toxizität [97, 120] bereits innerhalb 3-5 min zu einem rapiden Abfall des R_{epi} auf nicht messbare Werte führte, wurde in den nachfolgenden Versuche HgCl_2 erst nach 30 min hinzugegeben. Auch hier zeigte sich die Toxizitätswirkung unmittelbar nach Zugabe. Selbst ein messbarer Anstieg des Wasserfluxes unter HgCl_2 ist vor dem Hintergrund, dass ein Verlust der Vitalität der Zellen bewirkt wird und sich einzelne Zellen aus dem Monolayer herauslösen könnten, nicht eindeutig interpretierbar.

Auf der Suche nach neuen Inhibitoren für Versuche an lebenden Zellen, die eine günstigere Hemmwirkung besitzen und gleichzeitig weniger toxisch sind, fand sich eine einzige Arbeit mit Silberverbindungen [95]. Nach Zugabe von Silber-Sulfadiazin sank der epitheliale Widerstand ebenfalls rapide ab. Die Ermittlung des R_{epi} gestattet die Kontrolle der Membranintegrität und damit indirekt der Vitalität der Zelle. Der Abfall von R_{epi} ist am ehesten auf den zytotoxischen Effekt von DMSO in der erforderlichen Konzentration zur Lösung des Inhibitors zurückzuführen. Dies war auch der Fall, wenn DMSO allein zur Versuchslösung gegeben wurde. DMSO gehört zu den dipolaren Lösungsmitteln. Es wird aufgrund seiner chemischen Eigenschaften zur Lösung von

organischen Substanzen verwendet [121]. Die zytotoxische Wirkung beruht unter anderem auf der Eigenschaft von DMSO biologische Membran zu penetrieren und zusätzlich die Membranpassage anderer toxischer Moleküle zu fördern [122].

Die dritte Gruppe an AQP-Inhibitoren sind quartenäre Tetraethylammonium-Verbindung (TEA) [123]. Positive Inhibition wurde für AQP1, 2 und 4 berichtet [124, 125]. Es lassen sich jedoch auch Arbeiten finden, die eine inhibitorische Wirkung auf AQP nicht nachweisen konnten [126, 127]. Aufgrund der diskrepanten Datenlage wurde diese Substanzgruppe nicht getestet. Ein Nachteil, der potentiellen AQP-Inhibitoren gemeinsam betrifft, ist, dass eine Inhibition nicht für alle AQP nachweisbar ist und die Ausprägung der Inhibition ebenfalls in Abhängigkeit vom Subtyp der AQP variiert. Da eine Inhibition der AQP nicht möglich ist, sollte in weiteren Versuchen geklärt werden, ob die Expression von Claudin-2 in C7-Zellen einen Einfluss auf die Expression der AQP hat. Diese Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen.

4.5 Parazelluläre Pore

Über Struktur, Funktion und Regulation von parazellulären Poren ist zurzeit wenig bekannt. Bisher dienen in erster Linie Modelle zur Erklärung von Poreneigenschaften [56, 83]. Drei Parameter charakterisieren die Beschaffenheit einer parazellulären Pore: Größe, Form und die elektrostatische Interaktion. Über verschiedene denkbare Wege lassen sich diese Eigenschaften modifizieren: Downregulation von geladenen Claudinen, Einführung von neutralen Claudinen und die sterische Modifikation der extrazellulären Claudin-Schleifen über Phosphorylierung des intrazellulären COOH-Terminus. Eine weitere Dimension ist die zeitliche dynamische Änderung der Poreneigenschaften. Auf diese Untersuchungsmöglichkeiten wurde in dieser Arbeit nicht näher eingegangen. Sie stellen jedoch weitere experimentelle Ansätze dar, die helfen können, Details des parazellulären Transports aufzuklären. Auch die Gesamtanzahl der funktionsbereiten Poren muss berücksichtigt werden. So kann zum einen die Anzahl der verfügbaren Poren pro Fläche verändert sein oder ein Teil der Poren befindet sich in einem geschlossenen Zustand. Unter dem Mechanismus des *gating* werden Konfigurationszustände von Proteinen verstanden, die zu einem Öffnen oder Schließen der Pore führen. Der Wechsel zwischen den Zuständen kann ligandengesteuert (z.B. muskulärer Acetylcholin-Rezeptor) oder

membranspannungsabhängig (z.B. Natriumkanal) erfolgen. Bisher liegen keine Angaben über einen möglichen *gating*-Mechanismus oder über die Dichte der Claudin-2 Poren vor. Ein wesentlicher Unterschied zwischen konventionellen membranären und junktionalen Poren ist die räumliche Anordnung. Erstere sind senkrecht in die Zellmembran eingelassen und durchqueren die Lipiddoppelschicht. Letztere dagegen ordnen sich parallel zur lateralen Membran an ohne die Phospholipidschicht zu durchbrechen. Durch die Paarung der sich gegenüberliegenden TJ-Proteine können dimere und oligomere Poren entstehen [10]. Auch im Falle von Claudin-2 wäre eine solche Konfiguration möglich. Für Claudin-2 wurde bisher eine Paarung mit Claudin-3 nachgewiesen, aber nicht mit Claudin-1 [10]. Möglicherweise wurde durch die Claudin-2-Expression das Paarungsmuster der nativen TJ-Proteine oder die Expression anderer TJ-Proteine ebenfalls beeinflusst und hierdurch die parazelluläre Permeabilität im Vergleich zur Vektorkontrolle verändert.

4.6 Wasserpermeabilitätsmessung

Die vorliegende Arbeit stellt den ersten Ansatz dar, den transepithelialen Wassertransport unter Modulation des parazellulären Weges zu messen. Weitere Versuche sind für eine Beurteilung des einflussnehmenden Anteils von AQP und anderer Claudine notwendig. Ozu et al. [89] demonstrierten, dass in Abwesenheit von AQP der Wassertransport parazellulär lokalisiert ist. Zusätzlich wurde die These unterstützt, dass Wasserdurchlässigkeit nicht notwendigerweise mit elektrischer Leckheit (R_{epi}) korreliert.

Mit dem hier etablierten technischen Aufbau sind Wasserflux-Messungen am vitalen Epithel möglich. Die Ergebnisse dieser Arbeit können Anregungen zu weiteren experimentellen Untersuchungen geben. Bei fehlender Möglichkeit zur Inhibition der AQP wäre die Verwendung von AQP-freien Epithelien denkbar. Ebenfalls notwendig ist die Aufklärung, ob die Claudin-Expression die Expression der AQP beeinflusst. Die Kenntnis der genauen Mechanismen des parazellulären Wassertransports kann klinisch dazu beitragen, die Rehydratationstherapie zu verbessern und deren Effektivität zu steigern. Das detaillierte Verständnis über die Steuerbarkeit der Passage von Molekülen interzellulär kann pharmakologisch genutzt werden, um Substanzen gezielt

durch physiologische Schranken wie die Blut-Hirn-Schranke, Blut-Hoden-Schranke zu schleusen.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde untersucht, ob die Expression von Claudin-2, einem TJ-Protein, das in vivo bevorzugt in lecken Epithelien exprimiert wird und einen parazellulären Kanal für kleine Kationen bildet, einen Einfluss auf den Wassertransport an einer Nierenzelllinie (MDCK-Zellen) hat. Dazu wurde Claudin-2 stabil in MDCK-C7-Zellen transfiziert, die ein Modell für ein dichtes Epithel darstellen und endogen kein Claudin-2 exprimieren. Der Wassertransport an diesen Zellen wurde mit Vektorkontrollen (C7-vec), die nur den leeren Vektor enthielten, mit den Wildtypzellen (C7-wt) und mit MDCK-C11-Zellen (C11-wt), die ein leckes Epithel repräsentieren und endogen stark Claudin-2 exprimieren, verglichen.

Für diese Untersuchungen wurde ein Messaufbau entwickelt und etabliert, um den Wassertransport quantitativ zu erfassen. Die vorliegende Arbeit zeigt folgende Ergebnisse:

1. Der Messaufbau besteht aus einer modifizierten Ussing-Kammer und einem digitalen optisch-elektrischen Kombinationssystem, welches sowohl den transepithelialen Widerstand der Zellen als auch den Wassertransport anhand der Position des Flüssigkeitsmeniskus erfasst. Es ermöglicht somit eine quantitative Messung des Wassertransports an vitalen Epithelien unter physiologischen Bedingungen.
2. Der Wassertransport in lecken Epithelien bzw. MDCK-C11-wt ist höher als in dichten Epithelien, repräsentiert durch die MDCK-C7-Zellen.
3. Die Expression von Claudin-2 in hochohmigen C7-Zellen bewirkt eine deutliche Senkung des transepithelialen Widerstandes. Dabei war der Einfluss von humanem Claudin-2 deutlich stärker als der von murinem Claudin-2.
4. Der Wassertransport kann durch einen osmotischen Gradienten induziert werden und durch einen Gradienten für Natrium zusätzlich verstärkt werden. Der Wassertransport in den mit humanem Claudin-2 transfizierten Zellen ist deutlich höher als in den Vektorkontrollen oder Wildtyp-Zellen.

Furuse et al. demonstrierten an MDCK-Zellen, dass durch die Einführung von Claudin-2 ein dichtes Epithel in ein leckes Epithel umgewandelt wird [66]. Amasheh et al. belegten durch Fluxversuche, dass Claudin-2 einen parazellulären Kationen-selektiven Kanal induziert. Dieser Kanal könnte auch den parazellulären Transport von Wasser ermöglichen. Der durch Claudin-2 vermittelte parazelluläre Na⁺-Transport ist in der Lage, den osmotisch induzierten Wassertransport zusätzlich zu steigern. Folglich kann vermutet werden, dass Claudin-2 am epithelialen Wassertransport beteiligt ist und der Kationen-selektive parazelluläre Kanal auch einen Durchtritt von Wasser ermöglicht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass durch die Expression von Claudin-2 der transepitheliale Wassertransport gesteigert wird. Diese Steigerung ist vermutlich auf eine Erhöhung der parazellulären Permeabilität für Wasser zurückzuführen.

6. Abkürzungsverzeichnis, Abbildungen und Tabellen

Abkürzungsverzeichnis

TJ	Tight junction
ZO	Zonula occludens
U_{epi}	transepitheliale Spannung
JAM	Junction Adhesion Molekül
R_{epi}	transepithelialer Widerstand
I_{sc}	Kurzschlussstrom
RT	Raumtemperatur
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney Zellen
C7-cld2M	MDCK-C7-Zellklon mit Maus-Claudin-2
C7-cld2H	MDCK-C7-Zellklon mit humanem Claudin-2
C7-vec	MDCK-C7-Zellklon mit leerem Vektor
C11-wt	MDCK-C11-Wildtyp
AQP	Aquaporin
SGLT	Natrium-Glucose-Transporter
K, K^+	Kalium, Kalium-Ion
NMDG, NMDG^+	N-Methyl-D-Glucamin, NMDG-Ion
Cl, Cl^-	Chlor, Chlorid
Br, Br^-	Brom, Bromid
Na, Na^+	Natrium, Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
ADH	antidiuretisches Hormon, Vasopressin
kDa	kilo Dalton
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition

Abbildungen

- Abb. 1 Schematische Darstellung einer Epithelzelle und der Zell-Zell-Verbindungen.
- Abb. 2 Aufbau der Tight Junctions.

- Abb. 3 Parazelluläre "wässrige" Poren.
- Abb. 4 Schematische Darstellung des Versuchsstands.
- Abb. 5 Foto des Versuchsstands.
- Abb. 6 Western-Blot-Analyse. Expression von Occludin und Claudin-1 bis -5 in der Kontrollgruppe C7-vec und der transfizierten Zelllinie C7-cld2M.
- Abb. 7 Western-Blot-Analyse. Expression von Claudin-2 in der Kontrollgruppe C7-vec und der transfizierten Zelllinie C7-cld2H und den C11-wt-Zellen.
- Abb. 8 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie von der Kontrollgruppe C7-vec und der transfizierten Zelllinie C7-cld2M. Aufsicht und Seitenansicht. Occludin (grün), Claudin (rot), Überlagerung (orange).
- Abb. 9 Die transepithelialen Widerstände der Kontrollgruppe C7-vec und der transfizierten Zelllinie C7-cld2M im Vergleich zu C11-wt.
- Abb. 10 Die transepithelialen Widerstände der Kontrollgruppe C7-vec und der transfizierten Zelllinie C7-cld2H im Vergleich zu C11-wt.
- Abb. 11 Wasserflux induziert durch osmotischen Mannitol-Gradienten. Vergleich zwischen der Kontrollgruppe C7-vec, der transfizierten Zelllinie C7-cld2M und C11-wt.
- Abb. 12 Wasserflux induziert durch osmotischen Mannitol-Gradienten. Vergleich zwischen der Kontrollgruppe C7-vec, der transfizierten Zelllinie C7-cld2H und C11-wt.
- Abb. 13 Wasserflux induziert durch kationischen Na^{2+} -Gradient. Vergleich zwischen der Kontrollgruppe C7-vec und der transfizierten Zelllinie C7-cld2M.
- Abb. 14 Wassertransport unter Na-Mannitol-Gradient.

Tabellen

- Tab. 1 Lokalisation und klinische Bedeutung der Claudine
- Tab. 2 Expression und klinische Bedeutung von Claudin-2

7. Literaturverzeichnis

1. Denker BM, Smith BL, Kuhajda FP and Agre P. Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J Biol Chem*, 1988. **263**(30): p. 15634-42.
2. Verkman AS. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 15): p. 3225-32.
3. Zeuthen T. General models for water transport across leaky epithelia. *Int Rev Cytol*, 2002. **215**: p. 285-317.
4. Tepass U. Claudin complexities at the apical junctional complex. *Nat Cell Biol*, 2003. **5**(7): p. 595-7.
5. Staehelin LA. Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J Cell Sci*, 1973. **13**(3): p. 763-86.
6. Staehelin LA. Structure and function of intercellular junctions. *Int Rev Cytol*, 1974. **39**: p. 191-283.
7. Claude P and Goodenough DA. Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *J Cell Biol*, 1973. **58**(2): p. 390-400.
8. Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H and Tsukita S. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol*, 2005. **171**(6): p. 939-45.
9. Furuse M, Fujimoto K, Sato N, Hirase T and Tsukita S. Overexpression of occludin, a tight junction-associated integral membrane protein, induces the formation of intracellular multilamellar bodies bearing tight junction-like structures. *J Cell Sci*, 1996. **109 (Pt 2)**: p. 429-35.
10. Furuse M, Sasaki H and Tsukita S. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol*, 1999. **147**(4): p. 891-903.
11. Farquhar MG and Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol*, 1963. **17**: p. 375-412.
12. Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, et al. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol*, 1998. **142**(1): p. 117-27.
13. Tsukita S and Furuse M. Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol*, 2000. **149**(1): p. 13-6.
14. Reyes JL, Lamas M, Martin D, et al. The renal segmental distribution of claudins changes with development. *Kidney Int*, 2002. **62**(2): p. 476-87.
15. Moroi S, Saitou M, Fujimoto K, et al. Occludin is concentrated at tight junctions of mouse/rat but not human/guinea pig Sertoli cells in testes. *Am J Physiol*, 1998. **274**(6 Pt 1): p. C1708-17.
16. Hirase T, Staddon JM, Saitou M, et al. Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci*, 1997. **110 (Pt 14)**: p. 1603-13.

17. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell*, 2000. **11**(12): p. 4131-42.
18. Van Itallie CM and Anderson JM. The role of claudins in determining paracellular charge selectivity. *Proc Am Thorac Soc*, 2004. **1**(1): p. 38-41.
19. Lee DB, Huang E and Ward HJ. Tight junction biology and kidney dysfunction. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006. **290**(1): p. F20-34.
20. Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA and Anderson JM. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, 1998. **273**(45): p. 29745-53.
21. Balda MS, Garrett MD and Matter K. The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol*, 2003. **160**(3): p. 423-32.
22. Lan M, Kojima T, Osanai M, Chiba H and Sawada N. Oncogenic Raf-1 regulates epithelial to mesenchymal transition via distinct signal transduction pathways in an immortalized mouse hepatic cell line. *Carcinogenesis*, 2004. **25**(12): p. 2385-95.
23. Halasz J, Holczbauer A, Paska C, et al. Claudin-1 and claudin-2 differentiate fetal and embryonal components in human hepatoblastoma. *Hum Pathol*, 2006. **37**(5): p. 555-61.
24. Bignotti E, Tassi RA, Calza S, et al. Differential gene expression profiles between tumor biopsies and short-term primary cultures of ovarian serous carcinomas: Identification of novel molecular biomarkers for early diagnosis and therapy. *Gynecol Oncol*, 2006.
25. Long H, Crean CD, Lee WH, Cummings OW and Gabig TG. Expression of Clostridium perfringens enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium. *Cancer Res*, 2001. **61**(21): p. 7878-81.
26. Soini Y. Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours. *Histopathology*, 2005. **46**(5): p. 551-60.
27. Santin AD, Bellone S, Marizzoni M, et al. Overexpression of claudin-3 and claudin-4 receptors in uterine serous papillary carcinoma: novel targets for a type-specific therapy using Clostridium perfringens enterotoxin (CPE). *Cancer*, 2007. **109**(7): p. 1312-22.
28. Kleinberg L, Holth A, Fridman E, et al. The diagnostic role of claudins in serous effusions. *Am J Clin Pathol*, 2007. **127**(6): p. 928-37.
29. Aung PP, Mitani Y, Sanada Y, et al. Differential expression of claudin-2 in normal human tissues and gastrointestinal carcinomas. *Virchows Arch*, 2006. **448**(4): p. 428-34.
30. Kinugasa T, Huo Q, Higashi D, et al. Selective up-regulation of claudin-1 and claudin-2 in colorectal cancer. *Anticancer Res*, 2007. **27**(6A): p. 3729-34.
31. Tsukita S, Furuse M and Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(4): p. 285-93.
32. Furuse M, Fujita K, Hiiiragi T, Fujimoto K and Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*, 1998. **141**(7): p. 1539-50.

33. Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K and Tsukita S. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol*, 1998. **143**(2): p. 391-401.
34. Van Itallie CM, Fanning AS and Anderson JM. Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003. **285**(6): p. F1078-84.
35. Van Itallie C, Rahner C and Anderson JM. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest*, 2001. **107**(10): p. 1319-27.
36. Amasheh S, Schmidt T, Mahn M, et al. Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell Tissue Res*, 2005. **321**(1): p. 89-96.
37. Abuazza G, Becker A, Williams SS, et al. Claudins 6, 9, and 13 are developmentally expressed renal tight junction proteins. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006. **291**(6): p. F1132-41.
38. Inai T, Kobayashi J and Shibata Y. Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. *Eur J Cell Biol*, 1999. **78**(12): p. 849-55.
39. Furuse M, Hata M, Furuse K, et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol*, 2002. **156**(6): p. 1099-111.
40. Fujita K, Katahira J, Horiguchi Y, et al. Clostridium perfringens enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein. *FEBS Lett*, 2000. **476**(3): p. 258-61.
41. Sirotkin H, Morrow B, Saint-Jore B, et al. Identification, characterization, and precise mapping of a human gene encoding a novel membrane-spanning protein from the 22q11 region deleted in velo-cardio-facial syndrome. *Genomics*, 1997. **42**(2): p. 245-51.
42. Zheng A, Yuan F, Li Y, et al. Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J Virol*, 2007. **81**(22): p. 12465-71.
43. Turksen K and Troy TC. Permeability barrier dysfunction in transgenic mice overexpressing claudin 6. *Development*, 2002. **129**(7): p. 1775-84.
44. Lechpammer M, Resnick MB, Sabo E, et al. The diagnostic and prognostic utility of claudin expression in renal cell neoplasms. *Mod Pathol*, 2008.
45. Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*, 2007. **56**(1): p. 61-72.
46. Kiuchi-Saishin Y, Gotoh S, Furuse M, et al. Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol*, 2002. **13**(4): p. 875-86.
47. Bronstein JM, Tiwari-Woodruff S, Buznikov AG and Stevens DB. Involvement of OSP/claudin-11 in oligodendrocyte membrane interactions: role in biology and disease. *J Neurosci Res*, 2000. **59**(6): p. 706-11.
48. 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. **99**(6): p. 649-59.

49. Fujita H, Sugimoto K, Inatomi S, et al. Tight Junction Proteins Claudin-2 and -12 are Critical for Vitamin D-dependent Ca²⁺ Absorption between Enterocytes. *Mol Biol Cell*, 2008.
50. Wilcox ER, Burton QL, Naz S, et al. Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell*, 2001. **104**(1): p. 165-72.
51. Tamura A, Kitano Y, Hata M, et al. Megaintestine in claudin-15-deficient mice. *Gastroenterology*, 2008. **134**(2): p. 523-34.
52. Simon DB, Lu Y, Choate KA, et al. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science*, 1999. **285**(5424): p. 103-6.
53. Heiskala M, Peterson PA and Yang Y. The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport. *Traffic*, 2001. **2**(2): p. 93-8.
54. Sanada Y, Oue N, Mitani Y, et al. Down-regulation of the claudin-18 gene, identified through serial analysis of gene expression data analysis, in gastric cancer with an intestinal phenotype. *J Pathol*, 2006. **208**(5): p. 633-42.
55. 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. **580**(3): p. 923-31.
56. Van Itallie CM and Anderson JM. The molecular physiology of tight junction pores. *Physiology (Bethesda)*, 2004. **19**: p. 331-8.
57. Yu AS, Enck AH, Lencer WI and Schneeberger EE. Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation. *J Biol Chem*, 2003. **278**(19): p. 17350-9.
58. Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, Rahner C and Anderson JM. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. **283**(1): p. C142-7.
59. Alexandre MD, Lu Q and 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. **118**(Pt 12): p. 2683-93.
60. Katahira J, Inoue N, Horiguchi Y, Matsuda M and Sugimoto N. Molecular cloning and functional characterization of the receptor for Clostridium perfringens enterotoxin. *J Cell Biol*, 1997. **136**(6): p. 1239-47.
61. Wong V and Goodenough DA. Paracellular channels! *Science*, 1999. **285**(5424): p. 62.
62. 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. **115**(Pt 24): p. 4969-76.
63. Powell DW. Barrier function of epithelia. *Am J Physiol*, 1981. **241**(4): p. G275-88.
64. Tang VW and Goodenough DA. Paracellular ion channel at the tight junction. *Biophys J*, 2003. **84**(3): p. 1660-73.
65. Tebbe B, Mankertz J, Schwarz C, et al. Tight junction proteins: a novel class of integral membrane proteins. Expression in human epidermis and in HaCaT keratinocytes. *Arch Dermatol Res*, 2002. **294**(1-2): p. 14-8.

66. Furuse M, Furuse K, Sasaki H and Tsukita S. Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol*, 2001. **153**(2): p. 263-72.
67. Enck AH, Berger UV and Yu AS. Claudin-2 is selectively expressed in proximal nephron in mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001. **281**(5): p. F966-74.
68. Rahner C, Mitic LL and Anderson JM. Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology*, 2001. **120**(2): p. 411-22.
69. Varley CL, Garthwaite MA, Cross W, et al. PPARgamma-regulated tight junction development during human urothelial cytodifferentiation. *J Cell Physiol*, 2006. **208**(2): p. 407-417.
70. Heller F, Florian P, Bojarski C, et al. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology*, 2005. **129**(2): p. 550-64.
71. Burgel N, Bojarski C, Mankertz J, et al. Mechanisms of diarrhea in collagenous colitis. *Gastroenterology*, 2002. **123**(2): p. 433-43.
72. O'Donnell MJ and Maddrell SH. Paracellular and transcellular routes for water and solute movements across insect epithelia. *J Exp Biol*, 1983. **106**: p. 231-53.
73. Fromter E and Diamond J. Route of passive ion permeation in epithelia. *Nat New Biol*, 1972. **235**(53): p. 9-13.
74. Welsh MJ, Smith PL, Fromm M and Frizzell RA. Crypts are the site of intestinal fluid and electrolyte secretion. *Science*, 1982. **218**(4578): p. 1219-21.
75. Horster M and Larsson L. Mechanisms of fluid absorption during proximal tubule development. *Kidney Int*, 1976. **10**(5): p. 348-63.
76. Larsson L. Ultrastructure and permeability of intercellular contacts of developing proximal tubule in rat kidney. *J Ultrastruct Res*, 1975. **52**(1): p. 100-13.
77. Matsui H, Davis CW, Tarran R and Boucher RC. Osmotic water permeabilities of cultured, well-differentiated normal and cystic fibrosis airway epithelia. *J Clin Invest*, 2000. **105**(10): p. 1419-27.
78. Kovbasnjuk O, Leader JP, Weinstein AM and Spring KR. Water does not flow across the tight junctions of MDCK cell epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(11): p. 6526-30.
79. Quigley R and Baum M. Water transport in neonatal and adult rabbit proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002. **283**(2): p. F280-5.
80. Shachar-Hill B and Hill AE. Convective fluid flow through the paracellular system of Necturus gall-bladder epithelium as revealed by dextran probes. *J Physiol*, 1993. **468**: p. 463-86.
81. Zeuthen T. Molecular mechanisms for passive and active transport of water. *Int Rev Cytol*, 1995. **160**: p. 99-161.
82. Weinstein AM and Stephenson JL. Coupled water transport in standing gradient models of the lateral intercellular space. *Biophys J*, 1981. **35**(1): p. 167-91.
83. Mullin JM, Agostino N, Rendon-Huerta E and Thornton JJ. Keynote review: epithelial and endothelial barriers in human disease. *Drug Discov Today*, 2005. **10**(6): p. 395-408.

84. Anderson JM. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol Sci*, 2001. **16**: p. 126-30.
85. Spring KR. Routes and mechanism of fluid transport by epithelia. *Annu Rev Physiol*, 1998. **60**: p. 105-19.
86. Weinstein AM and Stephenson JL. Models of coupled salt and water transport across leaky epithelia. *J Membr Biol*, 1981. **60**(1): p. 1-20.
87. Murakami M, Shachar-Hill B, Steward MC and Hill AE. The paracellular component of water flow in the rat submandibular salivary gland. *J Physiol*, 2001. **537**(Pt 3): p. 899-906.
88. Segawa A, Yamashina S and Murakami M. Visualization of 'water secretion' by confocal microscopy in rat salivary glands: possible distinction of para- and transcellular pathway. *Eur J Morphol*, 2002. **40**(4): p. 241-6.
89. Ozu M, Toriano R, Capurro C and Parisi M. Electrical parameters and water permeability properties of monolayers formed by T84 cells cultured on permeable supports. *Braz J Med Biol Res*, 2005. **38**(1): p. 133-40.
90. Madin SH and Darby NB, Jr. Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1958. **98**(3): p. 574-6.
91. Gekle M, Wunsch S, Oberleithner H and Silbernagl S. Characterization of two MDCK-cell subtypes as a model system to study principal cell and intercalated cell properties. *Pflugers Arch*, 1994. **428**(2): p. 157-62.
92. Ussing HH and Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand*, 1951. **23**(2-3): p. 110-27.
93. Kruh J. Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol Cell Biochem*, 1982. **42**(2): p. 65-82.
94. Matsuzaki T, Suzuki T and Takata K. Hypertonicity-induced expression of aquaporin 3 in MDCK cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001. **281**(1): p. C55-63.
95. Niemietz CM and Tyerman SD. New potent inhibitors of aquaporins: silver and gold compounds inhibit aquaporins of plant and human origin. *FEBS Lett*, 2002. **531**(3): p. 443-7.
96. Weiske J, Schoneberg T, Schroder W, et al. The fate of desmosomal proteins in apoptotic cells. *J Biol Chem*, 2001. **276**(44): p. 41175-81.
97. Candia OA, Alvarez LJ and Zamudio AC. Regulation of water permeability in rabbit conjunctival epithelium by anisotonic conditions. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006. **290**(4): p. C1168-78.
98. Wall SM. Recent advances in our understanding of intercalated cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2005. **14**(5): p. 480-4.
99. Yu AS. Claudins and epithelial paracellular transport: the end of the beginning. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2003. **12**(5): p. 503-9.
100. Angelow S, Schneeberger EE and Yu AS. Claudin-8 expression in renal epithelial cells augments the paracellular barrier by replacing endogenous claudin-2. *J Membr Biol*, 2007. **215**(2-3): p. 147-59.

101. Kawedia JD, Nieman ML, Boivin GP, et al. Interaction between transcellular and paracellular water transport pathways through Aquaporin 5 and the tight junction complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(9): p. 3621-6.
102. Verkman AS, van Hoek AN, Ma T, et al. Water transport across mammalian cell membranes. *Am J Physiol*, 1996. **270**(1 Pt 1): p. C12-30.
103. King LS, Kozono D and Agre P. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. **5**(9): p. 687-98.
104. Loo DD, Wright EM and Zeuthen T. Water pumps. *J Physiol*, 2002. **542**(Pt 1): p. 53-60.
105. Pohl P. Combined transport of water and ions through membrane channels. *Biol Chem*, 2004. **385**(10): p. 921-6.
106. Fischbarg J and Vera JC. Multifunctional transporter models: lessons from the transport of water, sugars, and ring compounds by GLUTs. *Am J Physiol*, 1995. **268**(5 Pt 1): p. C1077-89.
107. Deen PM, Nielsen S, Bindels RJ and van Os CH. Apical and basolateral expression of aquaporin-1 in transfected MDCK and LLC-PK cells and functional evaluation of their transcellular osmotic water permeabilities. *Pflugers Arch*, 1997. **433**(6): p. 780-7.
108. Loo DD, Zeuthen T, Chandy G and Wright EM. Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(23): p. 13367-70.
109. Charron FM, Blanchard MG and Lapointe JY. Intracellular hypertonicity is responsible for water flux associated with Na⁺/glucose cotransport. *Biophys J*, 2006. **90**(10): p. 3546-54.
110. Lapointe JY, Gagnon MP, Gagnon DG and Bissonnette P. Controversy regarding the secondary active water transport hypothesis. *Biochem Cell Biol*, 2002. **80**(5): p. 525-33.
111. Hasegawa H, Skach W, Baker O, et al. A multifunctional aqueous channel formed by CFTR. *Science*, 1992. **258**(5087): p. 1477-9.
112. Schreiber R, Greger R, Nitschke R and Kunzelmann K. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates water conductance in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch*, 1997. **434**(6): p. 841-7.
113. Flamion B, Spring KR and Abramow M. Adaptation of inner medullary collecting duct to dehydration involves a paracellular pathway. *Am J Physiol*, 1995. **268**(1 Pt 2): p. F53-63.
114. Capurro C, Rivarola V, Kierbel A, et al. Vasopressin regulates water flow in a rat cortical collecting duct cell line not containing known aquaporins. *J Membr Biol*, 2001. **179**(1): p. 63-70.
115. Nielsen S and Agre P. The aquaporin family of water channels in kidney. *Kidney Int*, 1995. **48**(4): p. 1057-68.
116. Agre P. Aquaporin null phenotypes: the importance of classical physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(16): p. 9061-3.
117. Yasui M, Hazama A, Kwon TH, et al. Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. *Nature*, 1999. **402**(6758): p. 184-7.

118. Agre P, Bonhivers M and Borgnia MJ. The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems. *J Biol Chem*, 1998. **273**(24): p. 14659-62.
119. Uchida S, Kwon HM, Yamauchi A, et al. Molecular cloning of the cDNA for an MDCK cell Na(+)- and Cl(-)-dependent taurine transporter that is regulated by hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(15): p. 7424.
120. Issa Y, Watts DC, Duxbury AJ, et al. Mercuric chloride: toxicity and apoptosis in a human oligodendroglial cell line MO3.13. *Biomaterials*, 2003. **24**(6): p. 981-7.
121. Fok AK and Valin EL. Effects of dimethylsulfoxide (DMSO) on the digestive-lysosomal system in *Paramecium caudatum*. *Eur J Cell Biol*, 1983. **32**(1): p. 45-51.
122. Brayton CF. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet*, 1986. **76**(1): p. 61-90.
123. Yool AJ, Brokl OH, Pannabecker TL, Dantzler WH and Stamer WD. Tetraethylammonium block of water flux in Aquaporin-1 channels expressed in kidney thin limbs of Henle's loop and a kidney-derived cell line. *BMC Physiol*, 2002. **2**(1): p. 4.
124. Yool AJ, Brokl OH, Pannabecker TL, Dantzler WH and Stamer WD. Tetraethylammonium block of water flux in Aquaporin-1 channels expressed in kidney thin limbs of Henle's loop and a kidney-derived cell line. *BMC Physiol*, 2002. **2**: p. 4.
125. Detmers FJ, de Groot BL, Muller EM, et al. Quaternary ammonium compounds as water channel blockers. Specificity, potency, and site of action. *J Biol Chem*, 2006. **281**(20): p. 14207-14.
126. Sogaard R and Zeuthen T. Test of blockers of AQP1 water permeability by a high-resolution method: no effects of tetraethylammonium ions or acetazolamide. *Pflugers Arch*, 2007.
127. Yang B, Kim JK and Verkman AS. Comparative efficacy of HgCl₂ with candidate aquaporin-1 inhibitors DMSO, gold, TEA⁺ and acetazolamide. *FEBS Lett*, 2006. **580**(28-29): p. 6679-84.

8. Vorpublikationen im Zusammenhang mit der Dissertation

Abstracts

Rosenthal R, **Oelrich B**, Milatz S, Sorgenfrei D, Amasheh S, Schulzke JD, Fromm M. Role of the tight junction protein claudin-2 in paracellular water transport by epithelial cells. J. Physiol. Biochem., 2007. 63(1): 58

Rosenthal R, Milatz S, **Oelrich B**, Sorgenfrei D, Amasheh S, Fromm M. The paracellular cation channel claudin-2 is permeable also for water. 40th Sandbjerg Meeting on Membrane Transport, Sønderborg, Denmark, 2008 (Invited talk)

Originalarbeit

Rosenthal R, Milatz S, **Oelrich B**, Krug, SM, Amasheh S, Fromm M. The paracellular cation channel claudin-2 promotes water permeability.
(Manuskript in Vorbereitung für FASEB J.)

9. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlichst bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Michael Fromm für die Vergabe des Dissertationsthemas sowie für die herausragende Betreuung, immerwährende Diskussionsbereitschaft und wertvollen Anregungen während der Erstellung der Dissertation bedanken. Hierdurch fand ich meine Begeisterung für die experimentelle Forschung und für die Tight Junctions.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Salah Amasheh für sein großartiges Engagement und ständige Unterstützung zu jeder Phase der Arbeit, insbesondere bei der Vermittlung molekularbiologischer und elektrophysiologischer Arbeitsmethoden und der Bilddokumentation. Zu jedem Zeitpunkt und zu jeder Frage fand ich ein offenes Ohr und prompte Hilfe.

Insbesondere Herrn Detlef Sorgenfrei möchte ich für den professionellen und unermüdlichen Einsatz bei der technischen Umsetzung und Durchführung der Ussing-Kammer-Versuche danken. Kein Problem technischer Art einschließlich der zahlreichen Pannen mit dem Computer schienen in seinen Händen unlösbar zu sein. Ohne seine unendliche Geduld, ausdauernde Art und kreativen Problemlösungen, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Frau Rita Rosenthal danke ich ganz herzlichst für den fortwährenden Einsatz bei der Betreuung der schriftlichen Erstellung der Dissertation und für ihre großzügige Hilfsbereitschaft und aufmunternden Zuspruch.

Ich danke ganz besonders Sieglinde Lüderitz und Brigitte Papanis für ihren unverzichtbaren Einsatz bezüglich der Herstellung der Zellkulturen.

Großes Dankeschön an das gesamte Institut für Klinische Physiologie, welches stets für eine entspannte, kollegiale und familiäre Atmosphäre sorgte, wodurch das Arbeiten große Freude bereitete.

Weiterhin gilt mein Dank der Konrad-Adenauer-Stiftung für die finanzielle und ideelle Unterstützung.

Meiner Familie und meinen Freunden, die mir stets zur Seite standen, danke ich für die Unterstützung und den Zuspruch besonders in den schwierigen Phasen der Arbeit.

10. Lebenslauf

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

Erklärung

„Ich, Beibei Oelrich, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

Entwicklung und Etablierung einer Methode zur Messung des epithelialen Wassertransports an Claudin-2 exprimierenden MDCK-Zellen

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.“

Beibei Oelrich