

5 SCHLUßFOLGERUNG UND AUSBLICK

Störungen der Blut-Hirn-Schranke (BHS) sind Begleiterscheinungen vieler neurologischer Erkrankungen (z. B. Hirntumore, Meningitis, Enzephalitis, ischämische Erkrankungen, Malaria, AIDS-Dementia Komplex, multiple Sklerose, diabetische Retinopathie, Bluthochdruck) und führen oft zur Öffnung der Tight junction (TJ). Gehirnkapillarendothelzellen (GKEZ) erwerben ihre Barriereigenschaften durch die Wechselwirkung mit dem umgebenden Mikromilieu und verlieren sie unter pathologischen Bedingungen. Wichtigste Eigenschaft der GKEZ ist die extrem niedrige parazelluläre Permeabilität im Bereich der TJ und das Vorhandensein selektiver transzellulärer Transportsysteme. Die Erforschung der Schrankenfunktion ist deshalb eng mit der Aufklärung der Struktur, Funktion und Regulation der TJs und der molekularen Charakterisierung der TJ-Proteine verbunden. Letzteres ist von grundlegendem aber auch medizinischem Interesse. Es können Störungen der Schrankenfunktion diagnostiziert sowie therapiert und umgekehrt eine gezielte temporäre Öffnung der Barriere für eine systematische Applikation von Pharmaka erreicht werden. Ebenso ist die Aufklärung der TJ-Struktur und deren Protein-Protein-Interaktionen in anderen epithelialen Geweben (Niere, Leber, Darm) von großer Bedeutung.

Occludin ist ein regulatorisches und selbst durch Signaltransduktionsvorgänge reguliertes transmembranes Protein der TJ. Für die Aufklärung der TJ-Funktion und komplexer Regulationsmechanismen der Makroproteinkomplexe an den Zell-Zellkontakten spielt das Verständnis seines Zusammenwirkens mit Membranproteinen, wie dem Multidomänenprotein ZO-1, eine große Rolle. Um die Assoziation von TJ-Proteinen zu untersuchen und die beteiligten Domänen bzw. Peptidsequenzen zu identifizieren, ist die Anwendung der SPR Spektroskopie eine schnelle, direkte und einfach anwendbare Methode im Vergleich zur bisher dominierenden Kopräzipitationsanalyse. Diese Technik wird bei Verwendung vorgereinigter Proteine nicht durch andere TJ-Proteine sowie Zytosolbestandteile beeinflusst. Erstmals konnten durch den Einsatz der SPR-Spektroskopie die kinetischen Parameter der Wechselwirkung zwischen TJ-Proteinen bestimmt werden. Durch diese und andere Bindungsstudien (Epitopmapping, Kopräzipitation) wurde die Bindungsregion für Occludin auf zwei Hauptbindungsbereiche (CC1 und CC2a) im ZO-1 eingegrenzt. Es wurden submikromolare Bindungsaffinitäten des zytosolischen C-terminalen Teils von Occludin an einen Bereich der Guk-Domäne (CC2a) und erstmals an eine Region zwischen SH3- und Guk-

Domäne (sogenannte Drehangelregion inklusive CC1) bestimmt. Die spezifische Bindung von Occludin an die Guk-Domäne von ZO-1 wurde durch ein Epitopmapping von CC2a bestätigt. Durch die Längenanalyse des Bindungsepitops CC2a aus der Guk-Domäne von ZO-1 wurde die Interaktion mit Occludin näher charakterisiert und die Bindung auf ein Leucin-Zippermotif in ZO-1 (AS 761-769) eingeschränkt.

Außerdem sind die strukturellen Voraussetzungen für eine Coiled coil-Interaktion in beiden Proteinen erfüllt. Es wurde sowohl die α -helikale Struktur eines kürzeren C-terminalen Teils von Occludin als auch die Neigung einiger ZO-1-Peptidsequenzen (CC1, CC2a und CC2b) zur Ausbildung helikaler Strukturen durch die Circular dichroismus-Spektroskopie nachgewiesen.

Aus den Ergebnissen der Bindungsstudien wurde die Hypothese entwickelt, daß Occludin ein potentieller Kandidat für eine Regulation der intra- und intermolekulare Wechselwirkung von ZO-1 ist. Erstmals wurde eine Bindung von Occludin an die sogenannte Drehangelregion zwischen SH3- und Guk-Domäne nachgewiesen. Die SH3-Guk-Domäne scheint als eine funktionelle Einheit, für die Oligomerisierung von ZO-1, unter Beteiligung von Occludin zu fungieren. Die nachgewiesene spezifische Bindung beider Proteine könnte somit von regulatorischer Relevanz bei der Ausbildung der Multiproteinkomplexe der TJs an der Plasmamembran sein. Ebenfalls wird die Rolle von ZO-1 als Rekrutierungsmolekül unterstrichen, da durch die vorhandenen Proteinbindungsdomänen, weitere Proteine (Membranproteine, wie ZO-2 und 3 etc.) in die TJs rekrutiert werden können.

Der bindungsreduzierende Effekt von NO und anderer reaktiver Spezies wurde durch die SPR-Spektroskopie nachgewiesen und schließt auf einen molekularen Mechanismus der ZO-1/Occludin-Interaktion auf die TJ-Permeabilität und damit Dichtheit der BHS.

Aus der Vielzahl der möglichen Protein-Protein-Wechselwirkungen in den TJs ist die Komplexität der Regulationsmechanismen an den Zell-Zellkontakten ersichtlich. Die Interaktion zwischen ZO-1 und Occludin trägt entscheidend zur Ausbildung der TJ bei, ist aber keine alleinige Komponente für die Regulation der TJ-Eigenschaften. Eine tiefergehende Untersuchung zur Aufklärung von Mechanismen der endothelialen sowie epithelialen Bildung von Zellkontaktstrukturen sind daher notwendig

Zusammengefaßt sind die zentralen Ergebnisse der Arbeit:

1. Bestätigung der Möglichkeit einer coiled coil Wechselwirkung zwischen beiden Proteinen durch CD-spektroskopische Untersuchungen.

2. Occludin-Bindungsepitope im ZO-1 sind (i) die Guk-Domäne mit CC2a (ZO-1.750-769) und (ii) Sequenzen in der sogenannten Drehangelregion zwischen SH3- und Guk-Domäne (ZO-1.589-643 mit CC1 und Vorsequenz).
3. Betrachtung der SH3- und Guk-Domäne als gemeinsame funktionelle Einheit, die aus den Subdomänen 1 (β -Stränge A-D) und 2 (β -Stränge E-F) besteht.
4. Potentielle Rolle der SH3-Guk-Interaktion zur Orientierung von ZO-1 in polymere Komplexe an der lateral-apikalen Plasmamembran der TJs.
5. Mögliche Regulierung der intra- und intermolekularen Wechselwirkung von ZO-1 durch die Bindung von Occludin an die Drehangelregion, die zur Erhöhung des Rekrutierungspotentials von ZO-1 für andere Proteine führt.
6. Occludin als potentieller Regulator der Oligomerisierung von ZO-1.

Ungeklärt bleibt die Frage in welchen Bereichen des C-terminalen Teils von Occludin die Bindung an ZO-1 erfolgt (in derzeitiger Bearbeitung). Mutationen bestimmter Bereiche der untersuchten ZO-1-Peptidsequenzen (z.B. von CC1, CC2) sollen für die Etablierung des Interaktionsmodells durchgeführt werden. Mit Hilfe von diesen ZO-1-Mutanten werden die Bindungsepitope sowie die Bindungsmechanismen näher charakterisiert und der Beitrag einzelner Aminosäuren zur Bindung bestimmt. Deshalb sollte eine noch tiefergehende Untersuchung des C-terminalen Teils von CC2a mit der Peptidsequenz LRKNNHHL (ZO-1.761-769) in einer neuen Substitutionsanalyse zum Auffinden sogenannter Schlüsselaminosäuren für die Bindung an Occludin führen.

Weitere Untersuchungen zum genauen Oligomerisierungsgrad von ZO-1 in Lösung sollen das Bild der Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen vervollständigen. Dabei wird gegenwärtig vollständiges oder C-terminal verkürztes ZO-1-Protein in Insektenzellen hergestellt und mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation auf seine Sedimentationseigenschaften sowie Oligomerisierungsmechanismen hin untersucht.

Eine NMR-spektroskopische Strukturabschätzung der SH3-Guk-Domäne (mögliche Kooperation mit der NMR-Abteilung des FMP) mit und ohne Occludin könnte zur Überprüfung des bisher ermittelten molekularen Mechanismus der Bindung dienen. Ebenso sind Kristallstrukturuntersuchungen in Zusammenarbeit mit dem Max-Delbrück-Zentrum geplant. Schließlich ist die computergestützte Modellierung eines Interaktionsmodells ein Schritt, um Regulationsmechanismen in Zellen darzustellen (Zusammenarbeit mit der AG „Biomodelling“ am FMP unter G. Krause).

Die Entwicklung der Erkenntnisse der BHS-Charakteristik und die Erforschung der TJ-Grundlagen sowie ihrer Komponenten haben das Bild über diese Strukturen erheblich erweitert. Komponenten, die die parazelluläre Dichtheit der Zell-Zellkontakte regulieren, spielen im Zusammenhang mit Erkrankungen der BHS eine große Rolle. Die festgestellte Möglichkeit, daß Occludin die intra- und intermolekulare Wechselwirkung in ZO-1 reguliert, damit die Ausbildung des Multiproteinkomplexes unter Beteiligung von ZO-1 beeinflußt und permeabilitätsregulierende Eigenschaften der TJ bestimmt, stellt einen neuen Ansatz auch für pharmakologische Interventionen bei Störungen der TJ-Funktion dar. Daraus ergeben sich grundlegende Erkenntnisse für eine Wirkstoffentwicklung bei Erkrankungen des ZNS, die mit einer Zerstörung der BHS durch TJ-Fehlentwicklungen einhergehen. Mit dieser Arbeit konnte ein wesentlicher Beitrag zum Verständnis der Struktur, Funktion und Regulation von TJ, der von theoretischer und praktischer Relevanz ist, geleistet werden.