

Aus dem  
CharitéCentrum 13:  
Innere Medizin mit Gastroenterologie und Nephrologie

Medizinische Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie  
(einschließlich Arbeitsbereich Ernährungsmedizin)

Leiter des Arbeitsbereichs Ernährungsmedizin:

Prof. Dr. med. Jörg-Dieter Schulzke

## **Habilitationsschrift**

# **Molekulare Organisation Claudin-basierter Tight Junction-Stränge und deren Modulation**

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach  
"Experimentelle Biomedizin"

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. rer. nat. Jörg Piontek**

**Eingereicht: Dezember 2015**

**Dekan: Prof. Dr. Axel R. Pries**

**1. Gutachter/in: Prof. Dr. Britta Engelhardt**

**2. Gutachter/in: Prof. Dr. Werner Franke**

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	2
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
1.1 TIGHT JUNCTIONS UND GEWEBEBARRIEREN .....	3
1.2 STRUKTUR, MOLEKULARE ZUSAMMENSETZUNG UND FUNKTION DER TIGHT JUNCTION .....	3
1.3 KRANKHEITSBEDINGTE VERÄNDERUNGEN DER TIGHT JUNCTION .....	5
1.4 TIGHT JUNCTIONS DER BLUTHIRNSCHRANKE .....	5
1.5 TJ ALS ANGRIFFSPUNKT ZUR VERBESSERUNG DER WIRKSTOFFAUFNAHME .....	6
1.6 DAS CLOSTRIDIUM PERFRINGENS ENTEROTOXIN ALS WERKZEUG ZUR STRUKTURANALYSE UND MODULATION DER CLAUDINE .....	6
1.7 VERWENDETE METHODEN .....	7
1.7.1 Zelluläre Rekonstitution von Tight Junctions.....	7
1.7.2 Elektronen-Mikroskopische Analyse der TJ-Ultrastruktur.....	9
1.7.3 Untersuchung der Abdichtungsfunktion von Claudinen.....	10
1.7.4 Bioinformatische Methoden .....	10
1.8 FRAGESTELLUNGEN UND ZIELE DIESER ARBEIT.....	11
<b>2. EIGENE ARBEITEN .....</b>	<b>12</b>
2.1 TIGHT JUNCTION BILDUNG: DETERMINANTEN DER HOMOPHILEN INTERAKTION ZWISCHEN KLASSISCHEN CLAUDINEN.....	12
2.2 MOLEKULARE DETERMINANTEN DER INTERAKTION ZWISCHEN CLAUDIN-3 UND FRAGMENTEN DES CLOSTRIDIUM PERFRINGENS ENTEROTOXINS.....	26
2.3 BETEILIGUNG DER EXTRAZELLULÄREN SCHLEIFE 2 VON CLAUDIN-5 AN DER PARAZELLULÄREN ABDICHTUNG GEGENÜBER IONEN, KLEINER UND GROßER MOLEKÜLE .	38
2.4 AUFKLÄRUNG DER PRINZIPIEN DER MOLEKULAREN ORGANISATION HETEROPOLYMERER TIGHT JUNCTION STRÄNGE .....	49
2.5 DIE FALTUNG VON CLAUDIN-3 UND -5 UND DEREN ASSEMBLIERUNG IN TIGHT JUNCTIONS WIRD DURCH RESTE IN TRANSMEMBRANSEGMENT 3 UND DER EXTRAZELLULÄREN SCHLEIFE 2 BESTIMMT. ....	66
2.6 MOLEKULARE UND STRUKTURELLE TRANSMEMBRANDETERMINANTEN FÜR DIE EINBETTUNG VON CLAUDIN-5 IN TIGHT JUNCTION-STRÄNGE.....	80
<b>3. DISKUSSION .....</b>	<b>93</b>
3.1 MOLEKULARE ORGANISATION DER TIGHT JUNCTION .....	93
3.2 STRUKTUR DER CLAUDINE .....	93
3.3 CLAUDIN-CPE INTERAKTION.....	95
3.4 GENERIERUNG VON CLAUDIN-MODULATOREN.....	96
3.5 ASSEMBLIERUNG DER CLAUDIN PROTOMERE ZU TJ-STRÄNGEN .....	97
3.6 MODELLE DER TJ-STRANGARCHITEKTUR .....	99
3.7 BILDUNG VON IONENKANÄLEN DURCH CLAUDINE.....	101
<b>4. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>103</b>
<b>5. LITERATURANGABEN .....</b>	<b>104</b>
Danksagung	
Erklärung	

## Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
BN-PAGE	Blaue Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
C	Cystein
cCPE	C-terminale Domäne von <i>Clostridium perfringens</i> -Enterotoxin
CPE	<i>Clostridium perfringens</i> -Enterotoxin
Cldn#	Claudin-#
D	Aspartat
DDM	n-Dodecyl $\beta$ -D-Maltosid
E	Glutamat
EM	Elektronenmikroskopie
EZS1 und -2	Extrazelluläre Schleife 1 und 2
FHHNC	familiäre Hypomagnesiämie, Hyperkalziurie und Nephrokalzinose
FRET	Förster- bzw. Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
GuK	Guanylatkinase
I	Isoleucin
KO	Knock Out
L	Lysin
M	Methionin
MAGUK	Membranassoziierte Guanylatkinase
MAL	Proteins of myelin and lymphocyte
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MARVEL	MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link
MDCK II	Madin-Darby Canine Kidney Cells Typ II
MMP9	Matrix-Metalloproteinase 9
MUPP-1	Multi-PDZ-Domänenprotein 1
N	Asparagin
NISCH	neonatale Ichthyosis und sklerosierende Cholangitis
P	Prolin
PDB	Protein Datenbank
PDZ	Domäne, die in den drei Proteinen PSD95/SAP90, Discs large und Zonula occludens-1 entdeckt wurde
F	Phenylalanin
Q	Glutamin
R	Arginin
RMSD	Root Mean Square Deviation
S	Serin
SH3	Src-Homologieregion
T	Threonin
TAMP	Tight junction-assoziiertes MARVEL-Protein
TER	Transepithelialer/transendothelialer Widerstand [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]
TJ	Tight Junction
TM	Transmembransegment
WT	Wildtyp
Y	Thyrosin
ZO	Zonula occludens

## 1. Einleitung

### 1.1 Tight Junctions und Gewebebarrieren

Gewebebarrieren sind für die Funktion von Organen wie Darm, Niere, Lunge, Haut oder Gehirn essentiell. Sie werden durch zelluläre Grenzschichten gebildet, Epithelien oder Endothelien, die zwei Körperkompartimente oder den Organismus von der Umgebung trennen und den Stoffaustausch kontrollieren. Hierüber wird das innere Milieu im Gleichgewicht gehalten und der Stoffaustausch verschiedener Organe untereinander und zwischen Organismus und Umwelt der physiologischen Situation angepasst.

Epithel- und Endothelzellen zeichnen sich durch ihre Polarität aus. Die Plasmamembran ist in eine basolaterale Domäne, die der Basalmembran zugewandt ist, und eine apikale, dem Lumen oder dem äußeren Milieu zugewandte Domäne funktionell aufgetrennt. Ein Stofftransport kann prinzipiell sowohl transzellulär durch beide Plasmamembranen als auch parazellulär erfolgen. Der transzelluläre Transport kann aktiv oder passiv durch eine Vielzahl transmembranärer Carrier- und Kanalproteine erfolgen. Demgegenüber wird die parazelluläre Permeabilität für anorganische Ionen, kleine Moleküle, Makromoleküle und H<sub>2</sub>O durch die *gate*-Funktion der Tight Junction (TJ, Zonula Occludens) reguliert. Darüber hinaus limitiert die TJ die laterale Diffusion von Membrankomponenten zwischen der basolateralen und der apikalen Plasmamembran (*fence*-Funktion) und ist somit an der Aufrechterhaltung der Zellpolarität beteiligt (Diamond, 1977).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die molekulare Organisation und strukturelle Aspekte des transmembranären Rückgrats der TJs mittels molekularbiologischer, zellbiologischer und bioinformatischer Methoden untersucht. Es wurden Protein-Protein-Interaktionen charakterisiert, die an der Ausbildung der parazellulären Barriere und an selektiven Transportprozessen beteiligt sind. Zudem wurden Ansätze zur gewebespezifischen Modulierbarkeit der *gate*-Funktion der TJs aufgezeigt.

### 1.2 Struktur, molekulare Zusammensetzung und Funktion der Tight Junction

TJs befinden sich am apikalen Ende der lateralen Plasmamembran und bilden dort eine gürtelartige Struktur um die Zellen. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Ultradünnschnitten erscheinen TJs als Fusionen der Membranen zwischen zwei Zellen. Über Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie wurden TJs als verzweigtes Netzwerk aus reißverschlussartigen Strängen/Fibrillen visualisiert, die aus transmembranären Partikeln bestehen (Staehein, 1974). Die Dichtigkeit der TJs wird durch deren molekulare Zusammensetzung bestimmt und unterscheidet sich in verschiedenen Geweben. In proximalen Segmenten von tubulären Epithelien (z.B. proximaler Tubulus der Niere und Dünndarm) sind TJs viel durchlässiger als in distalen Segmenten (z.B. distaler Tubulus der Niere und Dickdarm) (Günzel und Fromm, 2012). In der Harnblase, der *Epidermis* und dem Gehirndothel bilden TJs einen fast völlig undurchlässigen Verschluss. Zudem ist das Ausmaß der Abdichtung durch die TJ nicht immer konstant. Sie kann einerseits in bestimmten Geweben abhängig von den physiologischen Bedingungen reguliert werden und andererseits durch pathologische Faktoren verändert werden (Schneeberger und Lynch, 2004).

Die parazelluläre Dichtigkeit wird durch die tetraspan-Transmembranproteine der Claudin (Cldn)-Familie (derzeit 27 Mitglieder in Säugern) bestimmt. Sie bilden das Rückgrat der TJs (Furuse et al., 1999). Die exogene Expression eines Claudins, z.B. von Cldn1, oder Cldn2 in Zellen ohne endogene TJs reicht im Gegensatz zur Expression anderer TJ-Proteine zur Bildung von TJ-Strängen aus (Furuse et al., 1998a). Schon in dieser Studie wurde davon ausgegangen, dass sich TJ-Stränge durch Polymerisation der Claudine über *cis*-Interaktionen innerhalb derselben Membran und *trans*-Interaktionen zwischen Membranen gegenüberliegender Zellen bilden. Zudem war bekannt, dass einige (z.B. Cldn1 und Cldn3), aber nicht alle Claudine Heteropolymere untereinander bilden können (Furuse et al., 1999). Claudine werden gewebespezifisch exprimiert und unterscheiden sich in ihren Barriereigenschaften, so dass die parazelluläre Permeabilität in den verschiedenen Geweben vorrangig durch deren Claudinzusammensetzung bestimmt wird. Claudine können in barrierebildende und kanalbildende Claudine unterteilt werden (für einen Überblick: Günzel und Yu, 2013). Die Mehrheit der Claudine verfügt über abdichtende Funktionen. Demgegenüber bilden bestimmte Claudine parazelluläre Kanäle, die selektiv permeabel für Kationen (Cldn2, -10b, -15, -16 zusammen mit -19) oder für Anionen (Cldn10a, -17) und im Fall von Cldn2 auch für Wasser permeabel sind (Rosenthal et al., 2010). Die Funktion einiger Claudine ist noch unklar, da deren Einfluss auf epitheliale Barrieren in unterschiedlichen experimentellen Kontexten uneinheitlich ist (Cldn4, -7, -8). Unabhängig von ihren Barriereigenschaften können Claudine aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit untereinander in zwei Gruppen unterteilt werden: Die "klassischen" Claudine (Cldn1 bis-10, 14, -15, -17,-19) besitzen untereinander eine höhere Sequenzähnlichkeit als die "nicht-klassischen" Claudine (Cldn11, -12, -13, -16, -18, -20 bis -27) untereinander (Krause et al., 2008).

Die TJ-assoziierten MARVEL-Proteine (TAMPs) teilen mit den Claudinen zwar eine Tetraspan-Transmembrantopologie, verfügen jedoch über keine nennenswerte Sequenzhomologie. TAMPs kopolymerisieren mit den Claudinen an bi- (Occludin, MarvelD3) oder trizellulären (Tricellulin) Kontakten der TJs (Günzel und Fromm, 2012). Occludin wird als eine regulatorische Komponente der TJ angesehen. Für Tricellulin wurde gezeigt, dass es trizelluläre TJs abdichtet und dadurch die transepitheliale Makromolekül-Passage einschränkt (Krug et al., 2009).

Die Assemblierung und Disassemblierung der TJ werden durch eine Vielzahl an TJ-assoziierten transmembranären Proteinen (z.B. Junctional Adhesion Molecules, Tetraspanine) und membran-assoziierten Proteinen reguliert, die z.B. den Transport der Claudine oder deren Verankerung am Zytoskelett kontrollieren. ZO-1, -2 -3, MAGI, MUPP-1; Par3, Par6, PALS1, PATJ fungieren als Gerüst- und Adapterproteine und verbinden die TJ-Stränge mit dem Zytoskelett über ihre zytoplasmatischen PDZ-Domänen oder SH3-*hinge*-GuK-Einheiten und über ihre Assoziation mit Aktin und Myosin. Darüber hinaus wirken zahlreiche Proteine intrazellulärer Signalwege (z.B. PKC, PKA, MAP-kinase, WNK, MLCK, c-Src, RhoK und Eph-Rezeptoren) als Regulatoren der transmembranalen TJ-Proteine und sind an der Regulation der TJ-Genexpression, Proliferation und Differenzierung epithelialer Zellen beteiligt (Matter und Balda, 2003; Roh und Margolis, 2003). Posttranslationale Modifizierungen von TJ-Proteinen beinhalten Phosphorylierung, Palmitoylierung, O-Glykosylierung sowie Ubiquitinierung und regulieren deren TJ-Lokalisation und einen proteasomalen Abbau (Gonzalez-Mariscal et al., 2010).

### 1.3 Krankheitsbedingte Veränderungen der Tight Junction

TJs sind an der Pathophysiologie vieler Krankheiten beteiligt. Z. B. können im Zuge intestinaler Infektionen mit Bakterien, der Exposition von bakteriellen Toxinen (wie Zonula Occludens-Toxin von *Vibrio Cholerae*- und *Clostridium perfringens*-Enterotoxin) oder intestinaler Entzündungen (Zöliakie, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, mikroskopische Kolitis und Pouchitis) Schädigungen der TJ auftreten, die die Barrierefunktion beeinträchtigen (Mullin et al., 2005; Barmeyer et al., 2015). Darüber hinaus verursachen humane Mutationen im CLDN1-Gen neonatale Ichthyosis und sklerosierende Cholangitis (NISCH) (Hadj-Rabia et al., 2004), Mutationen im CLDN16- (Simon et al., 1999) oder CLDN19-Gen (Konrad et al., 2006) familiäre Hypomagnesiämie, Hyperkalziurie und Nephrokalzinose (FHHNC) und renale Hypomagnesiämie, Mutationen von CLDN14 oder Tricellulin verursachen autosomal rezessive Taubheit (Riazuddin et al., 2006). Die fundamentale physiologische Bedeutung der TJ wird auch durch die Phänotypen von Knockout-Mäusen untermauert: z.B. schwerer transepidermaler Wasserverlust bei Fehlen von *Cldn1* führt zum Tod nach der Geburt (Furuse et al., 2002); Fehlen von *Cldn5* führt zum Zusammenbruch der Bluthirnschranke für kleine Moleküle und ebenfalls zum Tod kurz nach der Geburt (Nitta et al., 2003).

In vielen Tumoren sind Claudine fehlreguliert (Kwon, 2013). Einerseits wurde angenommen, dass eine verminderte Claudin-Expression in Verbindung mit dem Verlust der TJ-Funktion und der Zelladhäsion zur Tumorprogression, Dedifferenzierung und Invasivität der Tumorzellen beiträgt. Andererseits wird in den meisten Studien eine Hochregulation von Claudinen in Tumoren berichtet (Long et al., 2001; Rangel et al., 2003; Hewitt et al., 2006). So zeigen Brust-, Kolon- und Pankreastumore oft eine Hochregulation von *Cldn3* und *Cldn4* (Michl et al., 2001; Kominsky et al., 2004; Nichols et al., 2004; de Oliveira et al., 2005). Claudine, die in Tumoren überexprimiert sind, tragen nicht notwendigerweise zur TJ-Funktion bei. In humanen kolorektalen Tumoren z.B. sind *Cldn1*, -3 und -4 hochreguliert, aber die TJ-Ultrastruktur ist gestört und die parazelluläre Solut-Permeabilität ist erhöht (de Oliveira et al., 2005). Es wird angenommen, dass die erhöhte Expression und Fehllokalisierung bestimmter Claudine die Tumorprogression durch positive Effekte auf Zellmigration, Invasion und Metastasierung unterstützt (Boireau et al., 2007; Lioni et al., 2007).

### 1.4 Tight Junctions der Bluthirnschranke

Im Vergleich zu epithelialen TJs sind endotheliale TJs in den meisten Geweben für Solute wesentlich durchlässiger (Kazakoff et al., 1995; Günzel und Fromm, 2012). Demgegenüber bilden die TJs der Gehirnkapillarendothelzellen, die die Bluthirnschranke bilden, mit einem transendothelialen Widerstand (TER) von ca. 2000-8000  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  (Crone und Olesen, 1982; Smith und Rapoport, 1986) eine der dichtesten parazellulären Barrieren im Körper. Interessanterweise wird *Cldn5* im Vergleich zu anderen Claudinen in allen Endothelien unabhängig von deren parazellulären Dichtigkeit mit Abstand am stärksten exprimiert (Morita et al., 1999; Nitta et al., 2003; Ohtsuki et al., 2008). Die Überexpression von *Cldn5* in epithelialen Zellen führt zur Abdichtung gegenüber Ionen und anderer kleiner Solute (Wen et al., 2004; Amasheh et al., 2005; Piehl et al., 2010). Die Claudin-5-Knockout-Maus zeigt eine stark erhöhte parazelluläre Permeabilität für Moleküle kleiner 800 Da (Nitta et al., 2003). Diese Studien demonstrierten eindeutig die Fähigkeit von *Cldn5* zur parazellulären

Abdichtung. Allerdings führt eine starke Cldn5-Expression in Endothelzellen, wie bereits erwähnt, nicht zwangsläufig zur Ausbildung dichter TJs, so wie in der Bluthirnschranke oder der Bluthodenschranke (Kamimura et al., 2002). Die Barrierefunktion von Gehirnkapillarendothelzellen nimmt *in vitro* ohne Kokultivierung mit Astrozyten und Perizyten stark ab, was dafür spricht, dass die Mikroumgebung der Endothelzellen *in vivo* (die Neurovaskuläre Einheit) entscheidend für die Ausbildung sehr dichter endothelialer TJs ist (Nakagawa et al., 2009). Welche strukturellen Komponenten der TJ neben Cldn5 dafür verantwortlich sind, ist unklar. Es ist davon auszugehen, dass wie in Epithelzellen weitere transmembranäre TJ-Proteine daran beteiligt sind, einen abdichtenden Multiproteinkomplex zu bilden. TAMPs werden ebenfalls in der Bluthirnschranke, aber auch in anderen Endothelzellen exprimiert (Haseloff et al., 2015). Demgegenüber gab es zu Beginn der vorliegenden Arbeit Hinweise, dass Endothelzellen der Bluthirnschranke im Gegensatz zu denen der meisten anderen Blutgefäße Cldn1, -3 und -12 exprimieren (Wolburg und Lippoldt, 2002; Nitta et al., 2003). Insbesondere die Beteiligung von Cldn3 an der Abdichtung der Bluthirnschranke wurde durch mehrere Hinweise auf eine regulierte Expression von Cldn3 im Gehirn und den Verlust von Cldn3 unter pathologischen Bedingungen nahegelegt (Wolburg et al., 2003; Liebner et al., 2008). Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde analysiert, inwiefern Interaktionen zwischen Cldn1, -3, -5 und -12 zu den Bluthirnschranken-typischen Eigenschaften der TJs beitragen könnten.

### **1.5 Tight Junction als Angriffspunkt zur Verbesserung der Wirkstoffaufnahme**

Die Wirkung potentieller Medikamente wird häufig durch die limitierte Fähigkeit ihrer Wirkstoffe, Gewebearrieren zu überwinden und ihre Zielstruktur zu erreichen, eingeschränkt. Verschiedene Ansätze werden verfolgt, um die transzelluläre Wirkstoffaufnahme zu verbessern (Upadhyay, 2014). Eine alternative Strategie versucht, die parazelluläre Passage von Wirkstoffen über eine zeitlich und örtlich begrenzte Öffnung der TJ zu verbessern (Deli, 2009; Tscheik et al., 2013). Dieser Ansatz hat den Vorteil, dass die Wirkstoffaufnahme für strukturell unterschiedliche Substanzen verbessert wird und dass es nicht nötig ist, den Wirkstoff selbst zu modifizieren. Verschiedene Absorptions-Verstärker wurden verwendet, um die TJ zu öffnen und die Wirkstoffaufnahme im Darm oder über die Haut zu verbessern. Im Gegensatz zu diesen generellen Absorptionsverstärkern ist die C-terminale Domäne des *Clostridium perfringens*-Enterotoxins (cCPE) ein Claudin-selektiver TJ-Modulator (Kondoh, 2006). cCPE bindet an eine Untergruppe von Claudinen, die cCPE-Rezeptoren, z.B. von Cldn3 und Cldn4, und öffnet die TJs in einer reversiblen Weise (Veshnyakova et al., 2010). Daher ist cCPE ein guter Kandidat, um eine effektive, reversible und Gewebe-spezifische TJ-Modulation zu erzielen.

### **1.6 *Clostridium perfringens*-Enterotoxin als Werkzeug zur Strukturanalyse und Modulation der Claudine**

Das *Clostridium perfringens*-Enterotoxin (CPE) verursacht die gastrointestinalen Symptome der *Clostridium perfringens*-Typ A-Lebensmittelvergiftung, die eine der häufigsten lebensmittelbedingten Krankheiten in den USA und Europa darstellt. Zudem sind häufig Nutztiere von CPE-verursachten gastrointestinalen Krankheiten betroffen (McClane, 2001; Smedley und McClane, 2004). Vegetative *Clostridium perfringens*-Bakterien, die mit der

Nahrung aufgenommen werden, setzen während der Sporenbildung im Darm CPE frei, das anschließend an Claudine bindet, die im Dünndarmepithel exprimiert werden (Miyakawa et al., 2005). Zu diesen CPE-Rezeptoren zählen vor allem Cldn3 und Cld4. Nachdem die C-terminale Domäne des CPE (cCPE) an die Claudine gebunden hat, wird unter Beteiligung der N-terminalen Domäne von CPE eine Pore in der Plasmamembran der Mukosazelle gebildet, durch die es zum Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  sowie Flüssigkeits- und Elektrolyt-Verlust kommt. Dies führt je nach CPE-Konzentration zum Zelltod der Epithelzellen über Nekrose oder Apoptose und zu den klinischen Symptomen der CPE-Vergiftung (Miyakawa et al., 2005).

cCPE (AS 194-319) allein ist nicht zytotoxisch, jedoch in der Lage, an bestimmte Claudine zu binden und dadurch die TJs zu öffnen. Die Behandlung von epithelialen Zellschichten mit cCPE erhöht die parazelluläre Permeabilität für Solute bis 10 kDa (Sonoda et al., 1999) und verstärkt die Wirkstoffaufnahme im Ratten-Jejunum um das 400fache im Vergleich zum klinisch verwendeten Na-Caprat (Kondoh et al., 2005). cCPE entfernt spezifisch Cldn4 aus den TJs ohne die Verteilung von Cldn1, das kaum an cCPE bindet, zu verändern (Sonoda et al., 1999). Diese Claudin-subtyp-spezifische TJ-Öffnung durch cCPE verläuft viel langsamer als die zytotoxische Porenbildung durch das Vollängen-CPE und ohne Veränderung der Membranintegrität der Plasmamembran. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde cCPE, das nicht toxisch ist, als pharmakologisches Werkzeug zur TJ-Modulation zwecks Verbesserung der Wirkstoffaufnahme über Gewebearrieren und das toxische CPE zur Behandlung von Claudin-überexprimierenden Tumoren vorgeschlagen (Veshnyakova et al., 2010).

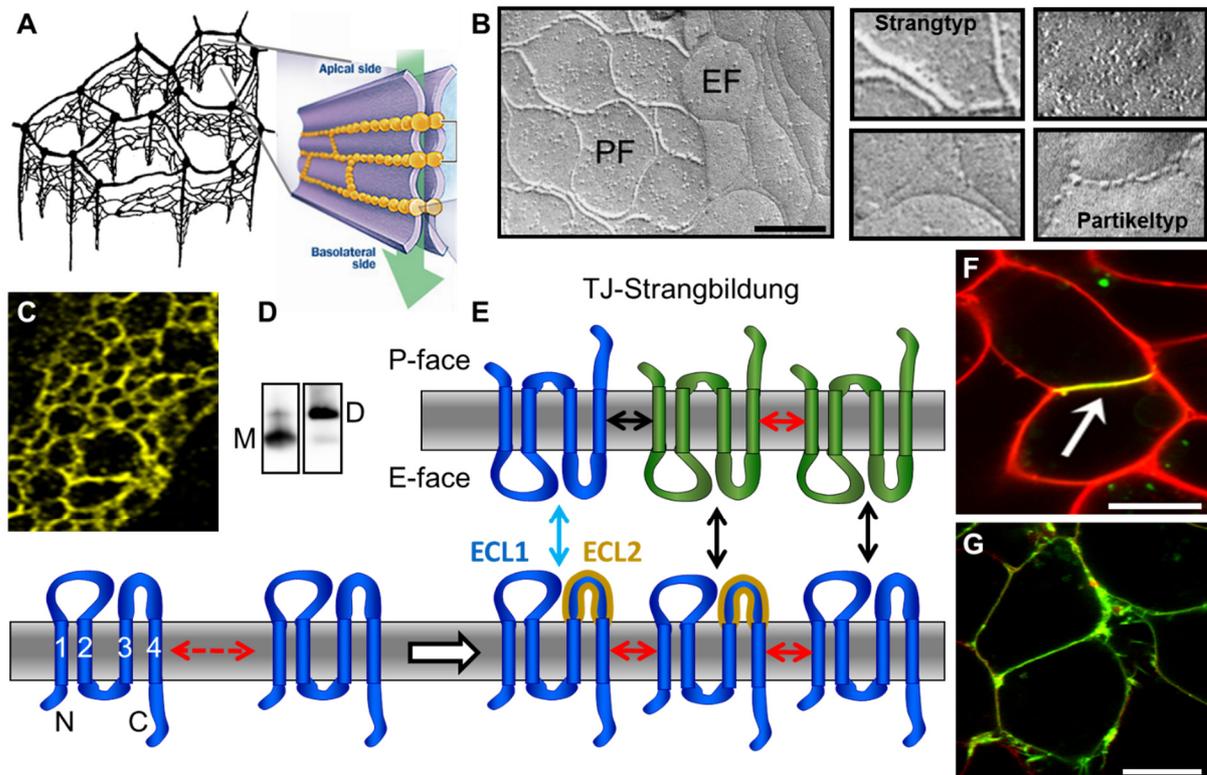
Zu Beginn der Arbeit war bekannt, dass cCPE unter Beteiligung der Aminosäurereste 290-319 an Cldn3, -4, -6, -7, -8 und -14 bindet und es wurde vermutet, dass es nicht an andere Claudine bindet. Zudem war bekannt, dass die zweite extrazelluläre Schleife (EZS2) von Cldn3 für dessen Interaktion mit cCPE essentiell ist (Fujita et al., 2000). Details zum molekularen Mechanismus der cCPE-Claudin Interaktion waren jedoch nicht bekannt. Dieser Interaktionsmechanismus wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher analysiert (Winkler et al., 2009; Veshnyakova et al., 2012b; Protze et al., 2015), auch indem die Kristallstruktur von cCPE (Van Itallie et al., 2008) genutzt wurde. Hierrüber sollten einerseits Informationen über den Pathomechanismus von CPE und andererseits über die unbekannt Struktur der Claudine gewonnen werden. Des Weiteren war es unser Ziel, ein besseres Verständnis des molekularen Mechanismus der cCPE-Claudin-Interaktion zu nutzen, um cCPE-Varianten zu entwickeln, die als Claudin-subtyp-spezifische und somit gewebespezifische Claudin-Modulatoren zur Verbesserung der Wirkstoffaufnahme eingesetzt werden könnten.

## **1.7 Methoden**

### **1.7.1 Zelluläre Rekonstitution von Tight Junctions**

Die biochemische und biophysikalische Analyse von TJ-Strängen ist stark durch deren Sensitivität gegenüber Detergenzien limitiert, welche eine Solubilisierung oder *in vitro*-Rekonstitution von intakten TJ-Strängen bisher verhinderte. Im Gegensatz dazu ist z.B. die Solubilisierung intakter Connexone aus zellulären Gap Junctions leicht möglich (Stauffer et al., 1991). Zur Überwindung dieser Limitierung wurden – aufbauend auf Experimenten von

Furuse et al. (Furuse et al., 1999) – Methoden etabliert, um die Assemblierung von Claudinen zu TJ-Strängen in einer nativen zellulären Umgebung zu analysieren.



**Abb. 1** Analyse der TJ-Strangbildung. **(A)** TJs bilden ein gürtelartiges Netzwerk aus TJ-Strängen um Epithelzellen (Menco, 1988, modifiziert). Claudine (gelb) bilden das Rückgrat dieser TJ-Stränge. **(B)** Visualisierung der TJ-Stränge durch Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie. Balken 200 nm; PF, protoplasmatische Seite (face); EF, exoplasmatische Seite. Morphologisch können zwei Strangtypen unterschieden werden: "Kontinuierliche Stränge" auf der PF und "Partikeltyp" mit Partikelreihen auf der EF (Staehein, 1974; Furuse et al., 1998b; Rossa et al., 2014a). **(C)** Visualisierung von Cldn5-Strängen durch Superresolution-Lokalisationsmikroskopie mit einer Lokalisationsgenauigkeit von ~20 nm (Kaufmann et al., 2012). **(D)** Differenzielle Dimerisierungseigenschaften wurden mittels blau-nativer Gelelektrophorese untersucht. M, Monomer; B; Dimer. **(E)** Schema der TJ-Strangbildung: TJ-Stränge werden durch cis-Interaktionen (rote Pfeile) und trans-Interaktionen (blaue Pfeile) zwischen Claudinen (blaue Piktogramme) gebildet. Claudine (blau, grün) interagieren in homophiler (rote und blaue Pfeile) und teilweise in heterophiler (schwarze Pfeile) Weise (Piontek et al., 2011). **(F)** Anreicherung von Cldn5-YFP (gelb, Pfeil) an Kontakten zwischen Cldn5-exprimierenden HEK-Zellen (Plasmamembran in rot) als Indikator einer trans-Interaktion; Balken 5 µm. **(G)** Das Fehlen der Kontaktanreicherung einer Claudin-Mutante weist auf eine Blockierung der trans-Interaktion hin; Balken 5 µm.

TJ-Stränge (Abb. 1A, B) wurden in der TJ-freien Zelllinie HEK293 rekonstituiert, indem Claudinkonstrukte mit C-terminalen YFP- oder GFP-Tags transfiziert wurden. In diesem System kann die TJ-Strangbildung (Abb. 1E) unabhängig von endogenen Claudinen und TJ-regulierenden Proteinen, die über PDZ-Domänen verfügen, analysiert werden. Trans-Interaktionen zwischen Claudinen wurden über die Anreicherung der Claudine an Kontakten zwischen Claudin-exprimierenden Zellen (nachfolgend als *Kontaktanreicherung* bezeichnet) mittels Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) lebender Zellen detektiert (Abb. 1F, G) (Piontek

et al., 2008). Kokulturen von HEK293-Zellen, die zwei verschiedene Claudin-C/YFP-Konstrukte exprimieren, wurden zur Analyse heterophiler *trans*-Interaktionen verwendet (Piontek et al., 2011). Eine räumliche Nähe von Claudinen innerhalb einer Membran als Indikation für *cis*-Interaktionen wurde über FRET-Assays getestet (Blasig et al., 2006). Verschiedene TJ-freie Zelllinien wurden verwendet, wobei mit HEK293-Zellen die beste experimentelle Effizienz und Datenkonsistenz erzielt wurde. Dieser Rekonstitutionsansatz wurde verwendet, um die heterophile Kompatibilität von Claudinen, die in zerebralen Schranken exprimiert werden, und Sequenzdeterminanten der TJ-Strangbildung zu analysieren (Piontek et al., 2008; Piontek et al., 2011; Rossa et al., 2014a; Rossa et al., 2014b).

Zudem wurde die Oligomerisierung von solubilisierten Claudinen mittels blau-nativer Gelelektrophorese ([Abb. 1D](#)) und FRET-Assays mit Lysaten Claudin-transfizierter Zellen analysiert (Rossa et al., 2014a).

### 1.7.2 Elektronenmikroskopische Analyse der TJ-Ultrastruktur

TJ-Stränge können mittels Gefrierbruch-EM eindeutig identifiziert und morphologisch charakterisiert werden. Hierbei wird die Lipiddoppelschicht der Membranen der Zellen in die protoplasmatische (P-face) und exoplasmatische (E-face) Hälfte getrennt und die Membranproteine werden als Intramembranpartikel sichtbar (Piontek et al., 2008) ([Abb. 1B](#)). TJs sind die einzigen zellulären Strukturen, die hierbei als verzweigtes Netzwerk linear angeordneter Intramembranpartikel mit einem Durchmesser von ca. 10 nm zu finden sind (Staehelin, 1974). Die Komplexität und Morphologie dieses TJ-Netzwerks unterscheidet sich in den verschiedenen Geweben und korreliert teilweise mit parazellulären Barriereigenschaften. Vor allem Diskontinuitäten in dem Netzwerk größer 25 nm sind häufig bei pathologisch erhöhter parazellulärer Permeabilität für Solute zu finden (Zeissig et al., 2007). Zwei TJ-Strangtypen können unterschieden werden ([Abb. 1B](#)). Der *kontinuierliche Strangtyp* ist in vielen, aber nicht allen Epithelien zu finden und zeichnet sich durch nicht unterbrochene Fibrillen oder Stränge mit Partikeln auf der P-face und komplementären Furchen auf der E-face aus. Demgegenüber findet man vor allem in Endothelien den *Partikeltyp*, bei dem Partikel wie Perlen auf einer Kette in einem Abstand von 10-40 nm aneinandergereiht sind (Furuse et al., 1998b; Rossa et al., 2014a). Diese unterschiedlichen Typen korrelieren jedoch nicht eindeutig mit bestimmten Barriereigenschaften. Allerdings zeigen TJs der Bluthirnschranke im Vergleich zu denen anderer Endothelien entwicklungsabhängig eine wesentlich höhere Assoziation der Partikel mit der P-face. Hier korreliert die P-face-Assoziation mit der Dichtigkeit der Barriere (Kniesel et al., 1996). TJ-Stränge, die durch Cldn5-Expression rekonstituiert wurden, zeigen E-face-assoziierte Partikel, entsprechende Cldn3-Stränge jedoch eine P-face-Assoziation. Daher und aufgrund der unter 1.4. erwähnten Korrelation von Cldn5/-3-Koexpression und Dichtigkeit war unsere Arbeitshypothese, dass Cldn3 und Cldn5 in der ausdifferenzierten Bluthirnschranke kopolymerisieren und damit ultrastrukturell zu einer gemischten P-/E-face-Assoziation der TJ-Partikel und funktionell zu einer hohen Dichtigkeit führen, was im Rahmen dieser Arbeit überprüft wurde (Piontek et al., 2011; Rossa et al., 2014a).

Des Weiteren wurde mittels supraauflösender Lokalisationsmikroskopie ein EM-unabhängiges Verfahren zur Analyse der Zusammensetzung und Morphologie von TJ-Strängen etabliert (Kaufmann et al., 2012) (Abb. 1C).

### **1.7.3 Untersuchung der Abdichtungsfunktion von Claudinen**

Zur Analyse der Abdichtungsfunktion von Claudinen wurden Claudin-Konstrukte und entsprechende Vektorkontrollen in polare epitheliale MDCK-Zellen stabil transfiziert. Diese Zellen verfügen über endogene funktionsfähige TJs. Die potentielle Veränderung der parazellulären Barriere-Eigenschaften dieser Zellen in Abhängigkeit der Expression eines exogenen Claudins gilt als Standardverfahren zur funktionellen Charakterisierung des entsprechenden Claudins (Günzel und Yu, 2013). Zuerst wurde die Expression des Claudin-Konstrukts über Westernblot und dessen Einbau in die TJ über LSM sichergestellt. Anschließend wurde zum einen der TER als reziprokes Maß für die Ionenpermeabilität gemessen. Zum anderen wurde der Flux von parazellulären Permeabilitätsmarkern verschiedener Größe (Fluoreszein (332 Da) und 10 kDa FITC-Dextran) gemessen und daraus die Permeabilität für diese Moleküle nach Standardformeln bestimmt und auf diese Weise die Abdichtungsfunktion von Cldn5- (Piehl et al., 2010) und Cldn1-Konstrukten (Veshnyakova et al., 2012a) beurteilt.

### **1.7.4 Bioinformatische Methoden**

Zu Beginn des Projekts waren weder die Struktur eines Claudins noch Sequenzdeterminanten für die Interaktionen zwischen Claudinen bekannt. Daher wurden die experimentellen Ansätze mit bioinformatischen Methoden kombiniert, um Struktur- und Interaktionsvorhersagen zu treffen (Piontek et al., 2008). Alignments von Aminosäuresequenzen wurden verwendet, um erstmals zwei Claudinuntergruppen aufgrund von Sequenz-Struktur-Funktionsbeziehungen zu definieren, klassische und nicht-klassische Claudine (Krause et al., 2008). Homologie-Modellierung wurde verwendet, um erste experimentell gestützte Claudinstrukturmodelle zu generieren (Krause et al., 2009; Winkler et al., 2009; Veshnyakova et al., 2012b). Nach Veröffentlichung einer Claudin-Kristallstruktur (Suzuki et al., 2014) wurden detaillierte Homologiemodelle unter Verwendung von Cldn15 als *Template*-Struktur generiert (Rossa et al., 2014b; Krause et al., 2015; Protze et al., 2015).

## 1.8 Fragestellungen und Ziele dieser Arbeit

Die parazelluläre Barriere- und Transportfunktion in Epithelien und Endothelien wird durch TJs reguliert. Die Ausgangsfrage dieser Arbeit war, wie TJ-Strängen auf molekularer Ebene organisiert sind und wie Claudine als deren Hauptkomponenten miteinander interagieren, um die barrierebildenden polymeren TJ-Stränge zu bilden. Der Fokus der Projekte lag hierbei auf den Claudinen, die in zerebralen Schranken (Bluthirnschranke und Blut-CSF-Schranke) exprimiert werden (Cldn1, -2, -3, -5 und -12; Ohtsuki et al., 2008). Die Struktur/Funktionsbeziehung dieser transmembranären TJ-Proteine sollte in zellbiologischen Studien untersucht werden. Die Hauptziele waren:

(i) Etablierung einer molekularbiologischen, zellbiologischen und bioinformatischen Methodik zur Aufklärung der molekularen Architektur der TJ-Stränge

Hierüber sollten identifiziert werden:

- Claudin-Paare, die heterophile *trans*- und/oder *cis*-Interaktionen eingehen können
- Sequenzdeterminanten der Claudinfaltung, der homo- und heterophilen *trans*- und *cis*-Interaktionen zwischen Claudinen und der Ultrastruktur homo- und heteropolymerer TJ-Stränge
- Sequenzdeterminanten der Claudin-CPE-Interaktion

(ii) Exemplarischer Nachweis, dass identifizierte Interaktionsdeterminanten die Barrierefunktion der Claudine in funktionellen TJs bestimmen

(iii) Ableitung von molekularen Strukturmodellen von Protomeren (Untereinheiten) und Oligomeren der Claudine zerebraler Schranken; Ableitung schematischer Modelle für polymere TJ-Stränge

Die Ergebnisse sollen dazu dienen,

- die membranäre Polymerisation von TJ-Proteinen auf molekularer Ebene und damit die strukturelle Basis der Regulation der parazellulären Permeabilität besser zu verstehen
- Vorarbeiten zur zielgerichteten therapeutischen Manipulation von Organschranken z.B. zur Verbesserung der Wirkstoffaufnahme über die Bluthirnschranke zu leisten. So könnten z.B. CPE-Fragmentvarianten entwickelt werden, die an definierte Claudine binden und eine selektive und reversible Öffnung der TJs bewirken.

## 2. Eigene Arbeiten

### 2.1 Tight Junction-Bildung: Determinanten der homophilen Interaktion zwischen klassischen Claudinen

Originalarbeit: **Piontek J\***, Winkler L\* (\*shared first authorship), Wolburg H, Muller SL, Zuleger N, Piehl C, Wiesner B, Krause G, Blasig IE (2008) Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J.* 22(1): 146-158. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.07-8319com>

Ergänzende Informationen sind als Supplement verfügbar unter:  
<http://www.fasebj.org/content/22/1/146/suppl/DC1>

Zu Beginn der Arbeit war die Struktur der Claudine unbekannt und der Mechanismus der Assemblierung von Claudinen in TJs weitgehend unklar. Zunächst wurden Methoden etabliert, um die Claudin-Assemblierung in einer nativen zellulären Umgebung analysieren zu können (Blasig et al., 2006; Piontek et al., 2008):

Aufbauend auf Pionierarbeiten von Mikio Furuse (Furuse et al., 1998a) wurde die Rekonstitution von TJ-Strängen in der TJ-freien Zelllinie HEK293 durch Transfektion mit C-terminal-YFP-markierten Claudinkonstrukten adaptiert. In diesem System kann die TJ-Strangbildung unabhängig von endogenen TJ-Proteinen analysiert werden. Als Maß für die *Trans*-Interaktion zwischen Claudinen wurde die Anreicherung von Claudinen an Kontakten zwischen lebenden Claudin-exprimierenden Zellen mittels LSM quantifiziert („*Kontakt-Anreicherung*“). TJ-Stränge und deren Morphologie wurden durch Gefrierbruch-EM detektiert. Als Indikator einer *cis*-Interaktion wurde die räumliche Nähe von Claudinen innerhalb einer Membran über FRET-Assays quantifiziert.

Dieser Ansatz wurde zusammen mit einer systematischen Mutagenese verwendet, um für Cldn5, das für die Abdichtung der Bluthirnschranke essentiell ist, zu zeigen, dass dessen EZS2 eine zentrale Rolle bei der Bildung von TJ-Strängen hat. Nach der Mutagenese erhielten wir drei Phänotypen: Ein *TJ-Typ* mit Wildtyp-ähnlicher *trans*- und *cis*-Interaktion, ein *Disjunction-Typ* mit blockierter *trans*-Interaktion und ein fehlgefalteter *Intrazellulär-Typ*. Die experimentellen Daten wurden mit molekularer Modellierung kombiniert, um Aminosäurereste in der EZS2 von Cldn5 zu identifizieren, die an der Proteinfaltung (z.B. K157) und an intermolekularen Interaktion (F147, Y148, Q156, Y158, E159) beteiligt sind. Es wurde ein erstes Homologiemodell der Struktur der EZS2 von Cldn5 und ein antiparalleles Homodimer-Modell der EZS2 mit einem aromatischen Bindungskern abgeleitet.

Diese Daten lieferten erstmals einen Ansatz einer Erklärung, wie Claudine aneinander binden, um den parazellulären Raum zu verengen. Fast alle Interaktions-relevanten Reste sind innerhalb der Gruppe der ebenfalls im Rahmen der Arbeit beschriebenen Gruppe der *klassischen Claudine* (Krause et al., 2008) konserviert. Daher sind die Ergebnisse dieser Studie von genereller Relevanz für alle klassischen Claudine. Auf der Grundlage dieser Daten wurde ein neuartiges molekulares Konzept der TJ-Bildung entwickelt.

## 2.2 Molekulare Determinanten der Interaktion zwischen Claudin-3 und Fragmenten des *Clostridium perfringens*-Enterotoxins

Originalarbeit: Winkler L, Wenzel A, Gehring C, Piehl C, Mueller SL, Krause G, Blasig IE, **Piontek J** (2009) Molecular determinants of the interaction between *Clostridium perfringens* enterotoxin fragments and claudin-3. *J. Biol. Chem.* 284(28): 18863-18872. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.008623>

Ergänzende Informationen sind als Supplement verfügbar unter:  
<http://www.jbc.org/content/284/28/18863/suppl/DC1>

Aufbauend auf das EZS2-Strukturmodell von Cldn5 wurde die Struktur-Funktionsanalyse auf den EZS2 anderer klassischer Claudine ausgedehnt, und zwar zunächst auf Cldn3, da es Hinweise dafür gab, dass Cldn3 ähnlich wie Cldn5 für die Integrität der Bluthirnschranke von Bedeutung ist (Wolburg et al., 2003). Zudem fungiert Cldn3 wie einige, aber nicht alle anderen klassischen Claudine, in der Darmmukosa als Rezeptor für das *Clostridium perfringens*-Enterotoxin (CPE). Es war bekannt, dass diese Interaktion über die EZS2 von Cldn3 vermittelt wird (Fujita et al., 2000). Unseren Homologie-Modellen zu Folge sollte sich die EZS2-Struktur von Cldn5 und Cldn3 ähneln. Daher wurde die CPE-Bindung an den EZS2 von Cldn3 und Cldn5 analysiert, um hierüber die EZS2-Modelle zu überprüfen und zu verbessern.

Zwei zuvor beschriebene Claudin-bindende CPE-Fragmente (CPE<sub>116-319</sub> und CPE<sub>194-319</sub>) wurden als rekombinante GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Mittels Peptid-Arrays konnte gezeigt werden, dass GST-CPE<sub>116-319</sub> direkt an EZS2-Peptide von Maus-Cldn-3, -6, -7, -9, und -14 aber nicht an EZS2-Peptide von 1, 2, 4, 5, 8, 10-13, 15, 16, 18-20 und 22 bindet. Über Substitutions-Peptidkartierung konnte das zentrale hydrophobe Motiv (148)NPLVP(152) in der vorhergesagten *turn*-Region des EZS2 als essentiell für die Interaktion zwischen CPE und murinen Claudin-3-Peptiden identifiziert werden. Die Beteiligung von N148 und L150 an der CPE-Bindung konnte mittels CPE-Bindungsassays mit Cldn3-transfizierten HEK293-Zellen und deren Lysaten auch für Vollängen-Cldn3 demonstriert werden. CPE<sub>116-319</sub> zeigte im Gegensatz zu CPE<sub>194-319</sub> zudem eine Bindung an Cldn5-exprimierende HEK293-Zellen. Diese konnte durch T151A- oder Q156E-Substitutionen in Cldn5 inhibiert werden. Demgegenüber verstärkte die Substitution aromatischer Seitenketten im EZS2 von Cldn3 und -5, die an der *trans*-Interaktion zwischen Claudinen beteiligt sind, die CPE-Bindung.

In der Summe bestätigte die Konsistenz der Befunde die EZS2-Homologiemodelle für Cldn3 und -5. Zudem zeigten die Daten, dass der molekulare Mechanismus der Claudin-Claudin-Interaktion von dem der CPE-Claudin-Interaktion verschieden ist. Des Weiteren wurde über LSM gezeigt, dass CPE<sub>116-319</sub> und CPE<sub>194-319</sub> Cldn-3 auf der Zelloberfläche vorwiegend außerhalb von Zell-Zellkontakten binden. Die erhaltenen Daten tragen zu einem besseren molekularen Verständnis der pathologisch relevanten CPE-Claudin-Interaktion sowie der Claudinstruktur bei und könnten für ein gezieltes Design von CPE-basierten TJ-Modulatoren z.B. zur Verbesserung der Wirkstoffaufnahme dienen.

- In zwei Folgearbeiten wurden Interaktionsflächen und die Orientierung des EZS2 von Cldn3 und Cldn4 in der Claudinbindungstasche von CPE (Veshnyakova, Piontek et al., 2012; siehe Liste ausgewählter Publikationen) und der Mechanismus, der dazu führt, dass

CPE hochaffin an Cldn3 und -4, aber nicht an Cldn1 und -5, bindet, (Protze et al., 2015; siehe Liste ausgewählter Publikationen) aufgeklärt sowie CPE-Varianten mit veränderter Claudinsubtyp-Spezifität generiert (beide Arbeiten).

### 2.3 Beteiligung der Extrazellulären Schleife 2 von Claudin-5 an der parazellulären Abdichtung gegenüber Ionen, kleiner und großer Moleküle

Originalarbeit: Piehl C\*, **Piontek J\*** (\*shared first authorship), Cording J, Wolburg H and Blasig IE (2010) Participation of the second extracellular loop of claudin-5 in paracellular tightening against ions, small and large molecules. *Cell. Mol. Life Sci.* 67(12): 2131-2140. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-010-0332-8>

Ergänzende Informationen sind als Supplement verfügbar unter:  
<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00018-010-0332-8>

Da zuvor gezeigt werden konnte, dass Aminosäurereste im EZS2 von Cldn5 an der Claudin-Claudin-Interaktion beteiligt sind (Piontek et al., 2008), sollte analysiert werden, ob diese Reste auch an der Cldn5-vermittelten parazellulären Abdichtung beteiligt sind. Hierzu wurden Cldn5-Konstrukte stabil in MDCK-II-Zellen exprimiert, die Standardzellen zur Analyse der TJ-Funktion darstellen. Lediglich Cldn5-wt, nicht aber die Mutanten R145A, Y148A, Y158A und E159Q erhöhte den transepithelialen elektrischen Widerstand (TER) und verminderte die Fluoreszein-Passage. Zudem erhöhte die Expression von Cldn5-Y148A, -Y158A oder -E159Q, nicht aber die von Cldn5-wt oder Cldn5-R145A die Permeabilität für 10 kD-Dextran. Demgegenüber war der Cldn5-Einbau in die TJ und deren Strangmorphologie für alle stabilen Zelllinien gleich.

Die Ergebnisse zeigten, dass R145 nicht essentiell für die *trans*-Interaktion von Cldn5, aber notwendig für die Abdichtung gegen kleine Solute ist. Im Gegensatz dazu tragen die zwischen klassischen Claudinen hochkonservierten Reste Y148, Y158 und E159 in EZS2 von Cldn5 grundlegend zur homo- und/oder heterophilen Interaktion zwischen klassischen Claudinen und somit zur parazellulären Abdichtung gegenüber Ionen sowie anderen kleinen und großen Solute bei. Somit lieferten die Ergebnisse neuartige Einblicke in die molekulare Funktionsweise der Tight Junctions.

- In einer weiteren Arbeit (Zhang et al., 2010; siehe Liste ausgewählter Publikationen) wurde in Zebrafischembryonen gezeigt, dass der ECL2 von Cldn5 an der parazellulären Abdichtung der zerebral-ventrikulären Barriere gegenüber Soluten und damit an der embryonalen Gehirnentwicklung beteiligt ist.

## 2.4 Aufklärung der Prinzipien der molekularen Organisation heteropolymerer Tight Junction-Stränge

Originalarbeit: **Piontek J**, Fritzsche S, Cording J, Richter S, Hartwig J, Walter M, Yu D, Turner JR, Gehring C, Rahn HP, Wolburg H, Blasig IE (2011) Elucidating the principles of the molecular organization of heteropolymeric tight junction strands. **Cell. Mol. Life Sci.** 68(23): 3903-3918. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-011-0680-z>

Ergänzende Informationen sind als Supplement verfügbar unter:  
<http://link.springer.com/article/10.1007/s00018-011-0680-z>

Um die molekulare Organisation von TJs zu analysieren, wurde die Fähigkeit der Claudine, Homo- und Heteropolymere zu bilden, untersucht. Es wurden Claudine analysiert, die in zerebralen Barrieren exprimiert werden (Cldn1, -2, -3, -5, und -12). TJ-Stränge wurden über Claudin-Transfektion von HEK293-Zellen rekonstituiert.

*cis*-Interaktionen und/oder die räumliche Nähe der Claudine wurde mittels FRET-Assays innerhalb und außerhalb von TJ-Strängen quantifiziert und wie folgt eingeordnet: Cldn5/Cldn5 > Cldn5/Cldn1 > Cldn3/Cldn1 > Cldn3/Cldn3 > Cldn3/Cldn5 und keine Interaktion für Cldn3/Cldn2. Die klassischen Claudine Cldn1, -3, und -5 zeigten im Gegensatz zum nicht-klassischen Cldn12 die Fähigkeit zur homophilen *trans*-Interaktion. Mittels Gefrierbruch-EM wurde aufgedeckt, dass Cldn12 im Gegensatz zu den klassischen Claudinen keine homopolymeren Stränge bildet. Heterophile *trans*-Interaktionen wurden in Kokulturen unterschiedlich monotransfizierter Zellen getestet. Die *trans*-Interaktion war für Cldn3/Cldn5 wesentlich schwächer ausgebildet als für Cldn3/Cldn1, Cldn5/Cldn1, Cldn5/Cldn5 oder Cldn3/Cldn3.

Die Barrierefunktion der rekonstituierten TJ-Stränge wurde über einen neuartigen Imaging-Assay demonstriert. In der Summe lieferten die Ergebnisse Hinweise dafür, dass die Bluthirnschranken-spezifische Ultrastruktur der TJs und damit die Dichtheit der parazellulären Barriere durch eine Kopolymerisierung von Cldn3-Oligomeren und Cldn5-Oligomeren in TJ-Strängen zustande kommt.

## 2.5 Die Faltung von Claudin-3 und -5 und deren Assemblierung in Tight Junctions wird durch Reste in Transmembransegment 3 und der Extrazellulären Schleife 2 bestimmt.

Originalarbeit: Rossa J, Ploeger C, Vorreiter F, Saleh T, Protze J, Günzel D, Wolburg H, Krause G, **Piontek J** (2014) Claudin-3 and claudin-5 protein folding and assembly into the tight junction are controlled by non-conserved residues in the transmembrane 3 (TM3) and extracellular loop 2 (EZS2) segments. *J. Biol. Chem.* 289(11): 7641-7653. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.531012>

Ergänzende Informationen sind als Supplement verfügbar unter:  
<http://www.jbc.org/content/289/11/7641/suppl/DC1>

Cldn3 und Cldn5 verfügen über einige Gemeinsamkeiten: Beide werden in der Bluthirnschranke exprimiert und gehören sowohl zu den klassischen als auch zu den Barriere-bildenden Claudinen. Allerdings unterscheiden sich die Ultrastrukturen der TJ-Stränge, die durch Cldn3 oder durch Cldn5 gebildet werden, fundamental. Ein Verständnis der molekularen Grundlage dieser Unterschiede könnte zur Aufklärung des Mechanismus der Claudin-Assemblierung und TJ-Bildung beitragen.

Um molekulare Determinanten der Faltung, Assemblierung und Ultrastruktur dieser klassischen Claudine zu erhalten, wurden chimäre Mutanten von Cldn3 und Cldn5 generiert. Diese wurden mittels zellulärer Rekonstitution von TJ-Strängen, konfokalem Imaging lebender Zellen und Gefrierbruch-EM analysiert. Es wurde ein umfangreiches Screening auf der Basis der funktionellen Wiederherstellung von Strandbildungs-defizienten Mutanten durchgeführt. Hierüber wurden Interaktions-relevante Reste von Cldn3 bzw. Cldn5 in verschiedenen Segmenten identifiziert, die in die Faltung und/oder die Assemblierung der Claudine involviert sind: In TM3 A127/C128, S136/C137, S138/F139, am Übergang von TM3 zur EZS2 T141/I142 und in der EZS2 N148/D149, L150/T151 und R157/Y158. Blau-native Gelelektrophorese und FRET-Assays demonstrierten eine 1%-n-Dodecyl- $\beta$ -d-Maltosid-resistente *cis*-Dimerisierung für Cldn5, jedoch nicht für Cldn3.

Es wurde gezeigt, dass diese homophile Interaktion durch Reste in TM3 stabilisiert wird. Die Daten machen es sehr wahrscheinlich, dass die Subtyp-spezifischen *cis*-Dimere Untereinheiten der polymeren TJ-Stränge darstellen und entscheidend zur Subtyp-spezifischen Ultrastruktur der TJs beitragen, die über Gefrierbruch-EM detektiert wird. Insbesondere wurde gezeigt, dass die Cldn5-ähnlichen Partikeltyp-Stränge, die mit der exoplasmatischen Seite der Membran assoziiert sind, mit der *cis*-Dimerisierung zusammenhängen. Diese Ergebnisse lieferten neuartige Einsichten in den molekularen Mechanismus der Bildung parazellulärer Barrieren: Es wurde demonstriert, dass definierte nichtkonservierte Reste in TM3 und EZS2 der klassischen Claudine zur Bildung von TJ-Strängen unterschiedlicher Ultrastruktur beiträgt.

## 2.6 Molekulare und strukturelle Transmembrandeterminanten für die Einbettung von Claudin-5 in Tight Junction-Stränge

Originalarbeit: Rossa J\*, Protze J\* (\*shared first authorship), Kern C, Piontek A, Günzel D, Krause G#, **Piontek J**# (#shared last authorship) (2014) Molecular and structural transmembrane determinants critical for embedding claudin-5 into tight junctions reveal a distinct four-helix bundle arrangement. **Biochem. J.** 464(1): 49-60. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20140431>

Ergänzende Informationen sind als Supplement verfügbar unter:

<http://www.biochemj.org/content/464/1/49.supplemental>

In dieser Arbeit wurde die Strategie, Interaktions-relevante Reste in Claudinen über die Wiederherstellung der TJ-Strangbildungsfähigkeit von Cldn3/Cldn5-Chimären weitergeführt. Mittels systematischer Mutagenese wurden Cldn5-Reste identifiziert, die an der Bildung von TJ-Strängen beteiligt sind: C128, A132, I142, A163, I166 und L174. Die experimentellen Ergebnisse wurden mit Methoden der strukturellen Bioinformatik kombiniert. Initial wurde das zuvor experimentell validierte Model des EZS2 von Cldn5 um die flankierenden Transmembran-Segmente (TM3/TM4) erweitert.

Es wurde ein *coiled-coil*-Interface identifiziert, das durch alternierende kleine und große Reste sowie *knob-into-hole*-Interaktionen, an denen die hier identifizierten Cldn5-spezifischen Reste beteiligt sind, zustande kommt. Um die Anordnung der Transmembran-Segmente in einem putativen vier-Helix-Bündel vorherzusagen, wurden Daten über evolutionär gekoppelte Aminosäure-Austausche in den Sequenzen der Mitglieder der Claudin/PMP22/MP20/EMP-Superfamilie herangezogen und vergleichende Modelle der intramolekularen Interaktionsflächen in der Transmembranregion der Claudine und schließlich des kompletten Cldn5 generiert.

Die von uns vorgeschlagenen Claudinsubtyp-spezifischen intramolekularen Interaktionsflächen, die durch konservierte *coiled-coil*-Motive und nicht-konservierte Reste in definierten TM-Positionen zustande kommen, wurden durch die kürzlich veröffentlichte Kristallstruktur von Cldn15 bestätigt. In der Summe wurden strukturelle Determinanten identifiziert, die essentiell für die Assemblierung von Claudinen in TJ-Stränge und somit entscheidend für die Bildung parazellulärer Barrieren sind.

### **3. Diskussion**

#### **3.1 Molekulare Organisation der Tight Junctions**

Die parazelluläre Barriere- und Transportfunktion von Epithelien und Endothelien wird durch TJs reguliert. Diese Arbeit hat das Ziel, dazu beizutragen, die molekulare und strukturelle Grundlage dieser Funktion besser zu verstehen. TJs wurden ultrastrukturell und funktionell erstmals Anfang der 1960er Jahre beschrieben (Farquhar und Palade, 1963). Als erstes TJ-assoziiertes Protein wurde ZO-1 (Stevenson et al., 1986) und als erstes Transmembran-TJ-Protein Occludin (Furuse et al., 1993) identifiziert. Allerdings wurden erst kurz vor der Jahrtausendwende die Mitglieder der Claudin-Familie als die Proteine identifiziert, die das transmembranäre Rückgrat der TJ bilden (Furuse et al., 1998a). Hierbei war die Gefrierbruch-EM von entscheidender Bedeutung, da durch diese Technik gezeigt werden konnte, wie ähnlich sich endogene und über Claudin-Transfektion zellulär rekonstituierte TJ-Stränge sind (StaeHELin, 1974; Furuse et al., 1998b). Über supraauflösende Lokalisationsmikroskopie konnten wir direkt einzelne Claudin-Moleküle in Netzwerken aus individuellen TJ-Strängen visualisieren sowie erstmals deren relative Moleküldichte bestimmen und eine Unterscheidung von polymerisierten und nichtpolymerisierten Claudinen erzielen (Kaufmann et al., 2012).

Seit der Entdeckung der Claudine konnte gezeigt werden, dass sich die verschiedenen Claudine in ihrem Expressionsmuster und in ihren Barriereeigenschaften deutlich unterscheiden. Zudem wurden Reste in der EZS1 identifiziert, die die Ladungsselektivität der durch bestimmte Claudine gebildeten Ionenkanäle kontrollieren. Allerdings blieben die Struktur der Claudine und der molekulare Mechanismus, über den Claudine TJ-Stränge und teilweise Ionenkanäle bilden, völlig unklar.

#### **3.2 Struktur der Claudine**

Zu Beginn der Arbeit war für kein Claudin eine 3D-Strukturinformation bekannt. Auch für andere Proteine mit signifikanter Sequenzhomologie, wie z.B. die anderen Mitglieder der Claudin/PMP22/EMP/MP20-Superfamilie, war keine Kristallstruktur verfügbar. Diese Tatsache erschwerte Struktur-Funktionsstudien erheblich. Von dem sehr ambitionierten Versuch, Vollängen-Claudine zu kristallisieren, um Strukturinformation zu erhalten, wurde Abstand genommen, da hierfür an den beteiligten Instituten keine Expertise vorhanden war und bekannt war, dass andere Gruppen diese Strategie bereits verfolgten. Allerdings wurde von Kooperationspartnern (Dr. Gerd Krause/Dr. Peter Schmieder, FMP Berlin) der Versuch unternommen, die NMR-Struktur der EZS1 von Cldn1 zu erstellen. Dieser Ansatz wurde verfolgt, da die NMR-Struktur von extrazellulären Fragmenten anderer multispan-Transmembranproteine (G-Protein-gekoppelter Rezeptoren) bereits aufgeklärt werden konnte. Diese biophysikalische Strategie war jedoch nicht erfolgreich. Daher wurde stattdessen ein indirekter Ansatz zur Strukturaufklärung gewählt – die experimentell validierte bioinformatische Strukturmodellbildung:

Claudin-basierte TJ-Stränge wurden über Claudin-Transfektion in HEK293-Zellen rekonstituiert, die über keine endogenen TJs verfügen. Nach zellulärer Rekonstitution wurden mittels systematischer Mutagenese Aminosäurereste in Cldn5 identifiziert, die an der TJ-Strangbildung der Claudine beteiligt sind. Je nach Phänotyp der Mutante, konnte ein

Einfluss des Restes auf *cis*-Interaktion, *trans*-Interaktion oder Faltung von Cldn5 abgeleitet werden. Allerdings erlaubte die indirekte Natur der konfokal- und elektronenmikroskopischen Assays keine stringente Unterscheidung zwischen direkten und indirekten Auswirkungen eines Aminosäureaustausches auf eine bestimmte Interaktion. Daher wurden die experimentellen Daten mit Methoden der strukturellen Bioinformatik kombiniert. Es wurden Fragment-basierte Homologie-Modelle der Claudinstruktur erstellt, anhand derer die Phänotypen der Mutanten erklärt werden konnten (Krause et al., 2008; Piontek et al., 2008; Krause et al., 2009). Für die EZS2 von Cldn5 wurde ein Helix-Turn-Helix-Modell generiert, das (i) den Missfaltungs-Phänotyp der Mutanten D149A, P150A, V152A, P153A, K157A, K157M, (ii) den Phänotyp der *trans*-Interaktions-Defizienz der Mutanten F147A, Y148A, Q156E, Y158A, E159Q, L160A und (iii) die Hemmung der Abdichtungsfunktion von Cldn5 durch R145A, Y148A, Y158A und E159Q erklären konnte.

Die Plausibilität des Modells haben wir auf zwei Weisen validiert: Zum einen sind die nach dem Modell strukturelevanten Reste unter der von uns in diesem Zusammenhang identifizierten Gruppe der klassischen Claudine (Krause et al., 2008) konserviert. Daher konnten wir für die klassischen Claudine, die alle TJ-Stränge bilden, ein gemeinsames Helix-Turn-Helix Modell vorschlagen (Krause et al., 2008) und für Cldn3 experimentell unterstützen (Piontek et al., 2011). Zum anderen war diese EZS2-Konformation konsistent mit unseren (Winkler et al., 2009; Veshnyakova et al., 2010; Veshnyakova et al., 2012b) und anderen (Kimura et al., 2010; Robertson et al., 2010) Studien zur Interaktion der EZS2 von Cldn3 und -4 mit CPE (siehe auch 3.3). In der Summe lieferten diese Ergebnisse das erste experimentell validierte Strukturmodell einer EZS eines multispan-TJ-Proteins. Zuvor wurde zwar ein Modell des EZS1 und der flankierenden Transmembransegmente von Cldn19 erstellt (Konrad et al., 2006), allerdings war dieses Modell zum einen nicht kompatibel mit der putativen Transmembran-Topologie der Claudine und zum anderen wurde das Modell nicht experimentell überprüft.

In einigen Studien wurden weitere Modelle der Claudinstruktur vorgeschlagen, die EZS und teilweise die Transmembransegmente umfassten. Zum Teil basierten die Modelle lediglich auf einer automatischen Modellierung mittels Webportalen ohne experimentelle und weitere bioinformatische Überprüfung (Ahmad et al., 2011). Extensivere Molekulardynamik-Studien wurden ebenfalls durchgeführt (Bhavaniprasad et al., 2013; Vippera et al., 2014), allerdings war auch hier die experimentelle Basis dieser Studien sehr begrenzt. Zumindest wurden zur Struktureingrenzung Daten über Interaktionen zwischen Claudinen und anderen Proteinen (CD81, Ephrin Typ-A Rezeptor 2 (Davis et al., 2012; Bhavaniprasad et al., 2013; Vippera et al., 2014) sowie Claudinen und Cldn1-EZS1-Peptiden (Dabrowski et al., 2015) in die Modellierung einbezogen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die begonnene Untersuchung (Piontek et al., 2008) der Claudinstruktur über Analyse rekonstituierter TJ-Stränge in HEK293-Zellen, systematischer Mutagenese und bioinformatischer Strukturmodellierung weitergeführt (Rossa et al., 2014a). Die Analyse wurde auf chimäre Cldn3/-5-Mutanten fokussiert, da sich diese beiden Claudine auf funktioneller und primärstruktureller Ebene ähneln, jedoch über unterschiedliche Oligomerisierungseigenschaften verfügen (Piontek et al., 2011; Rossa et al., 2012). Es konnten von uns Faltungs-relevante Reste in Cldn3 und -5 (Rossa et al., 2014a; Rossa et al., 2014b) sowie eine *coiled-coil*-Interaktionsfläche identifiziert und das Helix-Turn-Helix-Modell der EZS2 um die flankierenden TM3/TM4 erweitert werden. Die Anordnung der

Transmembran-Segmente in einem putativen vier-Helix-Bündel wurde unter Einbeziehung von Daten über evolutionär gekoppelte Aminosäureaustausche in der Claudin/PMP22/MP20/EMP-Superfamilie vorhergesagt (Rossa et al., 2014b).

Zum Zeitpunkt der Fertigstellung der Studien von Rossa et al. wurde – als Meilenstein der TJ-Forschung – die erste Kristallstruktur eines Claudins (mCldn15) gelöst (Suzuki et al., 2014). Diese Information ermöglicht von nun an wesentlich detailliertere Struktur-Funktionsstudien zu den Claudinen. So konnten auch unsere Strukturmodelle überprüft werden. Die Cldn15-Kristallstruktur und darauf basierende Cldn3- und Cldn5-Homologiemodelle bestätigten die rhombische Anordnung der Transmembransegmente im Uhrzeigersinn in einem linksgängigen vier-Helix-Bündel mit *coiled-coil*-Interaktionsflächen (Rossa et al., 2014b; Suzuki et al., 2014; Krause et al., 2015). Drei (TM1, 3, 4) der vier vorhergesagten partiellen *coiled-coil*-Helices stimmen in Faltung und Konformation mit der Kristallstruktur überein.

Der Vergleich der EZS2 in unserem Modell mit der EZS2 der Cldn15-Kristallstruktur ergab bemerkenswerte Ähnlichkeiten, aber auch Unterschiede. Für das Cldn5-EZS2-Modell stimmt die Rückgrat- und Seitenkettenorientierung der vorhergesagten Helix-Turn-Helix-Struktur zu 80% mit der EZS2-Konformation der Cldn15-Struktur überein (Rossa et al., 2014b; Suzuki et al., 2014; Krause et al., 2015). Dies manifestiert sich in einer paarweisen Übereinstimmung der Rückgratatompositionen der N-terminalen Helices und der Turnregion zwischen P-1 und P+3 von Modell und Struktur, was durch eine Root Mean Square Deviation (RMSD) von 0.7 Å demonstriert wird. Lediglich der kurze C-terminale  $\beta$ -Strang vor TM4, der intramolekular mit der EZS1 interagiert, wurde nicht vorhergesagt. Hierbei ist zu beachten, dass sich die Sequenzen von Cldn5 und -15 um einen Rest, der bei Cldn15 fehlt, unterscheiden. Nichtsdestotrotz stabilisiert das nachfolgende, Faltungs-sensitive (Piontek et al., 2008) Lysin an der Position P+7 (K157 in Cldn5, K155 in Cldn15) sowohl im Cldn5-Modell als auch in der Cldn15-Kristallstruktur die Turn-Konformation durch eine Wasserstoffbrücke mit Position P-1 (D149 in Cldn5, N147 in Cldn15). In der Summe wurde wesentliche Teile unserer EZS2- und TM-Modelle durch die Cldn15-Kristallstruktur bestätigt.

Die Kristallstruktur enthüllte zudem die Existenz einer zusammenhängenden extrazellulären  $\beta$ -Faltblattstruktur, zu der vier  $\beta$ -Stränge vom EZS1 und der  $\beta$ -Strang von EZS2 beitragen (Suzuki et al., 2014). Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeiten unter den klassischen Claudinen (Krause et al., 2008) kann davon ausgegangen werden, dass alle Claudine dieser Gruppe über eine ähnliche (Protomer-)Struktur verfügen.

### **3.3 Claudin-*Clostridium perfringens*-Enterotoxin-Interaktion**

Das *Clostridium perfringens*-Enterotoxin (CPE) verursacht die gastrointestinalen Symptome der *Clostridium perfringens*-Typ A-Lebensmittelvergiftung durch Bindung an CPE-Rezeptor-Claudine wie Cldn3, und -4 und anschließende Bildung von zytotoxisch wirkenden Poren in der intestinalen Mukosa-Zellmembran (McClane, 2001; Brynstad und Granum, 2002; Veshnyakova et al., 2010). Die hochaffine Bindung der nichttoxischen C-terminalen Claudin-bindenden Domäne cCPE an Cldn-3, -4, -6, -7, -8, und -14 konnte von uns bestätigt werden; darüber hinaus wurde die hochaffine Bindung an Cldn9 und eine schwache Bindung an

Cldn1 demonstriert (Winkler et al., 2009; Veshnyakova et al., 2012b; Protze et al., 2015). Auch eine schwache CPE-Bindung an Cldn2 wurde beschrieben (Kimura et al., 2010).

Unsere Peptidkartierung und zielgerichtete Mutagenese führte zur Identifizierung des CPE-Bindungsmotivs in der EZS2 der Claudine: N/D(P-1)P(P)L/M/V(P+1)V/T(P+2)P/A/D(P+3) (Winkler et al., 2009; Veshnyakova et al., 2012b; Protze et al., 2015). Dieses Motiv ist durch ein hochkonserviertes Prolin (Position P im Motiv) charakterisiert (Krause et al., 2008; Krause et al., 2015). Insbesondere die Reste an den Positionen P-1 und P+1 beeinflussen die Interaktion mit cCPE stark (Winkler et al., 2009; Kimura et al., 2010; Robertson et al., 2010).

Die Kristallstrukturen von cCPE (PDB: 2QUO), (Van Itallie et al., 2008) und von Volllängen-CPE (PDB: 2XH6, 2YHJ, Briggs et al., 2011; PDB: 3AM2, Kitadokoro et al., 2011) sind mittlerweile bekannt. In cCPE wurden Y306, Y310, Y312 und L315 als entscheidend für dessen Interaktion mit der EZS2 von Cldn4 identifiziert (Harada et al., 2007; Takahashi et al., 2008). Unter Verwendung der cCPE-Kristallstruktur, EZS2-Modellen klassischer Claudine und Mutagenesestudien wurde von uns ein detailliertes Modell der Claudin/cCPE-Interaktion für Cldn3 und Cldn4 erstellt (Veshnyakova et al., 2012b). Es konnte gezeigt werden, dass Leucin an der Position (P+1) im EZS2 in eine hydrophobe Vertiefung bindet, die durch Y306, Y310 und Y312 gebildet wird. Damit wurde die Orientierung der EZS2 in der Bindungstasche von cCPE geklärt. Zudem konnten wir zeigen, dass Cldn3 und -4 zwar in der gleichen Orientierung, jedoch mit leicht unterschiedlichen Interaktionsmodi binden (Veshnyakova et al., 2012b). Nachdem die Cldn15-Struktur gelöst worden war (Suzuki et al., 2014), wurden die cCPE-Interaktionsmodelle für Cldn3/-4 verfeinert. Hierbei hatte der Austausch der vorgeschlagenen C-terminalen Helix in EZS2 gegen den kurzen  $\beta$ -Strang des Cldn15-Templates keinen Einfluss auf die Interaktionsfläche in der EZS2-Turnregion zwischen P-1 und P+3 (Protze et al., 2015). Schließlich wurde die bereits 2012 vorhergesagte Anordnung und Orientierung der Cldn-EZS2-Turnregion in der Bindungstasche von cCPE durch die Kristallstruktur des Cldn19/cCPE<sub>S313A</sub> Komplexes bestätigt (PDB: 3X29, Saitoh et al., 2015). Des Weiteren enthüllten die Claudin-Kristallstrukturen und Homologiemodelle die Beteiligung des EZS1 an der Claudin/cCPE-Interaktion durch Vergrößerung der hydrophoben Oberfläche (Krause et al., 2015; Saitoh et al., 2015). Trotz dieser zahlreichen neuen Erkenntnisse sind noch nicht alle mechanistischen Details der CPE/Claudin-Interaktion geklärt. So verhindern Aspartat P-1 und Threonin (P+1 oder P+2) zwar die hochaffine Bindung von Cldn1 und Cldn5 (Protze et al., 2015). Es ist allerdings noch unklar, ob Asparagin an Position P-1 die EZS2-Turn-Konformation stabilisiert oder direkt mit cCPE interagiert. Zudem ist nicht für alle Reste der Bindungstasche im cCPE, die um hydrophobe Vertiefungen angeordnet sind (Veshnyakova et al., 2012b), klar, wie diese im Einzelnen mit EZS1- und EZS2-Resten interagieren.

### 3.4 Generierung von Claudin-Modulatoren

Zur Verbesserung der parazellulären Wirkstoffaufnahme über Gewebebarrieren könnten TJ-Modulatoren dienen (Tscheik et al., 2013). Diverse Absorptionsverstärker (z.B. Na-Caprat, Chitosan) können TJs öffnen und wurden zur Applikation an Darm, Haut oder Bluthirnschranke vorgeschlagen (Del Vecchio et al., 2012; Rosenthal et al., 2012; Krug et al., 2013). Des Weiteren können Alkylglycerole verwendet werden, um die Bluthirnschranke

transient zu öffnen. Der Mechanismus der durch Alkylglycerol vermittelten transienten TJ-Öffnung wurde von uns charakterisiert (Hulper et al., 2013).

Im Gegensatz zu den oben genannten Absorptionsverstärkern haben Claudin-bindende Peptide/Proteine den Vorteil, selektiv und direkt die strukturellen Komponenten der TJ zu adressieren. Cldn1-EZS1-Peptide (Mrsny et al., 2008) wurden z.B. verwendet, um die Blut-Nerven-Schranke zu öffnen (Sauer et al., 2014). cCPE ist ein Claudin-Subtyp-selektiver TJ-Modulator, der im Vergleich zu Cldn-EZS1-Peptiden bereits in einer ca. 1000fach geringeren Konzentration eine effektive TJ-Öffnung ermöglicht. Daher ist cCPE ein guter Kandidat, um eine gewebespezifische, effektive und reversible TJ-Modulation zu erzielen (Kondoh et al., 2005; Winkler et al., 2009; Veshnyakova et al., 2012b). Um die Gewebespezifität der cCPE-vermittelten TJ-Öffnung zu verbessern, wurden die mechanistische Informationen zur cCPE/Claudin-Interaktion (siehe 3.3) genutzt, um gezielt cCPE-Varianten zu entwickeln, die eine veränderte Claudin-Subtypspezifität besitzen.

Es wurden von uns Mutanten generiert, die präferenziell mit Cldn3 (cCPE<sub>L223A/D225A/R227A</sub>, cCPE<sub>R227A</sub>), Cldn4 (cCPE<sub>L254A/S256A/I258A/D284A</sub>) oder Cldn5 (cCPE<sub>Y306W/S313H</sub>) interagieren (Veshnyakova et al., 2012b; Protze et al., 2015). Parallel dazu wurde ein Phage Display verwendet (Screening von Protein-Bibliotheken, die von Phagen präsentiert werden), um einen Breitband-Claudinbinder (cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub>) zu selektionieren (Takahashi et al., 2012). Derartige cCPE-Varianten haben das Potential, als spezifische TJ-Modulatoren für Gewebe zu fungieren, in denen die entsprechenden Claudine stark exprimiert werden (Cldn5, Bluthirnschranke; Cldn1, Haut; Claudin-3 und Claudin-4, Darm). Darüber hinaus könnten die verschiedenen cCPE-Varianten auch der Diagnose diverser Tumore mit unterschiedlichem Claudin-Expressionsprofil dienen (Neesse et al., 2013). Entsprechende Vollängen-CPE-Varianten könnten zum zytotoxischen Angriff der Claudin-überexprimierenden Tumoren verwendet werden. Erste Schritte in diese Richtung wurden von uns bereits unternommen (Walther et al., 2012).

### 3.5 Assemblierung der Claudin-Protomere zu TJ-Strängen

Obwohl mittlerweile Kristallstrukturen für Cldn15 und -19 bekannt sind, ist der Mechanismus der Assemblierung von Claudin Protomeren zu TJ-Strängen weitgehend unklar. Einerseits ist zur Stabilisierung endogener TJs die intrazelluläre Interaktion der Claudine mit ZO-Proteinen notwendig (Umeda et al., 2006) und andererseits können Claudine in unpolaren Zellen unabhängig von anderen TJ-assoziierten Protein – einschließlich der ZO-Proteine – TJ-Stränge bilden (Furuse et al., 1998b; Piontek et al., 2008). Obwohl unklar ist, wie die TJ-Strangbildung durch weitere zelluläre Proteine und durch Lipide beeinflusst wird (Lingaraju et al., 2015), ist davon auszugehen, dass folgende Claudin-Claudin-Interaktionen direkt zur TJ-Strangbildung beitragen: (I) Intramolekulare Faltung in der Membran und intermolekulare Assemblierung durch (IIa) Ko- oder posttranslationale *cis*-Oligomerisierung und (IIb) Bildung polymerer Stränge durch *trans*-Interaktionen (Furuse et al., 1999; Piontek et al., 2008; Piontek et al., 2011; Koval, 2013; Krause et al., 2015).

Die meisten Epithel- und Endothelzellen exprimieren mehrere Mitglieder der Claudinfamilie, so dass es in den meisten Zellen sowohl durch homophile (zwischen gleichen Claudinen) als auch heterophile Interaktionen (zwischen verschiedenen Claudinen) zur Bildung

heteropolymerer TJ-Stränge kommt. Allerdings sind nicht alle Claudine kompatibel zueinander. Cldn1 interagiert in *trans* mit Cldn3, aber nicht mit Cldn2 (Furuse et al., 1999); Cldn16 und Cldn19 interagieren in *cis*, jedoch nicht in *trans* (Hou et al., 2008). Weitere *trans*-Inkompatibilitäten wurden für Cldn3/-4, -4/-5, -1/-4, -1/-10b und -1/-15 berichtet (Daugherty et al., 2007; Inai et al., 2010). Für Claudine, die in zerebralen Schranken exprimiert werden, konnten wir zeigen, dass die räumliche Nähe der Claudine innerhalb einer Membran wie folgt abnimmt: Cldn5/Cldn5 > Cldn5/Cldn1 > Cldn3/Cldn1 > Cldn3/Cldn3 > Cldn3/Cldn5 >> Cldn3/Cldn2. Starke homophile *trans*-Interaktionen sind für Cldn1, -2, -3 und -5, nicht aber für Cldn12 möglich. Heterophile *trans*-Interaktionen sind zwischen Cldn3/Cldn1, Cldn5/Cldn1 stärker ausgeprägt als zwischen Cldn3/Cldn5. Zudem konnte gezeigt werden, dass Cldn3/Cldn5-Heteropolymere die Bluthirnschranken-spezifische TJ-Ultrastruktur aufweisen und stärker zur Bluthirnschranke beitragen könnten als Cldn12 (Piontek et al., 2011).

In der Summe sprechen diese Untersuchungen dafür, dass das Rückgrat der TJs über Claudinsubtyp-spezifische multilaterale Interaktionen zwischen den Claudinen gebildet wird und dass zusätzlich TAMPs in diese Stränge inkorporiert werden und dadurch deren Morphologie und Funktion modifizieren (Westphal et al., 2010; Cording et al., 2013).

Der molekulare Mechanismus, über den Claudine miteinander interagieren und die Kompatibilität auf bestimmte Claudine einschränkt wird, ist jedoch unklar. Dessen Aufklärung wurde seit Beginn der Arbeit durch einen Mangel an struktureller Information über Oligomere von Claudinen oder homologen Proteinen erschwert. Lediglich für Connexin-Oligomere (Connexone), die die Gap Junction bilden, sind 3D-Strukturen mit zunehmender Auflösung seit 1999 durch Elektronen-Kristallographie (Unger et al., 1999; Oshima et al., 2007) und durch Röntgenkristallstrukturanalyse (Maeda et al., 2009) bekannt. Zwei Connexone, die zwischen den Membranen von aneinandergrenzender Zellen in *trans*-interagieren, werden durch sechs Connexine in jeder Membran gebildet. Da Connexine wie Claudine über eine tetraspan-Transmembrantopologie verfügen, oligomere Zell-Zellkontakt-Strukturen bilden und ein ähnliches Molekulargewicht besitzen, wurden diese Strukturen auch für TJ-Strukturüberlegungen herangezogen. In Gefrierbruch-Replika zeigen die Connexin-Hexamere mit einem Durchmesser von 10 nm eine ähnliche Größe wie intramembranäre TJ-Partikel (Piontek et al., 2008). Zudem wurden nach Solubilisierung von rekombinantem Cldn4 wie für Connexine ebenfalls Hexamere detektiert (Mitic et al., 2003). Diese Gemeinsamkeiten führten zu der Hypothese, dass auch Claudine hexamere Struktureinheiten bilden. Allerdings war die Größe von Claudin-Oligomeren, die in weiteren Studien detektiert wurden, sehr unterschiedlich. Diese war sowohl vom analysierten Claudin, vom verwendeten nativen Gel-Elektrophoresesystem und vom Zellmaterial abhängig (Coyne et al., 2003; Van Itallie et al., 2011). Wir erhielten mittels Blau-Nativer-Gel-Elektrophorese (BN-PAGE) von n-Dodecyl  $\beta$ -D-Maltosid (DDM)-solubilisierten Claudinen reproduzierbare und mit anderen Daten konsistente Ergebnisse (Rossa et al., 2014a). Hierüber konnten wir mittels FRET-Assays zeigen, dass Cldn5 im Gegensatz zu Cldn3 DDM-resistente *cis*-Dimere bildet. *cis*-Dimere wurde auch für Cldn2, aber nicht für Cldn4 beschrieben (Van Itallie et al., 2011). Diese und unsere Arbeiten unterstützen die Hypothese, dass Claudin-Dimere die strukturelle Grundeinheit größerer Detergenz-sensitiver Komplexe sind. Letztere könnten den 10-nm-Partikeln der TJ-Stränge entsprechen, die mittels Gefrierbruch-EM detektiert werden (Rossa et al., 2014a). Allerdings ist die DDM-resistente *cis*-Dimerisierung keine Voraussetzung für die Fähigkeit eines Claudins, TJ-Stränge zu bilden, sondern die Folge Claudinsubtyp-spezifischer Assemblierungseigenschaften. Wir konnten demonstrieren, dass

TM3 entscheidend zur *cis*-Dimerisierung der Claudine und damit zur ultrastrukturellen Morphologie der TJ-Stränge beiträgt (Rossa et al., 2014a).

### 3.6 Modelle der TJ-Strangarchitektur

Das IP39-Protein (UniProt ID: Q65Z39) von *Euglena gracilis* ist ein Mitglied der PMP-22/EMP/MP20/Claudin-Superfamilie und teilt mit Claudinen die Fähigkeit zur linearen Polymerisation in der Membran und besitzt 20% Sequenzähnlichkeit. Seine 3D-Struktur konnte über Cryo-EM von 2D-Kristallen bestimmt werden (Suzuki et al., 2013). Die sich in den Kristallen wiederholenden IP39-Trimere wurden als Grundlage für Strukturmodelle der Claudine und deren Polymerarchitektur herangezogen. Allerdings ist in der 3D-Struktur des IP39 bei einer Auflösung von  $\sim 10$  Å nur die Form des Proteins, jedoch nicht die Position einzelner Aminosäuren zu erkennen. Vor allem zeigte sich durch die Kristallstrukturen von Cldn15 (Suzuki et al., 2014) und Cldn19 (Saitoh et al., 2015), dass die Anordnung des 4-Helixbündels der Transmembran-Domäne der Claudine völlig anders ist als für IP39 (auf der Basis der Leukotrien-C4-Synthase, PDB ID: 2UUI) vorgeschlagen (Suzuki et al., 2013). Zudem ist IP39 nicht wie Claudine in *trans*-Interaktionen an Zell-Zellkontakten involviert. Demnach ist es in der Summe sehr fraglich, ob TJ-Strängen, so wie für die IP39-Polymere beschrieben, trimere Grundeinheit der Claudine zu Grunde liegen.

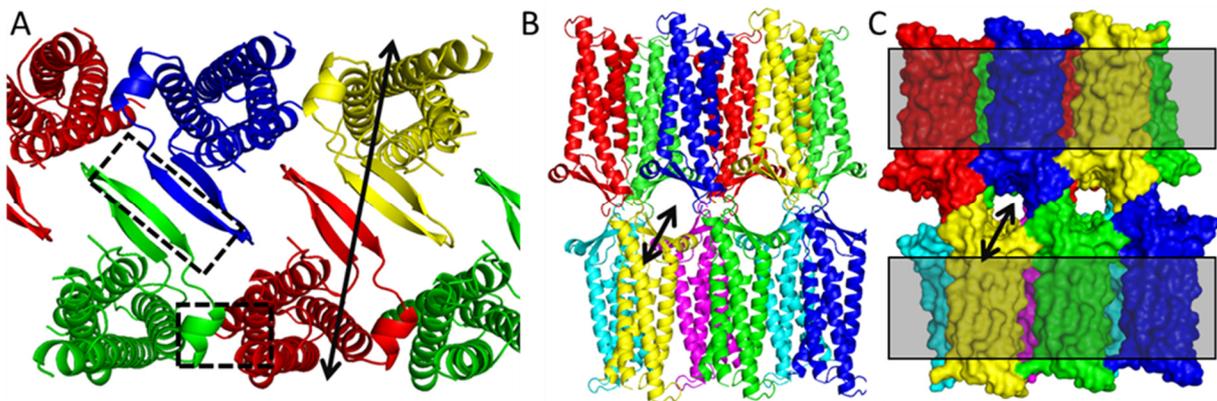
Ein Alternativmodell der TJ-Strangarchitektur wurde kürzlich auf der Basis der Cldn15-Kristalle vorgeschlagen (Abb. 2, (Suzuki et al., 2015): Die Anordnung der Cldn15-Protomere in einer Membran als antiparallele Doppelreihe mit zwei unterschiedlichen *cis*-Interaktionsflächen. Die eine (lineare) Interaktionsfläche zwischen EZS2 eines Protomers und der kurzen Helix (ECH) in EZS1 eines benachbarten Protomers ergibt sich durch die lineare Anordnung der Claudin-Protomere in der Cldn15-Kristallpackung (Abb. 2A). Auffallender Weise beinhaltet diese Interaktionsfläche EZS2-Reste (F146, F147, E157, L158) für deren korrespondierende Reste in Cldn5 und Cldn3 von uns eine essentielle Beteiligung an der TJ-Strangbildung (Piontek et al., 2008; Piontek et al., 2011) und Abdichtungsfunktionen *in vitro* (Y148, E159 in Cldn5, Piehl et al., 2010) sowie *in vivo* (Y148 in Cldn5, Zhang et al., 2010) nachgewiesen wurden. Auch in Cldn15 sind F146, F147 in EZS2 und M68 der ECH in EZS1 für die Strangbildung nötig (Suzuki et al., 2015). Diese Befunde unterstützen zwar die Annahme einer direkten EZS2-ECH *cis*-Interaktion in nativen TJ-Strängen, belegen sie allerdings nicht zweifelsfrei. Alternativ könnte diese Interaktionsfläche ein Artefakt der Proteinpackung im Kristall sein, so wie andere Protomer-Interaktionsflächen, die sowohl im Cldn15-Kristall als auch in anderen Proteinkristallen vorliegen. Die EZS2 könnte z.B. auch, so wie für Cldn5 vorgeschlagen (Piontek et al., 2008), direkt an der *trans*-Interaktion beteiligt sein.

In der Summe konnte durch die Daten, die für Mutanten von Cldn3, -5, und -15 erhaltenen wurden, zusammen mit der Cldn15-Kristallstruktur und Homologie-Modellierungen gezeigt werden, dass das unter klassischen Claudinen konservierte Motiv F, Y/F, x(9–10), E, L/I/M/F auf einer Seite der EZS2 (Abb. 2A) essentiell für eine intermolekulare Interaktion ist, die zur TJ-Strangbildung führt (Krause et al., 2015).

Die zweite (antiparallele) *cis*-Interaktionsfläche des Doppelreihenmodells wird durch Wechselwirkungen zwischen den Rändern der EZS- $\beta$ -Faltblätter von zwei antiparallel zueinander angeordneten Protomeren gebildet (Abb. 2A) (Suzuki et al., 2015). Diese

Interaktionsfläche wird durch Cystein-Crosslinking Daten gestützt, die für Cldn2 (Angelow und Yu, 2009; Li et al., 2013a) und Cldn15 (Suzuki et al., 2015) erhalten wurden.

Des Weiteren wurde von Suzuki et al. vorgeschlagen, dass sich zwei dieser „half pipe“-artigen Cldn15-*cis*-Doppelreihen in der Tight Junction an gegenüberliegenden Zellen in *trans* verbinden. Diese würde zu einer  $\beta$ -Fass-ähnlichen Struktur führen, in der ein Teil der Seitenketten zum Inneren einer Pore zeigt (Abb. 2B, C; Suzuki et al., 2015). Allerdings führt die sehr enge *trans*-Anordnung in diesem Modell zu massiven Kollisionen gegenüberliegender Reste. Zudem beinhaltet die oben beschriebene *cis*-Anordnung (Abb. 2A) keine intermolekularen Interaktionen zwischen Transmembran-Domänen der Claudine. Letztere wären jedoch aufgrund thermodynamischer Vorteile und experimenteller Hinweise (Colegio et al., 2003; Van Itallie et al., 2011; Rossa et al., 2014a) nicht unwahrscheinlich. Aufgrund dieser Unstimmigkeiten muss die Anordnung oder Konformation der Claudin-Protomere im nativen TJ-Strang zumindest teilweise vom Modell von Suzuki et al. abweichen.



**Abb. 2** . Modell eines TJ-Stranges, der durch Cldn15 gebildet wird und Ionenkanäle bildet (modifiziert nach Suzuki et al., 2015). (A) In einer Membran bildet sich eine Doppelreihe aus Cldn15-Protomeren (farbig; Cartoon ohne Seitenketten, Ansicht von extrazellulärer Seite). Diese *cis*-Anordnung verfügt über zwei verschiedene *cis*-Interaktionsflächen (gestrichelte Boxen) zwischen benachbarten Protomeren: i) Eine lineare *cis*-Interaktionsfläche (liegt in Kristallpackung vor) zwischen EZS2 und der kurzen Helix (ECH) von EZS1 (gerade Box); ii) Eine „face-to-face“-*cis*-Interaktionsfläche zwischen den Rändern der EZS- $\beta$ -Faltblätter von zwei antiparallel angeordneten Protomeren (schräge Box). Dadurch entsteht ein größeres  $\beta$ -Faltblatt, das eine „half pipe“ formt. (B) Zwei *cis*-Doppelreihen verbinden sich an gegenüberliegenden Zellen in *trans*. Die beiden „half pipes“ bilden dabei eine Pore aus (Cartoon ohne Seitenketten, Ansicht parallel zur Membran) (C) Darstellung der Oberflächen der Protomere (farbig) und der Membranen (grau). Schwarze Pfeile in A-C deuten den Verlauf der putativen Ionenpore an.

Darüber hinaus sind auch völlig andere Protomer-Anordnungen denkbar. Nichtsdestotrotz liefert dieses Model eine wertvolle Arbeitshypothese über die Architektur der TJ-Stränge, die in weiteren Studien getestet werden kann. Insbesondere die Tatsache, dass das antiparallele Doppelreihen-Arrangement der Claudin-Protomere zu einer Symmetrie und einer Größe führt, die konsistent mit der Ultrastruktur der TJ-Stränge ist, die mittels Gefrierbruch-EM visualisiert wurde (Furuse et al., 1999; Suzuki et al., 2015), ist beachtenswert. Auch eine eigene Studie, in der das *cis*-Arrangement der Claudin-Prototypen Cldn1 und Cldn3 in TJ-

Strängen über einen FRET-Ansatz bestimmt wurde, ist mit einem antiparallelen Doppelreihen-Modell vereinbar (Milatz et al., 2015).

### 3.7 Bildung von Ionenkanälen durch Claudine

Claudine können in einer Subtyp-abhängigen Weise den parazellulären Spalt für Solute und Wasser entweder abdichten oder parazelluläre Kanäle bilden. Unter den eindeutig TJ-strangbildenden Claudinen zeigen kanalbildende Claudine untereinander keine größere Sequenzähnlichkeit als kanal- und barrierebildende Claudine zueinander (Krause et al., 2008). Das spricht dafür, dass Kanal- und Barrierebildner über einen ähnlichen Mechanismus polymerisieren und sich nicht völlig in der Protomer-Anordnung der TJ-Stränge unterscheiden. So ist z.B. eine Protomer-Anordnung, ähnlich wie sie für das kanalbildende Cldn15 vorgeschlagen wurde ([Abb. 2](#); Suzuki et al., 2015), auch für Barrierebildner denkbar. *cis*- und *trans*-Interaktionsflächen könnten weitgehend ähnlich sein, lediglich ein Teil der intermolekularen Interaktion könnte unterschiedlich sein und bei den Barrierebildnern im Gegensatz zu den Kanalbildner zu einem parazellulären Verschluss führen. Zukünftige Struktur-Funktionsstudien könnten das klären. Immerhin ist schon länger bekannt, dass die Permeabilitätseigenschaften, insbesondere die Ladungs- (Colegio et al., 2003) und Größenselektivität (Li et al., 2013b) der Claudin-Kanäle, weitgehend von der EZS1 der Claudine bestimmt wird. EZS1-Reste, die die Ionenpermeabilität beeinflussen, wurden für verschiedene kanalbildende Claudine beschrieben (für einen Überblick: (Krause et al., 2015) ): R33 und R62 in Cldn10 für Anionen-Selektivität; D55 und D/E64 in Cldn15 für Ladungsselektivität; D104, D105 und E119 in Cldn16 für Kationenselektivität und H71, L75, G128 und R146 für Mg<sup>2+</sup>-Permeabilität; K65 in Cldn17 für Anionenselektivität; Y67 in Cldn2 und F66 in Cldn10b für Kationenselektivität. In Cldn2 wurde D65 als elektrostatische Interaktionsstelle für Kationen identifiziert und T32, G45, S47, M52, T56, T62, D65-S68 als porenaukleidende Reste beschrieben.

Für Barrierebildner konnten Reste identifiziert werden, die an der Abdichtung beteiligt sind: K65 in Cldn4; D38 und E53 in Cldn7. Wir konnten über den Austausch von EZS1-Resten im Barrierebildner Cldn1 durch korrespondierende Reste des Kanalbildners Cldn2 die abdichtende Wirkung von E48, S53 und D68 in Cldn1 zeigen (Veshnyakova et al., 2012a). Zudem konnten wir als erste die Beteiligung von EZS2-Resten (R145, Y148, Y158 und E159 in Cldn5) an der parazellulären Abdichtung demonstrieren (Piehl et al., 2010; Zhang et al., 2010).

Die experimentell identifizierten Permeations-sensitiven EZS1-Reste der verschiedenen Claudine wurden von uns auf die EZS1-Struktur von Cldn15 und ein entsprechendes Homologiemodell von Cldn2 kartiert. Hierüber wurde deutlich, dass sich die Permeations-sensitiven Reste auf beiden Seiten des extrazellulären  $\beta$ -Faltblatts befinden (Krause et al., 2015). Zurzeit ist unklar, ob die Pore von beiden oder nur von einer Seite des  $\beta$ -Faltblatts direkt ausgekleidet wird und die zweite Seite lediglich indirekt an der Porenbildung beteiligt ist. Eine Ableitung der multiplen Interaktionen, die zur Porenbildung führen, ist auf der Grundlage der Cldn15 Kristallstruktur nicht einfach möglich. Als ersten Schritt konnten wir durch Mutagenese, funktionelle Assays und Homologie-Modellierung für den Cldn17-Anionenkanal postulieren, dass eine hydrophile Rinne auf der Membran-abgewandten Seite des EZS  $\beta$ -Faltblatts einen Teil des oligomeren Kanals auskleidet. Zudem sprechen die Ergebnisse dafür, dass in kanal- bzw. barrierebildenden Claudinen unterschiedliche

elektrostatische Interaktionen zwischen Position 1 und Position 4 C-terminal der konservierten Disulfidbrücke (im EZS1) an Porenbildung bzw. Abdichtung beteiligt sind (Conrad et al., 2015). Allerdings sind weitere Struktur-Funktionsstudien nötig, um den strukturellen Unterschied zwischen permeablen und abdichtenden TJs und die Porenarchitektur der verschiedenen Claudine zu enthüllen.

#### 4. Zusammenfassung

Die parazelluläre Permeabilität für Solute und Wasser in Epithelien und Endothelien wird durch die Tight Junction (TJ) reguliert. TJs sind somit einerseits essentiell für die Bildung von Organschranken, andererseits limitieren sie die Wirkstoffaufnahme über Gewebearrieren, z.B. die Bluthirnschranke. Die Ultrastruktur der TJ ist durch membranäre Stränge/Fibrillen im apikalen Bereich von Zell-Zellkontakten gekennzeichnet. Die Mitglieder der Claudin-Proteinfamilie (Cldn) bilden das Rückgrat der TJ-Stränge und deren gewebespezifische Claudin-Zusammensetzung bestimmt die gewebespezifischen Barriereigenschaften der TJs maßgeblich. Allerdings ist unklar, wie TJ-Stränge auf molekularer Ebene organisiert sind und wie je nach Claudinzusammensetzung entweder parazelluläre Schranken oder Poren für Solute und Wasser gebildet werden.

Im Rahmen der vorliegenden Habilitationsarbeit wurden molekularbiologische, mikroskopische, funktionelle und bioinformatische Methoden kombiniert, um Einsichten in den molekularen Mechanismus der Bildung barrierebildender TJ-Stränge und deren Modulierbarkeit zu erzielen.

Es wurden erstmals Sequenzdeterminanten für die homophile Interaktion zwischen Claudinen identifiziert und verwendet, um zwei strukturell unterschiedliche Subgruppen (klassische und nicht-klassische Claudine) zu beschreiben. Für Cldn3 und Cldn5 wurden Interaktions-relevante Reste in Transmembransegment (TM) 3, der extrazellulären Schleife 2 (EZS2) und TM4 identifiziert. Z.B. wurde die Beteiligung von TM3-Resten an einer Claudin-subtyp-spezifischen *cis*-Dimerisierung und deren Bedeutung für die ultrastrukturelle Morphologie der TJ demonstriert. Die Interaktionsdeterminanten wurden zusammen mit Methoden der strukturellen Bioinformatik verwendet, um Homologiemodelle der unbekannt 3D-Struktur von Cldn3, Cldn5 und anderer Claudine zu erstellen und mechanistische Aspekte der Proteinfaltung und TJ-Strangbildung der Claudine zu erklären. Die kürzlich aufgeklärte Kristallstruktur von Cldn15 hat die zuvor von uns generierten Strukturmodelle in großen Teilen betätigt. In der Summe konnten wir z.B. zeigen, dass das unter klassischen Claudinen konservierte Motiv F, Y/F, x(9–10), E, L/I/M/F in der EZS2 eine Interaktion zwischen Claudinprotomeren vermittelt, die essentiell für die TJ-Strangbildung ist.

Für Cldn5 wurde die grundlegende Bedeutung der EZS2 an der Abdichtung der TJ gegenüber Soluten *in vitro* in einem epithelialen Monolayer und *in vivo* im Zebrafischembryo demonstriert. Die homo- und heterophilen *cis*- und *trans*-Interaktionen zwischen Claudinen, die in zerebralen Schranken exprimiert werden, und deren Auswirkung auf die Mobilität dieser Proteine, auf deren Fähigkeit, TJ-Stränge zu bilden, und auf deren Strang-Morphologie wurden bestimmt. Erstmals wurden einzelne Claudinmoleküle direkt in TJ-Strängen visualisiert, von nichtpolymerisierten Molekülen abgegrenzt und gezeigt, dass Cldn3 und Cldn5 die gleiche relative Moleküldichte in den TJ-Strängen besitzen.

Der molekulare Mechanismus, über den das *Clostridium perfringens*-Enterotoxin (CPE) an eine Untergruppe klassischer Claudine bindet, wurde weitgehend aufgeklärt und anschließend benutzt, um CPE-Varianten mit veränderten Claudin-Bindungseigenschaften zu generieren. Die erhaltenen Erkenntnisse zur Struktur und Organisation der TJ sowie zur CPE-Claudin-Interaktion können genutzt werden, um gezielt gewebspezifische, größenabhängige und reversible Claudin-Modulatoren zu generieren. Diese TJ-Modulatoren könnten die parazelluläre Wirkstoffaufnahme z.B. über die Bluthirnschranke erheblich verbessern.

## 5. Literaturverzeichnis

- Ahmad, W., K. Shabbiri, B. Ijaz, S. Asad, M.T. Sarwar, S. Gull, H. Kausar, K. Fouzia, I. Shahid, and S. Hassan. 2011. Claudin-1 required for HCV virus entry has high potential for phosphorylation and O-glycosylation. *Virology*. 8:229.
- Amasheh, S., T. Schmidt, M. Mahn, P. Florian, J. Mankertz, S. Tavalali, A.H. Gitter, J.D. Schulzke, and M. Fromm. 2005. Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell Tissue Res*. 321:89-96.
- Angelow, S., and A.S. Yu. 2009. Structure-function studies of claudin extracellular domains by cysteine-scanning mutagenesis. *J. Biol. Chem*. 284:29205-29217.
- Barmeyer, C., J.D. Schulzke, and M. Fromm. 2015. Claudin-related intestinal diseases. *Semin Cell. Dev. Biol*. 42:30-38.
- Bhavaniprasad, V., J.F. Prabhu Dass, and S. Jayanthi. 2013. Activation mechanism of claudin-4 by ephrin type-A receptor 2: a molecular dynamics approach. *Mol. Biosyst*. 9:2627-2634.
- Blasig, I.E., L. Winkler, B. Lassowski, S.L. Mueller, N. Zuleger, E. Krause, G. Krause, K. Gast, M. Kolbe, and J. Piontek. 2006. On the self-association potential of transmembrane tight junction proteins. *Cell. Mol. Life Sci*. 63:505-514.
- Boireau, S., M. Buchert, M.S. Samuel, J. Pannequin, J.L. Ryan, A. Choquet, H. Chapuis, X. Rebillard, C. Avances, M. Ernst, D. Joubert, N. Mottet, and F. Hollande. 2007. DNA-methylation-dependent alterations of claudin-4 expression in human bladder carcinoma. *Carcinogenesis*. 28:246-258.
- Briggs, D.C., C.E. Naylor, J.G. Smedley, III, N. Lukoyanova, S. Robertson, D.S. Moss, B.A. McClane, and A.K. Basak. 2011. Structure of the Food-Poisoning Clostridium perfringens Enterotoxin Reveals Similarity to the Aerolysin-Like Pore-Forming Toxins. *J. Mol. Biol*. 413:138-149.
- Brynstad, S., and P.E. Granum. 2002. Clostridium perfringens and foodborne infections. *Int. J. Food Microb*. 74:195-202.
- Colegio, O.R., C. Van Itallie, C. Rahner, and J.M. Anderson. 2003. Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 284:C1346-C1354.
- Conrad, M.P., J. Piontek, D. Günzel, M. Fromm, and S.M. Krug. 2015. Molecular basis of claudin-17 anion selectivity. *Cell. Mol. Life Sci*. 2015 Jul 21. [Epub ahead of print]
- Cording, J., J. Berg, N. Kading, C. Bellmann, C. Tscheik, J.K. Westphal, S. Milatz, D. Günzel, H. Wolburg, J. Piontek, O. Huber, and I.E. Blasig. 2013. In tight junctions, claudins regulate the interactions between occludin, tricellulin and marvelD3, which, inversely, modulate claudin oligomerization. *J. Cell Sci*. 126:554-564.
- Coyne, C.B., T.M. Gambling, R.C. Boucher, J.L. Carson, and L.G. Johnson. 2003. Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol*. 285:L1166-L1178.
- Crone, C., and S.P. Olesen. 1982. Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain research*. 241:49-55.
- Dabrowski, S., C. Staat, D. Zwanziger, R.S. Sauer, C. Bellmann, R. Gunther, E. Krause, R.F. Haseloff, H. Rittner, and I.E. Blasig. 2015. Redox-sensitive structure and function of the first extracellular loop of the cell-cell contact protein claudin-1: lessons from molecular structure to animals. *Antioxid. Redox. Signal*. 22:1-14.
- Daugherty, B.L., C. Ward, T. Smith, J.D. Ritzenthaler, and M. Koval. 2007. Regulation of heterotypic claudin compatibility. *J. Biol. Chem*. 282:30005-30013.
- Davis, C., H.J. Harris, K. Hu, H.E. Drummer, J.A. McKeating, J.G. Mullins, and P. Balfe. 2012. In silico directed mutagenesis identifies the CD81/claudin-1 hepatitis C virus receptor interface. *Cell Microbiol*. 14:1892-1903.
- de Oliveira, S.S., I.M. de Oliveira, W. De Souza, and J.A. Morgado-Diaz. 2005. Claudins upregulation in human colorectal cancer. *Febs Letters*. 579:6179-6185.

- Del Vecchio, G., C. Tscheik, K. Tenz, H.C. Helms, L. Winkler, R. Blasig, and I.E. Blasig. 2012. Sodium caprate transiently opens claudin-5-containing barriers at tight junctions of epithelial and endothelial cells. *Mol. Pharm.* 9:2523-2533.
- Deli, M.A. 2009. Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *Biochim. Biophys. Acta.* 1788:892-910.
- Diamond, J.M. 1977. Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence. *Physiologist.* 20:10-18.
- Farquhar, M.G., and G.E. Palade. 1963. Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.* 17:375-412.
- Fujita, K., J. Katahira, Y. Horiguchi, N. Sonoda, M. Furuse, and S. Tsukita. 2000. Clostridium perfringens enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein. *Febs Letters.* 476:258-261.
- Furuse, M., K. Fujita, T. Hiragi, K. Fujimoto, and S. Tsukita. 1998a. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.* 141:1539-1550.
- Furuse, M., M. Hata, K. Furuse, Y. Yoshida, A. Haratake, Y. Sugitani, T. Noda, A. Kubo, and S. Tsukita. 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J. Cell Biol.* 156:1099-1111.
- Furuse, M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita, and S. Tsukita. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 123:1777-1788.
- Furuse, M., H. Sasaki, K. Fujimoto, and S. Tsukita. 1998b. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J. Cell Biol.* 143:391-401.
- Furuse, M., H. Sasaki, and S. Tsukita. 1999. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J. Cell Biol.* 147:891-903.
- Gonzalez-Mariscal, L., E. Garay, and M. Quirós. 2010. Regulation of Claudins by Posttranslational Modifications and Cell-Signaling Cascades. *Curr. Top. Membr.* 65:113-150.
- Günzel, D., and M. Fromm. 2012. Claudins and other tight junction proteins. *Compr. Physiol.* 2:1819-1852.
- Günzel, D., and A.S. Yu. 2013. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol. Rev.* 93:525-569.
- Hadj-Rabia, S., L. Baala, P. Vabres, D. Hamel-Teillac, E. Jacquemin, M. Fabre, S. Lyonnet, Y. De Prost, A. Munnich, M. Hadchouel, and A. Smahi. 2004. Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology.* 127:1386-1390.
- Harada, M., M. Kondoh, C. Ebihara, A. Takahashi, E. Komiya, M. Fujii, H. Mizuguchi, S. Tsunoda, Y. Horiguchi, K. Yagi, and Y. Watanabe. 2007. Role of tyrosine residues in modulation of claudin-4 by the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin. *Biochem. Pharmacol.* 73:206-214.
- Haseloff, R.F., S. Dithmer, L. Winkler, H. Wolburg, and I.E. Blasig. 2015. Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: structural and functional aspects. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 38:16-25.
- Hewitt, K.J., R. Agarwal, and P.J. Morin. 2006. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer.* 6.
- Hou, J., A. Renigunta, M. Konrad, A.S. Gomes, E.E. Schneeberger, D.L. Paul, S. Waldegger, and D.A. Goodenough. 2008. Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J. Clin. Invest.* 118:619-628.
- Hülper, P., S. Veszeka, F.R. Walter, H. Wolburg, P. Fallier-Becker, J. Piontek, I.E. Blasig, M. Lakomek, W. Kugler, and M.A. Deli. 2013. Acute effects of short-chain alkylglycerols on blood-brain barrier properties of cultured brain endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 169:1561-1573.
- Inai, T., T. Kamimura, E. Hirose, H. Iida, and Y. Shibata. 2010. The protoplasmic or exoplasmic face association of tight junction particles cannot predict paracellular permeability or heterotypic claudin compatibility. *Eur. J. Cell Biol.* 89:547-556.

- Kamimura, Y., H. Chiba, H. Utsumi, T. Gotoh, H. Tobioka, and N. Sawada. 2002. Barrier function of microvessels and roles of glial cell line-derived neurotrophic factor in the rat testis. *Med. Electron Microsc.* 35:139-145.
- Kaufmann, R., J. Piontek, F. Grull, M. Kirchgessner, J. Rossa, H. Wolburg, I.E. Blasig, and C. Cremer. 2012. Visualization and quantitative analysis of reconstituted tight junctions using localization microscopy. *Plos One.* 7:e31128.
- Kazakoff, P.W., T.R. McGuire, E.B. Hoie, M. Cano, and P.L. Iversen. 1995. An in vitro model for endothelial permeability: assessment of monolayer integrity. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 31:846-852.
- Kimura, J., H. Abe, S. Kamitani, H. Toshima, A. Fukui, M. Miyake, Y. Kamata, Y. Sugita-Konishi, S. Yamamoto, and Y. Horiguchi. 2010. Clostridium perfringens Enterotoxin Interacts with Claudins via Electrostatic Attraction. *J. Biol. Chem.* 285:401-408.
- Kitadokoro, K., K. Nishimura, S. Kamitani, A. Fukui-Miyazaki, H. Toshima, H. Abe, Y. Kamata, Y. Sugita-Konishi, S. Yamamoto, H. Karatani, and Y. Horiguchi. 2011. Crystal structure of Clostridium perfringens enterotoxin displays features of  $\beta$ -pore-forming toxins. *J. Biol. Chem.* 286:19549-55
- Kniesel, U., W. Risau, and H. Wolburg. 1996. Development of blood-brain barrier tight junctions in the rat cortex. *Dev. Brain Res.* 96:229-240.
- Kominsky, S.L., M. Vali, D. Korz, T.G. Gabig, S.A. Weitzman, P. Argani, and S. Sukumar. 2004. Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am. J. Pathol.* 164:1627-1633.
- Kondoh, M., A. Takahashi, M. Fujii, K. Yagi, Y. Watanabe. 2006. A novel strategy for a drug delivery system using a claudin modulator. *Biol. Pharm. Bull.* 32: 1053-1059
- Kondoh, M., A. Masuyama, A. Takahashi, N. Asano, H. Mizuguchi, N. Koizumi, M. Fujii, T. Hayakawa, Y. Horiguchi, and Y. Watanabe. 2005. A novel strategy for the enhancement of drug absorption using a claudin modulator. *Mol. Pharm.* 67:749-756.
- Konrad, M., A. Schaller, D. Seelow, A.V. Pandey, S. Waldegger, A. Lesslauer, H. Vitzthum, Y. Suzuki, J.M. Luk, C. Becker, K.P. Schlingmann, M. Schmid, J. Rodriguez-Soriano, G. Ariceta, F. Cano, R. Enriquez, H. Juppner, S.A. Bakkaloglu, M.A. Hediger, S. Gallati, S.C. Neuhaus, P. Nurnberg, and S. Weber. 2006. Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *Am. J. Hum. Genet.* 79:949-957.
- Koval, M. 2013. Differential pathways of claudin oligomerization and integration into tight junctions. *Tissue Barriers.* 1: e24518.
- Krause, G., J. Protze, and J. Piontek. 2015. Assembly and function of claudins: Structure-function relationships based on homology models and crystal structures. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 42:3-12.
- Krause, G., L. Winkler, S.L. Mueller, R.F. Haseloff, J. Piontek, and I.E. Blasig. 2008. Structure and function of claudins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1778:631-645.
- Krause, G., L. Winkler, C. Piehl, I. Blasig, J. Piontek, and S.L. Muller. 2009. Structure and Function of Extracellular Claudin Domains. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1165:34-43.
- Krug, S.M., M. Amasheh, I. Dittmann, I. Christoffel, M. Fromm, and S. Amasheh. 2013. Sodium caprate as an enhancer of macromolecule permeation across tricellular tight junctions of intestinal cells. *Biomaterials.* 34:275-282.
- Krug, S.M., S. Amasheh, J.F. Richter, S. Milatz, D. Günzel, J.K. Westphal, O. Huber, J.D. Schulzke, and M. Fromm. 2009. Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol. Biol. Cell.* 20:3713-3724.
- Kwon, M.J. 2013. Emerging roles of claudins in human cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 14:18148-18180.
- Li, J., S. Angelow, A. Linge, M. Zhuo, and A.S. Yu. 2013a. Claudin-2 Pore Function Requires an Intramolecular Disulfide Bond Between Two Conserved Extracellular Cysteines. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 305:C190-6.

- Li, J., M. Zhuo, L. Pei, and A.S. Yu. 2013b. Conserved aromatic residue confers cation selectivity in claudin-2 and claudin-10b. *J. Biol. Chem.* 288:22790-22797.
- Liebner, S., M. Corada, T. Bangsow, J. Babbage, A. Taddei, C.J. Czapalla, M. Reis, A. Felici, H. Wolburg, M. Fruttiger, M.M. Taketo, H. von Melchner, K.H. Plate, H. Gerhardt, and E. Dejana. 2008. Wnt/beta-catenin signaling controls development of the blood-brain barrier. *J. Cell Biol.* 183:409-417.
- Lingaraju, A., T.M. Long, Y. Wang, J.R. Austin, 2nd, and J.R. Turner. 2015. Conceptual barriers to understanding physical barriers. *Sem. Cell. Dev. Biol.* 42:13-21.
- Lioni, M., P. Brafford, C. Andl, A. Rustgi, W. El-Deiry, M. Herlyn, and K.S. Smalley. 2007. Dysregulation of claudin-7 leads to loss of E-cadherin expression and the increased invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells. *Am. J. Pathol.* 170:709-721.
- Long, H., C.D. Crean, W.H. Lee, O.W. Cummings, and T.G. Gabig. 2001. Expression of Clostridium perfringens enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium. *Cancer Res.* 61:7878-7881.
- Maeda, S., S. Nakagawa, M. Suga, E. Yamashita, A. Oshima, Y. Fujiyoshi, and T. Tsukihara. 2009. Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature.* 458:597-602.
- Matter, K., and M.S. Balda. 2003. Signalling to and from tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:225-236.
- McClane, B.A. 2001. The complex interactions between Clostridium perfringens enterotoxin and epithelial tight junctions. *Toxicon.* 39:1781-1791.
- Menco, B.P. 1988. Tight-junctional strands first appear in regions where three cells meet in differentiating olfactory epithelium: a freeze-fracture study. *J. Cell Sci.* 89:495-505.
- Michl, P., M. Buchholz, M. Rolke, S. Kunsch, M. Lohr, B. McClane, S. Tsukita, G. Leder, G. Adler, and T.M. Gress. 2001. Claudin-4: A new target for pancreatic cancer treatment using Clostridium perfringens enterotoxin. *Gastroenterology.* 121:678-684.
- Milatz, S., J. Piontek, J.D. Schulzke, I.E. Blasig, M. Fromm, and D. Günzel. 2015. Probing the cis-arrangement of prototype tight junction proteins claudin-1 and claudin-3. *Biochem. J.* 468:449-58.
- Mitic, L.L., V.M. Unger, and J.M. Anderson. 2003. Expression, solubilization, and biochemical characterization of the tight junction transmembrane protein claudin-4. *Protein Sci.* 12:218-227.
- Miyakawa, M.E.F., V.P. Creydt, F.A. Uzal, B.A. McClane, and C. Ibarra. 2005. Clostridium perfringens enterotoxin damages the human intestine in vitro. *Infect. Immun.* 73:8407-8410.
- Morita, K., H. Sasaki, M. Furuse, and S. Tsukita. 1999. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells *J. Cell Biol.* 147:185-194.
- Mrsny, R.J., G.T. Brown, K. Gerner-Smidt, A.G. Buret, J.B. Meddings, C. Quan, M. Koval, and A. Nusrat. 2008. A key claudin extracellular loop domain is critical for epithelial barrier integrity. *Am. J. Pathol.* 172:905-915.
- Mullin, J.M., N. Agostino, E. Rendon-Huerta, and J.J. Thornton. 2005. Keynote review: epithelial and endothelial barriers in human disease. *Drug Discov. Today.* 10:395-408.
- Nakagawa, S., M.A. Deli, H. Kawaguchi, T. Shimizudani, T. Shimono, A. Kittel, K. Tanaka, and M. Niwa. 2009. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem. Int.* 54:253-263.
- Neesse, A., A. Hahnenkamp, H. Griesmann, M. Buchholz, S.A. Hahn, A. Maghnouj, V. Fendrich, J. Ring, B. Sipos, D.A. Tuveson, C. Bremer, T.M. Gress, and P. Michl. 2013. Claudin-4-targeted optical imaging detects pancreatic cancer and its precursor lesions. *Gut.* 62:1034-1043.
- Nichols, L.S., R. Ashfaq, and C.A. Iacobuzio-Donahue. 2004. Claudin 4 protein expression in primary and metastatic pancreatic cancer: support for use as a therapeutic target. *Am. J. Clin. Pathol.* 121:226-230.
- Nitta, T., M. Hata, S. Gotoh, Y. Seo, H. Sasaki, N. Hashimoto, M. Furuse, and S. Tsukita. 2003. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice *J. Cell Biol.* 161:653-660.

- Ohtsuki, S., H. Yamaguchi, Y. Katsukura, T. Asashima, and T. Terasaki. 2008. mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting. *J. Neurochem.* 104:147-154.
- Oshima, A., K. Tani, Y. Hiroaki, Y. Fujiyoshi, and G.E. Sosinsky. 2007. Three-dimensional structure of a human connexin26 gap junction channel reveals a plug in the vestibule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:10034-10039.
- Piehl, C., J. Piontek, J. Cording, H. Wolburg, and I.E. Blasig. 2010. Participation of the second extracellular loop of claudin-5 in paracellular tightening against ions, small and large molecules. *Cell. Mol. Life Sci.* 67:2131-2140.
- Piontek, J., S. Fritzsche, J. Cording, S. Richter, J. Hartwig, M. Walter, D. Yu, J.R. Turner, C. Gehring, H.P. Rahn, H. Wolburg, and I.E. Blasig. 2011. Elucidating the principles of the molecular organization of heteropolymeric tight junction strands. *Cell. Mol. Life Sci.* 68:3903-3918.
- Piontek, J., L. Winkler, H. Wolburg, S.L. Muller, N. Zuleger, C. Piehl, B. Wiesner, G. Krause, and I.E. Blasig. 2008. Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J.* 22:146-158.
- Protze, J., M. Eichner, A. Piontek, S. Dinter, J. Rossa, K.G. Blecharz, P. Vajkoczy, J. Piontek, and G. Krause. 2015. Directed structural modification of Clostridium perfringens enterotoxin to enhance binding to claudin-5. *Cell. Mol. Life Sci.* 72:1417-1432.
- Rangel, L.B., R. Agarwal, T. D'Souza, E.S. Pizer, P.L. Alo, W.D. Lancaster, L. Gregoire, D.R. Schwartz, K.R. Cho, and P.J. Morin. 2003. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. *Clin. Cancer Res.* 9:2567-2575.
- Riazuddin, S., Z.M. Ahmed, A.S. Fanning, A. Lagziel, S. Kitajiri, K. Ramzan, S.N. Khan, P. Chattaraj, P.L. Friedman, J.M. Anderson, I.A. Belyantseva, A. Forge, S. Riazuddin, and T.B. Friedman. 2006. Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. *Am. J. Hum. Genet.* 79:1040-1051.
- Robertson, S.L., J.G. Smedley, and B.A. McClane. 2010. Identification of a Claudin-4 Residue Important for Mediating the Host Cell Binding and Action of Clostridium perfringens Enterotoxin. *Infect. Immun.* 78:505-517.
- Roh, M.H., and B. Margolis. 2003. Composition and function of PDZ protein complexes during cell polarization. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 285:F377-387.
- Rosenthal, R., D. Günzel, C. Finger, S.M. Krug, J.F. Richter, J.D. Schulzke, M. Fromm, and S. Amasheh. 2012. The effect of chitosan on transcellular and paracellular mechanisms in the intestinal epithelial barrier. *Biomaterials.* 33:2791-2800.
- Rosenthal, R., S. Milatz, S.M. Krug, B. Oelrich, J.D. Schulzke, S. Amasheh, D. Günzel, and M. Fromm. 2010. Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J. Cell Sci.* 123:1913-1921.
- Rossa, J., D. Lorenz, M. Ringling, A. Veshnyakova, and J. Piontek. 2012. Overexpression of claudin-5 but not claudin-3 induces formation of trans-interaction-dependent multilamellar bodies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1257:59-66.
- Rossa, J., C. Ploeger, F. Vorreiter, T. Saleh, J. Protze, D. Guenzel, H. Wolburg, G. Krause, and J. Piontek. 2014a. Claudin-3 and Claudin-5 Folding and Assembly into the Tight Junction are controlled by Non-conserved Residues in TM3 and ECL2 Segments. *J. Biol. Chem.* 289:7641-53
- Rossa, J., J. Protze, C. Kern, A. Piontek, D. Günzel, G. Krause, and J. Piontek. 2014b. Molecular and structural transmembrane determinants critical for embedding claudin-5 into tight junctions reveal a distinct four-helix bundle arrangement. *Biochem. J.* 464:49-60.
- Saitoh, Y., H. Suzuki, K. Tani, K. Nishikawa, K. Irie, Y. Ogura, A. Tamura, S. Tsukita, and Y. Fujiyoshi. 2015. Tight junctions. Structural insight into tight junction disassembly by Clostridium perfringens enterotoxin. *Science.* 347:775-778.
- Sauer, R.S., S.M. Krug, D. Hackel, C. Staat, N. Konasin, S. Yang, B. Niedermirtl, J. Bosten, R. Gunther, S. Dabrowski, K. Doppler, C. Sommer, I.E. Blasig, A. Brack, and H.L. Rittner. 2014. Safety, efficacy, and molecular mechanism of claudin-1-specific peptides to enhance blood-nerve-barrier permeability. *J. Control. Release.* 185:88-98.

- Schneeberger, E.E., and R.D. Lynch. 2004. The tight junction: a multifunctional complex. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286:C1213-C1228.
- Simon, D.B., Y. Lu, K.A. Choate, H. Velazquez, E. Al-Sabban, M. Praga, G. Casari, A. Bettinelli, G. Colussi, J. Rodriguez-Soriano, D. McCredie, D. Milford, S. Sanjad, and R.P. Lifton. 1999. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg<sup>2+</sup> resorption. *Science.* 285:103-106.
- Smedley, J.G., III, and B.A. McClane. 2004. Fine mapping of the N-terminal cytotoxicity region of *Clostridium perfringens* enterotoxin by site-directed mutagenesis. *Infect. Immun.* 72:6914-6923.
- Smith, Q.R., and S.I. Rapoport. 1986. Cerebrovascular permeability coefficients to sodium, potassium, and chloride. *J. Neurochem.* 46:1732-1742.
- Sonoda, N., M. Furuse, H. Sasaki, S. Yonemura, J. Katahira, Y. Horiguchi, and S. Tsukita. 1999. *Clostridium perfringens* enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J. Cell Biol.* 147:195-204.
- Staehelin, L.A. 1974. Structure and function of intercellular junctions. *Int. Rev. Cytol.* 39:191-283.
- Stauffer, K.A., N.M. Kumar, N.B. Gilula, and N. Unwin. 1991. Isolation and purification of gap junction channels. *J. Cell Biol.* 115:141-150.
- Stevenson, B.R., J.D. Siliciano, M.S. Mooseker, and D.A. Goodenough. 1986. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J. Cell Biol.* 103:755-766.
- Suzuki, H., Y. Ito, Y. Yamazaki, K. Mineta, M. Uji, K. Abe, K. Tani, Y. Fujiyoshi, and S. Tsukita. 2013. The four-transmembrane protein IP39 of *Euglena* forms strands by a trimeric unit repeat. *Nat. Commun.* 4:1766.
- Suzuki, H., T. Nishizawa, K. Tani, Y. Yamazaki, A. Tamura, R. Ishitani, N. Dohmae, S. Tsukita, O. Nureki, and Y. Fujiyoshi. 2014. Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. *Science.* 344:304-307.
- Suzuki, H., K. Tani, A. Tamura, S. Tsukita, and Y. Fujiyoshi. 2015. Model for the architecture of claudin-based paracellular ion channels through tight junctions. *J. Mol. Biol.* 427:291-297.
- Takahashi, A., E. Komiya, H. Kakutani, T. Yoshida, M. Fujii, Y. Horiguchi, H. Mizuuchi, Y. Tsutsumi, S.I. Tsunoda, N. Koizumi, K. Isoda, K. Yagi, Y. Watanabe, and M. Kondoh. 2008. Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal region of C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, by site-directed mutagenesis. *Biochem. Pharmacol.* 75:1639-1648.
- Takahashi, A., Y. Saito, M. Kondoh, K. Matsushita, S.M. Krug, H. Suzuki, H. Tsujino, X. Li, H. Aoyama, K. Matsuhisa, T. Uno, M. Fromm, T. Hamakubo, and K. Yagi. 2012. Creation and biochemical analysis of a broad-specific claudin binder. *Biomaterials.* 33:3464-3474.
- Tscheik, C., I.E. Blasig, and L. Winkler. 2013. Trends in drug delivery through tissue barriers containing tight junctions. *Tissue Barriers.* 1:e24565.
- Umeda, K., J. Ikenouchi, S. Katahira-Tayama, K. Furuse, H. Sasaki, M. Nakayama, T. Matsui, S. Tsukita, M. Furuse, and S. Tsukita. 2006. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* 126:741-754.
- Unger, V.M., N.M. Kumar, N.B. Gilula, and M. Yeager. 1999. Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science.* 283:1176-1180.
- Upadhyay, R.K. 2014. Drug delivery systems, CNS protection, and the blood brain barrier. *Biomed. Res. Int.* 2014:869269.
- Van Itallie, C.M., L. Betts, J.G. Smedley, B.A. McClane, and J.M. Anderson. 2008. Structure of the claudin-binding domain of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J. Biol. Chem.* 283:268-274.
- Van Itallie, C.M., L.L. Mitic, and J.M. Anderson. 2011. Claudin-2 forms homodimers and is a component of a high molecular weight protein complex. *J. Biol. Chem.* 286:3442-3450.
- Veshnyakova, A., S.M. Krug, S.L. Mueller, J. Piontek, J. Protze, M. Fromm, and G. Krause. 2012a. Determinants contributing to claudin ion channel formation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1257:45-53.

- Veshnyakova, A., J. Piontek, J. Protze, N. Waziri, I. Heise, and G. Krause. 2012b. Mechanism of Clostridium perfringens enterotoxin interaction with claudin-3/-4 protein suggests structural modifications of the toxin to target specific claudins. *J. Biol. Chem.* 287:1698-1708.
- Veshnyakova, A., J. Protze, J. Rossa, I. Blasig, G. Krause, and J. Piontek. 2010. On the Interaction of Clostridium perfringens Enterotoxin with Claudins. *Toxins*. 2:1336-1356.
- Vipperla, B., J.F. Dass, and S. Jayanthi. 2014. Insilico modeling and molecular dynamic simulation of claudin-1 point mutations in HCV infection. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 32:1443-1455.
- Walther, W., S. Petkov, O.N. Kuvardina, J. Aumann, D. Kobelt, I. Fichtner, M. Lemm, J. Piontek, I.E. Blasig, U. Stein, and P.M. Schlag. 2012. Novel Clostridium perfringens enterotoxin suicide gene therapy for selective treatment of claudin-3- and -4-overexpressing tumors. *Gene Ther.* 19:494-503.
- Wen, H., D.D. Watry, M.C. Marcondes, and H.S. Fox. 2004. Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: role of the first extracellular domain of claudin-5. *Mol. Cell. Biol.* 24:8408-8417.
- Westphal, J.K., M.J. Dorfel, S.M. Krug, J.D. Cording, J. Piontek, I.E. Blasig, R. Tauber, M. Fromm, and O. Huber. 2010. Tricellulin forms homomeric and heteromeric tight junctional complexes. *Cell. Mol. Life Sci.* 67:2057-2068.
- Winkler, L., C. Gehring, A. Wenzel, S.L. Muller, C. Piehl, G. Krause, I.E. Blasig, and J. Piontek. 2009. Molecular Determinants of the Interaction between Clostridium perfringens Enterotoxin Fragments and Claudin-3. *J. Biol. Chem.* 284:18863-18872.
- Wolburg, H., and A. Lippoldt. 2002. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul. Pharmacol.* 38:323-337.
- Wolburg, H., K. Wolburg-Buchholz, J. Kraus, G. Rascher-Eggstein, S. Liebner, S. Hamm, F. Duffner, E.H. Grote, W. Risau, and B. Engelhardt. 2003. Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol.* 105:586-592.
- Zeissig, S., N. Burgel, D. Günzel, J. Richter, J. Mankertz, U. Wahnschaffe, A.J. Kroesen, M. Zeitz, M. Fromm, and J.D. Schulzke. 2007. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut.* 56:61-72.
- Zhang, J., J. Piontek, H. Wolburg, C. Piehl, M. Liss, C. Otten, A. Christ, T.E. Willnow, I.E. Blasig, and S. Abdelilah-Seyfried. 2010. Establishment of a neuroepithelial barrier by Claudin5a is essential for zebrafish brain ventricular lumen expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107:1425-1430.

## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Fromm und Herrn Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke für die Möglichkeit, am Institut für Klinische Physiologie / Bereich Ernährungsmedizin der Charité Berlin arbeiten und meine Habilitation fertigstellen zu können. Ihr persönliches Engagement, die stete Unterstützung und die intensiven Diskussionen und Anregungen waren sehr wertvoll für mich.

An hervorragender Stelle bedanke ich mich bei Herrn Dr. Gerd Krause für die langjährige sehr gute und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Bei Herrn Dr. Ingolf Blasig bedanke ich mich für die Einführung in das Forschungsfeld und bei Frau Prof. Dr. Britta Siegmund für ihre Hilfestellung.

Ein herzlicher Dank geht auch an alle Kollegen, die meinen Weg durch den Tight Junction-Dschungel begleitet haben, insbesondere Herrn Dr. Lars Winkler, Herrn Dr. Reiner Haseloff, Herrn Dr. Manjot Bal, Herrn Dr. Jimmi Cording, Herrn Jan Rossa, Herrn Dr. Jonas Protze, Herrn Dr. Nikolaj Zuleger, Frau Barbara Eilemann, Herrn Dr. Christian Piehl, Frau Miriam Eichner, Frau Dr. Susanne Krug, Frau Prof. Dr. Dorothee Günzel, Frau Anja Fromm, Frau Dr. Rita Rosenthal, Herrn Dr. Michael Schumann, Frau In-Fah Maria Lee und Frau Elisabeth Schultze.

Meiner Familie möchte ich für die liebevolle Unterstützung danken, vor allem meiner Frau Anna ohne die – sowohl in privater als auch beruflicher Hinsicht – diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

# Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....

Datum

.....

Unterschrift