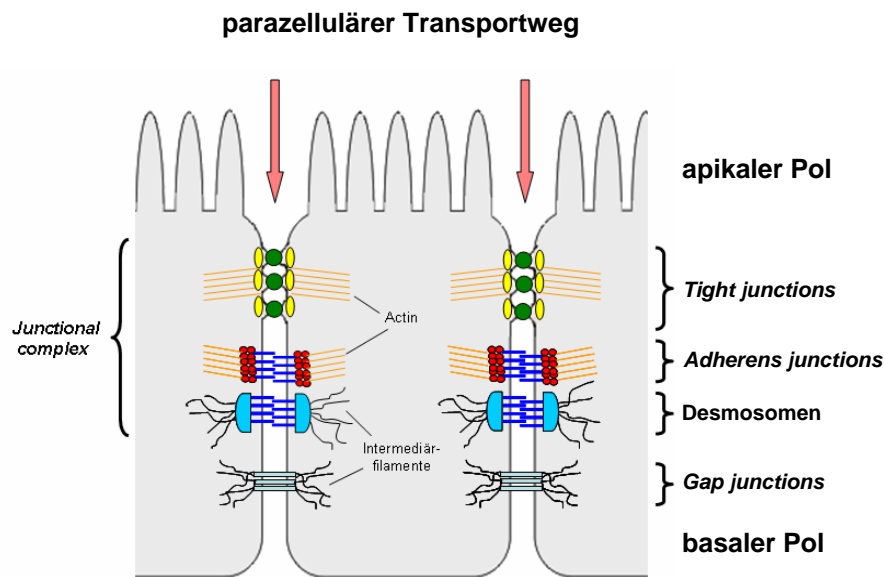


# 1 Einleitung

## 1.1 *Tight junctions* in Epithelien und Endothelien

Epithelien und Endothelien bilden Barrieren, die das interne Milieu von Organen gegenüber der Umgebung aufrechterhalten, indem der Transport von Wasser und gelösten Stoffen reguliert wird. Moleküle können diese Barriere auf zwei Wegen passieren. Zum einen auf dem transzellulären Weg, der die Passage durch die apikale und basolaterale Plasmamembran durch Kanäle, Transporter oder Pumpen beinhaltet. Dieser Schritt ist in bezug auf das zu transportierende Molekül hoch spezifisch. Der zweite Weg führt durch die Zellzwischenräume (parazellulärer Weg) und ermöglicht die Passage von wasserlöslichen Molekülen durch passive Diffusion. Die freie Diffusion wird durch eine parazelluläre Barriere eingeschränkt, deren Dichtigkeit gewebsspezifisch ist und typischerweise durch den transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER) beschrieben wird (Powell, 1981; Reuss, 2001; Van Itallie und Anderson, 2004). Der TEER variiert  $\sim 10^5$ -fach zwischen sogenannten dichten und undichten Geweben (Van Itallie und Anderson, 2006a).

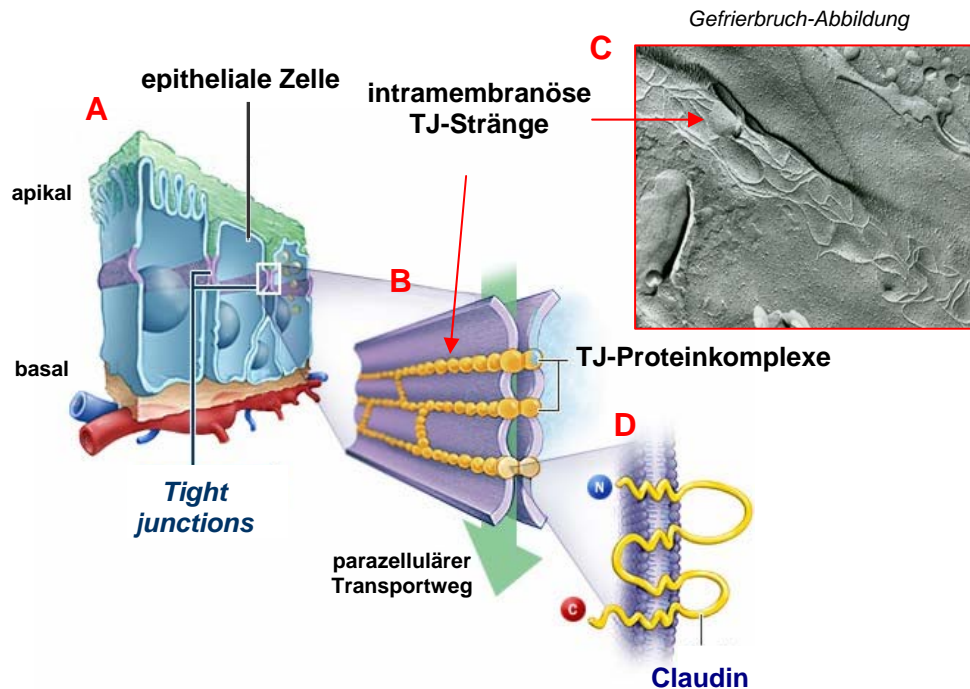


**Abb. 1.1: Zell-junctions in Epithel- und Endothelzellen.**

Schematische Darstellung einer polaren Epithelzelle, in der die vier Zell-Zell-Verbindungen in der lateralen Plasmamembran eingezeichnet sind. Die *Tight junctions* (TJ) sind im apikalen Bereich der lateralen Plasmamembran gelegen und bilden zusammen mit den *Adherens junctions* und Desmosomen den *Junctional complex*. TJs und *Adherens junctions* sind mit dem Zytoskelett über Aktinfilamente verbunden. Die *Gap junctions* und Desmosomen sind durch Intermediärfilamente mit dem Zytoskelett verknüpft.

Epitheliale und endotheliale Zellen sind durch spezielle Zell-junctions eng miteinander verbunden. Dabei bewirken die *Tight junctions* (TJ) die parazellulären Barriereigenschaften (Cereijido *et al.*, 2000), *Adherens junctions* und Desmosomen verbinden die Zellen und deren Zytoskelette mechanisch miteinander und *Gap junctions* unterstützen die interzelluläre Kommunikation. Desmosomen, *Adherens junctions* und TJs bilden den Verbindungskomplex

(*Junctional complex*), der sich in epithelialen Zellen im apikalen Bereich der lateralen Plasmamembran befindet (Abb. 1.1). In allen epithelialen Zelltypen nehmen TJs die am weitesten apikal gelegene Position ein, gefolgt von *Adherens junctions* und abschließend den Desmosomen (Farquhar und Palade, 1963). TJs umschließen die epitheliale Zelle ringförmig am apikalen Ende als intramembranöse, kontinuierliche Struktur, die in transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen zwischen zwei Zellen als eine Serie von engen Zell-Zell-Kontakten erscheint (Farquhar und Palade, 1963).



**Abb. 1.2: Tight junction-Stränge zwischen Epithelzellen verschließen den parazellulären Spalt.** Schematische Darstellung von TJs in Epithelzellen, die im apikalen Bereich ringförmig die Zelle umspannen und mit TJs der benachbarten Zelle in Wechselwirkung treten (A). In Vergrößerung zeigen sich TJs als intramembranöse Strangnetzwerke (B), die durch Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht werden können, wie durch ein typisches Netzwerk aus TJ-Strängen in Madin-Darby *canine kidney*-II-Zellen dargestellt (C). TJ-Stränge sind aus 10 nm großen Partikeln aufgebaut, deren molekulares Rückgrat aus Claudinen (D) besteht. Die Abbildung ist nach Johnson und Quay (2005, Natestch Pharmaceutical Company) modifiziert.

Werden die beiden Lipidschichten der Plasmamembran durch Gefrierbruchtechniken separiert und elektronenmikroskopisch analysiert, erscheinen TJs als ein Netzwerk aus miteinander verbundenen Strängen in der protoplasmatischen Hälfte (P-face) und korrespondierenden Vertiefungen in der extrazellulären Hälfte (E-face) (Abb. 1.2; Staehelin, 1973). Dieses zellumspannende Strangsystem teilt die Plasmamembran in ein apikales und ein basolaterales Membrankompartiment, indem die freie Diffusion der Lipide und Proteine zwischen der apikalen und basolateralen Plasmamembran blockiert ist (*fence*-Funktion). Daher, und durch den gerichteten polaren Transport, ist in polarisierten Zellen die Zusammensetzung von Lipiden und Proteinen in den beiden Membrankompartimenten unterschiedlich (Cereijido *et al.*, 1998). Die TJs von Endothelzellen in Gefäßen außerhalb des Gehirns unterscheiden sich

von denen in Epithelien (Bazzoni und Dejana, 2004). TJ-Stränge sind hier sowohl im apikalen Teil der lateralen Membran als auch, durchsetzt mit *Adherens junctions*, in einem breiten Segment der lateralen Membran zu finden (Leach und Firth, 1992; Leach *et al.*, 2000). In Gefrierbruchpräparaten scheinen endotheliale TJs hauptsächlich mit der E- und nicht mit der P-face assoziiert zu sein (Simionescu *et al.*, 1976; Muhleisen *et al.*, 1989).

### 1.2 Molekulare Komponenten der *Tight junctions*

Seit der Entdeckung von *Zonula Occludens* (ZO)-1 als erstes TJ-assoziiertes Protein im Jahr 1986 sind mittlerweile mehr als 40 Proteine als Teil des TJ-Komplexes beschrieben worden (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2003; Schneeberger und Lynch, 2004). Die Proteine lassen sich in drei Gruppen einteilen: 1. Integrale Plasmamembranproteine, die den interzellulären Raum durchspannen und die parazelluläre Barriere ausbilden, 2. die peripher assoziierten Gerüstproteine, die die Transmembranproteine organisieren und mit dem Zytoskelett verknüpfen, 3. Proteine, die für die Signaltransduktion von Bedeutung sind (Kinasen, Phosphatasen und kleine GTP-Bindungsproteine). Aufgrund der Vielzahl der charakterisierten TJ-Proteine wird im Folgenden nur auf die für diese Arbeit relevanten Proteine eingegangen.

Viele der mit den TJs assoziierten Gerüstproteine besitzen eine oder mehrere PDZ-Domänen (die Abkürzung PDZ setzt sich aus den jeweils ersten Buchstaben der drei Proteine *post synaptic density* Protein, *Drosophila disc large tumor suppressor* und ZO-1 zusammen). Durch Ausformung einer hydrophoben Vertiefung können die C-terminalen Reste der PDZ-Domäne an das Motiv T/SXV binden (Fanning und Anderson, 1999). ZO-1, ZO-2 und ZO-3 weisen im N-terminalen Bereich drei PDZ-Domänen, eine *Src oncogene homology region 3* (SH3) und eine katalytisch inaktive Guanylat-Kinase (GUK) homologe Region auf. Am C-Terminus befinden sich eine saure und eine prolinreiche Region, die in ZO-3 zwischen der PDZ2 und PDZ3 liegt. Die PDZ1 bindet an Claudine (Itoh *et al.*, 1999), während die PDZ2-Domäne aus ZO-1 mit der PDZ2 aus ZO-2 oder ZO-3 heterodimerisieren (Wittchen *et al.*, 1999) und mit der PDZ2 aus ZO-1 homodimerisieren kann (Utepbergenov *et al.*, 2006). Die PDZ3 (möglicherweise auch PDZ2) von ZO-1 interagiert mit dem *junctional adhesion molecule* (JAM)-1 (Ebnet *et al.*, 2000) und die GUK-Domäne von ZO-1 mit der dimerisierten Coiled-coil-Domäne im C-terminalen, zytosolischen Teil eines Occludin (Occ)-Dimers (Müller *et al.*, 2005). Die prolinreiche Region von ZO-1 bindet Aktin und verbindet damit die TJs mit dem Zytoskelett (Fanning *et al.*, 1998).

Als transmembranale Proteine der TJs wurden bisher die zwei homologen Proteine Occ und Tricellulin, die Familien der JAMs und Claudine (Cld) identifiziert.

JAMs (~32 kDa) durchspannen die Plasmamembran mit einer Transmembrandomäne und besitzen am zytoplasmatischen Ende ein PDZ-Bindungsmotiv (Ebnet *et al.*, 2000). Der extrazelluläre Teil beinhaltet zwei Immunglobulin-ähnliche Schleifen, die  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Zell-Zell-Adhäsion durch homophile (Bazzoni *et al.*, 2000; Lamagna *et al.*, 2005) und heterophile Interaktionen bewirken (Arrate *et al.*, 2001; Lamagna *et al.*, 2005). JAMs sind für die Regulation der parazellulären Permeabilität (Keiper *et al.*, 2005) und die Bildung der TJs in epithelialen Zellen wichtig (Ebnet *et al.*, 2001), obwohl sie nach Transfektion in L-Fibroblasten keine TJ-Stränge *de novo* generieren können (Itoh *et al.*, 2001). Die Transfektion von L-Fibroblasten mit Occ (~60 kDa) führt zur Anreicherung von Occ an Zell-Zell-Kontakten Occ-exprimierender Zellen sowie zur Bildung von TJ-Strängen, die jedoch nur in geringer Zahl vorliegen und morphologisch stark von TJ-Strängen in Epithelien abweichen (Furuse *et al.*, 1998b). In Epithelien lokalisiert Occ in TJs (Saitou *et al.*, 1997). Die Funktion von Occ in den TJs ist unbekannt. *Occ-Knock out*-Mäuse zeigen keine strukturellen oder funktionellen Abnormalitäten der TJs, obwohl diese Mäuse einen komplexen Phänotyp (chronische Entzündung und Hyperplasie des Magenepithels, Verkalkungen im Gehirn, Hodenatrophie und Ausdünnung kompakter Knochen) aufweisen (Saitou *et al.*, 2000). Es ist jedoch anzunehmen, dass Occ in die Regulation der TJs involviert ist.

Das jüngst entdeckte transmembranale Tricellulin (63,6 kDa) lokalisiert in TJs, in denen drei Epithelzellen aufeinander stoßen (Ikenouchi *et al.*, 2005). In diesen trizellulären Zell-Kontakten verlaufen die TJ-Stränge parallel, basolateral und sind mit basolateralen TJ-Strängen der beiden benachbarten Zellen gepaart. Gemeinsam bilden sie einen zentralen Kanal, der die Epithelschicht durchspannt und ebenfalls abgedichtet sein muss, um die Integrität der epithelialen Barriere aufrecht zu erhalten (Staehein, 1973). Die starke Reduktion der Expression von Tricellulin in Eph4-Zellen (Brustepithelzellen) durch RNA-Interferenztechnik bewirkt eine Reduktion der Lokalisation von Occ und Cld3 in den TJs und beeinträchtigt die Barrierefunktion der Eph4-Zellen (Ikenouchi *et al.*, 2005).

### 1.3 Claudine

Seit der Entdeckung von Cld1 und Cld2 im Jahre 1998 (Furuse *et al.*, 1998a) ist die Proteinfamilie auf 24 bisher bekannte Claudine in Säugetieren (Furuse und Tsukita, 2006), 56 im Kugelfisch *Fugu rubripes* (Loh *et al.*, 2004) und 15 im Zebrafisch *Danio rerio* (Kollmar *et al.*, 2001; Hardison *et al.*, 2005) angewachsen. Phylogenetisch sind sich die meisten Claudine sehr ähnlich. Einige entfernter verwandte Claudine weichen jedoch in ihrer Sequenz stark von den übrigen ab, wie Cld16 (stark verlängerter N-Terminus), Cld18 (verlängerte Sequenz in

der zweiten extrazellulären Schleife; 2.EZS) und Cld23 (verlängerter C-Terminus; Hewitt *et al.*, 2006). Zu der Gruppe nah verwandter Claudine, die einen hohen Grad an Homologie aufweisen, gehören Cld1 bis Cld10, Cld14, Cld15, Cld17, Cld19 und Cld20. Besonders ähnlich sind sich Cld6 und Cld9, Cld3 und Cld4 sowie Cld1 und Cld7 (Hewitt *et al.*, 2006).

In allen Vertebraten lokalisieren Claudine in TJs von Epithel- und Endothelzellen und sind in TJ-Stränge inkorporiert. So konnten nicht nur in Säugetieren, sondern auch im Zebrafisch TJs und TJ-Stränge beobachtet werden (Kessel *et al.*, 1988). In Invertebraten wie z.B. *Drosophila* und *Caenorhabditis elegans* lokalisieren Claudine in sogenannten *septate junctions*, die sich aber strukturell von den TJs unterscheiden (Furuse und Tsukita, 2006). Die Topologie der Claudine, wie auch die Topologie von Occ und Tricellulin, wird durch vier hoch konservierte  $\alpha$ -helikale Transmembransegmente geprägt, die durch zwei extrazelluläre und eine intrazelluläre Schleife miteinander verknüpft sind (Abb. 1.3). Diese Topologie ist auch für Connexine (*Gap junctions*) und Innexine typisch (Hua *et al.*, 2003). N- und der C-Terminus der Claudine sind kurze, intrazelluläre Peptidsequenzen. Experimentell konnte diese Topologie bisher jedoch nicht bestätigt werden. Die hydropathische Charakterisierung (Kyte und Doolittle, 1982) macht die Existenz der vier Transmembransegmente zumindest sehr wahrscheinlich (Furuse *et al.*, 1998a; Hua *et al.*, 2003).

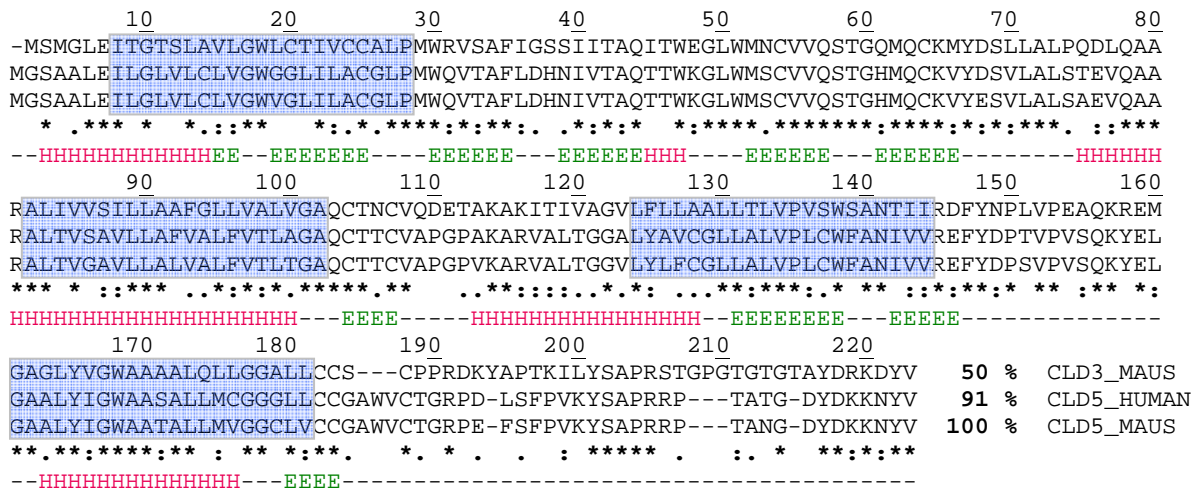
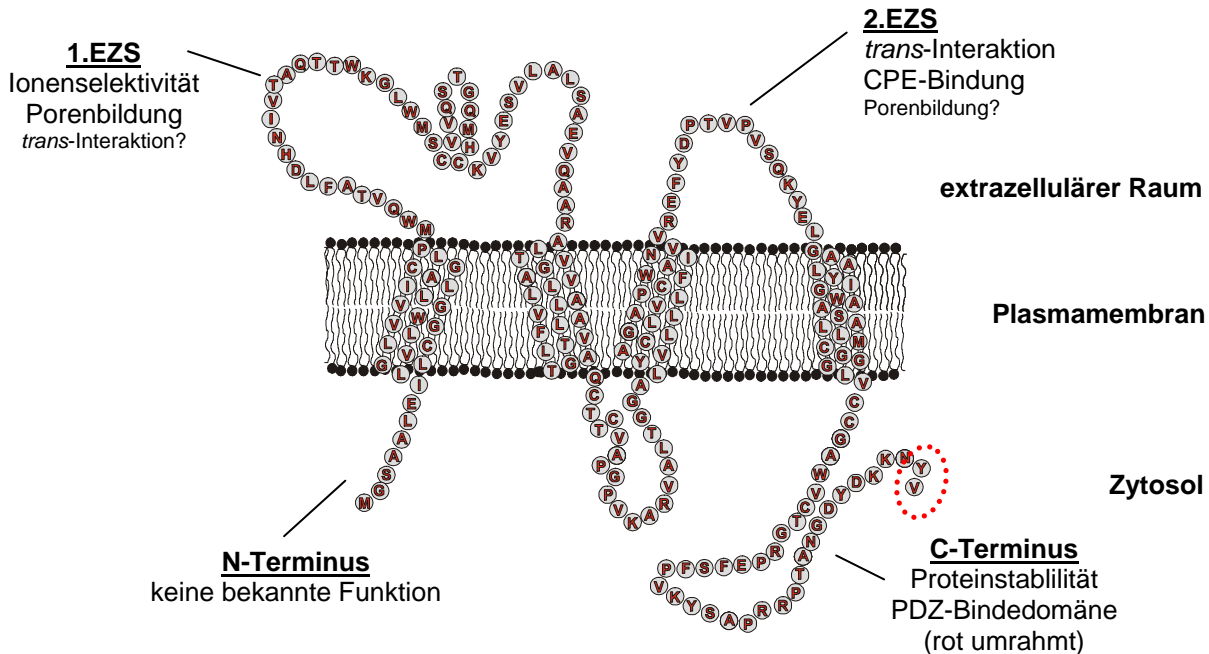
Die 20-27 kDa kleinen Claudine bilden das Rückgrat der TJs. Dies wurde eindrucksvoll durch die Transfektion von Cld1- bzw. Cld2-Konstrukten in TJ-lose Maus-L-Fibroblasten demonstriert, da in diesen Transfektanden die Cld-Expression zur *de novo* Assemblierung von TJ-Strängen führte (Furuse *et al.*, 1998a). Außerdem wird die funktionelle Bedeutung der Claudine als bestimmender Faktor der parazellulären Permeabilitätseigenschaften von Epithelien und Endothelien in einer großen Anzahl an Veröffentlichungen dargelegt (siehe Kap. 1.3.2; Van Itallie und Anderson, 2006b). Insbesondere von Bedeutung ist dabei die gewebespezifische Cld-Komposition, die hauptsächlich durch die gewebespezifische Expression der Mitglieder der Claudinfamilie zustande kommt. Einige Claudine, wie z. B. Cld1, werden beinahe in jedem Endothel oder Epithel exprimiert (Hewitt *et al.*, 2006), andere, wie Cld16, sind nur in speziellen Epithelien zu finden (Simon *et al.*, 1999). Andere Epithelzellen, wie z. B. Sertoli-Zellen, exprimieren nur Cld11 (Gow *et al.*, 1999).

### 1.3.1 Claudin-3 und Claudin-5

Gehirnkapillar-Endothelzellen (GKEZ) kleiden das mikrovaskuläre System im Gehirn aus und bilden eine besonders dichte Barriere zwischen Blut und Gehirn, die Blut-Hirnschranke (Wolburg und Lippoldt, 2002). Der transzelluläre Transport von Nährstoffen und anderen

# 1. Einleitung

essentiellen Bestandteilen in das Gehirn wird in den GKEZ durch eine Vielzahl spezieller Transportproteine streng reguliert (Abbott, 2002). Der parazelluläre Transportweg zwischen den GKEZ ist durch TJs verschlossen, die wesentlich dichter als die TJs der peripheren



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Topologie von Claudin-5 in der Plasmamembran.**  
 Beispielhaft für alle Claudine ist die Topologie von Cld5 in der Plasmamembran dargestellt. Die Sequenz der vier Transmembransegmente sind der Swiss-Prot-Datenbank (*primary accession number* O54942) entnommen worden (<http://au.expasy.org/uniprot/O54942>) und durch hellblaue Kästen hervorgehoben. Von den beiden Cysteinen in der 1.EZS wird angenommen, dass sie eine Cysteinbrücke bilden. Das Sequenzalignment unterhalb des Topologieschemas zeigt die Homologie zwischen Cld3-Maus (Q9Z0G9; obere Sequenz), Cld5-Human (O00501; mittlere Sequenz) und Cld5-Maus (O54942; untere Sequenz), deren identische Aminosäuren durch „\*“, ähnliche Aminosäuren durch „.“ und weniger vergleichbare durch „:“ unter den Sequenzen gekennzeichnet sind. Die Sequenzen von Cld3-Maus und Cld5-Human sind 50 % bzw. 91 % mit der Cld5-Maus-Sequenz identisch. Das Alignment wurde durch ClustalW erstellt (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/#>; Chenna *et al.*, 2003). Unterhalb der Proteinsequenz ist eine Sekundärstrukturvorhersage durch das Programm *Jpred* (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/>; Cuff *et al.*, 1998) dargestellt. Sequenzabschnitte, die laut Strukturvorhersage  $\beta$ -Faltblätter ausbilden, sind durch grünfarbige „E“ gekennzeichnet; vorhergesagte  $\alpha$ -helikale Sequenzabschnitte sind durch rotfarbige „H“ dargestellt. 1.EZS: Erste extrazelluläre Schleife; 2.EZS: Zweite extrazelluläre Schleife.

Mikrogefäße sind (Matter und Balda, 2003). Daher sind eine Reihe potentieller pharmakologischer Wirkstoffe im Gehirn unwirksam, da sie die Blut-Hirnschranke nicht passieren können. Als wichtige Komponente der TJs der GKEZ wurde Cld5 identifiziert (Nitta *et al.*, 2003). Cld5-*Knock out*-Mäuse werden lebend geboren, sterben allerdings bereits nach einem Tag ohne das morphologisch sichtbare Veränderungen im Gehirn festzustellen sind. Obwohl auch die Morphologie der TJ-Stränge intakt scheint, hat die Blut-Hirnschranke ihre abdichtende Funktion für Moleküle kleiner als 800 Da verloren (Nitta *et al.*, 2003). Daher ist Cld5 nicht die wesentliche Strukturkomponente der TJs der GKEZ, sondern bewirkt die Abdichtung der TJs der Blut-Hirnschranke für kleine Moleküle. Eine gezielte Manipulation von Cld5 sollte daher nicht zum Zusammenbruch der TJs führen, sondern eine temporäre Öffnung der Blut-Hirnschranke für kleine Moleküle ermöglichen. Neben Cld5 werden in den GKEZ Cld3 (Wolburg *et al.*, 2003) und Cld12 (Nitta *et al.*, 2003) exprimiert. Während die Funktion von Cld12 ungeklärt ist, führt der Verlust von Cld3 aus den TJs der Blut-Hirnschranke zum Zusammenbruch der Diffusionsbarriere durch die Auflösung der TJs (Wolburg *et al.*, 2003).

Cld5 wurde ursprünglich unter dem Namen TMVCF (*transmembrane protein deleted in VCFS*) als ein Gen unter mehreren beschrieben, das bei Patienten mit der Erbkrankheit des DiGeorge- oder velokardiofazialen Syndroms (VCFS) verloren gegangen ist (Sirotkin *et al.*, 1997). Außer in GKEZ wird Cld5 in den TJs von endothelialen Zellen, nicht jedoch in den TJs der meisten Epithelien exprimiert (Morita *et al.*, 1999c).

Cld3 ist auch als RVP.1 (*rat ventral prostate*) bekannt (Briehl und Miesfeld, 1991) und findet sich unter anderem in den dichteren Segmenten der Nephrone (Kiuchi-Saishin *et al.*, 2002), in den TJs der Blut-Hirnschranke (Wolburg *et al.*, 2003), in der Prostata, der Leber und in intestinalen Epithelzellen (Rahner *et al.*, 2001).

### **1.3.2 Claudine bilden großen- und ionenselektive Poren im parazellulären Spalt**

TJs bilden keine undurchdringliche Diffusionsbarriere im interzellulären Spalt, sondern sind je nach Epithel oder Endothel unterschiedlich dicht für Ionen, Wasser und Moleküle aller Art. Um diese Selektivität zu ermöglichen, ist die Existenz von parazellulären Poren postuliert worden, die gewebespezifisch eine molekulare Ausschlussgröße und Ionenselektivität aufweisen (Colegio *et al.*, 2002). Eine Reihe von Studien wurde zur Ermittlung des Porendurchmessers veröffentlicht. So ergab z. B. eine Untersuchung des transepithelialen Transports mit radioaktiven, nichtelektrolytischen Substanzen verschiedener Radien für ein undichtes Epithelium einen Ausschlussradius von 6 Å (Spring, 1998). Eine Studie mit 24 Polyethylenglykolen unterschiedlicher Größe, die einen molekularen Radius zwischen 3,5 und

7,4 Å aufweisen, ergab für die Poren in Caco-2- und T84-Zellen einen Porenradius zwischen 4,3 und 4,5 Å (Watson *et al.*, 2001). Eine direkte Beteiligung der Claudine an der Größenselektivität der TJs wird durch Cld5-*Knock out*-Mausembryos gestützt, deren Blut-Hirnschranke die Dichtheit gegenüber kleinen Molekülen verloren hat (Nitta *et al.*, 2003).

Neben der Größenselektivität ist auch der Einfluss von Claudinen auf die Ionenselektivität, insbesondere von Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Ionen, untersucht worden. Epitheliale Zelllinien weisen unterschiedliche Ionenselektivitäten auf. Madin-Darby *canine kidney* (MDCK)-I-Zellen (epitheliale Hundenierenzellen) sind z. B. kationenselektiv, während z. B. LLC-PK1-Zellen anionenselektiv sind (Hou *et al.*, 2006). Transfektionen dieser Zellen mit Konstrukten verschiedener Claudine (siehe Tab. 1.1) oder *Knock down*-Experimente gegen endogen exprimierte Claudine (Hou *et al.*, 2006) verändern die ionenselektiven Eigenschaften dieser Zellen. Zusammengefasst reduzieren die Claudine 4, 5, 8, 11, 14 und 19 selektiv die Permeabilität für Kationen (Na<sup>+</sup>), wohingegen die Claudine 2, 7, 15 und 16 die Kationenpermeabilität (Na<sup>+</sup>) erhöhen und möglicherweise parazelluläre Kationenporen bilden (Tab. 1.1). Zumindest für Cld7 sind die Daten kontrovers, demnach könnte Cld7 auch parazelluläre Anionenporen bilden (Hou *et al.*, 2006).

Von MDCK-Zellen existieren zwei Stämme, die beide morphologisch nicht unterscheidbare

**Tab. 1.1: Effekte von exogen exprimierten Claudinen auf elektrophysiologische Eigenschaften epithelialer Zellkulturen**

Protein	Zelltyp	TEER	P <sub>Na</sub>	P <sub>Cl</sub>	Referenz
Cld1	MDCK	↑	n.a.	n.a.	Inai <i>et al.</i> , 1999
Cld1	MDCK	↑	n.a.	n.a.	McCarthy <i>et al.</i> , 2000
Cld2	LLC-PK1	↓	↑	n.a.	Van Itallie <i>et al.</i> , 2003
Cld2	MDCK-I	↓	n.a.	n.a.	Furuse <i>et al.</i> , 2001
Cld2	MDCKC7	↓	↑	unverändert	Amasheh <i>et al.</i> , 2002
Cld2	MDCK-II	unverändert	n.a.	n.a.	Van Itallie <i>et al.</i> , 2003
Cld4	MDCK-II	↑	↓	unverändert	Van Itallie <i>et al.</i> , 2001
Cld4	LLC-PK1	↑	n.a.	n.a.	Van Itallie <i>et al.</i> , 2003
Cld5	MDCK-II	↑	↓	unverändert	Wen <i>et al.</i> , 2004
Cld7	LLC-PK1	↑	↑	↓	Alexandre <i>et al.</i> , 2005
Cld8	MDCK-I	↑	↓	unverändert	Yu <i>et al.</i> , 2003
Cld11	MDCK-II	↑	n.a.	n.a.	Van Itallie <i>et al.</i> , 2003
Cld11	LLC-PK1	↓	n.a.	n.a.	Van Itallie <i>et al.</i> , 2003
Cld14	MDCK-II	↑	↓	unverändert	Ben Yosef <i>et al.</i> , 2003
Cld15	LLC-PK1	↓	↑	n.a.	Van Itallie <i>et al.</i> , 2003
Cld15	MDCK-II	↑	unverändert	n.a.	Colegio <i>et al.</i> , 2002
Cld16	LLC-PK1	↓	↑	unverändert	Hou <i>et al.</i> , 2005
Cld19	MDCK-II	↑	↓	unverändert	Angelow <i>et al.</i> , 2007

P<sub>Na</sub>: Permeabilität für Na<sup>+</sup>-Ionen; P<sub>Cl</sub>: Permeabilität für Cl<sup>-</sup>-Ionen; n.a.: nicht analysiert  
MDCK-C7: wie MDCK-I-Zellen; hoher TEER und niedrige P<sub>Na</sub>



TJ-Stränge bilden, jedoch unterschiedliche TEER-Werte aufweisen (Stevenson et al., 1988; Gonzales-Mariscal et al., 1989). Die TEER-Werte von MDCK-II-Zellen ( $\sim 100 \Omega \times \text{cm}^2$ ) sind bedeutend niedriger als von MDCK-I-Zellen ( $> 1000 \Omega \times \text{cm}^2$ ; Schneeberger und Lynch, 2004). MDCK-II-Zellen exprimieren Cld1, Cld2, Cld4 und Cld7 und MDCK-I-Zellen Cld1, Cld4 und Cld7 (Furuse *et al.*, 2001; Hou *et al.*, 2006). LLC-PK1-Zellen (Schweinenierenepithelzellen;  $\sim 100 \Omega \times \text{cm}^2$ ) exprimieren Cld1, Cld3, Cld4 und Cld7 (Hou *et al.*, 2006).

### 1.3.3 Struktur und Funktion der ersten extrazellulären Schleife

Die erste extrazelluläre Schleife (1.EZS) der Claudine umfasst ca. 50 Aminosäuren, die an bestimmten Positionen hoch konserviert sind. Das Motiv  $\text{GLWxxC}_{(8-10 \text{ Aminosäuren})}\text{C}$  findet sich in allen Claudinen und einigen entfernter verwandten Proteinen (PMP22, EMP, MP20 und der  $\gamma 5$ -Untereinheit des spannungsgesteuerten Calcium-Kanals).

Mehrere Studien belegen eine Beteiligung der 1.EZS der Claudine an der Ionenselektivität und Porenbildung. So lässt sich die für Cld4 beschriebene Abnahme der Kationenpermeabilität (siehe Tab. 1.1) nach Überexpression von Cld4 in MDCK-II-Zellen nicht in Cld4-Mutanten beobachten, bei denen basische Aminosäuren der 1.EZS gegen saure Aminosäuren substituiert sind (Colegio *et al.*, 2002). Der Austausch der drei sauren Aminosäuren der 1.EZS von Cld15 gegen basische Aminosäuren erhöht hingegen die Anionenpermeabilität im Vergleich zur Kationenpermeabilität (Colegio *et al.*, 2002). Die 1.EZS von Cld16 (Paracellin-1) weist zehn negativ und vier positiv geladene Aminosäurepositionen auf. Systematische Aminosäuresubstitutionen der negativ geladenen Aminosäurepositionen durch ungeladene Aminosäuren bewirken in LLC-PK1-Zellen den Verlust der durch Cld16 induzierten Erhöhung der  $\text{Na}^+$ -Permeabilität (Tab. 1.1). Die Substitutionen der positiv geladenen Aminosäuren gegen ungeladene Aminosäuren haben keinen Einfluss auf die  $\text{Na}^+$ -Permeabilität (Hou *et al.*, 2005). Dies unterstreicht die Bedeutung der negativ geladenen Aminosäuren in der 1.EZS für die Kationenselektivität der Claudine.

Darüber hinaus zeigen weitere Mutationen in der 1.EZS (H71D, L75P, L81F/W) von Cld16 eine funktionelle Relevanz, da sie, wie viele der geladenen Aminosäurepositionen, als Ursache für *familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis* (FHHNC) identifiziert wurden (Simon *et al.*, 1999; Weber *et al.*, 2001; Kausalya *et al.*, 2006). FHHNC ist eine rezessive Nierenerkrankung der parazellulären Magnesium- und Calcium-Reabsorption im distalen Tubulus der Henle'schen Schleife.

Kürzlich konnte eine Mutation in der 1.EZS von Cld19 (Q57E) entdeckt werden, die ebenfalls Hypomagnesiämie (angeborene Magnesiumverlustkrankung) auslöst (Konrad *et al.*, 2006). Die Mutation eines der beiden konservierten Cysteine in der 1.EZS von Cld5 gegen Alanin (C64A) hebt den TEER-steigernden Effekt von Cld5 in MDCK-II-Zellen auf. C64A erhöht außerdem stark die parazelluläre Permeabilität für Monosaccharide wie Mannitol, Methylglucose, Glucosamin und Salicylsäure (Wen *et al.*, 2004).

### 1.3.4 Zytoplasmatische und transmembranale Regionen

Die N-terminale Sequenz der Claudine besteht aus zwei bis sechs Aminosäureresten; eine Funktion konnte ihr bisher nicht zugewiesen werden. Der C-Terminus ist etwas länger und endet mit Ausnahme von Cld12 in einem PDZ-Bindemotiv, das zumindest mit den PDZ-Domänen von ZO-1, ZO-2, ZO-3 (Itoh *et al.*, 1999), MUPP1 (Multi-PDZ domain protein 1; Hamazaki *et al.*, 2002; Jeansonne *et al.*, 2003) und PATJ (Roh *et al.*, 2002) interagieren kann. Diese Proteine, mit drei oder mehr PDZ-Domänen, bilden ein Gerüst an der zytoplasmatischen Seite der TJs, das die Claudine mit dem Zytoskelett und anderen Proteinen verbindet und deren TJ-Lokalisation reguliert. Cld-Mutanten, denen die PDZ-Bindedomäne fehlt oder Claudine mit Proteinfusionen am C-Terminus, die somit nicht mehr mit PDZ-Proteinen interagieren können, lokalisieren dennoch an Zell-Zell-Kontakten und bilden TJ-Stränge (Furuse *et al.*, 1998a). Diese TJ-Stränge sind jedoch schlecht organisiert und nicht auf den apikalen Pol der Zellen beschränkt (McCarthy *et al.*, 2000).

Die meisten Claudine beinhalten in der C-terminalen Sequenz potentielle Serin- und/oder Threonin-Phosphorylierungsstellen. Beispielsweise wurde gezeigt, dass in Cld1 Thr203 (Ratte) durch Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK; Fujibe *et al.*, 2004) und Protein Kinase C (PKC; Nunbhakdi-Craig *et al.*, 2002) phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung von Thr207 in Cld5 (Ratte; Ishizaki *et al.*, 2003; Soma *et al.*, 2004) und Thr192 in Cld3 (Mensch; D'Souza *et al.*, 2005) wird durch die cAMP-abhängige Protein Kinase A (PKA) bewirkt und Cld1 bis Cld4 werden zudem durch die Thr/Ser-Kinase WNK4 phosphoryliert (Yamauchi *et al.*, 2004). Für Tyr208 in Cld4 (Mensch), das innerhalb der PDZ-Bindesequenz liegt, konnte die Phosphorylierung durch die Rezeptor-Tyrosin-Kinase EphA2 nachgewiesen werden. Diese Phosphorylierung führt zur reduzierten Assoziation von Cld4 mit ZO-1 und vermindert die Lokalisation von Cld4 in Zell-Zell-Kontakten (Tanaka *et al.*, 2005). Eine Veränderung des Phosphorylierungsniveaus steht im direkten Zusammenhang mit veränderten Barriereigenschaften (Soma *et al.*, 2004). Zudem besteht ein Zusammenhang zwischen

veränderten Phosphorylierungsniveaus und pathologischen Zuständen wie z. B. Krebserkrankungen (Yamauchi *et al.*, 2004; D'Souza *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2005).

Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass die C-terminale Region der Claudine für die Proteinstabilität von Bedeutung ist, die Cld2 eine Halbwertszeit von >12 h und von Cld4 ca. 4 h vermittelt (Van Itallie *et al.*, 2004).

Für die TJ-Lokalisation ist die Palmitoylierung der membrannahen Cysteine in der intrazellulären Schleife und dem C-Terminus von Cld14 wichtig (Van Itallie *et al.*, 2005).

Die vier postulierten Transmembransegmente der Claudine sind bisher nicht experimentell bestätigt worden und basieren auf Sekundärstrukturvorhersagen. Kaum untersucht, zeugen allein humanpathogene Mutationen in den Transmembransegmenten verschiedener Claudine von deren Bedeutung für die Lokalisation der Claudine in der Plasmamembran (Cld14: Wattenhofer *et al.*, 2005; Cld16: Hou *et al.*, 2005; Cld19: Konrad *et al.*, 2006).

### 1.3.5 Struktur und Funktion der zweiten extrazellulären Schleife

Die zweite extrazelluläre Schleife (2.EZS) umfasst ungefähr 20 Aminosäuren deren Aminosäuresequenz innerhalb der Claudine weniger hoch konserviert ist, als die der Transmembranregionen der Claudine (Hewitt *et al.*, 2006).

Die 2.EZS der Claudine wurde nur wenig untersucht und ihre Funktion ist unbekannt. Einige Aminosäuresubstitutionen der 2.EZS von Cld16 (A139T, R146T und S165P) beeinträchtigen die Lokalisation von Cld16 in den TJs (Hou *et al.*, 2005). In Cld7 bewirkt der Austausch von negativen gegen positiv geladene Aminosäuren in der 1.EZS (D38R, E53K), nicht jedoch in der 2.EZS (D149R, E160K), die Steigerung der Cl<sup>-</sup>-Permeabilität der TJs von LLC-PK1-Zellen, ohne die subzelluläre Lokalisation von Cld7 zu beeinflussen (Alexandre *et al.*, 2007).

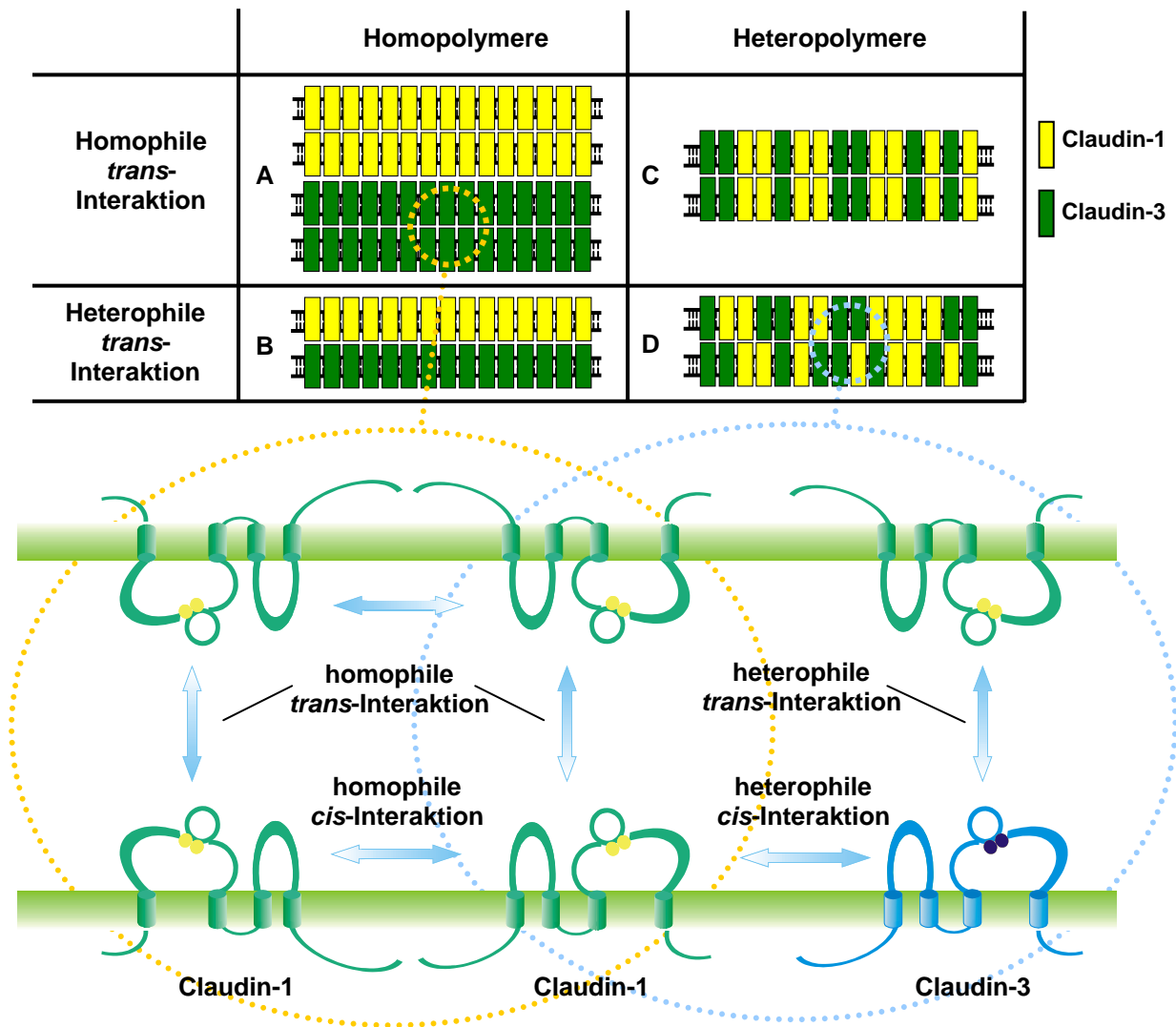
Colegio *et al.* stellten 2003 Chimären von Cld2 und Cld4 her, in denen die beiden extrazellulären Schleifen von Cld2 (einzeln oder zusammen) gegen die von Cld4 ausgetauscht wurden, und umgekehrt. Nach der Expression dieser Chimären in MDCK-II-Zellen ergab sich eine Beteiligung der 1.EZS, nicht jedoch der 2.EZS, an der Ionenselektivität und Porenbildung. Wie die Experimente außerdem zeigten, wird die TJ-Strangmorphologie nicht von den EZS bestimmt. Diese unterscheidet sich zwar für Cld2 und Cld4, nicht aber zwischen den jeweiligen Wildtypen und den Chimären.

### 1.3.6 Cis- und trans-Interaktionen von Claudinen

TJ-Stränge innerhalb einer Plasmamembran interagieren mit parallel orientierten TJ-Strängen in der gegenüberliegenden Membran der benachbarten Zelle und formen gepaarte TJ-Stränge (Furuse *et al.*, 1999). Eine direkte molekulare Interaktion der TJ-Stränge und der Proteine, die

diese Stränge aufbauen, wird allgemein angenommen. Da die Expression von Claudinen in TJ-losen Zellen, die weder Occ noch JAM exprimieren, zur *de novo*-Generierung von TJ-Strängen führt, die an Zell-Zell-Kontakten lokalisieren, ist eine direkte Interaktion der Claudine sehr wahrscheinlich.

Furuse *et al.* haben 1999 ein Modell zur Interaktion Cld-basierter TJ-Stränge (Cld-Stränge) vorgestellt. Demnach muss zwischen homopolymeren (Abb. 1.4 A und B) und heteropolymeren (Abb. 1.4 C und D) Cld-Strängen innerhalb einer Plasmamembran unterschieden werden, die entsprechend homophile (Abb. 1.4 A und C) oder heterophile



**Abb. 1.4: Modell der homophilen und heterophilen *cis*- und *trans*-Interaktionen von Claudinen.**

Schema der homophilen und heterophilen *cis*- und *trans*-Interaktion in TJs am Beispiel von Cld1 und Cld3. Innerhalb der Plasmamembran einer Zelle interagieren Claudine einer Art (z. B. Cld3) durch homophile *cis*-Interaktion, während Claudine unterschiedlicher Art (z. B. Cld1 und Cld3) durch heterophile *cis*-Interaktion in Kontakt treten (unteres Bild). Homophile *cis*-Interaktion führt zu Homopolymeren (oberes Bild, A und B), während heterophile *cis*-Interaktion die Bildung von Heteropolymeren bedingt (oberes Bild, C und D). Der Verschluss des parazellulären Raums zwischen zwei Cld-exprimierenden Zellen wird durch *trans*-Interaktion der extrazellulären Schleifen von Claudinen einer Art (homophil) oder verschiedener Art (heterophil) bewirkt. Im Modell kann homophile oder heterophile *trans*-Interaktion sowohl zwischen Homopolymeren (A und B) als auch zwischen Heteropolymeren stattfinden (C und D). Nicht alle Claudinkombinationen scheinen zur heterophilen *trans*-Interaktion befähigt (Tab.1.2). Modifiziert nach Furuse *et al.*, 1999.

## 1. Einleitung

**Tabelle 1.2: Homo- und Heterophile *trans*-Interaktionen und Cld-Strangbildung verschiedener Claudine exogen exprimiert in *tight junction*-losen Zelllinien**

Protein	Zelltyp	<i>trans</i> -Interaktion	TJ-Strangmorphologie	<i>E</i> -face / <i>P</i> -face Assoziation	Kommentar	Referenz
Occ	L	homophil	-	<i>P</i> -face assoziiert	wenige, kurze, gerade TJ-Stränge; punktiertes Muster von Occ in Zell-Zell-Kontakten	Furuse <i>et al.</i> 1998b
Cld1	L	homophil	kontinuierliche TJ-Stränge	<i>P</i> -face assoziiert	unterschiedliche Distanz zwischen den Verzweigungen der TJ-Stränge	Furuse <i>et al.</i> 1998b; Sonoda <i>et al.</i> , 1999
Cld1	NIH/3T3	homophil	kontinuierliche TJ-Stränge	-	lineare TJ-Stränge mit vielen Verbindungen zwischen den TJ-Strängen	Coyne <i>et al.</i> , 2003
Cld2	L	homophil	diskontinuierliche TJ-Stränge	<i>P</i> -/ <i>E</i> -face assoziiert	-	Furuse <i>et al.</i> 1998b; Furuse <i>et al.</i> , 1999
Cld3	L	homophil	kontinuierliche TJ-Stränge	<i>P</i> -face assoziiert	-	Furuse <i>et al.</i> , 1999
Cld3	NIH/3T3	homophil	kontinuierliche TJ-Stränge	-	nichtlineare TJ-Stränge mit wenigen Verbindungen zwischen den TJ-Strängen	Coyne <i>et al.</i> , 2003
Cld5	HEK-293	homophil	diskontinuierliche TJ-Stränge	<i>E</i> -face assoziiert	-	Piontek <i>et al.</i> , 2007
Cld5	NIH/3T3	homophil	diskontinuierliche TJ-Stränge	-	-	Coyne <i>et al.</i> , 2003
Cld5	L	homophil	diskontinuierliche TJ-Stränge	<i>E</i> -face assoziiert	-	Morita <i>et al.</i> , 1999b
Cld6	L	homophil	diskontinuierliche TJ-Stränge	<i>P</i> -/ <i>E</i> -face assoziiert	-	Morita <i>et al.</i> , 2002
Cld6	HEK-293	homophil	-	-	-	Turksen and Troy., 2001
Cld6	COS-7	homophil	diskontinuierliche TJ-Stränge	<i>P</i> -/ <i>E</i> -face assoziiert	geschwungene, verzweigte TJ-Stränge	Nunes <i>et al.</i> , 2006
Cld9	COS-7	homophil	diskontinuierliche TJ-Stränge	<i>P</i> -/ <i>E</i> -face assoziiert	geschwungene, verzweigte TJ-Stränge	Nunes <i>et al.</i> , 2006
Cld11	L	homophil	diskontinuierlich TJ-Stränge,	<i>P</i> -face assoziiert	große Zahl, wenig verzweigt, oft parallel verlaufend und mit unregelmäßiger Distanz zwischen den Partikeln	Morita <i>et al.</i> , 1999c
Cld14	L	homophil	kontinuierliche TJ-Stränge	-	kurze TJ-Stränge	Wattenhofer <i>et al.</i> 2005
Cld14	COS-7	-	-	<i>P</i> -/ <i>E</i> -face assoziiert	vielfach parallel verlaufende TJ-Stränge	Nunes <i>et al.</i> , 2006
Cld19	L	homophil	kontinuierliche TJ-Stränge	-	-	Miyamoto <i>et al.</i> , 2005
Occ/Cld1	L	-	kontinuierliche TJ-Stränge	<i>P</i> -face assoziiert	gleichen morphologisch denen von Cld1; Heteropolymere aus Occ und Cld1	Furuse <i>et al.</i> , 1998b
Cld1/Cld2	L	nicht heterophil	diskontinuierliche TJ-Stränge	<i>P</i> -/ <i>E</i> -face assoziiert	Heteropolymere aus Cld1 und Cld2	Furuse <i>et al.</i> , 1999
Cld1/Cld3	L	heterophil	kontinuierliche TJ-Stränge	<i>P</i> -face assoziiert	Heteropolymere aus Cld1 und Cld3	Furuse <i>et al.</i> , 1999
Cld1/Cld3	NIH/3T3	-	kontinuierliche TJ-Stränge	<i>P</i> -face assoziiert	-	Coyne <i>et al.</i> , 2003
Cld2/Cld3	L	heterophil	diskontinuierliche TJ-Stränge	<i>P</i> -/ <i>E</i> -face assoziiert	Heteropolymere aus Cld2 und Cld3	Furuse <i>et al.</i> , 1999
Cld1/Cld3/Cld5	NIH/3T3	-	kontinuierliche TJ-Stränge	<i>P</i> -face assoziiert	-	Coyne <i>et al.</i> , 2003

L: Maus-L-Fibroblasten; NIH/3T3: Maus-Fibroblasten-Zelllinie; COS-7: *African green monkey* Nierenzellen, Fibroblasten ähnliche Zelllinie

(Abb. 1.4 B und D) Interaktionen mit Cld-Strängen der benachbarten Zelle eingehen können. Der Interaktion der Cld-Stränge liegt die Interaktion einzelner Claudine zugrunde, die in dieser Studie innerhalb einer Plasmamembran als *cis*-Interaktion und zwischen zwei benachbarten Zellen als *trans*-Interaktion bezeichnet wird (Abb. 1.4, unterer Teil). Die Bezeichnung *cis*- und *trans*-Interaktion wurde für die beobachteten Interaktionen zwischen Cadherinen (*Adherens junctions*) definiert und hier übernommen (Ahrens *et al.*, 2002). Unterstützung erhält das Modell bisher durch Einzeltransfektionen von Claudinen in TJ-lose, eukaryotische Zellen. Exprimiert in Maus-L-Fibroblasten, HEK-293- oder COS-7-Zellen formieren die Claudine 1, 2, 3, 5, 6, 9, 11, 14 und 19 in der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie homopolymere Cld-Stränge unterschiedlicher, Cld-spezifischer Morphologie (siehe Tab. 1.2). Auch wenn die Strangmorphologie variiert, können Stränge, die von den Claudinen 1, 3, 14 und 19 gebildet werden, als kontinuierliche, *P-face* assoziierte Stränge klassifiziert werden. Die Claudine 2, 5, 6, 9 und 11 bilden hingegen *P-* und/oder *E-face* assoziierte, diskontinuierliche Partikel-Stränge. Durch Cld11 (Morita *et al.*, 1999b) oder Cld14 (Nunes *et al.*, 2006) induzierte Stränge zeigen lineare, parallel verlaufende Morphologie. Die homopolymere Strangbildung aller analysierten Claudine geht einher mit der Anreicherung der Claudine an Zell-Zell-Kontakten zwischen zwei Cld-exprimierenden Zellen. Das zeigt die Fähigkeit zur homophilen *trans*-Interaktion dieser Claudine. Für die heteropolymere Strangbildung gibt es eine Reihe von Hinweisen. Zum Beispiel polymerisieren endogenes Cld1 und Cld3 in Gallenkanälchen als heteropolymere Cld-Stränge, wie in Gefrierbruchstudien mit Cld1 bzw. Cld3 spezifischen Antikörpern nachzuweisen ist (Furuse *et al.*, 1999). Nach Kotransfektionen von Cld1 und Cld2, Cld1 und Cld3 sowie Cld2 und Cld3 in L-Fibroblasten, bilden sich ebenfalls heteropolymere Cld-Stränge, die mit heteropolymeren Strängen der benachbarten Zelle interagieren (*trans*-Interaktion; Furuse *et al.*, 1999).

Wie mit Immunfluoreszenzmikroskopie gezeigt werden konnte, kommt es in Kokulturen von stabil transfizierten L-Fibroblasten zu heterophiler *trans*-Interaktion zwischen Cld1 und Cld3 sowie Cld2 und Cld3, nicht jedoch zwischen Cld1 und Cld2 (Furuse *et al.*, 1999).

Direkter lässt sich die Interaktion der Claudine durch Koimmunopräzipitation nachweisen (Cld1 und Cld3, Cld3 und Cld5, aber nicht Cld1 und Cld5; Coyne *et al.*, 2003). Allerdings kann hier nicht sicher zwischen *cis*- und *trans*-Interaktion unterschieden werden.

### 1.3.7 Claudin-assoziierte Krankheiten

Viele Erkrankungen gehen mit veränderten Barrierefunktionen der TJs einher oder lösen diese aus, darunter inflammatorische Darmerkrankungen, Nierenerkrankungen, Krebserkrankungen, bakterielle sowie virale Infektionen (Sawada *et al.*, 2003; Mullin *et al.*, 2005).

Ein Teil dieser Erkrankungen steht mit veränderter Expression oder subzellulärer Lokalisation von Claudinen im Zusammenhang. Verursacht durch Entzündungen können z. B. im Gehirn Ödeme entstehen, die den Verlust der Barriereigenschaften der Blut-Hirnschranke bewirken. Im Mausmodell experimentell ausgelöste autoimmune Enzephalomyelitis, sowie in humanen Geweben von Patienten mit *Glioblastoma multiforme*, zeigt sich ein selektiver Verlust von Cld3 aus den TJs, während andere TJ-Proteine unbeeinflusst bleiben (Wolburg *et al.*, 2003).

Im sigmoiden Dickdarm von Patienten mit Morbus Crohn ist die Expression von Cld5 und Cld8 herunterreguliert und die von Cld2 hochreguliert, während die Expression von Cld1, Cld4 und Cld7 unverändert ist (Zeissig *et al.*, 2007).

Veränderungen der Genexpression von Claudinen sind auch bei humanen Tumorerkrankungen zu beobachten (Morin, 2005; Swisshelm *et al.*, 2005). In den meisten Tumorarten ist die Expression einiger Claudine herunterreguliert, während andere hochreguliert werden. Die Expression von Cld1 ist z. B. in spinzellulären Karzinomen, in Glioblastoma multiforme und in Prostata-Adenokarzinomen herunterreguliert (Liebner *et al.*, 2000; Morita *et al.*, 2004; Sheehan *et al.*, 2007). In Fällen von Dickdarmkrebs ist die Expression von Cld1 gesteigert (Miwa *et al.*, 2001). In vielen tumorösen Geweben der Bauchspeicheldrüse, Harnblase, Schilddrüse, Eileitern, Eierstöcken, Magen, Brust, Uterus und Prostata sind insbesondere Cld3, Cld4 und Cld7 verstärkt exprimiert (Hough *et al.*, 2000; Long *et al.*, 2001; Michl *et al.*, 2001; Rangel *et al.*, 2003; Kominsky *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2005; Hewitt *et al.*, 2006). Tumorspezifische Expressionsmuster haben dazu geführt, dass die Verwendbarkeit von Claudinen als Markerproteine für die Tumor-Diagnostik derzeit untersucht wird (Morin, 2005; Hewitt *et al.*, 2006). Möglicherweise steht die gesteigerte Cld-Expression mit der Invasionsfähigkeit von Krebszellen im Zusammenhang. Nach Überexpression von Cld4 in Pankreaskrebszellen konnte die Invasionsfähigkeit und das Potential dieser Zellen Metastasen zu bilden eingeschränkt werden (Michl *et al.*, 2003). Die Überexpression von Cld3 und Cld4 in Eierstockkarzinomen führt hingegen zu gesteigerter Invasionsfähigkeit (Agarwal *et al.*, 2005).

Einige genetisch bedingte Erkrankungen haben ihre Ursache in Mutationen in Claudinen. FHHNC z. B. (siehe Kap. 1.3.3.) geht auf Mutationen in Cld16 zurück (Simon *et al.*, 1999). Einige Fälle von Hypomagnesiämie werden durch Mutationen in Cld19 verursacht (Konrad *et*

*al.*, 2006). Hingegen bewirken Mutationen in Cld14 autosomal rezessive Taubheit (Wilcox *et al.*, 2001; Wattenhofer *et al.*, 2005).

Für das Hepatitis-C-Virus ist kürzlich die Beteiligung der 1.EZS von Cld1 als einer der Korezeptoren für den Eintritt des Virus in die Wirtszelle beschrieben worden, was durch Antikörper gegen die 1.EZS von Cld1 verhindert werden kann (Evans *et al.*, 2007).

Eine Reihe von Bakterienarten wie z. B. *Shigella flexneri* (Sakaguchi *et al.*, 2002), *Campylobacter jejuni* (Chen *et al.*, 2006), enteropathogene *Escherichia coli* (Muza-Moons *et al.*, 2004), *Helicobacter pylori* und *Clostridium perfringens* bewirken einen Zusammenbruch der parazellulären Barrierefunktion und der TJs. *Helicobacter pylori* öffnet durch die Aktivierung der *Myosin light chain*-Kinase die epitheliale Barriere des Magenepithels, was mit dem Verlust von Cld4 und Cld5 aus den TJs einhergeht (Fedwick *et al.*, 2005).

### **1.4 Clostridium perfringens Enterotoxin**

*Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPE) steht im Zusammenhang mit *Clostridium perfringens* Typ A Lebensmittelvergiftungen und ist die molekulare Ursache für weitere Magen-Darm-Erkrankungen (Smedley, III *et al.*, 2004). Während der Sporulationsphase kann CPE bis zu 20 % der Gesamtproteinmasse im Bakterium ausmachen (Czeczulin *et al.*, 1993) und akkumuliert im Zytoplasma in Form von parakristallinen *Inclusion bodies* (Labbe, 1989). CPE lysiert kultivierte Epithelzellen von Darm, Leber und Niere verschiedener Tierarten (Matsuda und Sugimoto, 1979; McClane und McDonel, 1979; McDonel, 1980; Tolleshaug *et al.*, 1982).

#### **1.4.1 Bindung und Lyse epithelialer Zellen**

CPE besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette von 319 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 35,3 kDa. Der CPE-Bindungsmechanismus an CPE-sensitive eukaryotische Zellen beginnt mit der Bindung an Claudine (Katahira *et al.*, 1997b). Dadurch bildet sich ein ca. 90 kDa großer, SDS-sensitiver Komplex („kleiner Komplex“; Wieckowski *et al.*, 1994), in den weitere Membranproteine integriert werden, so dass sich ein ca. 155 kDa großer, SDS-resistenter Komplex („großer Komplex“) formt (Wnek und McClane, 1989; Wieckowski *et al.*, 1994; Katahira *et al.*, 1997a). Die mit der Bildung des großen Komplexes einhergehende, massive Veränderung der Membranpermeabilität für kleine Moleküle (<200 Da; McClane und McDonel, 1980), führt zum Zusammenbruch des Kolloid-osmotischen Gleichgewichts (McClane, 1984). Möglicherweise wird CPE als Teil des ~155 kDa Komplexes partiell in die Plasmamembran eingebracht und verändert die



Membranpermeabilität durch Bildung einer transmembranalen CPE-Pore (Wieckowski *et al.*, 1998; Smedley, III *et al.*, 2007). Der Calcium-Einstrom durch diese CPE-Pore bewirkt in Abhängigkeit von der CPE-Konzentration den Zelltod durch apoptotische oder onkotische Nekrose (Chakrabarti *et al.*, 2003; Chakrabarti und McClane, 2005). Die Schädigung der Zellen bewirkt den Zusammenbruch der TJs und ermöglicht CPE-Molekülen auch mit TJ-Proteinen im basolateralen Kompartiment zu interagieren, woraufhin sich ein Komplex von ca. 200 kDa bildet. Dieser zweite, größere SDS-resistente Komplex enthält Occ und bewirkt dessen Internalisation, eventuell zusammen mit CPE und Claudinen (Singh *et al.*, 2001).

#### 1.4.2 Claudin-*Clostridium perfringens* Enterotoxin-Interaktion

Nicht alle der 24 bekannten Claudine aus Säugetieren fungieren als CPE-Rezeptoren. CPE wirkt bereits nach einer Stunde zytotoxisch auf Maus-L-Fibroblasten, die mit Cld3 oder Cld4 transfiziert wurden (Katahira *et al.*, 1997 a, b). Demgegenüber zeigen Cld1- oder Cld2-transfizierte L-Fibroblasten auch nach 24-stündiger Inkubation keine morphologischen Veränderungen (Sonoda *et al.*, 1999). In MDCK-I-Zellen geht Cld4, nicht aber Cld1, aus den TJs verloren, wenn CPE<sub>184-319</sub> zum basolateralen Kompartiment, nicht jedoch in das apikale Kompartiment, gegeben wird (Sonoda *et al.*, 1999). Für die CPE-Bindung an die einzelnen Claudine in transfizierten L-Fibroblasten wurden unterschiedliche Assoziationskonstanten ( $K_a$ ) bestimmt (Tab. 1.3). Während CPE an Zellen bindet, die mit den Claudinen 3, 4, 6, 7, 8 oder 14 transfiziert wurden, zeigen Zellen, die mit den Claudinen 1, 2, 5 und 10 transfiziert wurden, keine Interaktion mit CPE (Sonoda *et al.*, 1999; Fujita *et al.*, 2000).

Für die Bindung von CPE an die CPE-sensitiven Claudine ist die 2.EZS der Claudine essentiell. So konnte gezeigt werden, dass His-CPE<sub>184-319</sub> mit dem Fusionsprotein der 2.EZS von Cld3 interagiert, es jedoch zu keiner Interaktion mit dem Fusionsprotein der 1.EZS von Cld3 sowie der 2.EZS von Cld1 kommt (Fujita *et al.*, 2000).

**Tab. 1.3: Assoziationskonstanten der Interaktion von Claudinen mit *Clostridium perfringens* Enterotoxin**

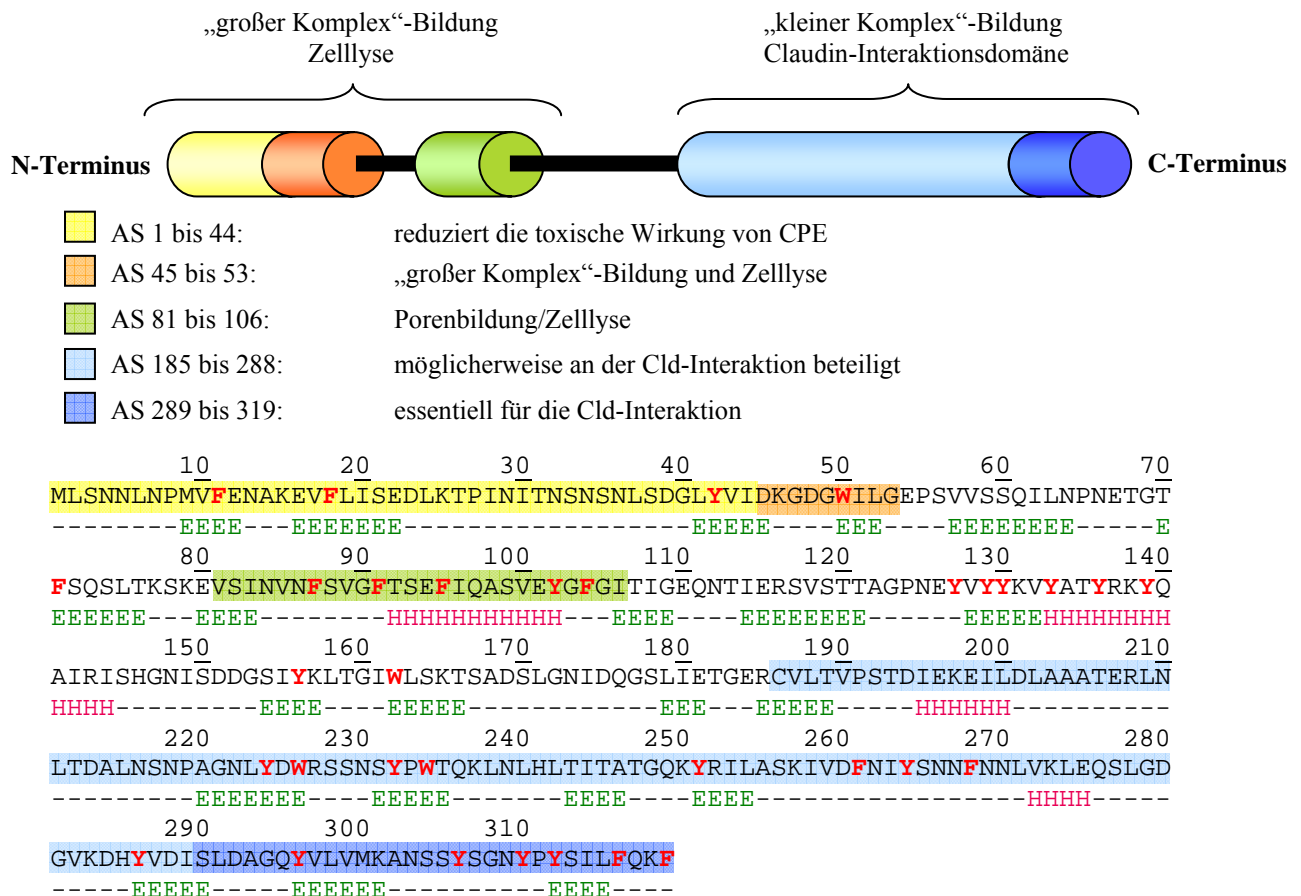
CPE-Protein	Cld-Variante	Assoziationskonstante ( $K_a$ )	Referenz
I <sup>125</sup> -CPE	Intestinale Epithelzellen (Kaninchen)	5,66 x 10 <sup>7</sup> M <sup>-1</sup> hochaffin 8,22 x 10 <sup>6</sup> M <sup>-1</sup> niedrigaffin	McDonel, 1980
I <sup>125</sup> -CPE	Cld3	8,40 x 10 <sup>7</sup> M <sup>-1</sup>	Sonoda <i>et al.</i> , 1999
I <sup>125</sup> -CPE	Cld3	4,60 x 10 <sup>7</sup> M <sup>-1</sup>	Katahira <i>et al.</i> , 1997b
I <sup>125</sup> -CPE	Cld4	1,10 x 10 <sup>8</sup> M <sup>-1</sup>	Sonoda <i>et al.</i> , 1999
I <sup>125</sup> -CPE	Cld4	7,94 x 10 <sup>7</sup> M <sup>-1</sup>	Katahira <i>et al.</i> , 1997b
I <sup>125</sup> -CPE	Cld6	9,70 x 10 <sup>7</sup> M <sup>-1</sup>	Fujita <i>et al.</i> , 2000
I <sup>125</sup> -CPE	Cld7	8,80 x 10 <sup>7</sup> M <sup>-1</sup>	Fujita <i>et al.</i> , 2000
I <sup>125</sup> -CPE	Cld8	1,00 x 10 <sup>6</sup> M <sup>-1</sup>	Fujita <i>et al.</i> , 2000
I <sup>125</sup> -CPE	Cld14	3,60 x 10 <sup>6</sup> M <sup>-1</sup>	Fujita <i>et al.</i> , 2000
His <sub>10</sub> -CPE <sub>184-319</sub>	GST-Cld3 <sub>141-160</sub>	1,00 x 10 <sup>8</sup> M <sup>-1</sup>	Fujita <i>et al.</i> , 2000

### 1.4.3 Funktionelle Regionen von *Clostridium perfringens* Enterotoxin

Als Bindungsdomäne von CPE für Claudine wurde der extreme C-Terminus identifiziert. So reicht der kurze Sequenzabschnitt CPE<sub>290-319</sub> für eine hochaffine Bindung aus (Hanna *et al.*, 1991; Kokai-Kun und McClane, 1997). Eine Deletion der letzten 5, 10, 16 oder 30 Aminosäuren (CPE<sub>1-314</sub>; CPE<sub>1-309</sub>; CPE<sub>1-303</sub>; CPE<sub>1-289</sub>) bewirkt einen Bindungsverlust des Enterotoxins an CPE-sensitive Zellen (Kokai-Kun und McClane, 1997; Takahashi *et al.*, 2005). In CPE<sub>184-319</sub> führen Aminosäuresubstitutionen der Tyrosine Y306, Y310 oder Y312 innerhalb der letzten 30 Aminosäuren des C-terminalen Sequenzabschnitts zur reduzierten Bindung der Mutanten an Cld4-exprimierende L-Fibroblasten und endogenem Cld4 aus Caco-2-Zellen. Doppelmutationen (Y310A/Y312A) verstärken diesen Effekt bis hin zum vollständigen Verlust der Bindung (Y306A/Y310A, Y306A/Y312A), der auch bei der Dreifachmutation Y306A/Y310A/Y312A festzustellen ist (Harada *et al.*, 2007). Die Aminosäuresubstitution von Y306 gegen aromatische Aminosäuren (Y306W, Y306F) reduziert die Bindungseigenschaft von CPE<sub>184-319</sub> kaum. Die Mutante Y306K zeigt hingegen einen ähnlich starken Effekt wie Y306A (Ebihara *et al.*, 2006).

Der N-terminale Abschnitt beinhaltet den zytotoxischen Teil des Enterotoxins. Die zytotoxische Wirkung von CPE<sub>45-319</sub> ist zwei bis dreimal größer als die von CPE<sub>1-319</sub> (Kokai-Kun und McClane, 1997). Verkürzungsstrukturen, die über diese Aminosäureposition hinaus gehen (CPE<sub>53-319</sub>, CPE<sub>69-319</sub>, CPE<sub>103-319</sub> und CPE<sub>168-319</sub>), bewirken den kompletten Verlust der zytotoxischen Aktivität und inhibieren die große Komplexbildung, obwohl die Fähigkeit zur Bindung an Claudine erhalten bleibt. Systematische Aminosäuresubstitutionen innerhalb der Region D45 bis G53 belegen eine wesentliche Beteiligung dieser CPE-Region an der großen Komplex-Bildung und Zellyse. Für die Zytotoxizität sind insbesondere die Aminosäurepositionen D48 und I51 relevant (Smedley, III und McClane, 2004). Durch Zufallsmutagenese von CPE wurden auch kritische Aminosäuresubstitutionen identifiziert, die außerhalb dieser postulierten zytotoxischen Region liegen. Die CPE-Mutanten G49D, S59L, R116S, R137G und S167P sind in ihrer Zytotoxizität eingeschränkt, jedoch zur Bindung an CPE-sensitive Epithelzellen befähigt. Die Mutanten Y310C und W226Stop zeigen keine Bindung mehr. G49D, S59L und R116S formen noch den kleinen Komplex, nicht jedoch, oder nur eingeschränkt (R116S), den großen Komplex (Kokai-Kun *et al.*, 1999). Für CPE-Region 81-106 wurde eine Ähnlichkeit zur  $\beta$ -hairpin-Transmembrandomäne der  $\beta$ -barrel porenbildenden Toxine festgestellt (Smedley, III *et al.*, 2007). Ein CPE-Konstrukt ohne die Region 81-106 bildet ~155 kDa Komplexe, verändert aber nicht die Plasmamembranpermeabilität von Caco-2-Zellen. Wenn in dieses Konstrukt die Aminosäure-

Substitution D48A eingeführt wird, unterdrückt diese die ~155 kDa Komplexbildung (Smedley, III *et al.*, 2007). Daher sind für die Zytotoxizität und die Bildung der großen Komplexe scheinbar zwei verschiedene Sequenzabschnitte verantwortlich. Möglicherweise ist die CPE-Region 81-106 an der Bildung einer CPE-Pore beteiligt. Die für die Bindung, Komplexbildung und Lyse der CPE-sensitiven Zellen bisher identifizierten funktionellen Abschnitte von CPE sind in Abb. 1.5 dargestellt.



**Abb. 1.5: Schematische Darstellung der funktionellen Abschnitte von *Clostridium perfringens* Enterotoxin.** Die schematische Darstellung gliedert *Clostridium perfringens* Enterotoxin in (alle bisher identifizierten) funktionelle Abschnitte. Die Aminosäuresequenz der funktionellen Abschnitte ist entsprechend farbig unterlegt. In der CPE-Aminosäuresequenz sind alle aromatischen Aminosäuren (33 von 319; W, Y, F) durch rote Buchstaben hervorgehoben. Interessanterweise treten aromatische Aminosäuren in einigen Sequenzabschnitten gehäuft auf (87-104; 127-139 und 285-319). Unter der Proteinsequenz ist eine Sekundärstrukturvorhersage für CPE dargestellt, die durch das Programm *Jpred* erstellt wurde (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/>; Cuff *et al.*, 1998). Vorhergesagte  $\beta$ -Faltblätter, sind durch grünfarbige „E“ gekennzeichnet; Vorhergesagte  $\alpha$ -helikale Sequenzabschnitte sind durch rotfarbige „H“ dargestellt.  $\beta$ -Faltblätter sind in der Strukturvorhersage weit häufiger vertreten als  $\alpha$ -Helices.

## 1.5 Zielstellung

Claudine bilden intramembranöse Stränge der TJs und sind essentiell für die Ausbildung der parazellulären Barriere von Epithelien und Endothelien. Es wird postuliert, dass eine direkte Interaktion der extrazellulären Schleifen von Claudinen benachbarter Zellen (*trans*-Interaktion) den Verschluss der Zellzwischenräume bedingt. Für die Bildung der TJ-Stränge

wird eine Interaktion der Claudine innerhalb einer Plasmamembran angenommen (*cis*-Interaktion). Diese hypothetischen Wechselwirkungen der Claudine sind bisher nicht systematisch untersucht worden, und der molekulare Interaktionsmechanismus ist vollständig unklar. Die Aufklärung der Interaktionsmechanismen ist eine Voraussetzung zur Auffindung neuer Strategien, um die Wirkstoffpermeation durch Gewebebarrieren zu verbessern. Die Blut-Hirnschranke z. B. unterbindet als besonders dichte Barriere den Transfer vieler Pharmaka in das Gehirn. Dabei dichtet Cld5 die TJs der Blut-Hirnschranke gegen Moleküle kleiner als 800 Da ab. Die Manipulation der subzellulären Lokalisation von Cld5 könnte eine partielle Öffnung der Blut-Hirnschranke für kleine Moleküle bewirken und so die Wirkstoffzufuhr verbessern. Andererseits ließe sich möglicherweise eine Öffnung der Blut-Hirnschranke unter pathologischen Bedingungen verhindern.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, die verschiedenen Interaktionsmechanismen und die Strangbildung von Cld5 näher zu charakterisieren. Dabei sollte besonders auf die kurze und hoch konservierte 2.EZS fokussiert werden, die aufgrund bioinformatischer Vorhersagen ein Potential zur homophilen Interaktion aufweist. Zunächst sollten Cld5-Fusionsproteine generiert werden, deren Expression und subzelluläre Lokalisation in TJ-losen, dedifferenzierten, embryonalen Nierenepithelzellen (HEK-293) zu untersuchen sind. Mit Hilfe dieser Zelllinie sollten Zellkulturmethoden entwickelt werden, um die subzelluläre Lokalisation, Strangbildung sowie *cis*- und *trans*-Interaktionsfähigkeit von Cld5 getrennt voneinander zu analysieren. Um für diese Eigenschaften essentielle Aminosäuren zu identifizieren, sollten durch ortsgerichtete Mutagenese Aminosäuresubstitutionen in die 2.EZS von Cld5 eingeführt werden. Anhand der gewonnenen Erkenntnisse sollten Cld-Interaktionsmodelle generiert werden.

Ein Ansatz zur Beeinflussung der Permeabilität der Blut-Hirnschranke bietet sich durch das bakterielle Enterotoxin CPE, das an die 2.EZS von Cld3, nicht jedoch von Cld5, bindet. In Epithelien bewirkt CPE die Öffnung der TJs. Eine Manipulation der Bindungseigenschaften von CPE könnte aus dem Enterotoxin einen effektiven Bindepartner für Cld5 und einen Modulator der Barrierepermeabilität machen.

Die genaue Aufklärung des Interaktionsmechanismus und der molekularen Determinanten der Cld-CPE-Interaktion ist dafür Voraussetzung. Beides sollte in dieser Arbeit durch Cld-CPE-Bindungsexperimente mit rekombinanten Proteinen und Peptiden sowie Cld3- bzw. Cld5-transfizierten HEK-293-Zellen in Zellkulturansätzen näher charakterisiert werden. Dazu sollten ebenfalls Mutanten der 2.EZS von Cld5 und von Cld3 analysiert werden.