

ZUSAMMENFASSUNG

Die dynamische Bildung und Zerstörung der *tight junction* (TJ) ist für die Regulation der Durchlässigkeit von Blut-Gewebe-Schranken in multizellulären Organismen äußerst kritisch. Es wird angenommen, dass die Bildung der TJ durch die Proteinkinase C (PKC) reguliert wird, obgleich die molekularen Mechanismen größtenteils unverstanden sind. Occludin, ein integrales membranales Phosphoprotein, das spezifisch mit den TJ assoziiert ist, trägt zur Struktur und Funktion der interzellulären Verbindungen (TJ) bei. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass die Neubildung der TJ mit der Phosphorylierung von Occludin einhergeht. Aus diesem Grund wird angenommen, dass Occludin eine regulatorische Rolle in der TJ-Biogenese spielt. Bisher wurde weder eine entsprechende Kinase noch die Phosphorylierungsstellen in Occludin identifiziert. Demzufolge waren die Ziele der vorliegenden Arbeit:

- der Nachweis der Proteinkinase C-Signaltransduktion bei der Regulation der Phosphorylierung von Occludin und die zelluläre Verteilung von Occludin,
- die Untersuchung der Wirkungsweise der neuen und konventionellen Proteinkinase C (Diacylglycerin-sensitive PKC-Unterfamilien), die in die Ausbildung und den Abbau der TJ involviert sind und
- die Identifizierung der *in vivo* Phosphorylierungsstellen von Occludin.

Ergebnisse: Die Effekte der PKC-Aktivatoren und -Inhibitoren auf die Phosphorylierung von Occludin und die TJ-Biogenese wurden mit Hilfe des *Kalzium-Switch-Modells* untersucht. MDCK-Zellen, die im Medium mit geringem Kalziumgehalt kultiviert wurden, verloren vollständig ihre interzellulären Kontakte. Nach Kultivierung im Medium mit normalen Kalziumgehalt bildeten die MDCK-Zellen innerhalb weniger Stunden funktionell normale TJ aus. Phorbol-12-myristat-13-acetat und 1,2-Dioctanoylglycerin induzierten in MDCK-Zellen, die im Medium mit geringem extrazellulären Kalziumgehalt kultiviert wurden, eine schnelle Phosphorylierung von Occludin. Gleichzeitig erfolgte eine Translokalisierung von Occludin in die Regionen der Zell-Zell-Kontakte. Sowohl der Umfang der Occludinphosphorylierung als auch die Inkorporation von Occludin und ZO-1 in die TJ, die durch Proteinkinase C-Aktivatoren oder durch das Kalzium-Switch Modell erreicht wurden, verringerten sich durch den klassischen und neuen Proteinkinase C-Inhibitor GF-109203X signifikant. In gleicher Weise blockte Rottlerin, ein Inhibitor der neuen Proteinkinase C-Isotypen δ und θ , sowohl die Phosphorylierung von Occludin als auch die TJ-Ausbildung, die normalerweise bei Kultivierung im normalen Medium induziert wird. Zusätzlich zeigten *in vitro*-Experimente, dass die COOH-terminale Domäne von Occludin (Maus) direkt durch aufgereinigte PKC δ phosphoryliert wird. Während des Kalziumswitches beschleunigte der klassische PKC-Inhibitor Gö6976 unerwartet die Phosphorylierung von Occludin. Dieser Vorgang ging mit der einer Inkorporation von Occludin in die neugebildeten TJ einher. Außerdem führte die Zugabe von Gö6976 bei einer Kultivierung im Medium mit geringem Kalziumgehalt zur Ausbildung des TJ-Komplexes, einer Phosphorylierung von Occludin und einer Verminderung des Abbaus des TJ-Komplexes.

Um die Phosphorylierungsstellen in Occludin zu identifizieren, wurde ein einfaches Verfahren zur Isolierung hochphosphorylierter Occludinformen aus Rattenleber entwickelt. Die *in vivo* Phosphorylierungsstelle Ser³⁷¹ wurde mit Hilfe der Kapillar-LC/Elektrosprayionisierung-Tandem-Massenspektroskopie identifiziert.

Schlussfolgerung: Die TJ-Bildung wird durch antagonistische Signaltransduktionswege klassischer und neuer PKC-Isoenzyme reguliert. Dabei wird die Entstehung des TJ-Komplex bevorzugt durch die Aktivierung der neuen Proteinkinasen C-Signaltransduktion (vermutlich PKC δ) erreicht und durch die klassische Signaltransduktion von PKC/PKC μ inhibiert.

Es konnte gezeigt werden, dass Occludin ein Zielgen der PKC-vermittelten Signaltransduktion ist. Die Aktivierung der neuen PKC induziert eine schnelle Phosphorylierung von Occludin mit

einer gleichzeitigen Translokalisierung von Occludin in die Regionen der Zell-Zell-Kontakte. Beidem, sowohl der Occludinphosphorylierung als auch der Inkorporation in die neugebildeten TJ, wirkt die klassische PKC-Signaltransduktion entgegen. *In vitro*-Experimente bestätigten, dass die PKC δ direkt Occludin phosphoryliert.

Weiterhin wurde ein einfaches Verfahren zur Isolierung von hochphosphoryliertem Occludin aus der Rattenleber entwickelt. Zum ersten Mal wurde in Occludin Ser371 als eine *in vivo* Phosphorylierungsstelle identifiziert.