

1. Einleitung

1.1. Stand der Forschung zu den *Tight junctions*

1.1.1. Die Rolle und Bedeutung der *Tight junctions* in verschiedenen Organen

TJ verbinden die Zellen in Epithel-/Endothelzellschichten so dicht miteinander, dass eine Barriere für die parazelluläre Diffusion von Wasser, Ionen und gelösten Stoffen entsteht. Des Weiteren bilden die TJ einen die ganze Zelle umspannenden Gürtel, deren Abdichtung die Zelloberfläche in einen apikalen und einen basolateralen Bereich unterteilt. Die spezifische Verteilung von Proteinen (Ionenpumpen, Transportern u.a.) und auch einigen Lipiden in diesen beiden Membrankompartimenten wird so aufrechterhalten. Dies ermöglicht einen gerichteten Transport von Stoffen über die Epithel- bzw. Endothelzellschichten. Dadurch können auf den beiden Seiten des Epithels unterschiedliche Konzentrationen an Ionen und Nährstoffen aufgebaut werden, während die von den TJ erzeugte Diffusionsbarriere eine erneute Vermischung der beiden Milieus verhindert (Harhaj und Antonetti, 2004).

Die TJ sind z.B. essentiell für die Funktion der Blut-Hirn-Schranke und erhalten so die Homöostase des Zentralnervensystems (Rubin und Staddon, 1999). Spezifische Transporter für z.B. Glukose, Aminosäuren (Boado et al., 1999) und Eisen (Transferrin) sorgen für die Versorgung des Gehirns, während die Diffusionsbarriere Schadstoffe oder Signalstoffe aus dem Blut, die im Gehirn Neurotransmitterfunktion haben (z.B. Adrenalin) von den Neuronen fernhält. Membrangängige Schadstoffe werden durch besondere Enzymsysteme in den Endothelzellen der Blut-Hirnschranke abgebaut (z.B. Lipidhydroperoxide und freie Radikale durch antioxidative Enzyme). Aktive Transporter (z.B. *multi drug resistens protein*), die für einen Rücktransport von bestimmten Verbindungen ins Blut sorgen, sind auch ein Hindernis für die medikamentöse Behandlung von z.B. Gehirntumoren. Deshalb wäre eine gezielte und kurzfristige Möglichkeit zur Öffnung der TJ wünschenswert. Bei manchen Krankheiten des Zentralnervensystems (z.B. Schlaganfall, Multiple Sklerose, Alzheimersche Krankheit, bakterielle Meningitis, zerebrale Malaria, AIDS, Tumore u.a.; De Vries et al., 1997; Davies, 2002) erfolgt eine Öffnung der TJ-Barriere, wobei dadurch ins Gehirn eindringende Schadstoffe die Folgen der Krankheit verstärken. Ein genaueres Verständnis der dabei ablaufenden Prozesse auf molekularer Ebene könnte zu neuen Wegen pharmakologischer Intervention führen.

In der Niere sorgen die TJ für die Dichtheit der Nierentubuli und verhindern ein Vermischen des Ultrafiltrats mit dem Blut. Durch spezielle TJ-Zusammensetzung und Transporterproteine werden in den verschiedenen Abschnitten des Tubulussystems Ionen, organische Intermediate und Wasser selektiv rückresorbiert. Im proximalen Tubulus betrifft dies hauptsächlich Zucker

und Aminosäuren. In nahezu allen Abschnitten des Tubulus werden schrittweise und mit verschiedenen Transportern und Mechanismen Ionen (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^-) und Wasser für den Körper zurückgewonnen (Schmidt und Thews, 1995). Dabei erlauben bestimmte Zusammensetzungen von Claudinsubtypen in den Epithelzellen des Tubulus die parazelluläre Permeation von Ionen. Passend dazu ist der Befund, dass in den unterschiedlichen Bereichen der Tubuli verschiedene Claudine exprimiert sind (Kiuchi-Saishin et al., 2002). Eine Mutation des TJ-Proteins Claudin-16 führt zu schweren Störungen der $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -Rückresorption (Simon et al., 1999).

Entdeckte Mutationen oder *knock out* Studien von verschiedenen TJ-Proteinen unterstreichen die Bedeutung der TJ für die Funktion von etlichen Organen. Claudin-1 ist essentiell für die Wasserdichtheit der Haut. In *knock out* Studien mit Mäusen starben die Tiere etwa einen Tag nach der Geburt an Dehydration (Furuse et al., 2002). Untersuchung von Claudin-5 *knock out* Mäusen zeigen nicht den erwarteten totalen Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke. Es gab nur eine teilweise Öffnung der BHS für Stoffe <800 Da. Wenn man das in Patienten reproduzieren könnte, wäre dies ein Weg, um Medikamente ins Gehirn zu bringen (Nitta et al., 2003). Claudin-11 *knock out* Mäuse haben keine TJ im ZNS-Myelin und in den Sertoli-Zellen der Hoden. Als Phänotyp zeigen sich neurologische Defekte (langsamere Signalleitung in Nerven, Schwäche der Hintergliedmaßen) und männliche Sterilität (Gow et al., 1999). Eine Mutation des TJ-Proteins Claudin-14 verursacht Taubheit, da die normale Zusammensetzung der Hämolymphe im Ohr beeinträchtigt wird (Wilcox et al., 2001). In einem Maus *knock out* Modell von Claudin-14 entsteht die Taubheit durch Degeneration der Haarzellen innerhalb der ersten drei Wochen nach der Geburt. Durch den Ausfall des Claudin-14 wurde eine kationenrestriktive Barriere im Ohr gestört (Ben-Yosef et al., 2003).

TJ sorgen auch für die Dichtheit der Darmmucosazellen, damit nur physiologische Nährstoffe über Permeationsmechanismen ins Blut gelangen. Die Darm-TJ-Barriere verhindert ebenso das Eindringen von pathogenen Keimen (Berkes et al., 2003). In der Leber versiegeln TJ die Gallenkanäle und dienen als Barriere zwischen Galle und Blut (Kojima et al., 2003). Die Sertoli-Zellen in den Hoden bilden die Blut-Testis-Barriere, welche die Spermatozoenvorstufen während der Spermatogenese passieren müssen, wobei die Regulation noch nicht ganz klar ist (Lui et al., 2003).

Auch in verschiedenen Tumoren wurden abnormale Expressionen von TJ-Proteinen (Occludin, ZO-1, Claudin-4) beobachtet (Morita et al., 2004). Besonders häufig werden in Tumoren Veränderungen der Expression von Claudinen im Vergleich zu Normalgewebe gefunden (z.B. Claudin-1, 4, 10 in Miwa et al., 2000; Hibbs et al., 2004; Aldred et al., 2004).

Die Überexpression von Claudin-3 und -4 bei Brustkrebs könnte zum gezielten Zerstören der betroffenen Zellen mit CPE (*Clostridium perfringens* Enterotoxin) genutzt werden (Kominsky et al., 2004).

1.1.2. Tight junctions sind Teil des Kontaktbereiches zwischen Zellen

Neben den TJ gibt es noch weitere Strukturen, die Zellen miteinander verbinden und zum sogenannten „Verbindungskomplex“ (*junctional complex*) gehören. Sie werden als *Adherens junctions* (AJ), *Gap junctions* und Desmosomen bezeichnet. Darüber hinaus gibt es vielfältige Kontakte mit der extrazellulären Matrix über Integrine, die z.T. in Hemidesmosomen und Fokalkontakten konzentriert sind (Plattner und Hentschel, 1997) (Abb. 1.1).

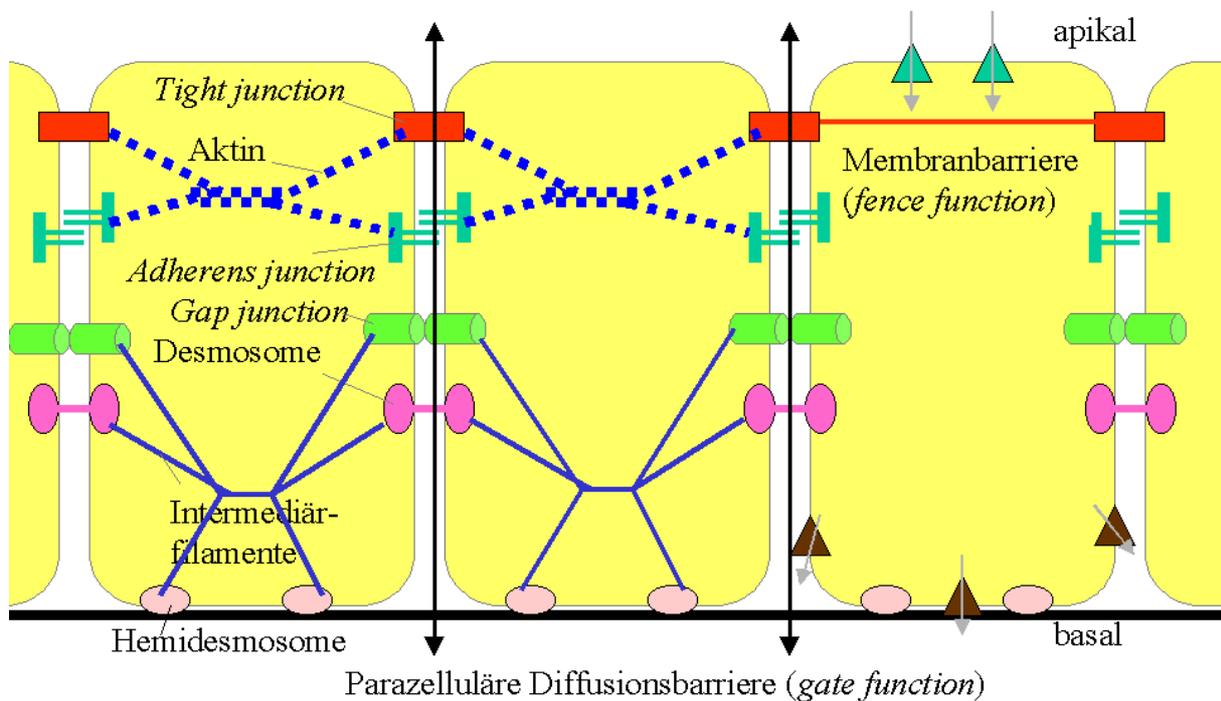


Abb. 1.1. Schema der Zellstrukturen des Zellkontaktbereiches (*junctional complex*) von Epithel- und Endothelzellen. Apikal liegen die *Tight junction* (TJ) und die *Adherens junction*, die durch Aktinfilamente verbunden sind. *Gap junction*, Desmosome und Hemidesmosome, die Interaktionen zur Basallamina (schwarze Linie) vermitteln, sind durch Intermediärfilamente verknüpft. Die Hauptfunktionen der TJ sind gezeigt als schwarze Pfeile (Parazelluläre Diffusionsbarriere (*gate function*)) und rote Linie [Membranbarriere (*fence function*)]. Durch eine polare Verteilung unterschiedlicher Transport- und Kanalproteine (grüne bzw. braune Dreiecke) auf die beiden durch die Membranbarriere (rote Linie) getrennten Membrankompartimente ist ein gerichteter Stofftransport (graue Pfeile) über die Zellen möglich.

Die AJ sorgen durch homotypische Bindung von Ca^{2+} -abhängigen Glykoproteinen (Cadherine siehe Abschnitt 1.1.5) für den mechanischen Zusammenhalt der Zellen im Gewebe. Die TJ und AJ sind durch Aktinfilamente mit dem Zytoskelett verbunden, wohingegen *Gap junctions*, Hemidesmosome und Desmosome über Intermediärfilamente verbunden sind. Die Desmosome bilden kreisförmige Bereiche in den Zellmembranen sich gegenüberliegender

Zellen, die über homophile Interaktion von anderen Cadherinen als in AJ (Desmocolline und Desmogleine) zusammengehalten werden (Garrod et al., 2002). Ähnliche Bereiche findet man in Hemidesmosomen, die aber hier aus Integrinen bestehen und zur Verankerung der Zelle an der Basallamina dienen. *Gap junctions* bestehen aus den Proteinen der Connexinfamilie (~20 bekannt in Vertebraten), die zu Membranporen zwischen benachbarten Zellen geformt sind. Durch diese Poren können hydrophile Moleküle von bis zu 1 kDa diffundieren. So wird ein Austausch von Ionen, Botenstoffen und Metaboliten zwischen benachbarten Zellen ermöglicht.

Tabelle 1.1. Zusammenfassung der wichtigsten Proteine in den Bestandteilen des Zellkontaktbereichs. Mit dem Zytoskelett sind sie entweder durch Aktinfilamente oder durch Intermediärfilamente (IF) verbunden.

Zellstruktur	Transmembranale Adhäsionsproteine	weitere Proteine (zytosolisch)	Zytoskelett	Funktion
<i>Tight junction</i>	Claudine (24 bekannt) Occludin, JAMs	ZO-1, ZO-2, ZO-3 Cingulin	Aktin	parazelluläre Diffusionsbarriere Barriere zwischen Membrankompartimenten
<i>Adherens junction</i>	Cadherine (z.B. E-Cadherin)	α -Catenin, ZO-1 Vinculin	Aktin	Zelladhäsion
<i>Gap junction</i>	Connexine (>20 bekannt)	ZO-1	IF	Poren zw. Zellen
Desmosom	Cadherine (Desmogleine, Desmocolline)	Desmoplakin, Plakoglobin, Plakophilin	IF	Zelladhäsion
Hemidesmosom	Integrine	Plectin	IF	Adhäsion von Zellen an extrazelluläre Matrix

1.1.3. Morphologie und Funktion von *Tight junctions*

TJ (auch *zonula occludens*) bilden eine dichte gürtelähnliche Struktur im apikalen Bereich der lateralen Zellmembran von Endo- bzw. Epithelzellen, die benachbarte Zellen so dicht miteinander verbindet, dass eine Barriere für die Diffusion von Wasser, Ionen und größeren gelösten Stoffen sowie die Migration von Zellen durch den parazellulären Weg entsteht. Diese Barriere ist auch für den transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER) von Epithelzellschichten verantwortlich. Die Stärke der TJ-Barriere (gemessen als TEER oder als Perfusionsmenge von Markersubstanzen) kann je nach Zelltyp um mehrere Größenordnungen variieren. Die Dichtheit (TEER) der Nierentubuli nimmt z.B. vom proximalen Tubulus (~5-10 $\Omega \cdot \text{cm}^2$) bis zum Sammelrohr (~200-2000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$) zu. Dies korreliert mit verstärkter Expression und TJ-Lokalisation von ZO-1, ZO-2 und Occludin (Gonzalez-Mariscal et al., 2000a). TJ sind für Kationen besser permeabel als für Anionen. Generell begrenzen sie die Diffusion aller Substanzen, die größer als ~1,8 nm sind (Pollard und Earnshaw, 2002).

Zytosolisch sind die TJ mit einem Ring aus Aktinmyosin unterlegt. Veränderungen in der Spannung dieser Zytoskelettbestandteile können die TJ beeinflussen. In einem in der Literatur vorgeschlagenen Modell erlaubt ein entspanntes Aktomyosin den TJ, sich zur Diffusionsbarriere zu verbinden, während ein angespanntes Zytoskelett die vermuteten TJ-Poren öffnet. TJ Proteine mit bekannter Bindung an Aktin (ZO-1, ZO-2, ZO-3 und Occludin) oder Myosin (Cingulin) könnten diese Wirkung vermitteln und regulieren (Turner, 2000). In Geweben mit hohem Turnover von Zellen (z.B. Darmepithel) ist es wichtig, durch absterbende Zellen entstehende Lücken schnell zu schließen. Es wurde gezeigt, dass sich 3-10 min nach der Zerstörung einer einzelnen Zelle in den benachbarten Zellen der Zellschicht ein Ring aus Aktin um die Öffnung bildet, wo auch ZO-1 und Occludin kolokalisieren. Die Öffnung wird dann durch das Zusammenziehen des Ringes geschlossen und ist nach rund 15 min wieder dicht. Inhibitoren der Aktinpolymerisation verzögern diesen Prozess (Florian et al., 2002). Occludin, Claudin-1 und andere TJ-Proteine wurden sogar während der gesamten Zellteilung zwischen mitotischen Zellen beobachtet. Das ist ein starker Hinweis, dass die parazelluläre Barriere der TJ sogar während der Mitose aufrecht erhalten wird (Kojima et al., 2001). Einige Studien sehen die TJ als spezielle Mikrodomänen der Zellmembran mit erhöhtem Cholesteringehalt und Unlöslichkeit in Triton-X-100 (Nusrat et al., 2000a).

Als zweite Funktion teilen die TJ die Plasmamembranoberfläche in zwei separate Kompartimente (apikal und basolateral). Die apikale Seite ist üblicherweise nach außen gerichtet (z.B. zum Darmlumen). Gehirnkapillarendothelzellen wurden auf die polare Verteilung von Lipiden untersucht. Dabei wurde im apikalen Membrankompartiment eine Anreicherung von Phosphatidylcholin beobachtet, während die basolaterale Membran vermehrt Sphingomyelin und Glucosylceramid enthielt. Dadurch wird wahrscheinlich die richtige Membranumgebung für ebenfalls unterschiedlich verteilte Membranproteine geschaffen (Tewes und Galla et al., 2001). In elektronenmikroskopischen Querschnittsaufnahmen sind TJ als ein- oder mehrfache Verschmelzungen der Plasmamembranen (*kissing points*) benachbarter Zellen zu erkennen (Abb. 1.2). In Längsaufnahmen nach der Gefrierbruchmethode sind die TJ als verzweigtes Netzwerk von miteinander verbundenen Strängen zu sehen (Abb. 1.3). Es zeigt sich eine Korrelation mit der Anzahl und Kontinuität dieser Stränge und der Dichte der Diffusionsbarriere in den untersuchten Zelltypen. Die Stränge bestehen aus etwa 10 nm großen Partikeln mit einem Abstand von 18 nm zwischen ihren Mittelpunkten (Anderson, 2001), in denen die integralen Membranproteine Occludin und Claudin identifiziert wurden.

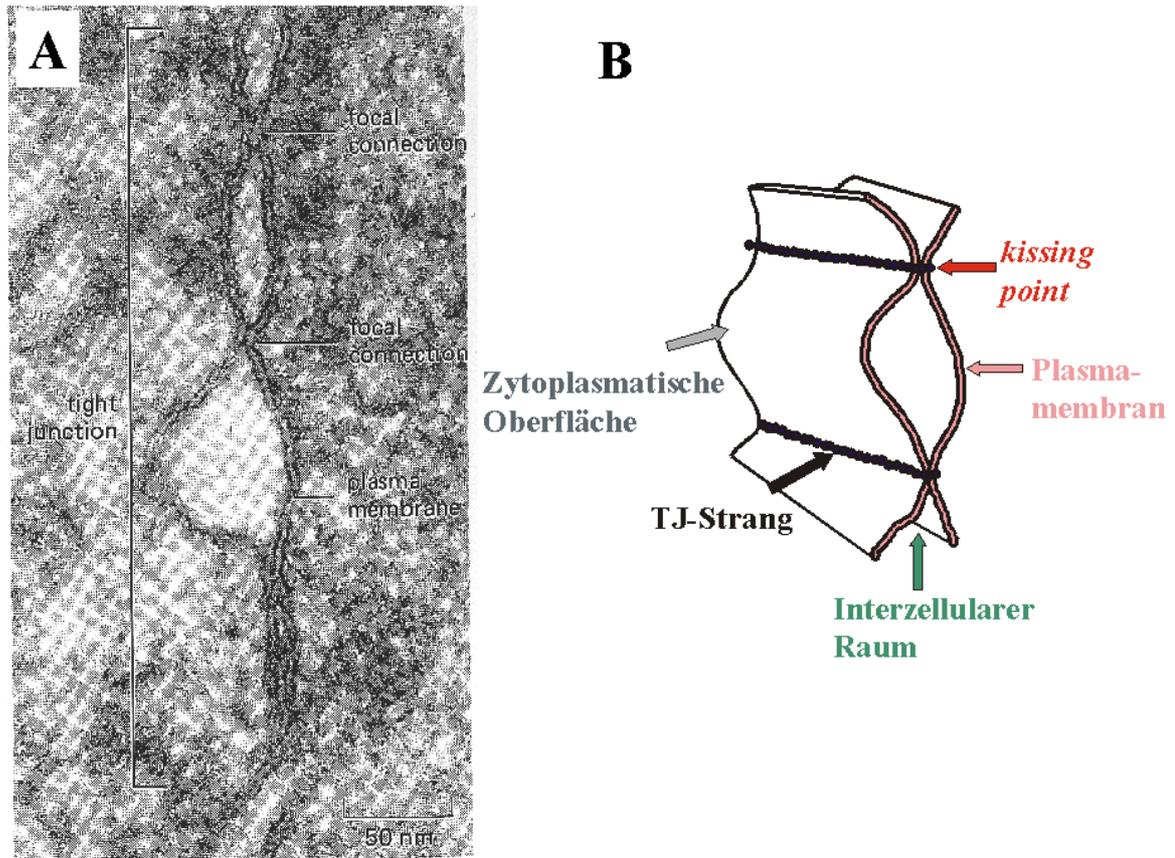


Abb. 1.2. A) Ultradünne Querschnittsansicht von *Tight junctions* zwischen zwei Zellen. TJ sind als sehr dichte Annäherungen der beiden benachbarten Plasmamembranen zu sehen mit einer punkweisen Verschmelzung (*kissing points*). Bild aus Gilula, 1974. B) Schematische Darstellung des TJ-Querschnitts.

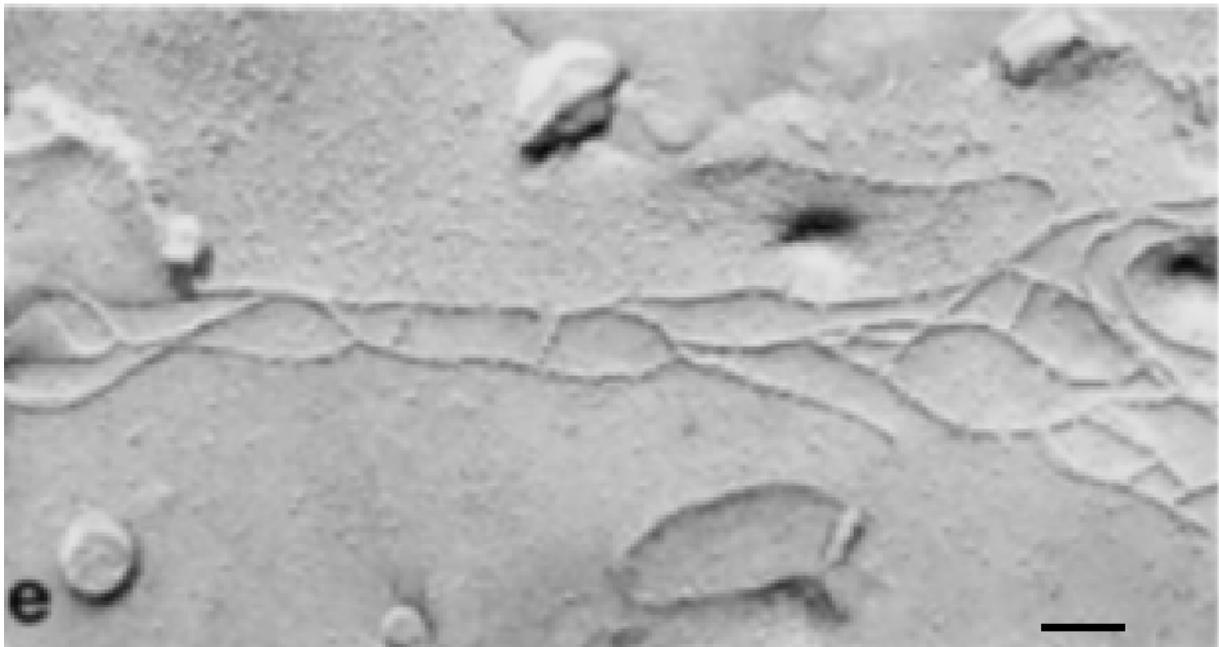


Abb. 1.3. Gefrierbruchdarstellung von *Tight junctions* aus MDCK-Zellen (Mitic et al., 1999). Balken: 0,16 μm .

GFP-Claudin-1 Konstrukte weisen eine deutliche Dynamik von TJ-Strängen auf, die sich in kurzer Zeit (< 1 min) trennen und wieder zusammenfinden. Sowohl C- als auch N-terminale GFP-Claudin-Konstrukte zeigen keine ZO-1-Bindung, weshalb die beobachtete Schnelligkeit der TJ-Strangbrüche und deren Wiedervereinigungen in nativen Zellen wahrscheinlich anders ist (Sasaki et al., 2003). Durch das Öffnen der TJ-Stränge während dieser dynamischen Prozesse entstehen zeitweise Schlitze. Diese passen in ein Modell, bei dem mit bekannten Messwerten für die Permeabilität verschiedener Stoffe (Wasser, NaCl, Mannitol u.a.) im Epithelium vom proximalen Tubulus aus Ratten die TJ modelliert wurden. Danach erfolgt die parazelluläre Diffusion über zwei unterschiedliche Wege, durch kleine Poren (vermutlich von Claudinen gebildet mit 0,668 nm Radius) und größere Schlitze in den TJ-Strängen (knapp 200 nm lang, 19,6 nm hoch und 0,04% der gesamten TJ-Länge einnehmend). Nach dem Modell diffundiert NaCl hauptsächlich durch die Poren, während Wasser meist die Schlitze durchdringt. Der Fluss von Mannitol (3,6 Å Radius) erfolgt laut dem Modell zu etwa gleichen Teilen über beide Wege (Guo et al., 2003). Eine Analyse der Poren weist auf Eigenschaften hin, die mit klassischen Ionenkanälen vergleichbar sind und nicht nur wässrigen Poren entsprechen. Es zeigen sich Größen- und Ladungsselektivität, Abhängigkeit der Permeabilität von den Ionenkonzentrationen, Kompetition zwischen mehreren passierenden Ionen, die auch abhängig von ihren Konzentrationsverhältnissen sind (der sogenannte anormale Molfraktionseffekt), und pH-Abhängigkeit (Tang und Goodenough, 2003).

Zusammenfassend kann man zwei Hauptfunktionen der TJ unterscheiden: **1.** die selektive Barrierefunktion, welche die parazelluläre Diffusion ionen- und größenspezifisch einschränkt (*gate function*) und **2.** die Abgrenzung zwischen apikalen und basolateralen Membranlipiden und -proteinen (*fence function*; Diamond, 1977). Es ist experimentell gezeigt, dass diese beiden Funktionen voneinander entkoppelt werden können (ATP-Entzug in MDCK Zellen stört *gate* aber nicht *fence function*; Mandel et al., 1993) obwohl beiden die gleiche Zellstruktur (die TJ) zugrunde liegt. Das deutet darauf hin, dass diese Funktionen von verschiedenen Proteinen aufrechterhalten und separat gesteuert werden können. Auch die kleinen GTPasen RhoA und Rac1 haben eine regulierende Wirkung auf die *gate* und *fence* Funktion der TJ (Jou und Nelson, 1998; Jou et al., 1998).

Die Eigenschaften von TJ (Dichtheit, Proteinexpression, Phosphorylierung u.a.) können durch viele Faktoren über bisher noch gering verstandene Mechanismen moduliert werden. Es sind regulierende Wirkungen von Hormonen (z.B. Vasopressin, Progastrin), Cytokinen (z.B. Interleukin-1 β , Tumor-Nekrose-Faktor- α und Interferon- γ), Wachstumsfaktoren (z.B. EGF, VEGF), Scherstress, oxidativem Stress und Effektoren (z.B. Proteinkinase A und C) bekannt.

Das Prohormon Progastrin induziert Dissoziation von TJ- und AJ-Komplexen in IMGE-5-Zellen über unterschiedlich beeinflussbare Signalwege (Hollande et al., 2003). Die proinflammatorischen Cytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ (Coye et al., 2002) und VEGF (Mayhan, 1999) erhöhen die Permeabilität der TJ. TNF- α und IFN- γ senken die Expression von Occludin (Mankertz et al., 2000). VEGF bewirkte eine Phosphorylierung von Occludin und eine Tyrosinphosphorylierung von ZO-1 (Antonetti et al., 1999). Scherstress an Rinderaortaendothelzellen bewirkte einen raschen (< 5 min) Anstieg der Occludinphosphorylierung und über 1-4 h eine Abnahme der Occludinexpression (DeMaio et al., 2001). In CaCo-2-Zellen löst oxidativer Stress eine schnelle Tyrosinphosphorylierung von Occludin, ZO-1, E-Cadherin und β -Catenin aus. Die Proteine dissoziieren von der Zellmembran und der Occludin/ZO-1-Komplex weist im Gegensatz zum E-Cadherin/ β -Catenin-Komplex eine schwächere Assoziation auf (Rao et al., 2002). TJ-Proteine (u.a. Occludin, Claudin-1, -4 und ZO-1) werden beim Herunterregeln der Expression scheinbar über einen Clathrin vermittelten Weg endozytiert und in besonderen Vesikeln gelagert (Ivanov et al., 2004). Der Transkriptionsrepressor Snail verringert die Expression von E-Cadherin, Occludin und Claudinen und sorgt für eine Epithel-Mesenchym-Transition (Ikenouchi et al., 2003).

Leukozyten können bei ihren Wanderungen zu Krankheitsherden Epithelien und ihre TJ durchdringen, ohne Bruch der Diffusionsbarriere für andere Substanzen. Die Zugabe eines Peptids mit der Occludin-CAR-Sequenz LYHY aus ECL1, das durch zwei benachbarte Cysteine zyklisiert wurde, erhöht die Wanderung von Neutrophilen über die TJ (Oshima et al., 2003). Auch verschiedene bakterielle Toxine beeinflussen die TJ und helfen so möglicherweise den Pathogenen beim Eindringen ins Gewebe. Eine Zink-Metalloprotease (Hämagglutinin/Protease (HA/P)) aus *Vibrio cholerae* spaltet das hochphosphorylierte Occludin in den TJ (85 kDa) in 35 und 50 kDa Bruchstücke, während das geringphosphorylierte Occludin im Zellinneren und auch ZO-1 nicht betroffen waren. Da die Antikörper zur Detektion von Occludin gegen den C-Terminus gerichtet sind, kommen bei diesen Größen nur Spaltungen im ECL1 (50 kDa) bzw. ECL2 (35 kDa) in Frage. Im Vergleich dazu hat Trypsin keinen Effekt auf Occludin in konfluenten Zellen, solange sie sich nicht von den Kulturgefäßen ablösen. In HA/P-behandelten Zellen kam es jedoch zur Umorganisation von ZO-1, was möglicherweise über einen noch unbekanntem Signalweg durch die Spaltung von Occludin ausgelöst wird (Wu et al., 2000). Andere Pathogene greifen über verschiedene Mechanismen und Signalwege in die TJ-Regulation ein (Fasano, 2002). Beispielsweise sorgt enteropathogenes *E. coli* für eine Kontraktion des unter den TJ liegenden Aktomyosinrings und Dephosphorylierung von Occludin (Vogelmann et al., 2004). Es wurde

auch gezeigt, dass eine im Kot von Hausstaubmilben vorkommende allergene Cysteinproteinase Occludin und Claudin-1 in den ECL-Bereichen angreift und so durch das Zerstören der TJ für das bessere Eindringen der Allergene sorgt (Wan et al., 1999).

1.1.4. Molekularer Aufbau der *Tight junctions*

An den TJ sind offenbar viele verschiedene Proteine beteiligt, von denen bisher nur ein Teil bekannt ist. Es werden immer noch neue TJ-Proteine entdeckt (z.B. JACOP, Ohnishi et al., 2004; LYRIC, Britt et al., 2004; CLMP, Raschperger et al., 2004). Sie lassen sich in zwei Gruppen einteilen: transmembranale Proteine und membranassoziierte Proteine. Letztere lassen sich nach ihrer Funktion weiter unterteilen in z.B. Gerüstproteine, Regulatorproteine und Transkriptionsfaktoren (Abb. 1.4).

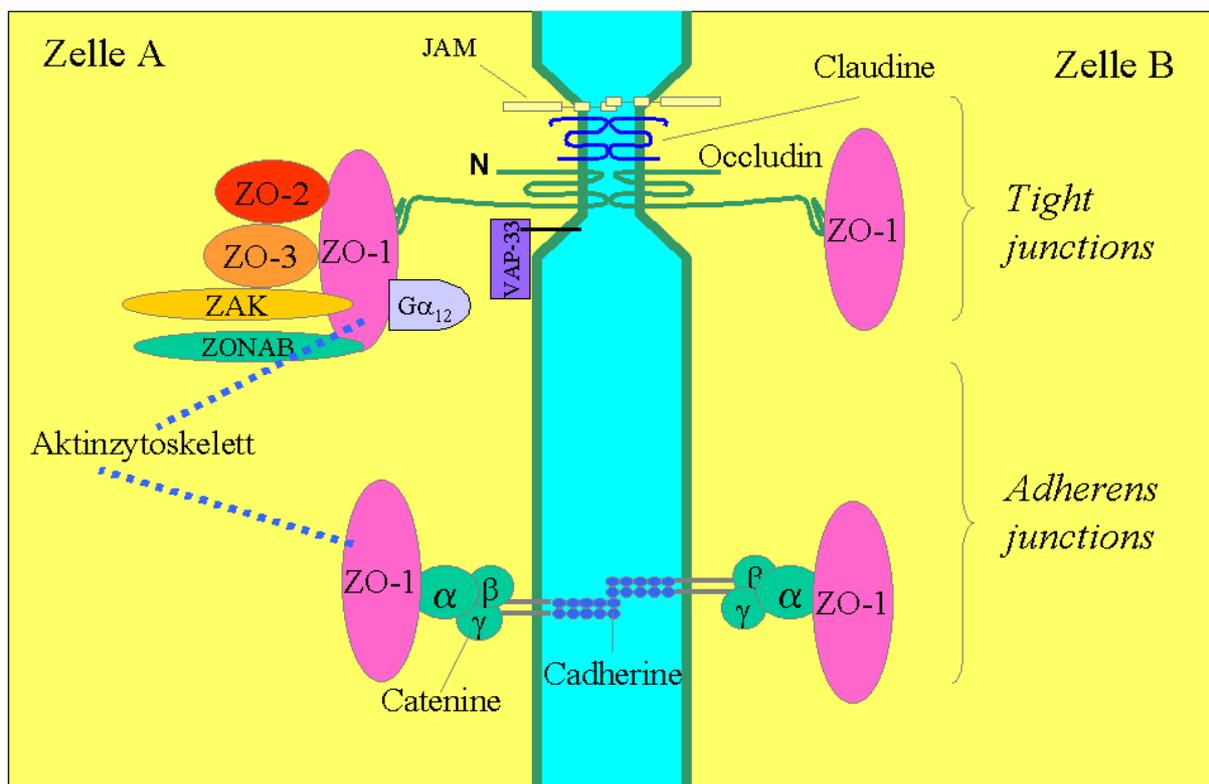


Abb. 1.4. Schema der wichtigsten Proteine in *Tight junctions* und *Adherens junctions* im Zell-Zellkontaktbereich zweier Zellen. JAM = *junctional adhesion molecule*; VAP-33 = *VAMP associated protein of 33 kDa*, VAMP = *vesicle associated membrane protein*); ZO-1, -2, -3 = *zonula occludens Protein 1, -2, -3*; ZAK = *ZO-1 associated kinase*; ZONAB = *ZO-1 associated nucleic acid binding protein*.

Die wichtigsten transmembranalen Proteine mit je vier transmembranalen Helices sind Occludin und die Proteinfamilie der Claudine, von denen bisher 24 gefunden worden sind. Weiterhin gibt es noch die immunglobulinähnlichen JAMs. Zu den wichtigen Gerüstproteinen, die eine Verbindung zum Aktinzytoskelett herstellen, gehören ZO-1, ZO-2 und ZO-3. Sie sind mit ihren je drei PDZ-Domänen, einer SH3- und einer GUK-Domäne

imstande, viele Proteine gleichzeitig zu binden und so ein komplexes Proteinnetzwerk an den TJ aufzubauen. Daneben sind noch weitere Proteine mit mehreren Domänen an den TJ beteiligt, z.B. MAGI, MUPP1, PAR-Proteine, AF-6/Afadin, Cingulin, Symplexin, Rab-Proteine u.a. (Gonzalez-Mariscal et al., 2003). Durch Transfektion einzelner Claudine (1-3, 5, oder 11) in Maus-L-Fibroblasten wurden in Gefrierbruchstudien TJ-Stränge sichtbar (Furuse et al., 1998b; Morita et al., 1999). Je nach verwendetem Claudinsubtyp ergaben sich unterschiedliche Gefrierbruchmuster. In Kokulturstudien zeigte sich, dass nicht alle Claudinsubtypen miteinander dichte TJ bilden (Furuse et al., 1999). Daraus kann man auf das Vorhandensein von subtypabhängigen selektiven Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Claudinen schließen.

1.1.4.1. Occludin

Allgemeines zu Occludin: Es wurde als erstes integrales Membranprotein in TJ-Präparationen entdeckt (Furuse et al., 1993). Durch spezifische Antikörper in Gefrierbruchstudien wurde die TJ-Lokalisation von Occludin bewiesen (Fujimoto, 1995). Occludin hat vier transmembranale Domänen (je ~20 AS), wobei N- (~60 AS) und C-Terminus (~250 AS) im Zytosol liegen. Die zwei extrazellulären Loops (je 40-50 AS) sind wahrscheinlich an der interzellulären Assoziation beteiligt. Der erste Loop zeichnet sich durch einen hohen Anteil an Glycin- und Tyrosinresten aus. Die Tyrosine könnten sowohl hydrophobe Wechselwirkungen miteinander als auch mit den OH-Gruppen Wasserstoffbrücken zueinander oder zu polaren Lipidkopfgruppen der Membran herstellen, während die kleinen Glycine für Flexibilität im Loop sorgen. Der intrazelluläre Loop ist mit ~10 AS sehr kurz und hat einen Überschuss an basischen AS (Abb. 1.5).

Überexpression von Occludin: Wird Occludin in Zellen ohne TJ (z.B. L-Fibroblasten) transfiziert, bilden sich TJ-ähnliche Filamente (Furuse et al., 1998b). Expression von Occludin in *rat lung endothelium* Zellen, die kein Occludin aber ZO-1 haben, zeigt eine junctionale Lokalisation ohne Veränderung in den Permeationseigenschaften. Occludinakkumulation war an den *junctions* mit Akkumulation von Aktin begleitet. Depolymerisation von Aktin beendete auch die junctionale Lokalisation von Occludin. Dies deutet auf eine gegenseitige Abhängigkeit und möglicherweise Regulierung dieser Proteine hin (Kuwabara et al., 2001).

Verhalten von Occludinchimären und -mutanten: Das Verhalten von Chimärenkonstrukten (C-Terminus von Occludin fusioniert mit Ecto- und Transmembrandomäne von FcRII) in MDCK-Zellen zeigt, dass der C-Terminus von Occludin für eine Lokalisation in den basolateralen Teil der Zellmembran sorgt. Auch Konstrukte, in deren ECLs

Glykosylierungsstellen eingeführt wurden, akkumulierten in der basolateralen Membran, weil durch die Zuckermoleküle die ECLs für den Einbau in TJ zu groß wurden und/oder sich ihre Bindungseigenschaften veränderten (Matter und Balda, 1998). Connexin-Occludin-Chimären mit den ZO-1-bindenden C-Terminus von Occludin lokalisierten jedoch zu TJ in MDCK-Zellen (Mitic et al., 1999). Ein zweifach verändertes Occludinkonstrukt mit sowohl N-terminal fusioniertem Hämagglutinin als auch deletiertem C-Terminus wies im Vergleich zu den Einzelmutanten eine diskontinuierliche Verteilung an TJ in MDCK-Zellen auf. Ein unmodifizierter N-Terminus bei gleichzeitiger Deletion des C-Terminus genügt für eine korrekte Verteilung in den TJ. N-terminaler und/oder transmembranaler Bereich scheinen also ausreichend für eine TJ-Lokalisation (Huber et al., 2000). Diese Studien wurden mit MDCK-Zellen durchgeführt, wo Interaktionen mit endogenem Wildtyp-Occludin die Mutanten möglicherweise mit an die TJ transportierten. Expression einer Occludin-Deletionmutante (enthielt nur noch 14 AS von ECL2 und alles C-terminal folgende) in der murinen Epithelzelllinie CSG 120/7 führte zu starker Abnahme des TEER und einer Zunahme der parazellulären Permeabilität. Das Konstrukt lokalisiert richtig zu den TJ. In Gefrierbruchbildern sieht man eine starke Fragmentierung der TJ-Stränge. Dies deutet auf eine wichtige Rolle des N-Terminus und/oder der Transmembranbereiche von Occludin für die Barrierefunktion der TJ hin (Bamforth et al., 1999).

Splicevarianten von Occludin: In MDCK-Zellen wurde eine Splicevariante von Occludin gefunden, bei der die ersten 17 AS im originalen N-Terminus durch 56 AS (Occludin 1B-Variante) ersetzt sind. Immunoblots von Maudarmschnitten und humanen T84-Zellen zeigten eine starke Kolokalisation von Occludin 1B mit Occludin (Muresan et al., 2000). Nach einer anderen Arbeit kommt das entsprechende Exon für die 1B-Splicevariante in der humanen Genomdatenbank und auch in Maus-cDNA Studien gar nicht vor (Ghassemifar et al., 2002). Weitere Splicevarianten von Occludin und eine alternative Nutzung von zwei verschiedenen Promotoren wurden gefunden. Bei einigen der Splicevarianten fehlt der vierte transmembranale Bereich (TM4) von Occludin und einige nachfolgende AS, wodurch der C-Terminus auf die extrazelluläre Membranseite wandert. Die entsprechenden Varianten lokalisierten nicht an TJ (Mankertz et al., 2002). In einer anderen Arbeit wurde eine TM4-Deletionsmutante in Primaten beschrieben, die schwach in subkonfluenten jedoch nicht in konfluenten Zellen exprimiert wird (Ghassemifar et al., 2002).

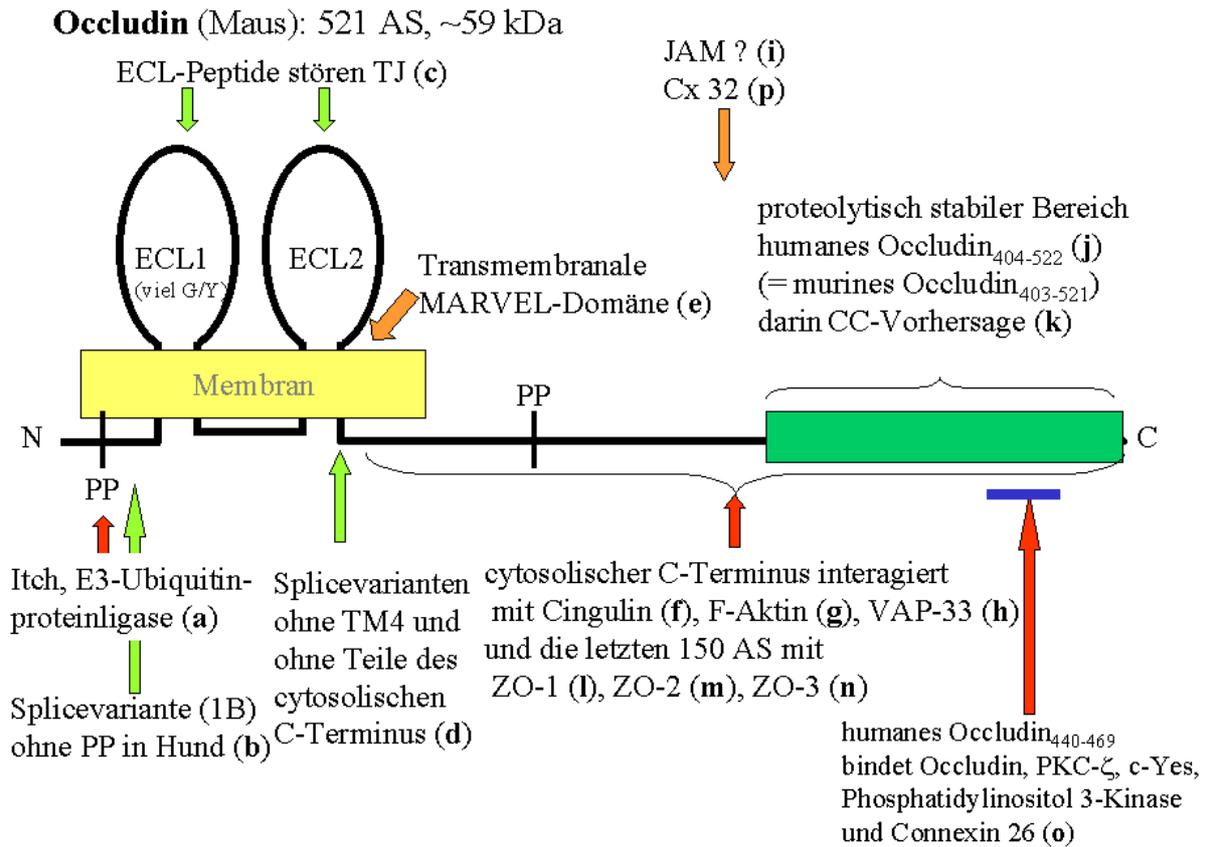


Abb. 1.5. Schema des transmembranalen TJ-Proteins Occludin mit Lage der N- und C-Termini und der extrazellulären Loops (ECL), sowie bekannter Struktur-Aktivitätsbeziehungen. PP=Polyprolinregion, interagierende Proteine (rote Pfeile, bzw. orange, wenn Daten noch nicht abgesichert) und sonstige bekannte Besonderheiten (grüne Pfeile) sind an den entsprechenden Positionen angezeigt. (Quellen: **a**= Traweger et al., 2002; **b**= Muresan et al., 2000; **c**= Lacaz-Vieira et al., 1999, Medina et al., 2000, Tavelin et al., 2003, Wong and Gunbiner, 1997; **d**= Mankertz et al., 2002, Ghassemifar et al., 2002; **e**= Sanchez-Pulio et al., 2002; **f**= Cordenonsi et al., 1999a, **g**= Kuwabara et al., 2001, Wittchen et al., 1999; **h**= Lapierre et al., 1999; **i**= Bazzoni et al., 2000; **j**= Peng et al., 2003; **k**= Ando-Akatsuka et al., 1996; **l**= Furuse et al., 1994, Fanning et al., 1998; **m**= Itoh et al., 1999a, Wittchen et al., 1999, **n**= Haskins et al., 1998; **o**= Nusrat et al., 2000b; **p**= Kojima et al., 1999).

Einfluss von künstlichen ECL-Peptiden von Occludin auf TJ: Künstliche Peptide von den extrazellulären Loops von Occludin bewirken ein Verschwinden von TJ in Epithelzellen. Dabei waren die von zwei unterschiedlichen Arbeitsgruppen gefundenen Ergebnisse widersprüchlich. Die einen fanden Effekte mit Peptiden aus ECL1 (Lacaz-Vieira et al., 1999), während bei den anderen nur Peptide aus ECL2 (Medina et al., 2000; Vietor et al., 2001) eine Wirkung zeigten. Bei diesen Arbeiten waren die Sequenz der Occludinpeptide und die verwendeten Zellen nicht von derselben Spezies, wodurch die verwendeten Sequenzen voneinander abwichen. In einer neueren Arbeit mit humanen Occludinpeptiden und humanen Zellen verursachten Peptide aus der N-terminalen Hälfte von ECL1 eine Erhöhung der parazellulären Permeabilität (Tavelin et al., 2003). Extrazelluläre Zugabe von Occludin ECL2-Peptid (Hühneroccludin AS 184-227) verringert TEER und erhöht den parazellulären Flux in der *Xenopus*-Nierenepithelzelllinie A6, während ECL1-Peptid (AS 81-125) keinen

Effekt hatte (Wong and Gunbiner, 1997). Dagegen bewirkte eine Überexpression von Occludin in Epithelzellen einen erhöhten TEER, aber gleichzeitig einen Anstieg des parazellulären Fluxes von Markern anstatt der erwarteten Verringerung (Balda et al., 1996b; McCarthy et al., 1996). Diese unterschiedliche Reaktion auf extrazelluläre Peptide und Überexpression könnte durch die Existenz von verschiedenen Occludinsplicevarianten erklärbar sein. Die Peptide beeinflussen alle bekannten und eventuell noch zu entdeckenden Isoformen gleichermaßen, während durch die Überexpression von Occludin das Verhältnis der Isoformen zueinander (und gegebenenfalls zu anderen TJ-Proteinen) gestört wird, und sich daraus möglicherweise andere TJ-Veränderungen ergeben.

Bekannte Bindungspartner von Occludin: Für Occludin sind verschiedene Bindungspartner beschrieben (Abb. 1.5). Im N-Terminus liegt ein Typ I WW-Bindungsmotiv (PPXY), was mit Itch (an der 2. und 4. WW-Domäne), einer E3-Ubiquitinproteinkinase, interagiert, die in die Occludindegradation involviert ist (Traweger et al., 2002). Dieses Polyprolinmotiv fehlt in der Splicevariante Occludin 1B, wodurch wahrscheinlich der Proteinabbau anders verläuft. Sequenzvergleiche zeigten eine Homologie zwischen den vier transmembranalen Bereichen von Occludin und Proteinen aus den Myelin- und Lymphozyt-, Physin- und Gyriinfamilien. Diese sogenannte MARVEL-Domäne könnte typisch für Proteine in cholesterolreichen Membranbereichen sein (Sanchez-Pulio et al., 2002). Über diese transmembranale Domäne erfolgen möglicherweise Homo- oder Heteroassoziationen mit anderen Proteinen innerhalb der Membran. Es wurde eine Assoziation von Occludin mit *in vitro* translatiertem Cingulin beobachtet, die *in vivo* nur sehr schwach ist (Cordenonsi et al., 1999a). Mit dem *Yeast-2-Hybrid* System wurde VAP-33 als Bindungspartner zum C-Terminus von Hühneroccludin₃₅₈₋₅₀₄ gefunden. VAP-33 hat am C-Terminus einen 25 AS langen hydrophoben Bereich, der einer transmembranalen Helix entspricht. In epithelialen Zellen gibt es eine Kollokalisierung von VAP-33 und Occludin an TJ. Ein Teil des zellulären VAP-33 liegt in Vesikeln, so dass Occludin in TJ ein Richtungsindikator für den Vesikeltransport sein könnte (Lapierre et al., 1999). Occludin kosedimentiert mit F-Aktin (Wittchen et al., 1999). JAM hilft bei der Rekrutierung von Occludin zu den TJ, da Kotretransfektion beider Proteine in CHO-Zellen zu stärkerer Akkumulation von Occludin an Zellgrenzen führt (Bazzoni et al., 2000). Es ist unbekannt, ob Occludin direkt mit JAM interagiert. Die letzten 150 AS von Occludin sind zwischen verschiedenen Arten stark konserviert (Abb.3.1) und darin wird ein Coiled coil-Bereich vorhergesagt (Ando-Akatsuka et al., 1996). Neben VAP-33 binden hier auch die MAGUK-Proteine ZO-1, -2, -3 (Furuse et al., 1994; Fanning et al., 1998; Itoh et al., 1999a; Wittchen et al., 1999; Haskins et al., 1998). Die letzten ~120 AS von Occludin (humanes

Occludin₄₀₄₋₅₂₂) bilden eine proteolytisch stabile Struktur (Peng et al., 2003). Ein Peptid aus dem Coiled coil-Bereich (humanes Occludin₄₄₀₋₄₆₉) bindet an Occludin selbst, sowie an die Proteine PKC- ζ , Non-Rezeptor Tyrosinkinase c-Yes, Phosphatidylinositol 3-Kinase und Connexin 26 (Nusrat et al., 2000b). Die physiologische Bedeutung dieser *in vitro* Interaktionen ist unklar. Koimmunoprecipitationdaten deuten auch auf eine Interaktion mit Cx32 und eine mögliche regulatorische Rolle von Cx32 für Occludin hin (Kojima et al., 1999).

Phosphorylierung von Occludin: Im SDS-Gel migriert Occludin in mehreren Banden (62-82 kDa) wegen multipler von Serin-, Threonin- und Tyrosinphosphorylierung (Sakakibara et al., 1997; Wong, 1997; Wong und Gumbiner, 1997; Chen et al., 2002; Tsukamoto und Nigam, 1999). Beteiligte Kinasen sind PKC (Andreeva et al., 2001) CK2 (Cordenonsi et al., 1999a), p34^{cdc2}/cyclin B-Komplex (Andreeva et al., 2001; Cordenonsi et al., 1997, 1999a) und Non-Rezeptor Tyrosinkinase c-Yes (Chen et al., 2002). In Epithelzelllinien sind hochphosphorylierte Occludinmoleküle in TJ angereichert, während schwach phosphorylierte im Zytoplasma lokalisieren (Andreeva et al., 2001; Sakakibara et al., 1997; Tsukamoto und Nigam, 1999). Dagegen war die Verteilung der unterschiedlich stark phosphorylierten Occludinmoleküle in *Xenopus* Embryos umgekehrt (Cordenonsi et al., 1997). Die BHS wird durch Hypoxie beeinträchtigt. Bei einem *in situ* Experiment in Ratten veränderte sich der Phosphorylierungsgrad von Occludin (Witt et al., 2003). Der Phosphorylierungsgrad von Occludin in MDCK-Zellen korreliert mit der Calciumkonzentration. Wenig Ca²⁺ führt im SDS-Gel zu kleinen Occludinbanden (65-68 kDa), während die Banden bei normaler Ca²⁺-Konzentration größer (70-75 kDa) sowie in Triton-X-100 unlöslich sind. Die Zugabe eines Occludinpeptids aus ECL2 aber nicht aus ECL1 bewirkt eine Verringerung der Hochphosphorylierung (Wong, 1997). Die Permeabilität von TJ wird durch H₂O₂-Gabe erhöht. Über einen Signalweg mit ERK1/ERK2 verschwindet Occludin aus den Zell-Zellkontakten und kolokalisiert nicht mehr mit ZO-1, wobei es stärker an Serinresten phosphoryliert wird (Kevil et al., 2000).

Occludin knock out Studien: In einer Epithelzelllinie mit unterdrückter Occludinexpression sind die TJ morphologisch und in ihrer Barrierefunktion nicht beeinflusst. Auch die Lokalisation von ZO-1 an den TJ war unverändert (Saitou et al., 1998). TJ in Occludindefizienten Mäusen sind morphologisch und elektrophysiologisch normal. Die Tiere zeigen verzögertes Wachstum, chronische Entzündungen und Kalzifizierung des Gehirns. Die männlichen Tiere sind unfruchtbar (möglicherweise Störung der Spermatogenese) und die Weibchen säugen die Jungen nicht (Saitou et al., 2000). Occludin spielt in der

Embryonalentwicklung des Blastocoels (Barrierefunktion der Blastocysten) eine Rolle, wie die Hemmung durch Anti-Occludin-Antikörper zeigen (Kim et al., 2004).

Die Literatur ergibt also keine klare Aussage zur genauen Funktion von Occludin. Die Daten deuten auf eine regulatorische Rolle hin. Für die Bindung an alle ZO-Proteine ist die proteolytisch stabile Struktur des zytosolischen C-Terminus nötig, wahrscheinlich über die vorhergesagte Coiled coil-Helix.

1.1.4.2. Die Claudinproteinfamilie

Seit der Identifikation der Claudine (Furuse et al., 1998a) sind 24 Mitglieder entdeckt worden mit je vier transmembranalen Bereichen und zwei extrazellulären Loops (~50 AS und ~25 AS) (Abb. 1.6).

Claudinfamilie (24 bekannt) je rund 200 AS (20-27 kDa)

ECLs bilden wahrscheinlich die Grundstrukturen der TJ durch Bindung an ECLs von Claudinen in gegenüberliegenden Zellen (dabei z.T. Bildung parazellulärer Poren) (a)

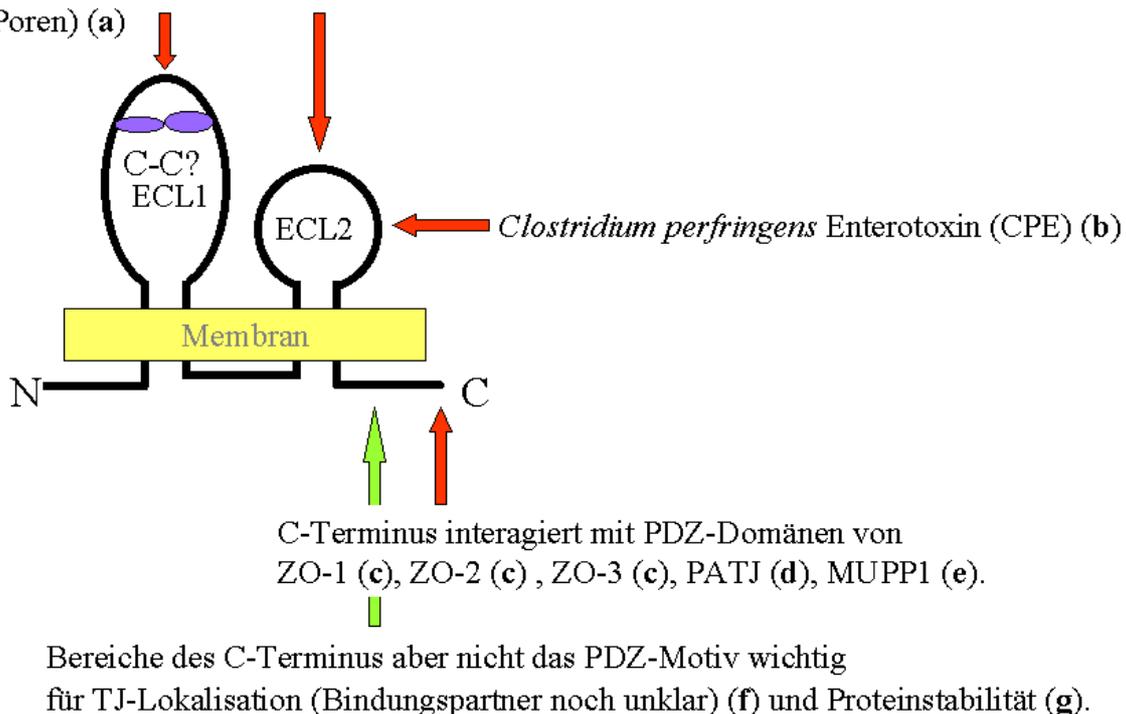


Abb. 1.6. Allgemeines Schema der TJ-Proteinfamilie der Claudine mit Lage der N- und C-Termini und der extrazellulären Loops (ECLs). Interagierende Proteine (rote Pfeile), Besonderheiten (grüne Pfeile). ECL1 enthält zwei hochkonservierte Cysteinreste (lila), die möglicherweise intramolekulare Cysteinbrücken ausbilden. (Quellen: **a**=Gonzalez-Mariscal et al., 2001, Mitic und Van Itallie, 2001; **b**=Fujita et al., 2000, Sonoda et al., 1999; **c**=Itoh et al., 1999b; **d**=Roh et al., 2002; **e**=Hamazaki et al., 2002, Jeansonne et al., 2003; **f**= Ruffer und Gerke, 2004; **g**=Van Itallie et al., 2004).

Einige Claudine sorgen für parazelluläre Dichtheit (z.B. 1, 3, 5, 12), während andere parazelluläre Poren bilden können (Claude 1978; Tsukita und Furuse, 2000; Gonzalez-

Mariscal et al., 2001), wo die verschiedenen Claudine für spezifische Ionenselektivität verantwortlich sind. Basierend auf dem pKI-Werten der extrazellulären Loops wurde Claudin-16 als Kationenpore und die Claudine-4, -11, -17 als Anionenkanäle vorhergesagt (Mitic und Van Itallie, 2001). Dadurch können Claudin-16-Mutationen Störungen in der Mg^{2+}/Ca^{2+} -Resorption in der Niere auslösen (Simon et al., 1999). Die parazellulären Poren werden wahrscheinlich von ECL1 gebildet (Colegio et al., 2003). Die C-Termini sind kurz (~20-70 AS) und tragen ein konserviertes PDZ-Bindungsmotiv (K/xD/xYV), was innerhalb der Claudinfamilie variiert. Bei Untersuchungen von Chimären aus Claudin-2 und -4 mit vertauschten C-Termini zeigt sich eine dreifach höhere (12 h statt 4 h) Lebensdauer von Claudin-2 gegenüber Claudin-4. Unterschiedliche Halbwertszeiten verschiedener Claudine können so auch eine Bedeutung für die Funktion und die *steady state*-Konzentration von Claudinen in den TJ haben (Van Itallie et al., 2004). Die Claudine sind nicht Schwerpunkt dieser Arbeit, müssen jedoch wegen ihrer Bedeutung für die TJ mit in die Überlegungen einbezogen werden (Tsukita und Furuse, 1999).

Für die Claudine-1 bis -8 sowie -16 ist eine Bindung an die PDZ1-Domäne der MAGUK-Proteine ZO-1, ZO-2, ZO-3 gefunden worden (Itoh et al., 1999b; Ikari et al., 2004). Claudin-1 zeigt auch eine Bindung an PDZ8 von PATJ (Roh et al., 2002) und PDZ10 von MUPP1 (Hamazaki et al., 2002). Dagegen interagiert Claudin-8 mit PDZ9 von MUPP1 (Jeansonne et al., 2003). Die Einführung einer myc-Sequenz an den C-Terminus von Claudin-1 führt zu abnormalen TJ-Strängen. Bei schwacher Expression der Mutanten wurden sie wahrscheinlich mit dem endogenen Claudin-1 mittransportiert und zeigten Kolokalisation mit ZO-1 (Kobayashi et al., 2002). Konstrukte von Claudin-1 und -5 ohne PDZ-Bindungsmotiv lokalisieren noch zu TJ von MDCK-Zellen, aber Mutanten, bei denen der gesamte zytosolische C-Terminus deletiert worden ist, akkumulieren im Zellinneren (Rüffer und Gerke, 2004). Die Interaktion von Claudin-16 über sein PDZ-Bindungsmotiv mit ZO-1 scheint für seine Funktion als parazelluläre Ca^{2+}/Mg^{2+} -Ionenpore essentiell zu sein (Ikari et al., 2004). Eine Mutation von Claudin-16 verändert das PDZ-Bindungsmotiv, was ZO-1 Bindung verhindert und zum Fehltransport des Proteins in Lysosomen führt (Müller et al., 2003). Claudin-3 und -4 binden CPE, wobei für Claudin-3 der Bindungsbereich auf ECL2 eingegrenzt wurde. Andere Claudine zeigen ebenfalls eine Bindung an CPE (Claudin-6, -7, -8, und -14 aber nicht Claudin-1, -2, -5 und -10) (Fujita et al., 2000). CPE sorgt in MDCK-Zellen für eine selektive Entfernung von Claudin-4 aus TJ (Sonoda et al., 1999). Die biochemische Charakterisierung von Claudin-4 bewies, dass es als Hexamer vorliegen kann,

was von der Größe zu den in Gefrierbruchstudien beobachteten TJ-Partikeln passt (Mitic et al., 2003).

1.1.4.3. Die *zonula occludens*-Proteine 1, 2 und 3

Die *zonula occludens*-Proteine gehören zur MAGUK-Proteinfamilie mit konservierten drei PDZ-, einer SH3- und einer GUK-Domäne. Anhand der Nukleotid-Bindungsfähigkeit können separate MAGUK-Unterfamilien unterschieden werden. Einige MAGUKs binden sowohl GMP als auch ATP (z.B. p55 und Lin-2), andere nur GMP (SAP90, SAP97). Die ZO-Proteine gehören zu einer dritten Gruppe, die gar keine Nukleotid-Bindungsfähigkeit mehr besitzt (Anderson, 1996). Alle GUK-Domänen der MAGUK-Proteinfamilie weisen keine enzymatische Aktivität mehr auf, was am Beispiel des MAGUK-Proteins SAP97 ausführlich untersucht wurde. Dies spricht für eine Änderung der Funktion der GUK-Domäne hin zu einer Proteinbindungsdomäne (Kuhlendahl et al., 1998). Die in den ZO-Proteinen vorhandenen multiplen Proteinbindungsdomänen dienen als Gerüst für die Bindung anderer Proteine an der zytosolischen Seite der TJ. Die Sequenzen der Domänen sind zwischen den drei Proteinen recht konserviert mit z.T. gleichen Bindungspartnern (z.B. Claudine, Occludin). Der Hauptunterschied liegt im C-terminalen Bereich, der deutlich in Länge und Sequenz variiert (Gonzalez-Mariscal et al., 2000b). ZO-1 ist am längsten und es wurde darin noch eine zusätzliche Domäne (ZU-5 von ZO-1 und *Unc5-like* Netrin-Rezeptoren) gefunden, für die noch keine Funktion bekannt ist (SMART-Datenbank, Schultz et al., 1998). ZO-1 hat drei Splicevarianten in der C-terminalen Hälfte. Die erste mit dem Motiv α umfasst 80 AS (Balda und Anderson, 1993). In Epithelien überwiegt α^+ und in Endothelien α^- . Die α^+ -Isoform scheint mit der Bildung funktionaler TJ zusammenzuhängen, die relativ stabil sind, während α^- zu strukturell dynamischen TJ gehört. Daneben wurden die Splicevarianten β_1 , β_2 und γ mit 7, 20 bzw. 45 AS identifiziert, deren strukturelle Bedeutung unklar ist (Gonzalez-Mariscal et al., 1999). ZO-1 hat C-terminal an der GUK-Domäne anschließend einen sauren Bereich sowie zwei Polyprolinregionen (Abb. 1.7).

ZO-1 lokalisiert in Epithelien und Endothelien an TJ (Stevenson et al., 1986). Die von der Sequenz ähnlichen MAGUK-Proteine ZO-2 (160 kDa) und ZO-3 (130 kDa) wurden durch Koimmunopräzipitation (Gumbiner et al., 1991; Balda et al., 1993) mit ZO-1 gefunden. Alle drei ZO-Proteine binden über die erste PDZ-Domäne C-Termini von Claudinen (Itoh et al., 1999b). Entweder ZO-2 oder ZO-3 können mit ZO-1 über eine PDZ2/PDZ2 Wechselwirkung interagieren und kosedimentieren mit F-Aktin (Wittchen et al., 1999). Dass ZO-1 nicht nur ein TJ-Protein ist wird durch die Bindung verschiedener *Gap junction*-Proteine (Connexine,

die ebenfalls klassische PDZ-Bindungsmotive an den C-Termini aufweisen, wie SVWI in Cx45) an PDZ2 und z.T. an PDZ1 deutlich (Übersicht siehe Giepmans et al., 2004). Mit der dritten PDZ-Domäne oder möglicherweise auch PDZ2 von ZO-1 interagiert JAM (Ebnet et al., 2000; Itoh et al., 2001).

ZO-1 (Maus): 1745 AS ~ 210-225 kDa

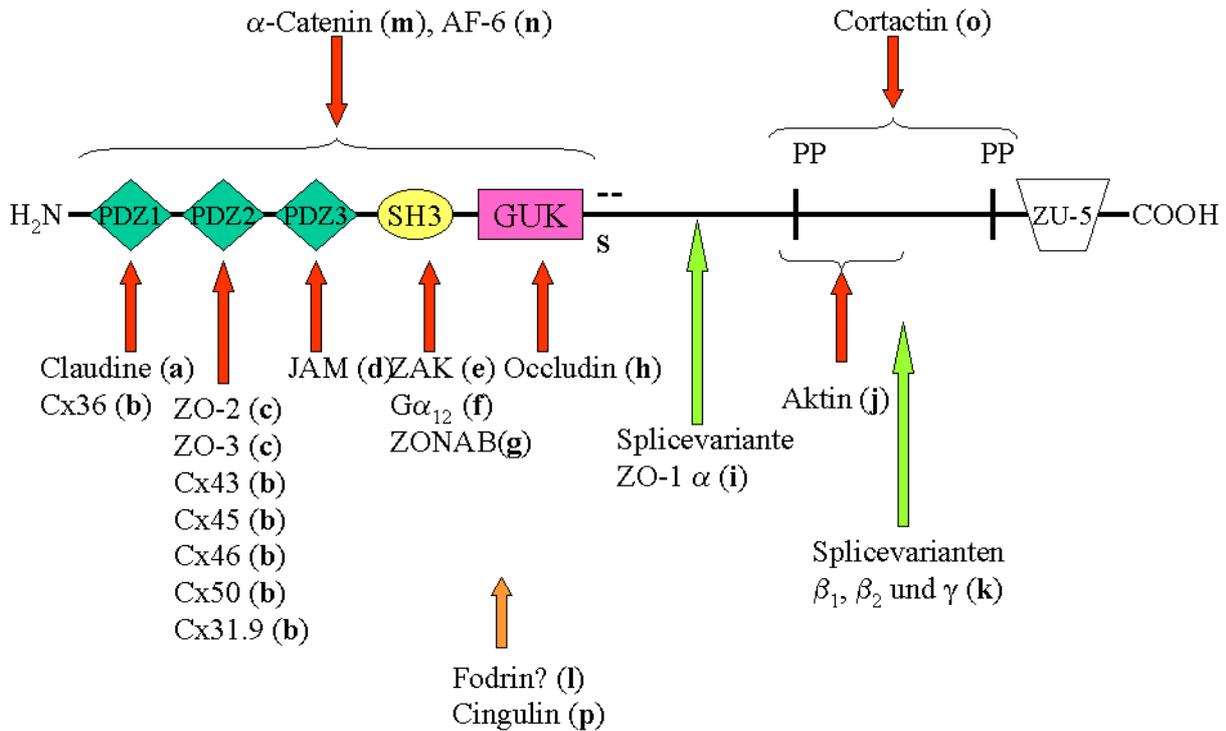


Abb. 1.7. Schema der Bindungsregionen von ZO-1. Interagierende Proteine (rote Pfeile, oder orange, wenn Daten noch nicht abgesichert) und sonstige bekannte Besonderheiten (grüne Pfeile) sind an den entsprechenden Positionen angezeigt. (Cx= Connexin mit jeweils Molmasse in kDa, PP=Polyprolinregion, s/-- = saure Region C-terminal von der GUK-Domäne) Quellen: **a**= Itoh et al., 1999b; **b**= Giepmans et al., 2004; **c**= Wittchen et al., 1999; **d**= Ebnet et al., 2000, Itoh et al., 2001; **e**= Balda et al., 1996a; **f**= Meyer et al., 2002; **g**= Balda et al., 2003; **h**= Fanning et al., 1998, Schmidt et al., 2001; **i**= Balda and Anderson, 1993; **j**= Fanning et al., 2002; **k**= Gonzalez-Mariscal et al., 1999; **l**= Tsukamoto und Nigam, 1997; **m**= Itoh et al., 1997; **n**= Yamamoto et al., 1997; **o**= Katsube et al., 1998; **p**= Cordenonsi et al., 1999b).

ZO-1 ist phosphorylierbar. Die dadurch hervorgerufenen Effekte sind widersprüchlich und die genauen Phosphorylierungsstellen kaum identifiziert. Es wurde eine Assoziation der Serin/Threonin-Kinase ZAK mit der SH3-Domäne von ZO-1 beobachtet, von der die C-terminal folgende Hingeregion an Serinen phosphoryliert wird (Balda et al., 1996a). Die Bindung von SH3-ZO-1 an $G_{\alpha 12}$ deutet auf eine Steuerung durch G-Protein-Prozesse hin (Meyer et al., 2002). Über die SH3-Domäne bindet ZO-1 auch an den Y-Box-Transkriptionsfaktor ZONAB und moduliert dadurch die parazelluläre Permeabilität und die Genexpression in Reporterassays. Eine Reduktion der Expression von ZONAB bewirkt eine

starke Reduktion der Proliferation von MDCK-Zellen. Den gleichen Effekt hat eine Überexpression von ZO-1. Durch die ZO-1-Bindung ist das ZONAB wahrscheinlich nicht mehr frei für Interaktionen im Zellkern (mit *cell division kinase 4*). Über die Assoziation mit dieser Kinase kann ZO-1 die Zellteilung regulieren (Balda et al., 2003). ZO-1 ist während der Zellreifung und bei Veränderungen der Zell-Zellkontakte auch direkt im Zellkern gefunden worden (Gottardi et al., 1996). Mittels Bereichen, welche die GUK-Domäne einschließen, erfolgt die Interaktion mit Occludin (Fanning et al., 1998; Schmidt et al., 2001). Der C-Terminus von ZO-1 (humanes ZO-1₁₁₅₁₋₁₃₅₁) enthält eine aktinbindende Region (Fanning et al., 2002). Es gibt noch weitere Interaktionen von ZO-1 mit AF-6 (Yamamoto et al., 1997) und Cortactin (Katsube et al., 1998), wobei die Interaktionsbereiche in ZO-1 bisher nur grob identifiziert wurden. ATP-Entzug an Zellen bewirkt eine Assoziation der TJ-Proteine ZO-1, ZO-2 und Cingulin in großen Komplexen. Darin wurde auch das 240 kDa-Protein Fodrin identifiziert, das eine Verbindung zum Aktinzytoskelett darstellt (Tsukamoto und Nigam, 1997). Für Cingulin (1-378) ist *in vitro* auch eine direkte Interaktion mit ZO-1, -2 und -3 gefunden worden (Cordenonsi et al., 1999b).

In Zellen ohne TJ ist ZO-1 teilweise im Zytoplasma verteilt und konzentriert sich an AJ (Itoh et al., 1993) durch eine Interaktion mit dem AJ-Protein α -Catenin (Itoh et al., 1997) und dem Nectin-Afadin-System (Yokohama et al., 2001). Die AJ-Bindung von ZO-1 wird als Zwischenschritt vorgeschlagen bei seinem Transport vom Zytosol an die Zellmembranen, bevor es zu den TJ gelangt (Rajasekaran et al., 1996). Generell weisen diese Daten darauf hin, dass ZO-1 nicht nur für TJ, sondern auch bei anderen Bestandteilen des Zellverbindungskomplexes bedeutsam ist. Bei der Ausbildung von Zell-Zellkontakten werden zunächst die AJ sichtbar, gefolgt von den TJ. Dabei kolokalisiert ZO-1 zuerst mit E-Cadherin (wahrscheinlich über α -Catenin) und danach mit Occludin (Ando-Akatsuka et al., 1999). ZO-2 lokalisiert wie ZO-1 in nicht-epithelialen Zellen (Fibroblasten, Herzmuskelzellen) an AJ. Occludin und α -Catenin binden an einen N-terminalen Teil von Maus-ZO-2 (1-938). Ein C-terminaler Teil von ZO-2 (939-1167) ist entlang von Aktinfilamenten verteilt (Itoh et al., 1999a). Über die Bindung von ZO-2 an das Protein 4.1 sind die TJ ebenfalls mit dem Aktinzytoskelett verbunden (Mattagajasingh et al., 2000). Der für die Zellpolarität bedeutsame Komplex aus den Proteinen ASIP/PAR-3, aPKC und PAR-6 kolokalisiert mit ZO-1 an TJ (Yamanaka et al., 2001). ZO-2 interagiert mit dem nukleären DNA-Bindungsprotein SAF-B, wahrscheinlich über die ZO-2-PDZ1 und den SAF-B-C-Terminus. ZO-2 zeigt eine erhöhte Lokalisation im Zellkern unter Stressbedingungen, was für eine

gewisse Regulatorfunktion spricht (Traweger et al., 2003). Auch eine Phosphorylation von ZO-2 durch PKC wurde beschrieben (Avila-Flores et al., 2001).

ZO-1 *knock out* Zellen haben gut entwickelte AJ und TJ, die sich im elektronenmikroskopischen Bild nicht vom Wildtyp unterscheiden. In Immunfluoreszenzstudien scheinen die meisten TJ-Proteine wie Claudine und Occludin normal exprimiert zu sein, jedoch tritt ZO-2 deutlich verstärkt an den Zellmembranen auf, während Cingulin herunterreguliert ist. Die ZO-1-defizienten Zellen weisen nach einem *Calciumswitch* eine verlangsamte Rekrutierung von Claudin/Occludin auf, wodurch die Assemblierung der TJ und die Ausbildung der Barrierefunktion deutlich verzögert werden. Diese Daten deuten auf eine teilweise Redundanz der Funktionen von ZO1 und ZO-2 hin (Umeda et al., 2004). Expression verschiedener Deletionsmutanten von ZO-1 in MDCK-Typ I-Zellen zeigt eine Umwandlung der Zellen vom epithelialen zum mesenchymalen Typus. Ausschließlich bei Konstrukte, welche die GUK-Domäne enthalten, ist diese Umwandlung nicht zu beobachten und auch nur diese ZO-1-Konstrukte lokalisieren an die Zellmembran. Ein bloß die PDZ-Domänen von ZO-1 umfassendes Konstrukt führt zu einer erhöhten Tumorigenizität in Nacktmäusen (Reichert et al., 2000).

Eine Abschätzung von ZO-1 in MDCK-Zellen ergab ~30.000 Moleküle pro Zelle, was ~700 ZO-1-Moleküle pro μm TJ-Länge entspricht. Dies wurde mit Zählungen der intermembranalen TJ-Partikel aus Gefrierbruchstudien verglichen (siehe Abb.1.3), die laut späteren Antikörperstudien Occludin und Claudine enthalten. Diese Partikel sind immer in mehreren parallelen vernetzten Fibrillen angeordnet, so dass man für die gesamten TJ der Zelle die in einer Fibrille gezählten Partikel noch mit einem Faktor (in MDCK-Zellen schwankend von 1-10, als Durchschnitt von den Autoren 4 angenommen) multiplizieren muss. Es wurden ~120 Partikel/ μm Fibrillenlänge also ~480 Partikel/ μm TJ-Länge gezählt. Das stimmt gut mit der Anzahl der ZO-1-Moleküle in den TJ der MDCK überein. Mit diesen Zahlen kommt etwa ein ZO-1 Molekül auf ein TJ-Partikel (Anderson et al., 1988).

Zusammenfassend haben die ZO-Proteine (vor allem ZO-1) durch ihre zahlreichen Interaktionspartner großen Einfluss auf zelluläre Prozesse, besonders im Zusammenhang mit den TJ. Da gerade Deletionskonstrukte der GUK-Domäne, wo Occludin bindet, starke phänotypische Veränderungen bewirken, kommt dieser Domäne und ihrem Bindungspartner besondere Bedeutung zu. Für alle drei ZO-Proteine ist der gleiche Bindungsbereich (GUK) an Occludin beschrieben, was auf einen identischen Bindungsmechanismus hindeutet.

1.1.5. Morphologie, molekularer Aufbau und Funktion von *Adherens junctions*

Die AJ liegen unterhalb der TJ auf der lateralen Zellseite und werden von Cadherinen ausgebildet (*Calcium [Ca]-dependent adhesion proteins*). Cadherine bestehen aus einem für die Zelladhäsion erforderlichen extrazellulären Teil, einer transmembranalen Helix und einem intrazellulären Bereich, der durch verschiedene weitere Proteine mit dem Aktinzytoskelett verbunden ist. Von dieser Proteinfamilie gibt es über 80 in Vertebraten und einigen Invertebraten und sie dienen der generellen Assoziation von Zellen in multizellulären Organismen. Einige Typen sorgen auch für die Zellinteraktionen in Desmosomen. Cadherine haben drei wichtige Eigenschaften. **1.** Sie interagieren nicht mit der extrazellulären Matrix; **2.** Interaktionen zwischen Cadherinen des gleichen Typs sind viel stärker als zwischen verschiedenen Typen (homophile Interaktionen sind also bevorzugt); **3.** Die Bindungen sind abhängig von der Anwesenheit von Ca^{2+} . Entzug von Ca^{2+} löst sowohl die AJ als auch die TJ auf (Cereijido et al., 2000). Die Cadherine bestehen auf der extrazellulären Seite aus CAD-Domänen von ~115 AS (klassische Cadherine haben 5 CAD-Domänen). Zwei Cadherine einer Zelle bilden zunächst ein durch Ca^{2+} stabilisiertes laterales Dimer, wonach die äußersten CAD-Domänen homophile Interaktionen mit Cadherinen der Nachbarzelle eingehen (Abb.1.4). Man kann, hauptsächlich durch andere Bindungspartner auf der intrazellulären Seite und unterschiedliche Anzahl an CAD-Domänen mehrere Unterfamilien klassifizieren (Patel et al., 2003). Im Gegensatz zur direkten Membranberührung bei TJ (Abb. 1.2) sind in den Kontaktbereichen der AJ die Plasmamembranen immer noch 15-20 nm auseinander (Tsukita et al., 2001), wobei dazwischen die stäbchenförmigen Cadherine zu sehen sind. Die Cadherine haben nur eine Transmembrandomäne und unterscheiden sich besonders in ihren zytosolischen Bereichen, die mit verschiedenen Proteinen interagieren. In AJ von Epithelien ist E-Cadherin das homotypisch interagierende Protein. Daran bindet zytosolisch β -Catenin (z.T. auch γ -Catenin) und daran wiederum α -Catenin, welches über Vinculin, ZO-1 und auch direkt die Verbindung zum Aktinzytoskelett herstellt. Cadherine tragen zur Kontakthemmung beim Wachstum von Epithelzellen bei. Ein Teil des β -Catenins interagiert mit Transkriptionsfaktoren im Zellkern zur Regulation der Genexpression.

1.1.5.1. Das *Adherens junction* Protein α -Catenin

Es stellt in den AJ die Verbindung zwischen β -Catenin und dem Aktinzytoskelett her. Wegen seiner Bindung an ZO-1 (Itoh et al., 1997; Imamura et al., 1999) ist α -Catenin für unsere Untersuchungen der ZO-1-Occludin-Interaktion interessant. Es besteht aus drei Regionen mit Homologien zum AJ-Protein Vinculin (VH1, VH2, VH3) (Herrenknecht et al., 1991)

(Abb.1.8). Mehrere Arbeiten identifizieren einen für die Homodimerisierung essentiellen Bereich im N-Terminus von α -Catenin, der mit dem Bindungsbereich an β - und γ -Catenin überlappt (Koslov et al., 1997; Obama und Ozawa, 1997; Huber et al., 1997). Strukturelle u.a. Untersuchungen beweisen, dass die Heterodimerisierung von α/β -Catenin gegenüber der Homodimerisierung von α -Catenin bevorzugt wird (Pokutta und Weis, 2000). Auch eine Bindung von α -Actinin (Nieset et al., 1997), F-Aktin (Rimm et al., 1995), Spectrin (Pradhan et al., 2001) und Vinculin (Watabe-Uchida et al., 1998) an α -Catenin wurde gefunden. Untersuchungen einer N-terminalen Deletion von α -Catenin in der humanen Tumorzelllinie Ov2008 weisen auf eine Bedeutung von α -Catenin für Wachstumsregulation und die Tumorunterdrückung hin (Bullions et al., 1997). Auch das Aktinytoskelett scheint von α -Catenin beeinflusst (Kobiela und Fuchs, 2004).

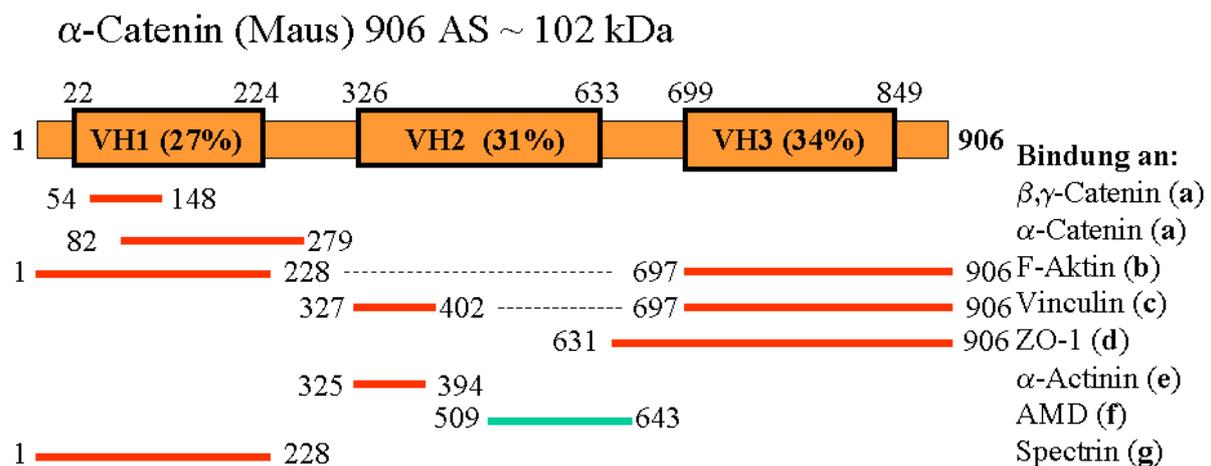


Abb. 1.8. Schema von Maus- α -Catenin mit den vinculinhomologen Regionen (VH1-3, mit Sequenzidentität laut Herrenknecht et al., 1991 und mit VH-Grenzen aus Yang et al., 2001). Dargestellt sind die identifizierten Bindungsbereiche (rote Linien) verschiedener Proteine (modifiziert nach Vasioukhin und Fuchs, 2001) und eine Region (grüne Linie), die offenbar die Adhäsionseigenschaften moduliert (AMD, *adhesion modulation domain*). (Quellen: a= Koslov et al., 1997, Obama und Ozawa, 1997, Huber et al., 1997, Pokutta und Weis, 2000; b= Rimm et al., 1995; c= Watabe-Uchida et al., 1998; d= Itoh et al., 1997, Imamura, et al., 1999; e= Nieset et al., 1997; f= Imamura, et al., 1999; g= Pradhan et al., 2001)

1.2. Das Coiled Coil-Interaktionsmotiv

Für Occludin wurde in der an ZO-1 bindenden Region ein CC-Motiv vorhergesagt (Ando-Akatsuka et al., 1996). Dies ist ein sehr häufiges Interaktionsmotiv (2-3% aller Sequenzen als CC prognostiziert) in vielen Proteinen, welches aus 2-5 amphipatischen Helices besteht, die umeinander zu einer Superhelix gewunden sind. Dabei sind parallele und antiparallele Anordnungen möglich. Die am häufigsten vorkommende Form ist die linksdrehende CC mit einer Periodizität von sieben AS, dem sogenannten Heptadmuster, wobei die sieben AS-Positionen als "abcdefg" bezeichnet werden. Dabei treten hydrophobe AS präferentiell an der

ersten (a) und der vierten (d) Position auf (Lupas et al., 1996a) (Abb.1.9). In vielen CC-Proteinen ist das klassische Heptadmuster unterbrochen. Die häufigsten Veränderungen laut einer Studie von 40 verschiedenen CC-Proteinen sind *Stutter* (entsprechend einer Deletion von 3 AS) und *Stammer* (entsprechend einer Deletion von 4 AS).

Periodizität von hydrophoben Aminosäuren in Coiled coil- Helices

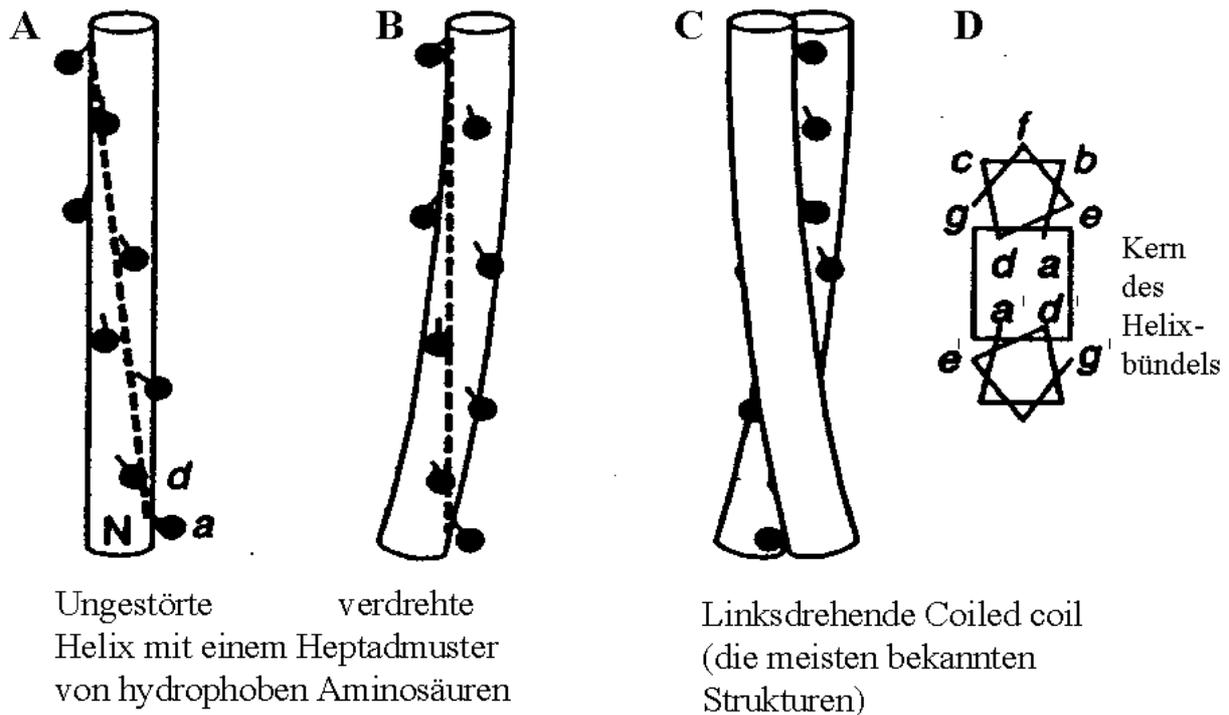


Abb. 1.9. Schema zum Prinzip der CC-Wechselwirkung zwischen Helices über hydrophobe Aminosäuren [in Position a und d des sieben AS (abcdefg) langen periodisch sich wiederholenden CC-Musters (modifiziert nach Lupas et al., 1996a)]. In A-C sind nur die AS auf den a und d Positionen als schwarze hervorstehende Kreise, vor den die restliche Helix symbolisierenden Zylindern, gezeigt. Eine ungestörte α -Helix besitzt 3,6 AS pro Windung. **A**) Die sieben AS einer CC-Periode (Heptad) nehmen somit nicht ganz zwei Helixwindungen (7,2 AS) ein und die a und d Positionen aufeinanderfolgender Heptads würden sich in einer ungestörten Helix gegeneinander verschieben. **B**) Die treibende Kraft der CC-Bildung (Verdrehung mehrerer Helices umeinander) ist der hydrophobe Effekt. Für eine optimale Interaktion müssen möglichst viele hydrophobe AS der verdrehten Helices miteinander in Kontakt kommen. Dies wird durch ein Verdrehen der Helices erreicht, wodurch jede Windung nur noch 3,5 AS enthält und so jedes Heptad exakt zwei Helixwindungen einnimmt. Die hydrophoben AS zeigen nun alle zu einer Seite. In **C**) ist die bei **B**) aus Anschaulichkeitsgründen weggelassene zweite Helix mit dargestellt. Um in einer normalerweise rechtsdrehenden α -Helix die Zahl der AS pro Windung von 3,6 auf 3,5 zu verringern, muss der Drehsinn der übergeordneten Struktur entgegengesetzt also linksdrehend sein. Es gibt ein anderes aber selteneres CC-Grundmuster mit einer Periode von 11 AS. Dort ist das Optimum der Interaktion erreicht, wenn die 11 AS auf genau drei Helixwindungen ($11/3=3,666$) kommen. Um hier die Zahl der AS pro Helixwindung normal 3,6 auf 3,666 zu erhöhen, muss die Superstruktur rechtsgewunden sein. Zusätzliche Spezifität erhält die CC-Interaktion oft durch geladene Aminosäuren, die dem Kern benachbart liegen, wie hier die im Querschnitt (D) des Helixbündels sichtbaren Positionen e/g' und g/e'. Das gebildete Helixbündel enthält im Inneren einen Kern aus den hydrophoben AS von den a und d Positionen.

Dadurch wird die normale Periodizität in der CC-Helix von 3,5 AS pro Windung gestört und es kommt zum Abschwächen bzw. Überdrehen der CC-Superhelix. Durch solche Bereiche wird die CC-Interaktion destabilisiert und die globale Struktur der Superhelix geändert, was für regulatorische Prozesse wichtig sein könnte (Brown et al., 1996). Die dadurch lokal veränderten Twisteigenschaften der Helices, könnten ein Mechanismus sein, wie sich unterschiedliche CC-Helices spezifisch erkennen, und wie besonders bei sehr langen CC-Bereichen (z.B. in fibrillären Zytoskelettproteinen) Fehlpaarungen vermieden werden (Hicks et al., 1997). Eine andere CC-Form basiert gänzlich auf einer 11-AS Periode (Undecadmuster) und ist rechtsdrehend. Neuere Untersuchungen zeigen noch weitere abweichende Periodizitäten in verschiedenen Proteinen auf (Gruber und Lupas, 2003). Die Stabilität der CC beruht vor allem auf einer besonderen Anordnung („*knobs-into-holes*“) der apolaren AS im hydrophoben Innenbereich des Helixbündels, die erstmals 1953 postuliert worden war (Pauling und Corey, 1953; Crick, 1953). Spezielle Muster ionischer AS an der Außenseite des Helixbündels können die Stabilität der CC beeinflussen, sie sind aber auch als Auslöser für die Helixassemblierung (*trigger-sites*) und für die richtige Anordnung, Orientierung und Spezifität der CC-Interaktion wichtig. Einige CC zeigen auch eine Modulation durch pH-Veränderungen, Phosphorylierungen und Interaktionen mit Ionen (Burkhard et al., 2001). Langgestreckte CC-Strukturen für einen dauerhaften Zusammenhalt von Proteinen kommen z.B. in Zytoskelettproteinen (α -Keratin, Vimentin) und in Motorproteinen (Myosin, Kinesin, Dynein) vor. Daneben gibt es kleinere CC-Abschnitte, die bei der kurzfristigen Interaktion von Proteinen, z.B. bei regulatorischen Prozessen, von Bedeutung sind. Ein Beispiel ist der beim Verschmelzen von Membranvesikeln mit anderen Membranen auftretende sogenannte SNARE-Komplex. Er besteht aus einem heterotetrameren Helixbündel. Dabei wird je eine Helix des Bündels von einem Protein in der Vesikelmembran (Synaptobrevin) und in der Zielmembran (Syntaxin) beigesteuert. Die restlichen zwei Helices stammen aus einem weiteren in der Zielmembran verankerten Protein (SNAP-25; Misura et al., 2001).

Die am besten untersuchte CC-Interaktion ist der GCN4 *leucin zipper*. Da er oft als Modellsystem für Studien von CC-Interaktionen benutzt wurde, liegen eine Vielzahl von Kristallstrukturen und anderen Messdaten vor. Er bildet die Dimerisierungsdomäne für einen Transkriptionsfaktor und sorgt für parallele Interaktion mit einer 4,5 Heptadperioden langen Helix. Auf der d-Position sitzt als hydrophobe AS immer Leucin. Systematisches Einsetzen der apolaren AS Leucin, Isoleucin und Valin in die a bzw. d-Positionen führte bei bestimmten Kombinationen anstelle der nativen Dimerkonformation zu Trimeren oder Tetrameren (Harbury et al., 1993). Das weist auf die Bedeutung der AS-Packung im Helixinnenbereich

für den Oligomerisierungsgrad hin. Auch der Einbau von einzelnen AS, besonders wenn er im mittleren Teil der Helix erfolgt, kann den Oligomerisierungsgrad ändern (z.B. N16Q von Di- zu Trimer, Gonzalez et al., 1996).

1.3. Homologiemodelle

1.3.1. Voraussetzungen für die Generierung von homologen Strukturmodellen

Diese Methode beruht auf zwei wichtigen Beobachtungen: **1.** Die Struktur eines Proteins wird nur von seiner AS-Sequenz bestimmt (Epstein et al., 1963). **2.** In der Evolution ist die Struktur stabiler und ändert sich viel langsamer als die dazugehörige Sequenz, so dass ähnliche Sequenzen praktisch identische Strukturen und verwandte Sequenzen immer noch ähnliche Strukturen ausbilden.

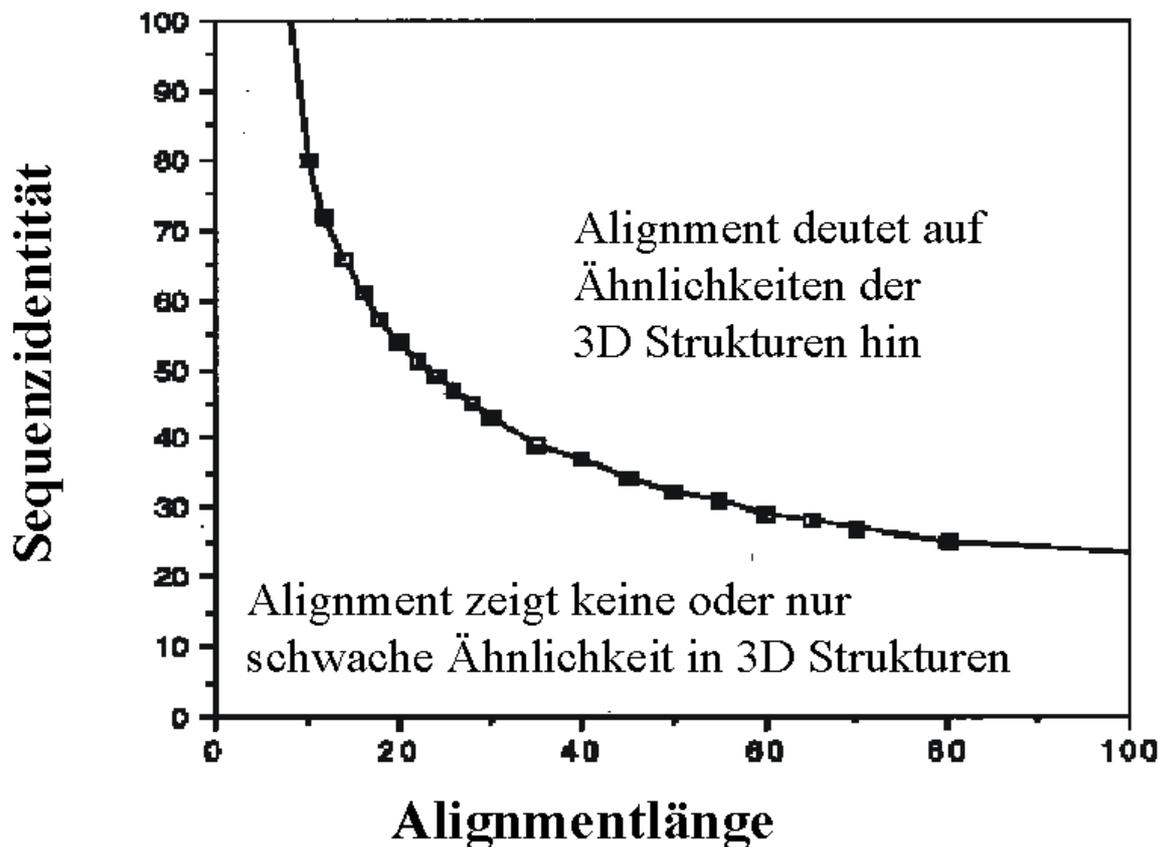


Abb. 1.10. Beziehung zwischen dem Anteil identischer Aminosäurereste (Sequenzidentität) und der Länge der verglichenen Sequenzen (Alignmentlänge) (nach G. Vriend, 2000 von <http://www.cmbi.kun.nl/gv/articles/text/gambling.html>).

Durch das schnelle Wachstum der Protein-Datenbank konnte man eine Grenze für diese Aussage ermitteln (Abb. 1.10). Für Proteindomänen mit einer Größe von 100 AS liegt der Grenzwert der Sequenzidentität bei etwa 30%, wobei der Wert für längere Sequenzen noch etwas sinkt. Zur Erstellung eines Homologiemodells muss man also eine Struktur mit einer entsprechenden Ähnlichkeit in der PDB finden (siehe Abschnitt 2.4.2).

1.3.2. Experimentelle Strukturvorlagen

Für die Erstellung eines Homologiemodells von einem Zielprotein braucht man experimentelle Strukturdaten eines dazu sequenzhomologen Proteins. Als experimentelle Methoden zur Gewinnung dieser Strukturinformation gibt es Röntgenkristallographie, NMR und Elektronenmikroskopie. Jede dieser Methoden hat Vor- und Nachteile und nicht alle Proteine sind für diese Verfahren geeignet. Bei allen Methoden benötigt man das zu untersuchende Protein in relativ großen Mengen (mg-Maßstab). Da jedes Protein eine andere AS-Zusammensetzung hat, sind die chemischen Eigenschaften jeweils einzigartig und entsprechend variabel sind die Kristallisationsbedingungen. Selbst durch den Einsatz von Robotern zur Hoch-Durchsatz-Suche nach guten Bedingungen (hinsichtlich pH-Wert, Temperatur, Ionenzusammensetzung, Gefrierschutzmittel und sonstiger Zusätze) gelingt es nur einen Bruchteil der getesteten Proteine zu kristallisieren. Die Packung in den erhaltenen Kristallen kann suboptimal sein, oder durch Gefrieren bzw. Röntgenstrahlen so geschädigt werden, dass keine guten Messdaten zu erhalten sind.

Für NMR-Untersuchungen dürfen die Proteine bzw. Proteindomänen nicht zu groß sein, damit sich die Signale nicht zu stark überdecken, wobei die Größenbeschränkung durch Weiterentwicklung der Methodik immer mehr erweitert wird. Die Proteine können mit speziellen Isotopen (z.B. ^{13}C und ^{15}N) markiert werden. Zur Abschwächung der Protonensignale werden diese durch Deuterium ersetzt. NMR-Studien werden meist in wässrigen Milieus durchgeführt, so dass die erhaltenen Strukturdaten den realen Zustand der Proteine in der Zelle gut beschreiben. Dies ist ein Vorteil gegenüber der Kristallographie, wo sich durch die Kontakte im Kristall strukturelle Artefakte zeigen können.

Die Elektronenmikroskopie ist zwar im Verlauf der letzten Jahrzehnte verbessert worden, aber immer noch liegt die erzielte Auflösung meist im unteren nm-Bereich und nicht im Angströmbereich, wo man direkt atomare Koordinaten studieren kann. Die Kombination von Elektronenmikroskopie zum Studium großer Komplexe und einer der anderen Methoden zur genaueren Analyse kleinerer Substrukturen liefert jedoch oft gute generelle Aussagen.

Alle mit den oben genannten Methoden erhaltenen Strukturdaten werden in der Protein-Datenbank (PDB: <http://www.rcsb.org/pdb/>) abgelegt. Seit der Gründung dieser Datenbank hat die Zahl der darin abgelegten Strukturen exponentiell zugenommen; es sind aber immer noch recht wenige publiziert (~32000 im Juli 2005) im Vergleich zu den Tausenden von Proteinen, die in den Millionen von Arten vorkommen. Aus den oben genannten experimentellen Einschränkungen und aus Kostengründen ergibt sich, dass niemals die Strukturen aller auf der Erde vorliegender Proteine experimentell aufgeklärt werden können.

Die Herstellung von Homologiemodellen ist eine Methode, um die Strukturen anderer interessanter Proteine einzuschätzen und Struktur-Funktions-Zusammenhänge zu verstehen.

1.4. Zielstellung der Arbeit

TJ sind spezialisierte Zell-Zell-Kontaktbereiche in Epithelien und Endothelien vielzelliger Organismen, deren Hauptfunktion die parazelluläre Abdichtung zwischen verschiedenen Geweben ist. Es sind erst wenige, der daran beteiligten Proteine bekannt. Beginnend mit dem membranassoziierten Protein ZO-1 (1986) und dem Transmembranprotein Occludin (1993) werden immer noch neue Proteine identifiziert. Zwischen Occludin und dem ebenfalls ZO-1-bindenden AJ-Protein α -Catenin gibt es Sequenzähnlichkeiten. Sie enthalten ebenso wie ZO-1 CC-Motive, was auf gemeinsame evolutionäre Ursprünge der TJ und AJ mit einem ähnlichen Bindungsmechanismus von Occludin und α -Catenin an ZO-1 hindeuten könnte. Wie diese Proteine auf der molekular/strukturellen Ebene miteinander interagieren und reguliert werden und welche Mechanismen auf der molekularen Ebene an den TJ dabei ablaufen, ist jedoch noch weitgehend unbekannt. Von den TJ-Proteinen sind zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Strukturen auf atomarer Ebene bekannt. Viele durchgeführte Mutations- und andere Studien ergeben nur ein bruchstückhaftes und teilweise widersprüchliches Bild der Zell-Zell-Interaktionen. Mit dieser Arbeit sollte durch die Untersuchung der Struktur-Funktions-Beziehung zwischen den TJ-Proteinen Occludin und ZO-1 ein Teil der Fragen zu den TJ beantwortet und besonders die molekularen Mechanismen der Protein-Protein-Wechselwirkung von Proteinen der TJ und AJ aufgeklärt werden. Dabei werden bekannte homologe Strukturen analysiert und anhand von experimentellen Daten Homologiemodelle entwickelt. Die direkte Kombination von Bindungsexperimenten und bioinformatischen Homologiemodellen führte mit den einander komplementierenden Ergebnissen zu weiterführenden Schlussfolgerungen, als es mit nur einem der beiden Methodenkomplexe allein möglich gewesen wäre. Dies trägt zum Verständnis der Zell-Zell-Kontakt-Mechanismen bei. Es soll die Hypothese geklärt werden, ob wirklich ein gemeinsamer Bindungsmechanismus (und was für einer) zwischen Occludin/ α -Catenin und ZO-1 vorliegt. Die durchzuführenden Studien in dieser Arbeit sollen zur Klärung noch offener Fragen über die Prinzipien der Bildung von makromolekularen Komplexen in TJ beitragen. Die erwarteten Erkenntnisse versprechen einen Beitrag zu einem besseren Verständnis der Funktion und Regulation der TJ und AJ.