

4 Diskussion

ZO-1 und Occludin haben wesentliche Bedeutung für die Struktur und Funktion der TJ. Angenommen werden neben Rekrutierungsfunktionen von ZO-1 Regulationsfunktionen von Occludin. Es gibt Hinweise auf die direkte Interaktion der TJ-Proteine Occludin und ZO-1 (Furuse et al., 1994; Fanning et al., 1998), die bisher nicht systematisch untersucht wurde, denn bis heute ist der genaue Bindungsmechanismus der Wechselwirkung zwischen beiden Proteinen unbekannt. Aus bioinformatischen Studien heraus wurde die Hypothese entwickelt, daß ZO-1 und Occludin über Coiled coil-Helices miteinander interagieren. In dieser Arbeit wurden erstmals systematisch variierte ZO-1-Fragmente und Peptidsequenzen mit den vorausgesagten potentiellen Coiled coil-Helices N- und C-terminal von und in der Guk-Domäne SPR-spektroskopisch hinsichtlich ihrer Bindung zum TJ-Protein Occludin untersucht. Ebenfalls wurde erstmalig die Bindungsspezifität von Occludin zu Peptiden einer Peptidbibliothek getestet. Diese Bibliothek wurde aus Peptiden zusammengestellt, die Teilsequenzen der Guk-Domäne von ZO-1, insbesondere des C-terminal gelegenen potentiell helikalen Abschnitts CC2a, tragen. Die vorliegenden Ergebnisse geben detaillierte Informationen zur Interaktion von ZO-1 und Occludin. Die Identifizierung und Charakterisierung der spezifischen Occludin-Bindungsdomäne in ZO-1 tragen zur Klärung offener Fragen und damit zu einem besseren Verständnis des Wechselwirkungsmechanismus zwischen diesen Proteinen bei. Die Arbeit schafft ebenfalls Voraussetzungen zur Entwicklung eines 3-dimensionalen Modells einer Coiled coil-Bündelhelix der ZO-1/Occludin-Interaktion.

4.1 Vor- und Nachteile der SPR-Spektroskopie bei der Bestimmung kinetischer Konstanten

Im Vergleich zur Kopräzipitation und chromatographischen Bindungsprozeduren (Furuse et al., 1994; Fanning et al., 1998; Wittchen et al., 1999) hat die SPR den Vorteil, das in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration, die Assoziation und Dissoziation einfach, direkt und in Echtzeit analysiert und Bindungsdaten in kürzester Zeit kalkuliert werden können. Der immobilisierte Ligand kann mehrfach regeneriert und für hunderte Analysen über Wochen hinweg eingesetzt und mit dem selben Chip vielfache Messungen unter identischen Bedingungen durchgeführt werden. Bei den oben genannten Untersuchungen wurde das 1:1 Bindungsmodell von Langmuir (Adsorptionsisotherm) angewendet, um die Wechselwirkung

zwischen dem immobilisierten Occludin und ZO-1 in einer mobilen Lösung entsprechend $A + B \leftrightarrow AB$ zu beschreiben (Karlsson et al., 1991). Es gibt einige Fälle mit verschiedenen Ursachen, bei der die Assoziation und Dissoziation von dieser 1:1 Stöchiometrie abweichen. Aus der Gleichung (Anhang G 7.4) ist ersichtlich, daß die Geschwindigkeit der Bindung und Loslösung von den kinetischen Konstanten k_a und k_d , von der Konzentration sowohl des immobilisierten Liganden als auch des Analyten, der Dichte des immobilisierten Liganden, der Diffusion in die Dextranmatrix und der Flußrate abhängt (Karlsson et al., 1991; Glaser et al., 1993; Schuck et al., 1996). Inhomogenitäten bei der Immobilisierung von Occludin und den ZO-1-Peptiden können zu sekundären Problemen der (i) Massentransferlimitierung (Myszka et al., 1997 und 1998), (ii) Wiederbindung des Analyten während der Dissoziationsphase (Morton et al., 1995; Nieba et al., 1996) und (iii) sterischen Behinderungen führen (Caide et al., 1999, Rich und Myszka, 2000). Um Fehlinterpretationen kinetischer Daten in Folge systematischer Fehler zu vermeiden, werden die aufgezählten Probleme nachfolgend genauer erläutert.

Um den Einfluß des Massentransportes auf die Bindung zwischen ZO-1.644-812 und Occludin zu analysieren, wurde bei gleichbleibender Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ die Flußrate geändert. Dabei wurde in den durchgeführten Messungen bei einem geringen Immobilisierungsniveau von Occludin ($1,07 \text{ ng/mm}^2$) unter Standardbedingungen gearbeitet. Massentransporteinflüsse können zum limitierenden Faktor der Bindung werden und somit die Assoziationsratenkonstante verfälschen. Wenn die Assoziation des Analyten an den immobilisierten Liganden schneller ist, als durch Diffusion in die Sensorchipoberfläche nachgeliefert werden kann, wird eine langsamere Assoziation vorgetäuscht, als sie den realen kinetischen Daten entspricht (Glaser et al., 1993; Schuck et al., 1996). D.h. wenn die graphische Auftragung von dR/dt in Abhängigkeit von R eine Konstante ergibt, diffundiert weniger Analyt in die Matrix als gebunden werden kann. Ebenfalls ist aus der Literatur bekannt, daß bei einer linearen Änderung des Wertes dR/dt in Abhängigkeit von der Kubikwurzel der Flußrate Massentransportlimitierungen auftreten (Glaser et al., 1993; Schuck et al., 1996; Myszka et al., 1997 und 1998). Genauere Untersuchungen der Assoziationsphase der SPR-Sensorgramme des ZO-1 ergaben einen Einfluß der genannten Faktoren. In der Abbildung 3.15 wurden bei 5 unterschiedlichen Flußraten eine lineare Abhängigkeit des Wertes $dR/dt_{\text{konst.}}$ von der Kubikwurzel der Flußrate festgestellt, die aber nur in den ersten Sekunden der Assoziation auftritt. Bei einer graphischen Auftragung der Daten von dR/dt

gegen R in der Assoziationsphase bleibt dieser Wert in einem Zeitraum am Beginn der Assoziation von 0 bis ca. 10 s konstant (Plateauphase der Assoziation). Das bedeutet, daß weniger ZO-1 aus der mobilen Phase in die Dextranmatrix diffundiert, als durch die Interaktion mit Occludin gebunden werden könnte. Deshalb wurden für die Charakterisierung der Bindungskinetik nicht die ersten Sekunden zur Bestimmung von k_a herangezogen und somit nur ein linearer Zeitbereich der Assoziation ausgewertet. Eine Reaktionslimitierung dieser Wechselwirkung kann durch den Massentransport schnell wieder ausgeglichen werden, indem eine genügend hohe Konzentration der ZO-1-Fragmente eingesetzt wird und diese höher als die Konzentration freier Bindungsstellen in der Matrix ist. Weiterhin wurde der Bereich am Ende der Assoziation für die Bestimmung von k_a ausgeschlossen, da es hier durch steigende Belegungsdichten von ZO-1 in der Matrix zu einer verlangsamten Assoziation mit Occludin kam. Möglich sind auch unspezifische Bindungen der ZO-1-Fragmente bzw. von Occludin über hydrophobe Wechselwirkungen an bereits gebundene Moleküle in der Dextranmatrix. Der beschriebene Effekt ist aus der Literatur bekannt (Balgi et al., 1995). Hydrophobe Oberflächen neigen zur Aggregation, pH-Wert-Messungen ergaben, daß hydrophobe Wechselwirkungen an der Interaktion zwischen ZO-1 und Occludin eine Rolle spielen könnten. Normalerweise werden solche Regionen durch flankierende Bereiche abgedeckt, so daß möglichst vollständige Faltungsdomänen für Interaktionsmessungen verwendet werden sollten.

Ebenfalls können bei der Wechselwirkung zwischen Occludin und den kleinen Peptidsequenzen (zwischen 20-35 AS) die Bindung von weiteren Occludinmolekülen durch die räumliche Nähe und steigende Belegungsdichten unterdrückt werden, die sich in einer vorgetäuschten langsameren Assoziation bemerkbar macht.

Bei fortschreitender Dissoziation erfolgt eine Rückbindung von gerade abdissoziiertem ZO-1 an freie Bindungsstellen von Occludin, die zu einer verlangsamten Dissoziation führt. Dieser Rückbindungseffekt (Rich und Myszka, 2000) ist aus der Literatur bekannt und liegt in der häufigen nicht monoexponentiell verlaufenden Dissoziation (Morton et al., 1995; Nieba et al., 1996). Der Wert für R_0/R_t in Abhängigkeit von t zur Bestimmung der Dissoziationsratenkonstanten k_d sollte bei dem angewendeten Bindungsmodell eine Gerade ergeben. In der Abbildung 3.12 A ergibt die graphische Auftragung aber keinen linearen Zusammenhang über den gesamten Dissoziationsbereich, so daß nur die ersten 50 s der Dissoziation zur Bestimmung von k_d herangezogen wurden (Zoche, 1997). Bei hoher

Belegungsdichte von Occludin in der Dextranschicht und geringer ZO-1-Konzentration (z.B. bei 0,5 μM) kann es auch hier zu den genannten Verfälschungen der kinetischen Parameter kommen. Geringe Immobilisierungsraten von Occludin, hohe Flußraten und die Verwendung neuerer Chips (F1) mit verringerter Dextranmatrix können diese Fehlerquellen in zukünftigen Messungen reduzieren.

In den CD-spektroskopischen wurde festgestellt, daß CC1 und CC2a in wäßrigen Lösungen als Zufallsknäuel (*random coil*) vorliegen, was für kurze Peptide durchaus bekannt ist (Dyson und Wright, 1991). Die unterschiedliche räumliche Konformationen der ZO-1-Peptide in der Dextranmatrix, bei der möglicherweise erst durch Bindung von Occludin helikale Strukturen induziert werden, sind ebenso mögliche Fehlerquellen für die Bestimmung kinetischer Konstanten.

Es wurde bereits auf die im Verlauf der Messungen gemachte Beobachtung einer möglichen Selbstassoziation von ZO-1 eingegangen. Da der strukturelle Zustand von ZO-1 noch nicht eindeutig geklärt ist, sollten die kinetischen Parameter der Bindung zwischen ZO-1 und Occludin vorsichtig interpretiert werden. Aus den Aussagen zu den Bindungsmengen der ZO-1-Fragmente bei einer Interaktion mit Occludin konnten Bindungsepitope für Occludin gefunden werden. Diese führten zu Untersuchungen der Bindung von Occludin an einzelne Peptidsequenzen aus ZO-1. Die SPR-Messungen ermöglichten also einerseits Aussagen zur quantitativen Bindung zwischen Occludin und ZO-1 und führten erstmals zu der Vermutung einer Oligomerisierung von ZO-1. Andererseits wurde durch den Vergleich der Bindungsparameter von Occludin an die Peptidsequenzen von ZO-1, die kinetischen Parameter der Bindung rekombinanter ZO-1-Fragmente an das immobilisierte Occludin bestätigt. Beispielsweise wurden ähnliche Dissoziationskonstanten der rekombinanten ZO-1-Fragmente, die CC1 enthalten (ZO-1.589-731 und ZO-1.597-731) und zwischen dem synthetisch hergestellten Peptid P.597-633 (CC1) im Bereich von 0,5 μM gefunden.

Zur Charakterisierung der Bindung zwischen den rekombinanten ZO-1-Fragmenten und Occludin sollte aus der angenommenen Selbstassoziation von ZO-1 überwiegend quantitative Aussagen zur Bindungsmenge bzw. qualitative Aussagen getroffen werden. Dagegen kann die Bindung zwischen Occludin und den immobilisierten ZO-1-Peptidsequenzen quantifiziert und genaue Aussagen zu kinetischen Bindungskonstanten gemacht werden.

4.2 Aufklärung des Wechselwirkungsmechanismus zwischen Occludin und ZO-1

4.2.1 Coiled coil-Regionen der Guk-Domäne und Bereiche in der Drehangelregion von ZO-1 sind Bindungsepitope für Occludin

Das Wissen um die Aminosäuresequenz und die Aufklärung von Struktur und Funktion eines Proteins ist für die Beurteilung seiner biologischen Wirksamkeit eine wichtige Aufgabe der molekularbiologischen Forschung. In der Bioinformatik können bei bekannter Proteinsequenz Sekundärstrukturen vorhergesagt und durch Vergleich mit Sequenzhomologien von strukturbekanntem Proteinen Vorstellungen über Tertiärstrukturen entwickelt werden. Über Sequenzähnlichkeiten werden evolutionäre Zusammenhänge (Stammbäume) und Regionen erkannt, die innerhalb der Familie konserviert sind. Z.B. führen Strukturhomologien der MAGUK-Proteine untereinander zu einigen ähnlichen Funktionen dieser (McGee et al., 2001).

Durch die Einbeziehung multipler Sequenzfolgen (*alignments*) als grundlegende Informationsquelle und deren bioinformatische Auswertung ergaben sich wesentliche Aufschlüsse über die Struktur und mögliche Funktionen helikaler Regionen in ZO-1 sowie Occludin. Die durchgeführten bioinformatischen Analysen sagten potentielle helikale Strukturen für den C-terminalen Teil von Occludin, für Bereiche zwischen der SH3- und Guk-Domäne (CC1) und für C-terminal liegende Bereiche in der Guk-Domäne von ZO-1 (CC2a und CC2b) voraus (siehe Abb. 3.1). Die potentiellen helikalen Abschnitte zeigen Coiled coil-Eigenschaften (Leucin-Zippermotif alle 7 AS), aber es gibt keine Methoden bzw. Modelle, um Interaktionspartner dieser Helices vorherzusagen (Lupas, 1996). Zur Bestimmung der Sekundärstruktur von CC1 und CC2 wurden CD-Spektren der entsprechenden Peptidsequenzen aufgenommen. In wäßriger Lösung zeigten CC1 und CC2a geringe helikale Eigenschaften (5-8%). Unter dem Einfluß von TFE erhöhte sich die Helizität auf 13% für CC1 und bis zu 60% für CC2a. Unter TFE verändern Peptide ihre Konformation und zeigen ihr Potential und Flexibilität, helikale Strukturen auszubilden. Die helikale Neigung bestimmter Aminosäuren von Peptidsequenzen kann sich in Abhängigkeit der Umgebungsbedingungen ändern (Li und Deber, 1994, Dyson und Wright, 2002). Außerdem ist bekannt, daß sich helikale Regionen erst bei richtiger Lokalisierung in der Zelle (z.B. an der Membran) zu einer Helix falten (Brahms et al., 1980). Die elektrostatische Interaktion erfolgt durch positiv geladene Aminosäuren des Peptids und den negativen

Lipidphosphatgruppen der Membran, die in einer helikalen Konformation des Peptids münden (Killian und von Heijne, 2000). Beispielsweise ist die zytosolische Domäne von E-Cadherin in Lösung unstrukturiert (Huber et al., 2001a). Hier bilden sich α -helikale Strukturen erst bei einer Bindung an β -Catenin heraus (Huber et al., 2001b). Mit Hilfe der CD-Spektroskopie wurden helikale Eigenschaften (52-66%) des C-terminalen Teils von Occludin nachgewiesen (siehe Abb. 3.30). Somit konnte in beiden Proteinen das Vorhandensein (in Occludin) sowie die hohe Neigung zur Ausbildung helikaler Strukturen (in den ZO-1-Peptiden) bestätigt werden, wodurch die strukturellen Erfordernisse für eine Bindung über Coiled coil-Strukturen erfüllt sind. Bekannt ist, daß Coiled coil-Strukturen 2-5 Helixbündel bilden können und so potentielle Strukturen einer Protein-Protein-Interaktion sind (Lupas, 1997).

Die Ausbildung von TJs als eine fundamentale Struktur in mehrzelligen Organismen erfordert vielfältige Interaktion zwischen unterschiedlichen Proteinen. TJ-Stränge sind wahrscheinlich aus linear aggregierten integralen Membranproteinen und umgekehrten Lipidmycellen aufgebaut und bilden durch ihre Verzweigungen ein ausgeprägtes Netzwerk in Endothel- und Epithelzellen (Grebekämper und Galla, 1994, Gerhardt et al., 2000; Tsukita und Furuse, 1999a und 2000). In den Proteinkomplexen an der Plasmamembran scheinen die MAGUKs bemerkenswerte Funktionen auszuüben: Sie rekrutieren und organisieren verschiedene Rezeptoren und Signalmoleküle, verankern diese Signalkomplexe an speziellen subzellulären Orten der Plasmamembran und dienen als molekulares Stützgerüst in der Organisation von Multiproteinkomplexen in den TJ (Fanning und Anderson, 1999; McGee et al., 2001).

ZO-1, ein MAGUK-Multidomänenprotein, besitzt als Interaktionspartner eine Vielzahl integraler Membranproteine (Occludin, Furuse et al., 1994; Fanning et al., 1998; Claudin, Itoh et al., 1999a; und JAM, Bazzoni et al., 2000; Ebnet et al., 2000), zytoskelettaler Komponenten (Aktin, Itoh et al., 1997 und 1999b; Fanning et al., 1998) und zytosolischer Proteine (ZO-2, 3, Gumbiner et al., 1991; Balda et al., 1993; Haskins et al., 1998; Wittchen et al., 1999). Es ist nicht klar, welche der Interaktionen für die TJ-Bildung und für permeabilitätsregulierende Eigenschaften der TJ notwendig sind oder zur Ausbildung des Zytoskeletts in den Regionen der Zell-Zelladhäsion beitragen. Es ist wahrscheinlich, daß Occludin eine funktionelle Komponente der TJ ist, aber junctionale Stränge sowie funktionale TJs werden auch in Abwesenheit des Occludingens gebildet (Saitou et al., 1998, 2000). Auch deshalb sind exakte Funktionen von Occludin im Zusammenwirken mit ZO-1, die Rolle in der Ausbildung der TJ-Strangnetzwerke und sein Beitrag zur Aufrechterhaltung der Permeabilitätsbarriere,

Trennfunktion und zellulären Polarität der TJ unklar. Belegt ist die funktionelle Wichtigkeit des zytoplasmatischen C-terminalen Teils von Occludin im Zusammenwirken mit peripheren TJ-Proteinen (Balda et al., 2000c) und einer Serin- (Andreeva et al., 2001) bzw. Threonin-Phosphorylierung zur Lokalisierung von Occludin an der Zellmembran, die wiederum stark mit einer TJ-Ausbildung korreliert (Sakakibara et al., 1997). Durch die molekularbiologische Charakterisierung der angenommenen helikalen Bereiche und deren Interaktion miteinander soll die Vorhersage einer möglichen Coiled coil-Wechselwirkung zwischen ZO-1 und Occludin untersucht werden.

Wie von Furuse und Mitautoren (1994) durch Kopräzipitation gezeigt, interagiert humanes ZO-1 mit Hühneroccludin. Ähnliche Experimente von Fanning (1998) bestätigen die Untersuchungen, daß die erweiterte Guk-Domäne von ZO-1 (humanes ZO-1 mit AS 633-876) mit dem C-terminalen Teil von Occludin kopräzipitiert. Alle bisherigen Untersuchungen wurden an heterologen Systemen durchgeführt und müssen nicht zwangsläufig auf homologe Systeme übertragbar sein. Außerdem ist mit den bisher verwendeten Methoden die Berechnung von Ratenkonstanten nicht möglich. Um die Bindungseigenschaften zu bestimmen, wurde die von Fanning verwendete humane ZO-1-Sequenz auf das Maus-ZO-1 übertragen (AS 644-890) und der C-terminale Teil von Maus-Occludin (AS 264-521) betrachtet.

Ein großer Teil der Arbeit umfaßte die Charakterisierung der molekularen Wechselwirkung von Occludin mit ZO-1 mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR-Spektroskopie). Als Modellsystem für Untersuchungen von TJ-Proteinen wurde erstmals ein *in vitro* Assay mit dem BIAcore-SPR-System entwickelt. Dabei wurde der C-terminale Teil von Occludin an die Oberfläche eines Biosensor immobilisiert, das der biologischen Situation in der Zelle entspricht. *In vivo* befindet sich der C-terminale Teil von Occludin an der inneren Plasmamembranoberfläche (siehe Abb. 1.6), wodurch die SPR-Versuchsanordnung an die *in vivo* Situation angepaßt wurde. Eine Occludin-Occludinbindung des zytoplasmatischen C-terminalen Teils von Occludin wurde SPR-spektroskopisch nicht festgestellt. Dafür spricht auch, daß für die Ausbildung der Struktur der TJ-Stränge wahrscheinlich Kopolymerisierungen von Occludin mit den Claudinen in Form von Heteropolymeren verantwortlich sind (Tsukita und Furuse, 2000).

Die ersten Ergebnisse der durchgeführten SPR-spektroskopischen Messungen bestätigen die Assoziation von ZO-1.644-890 an Occludin (AS 378-521). Die geringe Sequenzhomologie

(50%) zwischen Hühner- und humanen bzw. Maus-Occludin scheint also die Bindung nicht zu beeinflussen. Weiterhin zeigten die Untersuchungen eine spezifische Interaktion zwischen ZO-1 und Occludin. SPR-Messungen mit anderen, zum Teil helikalen Proteinen (BSA, MBP-Gal, Myoglobin etc.) führten nicht zu einer Bindung an das Occludin. Daraufhin wurde die ZO-1-Sequenz von Fanning, die die Guk-Domäne und den sauren C-terminalen Teil von ZO-1 umfaßte, um 78 AS gekürzt. Das verkürzte Protein ZO-1.644-812 enthält die eigentliche Guk-Domäne (644-794) und C-terminal den gesamten vorhergesagten potentiell helikalen Bereich CC2 (AS 751-798). Dieses Guk-Fragment zeigt eine fast vierfach höhere Bindung an den C-terminalen Teil von Occludin als das von Fanning und Kollegen (1998) eingesetzte Protein (siehe Abb. 3.10/11). Aus den SPR-Untersuchungen wurden submikromolare Bindungsaffinitäten von ZO-1.644-812 zu Occludin gefunden und Bindungskonstanten von 0,7-0,8 μM kalkuliert. Die SPR-Messungen bestätigen somit die Guk-Domäne als Bindungsregion für Occludin, denn bei C-terminaler Verlängerung auf ZO-1.644-890 verringerte sich die Bindungsaffinität um das Doppelte (ca. 1,6 μM). Verschiedene Untersuchungen haben für SH3-Domänen spezifische Bindungspartner identifiziert, deren Bindungsaffinitäten ebenfalls im submikromolaren Bereich (Posern et al., 1998) bis in einem Bereich um 10 μM (Mayer, 2001) und 50 μM lagen (Larson und Davidson, 2000). Daraus läßt sich folgern, daß die C-terminale saure Region von ZO-1 für die Bindung an Occludin nicht notwendig ist, sondern vielmehr die Guk-Domäne für den Bindungsmechanismus verantwortlich zu sein scheint. Ursache der besseren Bindung der verkürzten Sequenz ist möglicherweise eine Maskierung der Guk-Domäne durch den C-terminalen Teil von ZO-1, so daß Bindungsstellen für Occludin im ZO-1.644-890 nicht mehr frei zugänglich sind. Der C-terminale Bereich von ZO-1 (Maus: AS 863-1745) ist *in vivo* mit dem Aktinfilament und Aktin-enthaltenen Strukturen assoziiert (Itoh et al., 1997; Fanning et al., 1998). Ryeom und Mitarbeiter (2000) stellten Bindungen von C-terminal verkürztem rekombinantem ZO-1 (AS: 1-422 und 1-794) ohne Zytoskelettanker mit anderen Proteinen fest, die bei gesamter Länge von ZO-1 nicht möglich waren.

Aufgrund der Einbeziehung bioinformatischer Studien wurden die Sequenzen der ZO-1-Fragmente dahingehend erweitert, daß sie auch den N-terminal an die Guk-Domäne angrenzenden Bereich bis zum Beginn der SH3-Domäne (CC1) umfassen. Der Sequenzbereich zwischen SH3- und Guk-Domäne wird im folgenden als Drehangelregion bezeichnet und entspricht der *HOOK-* bzw. *Hinge-*Region in anderen MAGUK-Proteinen (Tavares et al., 2001; McGee et al., 2001).

Die Einbeziehung der Drehangelregion (mit CC1, AS 611-624) und eine N-terminale Verlängerung der ZO-1-Fragmente um 4-12 AS (Vorsequenz vor 601) waren ausschlaggebend für steigende Bindungen an Occludin. Überraschend konnten die stärksten Bindungen an Occludin mit ZO-1-Fragmenten bei fehlendem C-terminalen Teil von CC2, wie z.B. ZO-1.589-772 und ZO-1.597-772, im Vergleich mit den bis zu AS 812 reichenden Sequenzen, gefunden werden. Die Bindungsmengen aller ZO-1-Fragmente an Occludin sind im folgenden semiquantitativ dargestellt und veranschaulichen die bis zu 2,5-fach stärkeren Bindungen von ZO-1.589-772 sowie ZO-1.597-772 an Occludin (Abb. 4.1).

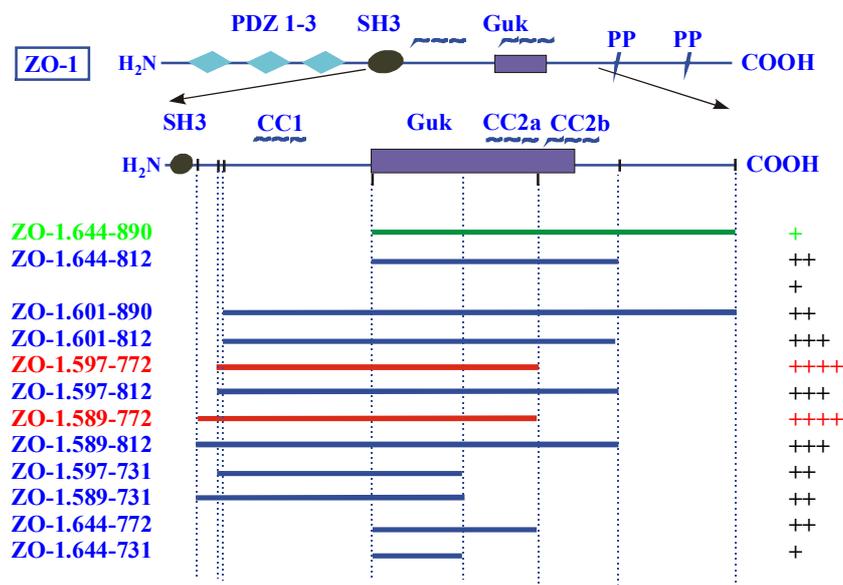


Abb. 4.1 Semiquantitative Auswertung der SPR-Messungen aller ZO-1-Fragmente hinsichtlich ihrer Bindungsmengen an das immobilisierte Occludin.378-521. Diese Werte wurden mit „+“ gekennzeichnet. Ausgegangen wurde von dem von Fanning et al. (1998) untersuchten ZO-1.644-890, das entsprechend der angegebenen Längen modifiziert wurde (ZO-1-Sequenzangaben auf der linken Abbildungsseite). Hervorzuheben ist die vergleichbare Bindungsstärke der Fragmente ZO-1.589-772 und ZO-1.597-772, die mindestens bis zu 2,5-fach größer im Vergleich zu den anderen war.

Zusätzlich zur Guk-Domäne mit CC2a als Occludinbindungsbereich weisen somit die Ergebnisse auf eine direkte Beteiligung der Drehangelregion (inklusive CC1) an der Assoziation mit Occludin hin (siehe 4.2.1.3). Die Bindungsaffinitäten von ZO-1.589-772 bzw. 597-772 sind etwa eine Größenordnung kleiner (70-120 nM) als die der Ausgangssequenzen. Itoh et al. (1999a) berechneten aus *in vitro* Bindungsexperimenten Bindungsaffinitäten zwischen der PDZ1-Domäne von ZO-1, 2 und 3 mit dem C-terminalen Teil von Claudin 1-8, die im Bereich von 11-18 nM lagen. Durch eine starke Affinität des C-terminalen Teils der Claudine zu der PDZ1-Domäne der ZO-Proteine werden zytoplasmatische Proteine an der

Membran lokalisiert und in die TJ-Stränge eingebaut. Auch die aus den durchgeführten SPR-Messungen berechneten Affinitäten deuten auf starke Wechselwirkungen zwischen dem C-terminalen Teil von Occludin und der Guk-Domäne bzw. weiterer Bindungsbereiche von ZO-1 hin, die auf ähnlichen Funktionen für die ZO-1/Occludin-Interaktion in den TJ schließen läßt. Zur Bestätigung der spezifischen Bindung von Occludin an die Guk-Domäne von ZO-1 wurde die Wechselwirkung zwischen Occludin und synthetisch hergestellten Peptiden in SPR-Messungen und in anderen unabhängigen Bindungsmethoden untersucht. Dadurch sollte die differierende Occludinbindung an CC2a sowie CC2b charakterisiert werden.

4.2.1.1 Charakterisierung des Bindungsverhalten von Occludin an CC2a

Die nachweislich stärkste Bindung an Occludin besitzt der Sequenzabschnitt CC2a. Bindungsaffinitäten der Peptide CC2a₂₈ und CC2a₂₀ im nanomolaren Bereich (52-76 nM) zeigen eine starke Wechselwirkung zwischen Occludin und diesen Sequenzbereichen. Dabei wurden im Gegensatz zu den rekombinanten ZO-1-Fragmenten schnellere Kinetiken der Interaktion ermittelt, die bei ausreichend hohen Konzentrationen von Occludin (0,5-1 µM) zur Sättigung kamen (siehe Abb. 3.21).

Um diese Bindung durch anderen Methoden zu bekräftigen, wurden die biotinylierten Sequenzabschnitte P.745-772 (CC2a₂₈) und P.750-769 (CC2a₂₀) auf Streptavidin-Partikel immobilisiert. Eine Inkubation der an die Streptavidin-Partikel immobilisierten Peptide mit dem C-terminalen Teil von Occludin ergab eine nahezu vollständige Assoziation an CC2a₂₀ und CC2a₂₈ (siehe Abb. 3.25). Diese Ergebnisse bekräftigen damit die oben genannten SPR-Messungen. Occludin aus MDCK-Zellysate zeigte in Koimmunopräzipitationsversuchen keine Bindung an das immobilisierte Peptid CC2a₂₈ (siehe Abb. 3.24). Grund hierfür kann erstens eine zu geringe Konzentration von Occludin in der Inkubationsfraktion aus dem MDCK-Zellysate gewesen sein. Zweitens kann eine Bindung von Occludin an das immobilisierte Peptid dadurch verhindert worden sein, daß Occludin schon im Zellysate in einem Multiproteinkomplex eingebunden war. Somit standen keine freien Bindungsstellen mehr für die Assoziation an die Peptidsequenz zur Verfügung.

Weiterhin wurde eine Epitopmapping durchgeführt, um die für die Occludinbindung notwendigen spezifischen Aminosäuren aus der Guk-Domäne von CC2a zu identifizieren. Dabei wurde eine Peptidbank mit unterschiedlich langen Peptiden hergestellt, bei der die

Ausgangssequenz CC2a₂₀ (Wildtyp, ZO-1.750-769) aus der Guk-Domäne von ZO-1 durch N- und C-terminale Verkürzung modifiziert wurde. Die Testung des Bindungsverhaltens von Occludin gegenüber diesen 120 membrangebundenen Peptiden aus dem Abschnitt CC2a des ZO-1 diente der Einengung des Bindungsepitops auf die wesentliche Hauptbindungssequenz. Die Auswertung der gebundenen Occludinmenge an die einzelnen Peptide ergab, daß vor allem der hintere Teil von CC2a, bestehend aus den Aminosäuren LRKNNHHLF (ZO-1.761-769), für eine Bindung an Occludin unabdingbar ist. Dieses Bindungsmotif entspricht einer helikalen Windung einer Coiled coil-Helix („Leucin-Zippermotif“, Lupas, 1996). Für diesen Abschnitt wurde eine noch ca. 60%-ige Bindung im Vergleich zur Ausgangssequenz CC2a₂₀ erreicht. Dagegen führte eine C-terminale Verkürzung der Ausgangssequenz CC2a₂₀ und eine damit einhergehende Modifizierung des Bindungsmotifes LRKNNHHLF zu einer drastischen Reduzierung der Bindung von Occludin an diese Peptide (siehe Tab. 3.5). Das N-terminale gelegene „Leucin-Zippermotif“ LYERSHKL (ZO-1.754-761) scheint dagegen keine Bedeutung für die Occludinbindung (0,8%) zu haben.

Eine Veränderung der Ausgangssequenz CC2a durch einen systematischen Aminosäureaustausch an jeder Aminosäureposition der Wildtypsequenz ist zur Bestimmung sogenannter Schlüsselaminosäuren notwendig. Aus dieser Substitutionsanalyse von CC2a₂₀ konnte aber kaum die Bedeutung einzelner AS bestimmt werden (Abb. 3.28). Evident ist nur, daß Cystein an keiner Stelle der Wildtypsequenz stehen darf, da es zu einer sichtbaren Reduzierung der Bindungshöhe kam. Aus den oben genannten Ergebnissen ist eine Substitutionsanalyse des kleinsten noch ausreichend bindenden Epitops (LRKNNHHLF) eine mögliche Alternative, um die Bedeutung dieser Aminosäuren, für eine Occludinbindung zu ermitteln (in Bearbeitung). Mögliche Ursache der begrenzten Auswertbarkeit der Substitutionsmembran kann sein, daß die Occludinbindung gegen synthetisch hergestellter Peptide getestet wurde. Synthetische Peptide besitzen eine bevorzugte Raumstruktur, aber ob diese mit dem nativen Protein identisch ist, kann kaum vorhergesagt werden (Dyson und Wright, 2002). Besonders dann, wenn das Epitop im zu untersuchenden Protein eine stabilisierte, von Zufallsfaltungen beherrschte andere Struktur aufweist, könnten zufällige Bindungen detektiert werden (Kramer et al., 1994).

In vitro Untersuchungen (Ryeom et al., 2000) haben spezielle Funktionen der verschiedenen Domänen von ZO-1 als Protein-Protein-Interaktionsstellen nachgewiesen. Dabei wurde die differierende subzelluläre Verteilung verschiedener Mutationsformen von ZO-1 durch

Immunfärbungen gezeigt. So befinden sich vollständiges sowie C-terminal verkürztes ZO-1 (nur PDZ-, SH3- und Guk-Domänen) an den Grenzen der Zell-Zell-Kontakte in endo- und epithelialen Zellen. Deletionsmutanten ohne Guk-Domäne sind dagegen diffus im Zytoplasma verteilt. Diese Mutanten zeigten *in vitro* einen veränderten Phänotyp und *in vivo* eine erhöhte Tumorbildung (Gehirntumore, Reichert et al., 2000). Die Guk-Domäne von ZO-1 spielt somit eine essentiellen Rolle als Lokalisierungssignal zur zytoplasmatischen Verankerung an der apikalen Zellmembran. Die hier durchgeführten vielfältigen Untersuchungen unterstreichen die spezifische Bindung von Occludin an die Guk-Domäne von ZO-1 (insbesondere CC2a) und zeigen ihre funktionelle Wichtigkeit für die Interaktion mit Occludin. Beispielsweise ist die Expression von Occludin in morphologisch veränderten Zellen, bei der Guk-Deletionsmutanten von ZO-1 im Zytoplasma verteilt sind, dramatisch herabreguliert (Ryeom et al., 2000). Die Bedeutung der Guk-Domäne wird auch durch Studien mit dem *Drosophila*-homologen MAGUK-Protein Dlg unterstützt. Auch hier ergeben Deletionsstudien, daß Dlg-Mutanten ohne Guk-Domäne nicht in neuromuskulären junctions lokalisiert sind (Budnik et al., 1996; Thomas et al., 2000).

4.2.1.2 Charakterisierung des Bindungsverhalten von Occludin an CC2b

Widersprüchlich waren die Bindungsuntersuchungen mit dem C-terminalen Teil der Guk-Domäne mit dem Sequenzabschnitt CC2b. Dieser Abschnitt besitzt viele Glutamine (QQQQNQ), d.h. die Löslichkeit in Wasser ist gering. In höheren Konzentrationen bildete sich eine geleeartige Masse. Dadurch wurde keine reproduzierbare Immobilisierung von CC2b erreicht, die keine Stabilisierung der Basislinie zur Folge hatte. Das führte dementsprechend zu einer Verfälschung der Bindung von Occludin an CC2b. Mit den gleichen Methoden aufgereinigtes Occludin aus an verschiedenen Tagen hergestellten *E. coli*-Lysaten zeigten keine eindeutigen, reproduzierbaren Bindungsergebnisse. Eine weitere Erklärung der widersprüchlichen Bindungsergebnisse ist, daß auch hier kurze, synthetisch hergestellte Peptide eine von den *in vivo* herrschenden Bedingungen abweichende Faltung aufweisen können (Dyson und Wright, 1991). Alterierende Peptidkonformationen führen zu inhomogenen Peptidpopulationen auf dem Sensorchip und wechselndem Bindungsverhalten zum Bindungspartner (Van Merwe et al., 1996). Ebenso sind schwankende Bindungseigenschaften der kovalenten Immobilisierung des Peptides geschuldet (Luo et al., 1999). Durch CD-spektroskopische Messungen wurde die in bioinformatischen Betrachtungen

vorausgesagte potentielle helikale Struktur von CC2b nachgewiesen. CC2b besitzt einen hohen Anteil an α -helikalen Strukturen, die von ca. 78% in wäßriger Lösung auf bis zu 94% unter TFE anstiegen. Diese Helix könnte *in vitro* in einer unspezifischen Coiled coil-Wechselwirkung mit Occludin interagieren, aber bei Vorhandensein vollständiger Proteine kein Bindungsort für Occludin sein.

Wie sind die verringerten Bindungsmengen/Affinitäten zu Occludin, der bis AS 812 reichenden ZO-1-Fragmente und die widersprüchlichen Bindungsergebnisse mit CC2b zu erklären? McGee und Brecht (1999) identifizierten eine spezifische intramolekulare Interaktion zwischen der SH3- und Guk-Domäne im sehr ähnlich strukturierten MAGUK-Protein PSD-95, insbesondere zwischen den β -Faltblattsträngen E in der Drehangelregion und F (C-terminal der Guk-Domäne) und stellten fest, daß diese Interaktion auch in anderen MAGUKs (Dlg) konserviert ist. Auch Tavares et al. (2001) gehen davon aus, daß die intramolekulare Wechselwirkung in allen MAGUKs konserviert ist. Obwohl spezielle prolinreiche Sequenzen in der Guk-Domäne von PSD-95 fehlen, die typischerweise an SH3 binden, finden diese heterotypischen Interaktionen statt (McGee und Brecht, 1999 und 2001; Shin et al., 2000; McGee et al., 2001; Tavares et al., 2001). Außer dem PSD-95 zeigen die MAGUK-Proteine SAP97 (Wu et al., 2000), Dlg (Marfatia et al., 1994; Masuko et al., 1999; Nix et al., 2000), Chapsyn-110 (Tavares et al., 2001), CASK (Cohen et al., 1998; Nix et al., 2000) und p55 (Marfatia et al., 1994) eine inter- und intramolekulare Interaktionen zwischen der SH3- und Guk-Domäne. Beispielsweise fanden Nix et al. (2000) *in vivo* heteromultimere Interaktionen zwischen den MAGUKs hCask, hDlg und p55 über diese Domänen. Die Guk-Domäne von p55 interagiert mit der SH3-Domäne von hCASK, hDlg und p55; die SH3-Domäne von p55 mit der Guk-Domäne von hCASK und p55; die SH3-Domäne von hCASK mit seiner Guk-Domäne und die SH3-Domäne von hDlg mit seiner Guk-Domäne und der von hCASK. Alle MAGUKs besitzen eine SH3- und Guk-Domäne, aus denen sich ein Vielzahl kombinatorischer Interaktionsmöglichkeiten zwischen diesen ergeben, die zu dem komplexen Netzwerk an der lateralen Plasmamembran von Endothel- und Epithelzellen führen können (Nix et al., 2000). Die im ZO-1 vorhandenen β -Stränge E (ZO-1.633-640) und F (ZO-1.797-800) könnten auch hier Regionen für intramolekulare Interaktionen zwischen SH3- und Guk-Domäne sein bzw. einen Einfluß auf den Oligomerisierungsgrad (Shin et al., 2000; McGee et al., 2001; siehe dazu 4.2.2) von ZO-1 haben. In den oben genannten Veröffentlichungen wurde immer eine dominantere intramolekulare Interaktion zwischen beiden Domänen

gefunden, die die intermolekulare Assoziation an andere Proteine verhindert. Daraus könnte sich ergeben, daß der F-Strang in CC2b durch eine Bindung an den E-Strang eine Wechselwirkung mit Occludin durch eine Veränderung der Konformation von ZO-1 (Bindung der Stränge untereinander) unterdrückt, die in einer nachfolgenden Maskierung von CC2a resultiert. Außerdem wurde von McGee et al. (2001) festgestellt, daß zur Assoziation von SH3- und Guk-Domäne im PSD-95 eine Region hinter der Guk-Domäne benötigt wird, die für Interaktionen mit exogenen Guk-Bindungspartnern nicht notwendig erscheint. Beispielsweise zerstört eine Deletion der C-terminal 12 letzten Aminosäuren der Guk-Domäne im PSD-95 die intramolekulare Interaktion zwischen der SH3- und Guk-Domäne (Shin et al., 2000). Die Kristallstruktur zeigte, daß 7 der 12 Aminosäurereste an der Bildung einer β -Faltblattstruktur (F-Strang) und die meisten an einer hydrophoben Interaktion mit Aminosäureresten aus der SH3- und Drehangelregion beteiligt sind (Tavares et al., 2001). Die hier durchgeführten SPR-Messungen bestätigen diesen Fakt, da die oben beschriebene Region hinter der Guk-Domäne (z.B. in ZO-1.601-890 und ZO-1.644-890) für die Bindung an Occludin nicht notwendig zu sein scheint und durch Deletion dieser Region CC 2b eine stärkere Interaktion mit Occludin möglich ist (z.B. ZO-1.589-772 und 597-772). Aus der diskutierten Möglichkeit einer Beteiligung von CC2b an der intramolekularen Wechselwirkung mit der Drehangelregion ergibt sich eine mögliche andere Funktion von CC2b im ZO-1, die eine Bindung an exogene Bindungspartner (Occludin) ausschließt.

4.2.1.3 Charakterisierung des Bindungsverhalten von Occludin an CC1

Bisher ist die Bedeutung der Drehangelregion nur in anderen MAGUKs untersucht worden. Im MAGUK-Protein Dlg in *Drosophila melanogaster* ist die Drehangelregion (*HOOK*-Region) für die Lokalisierung von Dlg an der Plasmamembran von Insektenaugen (*imaginal discs*) sowie an den synaptischen und *septate junction* verantwortlich (Thomas et al., 2000) und reguliert das epitheliale Wachstum (Hough et al., 1997). Auch im MAGUK-Protein SAP97 ist die Drehangelregion essentiell für die effiziente Lokalisierung und zytoskelettale Verankerung an Bereiche der Zell-Zelladhäsion (Wu et al., 1998). Die Ergebnisse von Wu et al. führten zu der Hypothese, daß SAP97 als Adapterprotein der Bildung des makromolekularen Proteinkomplexes an verschiedenen spezialisierten Membranregionen der synaptischen junctions fungiert.

Erstmals wurde neben dem bindungsreduzierenden Effekt bei Vorhandensein von CC2b eine mögliche Beteiligung potentiell helikaler Strukturen N-terminal der Guk-Domäne in der Drehangelregion an der Interaktion mit Occludin gezeigt, die in der entsprechenden Literatur noch nicht diskutiert wurde. Der positive Einfluß der Vorsequenz des N-terminal längsten ZO-1-Fragment auf die Bindung an Occludin konnte auch durch den Vergleich der Bindungsaffinitäten von ZO-1.589-772 (ca. 70 nM) mit dem ZO-1.597-772 (ca. 120 nM) bzw. ZO-1.601-772 (ca. 150 nM) nachgewiesen werden. Aus diesem neuen Aspekt der Interaktion ergeben sich weitreichende Konsequenzen.

Deshalb wurde zur Überprüfung einer spezifischen Bindung von Occludin an eine weitere Bindungsstelle von ZO-1 ein synthetisch hergestelltes Peptid P.597-633 (CC1) in SPR-Messungen untersucht. Dabei zeigte CC1 ähnliche Bindungsaffinitäten zu Occludin wie die rekombinant hergestellten ZO-1-Fragmente ZO-1.589-731 und 597-731 mit involvierter Drehangelregion und N-terminaler Guk-Domäne. Für ZO-1.589-731 wurden K_D -Werte von 460 nM, für ZO-1.597-731 500 nM und für das Peptid P.597-633 460 nM kalkuliert.

Diese Ergebnisse bestätigen erstens die Vermutung, daß die ZO-1-Region zwischen SH3- und Guk-Domäne (inklusive CC1 und Vorsequenz) funktionelle Bedeutung bei der Vermittlung intermolekularer Interaktionseigenschaften zu Occludin besitzt. Aufgrund der aufgeführten Ergebnisse aus den Bindungsstudien und der Sequenzhomologien der Proteinbindungsdomänen der MAGUK-Familie untereinander ist es zweitens wahrscheinlich, daß auch ZO-1 über intramolekulare Interaktionsmechanismen zwischen SH3- und Guk-Domäne verfügt.

4.2.2 Oligomerisierung von ZO-1 zur Proteinkomplexbildung in den Tight junctions?

In allen MAGUKs besteht die β -Faltblattstruktur der SH3-Domäne aus den Strängen A bis F und ist innerhalb der MAGUKs stark konserviert (Sequenzalignmentvergleich). Damit enthält die Faltblattstruktur der SH3-Domäne Stränge, die durch die Drehangelregion und die Guk-Domäne unterteilt werden und Subdomänen bilden. Diese Subdomänen können in Abhängigkeit der intra- und intermolekularen Interaktionsmechanismen in ZO-1 (sowie auch in allen anderen MAGUKs) die SH3-Faltblattstruktur komplementieren.

Aus diesen Gründen sollten SH3- und Guk-Domäne als eine gemeinsame funktionelle Einheit betrachtet werden (siehe Abb. 4.2).

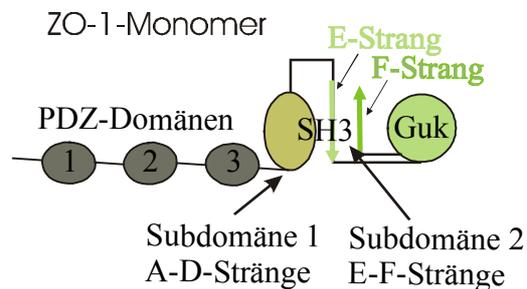


Abb. 4.2 Schematische Darstellung der SH3-Guk-Einheit. Die Drehangelregion und die Guk-Domäne unterteilen die SH3-Domäne in zwei Subdomänen, eine Kernregion von vier β -Strängen A-D und ein β -Paarstrang, bestehend aus E und F, der die Guk-Domäne flankiert.

SPR-Messungen mit einem ZO-1-Fragment, das beide Subdomänen integriert (ZO-1.502-812), führte in weitaus geringeren Konzentrationen (0,1-1 μ M) zu einer starken Bindung an Occludin. In diesem Fragment scheint die Faltung der Subdomänen 1 und 2, eher dem nativen Protein zu entsprechen, so daß auch die Bindungsstellen für Occludin nicht durch unnatürliche Konformationsänderungen in ZO-1 verdeckt werden (siehe Abb.7.1.14. A).

Durch die Bindungsuntersuchungen von ZO-1 an Occludin wurden erste Hinweise für eine neue ZO-1-Funktion gefunden. Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß eine mögliche Oligomerisierung durch spezifische Domänen in ZO-1 auftritt. Bei Bindung verschiedener ZO-1-Fragmente an Occludin wurde trotz längerer Infusionsdauer (bis zu 20 min) kein Gleichgewicht in der Reaktion erreicht, was durch eine Oligomerisierung rekombinanter ZO-1-Fragmente erklärbar wäre. Nachfolgende Untersuchungen mit dem MBP-Fusionsprotein von ZO-1.589-812 mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation bestätigten diese Befunde (siehe Abb. 3.6). Die Analyse der Sedimentationsgeschwindigkeiten und die daraus folgende Bestimmung der S-Werte führten zu der Vermutung, daß hochmolekulare Komplexe von bis zu 30 ZO-1-Molekülen vorhanden sind. Diese Ergebnisse wurden auch durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bekräftigt, bei der eine Selbstassoziation von 30-50 ZO-1-Molekülen nachgewiesen wurde. Die gewonnenen Einsichten wurden durch nachfolgende Zentrifugationsstudien mit PSG-ZO1 (Expression in Sf9-Insektenzellen) weiter ausgebaut, da man hier auf ein eukaryotisches System zurückgreift, bei der die Faltung und räumliche Struktur des ZO-1 der *in vivo* Situation näher kommt. Durch die Sedimentationsanalyse konnten neben Monomeren, Dimere und mit steigenden Konzentrationen Trimere gefunden werden. Erste Vorversuche, bei denen Gleichgewichtsläufe von PSG-ZO-1 aufgenommen wurden, bestätigen bereits die oben genannten Ergebnisse (mündlich Dr. D. Utepergenov und Dr. D. Labudde).

Oligomerisierungen können ein weiterer Mechanismus sein, durch die MAGUK-Proteinkomplexe TJ-Stränge bilden bzw. über integrale Proteine mit der Plasmamembran verankert sind. Coiled coil-Strukturen sind als Dimerisierungselement in einer Klasse von Transkriptionsfaktoren (Leucin-Zipperproteinen) gefunden worden (Landschulz et al., 1988). Neueste Veröffentlichungen haben Beweise erbracht, daß über die SH3- und Guk-Domäne von MAGUK-Proteinen inter- und intramolekulare Interaktionen erfolgen und diese dadurch als Regionen für Oligomerisierungen angenommen werden (Masuko et al., 1999; McGee und Bredt, 1999; Nix et al., 2000; Shin et al., 2000, McGee et al., 2001). PSD-95 und hDlg polymerisieren durch N-terminal vor der PDZ-Domäne gelegene Sequenzregionen (in PSD-95: AS 1-64, Hsueh et al., 1997; in hDlg: AS 1-161, Marfatia et al., 2000). Ein Bereich in der Drehangeldomäne des neuronalen MAGUK-Proteins NE-Dlg/SAP102 besteht aus wenigen basischen Aminosäuren, die seine Calmodulin-abhängige Dimerisierung vermitteln (Masuko et al., 1999). Außerdem erfolgt eine Bindung von PSD-95/SAP90 an die SH3-Domäne von NE-dlg/SAP102 über die SH3/Guk-Domäne und beide binden über ihre PDZ-Domäne an einen N-methyl-D-Aspartatrezeptor (NR2B), die wiederum zur heteromeren Komplexbildung des Rezeptors an die postsynaptischen Membran führt (Masuko et al., 1999).

Die durchgeführten ZO-1/Occludin-Bindungsstudien und die Zentrifugationsanalyse von ZO-1 haben zu der Annahme geführt, daß ZO-1 als MAGUK-Protein über ähnliche Mechanismen verfügt, die eine Ausbildung von Proteinkomplexen an der Plasmamembran induziert. Beispielsweise findet in PSD-95 die MAGUK-Oligomerisierung durch die SH3/Guk-Einheit über ein 3D-Domänentausch statt. Dabei assoziieren komplementäre Substrukturen von Polypeptidketten miteinander (u.a. β -Stränge der SH3-Faltblattstruktur) und bilden Dimere oder höhere Oligomere (McGee et al., 2001). Bei diesem Modell reguliert die Ligandenbindung an die Drehangelregion die Bildung des MAGUK-Netzwerkes. Analog dazu führen die Bindungsergebnisse dieser Arbeit zu der Annahme, daß die intra- und intermolekulare Interaktion zwischen SH3- und Guk-Domäne eine physiologische Rolle in der Funktion von ZO-1 spielt. Die Drehangelregion ist für alle MAGUKs sehr charakteristisch, aber nicht konserviert (Sequenzalignmentvergleich). Sicherlich ist in den MAGUKs ein unterschiedlicher Aufbau dieser Region (unterschiedliche Länge und Sequenz) verknüpft mit vielfältigen Funktionen und Voraussetzung für die Bindung verschiedener Proteine. Deshalb ist eine wichtige Frage im Zusammenhang mit der Bildung von makromolekularen Proteinkomplexen an der Zellmembran, die nach Regulierungsmechanismen für die Verfügbarkeit individueller Domänen für Protein-Proteinbindungen in ZO-1. In anderen

MAGUKs binden eine Reihe verschiedener Liganden an die Region zwischen SH3- und Guk-Domäne, die sich als potentielle Regulatoren der SH3-Guk-Bindung über die β -Faltblattstränge E und F erweisen könnten. Die MAGUKs CASK (Coehn et al., 1998), SAP97 (Lue et al., 1994) und p55 (Marfatia et al., 1994) binden das Protein 4.1 durch einen Bereich mit spezifischen Aminosäuren in der Drehangelregion und verbinden dadurch das Aktin/Spektrinzytoskelett mit der Plasmamembran. In PSD-95 reguliert möglicherweise die Bindung verschiedener Liganden (Calmodulin, Protein 4.1 u.a. unidentifizierte Bindungspartner) an die Drehangelregion die intra- und intermolekulare Wechselwirkung von PSD-95 (McGee et al., 2001). Bisher ist aus der Literatur kein Bindungspartner für die Drehangelregion von ZO-1 bekannt.

Eine potentielle Rolle der SH3-Guk-Interaktion könnte die effiziente Orientierung von ZO-1 in lange polymere Komplexe an der lateral-apikalen Plasmamembran in Abhängigkeit von anderen Proteinen sein. Die Bildung der TJ-Stränge durch Claudine (Homodimere von Claudin-1 und 2, Furuse et al., 1999, Itoh et al., 1999) und die Assoziation mit ZO-1 über seine PDZ1-Domäne induziert die Lokalisierung von ZO-1 in die TJs an der Plasmamembran (Kubota et al., 1999). Untersuchungen von Kobayshi et al. (2002) ergaben, daß Claudin in die Cadherin-involvierten Zell-Zellkontakte (AJ) transportiert wird, in denen ZO-1 akkumuliert war. Anschließend erfolgte eine gleichzeitige Konzentration von Claudinen und ZO-1 im apikalen Bereich der TJ. Claudine sind die Hauptkomponenten in der Bildung der transzellulären Kontakte innerhalb der TJ und kreieren die physiologische und strukturelle parazelluläre Barriere der TJ (Furuse et al., 1998b; Mitic et al., 2000; Furuse et al., 2002). Dafür spricht auch, daß für die TJ-Rekrutierung die Interaktion von ZO-1 mit dem C-terminalen Teil von Occludin nicht essentiell ist. TJs werden auch in Abwesenheit von Occludin gebildet (Itoh et al., 1999; Saitou et al., 2000), das auf andere, vorrangig regulatorische Funktionen von Occludin schließen läßt. Bei einer Transfektion von Occludin in Claudin-1-exprimierende Fibroblasten wird Occludin in diese eingebaut (Furuse et al., 1998b), wobei die Zelladhäsionsaktivität geringer ist und kürzere TJ-Stränge gebildet werden (Van Itallie und Anderson, 1997). Der Einbau von phosphoryliertem Occludin (Andreeva et al., 2001) in die TJs kann über Kooligomerisierungen mit Claudin oder die Interaktion mit den zytoplasmatischen Proteinen erfolgen (Furuse et al., 1998b). Im folgenden wird ein hypothetisches 3D-Domänentausch-Modell für ZO-1 vorgestellt, um mögliche Funktionen der ZO-1/Occludin-Interaktion darzustellen. Aus diesem Modell ist der enge Zusammenhang zwischen der intramolekularen Wechselwirkung zwischen SH3- und Guk-Domäne und einer

möglicherweise durch Ligandenbindung regulierten Oligomerisierung von ZO-1 erkennbar (Abb. 4.3).

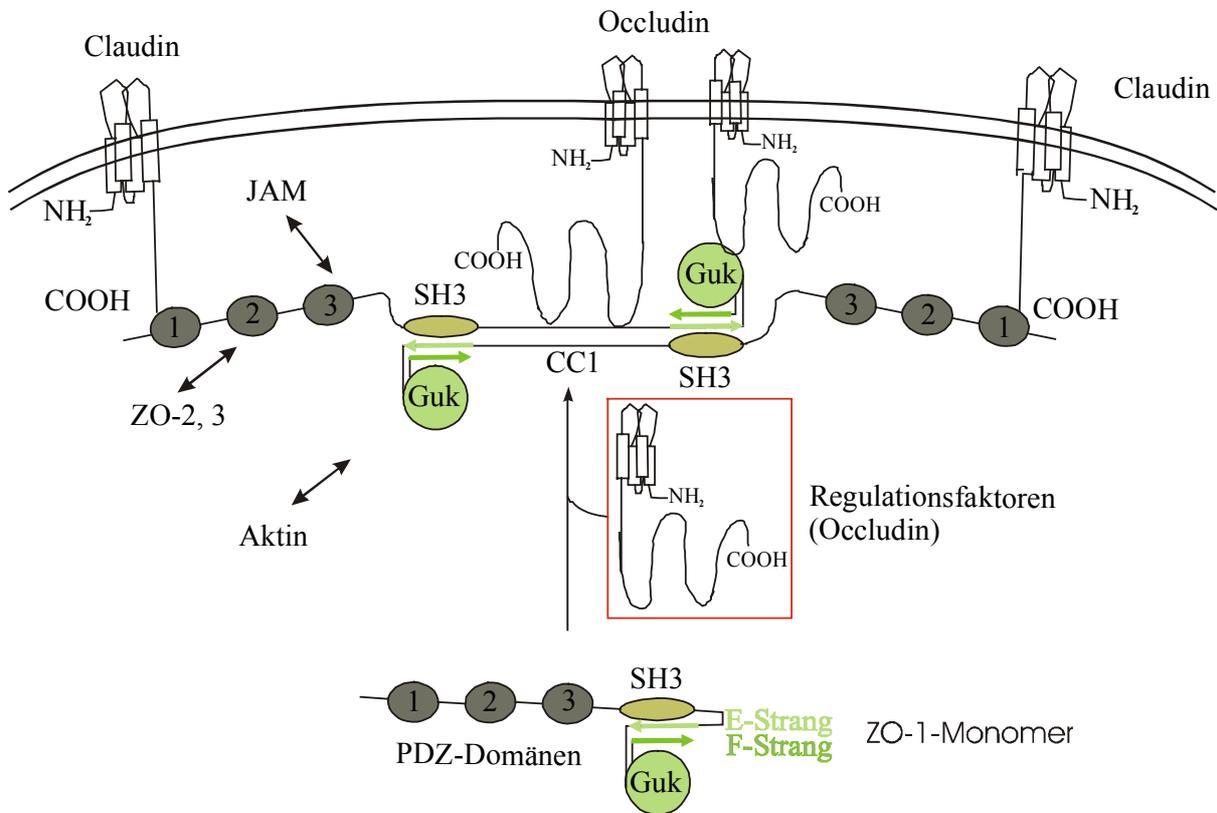


Abb. 4.3 Hypothetisches 3D-Domänentausch-Modell (modifiziert nach McGee et al., 2001). Es erfolgt eine Bindung von Occludin an die Guk-Domäne von ZO-1 und eine Bindung von Claudin über die PDZ1-Domäne von ZO-1. Durch die Bindung verschiedener Proteine, wie Occludin, an die Drehangelregion zwischen SH3- und Guk-Domäne wird die dominanteren intramolekulare Interaktion zwischen SH3- und Guk-Domäne unterbrochen und eine Dimerisierung von ZO-1 induziert, die bei weiterer Bindung zu einer zunehmenden Oligomerisierung von ZO-1 führt. Die Lokalisierung integraler Membranproteine beschränkt die Bildung supramolekularer Komplexe an den apikal-lateralen Bereich der Plasmamembran. Die Pfeile stellen die Interaktion von ZO-1 mit anderen Proteinen dar.

ZO-1 kann sich als eine molekulare Komponente der TJ erweisen, die zuerst durch Signale in bestimmten Domänen (PDZ) in die TJs eingebaut wird. Einmal verankert fungiert ZO-1 als Cluster-Komplex für nachfolgende TJ-Proteine. Eine intramolekulare Wechselwirkung zwischen den Subdomänen von ZO-1 wird erst aufgehoben, wenn die exakte räumliche Orientierung an der Plasmamembran für den korrekten sowie effektiven Aufbau der Proteinkomplexe erfolgt ist. Die Bindung von Occludin an die Drehangelregion von ZO-1 (Monomer) führt zu einer Destabilisierung der SH3-Guk-Bindung. Im SH3-Guk-3D-Domänentauschmodell interagieren die β -Stränge A-D (Subdomäne 1) von einem Molekül mit der vom E- und F-Strang gebildeten zweiten Subdomäne eines anderen ZO-1-Molekül.

Die Bindung von Occludin an ZO-1 führt somit zur Zerstörung der intramolekularen Wechselwirkung zwischen SH3- und Guk-Domäne, die eine Dimerisierung oder sogar Oligomerisierung von ZO-1 zur Folge hat. Aus den durchgeführten Bindungsuntersuchungen ergibt sich, daß u.a. Occludin als potentieller Regulator der intra- und intermolekulare Wechselwirkung von ZO-1 dienen kann. Die Lokalisierung der regulatorischen Komponenten hilft, die Ausbildung supermolekularer Komplexe an spezifischen subzellulären Orten (TJs) zu beschränken. Die Oligomerisierung von ZO-1 schafft ebenfalls eine Voraussetzung zur Ausbildung eines Multiproteinkomplexes an der apikal-lateralen Plasmamembran der TJ. Durch die Bindung von Occludin wird das Rekrutierungspotential von ZO-1 in hohem Maße verstärkt. Die Rolle von ZO-1 als Rekrutierungsmolekül ist durch die strukturellen Eigenschaften der PDZ-Domänen sowie SH3- und Guk-Domäne von ZO-1 bedingt (Willott et al., 1993), die als Bindungsregionen für andere Proteine (ZO-2 und 3; JAM; Aktin) fungieren. Die Möglichkeit, das Rekrutierungspotential von MAGUK-Proteinen durch verschiedene Regulatoren der SH3-Guk-Bindung zu beeinflussen, ist von großer Bedeutung in Prozessen, wie der Morphogenese und Wundheilung, bei denen sich die Membranpolarität der Zellen verändert (Nix et al., 2000; McGee et al, 2001).

Das 3D-Domänentausch-Modell steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der SPR-Messungen und den oben genannten Literaturdaten. Das vorgestellte Modell einer durch Occludin regulierten Ausbildung eines Makroproteinkomplexes in den TJ ist gut mit der Funktion von ZO-1 als Rekrutierungsprotein der TJ vereinbar und unterstreicht eine regulatorische Funktion von Occludin. Vorteile des 3D-Domänentauschmodells sind: (i) Durch das Modell werden komplette Domänenfaltungen erzeugt, die eine Oligomerisierung unabhängig von Bindungsstellen für andere Signalmoleküle in der SH3-Domäne erlaubt (McGee et al., 2001). Beispielsweise ist die Prolinbindungsstelle von SH3 im PSD-95 nicht an der intramolekularen Interaktion beteiligt (Tavares et al., 2001), wie Mutationsstudien gezeigt haben (McGee et al., 1999; Shin et al., 2000; Nix et al., 2000). Dagegen unterbinden Mutationen in der PDZ- und SH3-Domäne (z.B. AS Leu⁴⁶⁰ zu P) die intramolekulare Interaktion in *Drosophila melanogaster* und führen zu einem fortschreitendem Wachstums epithelialer Zellen (Woods et al., 1996; Thomas et al., 1997; Pim et al., 2000). ZONAB, ein Homologes der Y-Box-Transkriptionsfaktoren, und ZAK binden an die SH3-Domäne von ZO-1 (Balda et al., 1996). *In vivo* sind ZO-1 und ZONAB an der Regulierung der ErbB2-Expression (Transkriptionsfaktor) beteiligt (Balda und Matter, 2000). (ii) Regulatorische Proteine (z.B. Occludin) mit der entsprechenden subzellulären Lokalisation (an der TJ-

Membran) könnten die korrekte zeitliche und räumliche Ausbildung der MAGUK- (ZO-1-) Netzwerke lenken. (iii) Verschiedene regulatorische Proteine, die einen heteromeren 3D-Domänentausch (z.B. Bindung vom C-terminalen Teil von Occludin an ZO-2, und 3; Haskins et al., 1998) regeln, könnten zur kombinatorischen Vielfalt von unterschiedlicher Proteinen an der Plasmamembran beitragen und somit Regulatoren komplexer Multiproteinnetzwerke sein (McGee et al., 2001).

4.3 Ausbildung von Barriereigenschaften durch vielfältige Interaktionen zwischen Proteinen der Tight junction

Eine Vielzahl an Proteinen, die an den Zell-Zellkontakten konzentriert vorliegen, können zur Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der TJ beitragen. Neben den untersuchten TJ-Proteinen bestimmen andere Proteine (VE-Cadherin) die Ausbildung der Zell-Zelladhäsion und die Eigenschaften der TJ (Hordijk et al., 1999; van Buul et al., 2002). Beispielsweise reguliert die Aktinpolymerisierung die Stärke der VE-Cadherin-abhängigen Zell-Zelladhäsion und damit die TJ-Ausbildung. In den SPR-Messungen wurde keine Abhängigkeit der Interaktion der ZO-1-Fragmente mit Occludin in Anwesenheit von Ca^{2+} festgestellt, die aber *in vivo* durchaus möglich sein kann. Die Abhängigkeit der TJ-Permeabilität und der Barrierefunktion vom extrazellulären Kalziumgehalt wurde in epithelialen (Contreras et al., 1989; Lacaz-Vieira, 1997 und 2000) und endothelialen (Rutten et al., 1987; Ruben et al., 1992) Zellen aufgezeigt. Die kalziumfreie Zellkultivierung führte zu einer erhöhten TJ-Permeabilität und Separation der TJ-Proteine ZO-1 und Occludin von diesen und der Bildung großer interzellulärer Öffnungen zwischen benachbarten Zellen, die zu einer Öffnung der TJ führen (Ma et al., 2000).

Unter dem Aspekt eines möglichen Einflusses der ZO-1/Occludin-Interaktion auf die TJ-Permeabilität soll weiterhin der Effekt von SIN-1 auf die Bindung von ZO-1 an Occludin betrachtet werden. Verschiedene Studien zeigen, daß das Stickstoffmonoxidradikal ($\cdot\text{NO}$) die Permeabilität der BHS beeinflussen kann. Zum Beispiel sind $\cdot\text{NO}$ und andere reaktive Spezies wie Peroxynitrit in der Lage, die Permeabilität der BHS konzentrationsabhängig unter physiologischen oder pathologischen Bedingungen zu ändern (Hurst und Fritz, 1996; Janigro et al., 1994; Utepsbergenov et al., 1998; Chi et al., 1999; Abdul-Khaliq et al. 2000). Die reaktiven Spezies $\cdot\text{NO}/\text{ONOO}^-$ sind bei der Entstehung pathologischer Zustände im ZNS (Ischämie/Reperfusion, Entzündung, Schock (Cuzzocrea et al., 2001) und an der Veränderung

bis hin zur Zerstörung der BHS beteiligt (Mayhan, 2000; Beckmann et al., 2000; Nag et al., 2001). Eine erhöhte NOS-Expression auf mRNA- und Proteinebene korreliert mit dem Vorhandensein von NO/ONOO⁻ während pathologischer Prozesse, wie beim Schlaganfall und zerebralem Ödem (Nag et al., 2000). In Gehirnkapillarendothelzellen induziert NO die Phosphorylierung des Zytoskelett- und Zellkontaktproteins VASP (vasodilatatorstimuliertes Phosphoprotein, Sporbert et al., 1999), welches die EZ-EZ-Dichtheit reguliert (Draijer et al., 1996). In dieser Studie wurde die Interaktion zwischen der eigentlichen Guk-Domäne von ZO-1 (ZO-1.644-812) und Occludin unter Einfluß von SIN-1 untersucht. SIN-1 (3-Morpholinosydnonimin) generiert in wäßrigen Medien spontan NO und Superoxid, das zur Bildung von reaktivem Peroxynitrit (ONOO⁻) führt (Beckmann und Koppelol, 1996; Zöllner et al., 1997). Die Bindung von ZO-1 an Occludin wird stark, durch SIN-1 resultierend, in einer 2,5-fachen Verringerung der Bindungsstärke beeinflusst (siehe Abb. 3.18, Tab. 3.3). Unter ischämischen und nachfolgenden Reperfusionbedingungen sind NO und Superoxid und die einhergehende Bildung von toxischem Peroxynitrit grundlegend für die Verschlechterung der BHS-Funktion verantwortlich (Betz, 1993, Merrill und Murphy, 1997; Cuzzocrea et al., 2001). Auch in anderen TJs, z.B. im Darm, zeigte eine Erhöhung der NO-Konzentration eine Beeinträchtigung der epithelialen Zelladhäsion. Sie führte zu einer Verringerung der Occludinexpression und einer Erhöhung der TJ-Permeabilität (Cuzzocrea et al., 2000). Bisher wurden noch keine Studien über den direkten Effekt von ROS auf die endotheliale Expression und Interaktion der TJ-Proteine Occludin und ZO-1 durchgeführt. Mit Hilfe der SPR-Spektroskopie konnte erstmals die Verringerung der Bindung zwischen ZO-1 und Occludin unter dem Einfluß peroxinitrit erzeugender toxischer Substanzen schnell und mit geringem Aufwand gezeigt werden (Schmidt et al., in press). Diese Ergebnisse deuten auf einen molekularen Mechanismus, bei dem die TJ-Permeabilität und damit TJ-Dichtheit direkt durch eine Occludin/ZO-1-Interaktion beeinflusst wird. Die SPR-Spektroskopie stellt damit eine geeignete Methode zur Untersuchung pathologischer bzw. bindungsreduzierender Einflüsse dar, die auch eine Untersuchung von Interaktionen zwischen weiteren TJ-Proteinen erlaubt.

Folgende Literaturdaten unterstützen eine funktionelle Rolle von Occludin in der Bildung der Barriereigenschaften durch die TJs. Die Unterbrechung der Occludin-Occludininteraktion durch Zugabe von synthetischen Peptiden, die mit den extrazellulären Loops von Occludin korrespondieren, führt zu einem Abfall des transepithelialen elektrischen Widerstandes (Wong und Gumbiner, 1997; Balda und Matter, 1998). Die Einführung von C-terminal

verkürztem Occludin in MDCK-Zellkulturen haben ähnliche Effekte auf die TJ-Permeabilität, die zu einem erhöhten parazellulären Fluß von niedrigmolekularen Komponenten und zu Veränderungen der Trennfunktion führen (Balda et al., 1996a; Chen et al., 1997). Eine Überexpression von Hühneroccludin in kultivierten MDCK-Zellen erhöht die Anzahl an TJ-Strängen mit einer einhergehenden Erhöhung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (McCarthy et al., 1996). Die Behandlung endothelialer Zellen mit zytostatischen Substanzen (mehrfach ungesättigt Fettsäuren) regulieren unter anderem auch die Expression von Occludin und erhöhen den TER bzw. verringern die Permeabilität dieser Zellen (Jiang et al., 1998). Aus diesen Daten ergibt sich, daß Occludin als regulatorische Komponente der TJ-Dichtheit und als Regulator der TJ-Permeabilität fungieren kann (Bamforth et al., 1998; Saitou et al., 2000). Die Rekrutierung verschiedener Proteine über ihre spezifischen Domänen in die TJs und die Bildung eines makromolekularen Komplexes an der zytoplasmatischen Seite der TJ-Stränge wirft Fragen zur physiologischen Funktion dieser Komplexe auf. Neben der schon aufgezeigten Vielzahl von ZO-1-Interaktionspartnern ist auch die Bindung C-terminaler Regionen von ZO-1 (und auch ZO-2) an das Aktinfilament nachgewiesen (Itoh et al., 1997 und 1999; Fanning et al., 1998). Aus dem vorgeschlagenen Modell (siehe Abb. 4.3) ergibt sich, daß die TJ-MAGUKs als Verbindung zwischen den TJ und dem Aktinfilament fungieren. Aus diesen Gründen ist es sinnvoll zu spekulieren, daß ZO-1 direkt in den Regulationsmechanismus der TJ-Barrierefunktion eingebunden ist, denn es wird angenommen, daß sie durch die Assoziation von Aktin mit den TJ-Strängen reguliert wird (Madara, 1998).