

4 Diskussion

4.1 Claudin-Claudin-Interaktionen

Auf Grundlage eines Modells der homophilen und heterophilen Interaktion von Claudinen in den TJs (Furuse *et al.* 1999) wurde in dieser Arbeit erstmals für Claudine ein *cis*- und *trans*-Interaktionsmodell entwickelt (Abb. 1.4). Sequenzabschnitte und molekulare Determinanten der Claudine, die für die *cis*- und *trans*-Interaktion sowie für die Cld-Strangbildung essentiell sind, wurden bisher nicht identifiziert.

Da sich in den TJs die extrazellulären Schleifen von Claudinen benachbarter Zellen sehr nahe kommen, ist eine Beteiligung der extrazellulären Schleifen an der *trans*-Interaktion anzunehmen. Interaktionen von extrazellulären Schleifen wurden auch für die Connexine (ein weiteres vier Transmembransegmente umfassendes Protein) der *Gap junctions* beschrieben (Unger *et al.*, 1999). Zudem konnte durch proteinkristallografische Studien gezeigt werden, dass die extrazellulären Domänen des intramembranösen TJ-Proteins JAM-A durch hydrophobe und ionische Wechselwirkungen dimerisieren (Prota *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit wurden zuerst direkte Cld-Interaktionen rekombinanter Fusionsproteine von Cld3 und Cld5 analysiert, mit konträren Ergebnissen. Mit gereinigten MBP-Fusionsproteinen der 2.EZS von Cld3 und Cld5 lassen sich durch Größenausschlusschromatographie homophile Interaktionen nachweisen, die für MBP allein nicht zu beobachten sind. Dabei sind neben Monomeren und Dimeren, geringe Mengen Tetramere nachweisbar. Das experimentell bestimmte Molekulargewicht der MBP-Cld-Monomere ist bis zu 12 % geringer als deren theoretisches Molekulargewicht. Da jedoch auch das experimentell ermittelte Molekulargewicht von MBP im Durchschnitt 13 % kleiner ist als das theoretische, ist ein apparentes Laufverhalten wahrscheinliche Ursache. Im Gegensatz dazu zeigt ein synthetisiertes Cld5-Peptid der 2.EZS keine homophile Interaktion in der Größenausschlusschromatographie. Möglicherweise unterscheiden sich Peptid und rekombinantes Protein in ihrer Konformation, welche im Peptid die Bindung beeinträchtigt. Es lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass die Oligomere durch unspezifische Interaktionen zwischen dem MBP eines MBP-Cld-Moleküls mit dem Cld-Fragment der 2.EZS eines weiteren MBP-Cld-Moleküls entstehen. Allerdings unterstützt MBP die native Faltung des Fusionspartners und fördert die Löslichkeit von Peptiden (Kapust und Waugh, 1999).

4.1.1 HEK-293-Zellen als Zellkultursystem für Claudin-Claudin-Interaktionen

Um die Problematik der Analyse der Cld-Interaktionen mit isolierten Fragmenten der 2.EZS *in vitro* zu umgehen, wurde eine Strategie zur Analyse von Claudinen im zellulären System

entwickelt. Der erste Schritt dieser Strategie umfasste die Etablierung eines geeigneten Zellkultursystems. Eine Reihe von Studien untersuchte die Effekte von exogen exprimierten Claudinen auf epitheliale Zellen (z. B. MDCK-I, MDCK-II und LLC-PK1, Tab. 1.1). In diesen Zelllinien ist eine Untersuchung der homo- und heterophilen Interaktionen einzelner Claudine aufgrund des Vorhandenseins endogener Claudine schwierig. Daher wurden in dieser Arbeit TJ-lose HEK-293-Zellen für die Analyse von homophilen Cld3- und Cld5-Interaktionen verwendet. Um sicher zu gehen, dass HEK-293-Zellen keine TJs ausbilden, wurden diese Zellen in Bezug auf TJs in dieser Arbeit näher charakterisiert. In nicht transfizierten HEK-293-Zellen finden sich in gefrierbruchelektronenmikroskopischen Aufnahmen keine TJ-Stränge (persönliche Mitteilung, Dr. Hartwig Wolburg, Universität Tübingen). Darüber hinaus ist keine endogene Expression von Cld1 bis Cld5 in HEK-293-Zellen durch Immunfluoreszenzfärbungen festzustellen. Daher scheint die Analyse von homophilen Cld3- oder Cld5-Interaktionen frei vom interferierenden Einfluss endogener Claudine möglich. Zudem wurden HEK-293-Zellen bereits als Zellkultursystem für TJ-Proteine verwendet. Dabei konnte nach exogener Expression homophile *trans*-Interaktion von Cld6 nachgewiesen werden, während die endogene Expression von Cld6 nicht detektiert werden konnte (Turksen *et al.*, 2001). Die *trans*-Interaktion von Cld3 oder Cld5 mit YFP- oder CFP-Fusionen am C-Terminus lässt sich in HEK-293-Zellen durch die Anreicherung an Cld-Kontakte bestimmen, wie es zuvor bereits für andere TJ-lose Zellkultursysteme (COS-7-Zellen, NIH-3T3 und Maus-L-Fibroblasten) beschrieben wurde (Tab. 1.2). Außerdem bilden Cld5- oder Cld5-YFP-exprimierende HEK-293-Zellen (diese Arbeit) und Cld5-exprimierende Maus-L-Fibroblasten (Morita *et al.*, 1999c) diskontinuierliche, E-*face* assoziierte TJ-Stränge. Durch Cld1 gebildete TJ-Stränge sind in HEK-293-Zellen wie auch in Maus-L-Fibroblasten (Furuse *et al.*, 1999, Sonoda *et al.*, 1999) kontinuierlich und P-*face* assoziiert.

In vorangegangenen Studien diente die Cld-Strangbildung als indirekter Nachweis für *cis*-Interaktionen (Furuse *et al.*, 1999). Offen dabei ist jedoch, ob Claudine innerhalb der Stränge wirklich direkt miteinander interagieren. In dieser Arbeit wurde daher die FRET-Methode etabliert, mit welcher *cis*-Interaktionen von der Strangbildung getrennt analysierbar sind. Die direkte homophile *cis*-Interaktion von Claudinen in der Plasmamembran wurde hier erstmals am Beispiel von Cld5 durch FRET nachgewiesen.

Anzumerken ist, dass immunzytochemische Färbungen auf eine schwache, endogene Expression der TJ-Proteine Occ und ZO-1 in HEK-293-Zellen deutet. Die Expression von endogenem ZO-1 in HEK-293-Zellen wurde bereits zuvor beschrieben (Toyofuku *et al.*, 1998) und kompliziert die Analyse der Cld-Interaktionen, da ZO-1 mit dem C-Terminus der

Claudine interagiert (Itoh *et al.*, 1999). In den mikroskopischen Beobachtungen dieser Arbeit wurde endogenes ZO-1 teilweise an Zell-Zell-Kontakten gefunden und zeigte gelegentlich eine partielle Kollokalisierung mit Cld5-YFP. Allerdings war der C-Terminus der Claudine in den zu analysierenden Cld-Konstrukten durch eine CFP- oder YFP-Fusion blockiert. Eine Interaktion der YFP- und CFP-Fusionsproteine von Cld3 und Cld5 mit endogenem ZO-1 ist daher nicht anzunehmen. Auch Maus-L-Fibroblasten, die häufig für die Analyse von Cld-Cld-Interaktionen verwendet werden, exprimieren endogenes ZO-1, das sehr wahrscheinlich nicht mit exogen exprimiertem Cld1-GFP interagiert (Sasaki *et al.*, 2003).

Nach Transfektion von HEK-293-Zellen mit Cld5-YFP koloalisieren Cld5 und endogenes Occ an Zell-Zell-Kontakten zwischen zwei Cld-exprimierenden Zellen. Occ zeigt dabei eine verstärkte Anreicherung an Zell-Zell-Kontakten zwischen Zellen, die Cld5-YFP exprimieren (Abb. 3.4). Eine Inkorporation von Occ in Cld5-YFP-Stränge ist daher anzunehmen, zumal sich auch heteropolymere Cld1/Occ-Stränge nach exogener Expression in TJ-losen Fibroblasten bilden (Furuse *et al.*, 1998b). Eine *cis*-Interaktion zwischen endogenem Occ und transfizierten Claudinen ist somit nicht auszuschließen. Zumal eine Wechselwirkung zwischen Occ und Cld1 bereits beschrieben wurde (Nusrat *et al.* 2005). Hingegen deutet nichts auf eine *trans*-Interaktion zwischen Occ und Cld3 oder Cld5, da Cld-exprimierende Zellen keine Anreicherung an Zell-Zell-Kontakten zwischen einer Cld-exprimierenden und einer nicht Cld-exprimierenden Zelle zeigen. Occ beeinflusst nicht die Cld1-Strangmorphologie, wie Koexpressionen von Cld1 und Occ im Vergleich zu Cld1-Einzeltransfektanden in Maus-L-Fibroblasten belegen (Furuse *et al.*, 1998b). Zudem unterscheidet sich die Anreicherung an Cld5-Kontakte und die Cld5-Strangmorphologie in Occ-exprimierenden HEK-293-Zellen (diese Studie) optisch nicht von denen in Occ-losen Maus-Fibroblasten-Zelllinien (Morita *et al.*, 1999c; Coyne *et al.*, 2003).

4.1.2 Die zweite extrazelluläre Schleife: Essentiell für *trans*-Interaktionen

In dieser Studie wurden erstmals Aminosäuren identifiziert, die für die homophile *trans*-Interaktion und die Strangbildung in Claudinen wesentlich sind. Dazu wurden systematische Aminosäuresubstitutionen in Cld5-YFP-Konstrukten im vorhergesagten Sequenzabschnitt der 2.EZS vorgenommen (Abb. 1.3, Abb. 4.2). Nach der Expression in HEK-293-Zellen zeigen diese generierten Mutanten drei verschiedene Phänotypen. Mutanten vom TJ-Typ sind nicht in der *cis*- und *trans*-Interaktion sowie der Strangbildung und Strangmorphologie gestört. Mutanten des *disjunction*-Typs sind zur *cis*-Interaktion befähigt, zeigen aber keine *trans*-Interaktion mehr und keine oder nur sehr wenige Cld-Stränge. Die Mutanten von

intrazellulärem Typ akkumulieren, möglicherweise durch Falschfaltung von Cld5 ausgelöst, intrazellulär. Die Tabelle 4.1 fasst diese Mutanten und ihre Phänotypen zusammen.

P150A zeigt einen intermediären Phänotyp und ist dem TJ-Typ zugeordnet, akkumuliert aber aufgrund weniger stark ausgeprägter Faltungsdefizite verstärkt intrazellulär. Die Y158A-Mutante weist ebenfalls einen intermediären Phänotyp auf, da sie sehr schwach an Cld5-Kontakten angereichert und homogen in der Plasmamembran verteilt ist, in vielen Zellen aber

Tab. 4.1: Effekte verschiedener Aminosäuresubstitutionen in Claudin-5 und Claudin-3 auf die subzelluläre Lokalisation, *trans*-, *cis*-Interaktion und Strangbildung

Aminosäure-substitutionen	Lokalisation	<i>trans</i> -Interaktion	<i>cis</i> -Interaktion	Strangbildung
Claudin-5				
wt	Cld5-Kontakt	+	+	+
R145A	Cld5-Kontakt	(+)	+	+
R145Q	Cld5-Kontakt	+	+	+
E146N	Cld5-Kontakt	+	+	+
D149N	Cld5-Kontakt	+	+	+
P150A	intrazellulär und Cld5-Kontakt	(+)	+	(+)
T151A	Cld5-Kontakt	+	n. a.	n. a.
V154A	Cld5-Kontakt	+	n. a.	n. a.
S155A	Cld5-Kontakt	+	+	n. a.
Q156A	Cld5-Kontakt	+	+	+
Q44N	Plasmamembran	-	n. a.	n. a.
F147A	Plasmamembran	-	+	-
Y148A	Plasmamembran	-	+	-(+)
Q156E	Plasmamembran	-	+	n. a.
Y158A	intrazellulär und Plasmamembran	(+)	(+)	(+)
E159Q	Plasmamembran	-	+	-(+)
L50Q/W51R	intrazellulär	n. b.	n. b.	n. a.
E146A	intrazellulär	n. b.	n. b.	n. a.
Y148L	intrazellulär	n. b.	n. b.	n. a.
D149A	intrazellulär	n. b.	n. b.	n. a.
V152A	intrazellulär	n. b.	n. b.	-
P153A	(intrazellulär)	n. b.	n. b.	-(+)
K157A	intrazellulär	n. b.	n. b.	n. a.
K157M	intrazellulär	n. b.	n. b.	n. a.
E159A	intrazellulär	n. b.	n. b.	n. a.
L160A	intrazellulär	n. b.	n. b.	n. a.
A163G/A185T	intrazellulär	n. b.	n. b.	n. a.
Cld5₁₋₁₂₃	intrazellulär	n. b.	n. b.	n. a.
Cld5₁₀₃₋₂₁₉	intrazellulär	n. b.	n. b.	n. a.
Claudin-3				
wt	Cld3-Kontakt	+	n. a.	n. a.
N148A	Cld3-Kontakt	+	n. a.	n. a.
N148D	Cld3-Kontakt	+	n. a.	n. a.

Die Tabelle fasst alle phänotypischen Beobachtungen der Mutanten zusammen. Die Lokalisation wurde durch Lebendzellfärbungen und Zelloberflächenbiotinylierung bestimmt; die *trans*-Interaktion wurde durch Cld5-Kontaktanreicherung demonstriert; *cis*-Interaktion durch die FRET-Methode und Strangbildung durch Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie untersucht. Grüne Buchstaben: Mutanten vom TJ-Typ; blaue Buchstaben: *disjunction*-Typ; rote Buchstaben: intrazellulärer Typ. +: Wildtyp ähnlich; (+): reduziert; -(+): sehr stark reduziert; -: unterdrückt; n. b.: nicht analysierbar; n. a.: nicht analysiert.

verstärkt intrazellulär akkumuliert. Für den Vergleich homophiler Interaktionen verschiedener Mutanten mit der homophilen Interaktion von Cld5_{wt}-YFP ist die Menge an Cld-Molekülen in der Plasmamembran entscheidend. Die Cld5-Menge in der Plasmamembran ist durch Zelloberflächenbiotinylierung und konfokale Mikroskopie quantifiziert worden. Der Vergleich von Mutanten des *disjunction*-Typs und des TJ-Typs mit Cld5_{wt}-YFP belegt für beide Phänotypen in beiden Methoden eine ähnlich große Cld5-Menge in der Plasmamembran. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die entsprechende Aminosäuresubstitution direkt die *trans*-Interaktion blockiert, ohne den Transport in die Plasmamembran zu beeinträchtigen. Hingegen beeinflussen weder die Aminosäuresubstitutionen der Mutanten des TJ-Typs noch die des *disjunction*-Typs die homophilen *cis*-Interaktionen an Cld5-Kontakten, wie die FRET-Analysen belegen.

Für die Mutanten des intrazellulären Typs ist aufgrund der stark verringerten bzw. nicht nachweisbaren Menge in der Plasmamembran im Vergleich zum Wildtyp keine Aussage über die Fähigkeit zur *cis*- und *trans*-Interaktion sowie Strangbildung möglich. Die Lokalisation von Cld5_{P153A}-YFP ist nicht eindeutig, da die Mutante in der Lebendzellfärbung optisch nicht in der Plasmamembran zu detektieren ist, jedoch nach der Quantifikation der Kolo­kalisierung mit der Plasmamembran ähnlich dem Wildtyp lokalisiert. Da die Zelloberflächenbiotinylierung ebenfalls nur eine geringe Menge in der Plasmamembran ergibt, wird diese Mutante dem intrazellulären Phänotyp zugeordnet. Die niedrigeren FRET-Effizienzen der Intrazellulärtyp-Mutanten, die ein Maß für die *cis*-Interaktion darstellen, lassen sich aufgrund der geringeren Menge an Cld-Molekülen in den Cld-Kontakten nicht quantitativ mit dem Wildtyp vergleichen. Trotzdem zeigen die Intrazellulärtyp-Mutanten an Cld5-Kontakten eine höhere relative FRET-Effizienz als die Negativkontrollen. Das deutet auf die Fähigkeit dieser Mutanten zur *cis*-Interaktion hin. Zusammenge­nommen liefern die Resultate deutliche Anhaltspunkte, dass die 2.EZS von Cld5 nicht primär an der *cis*-Interaktion beteiligt ist.

Die Kolo­kalisierung der Mutanten des intrazellulären Typs mit einem Marker für das endoplasmatische Retikulum (ER) belegt die hauptsächliche Akkumulation dieser Mutanten im ER. Dies trifft eingeschränkt auch auf die Intermediärtypen (Cld5_{P150A}, Cld5_{Y158A}) zu, die deutlich stärker mit dem ER-Marker kolo­kalisieren als Mutanten von TJ- und *disjunction*-Typ. Das unterstützt die Annahme, dass Aminosäuresubstitutionen des Intrazellulärtyps Fehlfaltungen in Cld5 bewirken, die zum Verbleib im ER führen, was häufig für fehlgefaltete Proteine beobachtet wird (Bross *et al.*, 1999).

Die intrazelluläre Akkumulation, wie sie für einige Cld5-Mutanten der 2.EZS zu finden ist, wurde auch für einige Mutationen in beiden extrazellulären Schleifen und Transmembransegmenten von Cld16 (Hou *et al.*, 2005) und den *Gap junctions*-bildenden Connexinen (Deschenes *et al.*, 1997) beobachtet. Einige zusätzlich generierte Mutanten dieser Arbeit beinhalten ebenfalls Mutationen in der ersten 1.EZS von Cld5 und in den Transmembransegmenten. Die Mutante Cld5_{L50Q/W51R} lokalisiert nach Expression in HEK-293-Zellen intrazellulär, wie auch Cld5_{A163G/A185T}. Die zweite Mutante der 1.EZS von Cld5 generiert ein N-Glykosilierungssequenzmotiv (Cld5_{Q44N}), dessen Glykosylierung nach der Expression in HEK-293-Zellen im Immunoblot durch einen Bandenshift zu erkennen ist (Abb. 3.11). Dabei lässt sich die Glykosylierungsmutante sogar stärker als der Wildtyp in der Plasmamembran detektieren. Die *trans*-Interaktion ist, vermutlich durch die sterische Behinderung der Zuckerkette, gestört. In MDCK-II-Zellen lokalisieren die Glykosylierungsmutante und die Mutante des Intrazellulärtyps (L50Q/W51R) in der Plasmamembran in den TJs. Die Glykosylierungsmutante kolokalisiert allerdings nur teilweise mit ZO-1 und beeinträchtigt die Abdichtungsfunktion von Cld5 (Wen *et al.*, 2004). Da MDCK-II-Zellen eine Reihe von endogenen Claudinen (Cld1, Cld2, Cld4 und Cld7) exprimieren (Hou *et al.*, 2006), könnte die Plasmamembranlokalisierung von Cld5_{Q44N} und Cld5_{L50Q/W51R} durch den Einfluss der heterophilen *cis*-Interaktionen in MDCK-Zellen unterstützt werden. Auch diese Studie zeigt, dass die Koexpression von Cld5_{wt}-YFP und einer Mutante des intrazellulären Typs (Cld5_{Y148L}) in HEK-293-Zellen die Anreicherung an Cld5-Kontakten fördern kann (Abb. 3.10). Das gilt allerdings nicht für die Intrazellulärtyp-Mutante Cld5_{D149A}. Möglicherweise ist der Grad der Falschfaltung der Intrazellulärtyp-Mutanten unterschiedlich stark.

Eine Beteiligung der 1.EZS von Cld5 an der *trans*-Interaktion von Cld5 ist aufgrund o. g. Experimente anzunehmen. Da *cis*-Interaktion und Strangmorphologie der 1.EZS-Mutanten nicht untersucht wurden, kann eine Beteiligung der 1.EZS an beiden Eigenschaften nicht ausgeschlossen werden. In der Literatur existiert bisher jedoch kein Beleg für eine homophile oder heterophile Interaktion der 1.EZS mit Claudinen.

Für Cld3_{wt} und die Mutanten Cld3_{N148A} und Cld3_{N148D} wurde in dieser Arbeit eine *trans*-Interaktion nachgewiesen. Interessanterweise konnte nach Expression der drei Cld3-Konstrukte in HEK-293-Zellen keine Trypanblaufluoreszenz in der Plasmamembran im Bereich der Cld-Kontakte beobachtet werden, wenn die Zellen in der Lebendzellfärbung mit Trypanblau behandelt wurden. Trypanblau bindet durch freie, saure Reste an positive Ladungen von Proteinen der Zelloberfläche (Dr. Burkhard Wiesner, persönliche Mitteilung)

und wurde bereits verwendet, um Plasmamembranen sichtbar zu machen (Wuller *et al.*, 2004). Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf die dichtere Packung von Cld3 in den Cld3-Kontakten im Vergleich zu Cld5 in den Cld5-Kontakten. Cld3 bildet kontinuierliche, intramembranöse Stränge (Furuse *et al.*, 1999), während Cld5-Stränge diskontinuierlich sind (Morita *et al.*, 1999c). Möglicherweise kann der Farbstoff dadurch leichter in die Cld5-Kontakte als in die Cld3-Kontakte eindringen.

4.1.3 *Tight junction-Strangbildung durch Claudin-5*

Die Analyse der Mutanten der 2.EZS von Cld5 durch Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie belegt, dass die *trans*-Interaktion notwendige Voraussetzung für die Bildung von intramembranösen Cld5-Strängen ist. Nur die Mutanten des TJ-Typs sowie Cld5_{wt} bilden diskontinuierliche, *E-face* assoziierte Stränge ähnlicher Anzahl und mit vergleichbarem Verzweigungsgrad, nicht hingegen Mutanten des *disjunction*- oder Intrazellulärtyps. Das ist überraschend, da die *disjunction*-Typ Mutanten (F147A, Y148A, E159Q und Y158A) zur *cis*-Interaktion befähigt sind (Abb. 3.15). Da die Strangmorphologie der Mutanten vom TJ-Typ nicht wesentlich von der Morphologie der TJ-Stränge des Wildtyps abweicht, ist bewiesen, dass Mutationen in der 2.EZS von Cld5 keinen Einfluss auf die Strangmorphologie haben, sofern *trans*-Interaktion, Faltung und Plasmamembranlokalisation korrekt sind. Das wurde auch für Cld2- und Cld4-Chimären nach Expression in MDCK-II-Zellen gezeigt, bei denen die extrazellulären Schleifen gegeneinander ausgetauscht wurden (Colegio *et al.*, 2003).

Claudine prägen das Erscheinungsbild der Cld-Stränge, wie nach Einzeltransfektionen in TJ-losen Zellen zu beobachten ist. Dabei lassen sich die TJ-Stränge in kontinuierliche *P-face* assoziierte Stränge (Cld1, Cld3 und Cld19) oder diskontinuierliche *E-/P-face* assoziierte Stränge (Cld2, Cld6, Cld9 und Cld11) bzw. diskontinuierliche *E-face* assoziierte Stränge (Cld5) einteilen (Tab. 1.2), wie sich für Cld1 und Cld5 in HEK-293-Zellen in dieser Studie bestätigen lässt. Koexpressionen von Claudinen ergeben heteropolymere Cld-Stränge mit intermediärer Morphologie (Furuse *et al.*, 1999; Coyne *et al.*, 2003), während durch Koexpression von Occ und Cld1 in Maus-L-Fibroblasten heteropolymere Stränge gebildet werden, deren Morphologie von Occ unbeeinflusst ist (Furuse *et al.*, 1998b). Die molekulare Ursache der unterschiedlichen Morphologie der Cld-Stränge ist bisher ungeklärt. Die Morphologie der Cld-Stränge wirkt sich aber auf die Barrierefunktion aus, da Kontinuität und *P-face*-Assoziation der TJ-stränge mit der Barriereintegrität korrelieren (Wolburg *et al.*, 1994; Liebner *et al.*, 2000). Interessanterweise zeigen auch die wenigen beobachteten Cld5-Stränge der Mutanten Y148A, P153A und E159Q gesteigerte *P-face*-Assoziation. Alle drei Mutanten

zeigen keine *trans*-Interaktion. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Assoziation von Cld5-Partikeln mit den Plasmamembranhälften zumindest teilweise mit der Stärke der *trans*-Interaktion zusammenhängt. Andererseits wurde angenommen, dass eine starke *P-face* Assoziation mit einer starken Verankerung der Claudine mit dem Zytoskelett zusammenhängt (Liebner *et al.*, 2000). In den für die Gefrierbruchstudien verwendeten Cld5-YFP-Konstrukten ist jedoch die durch ZO-1 vermittelte Verknüpfung der Claudine mit dem Zytoskelett unterbunden. Daher ist die Verankerung mit dem Zytoskelett wahrscheinlich nicht die Ursache für die beobachteten Unterschiede in der *P-face* Assoziation.

4.1.4 Molekulares Modell der homophilen Interaktion der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5

Das molekulare Monomermodell der 2.EZS von Cld5 (Abb. 2.2) basiert auf der hohen Sequenzhomologie zu der Proteinstruktur 2BDV, deren Helix-*turn*-Helix Strukturmotiv auf die 2.EZS von Cld5 übertragbar ist. In dem Modell wird die *turn*-Konformation zwischen den beiden Helices durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen, die beiden Proline (P150 und P153) und hydrophobe Seitenketteninteraktionen (zwischen V152 und L160) stabilisiert. Alanin-Mutationen an diesen Aminosäurepositionen bewirken eine intrazelluläre Lokalisation der Mutanten in HEK-293-Zellen aufgrund von Faltungsdefekten, die dieses Stabilisierungsmuster stören. Aufgrund der zyklischen Struktur der Prolin-Seitenketten besitzen diese Aminosäuren eine eingeschränkte Rückgratkonformation, die geeignet ist, *turn*-Strukturen zu bilden (MacArthur und Thornton, 1991).

Im Gegensatz zu der Intrazellulärtypmutante D149A zeigt D149N einen Phänotyp, der dem Wildtyp gleicht. Nach dem Modell ist D149N in der Lage das Wasserstoffbrückenmuster aufrechtzuerhalten, D149A hingegen nicht. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass Asparagin an dieser Aminosäureposition in einer Reihe von Claudinsubtypen vorkommt (siehe Alignment, Abb. 4.2). Diese konservierte Wasserstoffbrücke zwischen der Seitenkette von D149 und dem Rückgrat –NH von V152 könnte erklären, warum eine Alaninmutation an P150 einen Phänotyp ergibt, der als intermediärer Typ zwischen dem Intrazellulärtyp und dem TJ-Typ liegt. Die nur leichten Faltungsdefizite von der Mutante P150A könnten auf eine zusätzliche Stabilisierung der N-terminalen Hälfte der Schleife durch die Wasserstoffbrücke zwischen D149 und V152 zurückzuführen sein. Interessanterweise lokalisiert die Cld5_{D149A}-analoge Mutation Cld3_{N148A}, ebenso wie die Mutante Cld3_{N148D}, in der Plasmamembran und ist zur homophilen *trans*-Interaktion befähigt. Die Position N148 in Cld3 scheint demnach für die Stabilität der *turn*-Struktur der 2.EZS von Cld3 weniger bedeutsam. Der intrazelluläre

Phänotyp der Mutationen K157A und K157M kann durch den Verlust der Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Seitenkette von K157 und dem Rückgrat von D149 erklärt werden.

Das beste *trans*-Dimermodell der 2.EZS von Cld5, das die meisten Befunde in Einklang mit den Phänotypen bringt, ergibt ein antiparalleles Dimer. Die Aminosäuren F147, Y148 und Y158 von zwei interagierenden 2.EZS bilden nach diesem Modell einen aromatischen Kern. Diese Interaktion durch aromatische Aminosäurereste wurde für Protein-Protein-Interaktion häufig beschrieben (Waters, 2004). Aminosäuresubstitutionen dieser aromatischen Aminosäurereste ergeben Mutanten, die in der *trans*-Interaktion gestört sind und daher dem *disjunction*-Typ zugeordnet wurden. Drei der fünf Mutanten des *disjunction*-Typs können mit diesem Dimermodell der 2.EZS erklärt werden. Die Aminosäurepositionen der zwei übrigen Mutanten des *disjunction*-Typs, Q156 und E159, sind in dem Modell auf der gegenüberliegenden Seite des aromatischen Kerns lokalisiert. Dort ist auch die Mutante E146 vom intrazellulären Typ lokalisiert. Es ist wahrscheinlich, dass diese Seite der 2.EZS mit anderen Bereichen von Cld5 interagiert. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass E146 und E159 in der Mehrheit der Claudinvarianten hoch konserviert sind und Alanin-Mutanten an diesen beiden Aminosäurepositionen zu gestörter Faltung und zum intrazellulären Typ führen. Wie bereits zuvor diskutiert, könnte die 1.EZS von Cld5 an der *trans*-Interaktion beteiligt sein und daher den Bindungspartner darstellen.

Im Gegensatz zu E146A ist die Mutante E146N in der 2.EZS von Cld5 dem TJ-Typ zugeordnet. Die Ladung der Seitenkette von E146 wird daher für die *trans*-Interaktion nicht benötigt. Auch die korrespondierenden Aminosäurepositionen in Cld7, D147 (entsprechend E146) und E160 (entsprechend E159), zeigen nach Austausch gegen positive geladene Aminosäuren keine verstärkte intrazelluläre Lokalisation und keine Einschränkung der porenbildenden Eigenschaften in LLC-PK1-Zellen (Alexandre *et al.*, 2007).

Die Claudinfamilie kann anhand der Homologie der 2.EZS grob in zwei Gruppen eingeteilt werden (siehe Alignment, Abb. 4.2). Cld1 bis Cld10, Cld14, Cld15, Cld17 und Cld19 repräsentieren die Gruppe der klassischen Claudine, in denen folgende Aminosäurepositionen hoch konserviert sind (% Ähnlichkeit): E146 (85 %), F147 (100 %), Y148 (95 %), P150 (98 %), K157 (98 %), E159 (100 % hydrophobe, große Seitenkette). Diese hoch konservierten Aminosäurepositionen sind wichtig für die Faltung und/oder die *trans*-Interaktion, wie die systematische Analyse der Mutanten belegt. Daher sind die hier gewonnenen Erkenntnisse sehr wahrscheinlich auf alle klassischen Claudine übertragbar, deren 2.EZS damit eine generelle Struktur und einen generellen molekularen Interaktionsmechanismus aufweisen. Die

Claudine 11, 12, 13, 16, 18, 20, 22 und 23 zeigen eine hohe Variabilität der Aminosäure-Komposition und -Länge der 2.EZS, die auf eine Faltung hindeutet, welche von der hier beschriebenen Faltung der klassischen Claudine wesentlich abweicht.

4.1.5 Modell der Claudin-5-Strangbildung

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse über die Interaktionen von Cld5 wird ein Zweistufenmodell der Cld5-Strangbildung postuliert (Abb. 4.1).

Schritt eins stellt die Oligomerisierung von Cld5-Monomeren in der Plasmamembran (in Klammern, n) dar. Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, interagieren Cld5-Moleküle innerhalb einer Plasmamembran (*cis*-Interaktion) miteinander. Darüber hinaus lassen sich *in vitro* SDS-resistente Oligomere für Cld5 nach Expression in *E. coli* durch die Immunoblot-Methode nachweisen, die möglicherweise durch *cis*-Interaktion zustande kommen (Abb. 3.16). Monomere bis Hexamere von Cld3 und Cld5 aus LLC-PK1-Zellen (Coyne *et al.*, 2003) sowie von Cld4 exprimiert in Insektenzellen (Mitic *et al.*, 2003) wurden ebenfalls in der SDS-PAGE nachgewiesen. In einem anderen Gelsystem, der PFO-PAGE, lassen sich diese Monomere bis Hexamere für Cld3, Cld4 und Cld5 bestätigen, hingegen finden sich nur Monomere für Cld1 (Coyne *et al.*, 2003; Mitic *et al.*, 2003). Die PFO-PAGE basiert auf dem Trennprinzip der SDS-PAGE, bei dem jedoch das stark denaturierende Detergens SDS gegen das mildere, nicht denaturierende PFO (Perfluoro-Oktansäure) ausgetauscht wird. Mit diesem Trennsystem konnte die native Quartärstruktur von Aquaporin 1 (Ramjeesingh *et al.* 1999) und dem Chloridkanal CIC-2 (Ramjeesingh *et al.*, 2000) erhalten werden. Eine hexamere Konformation (Connexon) wurde auch für die Connexine in *Gap junctions* nachgewiesen (Unger *et al.*, 1999). Interessanterweise beträgt der Durchmesser des Connexin-Hexamers 10 nm (Jiang und Goodenough, 1996), welches auch dem Durchmesser der Partikel der TJ-Stränge entspricht (Staehelin 1973 und 1974, Bullivant 1977).

Schritt zwei ist die Bildung von polymeren Strängen in den TJs durch die *trans*-Interaktion zwischen Cld5-Oligomeren (Abb. 4.1). Innerhalb einer Plasmamembran polymerisiert Cld5 nicht in kontinuierliche Stränge, sondern bildet diskontinuierliche Stränge aus *E-face* assoziierten Transmembranpartikeln (Morita *et al.*, 1999c). Die Strangbildung von Claudinen wurde bisher allein auf *cis*-Interaktionen zurückgeführt (Furuse *et al.*, 1999). Nach den Erkenntnissen dieser Arbeit ist die Strangbildung aber auch der *trans*-Interaktion zuzuschreiben. Die Kontinuität der Cld5-Polymere ist nach dem skizzierten Modell nur im parazellulären Spalt zu beobachten, während durch Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie innerhalb der Plasmamembranen nur diskontinuierliche Stränge zu erkennen sind (Abb. 4.1;

Schwarze Pfeile). Anzumerken ist auch, dass die Inkorporation von Cld5-Oligomeren in die Stränge sehr wahrscheinlich nicht durch TJ-assoziierte Proteine verursacht wird, da die Interaktion zwischen Cld5 und ZO-1 durch die YFP-Fusion am C-Terminus unterbunden ist. Zusammengefasst liefert dieses Modell einen Erklärungsansatz, um die Diskontinuität der intramembranösen Stränge der Claudine 2, 5, 6, 9 und 11 in der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie zu erklären.

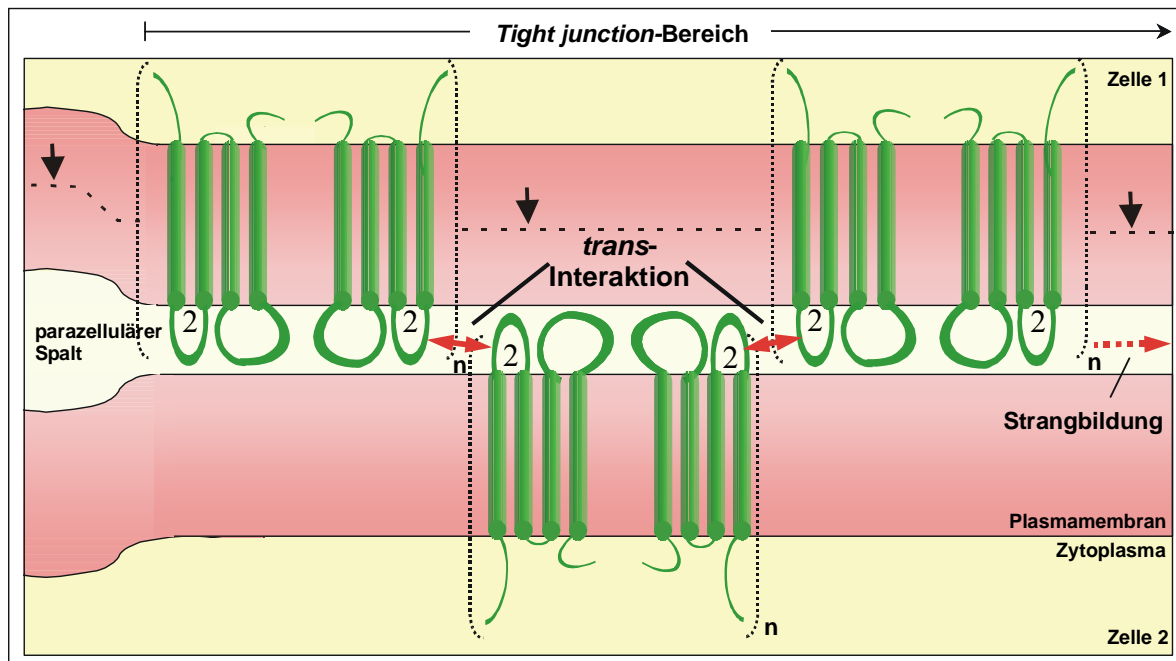


Abb. 4.1: Schema der homophilen Claudin-5-Oligomerisierung und Strangbildung.

Cld5 bildet in der Plasmamembran durch *cis*-Interaktion Cld5-Oligomere (n). Homophile *cis*-Interaktionen von Cld5 konnten in dieser Arbeit durch die FRET-Methode nachgewiesen werden. Die Oligomere bestehen zumindest aus zwei, möglicherweise aus sechs Monomeren, jedoch nicht aus kontinuierlichen Polymeren, die innerhalb einer Plasmamembran gebildet werden, wie die Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie zeigt. *Trans*-Interaktion, die zumindest teilweise durch die 2.EZS vermittelt wird, ist für die Polymerisation und Strangbildung notwendig. Die Diskontinuität und *E-face*-Assoziation von Cld5 in der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie kann durch dieses Modell erklärt werden. Die gepunktete Linie in der Plasmamembran der oberen Zelle deutet die Bruchebene bei einem Gefrierbruch an, während die schwarzen Pfeile die Blickrichtung auf die *E-face* andeuten. In der *E-face* erscheint Cld5 diskontinuierlich, im parazellulären Spalt jedoch als kontinuierlicher Strang.

4.2 Claudin-*Clostridium perfringens* Enterotoxin-Interaktionen

Clostridium perfringens Enterotoxin (CPE) bewirkt im Darm von Säugetieren die Lyse der Darmepithelzellen innerhalb von 5-15 Minuten (McClane und McDonel, 1979). Dazu nutzt CPE verschiedene Claudinvarianten, insbesondere Cld3 und Cld4, als Zelloberflächenrezeptoren. Die Inkubation von CPE-sensitiven Epithelzellen mit nicht toxischen CPE-Fragmenten (CPE₁₁₆₋₃₁₉, CPE₁₈₄₋₃₁₉) bewirkt hingegen erst nach einigen Stunden (>4 h) die Öffnung von TJs, ohne die Zellen zu lysieren (Christian Piehl, FMP, persönliche Mitteilung; Sonoda *et al.*, 1999). Zudem ist auch bekannt, dass in vielen Karzinomen die Expression und Lokalisation der Claudine in den Tumorzellen gegenüber den

Ursprungsepithelien verändert ist (Swisshelm *et al.*, 2005; Morin *et al.*, 2005). Insbesondere die Expression von Cld3, Cld4 und Cld7 ist in vielen Karzinomen hochreguliert (Hewitt *et al.*, 2006). Damit sind zwei Einsatzmöglichkeiten für CPE vorstellbar.

Zum einen könnte CPE gezielt gegen Tumore eingesetzt werden, die verstärkt CPE-sensitive Claudine exprimieren (Kominsky *et al.*, 2004; Santin *et al.*, 2007). Z. B. bewirkt die intratumorale CPE-Behandlung von Xenotransplantaten aus Brustkrebszellen in immundefizienten Mäusen eine signifikante Reduktion des Tumolvolumens und Nekrose der Tumorzellen, die auch für humane Brustkrebsgewebeproben gezeigt wurde (Kominsky *et al.*, 2004). Ähnliche antitumoröse Ergebnisse sind für Bauchspeicheldrüsen-, Brust- und Prostatakrebs veröffentlicht (Long *et al.*, 2001; Michl *et al.*, 2001; Kominsky *et al.*, 2004). Eine andere Strategie nutzt die Endozytose von CPE-Cld-Komplexen, um Wirkstoffe intrazellulär in Tumorzellen einzubringen (Ebihara *et al.*, 2006).

Zum anderen stellen insbesondere dichte, epitheliale oder endotheliale Barrieren, wie z. B. die Blut-Hirnschranke, ein Problem bei der Wirkstoffzufuhr in hinter der Barriere gelegene Gewebe (z. B. dem Gehirn) dar. Der Einsatz von nicht toxischen CPE-Fragmenten als Mediator oder Verstärker der Wirkstoffzufuhr wäre daher hilfreich. In beiden Fällen ist eine Optimierung der Bindung von CPE an bestimmte Cld-Varianten erforderlich. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit molekulare Determinanten identifiziert, die für eine CPE-Cld-Interaktion von Bedeutung sind.

4.2.1 *Clostridium perfringens* Enterotoxin: ein Claudin-5-Modulator für die Steigerung der Wirkstoffzufuhr durch die Blut-Hirnschranke?

CPE₁₁₆₋₃₁₉ bindet an Cld3- und Cld5-exprimierende HEK-293-Zellen, nicht jedoch an Zellen die keine der beiden Claudinvarianten exprimieren. Die Claudine 3 und 5 lassen sich auch in den TJs der Blut-Hirnschranke nachweisen (Wolburg *et al.*, 2003). Da nichttoxische CPE-Fragmente die TJs von Cld3-exprimierenden Zellen öffnen (Sonoda *et al.*, 1999), ist CPE möglicherweise ein geeigneter Mediator der Wirkstoffzufuhr. Der Verlust von Cld3 aus den TJs der Blut-Hirnschranke führt allerdings zum Zusammenbruch der Diffusionsbarriere durch die Auflösung der TJs und zu Ödemen im Gehirn (Wolburg *et al.*, 2003). Eine eingeschränkte Öffnung der TJs, ohne die Barrierefunktion der Blut-Hirnschranke komplett aufzuheben, ist unter Verwendung von Cld5 als CPE-Rezeptor vorstellbar. Ohne Cld5 verliert die Blut-Hirnschranke ihre abdichtende Funktion für Moleküle kleiner als 800 Da, bleibt aber morphologisch unverändert (Nitta *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser

Arbeit konnte bisher keine Bindung von CPE an Cld5-exprimierende Maus-L-Fibroblasten nachgewiesen werden (Fujita *et al.*, 2000; Ebihara *et al.*, 2006).

Wie ist dieser Gegensatz zu erklären? Im Unterschied zu Maus-L-Fibroblasten exprimieren HEK-293-Zellen geringe Mengen endogenes Occ. Zusammen mit Cld und CPE lokalisiert Occ in den 200 kDa Komplexen auf der Zelloberfläche und interagiert eventuell mit CPE (Singh *et al.*, 2001). Allerdings bindet CPE weder an HEK-293-Zellen (diese Studie), noch an Maus-L-Fibroblasten (Sonoda *et al.*, 1999), sofern diese nicht transfiziert sind. Daher könnte Occ bestenfalls stabilisierend auf eine Cld5-CPE-Bindung wirken.

Ein anderer Erklärungsansatz könnte die niedrigere Affinität von CPE für Cld5 im Vergleich zu Cld3 sein, die bisher eventuell als „keine Bindung“ interpretiert worden ist (Fujita *et al.*, 2000; Ebihara *et al.*, 2006). CPE zeigt unterschiedliche Affinitäten gegenüber einzelnen Claudinen. Z. B. ist CPE höher affin für Cld4 als für Cld8 (K_a : $1,1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ bzw. K_a : $1,00 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$; Sonoda *et al.*, 1999; Fujita *et al.*, 2000). In Immunfluoreszenzfärbungen zeigt sich tendenziell eine höhere Affinität von CPE₁₁₆₋₃₁₉ für Cld3- gegenüber Cld5-exprimierenden HEK-293-Zellen. Unterschiedliche Affinitäten könnten auch erklären, warum CPE₁₁₆₋₃₁₉ an Peptide und Fusionsproteine der separierten 2.EZS von Cld3, nicht aber von Cld5 bindet. Möglicherweise ist in diesen Experimenten die Nachweisgrenze für die Cld5-CPE-Interaktion unterschritten. Da es allerdings in den Experimenten mit Peptiden und Fusionsproteinen von Cld5 überhaupt keinen Hinweis auf eine Interaktion zwischen Cld5 und CPE gab, scheint das Ausbleiben der Bindung eher auf eine unterschiedliche Konformation der Peptide der 2.EZS von Cld3 und Cld5 zu deuten.

Im Kompletprotein wird die Struktur der extrazellulären Schleifen auch durch die Transmembransegmente innerhalb der Plasmamembran vorgegeben. Diese sind bei den separierten 2.EZS von Cld3 und Cld5 nicht vorhanden. Das unterschiedliche Interaktionsverhalten von Cld3 und Cld5 mit CPE deutet daraufhin, dass die 2.EZS von Cld3 eine dem Kompletprotein ähnliche Konformation annimmt, die 2.EZS von Cld5 hingegen nicht. Zumindest interagieren auf membrangekoppelten Peptidbibliotheken auch die Peptide der 2.EZS von Cld4 und Cld8 nicht mit CPE₁₁₆₋₃₁₉, obwohl beide Kompletproteine als Bindungspartner von CPE beschrieben worden sind (Katahira *et al.*, 1997b; Fujita *et al.*, 2000). Die 2.EZS von Cld3 weist eventuell im Gegensatz zu Cld5 ein Element auf, das die Helix-turn-Helix-Struktur der Peptide stabilisiert. Folglich ist eine Analyse der Cld-CPE-Interaktionen anhand von Peptiden und rekombinanten Fusionsproteinen der 2.EZS kritisch zu betrachten und durch die Analyse von Kompletproteinen abzusichern. Allerdings erlauben die Peptiduntersuchungen wichtige Schlüsse auf die Struktur der 2.EZS.

Da CPE im zellulären System mit Cld5 interagiert, würde eine zelluläre Analyse der übrigen nicht-CPE-bindenden Claudine möglicherweise weitere Claudin-Varianten als CPE-Bindungspartner identifizieren.

Um CPE als Modulator für die Blut-Hirnschranke einzusetzen wäre nach Erkenntnissen dieser Arbeit eine Erhöhung der Spezifität und Affinität für die Bindung von CPE an Cld5 durch Modifikation der Aminosäuresequenz von CPE notwendig.

4.2.2 Molekulare Determinanten der Interaktionen zwischen *Clostridium perfringens* Enterotoxin und Claudin-3 bzw. Claudin-5

In dieser Arbeit wurden erstmals für die Cld-CPE-Bindung relevante Aminosäurepositionen in Claudinen, insbesondere in Cld3 und Cld5, identifiziert. Demnach ist für die Interaktion von CPE mit Peptiden der 2.EZS von Claudinen insbesondere das *turn*-Motiv entscheidend. Bei der Analyse von membrangebundenen Peptidbibliotheken bindet CPE₁₁₆₋₃₁₉ nicht nachweisbar bzw. bedeutend schwächer an Cld-Peptide, die in der *turn*-Region von der Sequenz NPLxz (x= T, L, V; z = P, A) abweichen (Abb. 4.2). Die Peptide der 2.EZS der Claudine -3, -6, -7, -9 und -14 interagieren demnach mit CPE. Für die Claudine -3, -6, und -14 wurde auch nach Zellinkubationsexperimenten eine Interaktion mit CPE nachgewiesen (Fujita *et al.*, 2000). Neu ist hingegen der Hinweis auf die Interaktion von CPE mit Cld9. Allerdings zeigt sich kein Hinweis auf die bereits zuvor erwähnte Interaktion von CPE mit Peptiden der 2.EZS von Cld4 (NPMVA) und Cld8 (NPLVD) (Katahira *et al.*, 1997b; Fujita *et al.*, 2000). Beiden Peptiden fehlt das zweite schleifenstabilisierende Prolin der *turn*-Struktur, welches jedoch auch nicht in den Peptiden der 2.EZS von Cld6 (NPLVA) und Cld9 (NPLVA) zu finden ist (Abb. 4.2). Um eine Interaktion der Cld4-Peptide mit CPE₁₁₆₋₃₁₉ zu bewirken, reicht die Einführung eines zweiten Prolins anstelle des Alanins in der *turn*-Region nicht aus. Erst die Herbeiführung des kompletten *turn*-Motivs NPLVP bewirkt eine Interaktion von Cld4 mit CPE in vergleichbarer Intensität zu Cld3. Dieser Befund gilt auch für Cld2 (SPLVP) und Cld5 (DPLVP). Andere Regionen in Cld5 spielen für die Interaktion von CPE mit den Cld-Peptiden nur eine untergeordnete Bedeutung. So bewirken Aminosäuresubstitutionen gegen äquivalente Aminosäuren der Cld3-Sequenz in den C- und N-terminalen Abschnitten der 2.EZS in Cld5-Peptiden keine Steigerung der CPE-Interaktionsfähigkeit.

Um die Bedeutung der *turn*-Region in Zellen zu überprüfen, wurden durch ortsgerichtete Mutagenese die Mutationen N148A bzw. N148D in das Cld3-Komplettprotein eingebracht. Nach Expression in HEK-293-Zellen bindet CPE₁₁₆₋₃₁₉ sowohl an den Wildtyp, als auch an die Mutanten, obwohl N148 eine bedeutende Aminosäureposition für die Interaktion der Peptide

mit CPE ist. Daher ist N148 eher nicht für die direkte CPE-Cld-Interaktion bedeutend, sondern muss vielmehr für die bindungsrelevante Struktur der Peptide der 2.EZS von Cld3 notwendig sein. Interessanterweise lokalisieren sowohl Cld3_{N148A} als auch Cld3_{N148D} in HEK-293-Zellen in der Plasmamembran und zeigen homophile *trans*-Interaktion. Die analoge Mutation Cld5_{D149A} bewirkt dagegen einen intrazellulären Phänotyp, während Cld5_{D149N} ebenfalls *trans*-interagiert. D149N ist zudem in der Lage mit CPE zu interagieren. Nach dem Monomermodell für Cld5 stabilisiert D149 durch eine Wasserstoffbrücke mit der NH₂-Gruppe von V152 den *turn*. In Cld3 könnte diese Brückenbildung auch durch Asparagin (N) erfolgen, ist aber für die Stabilisierung der *turn*-Struktur nicht so bedeutend wie für Cld5, da, wie Cld3 zeigt, Alanin-Mutationen an dieser Stelle nicht zwangsläufig einen intrazellulären Phänotyp bewirken.

		<u>Klassische Claudine</u>			
CPE bindende Claudine	Q9Z0G9 CLD03_MOUSE	WSANTIIRDFYNPLVPEAQ	-----KREMG	54%	
	O35054 CLD04_MOUSE	WTAHNVIRDFYNPMVASGQ	-----KREMG	50%	
	Q9Z262 CLD06_MOUSE	WTAHSIIQDFYNPLVADAQ	-----KRELG	46%	
	Q9Z261 CLD07_MOUSE	WIGHQIVTDFYNPLTPMNV	-----KYEFG	42%	
	Q9Z260 CLD08_MOUSE	WVANSIIRDFYNPLVDVAL	-----KRELG	54%	
	Q9Z0S7 CLD09_MOUSE	WTAHAIIQDFYNPLVAEAL	-----KRELG	41%	
	Q9Z0S3 CLD14_MOUSE	WTTNDVVQNFYNPLLPSCGM	-----KFEIG	46%	
		* : :: :****:	* * : *		
nicht CPE bindende Claudine	O88551 CLD01_MOUSE	WYGNRIVQEFYDPLTPINA	-----RYEFG	50%	
	O88552 CLD02_MOUSE	WNLHGILRDFYSPLPVDSM	-----KFEIG	45%	
	O54942 CLD05_MOUSE	WFANIVVREFYDPTVPVSQ	-----KYELG	100%	
	Q9Z0S6 CLD10_MOUSE	LYANKITTEFFDPLY-MEQ	-----KYELG	52%	
	Q9Z0S5 CLD15_MOUSE	WYAVNITTDFFNPLY-AGT	-----KYELG	39%	
	Q8BXA6 CLD17_MOUSE	WTANIIIRDFYDPTVHAGQ	-----KRELG	66%	
	Q9ET38 CLD19_MOUSE	WYATLVVQEFFNPSTPVNA	-----RYEFG	45%	
			: :*:.*	: * : *	
		<u>Nichtklassische Claudine</u>			
	Q60771 CLD11_MOUSE	WFPVCAHREITIVSF	-----G	16%	
	Q9ET43 CLD12_MOUSE	WAIFYNSHLNRKFEVFT	-----FDYA	8%	
	Q9Z0S4 CLD13_MOUSE	WVTHNLIHGFFNPLLGFSK	-----KVQMG	25%	
	Q925N4 CLD16_MOUSE	WYAVDVYVERSSSLVHLNLF	-----LGIQYKFGWS	8%	
	P56857 CLD18_MOUSE	VFANMLVTNFWMSTANMYSGMGGMGMVQTVQTRYTFG		32%	
	P56880 CLD20_HUMAN	WYTKELIANFLDLTVPESN	-----KHEPG	41%	
	Q9D7U6 CLD22_MOUSE	WVAHKTVREFWDETMPEIV	-----PRWEFG	37%	
	Q9D7D7 CLD23_MOUSE	WYNHFLSDPDLAAPSPPV	-----TVQVS	4%	

Abb. 4.2: Sequenzalignment der zweiten extrazellulären Schleife der Claudine.

Sequenzalignment der 2.EZS-Sequenzen der Claudine 1 bis 19, 22 und 23 der Maus und Cld20 des Menschen durch ClustelW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Für Cld20 ist bisher keine Maus-Sequenz bekannt. Die genaue Start- und Endposition der 2.EZS ist experimentell ungeklärt, weshalb einige der N- und C-terminal flankierenden Aminosäuren möglicherweise zur Transmembranregion zählen. Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten sind die 2.EZS der Claudine in klassische Claudine (sehr ähnlich) und nichtklassische (z. T. abweichend) eingeteilt. Der Grad der Identität (in %) der 2.EZS der Claudine zur Sequenz der 2.EZS von Cld5 ist im Anschluss an die Sequenzen angegeben. Die Sequenzen zudem in CPE-bindende und nichtbindende Claudine kategorisiert. Identische Aminosäuren sind durch einen „*“, konservierte Aminosäuren durch „:“ und semikonservierte Aminosäuren durch einen „:“ unter den CPE-bindenden Sequenzen und den klassischen/nicht CPE-bindenden Sequenzen eingezeichnet. Kleine und hydrophobe Aminosäuren: rote Buchstaben; saure Aminosäuren: blaue Buchstaben; basische Aminosäuren: rosa Buchstaben, alle anderen: grüne Buchstaben.

Um die zelluläre Bindung von CPE an Claudine weiter zu charakterisieren, wurde auf die im ersten Teil dieser Arbeit erstellten Mutanten zurückgegriffen. Die Mutanten P153A und V152A in der *turn*-Region der 2.EZS von Cld5 sind in der Interaktion mit CPE nicht eingeschränkt. Paradoxerweise handelt es sich hierbei um Mutanten vom intrazellulären Typ, die, wenn überhaupt, nur schwach in der Plasmamembran zu finden sein sollten. Vermutlich gelangen dennoch genug Moleküle beider Mutanten in die Plasmamembran, die dann durch CPE in der Plasmamembran festgehalten werden und sich anreichern, oder, wie bereits zuvor postuliert, zusammen mit CPE endozytiert werden (Singh *et al.*, 2001), so dass sich CPE im Zytoplasma anreichert. Im Gegensatz dazu bindet CPE nicht an die TJ-Typ-Mutante Cld5_{T151A} und schwächer an die intermediäre Mutante Cld5_{P150A} als an Cld5_{wt}. Demnach sind zumindest T151 und vielleicht P150 Aminosäurepositionen in der *turn*-Region von Cld5 direkt in die CPE-Interaktion involviert.

Aminosäuresubstitutionen innerhalb der α -helikalen Sequenz EAQKR (153-157) in der C-terminalen Hälfte der 2.EZS von Cld3-Peptiden gegen Prolin unterbinden eine Cld-CPE-Interaktion. Prolin ist bekannt dafür, α -helikale Strukturen zu stören. Interessanterweise ist die CPE-Cld-Interaktion auch nach Einführung einer negativen Ladung in Cld3-Peptide (Aspartat oder Glutamat) an den Positionen A154, Q155, K156 oder R157 gestört. Eine Cld5-Mutante vom *disjunction*-Typ, Cld5_{Q156E}, bei der eine negative Ladung in der zu Cld3 (Q155) analogen Aminosäureposition von Cld5 eingeführt ist, interagiert ebenfalls nicht mehr mit CPE₁₁₆₋₃₁₉. Andere Aminosäuresubstitutionen von Cld3-Peptiden, zumeist an den Positionen Q155 und E158, insbesondere gegen hydrophobe und positiv geladene Aminosäuren, bewirken hingegen eine verstärkte Wechselwirkung mit CPE₁₁₆₋₃₁₉.

Da die für die Cld-Cld-Interaktion relevanten aromatischen Aminosäuren in der 2.EZS der Claudine nicht für die Cld-CPE-Interaktion von Bedeutung sind, ist der Bindungsmechanismus beider Interaktionen unterschiedlich.

Für die Interaktion bedeutsame Aminosäuren in CPE konnten in dieser Arbeit nicht bestimmt werden, da mit membrangebundenen Peptidbibliotheken keine Bindungen zwischen den C- oder N-terminal immobilisierten CPE-Peptiden und den Fusionsproteinen der 2.EZS von Cld3 nachzuweisen sind (nicht gezeigt). Eine Analyse der CPE-Bindungseigenschaften nach ortsgerechter Mutagenese bestimmter Aminosäurepositionen in CPE ist geplant, sowie weitere Mutationen im Cld3-Komplettprotein.

4.2.3 Die Region 116-290 von *Clostridium perfringens* Enterotoxin verstärkt die Bindung an Claudine und bewirkt die Öffnung der *Tight junctions*

In den Zellinkubationsexperimenten, bei denen Cld3_{wt}-transfizierte HEK-293-Zellen mit CPE₂₉₀₋₃₁₉ oder CPE₁₁₆₋₃₁₉ inkubiert wurden, konnte in Immunfluoreszenzfärbungen und Immunoblot-Analysen der Zelllysate gezeigt werden, dass CPE₁₁₆₋₃₁₉ eine höhere Affinität für Cld3 aufweist, als CPE₂₉₀₋₃₁₉. *Pulldown*-Experimenten mit Caco-2-Zelllysaten zeigen einen ähnlichen Unterschied zwischen CPE₁₈₄₋₃₁₉ und CPE₂₂₀₋₃₁₉, wobei CPE₁₈₄₋₃₁₉ stärker an Cld4 bindet als CPE₂₂₀₋₃₁₉ (Masuyama *et al.*, 2005). Außerdem binden sowohl synthetisierte Peptide als auch exprimierte Fusionsproteine der CPE₂₉₀₋₃₁₉-Sequenz schwächer an intestinale Bürstensaummembranen und Vero-Zellen als CPE_{wt} (Hanna *et al.*, 1991). Daher sind die letzten dreißig Aminosäuren des C-Terminus von CPE für die Bindung an Cld3 und Cld4 ausreichend. Dennoch wird die Bindung durch eine oder mehrere Sequenzabschnitte innerhalb der Region 116-290 von CPE verstärkt, was auf eine weitere Rezeptorbindestelle in dieser Region deutet. Bei dem Bindepartner der zusätzlichen Rezeptorbindestelle könnte es sich um das bisher unidentifizierte 50 kDa-Protein handeln, das als Bestandteil in den „kleinen Komplexen“ beschrieben worden ist (Katahira *et al.*, 1997 a, b). Wahrscheinlicher ist ein stabilisierender Effekt der Region 116-290 auf den C-Terminus von CPE, der die Cld-CPE-Bindung fördert oder eine zusätzliche Cld-Bindestelle in dieser Region. Dafür würde sprechen, dass eine stärkere, direkte Bindung von CPE₁₁₆₋₃₁₉ an Peptide der 2.EZS von Cld3 als für CPE₂₉₀₋₃₁₉ durch Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie und den membrangebundenen Peptidbibliotheken nachgewiesen werden konnte. Zudem zeigt CPE₁₁₆₋₃₁₉ an Cld3-Peptiden der 2.EZS in Messungen der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie eine sehr langsame Dissoziation, die für CPE₂₉₀₋₃₁₉ nicht zu beobachten ist. Eine niedrige Dissoziationsrate wurde auch in Zellinkubationsexperimenten beobachtet (CPE_{wt} auf intestinale Kaninchen-Epithelzellen: $9,2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; McDonel, 1980).

Interessanterweise haben His₆-CPE₂₂₀₋₃₁₉ und ein synthetisiertes Peptid CPE₂₈₉₋₃₁₉ keinen TEER-reduzierenden Effekt auf Caco-2-Zellen (20 µg/ml für 18 h zum basalen Kompartiment gegeben) und zeigen keine Steigerung der FITC-Dextran (4 kDa)-Absorption im Jejunum der Ratte. CPE₁₈₄₋₃₁₉ zeigt hingegen beides (Masuyama *et al.*, 2005). Die Inkubation von Caco-2-Zellen mit 10 µg/ml CPE₁₁₆₋₃₁₉ führt sowohl apikal als auch basolateral zu den Zellen gegeben, zum Abfall des TEER innerhalb weniger als 12 h. Hingegen konnte kein Effekt für 10 µg/ml CPE₂₉₀₋₃₁₉-Peptid festgestellt werden (Christian Piehl, FMP, unveröffentlichte Daten). Daher scheint CPE₂₉₀₋₃₁₉ bzw. auch CPE₂₂₀₋₃₁₉ zwar an die 2.EZS der Claudine zu

binden, bewirkt aber keine Öffnung der TJs in Cld-exprimierenden Zellen. Eine Beteiligung der Region 184-290 von CPE an der Öffnung der TJs ist daher anzunehmen.

Zwei alternative Mechanismen, die ohne Zellyse zur Öffnung der TJs führen könnten, sind vorstellbar: 1. Eine direkte Bindung von CPE₁₁₆₋₃₁₉ an Cld3 oder Cld4 in TJ-Strängen induziert eine Depolymerisation der Stränge und Öffnung der TJs. 2. CPE₁₁₆₋₃₁₉ bindet an freie Cld3- oder Cld4-Moleküle in der Plasmamembran außerhalb der TJs, welche den nicht polymerisierten Cld-Pool darstellen. Die Bindung von CPE an diese freien Claudine verringert die Zahl, die für die Polymerisation zur Verfügung stehenden Cld-Moleküle. Notwendige Voraussetzung für die Strangbildung ist, wie in dieser Arbeit gezeigt, die *trans*-Interaktion, die jedoch durch die CPE-Cld-Bindung unterdrückt wird. Das TJ-Netzwerk wird dynamisch durch ein Gleichgewicht aus Polymerisation und Depolymerisation aufrechterhalten. Die Störung des Polymerisations-/Depolymerisations-Gleichgewichts bewirkt den Abbau der TJ-Stränge und daher die Öffnung der TJs.

Die erste Hypothese kann in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da CPE₁₁₆₋₃₁₉ nicht direkt an Cld3 oder Cld5 in Cld-Kontakten von Cld-exprimierenden Zellen bindet. Vielmehr bindet CPE₁₁₆₋₃₁₉ an alle übrigen Plasmamembranareale der Zellen. Für die zweite Hypothese spricht, dass es eine Reduktion des TEER gibt, wenn konfluente MDCK-I-Zellen mit CPE₁₈₄₋₃₁₉ im basolateralen Kompartiment inkubiert werden, nicht jedoch wenn die Zellen apikal inkubiert werden (Sonoda *et al.*, 1999). Die apikale Inkubation von Caco-2-Zellen mit CPE₁₁₆₋₃₁₉ bewirkt hingegen einen Abfall des TEER, der jedoch eine längere Zeit benötigt als nach Inkubation der Zellen vom basolateralen Kompartiment aus. Ein ähnlicher Unterschied der CPE-Sensitivität der apikalen gegenüber der basolateralen Plasmamembranen wurden auch für Caco-2-, MDCK-I- und Vero-Zellen berichtet, die mit CPE-Komplettprotein inkubiert wurden (Singh *et al.*, 2001). Daher könnte die Öffnung der TJs durch CPE₁₁₆₋₃₁₉ bzw. CPE₁₈₄₋₃₁₉ mit der zur Bindung zur Verfügung stehenden Zelloberfläche korrelieren. Möglich ist aber auch, dass Claudine als Bindungspartner von CPE, wie Occ (Sakakibara *et al.*, 1997; Matter und Balda, 1998), über das basolaterale Kompartiment in die TJ eingebaut werden und daher apikal nicht oder weniger in der Plasmamembran vorkommen. Zusammengefasst wird folgende Hypothese aufgestellt: CPE₁₁₆₋₃₁₉ bewirkt die Öffnung der TJs durch die hoch affine Bindung und extrem niedrige Dissoziationsrate von CPE₁₁₆₋₃₁₉ an frei in der Plasmamembran vorliegende Cld-Moleküle und stört dadurch das Polymerisations-/Depolymerisations-Gleichgewicht der Cld-Stränge. Im Vergleich dazu, reicht die geringere Affinität und höhere Dissoziationsrate von CPE₂₉₀₋₃₁₉ nicht aus, das Polymerisations-/Depolymerisations-Gleichgewicht so weit zu beeinflussen, dass eine Öffnung der TJs erreicht wird.