

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Proteine der *Tight junctions* (TJ) und *Adherens junction* (AJ) insbesondere Occludin und  $\alpha$ -Catenin hinsichtlich ihrer Interaktion mit dem MAGUK Protein ZO-1 untersucht. Die TJ trennen verschiedene Milieus zwischen Geweben und grenzen apikale von basolateralen Membranbereichen ab. Etliche an den TJ beteiligte Proteine sind identifiziert, jedoch ihre genauen molekularen Interaktionsmechanismen und die Regulation durch mögliche Effektoren sind noch weitgehend unbekannt. Die bisher in der Literatur gewonnenen Daten des transmembranalen Proteins Occludin werfen besondere Widersprüche auf und seine genaue Rolle und Funktion ist immer noch unklar. Einerseits gibt es Hinweise für eine strukturelle Bedeutung in Überexpressionsexperimenten durch eine Erhöhung des transepithelialen elektrischen Widerstands oder Bildung von kurzen TJ-Strängen. Andererseits sprechen *knock out* Experimente in Mäusen eher für eine regulatorische Bedeutung, da die Tiere keine sichtbaren morphologischen Veränderungen der TJ, jedoch einen komplexen Phänotyp mit Wachstumsverzögerungen, chronischen Entzündungen und Fruchtbarkeitsstörungen zeigen. Der molekulare Mechanismus der Occludin-ZO-1-Wechselwirkung war unverstanden und wurde in dieser Arbeit näher untersucht. Die bisherigen Daten weisen auf eine Interaktion von Occludin im Bereich der SH3-GUK-Domänen von ZO-1 hin. Occludin nimmt dabei die Rolle eines Adaptors der ZO-1-Oligomerisierung ein, ähnlich dem für das MAGUK-Protein PSD-95 vorgeschlagenen Mechanismus. ZO-1 wiederum assoziiert auch mit dem AJ-Protein  $\alpha$ -Catenin, welches in den vermuteten Interaktionsbereichen eine Sequenzähnlichkeit zu Occludin aufweist. Daraus ergab sich eine erweiterte Arbeitshypothese vom gleichen molekularen Bindungsmechanismus von Occludin und  $\alpha$ -Catenin an ZO-1. Diese Hypothese wurde geprüft, um die Funktion und Regulation von TJ und AJ besser zu verstehen.

Das Besondere an dieser Arbeit ist die Verwendung verschiedener sich gegenseitig ergänzender Methodenkomplexe. Es werden die Bindungseigenschaften und -epitope der Proteine mit biophysikalischen und biochemischen Methoden (z.B. Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie, Peptidmapping) experimentell untersucht. Zusätzlich werden die dabei identifizierten Proteinsegmente mit bioinformatischen Methoden auf mögliche Bindungsmotive und Sekundärstrukturen analysiert. Die Resultate dienen zusammen mit den experimentellen Ergebnissen zur Erstellung von Homologiemodellen. Durch Vergleich dieser Modelle werden Hypothesen für daraus abgeleiteten Interaktionsmechanismen generiert, die dann mit entsprechend modifizierten Experimenten (z.B. mit neuen Deletionskonstrukten der Proteine) überprüft worden sind. Mit dieser iterativen Vorgehensweise können weitergehende

Struktur-Funktions-Informationen zu den Wechselwirkungen von Occludin und  $\alpha$ -Catenin mit ZO-1 gewonnen werden.

Es wurde Folgendes gezeigt:

- Am Anfang stand die wichtige Entdeckung von Coiled coil-(CC)-Vorhersagen in Occludin, ZO-1 sowie  $\alpha$ -Catenin, was ein erstes Indiz für eine gemeinsame Wechselwirkung ist. Aus identifizierten hohen Sequenzähnlichkeiten zwischen Occludin und  $\alpha$ -Catenin ist die Hypothese eines gemeinsamen Bindungsmechanismus an ZO-1 entwickelt worden.
- Durch Vergleich mit der bekannten Kristallstruktur des MAGUK-Proteins PSD-95 sowie den Sequenzen von vielen weiteren MAGUK-Proteinen wurde ein Homologiemodell des SH3-Hinge-GUK-Bereiches von ZO-1 erzeugt. Basierend auf einer  $\alpha$ -Catenin-Kristallstruktur ist ein Monomermodell des C-Terminus von Occludin erstellt worden. Aufgrund der Modelle wurden die Grenzen von Deletionsmutanten ausgewählt.
- ZO-1 interagiert über dieselbe Bindungsstelle sowohl mit Occludin als auch mit  $\alpha$ -Catenin, wobei aufgrund der homologen Strukturmodelle das an ZO-1 bindende Protein jeweils als eine Vierhelixbündelstruktur mit partiellem CC-Anteil vorliegt.
- Mit SPR-Messungen finden wir als das am besten an Occludin und  $\alpha$ -Catenin bindende ZO-1-Konstrukt ZO-1<sub>589-772</sub>, was die Hinge-GUK-Region von ZO-1 ohne den CC2-Bereich umfasst.
- Mit Peptidmappingstudien werden die interagierenden ZO-1-Epitope auf die CC1-Helix in der Hingeregion und die  $\alpha$ -Helices H1/H2 in der GUK-Domäne weiter eingegrenzt. In den ZO-1-Modellen liegen diese Epitope in einem zusammenhängenden Bereich mit einem Überschuss an basischen Ladungen an der Moleküloberfläche.
- Der an ZO-1 bindende Bereich vom Occludin wurde innerhalb der C-terminalen Hälfte des zytosolischen C-Terminus weiter studiert (Maus-Occludin<sub>406-521</sub>). Dieser Bereich bildet eine Helixstruktur (CD-Spektroskopie und Modellen) und ist laut Literatur stabil gegenüber partieller Proteolyse. Mittels Experimenten mit weiter verkürzten Konstrukten konnten die Bindungsbereiche auf die CC-Helices CCa/CCb (mit einem Überschuss an sauren Ladungen) eingegrenzt werden.
- Größenausschlusschromatographie und Lichtstreuungsexperimente ergeben eine Dimerisierung der Occludin CC-Domäne, während SPR-Daten auf eine ZO-1-Oligomerisierung hinweisen. Entsprechend dieser Daten entwickelte Dimermodelle von Occludin und ZO-1 zeigen eine bessere Komplementarität (mit jeweils langgestrecktem sauren bzw. basischen Oberflächenbereich) von Moleküloberflächen und Ladungen zueinander als die Monomere

(Abb. 3.41). Hingegen komplementieren sich bei  $\alpha$ -Catenin und ZO-1 die Monomere besser (Abb. 3.15).

- Occludin kann die Rolle eines Adaptors der ZO-1-Oligomerisierung mit *domainswapping* von SH3- und GUK-Domäne spielen. Es ist möglich, dass ein solcher Adaptormechanismus und eine funktionelle Einheit von SH3 und GUK für alle MAGUKs bedeutsam sind, wie schon für PSD-95 beschrieben. Literaturdaten von anderen MAGUK-Proteinen bestätigen die wichtige Rolle der Hingeregion, in welcher verschiedene Splicevarianten und Phosphorylierungsstellen, sowie Bindung von Regulatorproteine (z.B. Calmodulin) identifiziert worden sind.
- Für die ZO-1- $\alpha$ -Catenin-Interaktion war bisher nur grob gezeigt worden, dass die erste Hälfte von ZO-1 an die zweite Hälfte  $\alpha$ -Catenin bindet. In dieser Arbeit wird der Interaktionsbereich in ZO-1 auf die SH3-Hinge-GUK-Einheit und in  $\alpha$ -Catenin auf bestimmte Peptidepitope eingegrenzt.

Das Verständnis der molekularen Regulationsprozesse an TJ ist essentiell für die Entwicklung neuer Ansätze zur Behandlung von Krankheiten, in denen die TJ gestört sind. Es wäre z.B. hilfreich zum Einschleusen von lipidunlöslichen Medikamenten (wie gegen Tumore) in das Gehirn, die TJ der Blut-Hirnschranke kurzzeitig öffnen zu können. Hingegen würden die Folgen etwa von Schlaganfällen und anderer Krankheiten, welche die zu einer Öffnung der TJ und damit zum Eindringen schädlicher Substanzen in das Gehirn führen, durch ein schnelles Schließen der TJ abgeschwächt werden. ZO-1 ist ein wichtiges Gerüstprotein an TJ. Es wird ein Oligomerisierungsmechanismus der ZO-1-SH3-Hinge-GUK-Region vorgeschlagen, bei der Occludin als Adaptor der Hinge fungiert, der bei Interaktion zu räumlichen Umlagerungen von SH3-Hinge-GUK führt. Diese hier beschriebenen ZO-1-Oligomerisierungsprozesse können helfen, die Bildung von zellumspannenden TJ-Strängen zu erklären, und damit zu einem besseren Verständnis der Funktion und Regulation der TJ und AJ beitragen.