

#### 4. Diskussion

In dieser Arbeit werden wichtige Epitope für die Interaktion von Occludin bzw.  $\alpha$ -Catenin mit ZO-1 identifiziert. Dabei findet sich für Occludin/ $\alpha$ -Catenin ein auf molekularer Ebene ähnlicher Bindungsmechanismus zu ZO-1. Es wird erstmals gezeigt, dass der gleiche Bereich von ZO-1 (Hinge-GUK-Region) sowohl die CC-Domäne von Occludin als auch das VH3-Segment von  $\alpha$ -Catenin bindet, was gut zu den bisher bekannten Bindungsdaten passt. Bei der Knüpfung von Zell-Zellkontakten bilden sich zunächst AJ und danach TJ, wobei ZO-1 zuerst mit E-Cadherin in den AJ (wahrscheinlich über  $\alpha$ -Catenin) und dann mit Occludin in den TJ kolokalisiert (Ando-Akatsuka et al., 1999). Die Akkumulation von ZO-1 in den AJ wird als Zwischenschritt vorgeschlagen beim ZO-1-Transport vom Zytosol in die TJ (Rajasekaran et al., 1996). Da nach unseren Ergebnissen die ZO-1-Bindung an die AJ bzw. TJ-Proteine ( $\alpha$ -Catenin bzw. Occludin) über das gleiche Epitop erfolgt, kommt als Erklärung für den Übergang von ZO-1 aus den AJ in die TJ nur eine kompetitive Verdrängung von  $\alpha$ -Catenin durch Occludin in Betracht. Es ist eine Kombination von bioinformatischen (Suche nach konservierten Sequenzinformationen, Erstellen von Homologiemodellen) und experimentellen Methoden zur Untersuchung der Bindungen (SPR von Verkürzungsstrukturen und Peptidmapping) benutzt worden. Dadurch gewinnt man sich ergänzende und weiterführende Erkenntnisse, als es mit nur einer Methode möglich wäre. Für alle identifizierten Bindungsepitope in den untersuchten Proteinen konnten aus Kristallstrukturen Fragmente mit homologen Sequenzen identifiziert werden (Pokutta und Weis, 2000; McGee et al., 2001; Izard et al., 2004). Sie enthalten  $\alpha$ -helikale Helixbündel und/oder CC-Eigenschaften als mögliche Interaktionsmotive. Die erzeugten Modelle liefern starke Hinweise, dass die C-terminale CC-Domäne von Occludin als dimerisiertes Vierhelixbündel vorliegt und in dieser Form auf ähnliche Weise wie die Vierhelixbündelstruktur von  $\alpha$ -Catenin mit ZO-1 interagiert. Dieser vergleichbare Interaktionsmechanismus und eine Sequenzähnlichkeit von Occludin und  $\alpha$ -Catenin in den Interaktionsbereichen zu ZO-1 könnten auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung dieser Wechselwirkung hindeuten.

##### 4.1. Vor- und Nachteile der verwendeten Methoden sowie Aussagekraft der Resultate

Durch die Verwendung unterschiedlicher Methoden mit anderen Mechanismen können die jeweiligen Nachteile größtenteils kompensiert und die Messergebnisse gegenseitig bestätigt werden.

SPR: Die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie ist eine Methode zur Analyse der Assoziation und Dissoziation von Makromolekülen in Echtzeit. Damit bietet sie Vorteile

gegenüber Methoden wie z.B. der Kopräzipitation, wo die Bindung erst nach einiger Zeit und durch verschiedene indirekte Detektionsmethoden (z.B. Chemilumineszenz mit Antikörpern) sichtbar wird. Je nach seiner Stabilität kann der immobilisierte Ligand mehrfach regeneriert werden. Unter günstigen Bedingungen ist ein SPR-Chip über Tage und Wochen in bis zu einigen hundert Messungen verwendbar. Die hier dargestellten Ergebnisse sind mit Sensorchips erhalten worden, die maximal 200 Zyklen von Messung und Regeneration durchliefen. Zwischendurch ist regelmäßig kontrolliert worden, ob die Bindungsfähigkeit der auf dem Sensorchip immobilisierten Liganden konstant geblieben ist. Um aus den erhaltenen Bindungskurven kinetische Konstanten wie  $k_a$  und  $k_d$  zu ermitteln, ist eine mathematische Kurvenanpassung der Messkurven an theoretische Kurven nach einer bekannten Gleichung nötig. Wenn keine anderen Informationen zur Stöchiometrie der untersuchten Bindung vorliegen, wird für die Kurvenanpassung das 1:1-Bindungsmodell nach Langmuir zugrunde gelegt (Karlsson et al., 1991). Dies ist auch bei unseren Messungen gemacht worden, aber die theoretischen und experimentellen Messkurven stimmten nicht überein. Im Verlauf der Experimente hat sich ergeben, dass die verschiedenen SH3-Hinge-GUK-Konstrukte von ZO-1 über eine unbekannte Stöchiometrie auch mit sich selbst interagieren. Damit kann für die Occludin-ZO-1- oder  $\alpha$ -Catenin-ZO-1-Wechselwirkung nicht mehr das einfache 1:1-Bindungsmodell zugrunde gelegt werden. Die genaue Stöchiometrie der ZO-1-ZO-1-Interaktion muss in weiteren Experimenten aufgeklärt werden, bevor man eine Gleichung für die Anpassung der Messkurven und damit die exakte Bestimmung der kinetischen Konstanten wie  $k_a$  und  $k_d$  entwickeln kann. Zur qualitativen Unterscheidung zwischen gut und schlecht interagierenden Konstrukten sind die quantitativ gebundenen molaren Mengen in einem bestimmten Zeitraum (üblicherweise 4 min, bei gleichen Analytkonzentrationen) miteinander verglichen worden.

Normalerweise sind bei SPR-Messungen analoge Ergebnisse zu erwarten, wenn die Position des am Chip gekoppelten Liganden und des in der Lösung perfundierten Analyten vertauscht werden. Bei unseren Messungen sind jedoch mit Occludin/ $\alpha$ -Catenin als Ligand und ZO-1 als Analyt immer deutlich höhere Bindungswerte (nach Normierung auf immobilisierte Molarität) erhalten worden, als im umgekehrten Fall. Dieses Ergebnis ist ein weiterer Hinweis, dass der im ZO-1-Homologiemodell gefundene basische Oberflächenbereich wirklich für die Bindung an Occludin und  $\alpha$ -Catenin bedeutsam ist. Durch die verwendete kovalente Kopplungsmethode (über freie Aminogruppen) werden etliche der zu immobilisierenden ZO-1-Moleküle mit dieser, viele Aminogruppen enthaltenden, Seite an den Chip gebunden. Das ZO-1-Bindungsepitop von Occludin und  $\alpha$ -Catenin trägt hingegen

überwiegend saure Aminosäuren und kaum freie Aminogruppen, so dass die Kopplung an den SPR-Chip hauptsächlich an anderen Molekülteilen oder sogar am Fusionsprotein MBP erfolgt. Damit sind bei gleicher immobilisierter molarer Menge bei ZO-1 deutlich mehr Moleküle mit ihren Bindungsepitopen an den Chip gekoppelt als bei Occludin oder  $\alpha$ -Catenin und somit für eine Interaktion mit dem Analyten sterisch nicht zugänglich. Da die Aminokopplung ungerichtet erfolgt, ist nicht zu bestimmen wie groß der jeweilige Anteil an sterisch nicht zugänglichen Liganden ist. Die beobachteten Bindungsunterschiede zwischen ZO-1- oder Occludin/ $\alpha$ -Catenin-Liganden deuten jedoch bei ZO-1 auf eine signifikante Menge sterisch für die Interaktion unerreichbarer Moleküle hin. Auch sind die ZO-1-Konstrukte in der Regel größer als die Occludinkonstrukte, und ergeben deshalb bei einer Bindung der gleichen Molmenge stärkere RU-Signale.

*Peptidmapping:* Durch Studien von an Membranen synthetisierte Peptide können Fragestellungen zu Bindungsepitopen und den zugrundeliegenden Aminosäuremustern schnell und effizient untersucht werden. Um artifizielle Ergebnisse auszuschließen, die dadurch entstehen können, dass die auf der Membran synthetisierten Peptide nicht immer die gleiche Konformation annehmen, die sie in den nativen Proteinen besitzen, wurden die Peptidmappingexperimente mit zwei reziproken Herangehensweisen durchgeführt. Dabei ist jeder Bindungspartner einerseits als immobilisiertes Peptid und andererseits in freier Lösung untersucht worden. Auch sind in einem Fall größere, zur Faltung fähige, GST-Konstrukte als Bindungspartner verwendet worden. Wegen Problemen bei der Herstellung und Reinigung ist die Untersuchung von GST-ZO-1-Konstrukten nicht möglich gewesen. Stattdessen sind farbstoffmarkierte ZO-1-Peptide, welche die vorhergesagten CC1- und H2-Bereiche enthalten, zur Bindung an membrangekoppelte Peptidsequenzen aus Occludin- bzw.  $\alpha$ -Catenin, eingesetzt worden. Im zweiten reziproken Ansatz werden dagegen die interessierenden ZO-1-Bereiche als Peptide immobilisiert, mit GST-Fusionsproteinen von Occludin bzw.  $\alpha$ -Catenin inkubiert und mit HRP-gekoppelten Anti-GST-Antikörpern und Chemilumineszenz analysiert.

Selbst bei der Benutzung von Robotern für die Synthese der Peptidmembranen entstehen deutliche Unterschiede der synthetisierten Peptidmenge pro Membranpunkt. Die beobachteten Bindungsmengen von Punkten mit gleicher Peptidsequenz können dadurch um den Faktor 2 oder eventuell mehr schwanken (persönliche Information Michael Portwich, Charité, Berlin). Bei Benutzung von Peptidmembranen sind daher die erhaltenen Daten hauptsächlich qualitativ ausgewertet worden.

#### 4.2. Identifizierung der Bindungsepitope von $\alpha$ -Catenin, Occludin und ZO-1

Die Entdeckung der Sequenz- und Strukturhomologie des AJ-Protein  $\alpha$ -Catenin zu Occludin ist ein überraschender und wichtiger Befund unserer Untersuchungen. Im Weiteren ergab sich, dass  $\alpha$ -Catenin und Occludin über identische Bindungsepitope mit ZO-1 interagieren. Am Anfang ist zunächst analysiert worden, ob zwischen den betrachteten Proteinen komplementäre strukturelle Interaktionsmuster bestehen. Bioinformatische Vorhersagen zeigen helikale CC-Motive (Lupas, 1996a) in der zweiten Hälfte des zytosolischen C-terminalen Teils von Occludin, in einigen Helixbündelbereichen von  $\alpha$ -Catenin und an beiden Flanken der ZO-1-GUK-Domäne. Des Weiteren sind zur Erstellung der Homologiemodelle auf der Basis von Sequenzähnlichkeiten bekannte Kristallstrukturen als Vorlagen für die Modelle gefunden worden. Überraschenderweise ist dabei die beste Strukturvorlage mit der größten Sequenzähnlichkeit für den genannten Occludinbereich eine Helixbündelstruktur aus dem N-Terminus des AJ-Proteins  $\alpha$ -Catenin. Da für Occludin (Fanning et al., 1998) und  $\alpha$ -Catenin (Itoh et al., 1997) eine Interaktion mit ZO-1 beschrieben ist, könnte das auf einen ähnlichen Bindungsmechanismus zu ZO-1 hindeuten. Wie die bekannten Kristallstrukturen von  $\alpha$ -Catenin (siehe PDB-Nr. in Abb. 3.3; Yang et al., 2001) zeigen, haben seine drei vinculinhomologen Regionen einem ähnlichen Aufbau von Vierhelixbündeln, von denen Teile CC-Eigenschaften besitzen. Basierend auf diesen Ausgangspunkten ist die ursprüngliche Hypothese der CC-Interaktion von ZO-1 und Occludin dahingehend erweitert worden, dass sowohl für Occludin als auch für  $\alpha$ -Catenin der gleiche Interaktionsmechanismus an ZO-1 über Helixbündel mit anteiligen CC-Eigenschaften angenommen wird. Unsere Modelle erhärten die Wahrscheinlichkeit dieser Hypothese. Die experimentellen Bindungsstudien unterschiedlicher Fragmente von ZO-1, Occludin und  $\alpha$ -Catenin unter Verwendung zweier unabhängiger Methoden (SPR-Spektroskopie, Peptidmapping) unterstreichen diese Annahme ebenfalls. Eines der zwei identifizierten essentiellen Bindungsepitope enthält die  $\alpha$ -Helices H1 und H2 von ZO-1 und liegt an der Oberfläche des SH3-Hinge-GUK-Strukturmodells. Dies bestätigt frühere Untersuchungen, wonach die GUK-Domäne an der Occludinbindung beteiligt ist (Fanning et al., 1998). Der Interaktionsbereich von ZO-1 zu Occludin ist dann weiter präzisiert worden (Schmidt et al., 2004). Zusätzlich wird jetzt in ZO-1 das CC-Motiv CC1 N-terminal von GUK in der Hingeregion zwischen der SH3- und der GUK-Domäne als ein zweites Epitop für die Bindung von ZO-1 an Occludin und  $\alpha$ -Catenin identifiziert. Die untersuchten Verkürzungsmutanten aus SH3-Hinge-GUK hatten in Oberflächenplasmonresonanzspektroskopiestudien jeweils ähnliche Bindungsintensitäten (Abb. 3.19) zu Occludin<sub>406-521</sub>

und  $\alpha$ -Catenin<sub>509-906</sub>. Auch andere  $\alpha$ -Cateninbereiche ( $\alpha$ -Catenin<sub>1-508</sub>,  $\alpha$ -Catenin<sub>631-766</sub>) weisen noch deutliche aber schwächere Bindungen an einige ZO-1-Konstrukte auf. Dagegen zeigt die komplette SH3-Hinge-GUK-Einheit (ZO-1<sub>502-812</sub>) mit  $\alpha$ -Catenin<sub>1-508</sub> nahezu keine aber mit  $\alpha$ -Catenin<sub>509-906</sub> sowie Occludin<sub>406-521</sub> eine deutliche Interaktion. Dies stimmt mit früheren Studien überein, in denen keine Bindung der ersten Hälfte von  $\alpha$ -Catenin an ZO-1 festgestellt worden ist (Imamura et al., 1999; Itoh et al., 1997). Die beobachtete Wechselwirkung verschiedener Verkürzungsmutanten von ZO-1-Hinge-GUK mit den vorderen Teil von  $\alpha$ -Catenin ( $\alpha$ -Catenin<sub>1-508</sub>) könnte durch das Freilegen einer Bindungsstelle in ZO-1 durch die Verkürzungen ermöglicht worden sein. Dies ist aber wahrscheinlich *in vivo* nicht relevant, da in der Zelle ZO-1 komplett vorliegt. Aus der Literatur (Imamura et al., 1999; Itoh et al., 1997) ist bekannt, dass die C-terminale Hälfte von  $\alpha$ -Catenin mit der N-terminalen Hälfte von ZO-1 (ZO-1<sub>1-812</sub>) interagiert. Wir können somit den Bindungsbereich von  $\alpha$ -Catenin<sub>509-906</sub> innerhalb von ZO-1 auf den Hinge-GUK-Bereich (ZO-1<sub>589-772</sub>) genauer eingrenzen.

Ein wichtiger Teil dieser Arbeit ist es, das ZO-1-Bindungsepitop im C-Terminus von Occludin weiter zu präzisieren. Splicevarianten von Occludin mit fehlender vierter Transmembrandomäne, wodurch der C-Terminus extrazellulär statt intrazellulär liegt, lokalisierten nicht an TJ (Mankertz et al., 2002). Connexin-Occludin-Chimären nur mit dem zytosolischen C-Terminus von Occludin werden auch in Zellen ohne endogenes Occludin oder Claudin an Zell-Zellkontakte transportiert (Mitic et al., 1999), wahrscheinlich nur durch ZO-1. Occludinmutanten ohne den intrazellulären C-Terminus zeigen eine Störung der TJ (Balda et al., 1996b). Diese Ergebnisse deuten auf die Wichtigkeit des C-Terminus von Occludin, für seine Lokalisation an die TJ, hin. Sie erfolgt wahrscheinlich über ZO-1, da ohne ZO-1 Occludin nur diffus in Membranen verteilt ist (Van Itallie und Anderson, 1997). SPR-Bindungsstudien mit Verkürzungskonstrukten von Occludin zeigen den Bereich Occludin<sub>406-468</sub> als das ZO-1-Bindungsepitop (Tabelle 3.6). Er liegt im letzten Drittel des C-terminalen Teils von Occludin und enthält Teile der vorhergesagten CC-Region und einen Überschuss an sauren Aminosäuren.

Mit Hilfe einer zweiten unabhängigen Methode (Peptidmapping) wurden die Interaktionsbereiche von ZO-1 innerhalb von Occludin und  $\alpha$ -Catenin weiter präzisiert (Variante a in Abb. 3.22). Die gefundenen Epitope liegen in den C-terminalen  $\alpha$ -helikalen Occludinbereichen Ha, Hb, CCa, CCb und in  $\alpha$ -Catenin in der VH2-Domäne und dem vorhergesagten CC-Bereich in der VH3-Domäne. Durch den inversen Ansatz beim Peptidmapping (Variante b in Abb. 3.22) konnten die Bindungsbereiche von rekombinanten Occludin- und  $\alpha$ -Cateninkonstrukten an ZO-1 weiter eingegrenzt werden. Die gefundenen

Peptidbereiche (ZO-1<sub>591-632</sub> für Occludin und ZO-1<sub>591-622</sub> für  $\alpha$ -Catenin, sowie ZO-1<sub>726-754</sub> und ZO-1<sub>756-781</sub> für beide Proteine) entsprechen gut den bioinformatisch vorhergesagten Bereichen ZO-1-CC1 und H2 und zeigen eine zusätzliche Bedeutung von ZO-1-H1 für die Interaktion mit Occludin und auch  $\alpha$ -Catenin. Die drei gefundenen Helices in ZO-1 (CC1, H1, H2) zeichnen sich durch einen Überschuss an basischen Aminosäuren aus, während in den Bindungsepitopen von Occludin und  $\alpha$ -Catenin negativ geladene saure Aminosäuren überwiegen. In den Interaktionsmodellen ist diese Ladungskomplementarität der Epitope ebenfalls zu beobachten. Ein basischer Oberflächenbereich im ZO-1-Dimermodell passt von der Größe zu einem sauren Bereich im Occludindimermodell (Abb. 3.41). Ebenso finden sich auch auf den Oberflächen der Monomermodelle von ZO-1 und des VH3- $\alpha$ -Catenins komplementäre Ladungsbereiche (Abb. 3.15). Nach diesen Modellen ist die Interaktion der experimentell ermittelten Bindungsepitope möglich. Diese Experimente und Modelle unterstützen also die Hypothese, dass CC-enhaltene Helixbündel von Occludin und  $\alpha$ -Catenin mit ZO-1 an derselben Bindungsstelle (Hinge-GUK-Region) interagieren.

#### **4.3. Die Bedeutung der Hingeregion für MAGUK-Proteine und der Einfluss von Phosphorylierungen**

Der SH3-Hinge-GUK-Bereich von ZO-1 und anderen MAGUK-Proteinen ist sehr wichtig für ihre Funktion. In der Hingeregion zwischen SH3 und GUK verschiedener MAGUKs wurden etliche Splicevarianten identifiziert. Auch Deletionsstudien in diesem Bereich führten z.T. zu starken Phänotypen. Ebenso ist die Hingeregion als Bindungsepitop für viele regulatorische Proteine erkannt worden, die eine mögliche Adaptorfunktion aufweisen (Näheres dazu im Abschnitt 4.7). Durch Phosphorylierungen sind noch Modifikationen dieser Region, ihrer Bindungseigenschaften und damit der Adaptoreffekte möglich.

Im MAGUK-Protein Dlg führen verschiedene Splicevarianten in diesem Bereich zu unterschiedlicher Lokalisierung an die Membran oder im Nukleus (McLaughlin et al., 2002). Deletionsstudien zeigen die Notwendigkeit der Hingeregion (dort Hook genannt) für die Membranlokalisierung von Dlg und zusammen mit der SH3-Domäne für Wachstumsregulation und Epithelstruktur (Hough et al., 1997). Eine Studie mit teilweise molekularem Modeling des MAGUK-Proteins SAP97 mit seinem GUK-Domänen-Bindungspartner GKAP zeigt eine Interaktion mit einem nur aus der GUK-Domäne bestehenden Konstrukt sowie dem Gesamtprotein, aber nicht an ein SH3-Hinge-GUK-Konstrukt. Die SH3-Domäne und ein Teil der Hingeregion allein wirkten also als Inhibitoren der GKAP-Bindung an die SAP97-GUK-Domäne, was durch den N-terminalen Bereich vor PDZ1 wieder aufgehoben wird (Wu et al.,

2000). Also beeinflussen in MAGUK-Proteinen nicht nur benachbarte Regionen einander, sondern auch sequenzmäßig entferntere Bereiche können in der Gesamtfaltung des Proteins aufeinander einwirken. In der vorliegenden Arbeit wurde nur der Bereich SH3-Hinge-GUK von ZO-1 näher untersucht, wobei die ZO-1-Hingeregion als wichtiges Bindungsepitop für die Interaktion mit Occludin und  $\alpha$ -Catenin identifiziert wurde. Aus der Arbeit von Wu et al., 2000 folgt aber, dass andere Bereiche von ZO-1 möglicherweise in diese Interaktion mit eingreifen, was noch zu untersuchen wäre. Eine Deletionsmutante von ZO-1 ohne die CC1-Helix und die GUK-Domäne (ohne Aminosäuren 615-812) lokalisiert nicht an die Membran, sondern bleibt intrazellulär (Ryeom et al., 2000). Die Hinge-GUK-Region ist folglich für die Membranlokalisierung von ZO-1 und damit auch für seine weiteren Funktionen und Bindungspartner in der Membran essentiell.

Unmittelbar N-terminal vor der vorhergesagten CC1-Region in ZO-1 ist ein Bereich mit zwei benachbarten Serinresten (S609, S610) identifiziert worden, der von der Kinase ZAK phosphoryliert wird (Balda et al., 1996a). In unserem SH3-Hinge-GUK-Modell für ZO-1 liegen diese Serine innerhalb des basischen Bereiches von CC1. Eine Phosphatgruppe würde hier das negative elektrische Potential erhöhen und so den positiven Ladungsüberschuss an dieser Stelle verringern. Dadurch wäre die elektrostatische Interaktion mit den überwiegend negativen sauren Bindungsepitopen von Occludin oder  $\alpha$ -Catenin abgeschwächt. Diese Annahme wird auch durch unsere Ergebnisse von immobilisierten ZO-1-Peptiden mit substituierten Glutamaten (als Phosphatanalog mit negativer Ladung) anstelle der Serine bestätigt, die eine verminderte Bindung von GST-Occludin<sub>406-521</sub> und GST- $\alpha$ -Catenin<sub>509-906</sub> im Vergleich mit den WT-Sequenzen zeigen.

Occludin ist ein Multiphosphorprotein, besonders der in den TJ vorkommende Anteil des Gesamtzellpools. Phosphorylierungen innerhalb der Coiled coil-Domäne von Occludin verstärken deren sauren Charakter und damit wahrscheinlich die Bindung an ZO-1. Erfolgt die Phosphorylierung außerhalb des Bindungsepitops, hat das unter Umständen Auswirkungen auf die Faltung des Occludins, was je nach der genauen Position positiven oder negativen Einfluss auf die ZO-1-Bindung oder möglicherweise eine Signalfunktion für andere Proteine haben kann. Für genauere Aussagen muss die Identifizierung der exakten Phosphorylierungspositionen, sowie der beteiligten Signalwege abgewartet werden, die jedoch noch weitgehend unklar sind. Eine Phosphorylierungsstelle (S338) ist von unserer Arbeitsgruppe im C-Terminus von Occludin identifiziert worden (Andreeva et al., 2001). Sie liegt weit außerhalb der hier untersuchten CC-Domäne von Occludin und ist deshalb auch nicht in den untersuchten Verkürzungsstrukturen enthalten. *In vivo* ist diese Stelle deshalb

nicht direkt an der ZO-1-Bindung beteiligt, sondern ist wahrscheinlich ein Signal für andere noch unbekannte Prozesse. Die Occludinphosphorylierung und TJ-Permeabilität wird über verschiedene Signalwege reguliert (RhoA-abhängig und -unabhängig, Hirase et al., 2001). In Caco-2-Zellen wurde ein schneller (in 15 min) Anstieg der Tyrosinphosphorylierung von Occludin, ZO-1, E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin beobachtet. Er war begleitet von einer Abwanderung dieser Proteine von interzellulären *junctions* und einer verminderten Koimmunopräzipitation von ZO-1 mit Occludin (Rao et al., 2002). Die genaue Position der hier erfolgten Phosphorylierung ist unklar, dennoch zeigt sich, dass eine Phosphorylierung von Occludin die Interaktion mit ZO-1 auch schwächen kann. Im Occludindimermodell sind mehrere Tyrosine an der Bildung des Vierhelixbündels beteiligt, wo sie Teil des hydrophoben Innenbereichs sind. Eine Phosphorylierung dort würde eventuell die hydrophobe CC-Interaktion und damit die Dimerbildung stören. In einer anderen Studie erwies sich eine Tyrosinphosphorylierung von Occludin und ZO-1 als wichtig für die Regenerierung von TJ nach ATP-Entzug (Tsukamoto und Nigam, 1999). In HUVEC-Zellen wird durch Tyrosinphosphataseinhibitoren eine selektive Proteolyse von Occludin mit einem Anstieg der Permeabilität ausgelöst (Wachtel et al., 1999). Es ist wahrscheinlich, dass in den unterschiedlichen Zelltypen und mit verschiedenen Signalstoffen oder Inhibitoren jeweils distinkte Phosphorylierungspositionen beeinflusst werden, die zu jeweils andersartigen Auswirkungen führen.

#### 4.4. Vergleich der Bindungsexperimente Occludin/ZO-1 und $\alpha$ -Catenin/ZO-1

Aus den Messungen kann man auf eine ähnliche Größenordnung der Bindungsstärke für die jeweils am besten an ZO-1 bindenden Konstrukte von Occludin und  $\alpha$ -Catenin schließen. Wegen der unter Punkt 4.1. genannten methodischen Einschränkungen lassen sich keine absoluten Bindungsstärken für einen genauen Vergleich ermitteln. In einer früheren Arbeit konnten jedoch  $K_D$ -Werte für die Bindung von Occludin<sub>378-521</sub> an das CC1-Peptid (ZO-1<sub>597-633</sub>) von  $460 \pm 104$  nM und an das H2-Peptid (ZO-1<sub>745-772</sub>) von  $58 \pm 20$  nM bestimmt werden (Schmidt, 2002). Diese Werte sprechen für submikromolare Bindungskonstanten zwischen Occludin/ZO-1 sowie wegen der vergleichenden Experimente auch zwischen  $\alpha$ -Catenin/ZO-1. Es zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit der Bindungseigenschaften von den Sequenzbereichen der untersuchten Fragmente. Besonders bei den Peptidbindungsstudien in dieser Arbeit ist ein Überlappen der ZO-1-Bindungs epitope von Occludin und  $\alpha$ -Catenin zu beobachten. Sie umfassen jeweils den CC1-Bereich in der Hingeregion und die  $\alpha$ -helikalen Bereiche H1 und H2 der GUK-Domäne. Im zeitlichen Ablauf bilden sich erst AJ und dann TJ.

Dabei wird bei der initialen Bildung von Zell-Zellkontakten z.B. während einer Wundheilung zunächst eine Kolokalisation von ZO-1 mit E-Cadherin an den neuen Kontaktbereichen zwischen den Zellen beobachtet (Ando-Akatsuka et al., 1999). Das erfolgte höchstwahrscheinlich über  $\alpha$ -Catenin, welches wiederum über  $\beta$ -Catenin an den zytosolischen C-Terminus von E-Cadherin bindet. Erst im weiteren Verlauf lokalisiert Occludin in diesen apikalen Membranbereich und bleibt im Folgenden als enger Occludin/ZO-1-Komplex sichtbar, der dann gürtelförmige TJ bildet, während sich die anfängliche Kolokalisation von E-Cadherin/ZO-1 langsam auflöst und sich das E-Cadherin in die sich entwickelten AJ verlagert (Ando-Akatsuka et al., 1999). Diese Beschreibung aufgrund von zeitlich gestaffelten Immunofluoreszenzaufnahmen mit einigen ausgewählten Proteinen beweist, dass erst ZO-1 an den Junctionkomplex bindet und später Occludin rekrutiert wird. Das heißt: unter physiologischen Bedingungen kann der  $\alpha$ -Catenin/ZO-1 Komplex in AJ aufgebrochen, und das  $\alpha$ -Catenin durch Occludin ersetzt werden. Dazu muss die Occludin/ZO-1-Interaktion stärker sein als die Bindung von  $\alpha$ -Catenin/ZO-1. In unseren Experimenten zeigt die gesamte SH3-Hinge-GUK-Einheit von ZO-1 eine stärkere Bindung an Occludin als an  $\alpha$ -Catenin, was für eine mögliche Verdrängung spricht. Auch in den Peptidmappingstudien scheint die ZO-1-Bindung von Occludin leicht stärker zu sein als die von  $\alpha$ -Catenin (besonders in der CC1-Region), aber die Methode des Peptidmappings eignet sich nicht gut für quantitative Aussagen. *In vitro* Kompetitionsmessungen zeigen, dass Occludin die  $\alpha$ -Catenin/ZO-1-Interaktion stören und das  $\alpha$ -Catenin daraus verdrängen kann. Wurde ZO-1<sub>502-812</sub> zusammen mit Occludin in Lösung vermischt, ergibt sich eine prozentual etwa gleiche Verminderung (bis zu ~50% bei 25  $\mu$ M Occludin in Lösung) der ZO-1-Bindung an immobilisiertes Occludin wie an  $\alpha$ -Catenin (Abb. 3.21). Unsere Experimente unterstützen also die Hypothese, dass ZO-1 über den gleichen Bindungsbereich zuerst mit  $\alpha$ -Catenin im E-Cadherin/Catenin-Komplex der AJ interagiert und dann mit der C-terminalen CC-Domäne des höher affinen Occludin in die TJ abwandert. Der Transfer des ZO-1 von den AJ zu den TJ wird möglicherweise durch weitere Interaktionen außerhalb der SH3-Hinge-GUK-Region mit anderen TJ-Proteinen gefördert. Dafür kämen z.B. die Interaktionen von Claudinen oder JAM mit den PDZ-Domänen von ZO-1 infrage (Abb. 1.7). Die AJ und TJ sind hochkomplexe Proteinstrukturen, für deren Bildung offenbar eine genaue zeitliche und räumliche Abfolge der Proteinrekrutierung entscheidend ist. Dabei gelangt ZO-1 frühzeitig über Bindung an  $\alpha$ -Catenin an den Junctionkomplex, bevor es später über seine sonstigen Proteinbindungsdomänen weitere Proteine (z.B. Occludin) zu den TJ rekrutiert.

#### 4.5. Monomermodelle von $\alpha$ -Catenin<sub>509-630</sub>/ZO-1<sub>518-806</sub> und Occludin<sub>400-521</sub>/ZO-1<sub>518-806</sub> zeigen keine komplementären Interaktionsmuster

Die Monomermodelle von ZO-1 und Occludin, sowie die Kristallstruktur von  $\alpha$ -Catenin<sub>509-630</sub> passen von Form und Ladung nicht gut zusammen. Das monomere Homologiemodell von Occludin besteht aus einem langgestreckten Dreihelixbündel mit einer langen zentralen Helix mit CC-Eigenschaften. Beide Enden des Bündels tragen ein negatives elektrostatisches Potential. Gebildet wird es auf der einen Seite von der  $\alpha$ -Helix Oc-Ha und auf der anderen Seite von der Turn-Region zwischen den CC-Helices Oc-CCa/-CCb. Dazwischen liegt wie eine Barriere die basische Helix Oc-Hc (Abb. 3.10.A, B). Laut den Messergebnissen der Verkürzungsstudien ist die  $\alpha$ -Helix Oc-Hc nicht an der Assoziation von Occludin zu ZO-1 beteiligt, da nach ihrer Deletion die Bindung sogar zunimmt. Die geringe Bedeutung dieser Helix bestätigen Überexpressionsstudien von Hühneroccludin in *Xenopus*-Embryos, wo eine Deletion von Oc-Hc keinen Effekt auf die Zelleigenschaften hatte, jedoch weitere C-terminale Verkürzungen eine verstärkte Permeabilität des Gewebes bewirkten (Chen et al., 1997). Das elektrostatische Potential der  $\alpha$ -Catenin<sub>509-630</sub>-Struktur (Abb. 3.11.A, B) hat ein ähnliches Muster (starke negative Potentiale an beiden Enden eines Helixbündels) wie das Occludinmonomermodell (Abb. 3.10). Komplementär dazu passend weist das Monomermodell von ZO-1-SH3-Hinge-GUK einen deutlichen, länglichen basischen Bereich an der Oberfläche auf, der von den ZO-1-Elementen H1/H2 in der GUK-Domäne und CC1 in der Hingeregion gebildet wird (Abb. 3.13.A, B). Vergleicht man die Monomermodelle von Occludin<sub>406-521</sub> bzw.  $\alpha$ -Catenin<sub>509-630</sub> (entspricht der 2. Hälfte von VH2) mit dem Modell von ZO-1<sub>518-806</sub>, ergeben sich nur unzureichende komplementäre Eigenschaften hinsichtlich Größe, elektrostatischem Potential und Oberflächenformen für eine optimale Wechselwirkung. Die biophysikalischen Untersuchungen von Occludin<sub>406-521</sub> mit Lichtstreuung (Tabelle 3.9) und Größenausschlusschromatographie (Abb. 3.26) ermittelten eine molare Masse von je  $\sim 30$  kDa. Das verwendete Occludinfragment hat aber nach der Aminosäuresequenz nur eine Masse von 14,6 kDa, was darauf hinweist, dass der C-terminale Occludinbereich dimerisieren kann. Nach den Lichtstreuungsexperimenten erfolgt mit dem gesamten Fusionsprotein MBP-Occludin<sub>406-521</sub> aber keine Dimerisierung, wahrscheinlich weil das MBP im Weg ist. Literaturdaten zeigen, dass ein Peptid aus der CC-Region von Occludin (humanes Occludin<sub>440-469</sub>, entspricht Maus-Occludin<sub>439-468</sub> sowie etwa der Helix Oc-CCa) verschiedene Proteine aus einem Zellextrakt von humanen T84-Zellen bindet. Unter den gefundenen Bindungspartnern waren neben ZO-1, Connexin26 auch Occludin selbst (Nusrat et al., 2000b), was ebenfalls für eine Dimerisierung spricht. Bei unseren SPR-Messungen ist

auch eine Wechselwirkung von ZO-1-Konstrukten untereinander beobachtet worden. Aufgrund dieser eigenen experimentellen Daten und den Literaturhinweisen sind Dimermodelle von Occludin und ZO-1 entwickelt worden.

#### **4.6. Komplementäre Interaktion der Dimermodelle von Occludin<sub>400-521</sub>/ZO-1<sub>518-806</sub> sowie der Monomermodelle von $\alpha$ -Catenin<sub>685-855</sub>/ZO-1<sub>518-806</sub>**

Die Dimermodelle von Occludin und ZO-1 weisen wie auch die Monomermodelle der VH3-Region von  $\alpha$ -Catenin und ZO-1 eine sehr gute Oberflächen- und Ladungskomplementarität auf. Das Dimer der C-terminalen CC-Domäne von Occludin und das Monomer von  $\alpha$ -Catenin<sub>685-855</sub> ähneln sich in bestimmten Struktureigenschaften, wie dem Aufbau aus Vierhelixbündeln mit partiellen CC-Motiven und hinsichtlich ihrer elektrostatischen Eigenschaften. Für die Dimermodelle von Occludin wird, wie schon beim Monomermodell, nur die zweite Hälfte des C-Terminus verwendet, die laut Sekundärstrukturvorhersagen aus  $\alpha$ -Helices besteht. Die helikale Neigung von Occludin<sub>406-521</sub> wurde durch unsere Cirkulardichroismus-Messungen bestätigt (Abb. 3.31). Die nicht im Modell berücksichtigte N-terminale Hälfte des zytosolischen C-Terminus von Occludin mit über 100 AS kann dabei jedoch immer noch als flexibler Linker dienen und sowohl eine parallele als auch eine antiparallele Anordnung der beiden Occludin-CC-Domänen im Dimer erlauben. Im parallelen Modell (Abb. 3.37) treffen allerdings die gleichgeladenen Enden der Occludine direkt aufeinander und erzeugen eine energetisch ungünstige Assoziation. Deshalb erscheint das antiparallele Dimermodell (Abb. 3.38) wahrscheinlicher. In diesem Strukturmodell sind die jeweils zwei langen und durch einen Turn verbundenen Helices der beiden Occludinmoleküle zu einem Vierhelixbündel auf der Basis einer Kristallstruktur aus einem Serin-Chemotaxis-Rezeptor (PDB: 1QU7) zusammengelagert. Das antiparallele Dimermodell zeichnet sich durch einen sehr langgestreckten sauren Bereich auf einer Seite der Moleküloberfläche aus, der nach Größe und komplementären Eigenschaften in Ladung und Oberflächenform gut geeignet ist, um zwei ZO-1-SH3-Hinge-GUK-Moleküle mit ihren basischen Bereichen zu binden (Abb. 3.41). Die Analyse der Bindung von ZO-1-Fragmenten an verkürzten Occludinkonstrukten ergibt als bestes Bindungsepitop den Bereich Occludin<sub>406-468</sub> oder Occludin<sub>406-488</sub>. Dies entspricht im Occludindimermodell den Helices der Einzelmoleküle (Ha, Hb, CCa und, wenn man bis AS 488 rechnet, CCb), die den sauren Bereich bilden. Von ihrer Form her passen zwei SH3-Hinge-GUK-Monomermodelle auch gut zusammen, um den benötigten langen basischen Bereich für die Bindung des Occludindimers zu bilden (Abb. 3.39). Ein Monomermodell des VH3-Bereichs von  $\alpha$ -Catenin ( $\alpha$ -Catenin<sub>685-855</sub>, Abb. 3.11.C,

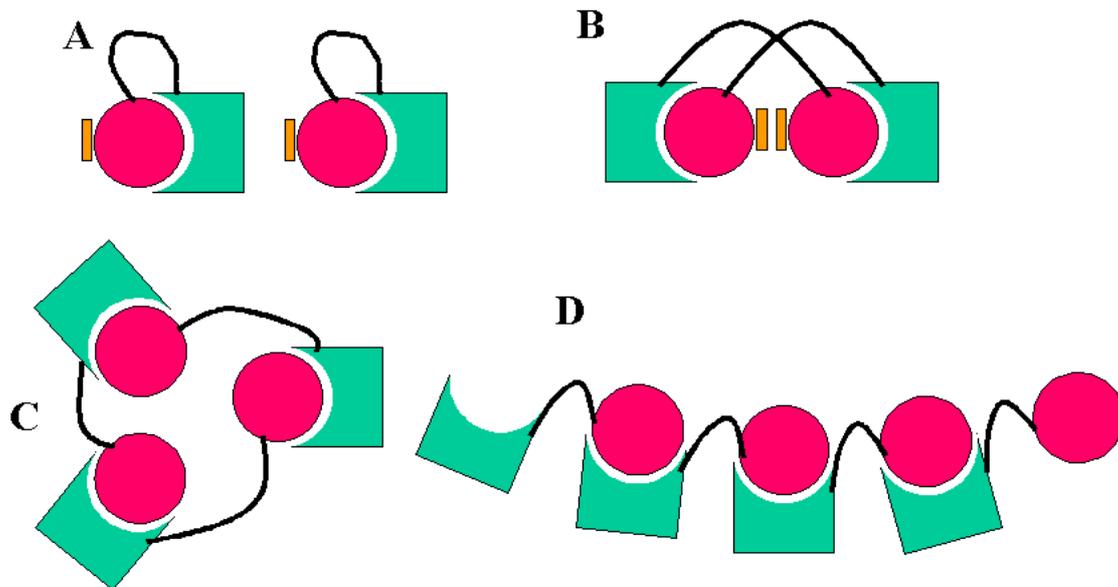
D) hat ein ähnliches elektrostatisches Potential wie das Occludindimermodell, mit einem großflächigen durchgehenden negativen Bereich auf einer Seite des Moleküls. Das  $\alpha$ -Catenin<sub>685-855</sub>-Modell ist kleiner und kürzer als das Occludindimermodell und passt größenmäßig und nach den komplementären Ladungsverteilungen und Oberflächenformen gut zum ZO-1-Monomer (Abb. 3.15). Laut unserer Daten vom Peptidmapping gibt es aber N-terminal von  $\alpha$ -Catenin<sub>685-855</sub> noch weitere Bereiche, die eine Bindung an ZO-1-Peptide aufweisen (Abb. 3.23). Auch sie sind hinsichtlich ihrer geladenen AS mehrheitlich negativ. Einige davon sind in der  $\alpha$ -Catenin<sub>509-630</sub>-Struktur enthalten, was ihre Tertiärstruktur sichtbar macht. Für das CC1 und H2 bindende Epitop  $\alpha$ -Catenin<sub>584-664</sub> ist die Faltung jedoch teilweise unklar, da der Bereich  $\alpha$ -Catenin<sub>631-684</sub> zwischen den beiden  $\alpha$ -Cateninmodellen  $\alpha$ -Catenin<sub>509-630</sub> und  $\alpha$ -Catenin<sub>685-855</sub> mangels ausreichender Strukturvorlagen nicht modelliert wurde. Im nativen Gesamtprotein ist dieser Bereich natürlich vorhanden und die darin durch Peptidmapping identifizierten ZO-1-Bindungsepitope müssen in die Vorstellungen zur  $\alpha$ -Catenin/ZO-1-Interaktion mit einbezogen werden. Zwischen den vorhandenen Teilmodellen  $\alpha$ -Catenin<sub>509-630</sub> und  $\alpha$ -Catenin<sub>685-855</sub> fehlen 54 AS und die längsten vorkommenden Helices haben 10 Windungen. Bei 3,6 AS pro Windung bilden die fehlenden AS wahrscheinlich eine Helix mit einigen in Turns enthaltenen AS. Stellt man sich die Teilmodelle zusammen mit den fehlenden AS vor, so ist der interagierende Bereich in  $\alpha$ -Catenin doch wieder zu groß, um zum ZO-1-Monomermodell zu passen. Das in den SPR-Experimenten verwendete größere Konstrukt  $\alpha$ -Catenin<sub>509-906</sub> könnte deshalb möglicherweise auch besser an ein ZO-1-Dimer als an ein ZO-1-Monomer binden.

In der Kristallstruktur des VH2-Bereichs von  $\alpha$ -Catenin liegt das Molekül als Dimer vor (Yang et al., 2001). Das zeigt, dass wahrscheinlich auch  $\alpha$ -Catenin Homodimere bildet, wobei in anderen Arbeiten die VH1-Region als Dimerisierungsbereich beschrieben ist (Pokutta und Weis, 2000). Yang et al., 2001 vermuten nach zusätzlichen Experimenten durch chemisches *crosslinking*, dass der Bereich des C-terminalen Vierhelixbündels ( $\alpha$ -Catenin<sub>509-630</sub>) durch diese Dimerisierung zur Zell-Zelladhäsion beiträgt, indem eine laterale Dimerisierung der assoziierten Cadherine induziert wird. Diese *adhesion-modulation-domain* von  $\alpha$ -Catenin ist in früheren Arbeiten beschrieben worden, wobei für eine starke Adhäsion auch noch die ZO-1-bindenden Bereiche, die den Kontakt zum Aktin-Zytoskelett herstellen, benötigt werden (Imamura et al., 1999). Es ist also möglich, dass *in vivo*  $\alpha$ -Catenin erst homodimerisiert und daran später ZO-1-Dimere binden. Für eine starke Adhäsion der AJ ist nicht nur die Verbindung der Zellmembranen benachbarter Zellen durch die Cadherine notwendig, sondern

die möglicherweise auftretenden Zug- und Druckkräfte müssen über das Zytoskelett der Zellen gleichmäßig im Gewebe verteilt werden, sonst würden die Zellen an den Membranen reißen (Hynes, 1999). Über die aktinbindende Region in ZO-1 (Fanning et al., 2002) wird ein Teil der Verbindung zwischen Junctionkomplex und Zytoskelett vermittelt.

#### **4.7. Analyse des vorgeschlagenen Interaktionsmodells von Occludin und ZO-1 und Vorstellung eines Oligomerisierungsmodells für ZO-1 mit Adaptorfunktion des Occludins**

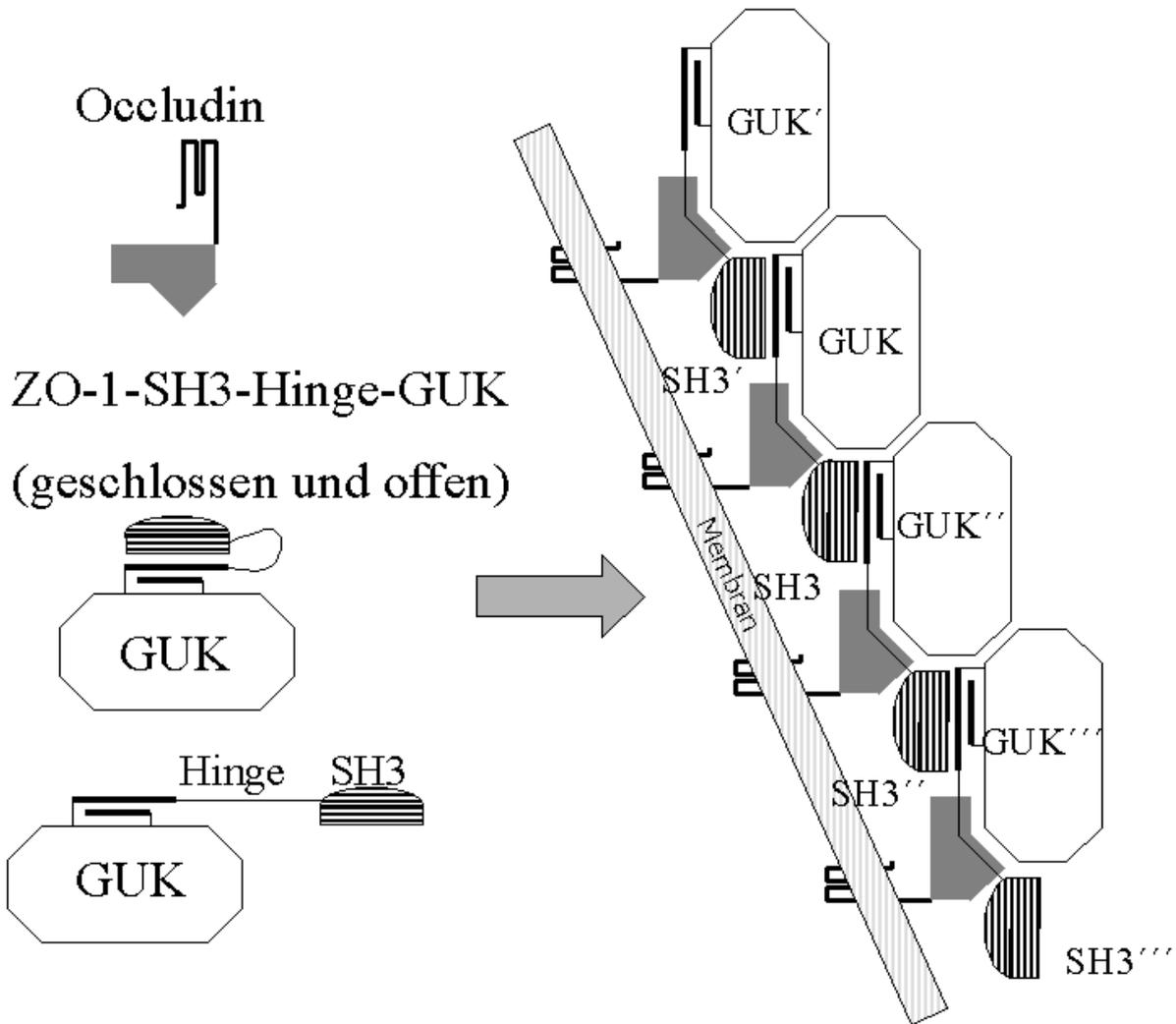
Entsprechend unserer Dimermodelle wird eine Interaktion vorgeschlagen, bei der die C-terminale CC-Domäne von Occludin (in Dimerform als Vierhelixbündel) als Adaptor für eine Oligomerisierung von ZO-1-SH3-Hinge-GUK fungiert. Der langgestreckte saure Bereich des Occludindimers findet seine Entsprechung in einem basischen Bereich von zwei zusammengelagerten SH3-Hinge-GUK-Einheiten, gebildet von ZO-1-CC1, -H1/H2 und ZO-1-CC1', -H1'/H2' (Abb. 3.40). Für das MAGUK-Protein PSD-95 wurde ein Domänenaustauschmechanismus (*domainswapping*) über eine Umlagerung der Hingeregion vorgeschlagen (McGee et al., 2001). Dabei werden Proteinstrukturbestandteile zwischen zwei oder mehr Proteinen ausgetauscht, um ein ineinander verflochtenes Oligomer zu bilden. Es gibt Beispiele, wo ganze Domänen aber auch nur einzelne Sekundärstrukturelemente, wie eine einzelne  $\alpha$ -Helix oder ein  $\beta$ -Strang aus einem gesamten  $\beta$ -Faltblatt ausgetauscht werden (Rousseau et al., 2003). Die umgelagerten Strukturbestandteile haben im Oligomer die gleiche Form und Interaktionspartner wie im Monomer und bilden das primäre Interface. Nur eine Hingeregion, welche die ausgetauschten Teile verbindet, ist im Oligomer meist langgestreckt, während sie im Monomer auf sich selbst zurückgefaltet ist. Durch die Oligomerisierung kommen auch die äußeren Teile der Monomere z.T. in Kontakt und bilden das sekundäre Interface (Abb. 4.1). Zwischen Monomer und Oligomer wird sich ein Gleichgewicht einstellen je nachdem, in welcher Konformation die Hingeregion und das sekundäre Interface energetisch günstiger vorliegen. Proline in der Hingeregion können z.B. für eine präferentielle Konformation und damit für einen bevorzugten Oligomerisierungsgrad sorgen (Rousseau et al., 2003). Die Bindung von sogenannten Adaptorproteinen an die Hingeregion und/oder das sekundäre Interface kann das Monomer-Oligomer-Gleichgewicht ebenfalls beeinflussen. Für das MAGUK-Protein PSD-95 ist als Auslöser für die Bildung von intermolekularen SH3-Hinge-GUK-Einheiten und damit von Di- oder Oligomerisierung die Bindung von Adaptorproteinen an die Hingeregion beschrieben (McGee et al., 2001).



**Abb. 4.1.** Grundprinzipien des *Domainswappings* mit beobachteten Varianten. **A)** Monomere mit den sich austauschenden Domänen in rot und grün, der Hingeregion als schwarze Linie und dem sekundären Interface in orange. **B)** Nach dem *Swapping* kommen die sekundären Interaktionsbereiche (orange) in Kontakt. **C)** Zyklisch geschlossenes Oligomer (hier ein Trimer, wie z.B. für Barnase beschrieben; Zegers et al., 1999). **D)** Schema zum Entstehen langer offener Oligomere.

Die sterische Anordnung der zwei Moleküle im SH3-Hinge-GUK-Dimermodell von ZO-1 dürfte ebenfalls zu einem Domänen austausch führen, der möglicherweise durch Bindung von Occludin als Adaptor ausgelöst werden könnte. Der basische Bereich aus ZO-1 (CC1, H1/H2) bleibt dabei in derselben Lage, während die SH3-Domäne unter konformationalen Änderungen in der Hingeregion durch die benachbarte SH3'-Domäne ersetzt wird. Durch weiteren Austausch von SH3' gegen SH3'' könnte sich so eine lineare Oligomerisierung von ZO-1 ergeben (als Schema in Abb. 4.2).

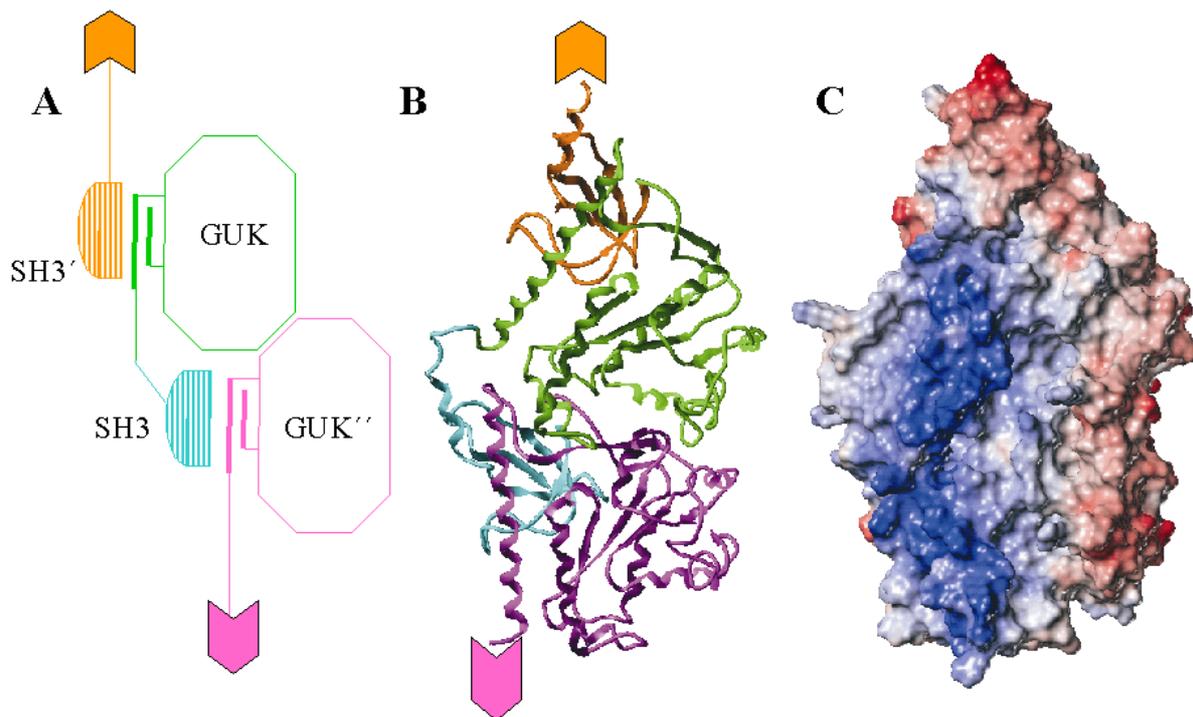
Bei dieser Oligomerisierung von ZO-1 treten neue Teile benachbarter GUK-Domänen in Kontakt, die als sekundärer Interaktionsbereich in Frage kommen. Dazu passen auch unsere SPR-Resultate einer Bindung von SH3-Hinge-GUK Konstrukten an sich selbst (Abb. 3.20). Es wurden jedoch auch Bindungen zwischen reinen GUK-Konstrukten oder Hinge-GUK-Konstrukten beobachtet, wobei die Bindung an das reine GUK-Konstrukt ZO-1<sub>644-812</sub> als Ligand sogar am besten war. In diesen Fällen kann kein Domänen austausch stattfinden, da die SH3-Domäne in den Konstrukten fehlt. Die Interaktion erfolgt hier möglicherweise über andere Bereiche der GUK-Struktur. Auf der anderen Seite des für die Occludin/ $\alpha$ -Catenin-Bindung wichtigen basischen Areals gibt es im ZO-1-GUK-Modell relativ saure Regionen. Die Oligomerisierung der GUK-Konstrukte läuft wahrscheinlich über diese elektrostatisch komplementären Bereiche ab. Um die prinzipielle Möglichkeit dieser offenen SH3-GUK-Konformation von ZO-1 zu zeigen, wurde ein entsprechendes Modell erzeugt (Abb. 4.3).



**Abb. 4.2.** Modellvorstellung, wie Occludin mit dem SH3-GUK-Bereich von ZO-1 interagieren könnte, um lange TJ-Stränge an der Zellmembran zu erzeugen.

Die wichtigsten Merkmale (besonders der lange basische Bereich an der Oberfläche) im Vergleich zum Modell des reinen Aneinanderlagerns zweier ZO-1-Monomere (Abb. 3.40) bleiben erhalten. An diese Region bindet das Adaptorprotein Occludin. Das *Swapping* bewirkt jedoch eine leichte Veränderung des Interaktionsbereiches wodurch andere Bindungseigenschaften und darüber eine Regulation dieses Prozesses zu vermuten sind. Ein Oligomerisierungsmechanismus über Domänenaustausch von SH3 und GUK ausgelöst durch die Bindung von Adaptorproteinen, könnte auch für andere MAGUK-Proteine funktionelle Bedeutung haben. Das ist erstmals durch Mutationsstudien und Strukturanalysen am MAGUK-Protein PSD-95 demonstriert worden. In der Kristallstruktur ist eine geschlossene intramolekulare Interaktion der SH3- und GUK-Domäne zu beobachten. Wurde die Hingeregion durch fünf Proline ersetzt, kann mit Größenausschlusschromatographie eine Dimerbildung nachgewiesen werden. Die Proline sorgen für eine gewisse Rigidität in der

Hingeregion, so dass die Dimerkonformation präferiert wird. Um auszuschließen, dass die Dimerisierung über eine SH3-Polyprolin-Interaktion erfolgt, wurden zusätzlich zu den Prolinen Glycine in die Hingeregion eingefügt. Eine SH3-Polyprolin-Wechselwirkung wäre jetzt immer noch möglich, aber es zeigen sich keine Dimere, d.h. die Dimerisierung beruht auf einem anderen Mechanismus.



**Abb. 4.3.** Offenes Dimermodell von ZO-1<sub>518-806</sub> mit Domänen austausch. **A)** Schema der beteiligten Domänen mit den Formen aus Abb. 4.2. Dabei ist ein vollständiges ZO-1-SH3-Hinge-GUK in offener Konformation dargestellt (GUK in Grün, SH3 in hellblau) und von den benachbarten ZO-1 Molekülen nur jeweils die SH3'-Domäne in orange (oben) und die GUK''-Domäne in magenta (unten). Die Interaktion über die  $\beta$ -Stränge A-D (in SH3) und E und F (links der GUK-Domänen als fette Linien dargestellt) erfolgt jetzt zwischen SH3' und GUK sowie SH3 und GUK''. Die Pfeile (orange bzw. magenta) veranschaulichen wo sich die nur mit je einer Domäne (hier SH3' bzw. GUK'') dargestellten ZO-1-Moleküle fortsetzen. **B)** Proteinrückraddarstellung des offenen Dimermodell von ZO-1<sub>518-806</sub> mit Einfärbung der Domänen wie im Schema A. **C)** Elektrostatische Potentialoberfläche des offenen ZO-1-Dimermodells (rot = negative Ladung; blau = positive Ladung).

Die Hingeregion steht also unter einer gewissen Anspannung, die entweder eine intra- oder intermolekulare Wechselwirkung favorisiert und durch Bindung eines Adaptorproteins (hier simuliert durch die Versteifung der Hingeregion in der Prolinmutante) beeinflusst werden kann (McGee et al., 2001). Die sequenzielle Anordnung der Domänen in den MAGUKs ist hoch konserviert (González-Mariscal et al., 2003). Deshalb können ähnliche SH3-Hinge-GUK-Einheiten auch für andere MAGUKs wie das hier untersuchte ZO-1 angenommen werden. Ein Sequenzvergleich vieler MAGUKs zeigt eine Konservierung der für die SH3-

GUK-Interaktion wichtigen  $\beta$ -Stränge E und F, während die Hingeregionen der verschiedenen MAGUKs in Länge und Sequenz stark variierten, und so sehr wahrscheinlich an die Bindung von jeweils selektiven Adaptorproteinen angepasst sind. Für einige MAGUKs ist schon eine Bindung potentieller Adaptorproteine an die Hingeregion beschrieben wie z.B. Calmodulin an SAP97 (Paarmann et al., 2002) sowie an SAP102 (Masuko et al., 1999) und Protein 4.1 an p55 (Marfatia et al., 1995). Das *Swapping* der SH3- und GUK-Domäne ist möglicherweise sogar ein Mechanismus, mit dem verschiedene MAGUK-Proteine oligomerisieren können. Dafür spricht, dass die GUK-Domäne von hCASK und die SH3-Domäne von Dlg im *yeast-two-hybrid*-System und Fusionsprotein-Bindungsassays interagieren. Daneben zeigen die SH3 und GUK-Domänen beider Proteine jedoch intrazelluläre Wechselwirkungen, die *in vitro* stärker als die intermolekularen Interaktionen sind (Nix et al., 2000). Diese intramolekularen Wechselwirkungen beruhen wahrscheinlich auch auf den  $\beta$ -Stranginteraktionen wie in der PSD-95-Struktur (McGee et al., 2001).

Die Stabilität der zweiten Hälfte des C-terminalen Teils von Occludin belegt auch eine kürzlich durchgeführte Studie mit partieller Proteolyse. Das gefundene stabile Produkt (humanes Occludin<sub>404-522</sub>) stimmt gut mit unserer ZO-1 bindenden CC-Domäne von murinem Occludin<sub>406-521</sub> überein. Bindungsdaten von Occludin<sub>404-522</sub> an ZO-2 weisen auf eine Interaktion von zwei oder mehr ZO-2 Molekülen mit Occludin hin, wobei zum Oligomerisierungsgrad des Occludins keine Angaben erfolgten (Peng et al., 2003).

Auch für die Interaktion von ZO-1 mit Cingulin wurde mit *GST-pull down*-Experimenten gezeigt, dass eine Dimerisierung über eine vorhergesagte CC-Sequenz in Cingulin für die richtige *in vivo* Lokalisation der Proteine notwendig ist (D'Atri et al., 2002). Occludin *knock out* Studien an Mäusen weisen mehr auf eine regulatorische Rolle und weniger auf eine strukturelle Rolle von Occludin hin. Es ergeben sich keine sichtbaren Änderungen in der Morphologie und den elektrophysiologischen Eigenschaften der TJ. Es wurde jedoch ein komplexer Phänotyp mit postnatalen Wachstumsverzögerungen und Anomalien in etlichen Geweben und im Sexualverhalten beobachtet. Ablagerungen von Kalziumphosphat im Gehirn und dünnere Knochen deuten auf eine Störung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stoffwechsel hin, im Blut und Urin konnten aber keine abweichenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Werte festgestellt werden. Die männlichen Occludin-(-/-)Tiere sind unfruchtbar. Das könnte an einer Störung der Blut-Testisbarriere liegen, obwohl die Spermatogenese normal war. Die weiblichen Occludin-(-/-)Tiere produzierten mit Wildtypmännchen normale Würfe, säugten die Jungen aber nicht, was zu neonatalem Tod führt. Alle diese Auswirkungen sind nur schlecht auf eine Wirkung der TJ zurückzuführen. Die Autoren vermuten, dass die Abwesenheit von Occludin, was ja z.T. hochphosphoryliert

ist, intrazelluläre Signalwege stört (Saitou et al., 2000). Eine Kolokalisation von Occludin mit VAP-33 könnte auf eine Rolle der TJ beim Fusionieren von Vesikeln mit der Plasmamembran hindeuten (Lapierre et al., 1999).

Ein Vergleich unserer mit Literaturdaten weist auf eine Wirkung von Occludin und  $\alpha$ -Catenin als Adaptorproteine für ZO-1 hin, die dort, wie schon für andere MAGUKs beschrieben, eine offene Konformation der SH3-Hinge-GUK-Einheit bewirken. Anschließend kommt es zum Domänen austausch, was eine lineare Di- oder Oligomerisierung der MAGUKs auslöst. Die von uns gemessene Oligomerisierung von ZO-1 unter eventueller Regulation von Occludin könnte zum besseren Verständnis der langgestreckten TJ-Stränge beitragen, die durch lineare Oligomerisierung von TJ assoziierten Proteinen gebildet werden. Die Adaptorproteine dienen wiederum als Ansatzpunkte für regulatorische Signale, welche die Zusammensetzung und Stärke von Zell-Zellkontakten kontrollieren (Pokutta und Weis, 2002). Der Nachweis der Bindung von ZO-1 an  $G_{\alpha 12}$  ist ein starker Hinweis, dass ZO-1 auch an G-Protein gesteuerten Prozessen beteiligt ist (Meyer et al., 2002).

Die AJ gehören ebenfalls zu den Zellkontaktstrukturen im apikalen Bereich der Zellmembranen von Epithelien und Endothelien. Die hier beschriebenen Helixbündel stellen offenbar einen gemeinsamen Interaktionsmechanismus für Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen Occludin/ZO-1 an TJ und ZO-1/ $\alpha$ -Catenin und  $\alpha$ -Catenin/ $\beta$ -Catenin an AJ dar.