

## 5 Zusammenfassung

Epithelien und Endothelien bilden in multizellulären Organismen Barrieren, die für die Funktion dieser Organe essentiell sind, jedoch die Wirkstoffpermeation einschränken können. Um die freie Diffusion wasserlöslicher Moleküle durch die Zwischenräume von Epithel- und Endothelzellen zu begrenzen, ist der parazelluläre Spalt zwischen diesen Zellen durch *Tight junctions* (TJ) abgedichtet. TJs erscheinen in der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie als intramembranöse Netzwerke aus Strängen im apikalen Bereich der lateralen Plasmamembran. Strukturelles Rückgrat der TJs der besonders dichten Blut-Hirnschranke sind die Claudine (Cld) 3 und 5. Cld5 dichtet die TJs der Blut-Hirnschranke für Moleküle kleiner als 800 Da ab. Hypothese dieser Arbeit ist, dass die Strangbildung und der Verschluss des parazellulären Spalts auf homo- und heterophile *cis*- und *trans*-Interaktionen der Claudine zurückzuführen ist, deren molekularer Interaktionsmechanismus bisher ungeklärt gewesen ist.

Mit dieser Arbeit wurde eine direkte homophile Selbstassoziation der zweiten extrazellulären Schleife (2.EZS) der Claudine 3 und 5 mit Größenausschlusschromatographie nachgewiesen. Eine Beteiligung der 2.EZS an der *trans*-Interaktion, nicht jedoch an der *cis*-Interaktion, wurde durch systematische Aminosäuresubstitutionen der 2.EZS von Cld5 bewiesen. Zudem wurden molekulare Determinanten identifiziert, die in die *trans*-Interaktion involviert sind. Dazu wurden TJ-lose HEK-293-Zellen verwendet, in denen die homophile *cis*- und *trans*-Interaktion sowie die Strangbildung von Cld5 frei vom Einfluss endogener Claudine untersucht wurde. Die Analyse der *trans*-Interaktionsfähigkeit mittels konfokaler Mikroskopie sowie die Ermittlung der subzellulären Lokalisation der Cld-Mutanten durch Zelloberflächen-Biotinylierung und konfokale Mikroskopie führten zu strukturellen Modellen eines Cld5-Monomers und eines Cld5-*trans*-Dimers. Dazu wurde auf die 2.EZS von Cld5 die sequenzhomologe Teilstruktur eines hypothetischen, bakteriellen Proteins (BB2244) übertragen. Die 2.EZS von Cld5 ist demnach eine Helix-*turn*-Helix-Struktur, deren *turn*-Konformation durch ein Netzwerk aus Wasserstoffbrücken, die Proline P150 und P153 sowie durch hydrophobe Seitenketteninteraktionen zwischen V152 und L160 stabilisiert wird. Nach dem Dimer-Modell *trans*-dimerisiert die 2.EZS durch eine Wechselwirkung von drei aromatischen Seitenketten (F147, Y148, Y158) zweier Schleifen miteinander. Eine potentielle Bindungsstelle der ebenfalls an der *trans*-Interaktion beteiligten Aminosäuren Q156 und E159 konnten bisher nicht identifiziert werden. Die Strukturmodelle lassen sich auf Claudine mit hoher Sequenzhomologie übertragen, die dadurch erstmals als klassische Claudine 1-10, 14, 15, 17 und 19 definiert werden.

Weiterhin wurde das Zusammenspiel von Claudinen bei der Strangbildung hinsichtlich *cis*- und *trans*-Interaktionen untersucht. Mutanten mit gestörter *trans*-Interaktion zeigten in der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie eine stark verringerte Zahl intramembranöser Stränge, obwohl die *cis*-Interaktion unbeeinträchtigt blieb. Es wird ein Schema postuliert, das die Morphologie von Claudin-5-gebildeten diskontinuierlichen Strängen erklärt. Die Partikelkomplexe der diskontinuierlichen Stränge von Cld5 müssen demnach mit den Partikelkomplexen einer benachbarten Zelle *trans*-interagieren, um TJ-Stränge zu bilden. Bei den Partikelkomplexen handelt es sich möglicherweise um Cld5-Hexamere.

Ein weiterer Aspekt der Arbeit ist die Analyse der Wechselwirkungen zwischen der 2.EZS von Claudinen und *Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPE). Durch die Analyse von membrangebundene Peptidbibliotheken wurde die Interaktion von CPE mit Peptiden der 2.EZS der Claudine 3, 6, 7, 9 und 14, nicht jedoch der Claudine 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10-13, 15, 18, 19, 20 und 22 aufgezeigt. Substitutionsanalysen mit membrangebundenen Peptidbibliotheken identifizierten das *turn*-Motiv NPLVP als essentiell für die Interaktion zwischen CPE und den isolierten 2.EZS von Claudinen. Im Gegensatz dazu scheint das *turn*-Motiv für die Interaktion von CPE mit nativen Cld-Molekülen auf der Zelloberfläche von Cld-exprimierenden Zellen ohne Bedeutung zu sein. Das deutet darauf hin, dass die bindungsrelevante Struktur der 2.EZS von Cld5 stark von der Membrantopologie der Claudine abhängt. Durch CPE-Bindungsstudien an transfizierten HEK-293-Zellen wurden zwei bindungsrelevante Aminosäuresubstitutionen, T151A und Q156E, in der 2.EZS von Cld5 identifiziert. Weiterhin wurde gezeigt, dass CPE an Cld-Moleküle außerhalb der TJs von Cld3- bzw. Cld5-exprimierenden HEK-293-Zellen bindet. Die CPE-induzierte Öffnung der TJs durch eine Störung des Polymerisations-/Depolymerisations-Gleichgewichts der Cld-Stränge ist daher wahrscheinlich.

Insgesamt tragen die durchgeführten Untersuchungen zu einem besseren Verständnis der TJ-Struktur bei. Zudem ermöglicht die Charakterisierung der CPE-Cld- bzw. Cld-Cld-Interaktion die Entwicklung von Peptiden oder niedermolekularen Substanzen, die gezielt TJs modulieren, um so z. B. die Wirkstoffzufuhr ins Gehirn zu verbessern.