

1 Einleitung

1.1 Die Blut-Hirn-Schranke

Die Barriere zwischen Blut und Gehirn, entdeckt von Ehrlich (1902) und benannt von Goldmann (1909), erfüllt in erster Linie eine Schutzfunktion, bei der im Blut zirkulierende Fremdstoffe (Bakterien, Viren, Toxine) nicht ins Gehirn gelangen können. Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ist essentiell für die Aufrechterhaltung konstanter Bedingungen in den Kompartimenten des Gehirns, einer Grundvoraussetzung der neuronalen Aktivität und störungsfreien Funktion der Nervenzellen (Abb. 1.1).

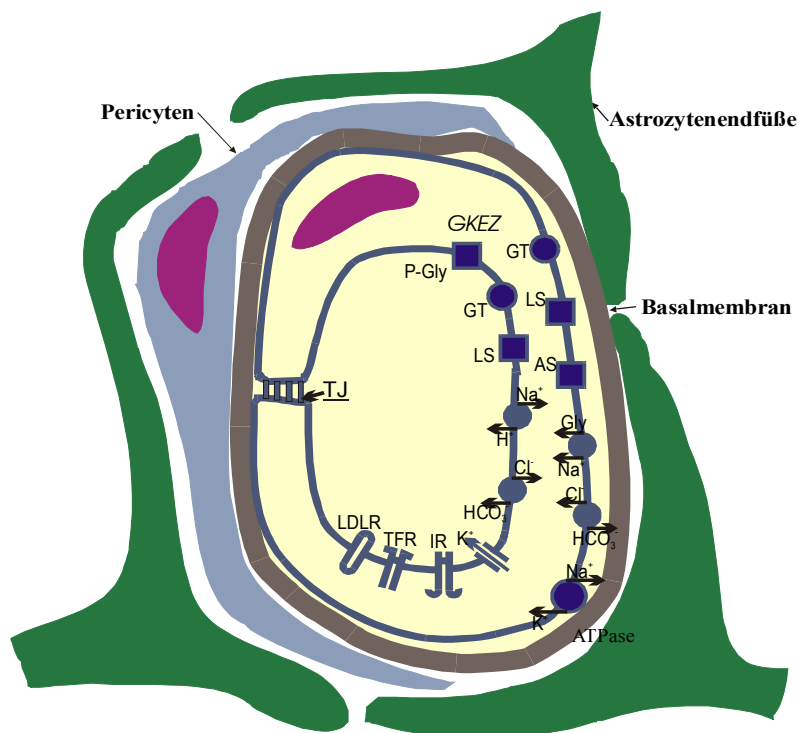


Abb. 1.1 Schematischer Aufbau der Blut-Hirn-Schranke (BHS). Die Gehirnkapillarendothelzellen (GKEZ), die zum großen Teil von den Endfüßen der Astrozyten, Perizyten und einer Basalmembran umhüllt werden, sind über Tight junction (TJ) miteinander verbunden. Neben spezifischen Transportsystemen für essentielle Nährstoffe (GT: Glukose-, AS: Aminosäuren- und LS: Liposaccharidtransporter) existieren Ionenkanäle für Natrium-, Kalium- und Chloridionen und eine rezeptorvermittelte Transzytose (TFR: Transferrin-, LDLR: *low density* Lipidrezeptor, IR: Eisenrezeptoren). Ein bedeutender Transporter der GKEZ ist das P-Glycoprotein, das viele lipophile Stoffe aus dem Gehirn ins Blut transportiert, apikal exprimiert wird und ein funktioneller Bestandteil der BHS ist (Rubin und Staddon, 1999).

Die besonderen strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Gehirnkapillaren, die in einer einzelligen Schicht die Blutgefäße des Gehirns auskleiden und diese mechanisch abdichten, bestehen in der Ausbildung der inter-endothelialen Tight junctions (TJ; Gumbiner,

1987; Rubin, 1992; Schneeberger und Lynch 1992, Citi, 1993; Anderson und Van Itallie, 1995). TJs haben eine besondere Bedeutung bei der physikalischen Trennung benachbarter Kompartimente. Sie sind für die Funktion des Gewebes und die strenge Kontrolle des Umgebungsmilieus lebensnotwendig (BHS, Epithelzellen des Dünndarms). Das Endothelium im Gehirn zeichnet sich durch eine extrem geringe Permeabilität im Bereich der TJ aus. Die TJs limitieren den parazellulären Fluß. Zirkulierende Moleküle können über zwei Transportprozesse in das Gehirn gelangen; durch freie Dissoziation kleiner Moleküle und katalysierten Transport. Glukose als essentielle Energiequelle und Aminosäuren gelangen durch erleichterten Transport über spezifische Systeme durch die Schranke (Glukose- und Aminosäuretransporter). Ionen (Kalium-, Natrium-, Chloridionen) und andere Stoffe (z. B. Transferrin) werden durch Diffusion, aktiven Transport, seltener über Transzytose in Vesikeln aufgenommen (Padridge, 1999). Daneben verhindert die Enzymschranke der GKEZ (endotheliale zytoplasmatische Enzyme) den Transport wasserlöslicher schädlicher Substanzen durch Modifizierung in membranundurchlässige Substanzen (Betz, 1994).

Umgeben werden die Gehirnkapillarendothelzellen (GKEZ) von einer Basalmembran, auf der die Astrozytenendfüße und Perizyten angeordnet sind (Bradbury, 1985). Zwei Eigenschaften der GKEZ tragen zum limitierten molekularen Transport bei: die geringe Rate an Flüssigphasen-Endozytose (transzellulärer Fluß) und der hohe elektrische Widerstand (parazellulärer Fluß, Staddon und Rubin, 1996). Diese Eigenschaften der GKEZ sind entscheidend für die Aufrechterhaltung der geringen Permeabilität der BHS, wodurch sich GKEZ sehr von peripheren Geweben und Organen unterscheiden (Risau, 1995; Rubin und Staddon, 1999).

Der Zeitablauf der Ausbildung der BHS durch die GKEZ ist immer noch Gegenstand einer kontrovers geführten Debatte. In Abhängigkeit der Untersuchungsmöglichkeiten (*in vivo* und *in vitro*, unterschiedliche Gewebe und Organe aus verschiedenen Organismen) wurden unterschiedliche Auffassungen publiziert (ausführlich dazu siehe Reviews: Rubin und Staddon, 1999; Bauer und Bauer, 2000). Eine Proteinschranke scheint schon im frühen Embryonalstadium ausgebildet zu sein (Saunders et al., 1991). Es wird davon ausgegangen, daß zur Aufrechterhaltung der BHS-Eigenschaften in den GKEZ ein kontinuierlicher Stimulus notwendig ist. Die Fähigkeit der Endothelzellen (EZ) des Zentralnervensystems (ZNS), die BHS zu bilden ist nicht intrinsisch, sondern wird durch die ZNS-Umgebung induziert (Abbruscato und Davis, 1999). Verschiedene durch Astrozyten (AZ, Janzer und Raff, 1987; Goldstein, 1988; Rubin et al., 1991a, b; Risau, 1991; Raub, 1996; Yamagata et al., 1997;

Rubin und Staddon, 1999), Neuronen (Bauer und Bauer, 2000) und der extrazellulären Endothelzellmatrix (Raub et al., 1992; Janzer, 1993; Wolburg et al., 1994; Federici et al., 1995; Hurst et al., 1996; Mizuguchi et al., 1997; Pekny et al., 1998) an die Umgebung abgegebene Faktoren induzieren BHS-Eigenschaften in GKEZ und prägen damit den EZ-Phänotyp. Der Einfluß von AZ und der extrazellulären Endothelzellmatrix wird kontrovers geführt. Small (1993) und Holash (1993a, b) haben trotz Abwesenheit eines direkten Kontaktes der Gefäße mit den umgebenden Zellen eine Impermiabilität der Kapillaren in der Iris gefunden. Der direkte Kontakt scheint nicht zur Ausbildung der BHS-Eigenschaften erforderlich zu sein (Goldstein, 1988; Cancilla et al., 1993; Allt und Lawrenson, 1993). Außerdem wird der vollständige EZ-Phänotyp über mehrere Tage bis Wochen ausgebildet, so daß mehrere verschiedene Faktoren Einfluß haben können. Noch dazu ist der beschriebene AZ-Effekt in *in vivo* Untersuchungen nicht erbracht.

Die Entwicklung der TJ in der BHS scheint von zwei primären Prozessen abhängig zu sein: (i) vom Auftreten eines hohen Expressionsniveau der TJ-Proteine (z.B. Occludin) und (ii) von intrazellulären Signalprozessen, die den Status der Phosphorylierung der TJ-Proteine kontrollieren. Welche Faktoren die Ausbildung der TJ in den GKEZ und damit die BHS induzieren, ist immer noch eine offene Frage. Weitere Experimente zur Erklärung der intra- und extrazellulären Ereignisse, der Entwicklung der BHS und deren TJs sind daher notwendig.

Die BHS ist keine undurchlässige Barriere, sondern zeigt eine Ionen- und Größenselektivität und verändert in pathologischen Zuständen ihre Schutzfunktion. Die Zerstörung der TJ der BHS ist ein Kennzeichen und eine Begleiterscheinung vieler neurologischer Erkrankungen des ZNS (Schlaganfall, multiple Sklerose, Alzheimer, bakterielle Meningitis, zerebrale Malaria, AIDS, ischämische Erkrankungen usw., De Vries et al., 1997). Durchblutungsstörungen im Gehirn, ausgelöst durch plötzliche Unterbrechung der Leitungsbahnen im Gehirn (fokale und globale Ischämie), führen zu einer Zellschädigung und Desintegration der Barriere in GKEZ. Die erhöhte Permeabilität kann durch einen verstärkten vesikulären Transport und erhöhter Endozytose, durch Veränderung der Zellmembranzusammensetzung (Verlust ihre zellpolarisierenden Eigenschaften), Umorganisation des Zytoskelettes und Oxidation der Membranlipidschicht bedingt sein (Plateel et al, 1997; Mertsch et al, 1995). Die TJs werden durchlässig. Neutrophile und aktivierte T-Zellen können an entzündete GKEZ binden und die BHS überwinden (De Vries et al., 1997; Dallasta et al., 1999; Huber et al., 2001). So erhöht VEGF, beispielsweise, die

mikrovaskuläre Permeabilität *in vivo*, senkt den transendothelialen elektrischen Widerstand (TEER) und führt zu einem Verlust von Occludin und ZO-1 aus den TJ (Wang et al., 2001). Neben dem untersuchten Einfluß von intrinsischen TJ-Proteinen (integrale Membranproteine) und dem assoziierten Aktinzytoskelett wurde der Effekt von Zytokinen auf die Funktion und Struktur der TJ (*in vivo* und *in vitro*) untersucht (Merrill und Murphy, 1997; Walsh et al., 2000). Die Produktion von Zytokinen durch Zellen der BHS (AZ, Mikroglia, EZ) spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer Antwort auf ZNS-Krankheiten oder bei Entzündungen und beeinflussen somit die Funktion der BHS (De Vries et al., 1997; Benveniste, 1998). Die weitere Erforschung der BHS ist von großer Bedeutung für die Therapie von Störungen der Schrankenfunktion. Andererseits bestehen pharmakologische Interessen bei der Applikation BHS-gängiger Medikamente direkt in die Zellen der BHS, um vor Ort eine gezielte Therapie durchführen zu können. Dabei wäre es notwendig, die BHS temporär durchlässig zu machen. Für die Verwirklichung dieses Ziels ist die Aufklärung der molekularen Basis der BHS-Struktur und der regulatorischen Kontrollmechanismen der TJ von grundlegender Bedeutung.

1.2 Die Bedeutung von Tight junction und deren Bestandteile

1.2.1 Aufbau und Struktur von Tight junctions

Die Bildung verschiedener zellulärer Barrieren wird durch die Polarisation der Endothel- und Epithelzellen sowie die Anheftung der Zellen aneinander induziert. Prinzipiell können verschiedene Typen der Zell-Zell-Verknüpfung unterschieden werden, die Tight junction oder Zonula occludens (TJ), die Strukturen der Zell-Zell-Adhäsion unter Beteiligung des Zytoskeletts (Zonula adhaerens, AJ), die Gap junction (GJ) und die Desmosomen (Farquhar et al., 1963). Der junctionale Komplex befindet sich im oberen apikalen Bereich der lateralen Zellmembran (Abb. 1.2).

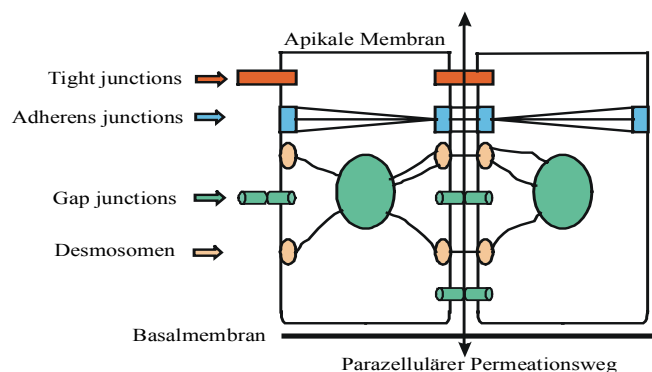


Abb. 1.2. Schematische Vorstellung über die Zell-Zell-Kontaktstrukturen. Dargestellt sind Tight, Adhärenz, Gap junctions und die Desmosomen der GKEZ.

Während die AJs die benachbarten Zellen mechanisch verbinden und die GJs und Desmosomen Kanäle bilden, sind die TJs für die interzelluläre Dichtheit verantwortlich (Schneeberger et al., 1992; Gumbiner, 1993). Neben dieser primären Barrierefunktion haben die TJs die Aufgabe, die apikale von der basolateralen Membran zu trennen (Trennfunktion, Rodriguez-Boulan und Nelson, 1989). Diese unterschiedlichen Zelloberflächendomänen sind wesentlich für die physiologische Funktion des endothelialen und epithelialen Gewebes und führen zur Polarisierung der Zellen. Die Membrandomänen unterscheiden sich in ihrem Aufbau voneinander, da sie das Gewebe vom Blutstrom trennen, unterschiedliche Lipid- und Proteinzusammensetzungen aufweisen und die Bewegung der Membranproteine zwischen der apikalen und basalen Oberfläche einschränken (Balda und Matter, 2000). Der transzelluläre Fluß ist aktiv oder passiv und basiert auf der Aktivität transmembraner Pumpen, Kanäle und Träger, die in polarisierter Manier exprimiert werden. Der parazelluläre Transport ist in Abhängigkeit transzellulärer Transportmechanismen passiv. Er wird über die TJ-Barriere, deren Dichtheit und Ionenselektivität reguliert (Anderson, 2001). Viele der beschriebenen TJ-Untersuchungen wurden an epithelialen Zellen durchgeführt, neuere Studien haben ergeben, daß GKEZ diesen sehr ähnlich sind (Rubin und Staddon, 1999). Aufgrund dieser Tatsache wird in den folgenden Ausführungen zum großen Teil auf epitheliale TJs eingegangen, da grundlegende Eigenschaften auf endotheliale Zellen des Gehirns übertragen werden können. Aufgrund von Ergebnissen elektronenmikroskopischer Untersuchungen unter Verwendung der Gefrierbruchtechnik (*freeze-fracture replica electron microscopy*) konnte gezeigt werden, daß die Zwischenräume benachbarter Zellen völlig verschwinden und es sogar zur Verschmelzung der Membranen kommt (Abb. 1.3).

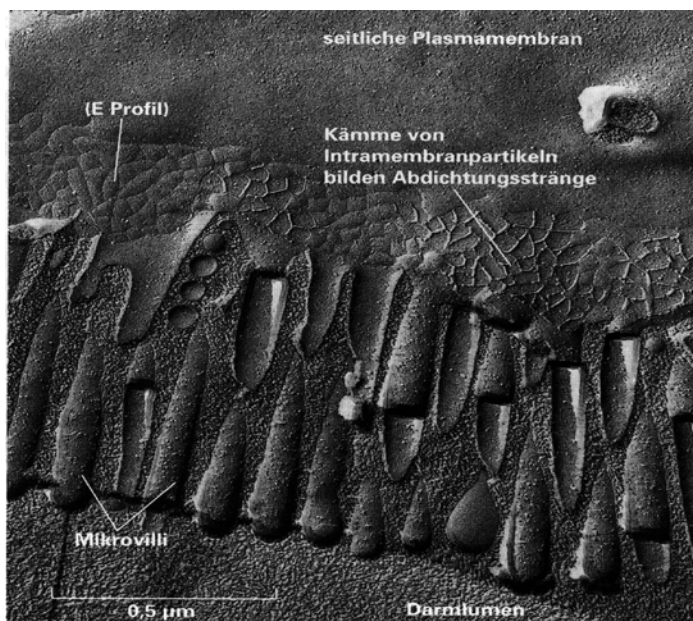


Abb. 1.3 Elektronenmikroskopische Aufnahme von TJs in Epithelzellen (aus Alberts et al., 1995).

Die Elektronenmikroskopie zeigt kontinuierliche, intramembranale Partikelstränge oder Fibrillen in der P-face (Gefrierbruch-Terminologie: innere Membranhälfte) und komplementäre Furchen an der E-face (äußere Membranhälfte) der Zellen (Staehelin, 1973). Die Anzahl der TJ-Stränge und die Frequenz ihrer Verzweigungen variiert in Abhängigkeit vom Zelltyp. Dadurch kommt es zu bemerkenswerten Unterschieden in der Morphologie der TJ-Strangnetzwerke. Die TJs der BHS zeigen eine Gleichverteilung der Partikel auf beiden Membranhälften, während die TJs von EZ peripherer Blutgefäße größtenteils mit der E-face statt der P-face assoziiert sind. Das Verhältnis der Partikelverteilung scheint ein Maß für die Permeabilität zu sein, bei einem Schlaganfall wechseln die Partikel von der P- auf die E-face, das Verhältnis zwischen Claudin-1 und 5 verschiebt sich und Veränderungen in der Polarität der EZ der BHS treten auf (Gerhardt et al. 2000; Liebner et al., 2000, Lippoldt et al., 2000). Bei einer Kultivierung von GKEZ gehen BHS-Eigenschaften im Vergleich zur *in vivo* Situation verloren. Sowohl die Komplexität der TJ als auch die Partikelverschiebung von der P- zur E-face tragen zum Verlust bei. Durch Zugabe von cAMP und Kokultivierung mit AZ kann die Ausbildung der Eigenschaften wieder induziert werden (Wolburg et al., 1994; Liebner et al., 2000).

Es existieren zwei Modelle, um den chemischen Aufbau dieser Strukturen zu erklären. Das eine Modell besteht darin, daß die lipophilen Kopfgruppen der Phosphoglyceride verschmelzen (Kachar und Reese, 1982). Das zweite Modell, bei denen integrale Membranproteine der TJs über bestimmte Domänen oder Bindungsmotive miteinander interagieren und linear polymerisieren, wird durch das Auffinden neuer Proteine unterstützt (Dunina-Barkowskaya, 1998; Tsukita et al., 2001). Welches der beiden Modelle letztendlich entscheidend ist oder ob sogar eine Kombination beider Modelle in Frage kommt, konnte bisher nicht geklärt werden (Abb. 1.4)

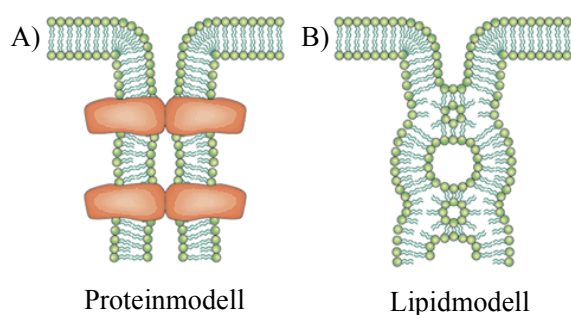


Abb. 1.4 Schematische Modellvorstellungen der TJ-Struktur (Tsukita et al., 2001). A) Proteinmodell. Integrale Membranproteine der TJ repräsentieren die TJ-Stränge. B) Lipidmodell der Membranverschmelzung, bei der die Lipidmycellen Grundlage der TJ-Stränge sind.

Entsprechend ihres Vorkommens variiert die Dichte der TJ, die durch den transendothelialen/epithelialen elektrischen Widerstand (in GKEZ: TEER, in Epithelzellen: TER) gemessen werden kann, gewebespezifisch (Schneeberger und Lynch, 1992; Gumbiner,

1993). Der TER-Wert korreliert sehr gut mit der Anzahl der TJ Stränge (Martinez-Palomo und Eriij, 1975; Mollgard et al., 1976). Untersuchungen in MDCK I und II (Madin-Darby Zelllinie I und II von Hundenieren) ergaben, daß der TER nicht von der Anzahl der TJ Stränge abhängt, sondern vielmehr von deren qualitativen Eigenschaften (Stevenson et al., 1988).

Die Anzahl und die Komplexität der TJ-Stränge sind bedeutende Faktoren zur Bestimmung der Barriereeigenschaften, doch die molekularen Regulationsmechanismen sind unklar. Claude und Koautoren (1978) fanden, daß der TER logarithmisch mit der Anzahl an parallelen TJ-Strängen wächst. Um diese Tatsache zu erklären, postulierten sie das Vorhandensein von Wasserporen in den Strängen, die abwechselnd offen oder geschlossen sind. Um die logarithmische Relation zu bestätigen, haben Cereijido et al. (1989) eine Kompartimentierung der TJ vorgeschlagen, die mit den elektronenmikroskopischen Aufnahmen korrespondiert. Untersuchungen zur chemischen Natur dieser Wasserporen deuten darauf hin, daß sie aus Claudin-16/Paracellin-1 gebildet werden und als Mg^{2+} -abhängige parazelluläre Kanäle fungieren (Simon et al., 1999).

Die dynamische Regulation der TJ ist von fundamentaler Bedeutung für viele physiologische Prozesse in der Zelle. Die Zerstörung der TJ-Funktion führt zu einer drastischen Änderung der parazellulären Permeabilität und ist ein Merkmal vieler pathologischer Zustände. Einen Einfluß auf die dynamische Regulation der Zell-Zell-Kontakte haben sekundäre Signalmoleküle, wie das zyklische Adenosin-3', 5'-monophosphat (cAMP, Rubin et al., 1991), das die junctionale Expression von VE-Cadherin, PCAM 1 (Raub, 1996) und den TJ-Proteinen Occludin und ZO-1 erhöht (Dye et al., 2001). Multiple G_{α} -Proteinuntereinheiten interagieren mit TJ-Proteinen und dienen der Regulation der Zusammensetzung und Aufrechterhaltung der TJ (Saha et al., 2001). Kleine G-Proteine (GTPasen) und heterotrimere G-Proteine fungieren als Messenger für die Kontrolle der Zell-Zellkontakte zwischen Stützproteinen und dem Aktinzytoskelett. Möglicherweise existieren intrinsische Mechanismen für die Regulation der parazellulären Permeabilität in polarisierten Endothel- und Epithelzellen (Hopkins et al, 2000).

Ein anderer Faktor, der die parazelluläre Barriere der TJ in EZ beeinflusst, ist die Integrität der Adhaerens junctions (AJs, Rutten et al., 1987; Rubin, 1992). AJs vermitteln die initiale Adhäsion zwischen den Epithel- und Endothelzellen und wurden erstmals von Gumbiner und Simons (1986) charakterisiert. Sie zeigten, daß die Formierung der TJ in Epithelzellen von der E-Cadherin vermittelten Bildung der AJ induziert wird und von ihr abhängig ist. Eine

Zerstörung der AJ führt zu einer Erhöhung der TJ-Permeabilität. AJ-Proteine müssen also indirekt TJ-Proteine beeinflussen. Durch das Entfernen des extrazellulären Kalziumgehaltes kommt es zur Öffnung und Unterbindung der Polarisation der TJ, bei der Botenstoffe wie die Proteinkinase C (Lacaz-Vieira, 2000) oder die Rho-Guanosintriphosphatkinase (ROCK-Kinase, Walsh et al., 2001) für die Dynamik der TJ eine bedeutende Rolle spielen (Contreras et al., 1989; Abbruscato und Davis, 1999). Veränderungen der Adhäsivität könnten somit zu einer physiologischen Modulation der TJ-Permeabilität führen (Staddon et al., 1995a). Die kalziumsensitiven Komponenten der AJ sind Cadherine (Takeichi, 1991), transmembrane Proteine, die via zytoplasmatischer Domänen mit den α , β , γ -Cateninen (Ozawa et al., 1989) und p120 (Tyrosinkinasesubstrat; Reynolds et al., 1994) verbunden sind. Catenine vermitteln wiederum die Interaktion mit dem Aktinzytoskelett (Gumbiner, 1996). Diese sind also ein Teil des Systems mit denen TJs und AJs kommunizieren und wurden ebenfalls in den EZ des Gehirns gefunden (Staddon et al., 1995b; Schulze et al., 1997).

Zu den multiplen Funktionen der TJ-Stränge, die als transmembrane Proteine um die Zelle verlaufen (Abb. 1.5 B), zählt die Assoziation mit PDZ-enhaltenen Proteinen (ZO-1-3, PAR-3 und 6, MAGI-1-3) über ihre zytoplasmatische Oberfläche (Abb. 1.5 A). Diese Proteine dienen wahrscheinlich als Linkerproteine zur Rekrutierung anderer Proteine, wie Zytoskelett- und Signalmoleküle (Tsukita et al., 2001).

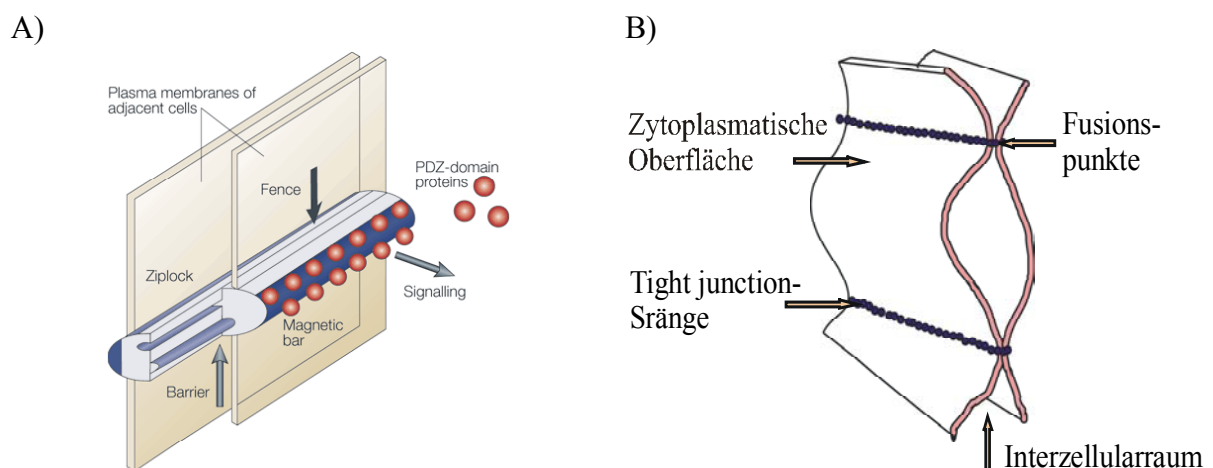


Abb. 1.5 Multiple Funktionen der TJ-Stränge (Tsukita et al., 2001). A) Extrazelluläre und zytoplasmatische Abschnitte fungieren als (i) Ziplock mit verschiedenartiger Permeabilität → Barrierefunktion, (ii) Hindernis, zur Abtrennung der apikalen/basolateralen Membrandomäne → Trennfunktion und (iii) Magnetbarriere, die verschiedene PDZ-enhaltene Proteine anzieht → Signalfunktion. B) Modell der TJ. Es wird postuliert, daß benachbarte Membranen durch kontinuierliche, im apikalen Teil der lateralen Zellmembran um die Zelle verlaufende Stränge aus transmembranen Proteinen zusammengehalten werden. Dabei können benachbarte Zellmembranen verschmelzen (Tsukita et al., 2001).

Die Bildung makromolekularer Komplexe in den TJ hat vielfältige Funktionen. Zum einen kann die Vernetzung der Aktinmyosinfilamente mit den Stützproteinen und deren Interaktion in den TJs zur Regulation der TJ beitragen, zum anderen dient sie der Signalübertragung der Zell-Zelladhäsion in Endothel- und Epithelzellen sowie der Regulation ihres Wachstums, Differenzierung und Polarisation (Tsukita et al., 2001).

Die Charakterisierung aller am TJ-Komplex beteiligten Komponenten könnte zur eindeutigen Beschreibung der TJ-Funktionen führen und ist daher von großer Bedeutung. Fortschritte wurden in den letzten Jahren bei der Aufklärung morphologischer und molekularer Prozesse durch die Identifizierung einiger, integraler Membranbestandteile der TJ-Stränge gemacht. Es konnte beispielsweise erstmals das Vorhandensein epidermaler TJs der Haut nachgewiesen und somit die Bedeutung von Claudin-1 als Hauptkomponente dieser TJs belegt werden (Furuse et al., 2002).

Es gibt eine ganze Reihe offener Fragen, die für das Verstehen der TJ-Architektur und komplexer Regulationsmechanismen der TJ beantwortet werden müssen:

- 1.) Unklar ist das Zusammenwirken der Hauptkomponenten der TJ zur Kontrolle der Integrität der Barriere sowie der Regulation und Neubildung der TJs unter verschiedenen biologischen Bedingungen. Sicherlich ist ein Komplex regulativer Proteine beteiligt.
- 2.) Occludin und die Claudine sind u.a. Bestandteile der TJ-Stränge, doch wie diese im Zusammenspiel mit anderen peripheren Proteinen (z. B. ZO-Proteine) interagieren, polymerisieren bzw. depolymerisieren ist hinsichtlich der TJ-Funktion nicht geklärt.
- 3.) Unklar sind ebenso die Mechanismen, ob periphere Proteine primär mit der Membran, über spezifische Protein-Protein-Interaktionen oder durch Interaktion mit den lipidhaltigen polaren Kopfgruppen der Phospholipid-Bilayer assoziiert sind.
- 4.) Außerdem ist unzureichend geklärt, welche Beziehungen zwischen den verschiedenen Zellverbindungen (TJ, AJ, GJ und Desmosomen) hinsichtlich der Polarisation, der Dichtheit, der Barriere- und Trennfunktion in Endothel- sowie Epithelzellen bestehen und wie die beteiligten Proteine darin eingebunden sind.
- 5.) Nicht zuletzt bestehen wichtige Fragen darin, wie Krankheiten, ausgelöst durch Veränderungen im Aufbau der TJ, entstehen und wie sie behandelt werden können.

1.2.2 Zur Rolle von transmembranen Proteinen und ZO-Proteinen in den Tight junctions

Occludin. 1993 wurde von Furuse et al. das erste integrale Membranprotein als ein Bestandteil der TJ in Epithelzellen entdeckt und als Occludin (ca. 60-65 kDa) bezeichnet. Ebenfalls exprimieren Endothelzellen (Hirase et al., 1997), AZ sowie Neuronen Occludin (Bauer et al., 1999). Occludin besitzt vier transmembranale Domänen, die mit den Aminosäuren 67-89, 135-158, 169-193 und 242-263 korrespondieren und drei zytoplasmatische Domänen. Diese umfassen eine kurze zytoplasmatische aminotermine (AS 1-66), eine lange carboxyterminale Domäne (AS 264-521) und eine kurze intrazelluläre Schleife (AS 159-168). Ein charakteristisches Hauptmerkmal der Occludinsequenz ist der hohe Anteil an Glycin- und Tyrosinresten (ca. 60%) des ersten extrazellulären Loop (AS 90-134). Der zweite extrazelluläre Loop beginnt bei AS 194 und endet bei AS 241 (Abb. 1.6; Furuse et al., 1993).

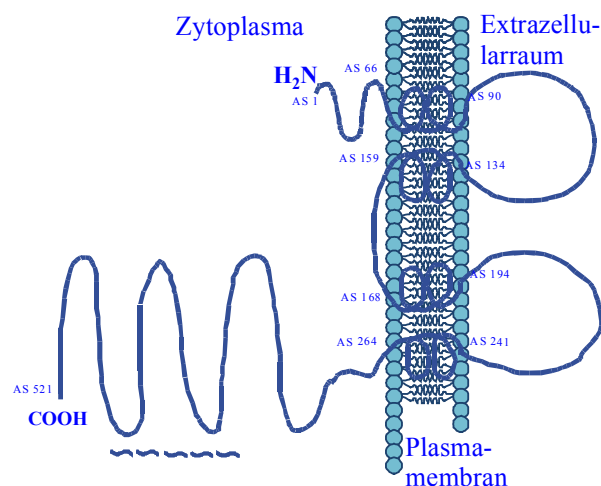


Abb. 1.6 Faltungsmodell von Occludin an der Membran (modifiziert nach Furuse et al., 1993). Neben vier transmembranalen Domänen und zwei extrazellulären Loops besitzt Occludin eine kurze N-terminale und lange C-terminale Region im Zytoplasma. Der murine C-terminale Teil beginnt bei AS 264 und endet bei AS 521.

Durch alternatives Splicing der mRNA können zwei Isoformen (Occludin und Occludin 1B) erzeugt werden (Muresan et al., 2000). Occludin 1B enthält eine 193 Basenpaar lange Insertion zwischen dem N-terminalen Exon des originalen N-Terminus (bei beiden gleich in 56 AS) und der nachfolgenden Sequenz.

In der Immunfärbungs-Elektronenmikroskopie markieren spezifische Antikörper gegen den C-terminalen Teil von Occludin die TJ-Stränge, so daß eine direkte Inkorporation von Occludin in die TJs angenommen wird. Ebenfalls scheint die Dichte der vorkommenden Occludinmoleküle in den TJs konstant zu sein, da diese in verschiedenen Geweben sehr gut mit der Anzahl der TJ Stränge korreliert (Saitou et al., 1997). Eine Überexpression von Occludin in MDCK-Zellen führt zu einer leichten Erhöhung der TJ-Strangzahl (McCarthy et al., 1996). Es besteht unter anderem die Möglichkeit, daß dieser Effekt über das Zytoskelett

reguliert werden kann (McCarthy et al., 2000). Immunelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen eine Occludinlokalisierung in der Plasmamembran in Assoziation mit zytoplasmatischem Aktin, das auf eine mögliche Funktion von Occludin für die Organisation des Aktin in EZ hinweist (Atsumi et al., 1999; Balda et al., 2000c). Andere Veröffentlichungen unterstreichen einen Einfluß von Occludin auf die Regulierung des Actinzytoskeletts in EZ, der aber keine Auswirkungen auf die TJ und damit die Barrierefunktion hat (Kuwabara et al., 2000).

Es ist außerdem nicht geklärt, wie Occludin in die Ausbildung der TJ involviert ist. Die Transfektion von Occludinmutationsformen (gesamtes sowie C-terminal verkürztes Occludin) in MDCK-Zellen beseitigen endogenes Occludin aus den TJ, ohne den TER zu senken, aber erhöhen den transzellulären Fluß und verändern die Barriere- und Trennfunktion der TJ (Balda et al., 1996; McCarthy et al., 1996 und 2000; Bamforth et al., 1999). Im Gegensatz dazu inhibiert die Zugabe von synthetischen Peptiden zu den extrazellulären Loops von Occludin in Epithelzellen die Zelladhäsion und führt zum Verschwinden der TJ, einer markanten Verringerung des TER und einer Erhöhung des transzellulären Flusses (Wong und Gumbiner, 1997; Lacaz-Vieria et al., 1999; Van Itallie und Anderson, 1997). Aus den kontroversen Ergebnissen ist ersichtlich, daß der Zusammenhang zwischen Occludin und dem TER immer noch nicht gelöst ist und die Struktur und Funktion der TJ mit Occludin alleine nicht geklärt werden kann. Die TJs in Occludin-defizienten Mäusen sind morphologisch und elektrophysiologisch normal. Diese Mäuse zeigen aber einen komplexen Phänotyp mit verlangsamtem Zellwachstum, chronischen Entzündungen und histologischen Abnormitäten in einigen Geweben. Im Gehirn kommt es zu einer progressive Ablagerung von mineralischen Komponenten (Kalzifikation einhergehend mit einer kopräzipitativen Phosphorablagerung) im Cerebellum und basalen Ganglium (Saitou et al., 2000). Ebenfalls bilden endodermale Zellen aus Occludin-defizienten embryonalen Stammzellen TJ-Stränge aus (Saitou et al., 1998). Es existieren endotheliale Zellen von nichtneuronalem Gewebe und Sertoli-Zellen (humanen Testis), in denen TJs ohne Occludin gebildet werden (Hirase et al., 1997; Moroi, et al., 1998). Diese *in vivo* Untersuchungen können auf eine weitere nicht identifizierte Funktion von Occludin in den TJ hinweisen.

Die TJ-Bildung, hervorgerufen durch Veränderungen der Kalziumkonzentration, führt zu einer Phosphorylierung und Einbindung von Occludin in die TJs von MDCK-Zellen (Sakakibara et al., 1997; Wong, 1998). Occludin wird somit über Phosphorylierungen reguliert und befindet sich als hochphosphoryliertes Protein an den Grenzen der Zell-

Zellkontakte. Dagegen ist wenig oder unphosphoryliertes Occludin diffus im Zytoplasma der Zellen verteilt (Wong, 1998). Ein involvierter Signaltransduktionsweg der Occludinphosphorylierung an S³³⁸ durch eine Proteinkinase C wurde vor kurzem in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen (Andreeva et al., 2001). Auch während unterschiedlicher Phasen der embryonalen Mausentwicklung wird Occludin phosphoryliert und assoziiert mit ZO-1. Diese Prozesse können ein möglicher Teil der Regulierung der TJ-Biogenese und der Startpunkt der Blastozytenbildung sein (Sheth et al., 2000). Ebenfalls scheint Occludin zur Funktion der Diffusionsbarriere, besonders für Lipide, beizutragen (Balda et al., 1996).

Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, daß die physiologische Funktion von Occludin in den TJ noch immer nicht vollständig verstanden ist und diese komplexer sein wird als bisher angenommen. Ein weiterer Schritt zum besseren Verständnis der Funktion von Occludin ist damit die Aufklärung molekularer Wechselwirkungsmechanismen im Zusammenspiel mit anderen TJ-Proteinen, wie beispielsweise ZO-1.

Transmembrane Proteinkomponenten der TJ sind neben Occludin das junctionale Adhesionsmolekül JAM (Martin-Padura et al., 1998) und die Proteine der Claudin-Familie (Furuse et al., 1998; Morita et al., 1999; Tsukita et al., 1999).

JAM gehört zum Multiproteinkomplex der TJ und ist ca. 40 kDa groß (Palmeri et al., 2000; Aurrand-Lons et al., 2000). JAM besitzt eine einzelmembranumspannende Domäne, der extrazelluläre Teil enthält zwei immunoglobulinähnliche Loops, die durch Disulfidbrücken gebildet werden. Mögliche Funktionen von JAM sind eine Organisation der TJ (Adhesivität der Zellen) und eine Regulation der Leukozytentransmigration. Kollokalisierungen mit Occludin, Cingulin und mit der PDZ3-Domäne von ZO-1 über den C-terminalen Teil von JAM sind beschrieben worden (Dejana et al., 2000; Bazzoni et al., 2000).

Claudine besitzen vier transmembrane Domänen, zeigen aber keine Sequenzähnlichkeit mit Occludin. Claudine sind ebenfalls direkt mit den intramembranal Strängen assoziiert und spielen bei ihrer Formation eine wesentlich größere Rolle als Occludin (Furuse et al., 1998a). Es gibt vermehrte Hinweise, daß die Claudine die Hauptkomponenten der TJ-Stränge sind, wie immunoelektronische Aufnahmen zeigen (Morita et al., 1999, 1999a und 1999b). Die Expression einzelner Claudine in TJ-defizienten Fibroblasten führte zu einem gut ausgebildeten Netzwerk an TJ-Strängen. Die Einführung von Occludin in diese Claudin-exprimierenden transfizierten L-Fibroblasten bewirkte eine Inkorporation von Occludin in die Claudin-Stränge (Furuse et al., 1998). Die Expressionsmuster der Claudine variieren in den

verschiedenen Geweben erheblich (Furuse et al., 1998; Morita et al., 1999). Zur Zeit sind 24 Claudine bekannt. In den Endothelzellen der Blutgefäße wird spezifisch Claudin-1 und 5/TMVCF exprimiert (Morita et al., 1999; Lippoldt et al., 2000). Die Expression verschiedener Claudine könnte den Unterschied von MDCK I und II in Bezug auf den TER bewirken. Außer Claudin-1 und 4 werden große Mengen an Claudin-2 in MDCK II exprimiert. Es ist möglich, daß Claudine neben ihrer Funktion als Hauptkomponente der TJ-Stränge an der Bildung von Wasserporen beteiligt sind und die Kombination verschiedener Claudine, die Dichtheit der TJ-Stränge bestimmt (Tsukita et al., 2001).

Zonula Occludens- (ZO) Proteine. An der zytoplasmatischen Seite der TJ sind viele periphere Membranproteine lokalisiert (siehe Abb. 1.7). Periphere oder extrinsische Membranproteine interagieren nicht direkt mit dem hydrophoben Kern der Phospholipid-Bilayer, sondern über integrale Proteine oder durch Interaktion mit der polaren Lipidkopfgruppe. Neben den Aktinfilament-bindenden Stützproteinen der ZO-Familie ZO-1-3 (Stevenson et al., 1986; Gumbiner et al., 1991; Balda et al., 1993; Wittchen et al., 1999) sind die Stützproteine MAGI-1-3 (Dobrosotskaja et al., 1997; Ide et al., 1999; Wu et al., 2000a und b) und MUPP1 (Hamazaki et al., 2001) und Moleküle, die für Zellpolarisationsvorgänge verantwortlich sind (ASIP/PAR-3 und PAR-6, Izumi et al., 1998) in den TJ lokalisiert. Proteine, die TJ-assoziiert sind bzw. an TJ-Proteine binden, sind Cingulin (Citi et al., 1988), Symplekin (Keon et al., 1996), 7H6 (Zhong et al., 1993), Rab-3b und Rab-13 (Weber et al., 1994; Zahraoui et al., 1994), AF-6 (Ras-target; Yamamoto et al., 1999), ZONAB (Balda et al., 2000), PILT (Kawabe et al., 2001), heterotrimere G-Proteine (Saha et al., 1998), huASH11 (Nakamura et al., 2000), Sec6/Sec8-Homologe (Grindstaff et al., 1998), PMP22 (Notterpek et al., 2001) und JEAP (Nishimura et al., 2001).

ZO-1 (Zonula Occludens-Protein 1), ein 225 kDa Protein, wurde erstmals von Stevenson et al. (1989) identifiziert und charakterisiert. Es ist spezifisch in TJ-enhaltenden Zellstrukturen in Endothel- (Rubin et al., 1991; Hirase et al., 1997) und Epithelzellen (Anderson et al., 1988) angereichert und wurde auch in nichtepithelialen Zellen (Astrozyten, Schwannsche Zellen, Fibroblasten, Gliomazellen, Sarcoma- und Mieloma-Zelllinien) gefunden (Itoh et al., 1991; Howarth et al., 1992). Nach Immunpräzipitation von ZO-1 konnten durch Kopräzipitation ein 160 kDa und 130 kDa Protein, das ZO-2 und ZO-3, im MDCK-Zellysat identifiziert werden (Gumbiner et al., 1991, Wittchen et al., 1999). Es existieren zwei Isoformen von ZO-1, die in

den unterschiedlichen Zelltypen in Abhängigkeit ihres Expressionsniveaus unterschiedlich vorkommen (Willot et al., 1992).

Die ZO-Proteine besitzen untereinander Sequenzähnlichkeiten und sind Mitglieder der MAGUK-(membrane-associated guanylate kinase homologues) Familie. Sie besitzen eine oder mehrere PDZ- (PSD95/dlg/ZO-1) Domänen, eine src-homologe Domäne 3 (SH3), eine Guanylatkinase-ähnliche Domäne (Guk) und einen sauren sowie prolinreichen C-terminalen Teil (PP). Die ZOs sind TJ assoziierte, in den submembranen Regionen der TJ lokalisierte Proteine und dienen als Linkerproteine zwischen den TJ-Strängen aus integralen Membranproteinen und dem Zytoskelett. Aus der Literatur geht hervor, daß die MAGUKs eine zentrale Organisationsrolle bei der Anordnung der transmembranen Moleküle an der Plasmamembran und in den Signaltransduktionsketten spielen (Gonzales-Mariscal et al., 1999, 2000). In nichtepithelialen und Epithelzellen, bei der die Ausbildung der TJ durch Kalziummangel inhibiert wurde, fand man eine Kolokalisation von ZO-1 mit AJ-Proteinen (Catenine; Itoh et al., 1993; Howarth et al., 1995). Durch fortschreitende Polarisierung der Zellen wurde der ZO-1/Catenin-Komplex aufgelöst und ZO-1 verstärkt an der apikal-lateralen Zellgrenze vollständig polarisierter Epithelzellen detektiert (Itoh et al., 1997 und 1999).

Eine Besonderheit der MAGUKs ist das Vorhandensein der oben genannten spezifischen Domänen. Die PDZ-Domänen sind strukturell konservierte Regionen (80-90 Aminosäuren) und wurden nach den Proteinen bezeichnet, wo sie das erste Mal gefunden wurden: (i) im PSD-95, einem postsynaptischen Protein, (ii) im Dlg-A, einem Tumorsuppressorprotein von *Drosophila melanogaster* und (iii) im ZO-1. PDZ-Domänen sind Protein-Proteinbindende Einheiten, deren Regulation potentiell über Phosphorylierungen erfolgt (Gonzalez-Mariscal et al., 2000).

Die SH3-Einheit umfaßt 55-70 Aminosäuren, ist eine nichtkatalytische Domäne und vermittelt kritische Protein-Protein-Interaktionen. In ZO-1 bindet die SH3-Domäne eine nicht-identifizierte Serinproteinkinase, die die C-terminale Region der SH3-Domäne phosphoryliert. Dabei ist aber deren Bedeutung unklar (Balda et al., 1996).

Die Guk-Domäne zeigt große Homologien zu dem Enzym, das GMP in GDP unter Nutzung von ATP umwandelt und erstmals in Hefe identifiziert wurde (Stehle und Schulz, 1990). Unabhängig ihrer vorausgesagten Enzymaktivität durch eine fehlende GTP-Bindungsstelle (Kistner et al., 1998; Haskins et al., 1998) vermittelt sie Protein-Protein-Interaktionen (Kim et al., 1997; Deguchi et al., 1998; Masuko et al., 1999; Yamada et al., 1999).

Der saure und zum Teil prolinreiche *C-Terminus* der ZOs (14,1% P in ZO-1; Willott et al., 1993) unterscheidet sich in seiner Länge und Komposition und könnte für die unterschiedlichen spezifischen Funktionen der ZOs in den TJ verantwortlich sein.

Es ist bekannt, dass ZO-1 *in vitro* mit einer Vielzahl von Proteinpartnern assoziiert (Abb.1.7). Eine bedeutende Wechselwirkung findet zwischen ZO-1 und Occludin statt, die in dieser Arbeit grundlegender untersucht werden soll (Furuse et al., 1994; Hirase, 1997; Fanning et al., 1998; Schmidt et al., 2001). Darüber hinaus interagiert ZO-1 mit ZO-2/3 (Gumbiner et al., 1991; Balda et al., 1993). Diese Interaktion wird über die PDZ2-Domänen in ZO-1, ZO-2 und ZO-3 vermittelt (Haskins et al., 1998; Wittchen et al., 1999). Die Proteine der Claudin-Familie binden direkt über den C-terminalen Teil an die PDZ1-Domäne von ZO-1 (Itoh et al., 1999; Heiskala et al., 2001). Ebenfalls wurde die direkte Bindung von ZO-1 mit dem junctionalen Adhäsionsmolekül JAM über PDZ3 gezeigt (Bazzoni et al., 2000; Ebnet et al., 2000). ZO-1 interagiert über seine SH3-Domäne mit dem Transkriptionsfaktor ZONAB (Balda et al., 2000) und mit der ZO-1-assoziierten Kinase (ZAK, Balda und Matter, 1996).

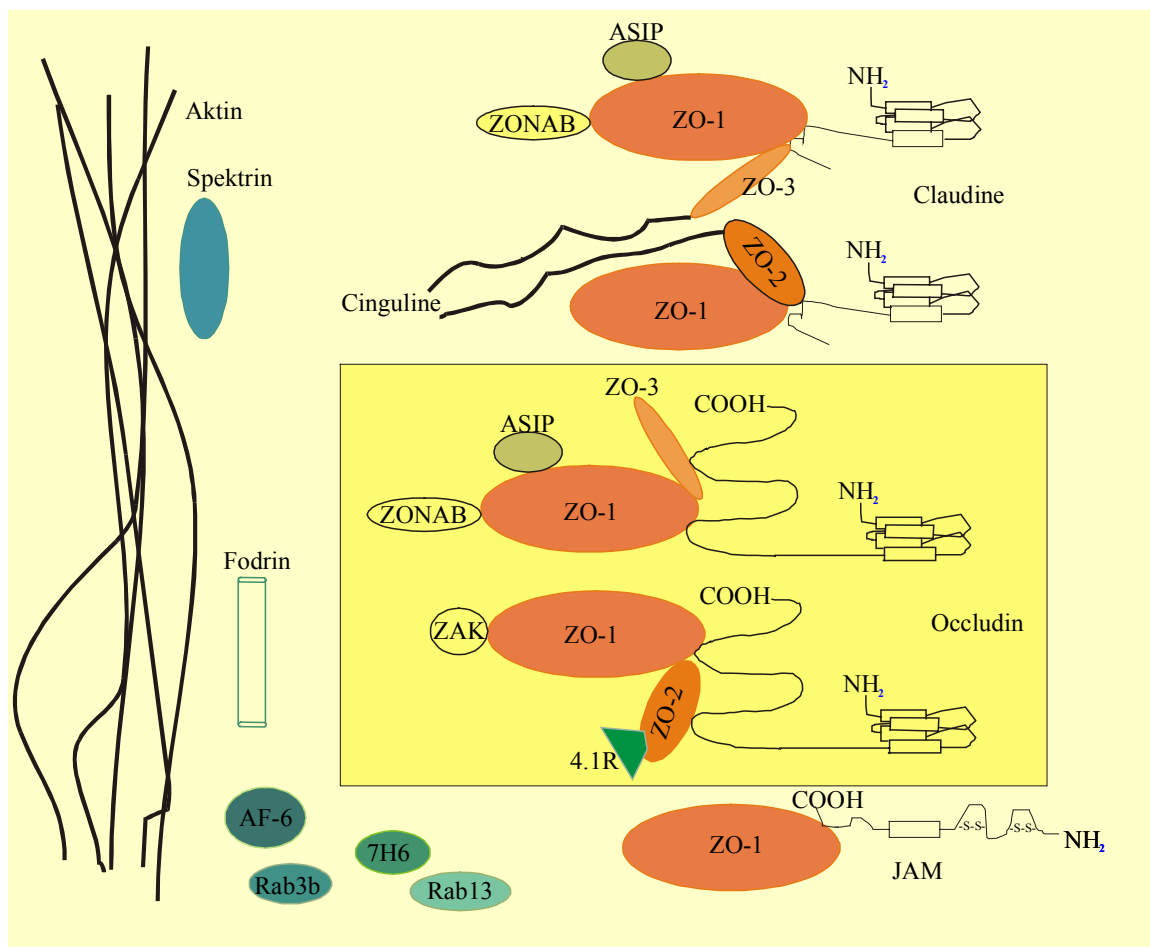


Abb. 1.7 Gegenwärtige Vorstellung der Proteinkomplexe in den Tight junctions (modifiziert nach Anderson und Van Itallie, 1995). Dargestellt sind die integralen Membranproteine Occludin, Claudin und JAM und deren bisher bekannte Assoziation an periphere, zytoplasmatisch lokalisierte TJ-Proteine.

Nachgewiesen ist die Bindung C-terminaler Regionen von ZO-1 (und auch ZO-2) an das Aktinfilament (Itoh et al., 1997 und 1999; Fanning et al., 1998). Cingulin hat mehrere Bindungspartner in den TJs (ZO1-3, JAM) und fungiert als Adaptermolekül zum Zytoskelett (Cordenonsi et al., 1999). Weitere Interaktionspartner des ZO-1 sind Connexin (Giepmans und Molemaar, 1998; Toyofuku et al., 1998), AF6 (Yamamoto et al., 1997 und 1999), Cortactin (Katsube et al., 1998), Fodrin/Spektrin (Itoh et al., 1991; Tsukamoto und Nigam, 1997), Canoe (Takahashi et al., 1998) und Proteine der AJs, wie Catenin (Rajasekaran et al., 1996; Itoh et al., 1997).

Wie tragen diese strukturellen Informationen zu einem besseren Verständnis der BHS- bzw. TJ-Ausbildung bei? Das Expressionsniveau von ZO-1 ist beispielsweise in den verschiedenen Endothelzellen ähnlich, dagegen wird Occludin im Unterschied zu peripheren EZ stark in GKEZ und in Epithelzellen exprimiert (Hirase et al., 1997). Aus diesen Tatsachen ist ersichtlich, daß Occludin im Zusammenwirken mit anderen Membranproteinen eine besondere Rolle in der Ausbildung der TJ spielt. Nicht zuletzt deshalb sollen in dieser Studie wichtige Komponenten der TJ, wie Occludin und ZO-1 genauer untersucht und in Bezug auf ihre Wechselwirkungsmechanismen charakterisiert werden.

1.3 Analyse molekularer Wechselwirkungen mit der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie

Die Anwendung der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR) war ein großer Schritt, in Realzeit Interaktionsmessungen zwischen zwei Biomolekülen vornehmen zu können und dabei kinetische Aussagen zu treffen (Malmqvist, 1993; Morton, 1996). Mit der Entwicklung des BIAcore-Systems (BIA: Biomolekulare Interaktionsanalyse) konnten Meßverfahren automatisiert und mit hoher Reproduzierbarkeit angewendet werden. Dadurch ist die Bestimmung kinetischer Parameter, wie der Assoziations- und Dissoziationsrate und damit der Dissoziationskonstanten möglich. Vorteile sind der Einsatz geringer Proteinkonzentrationen, die kurze Zeitdauer und die Direktheit der Messung. Neben Protein-Protein-Wechselwirkungen können u.a. auch Protein-Peptid-Interaktionen gemessen werden. Weltweit hat sich die SPR zu einer Standard-Analysenmethode entwickelt (über 900 Veröffentlichungen zur SPR-Spektroskopie und 490 zur Anwendung des BIAcore-Systems).

Das *Prinzip der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie* besteht darin, dass die Interaktion von einem an eine Chipoberfläche gebundenen Protein oder Peptid (Ligand) mit einem in Lösung befindlichen Protein (Analyt) gemessen wird (Abb. 1.8 A).

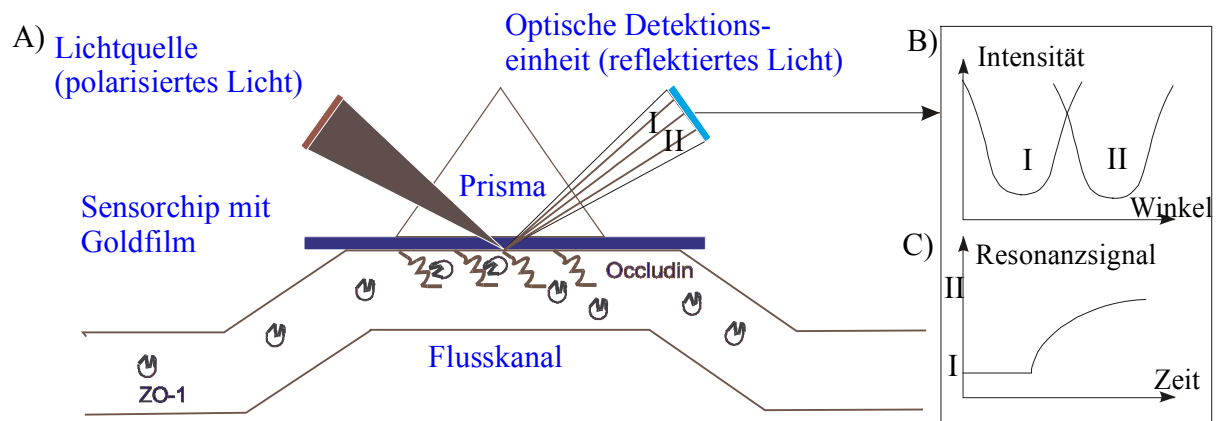


Abb. 1.8 Prinzip der SPR-Spektroskopie. (A) Aufbau des SPR-Biosensors. An der Sensoroberfläche wird Occludin immobilisiert und mit ZO-Fragmenten inkubiert. Das eingestrahlte polarisierte Licht wird am Goldchip des Sensors reflektiert und den photoelektrischen Dioden detektiert. (B) Unter einem bestimmten Winkel des eingestrahlichten Lichtes tritt SPR auf und kann als Adsorption des Lichtes detektiert werden. Die Änderung des Brechungsindex wird durch die Bindung eines Analyten (ZO-1-Fragmente und Occludin) an den Liganden (Occludin und ZO-1-Peptidsequenzen) hervorgerufen, wodurch der Winkel der TIR, bei der ein Adsorptionsmaximum in der reflektierten Intensität beobachtet wird, sich von I zu II verschiebt. (C) Assoziation und Dissoziation werden aus der Änderung des Resonanzsignals gemessen. SPR-Sensorgramme zeichnen das SPR-Signal (ΔRU) in Abhängigkeit von der Zeit (s) auf.

Die Änderung des Brechungsindex, hervorgerufen durch die Veränderungen in der mobilen Analytlösung führt zur Oberflächenplasmonresonanz. Die Änderung des resultierenden SPR-Signals angegeben als Resonanzeinheit (ΔRU), als Ergebnis der Protein-Protein- oder Peptid-Protein-Interaktion, wird in Realzeit direkt an einem Monitor beobachtet. Dabei werden keine radioaktiven, enzymatischen oder andere Markierungen eingesetzt.

Ein entscheidendes Merkmal der SPR-Spektroskopie ist die totale interne Reflexion (TIR) des Lichtes zwischen zwei nichtadsorbierenden Medien. Wenn das Licht an einer Oberfläche von einem optisch dichteren Medium (Prisma) auf ein optisch dünneres Medium (Flüssigkeit) trifft, wird das Licht in das dünnere Medium hinein reflektiert. Bei Erreichen und Überschreiten eines kritischen Winkels (*incident angle*) wird das Licht in das optisch dichtere Medium total reflektiert, d.h. es passiert kein Licht mehr das dünnere Medium. Unter den Bedingungen der TIR regt die monochromatische und p-polarisierte Lichtenergie freie oszillierende Elektrone, die sogenannten Oberflächenplasmonen an, wenn die Phasengrenze

von einem dünnen Metall(Gold)film bedeckt ist. Dabei ist die Dicke des Filmes deutlich geringer als die Wellenlänge des eingestrahlt Lichtes. Die evaneszierende Welle und die Elektrone des Metallfilmes treten bei Resonanzbedingungen in Wechselwirkung (Oberflächenplasmonresonanz) und Licht wird bei Erreichen des bestimmten Winkel absorbiert (Abb. 1.8 B). Der Winkel des eingestrahlt Lichtes bei dem Resonanzbedingungen gelten, wird also durch Veränderung des Brechungsindex im optisch dünneren Medium hervorgerufen. Dabei wird ein starker Abfall der Intensität des reflektierten Lichtes gemessen. SPR tritt bei Goldoberflächen im Bereich des sichtbaren Lichtes auf. Außerhalb des Metalls entsteht im dünneren Medium ein evaneszierendes elektrisches Feld, das sehr stark mit Entfernung von der Oberfläche abfällt. Durch die Konfiguration von Otto (1986) und Kretschmann (1971) kann das optische Phänomen der TIR ausgenutzt werden, um Protein-Protein-Interaktionen zu messen. Dabei sind alle Komponenten fixiert und die reflektierte Lichtintensität wird über den gesamten Bereich der Winkeländerung simultan aufgezeichnet (Abb. 1.8. C). Prinzipiell werden mit SPR Masseänderungen an der Oberfläche von kleiner 1 pg/mm² gemessen.

1.4 Zielstellung der Arbeit

Noch ist die Architektur der TJ unzureichend aufgeklärt, da genaue Interaktionsmechanismen zwischen den beteiligten Proteinen fehlen. Notwendig sind deshalb mehr Informationen über die Komposition, Funktion und Regulation der TJ, insbesondere um die Interaktionen zwischen den Hauptkomponenten der TJ aufzuklären. Eine Reihe von intermolekularen Wechselwirkungen in den TJ wurden in verschiedenen Arbeiten beschrieben. Hauptsächlich wurde kopräzipitative Methoden in *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen mit Proteinen aus Zellysaten herangezogen, um Protein-Protein-Interaktionen in TJs zwischen Occludin und ZO-1 zu untersuchen. Diese Experimente erlauben allerdings keine direkte Messung der Bindung zwischen den TJ-Proteinen. Das solche Bindungen indirekt, d.h. durch andere Proteine vermittelt sind, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Die Identifizierung und Charakterisierung der Wechselwirkungen und die eindeutige Aufklärung des Wechselwirkungsmechanismus zwischen den TJ-Proteinen Occludin und ZO-1 sind Voraussetzung für ein besseres Verständnis der Funktionsweise der BHS und anderer epithelialer Barrieren auf molekularer Ebene.

Für die dazu notwendigen Untersuchungen ist die Entwicklung eines einfachen und direkten *in vitro* Bindungsassays essentiell. Unter Verwendung der Oberflächenplasmonresonanz-

Spektroskopie (SPR-Spektroskopie) soll die Bindung zwischen dem C-terminalen Teil von Occludin und verschiedenen Fragmenten von ZO-1 detaillierter betrachtet werden. Die SPR-Methode erlaubt eine kontinuierliche Analyse der Protein-Protein-Interaktion und die Bestimmung kinetischer Parameter der Interaktion und ist somit für die gestellte Aufgabe geeignet. Auch die Bestimmung des Effektes verschiedener Faktoren auf die Occludin-ZO-1-Interaktion sollte mit Hilfe der SPR-Spektroskopie möglich sein. Mit Hilfe zellulosegebundener Peptide beteiligter Bindungsabschnitte aus der Guk-Domäne von ZO-1 könnte die Interaktion mit Occludin nachgewiesen und eine weitere Eingrenzung der Bindungsdomäne erzielt werden. Die Bestimmung der Helizität eines C-terminalen Teils von Occludin.406-521 und verschiedener potentiell helikaler Bereiche von ZO-1 soll die Hypothese einer Coiled coil-Wechselwirkung zwischen beiden Proteinen unterstützen.

Die durchzuführenden Studien können somit einige der offenen Fragestellungen klären helfen, insbesondere die nach möglichen Prinzipien der Bildung makromolekularer Komplexe in den TJ sowie die nach einer möglichen Funktion der Regulation der TJ-Permeabilität. Durch die Charakterisierung der Wechselwirkung sollen erste Voraussetzungen für die Entwicklung eines Interaktionsmodells zwischen ZO-1 und Occludin geschaffen werden.