

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med Ulrich Hadding

ZO-1, ein Tight junction assoziiertes Protein

**Ein Überblick und experimentelle Untersuchungen
an einer primären zerebralen Endothelzellkultur**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Gregor F. S. Aichele

2002

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Häussinger (Dekan)

Referent: Univ.-Prof. Dr. Heinz
Korreferent: Priv. Doz. Dr. Schulze-Röbbcke

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
	Zielsetzung	1
2	Grundlagen	3
2.1	Blut-Hirn-Schranke	3
2.1.1	Funktion, Physiologie	3
	Rolle des Endothels	3
	Aufbau der BHS in Abhängigkeit der Lokalisation im ZNS	4
2.1.2	BHS-spezifische Marker	5
2.1.3	Pathophysiologie der BHS	6
	Bakterielle Meningitis als Ursache der BHS-Störung	6
	Andere Ursachen für die BHS-Störung	7
	BHS und Hirnödem	8
2.2	Aufbau der tight junction	9
	Occludin	11
	Claudin-1, Claudin-2	13
	MAGUK-Proteine: ZO-1, ZO-2 und ZO-3	13
	Cingulin und 7H6	17
3	Tight junction Regulation	18
3.1	Zwei wichtige Modelle zur TJ-Bildung <i>in vitro</i>	18
3.1.1	Ca ²⁺ -switch-Modell	18
3.1.2	ATP-Entzug-Modell	23
3.2	Signaltransduktion bei der TJ-Regulation	25
	Proteinkinase C (PKC) und heterotrimere G-Proteine	25
	Kleine GTPasen: Rab und Ras; kleine G-Proteine Rac und Rho	29
3.3	Besonderheiten der TJ im Bereich der BHS	32
3.3.1	Astrozyten und Endothel	32
3.3.2	Signaltransduktion im BHS Bereich	34
3.3.3	Endothelzellen, Zytokine und Lipopolysaccharid	36
4	Das ZO-1 Protein	38
4.1	Allgemeine Erkenntnisse über ZO-1	38
4.1.1	Vorkommen und zelluläre Lokalisation von ZO-1	38

4.1.2	Biochemische und physikalische Eigenschaften von ZO-1	40
4.1.3	Assoziation von ZO-1 zu anderen Tight-junction-Strukturen	41
4.2	Aspekte zur Rolle von ZO-1 bei der Tight-junction-Regulation	42
4.2.1	Synthese / Abbau.....	42
4.2.2	Umverteilung.....	44
4.2.3	Sterische Konformationsänderungen	46
5	Experimente	50
5.1	Material und Methoden.....	50
5.1.1	Präparation boviner Hirndothelzellen für eine Primärkultur.....	50
	Präparationsschritte	50
	Zelleinsaat in ELISA-Platten	53
5.1.2	ZO-1-Nachweis	54
5.1.2.1	ZO-1-ELISA mit bovinen Hirndothelzellen	54
5.1.2.2	Proteinbestimmung	56
5.1.2.3	Harnstoffextraktion von ZO-1.....	57
5.1.2.4	Gelelektrophorese	59
5.1.2.5	Westernblot.....	61
5.1.2.6	Immunoblot.....	62
5.1.2.7	ZO-1 Immunfluoreszenz.....	63
5.2	Ergebnisse.....	65
5.2.1	Qualitativer ZO-1-Nachweis in RHE-Zellen	65
5.2.2	Lokalisation von ZO-1 in einer konfluenten RHE-Kultur	67
5.2.3	Semiquantitativer Nachweis von ZO-1 in RHE-Zellen	70
	Zeitkinetik des ZO-1-Gehalts der RHE-Zellen im Verlauf der <i>monolayer</i> -Bildung	71
	Titration der RHE-Zellzahl bei Einsaat der Zellkultur	75
	Stimulationen konfluenter RHE-Kulturen: Wirkung auf die ZO-1-Menge.....	77
5.3	Diskussion.....	79
5.4	Schlußfolgerung.....	85
6	Zusammenfassung	87
7	Tabellen.....	89
	Ca ²⁺ -switch-Modell.....	89
	ATP-Entzug-Modell.....	90
	Was geschieht mit ZO-1? Wirkung verschiedener Substanzen auf die Tight junction .	91
8	Literaturverzeichnis.....	93

Abkürzungsverzeichnis

AJ	<i>adherens junction</i>
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
DMEM	<i>Dulbecco's minimal essential medium</i> (Zellnährmedium)
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbant assay</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FITC	Fluorescein-isothiozyanat
GMP	Guanosinmonophosphat
GUK	Guanylatkinase
γ -GT	γ -Glutamyltranspeptidase
LPS	Lipopolysaccharid
MAGUK	<i>membrane associated guanylat kinase</i>
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney (epithelial cells)</i>
NCS	<i>neonatal calf serum</i> (neonatales Kälberserum)
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatpufferlösung)
PDZ	PSD95 / dlg / ZO-1
PKC	Proteinkinase C
PSD95	<i>postsynaptic density 95</i>
RHE(Z)	Rinderhirnendothel(-zelle)
RT	Raumtemperatur
SAP90	<i>synapse associated protein 90</i>
SH3	<i>src homology 3</i>
TER	transendothelialer (oder transepithelialer) elektrischer Widerstand
TJ	<i>tight junction</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
ZAK	ZO-1-assoziierte Kinase
ZO-1(-2, -3)	<i>zonula occludens-1(-2, -3)</i>

Nicht eingedeutschte fremdsprachliche Begriffe sind *kursiv* gesetzt.

1 Einleitung

Die *tight junctions* (TJ) der Hirnendothelzellen bilden die mechanische Barriere zwischen den Zellen und limitieren so die parazelluläre Diffusion zwischen Blut und Hirngewebe. Damit stellen sie das anatomische Korrelat der **Blut-Hirnschranke** (BHS) dar. Störungen der BHS-Integrität spielen bei der Pathophysiologie der Meningitis eine entscheidende Rolle.

Das **ZO-1 Protein** ist die älteste beschriebene strukturelle Einheit der TJ. Die Kenntnisse über die Anatomie der TJ sind mit den jüngsten Ergebnissen der Forschung um einiges bereichert worden, so daß die Vorstellungen über den strukturellen Aufbau der TJ dadurch jetzt viel klarer sind. Die Mechanismen der TJ-Regulation werden aber immer noch unzureichend verstanden.

Da das ZO-1 Protein sowohl eine wichtige strukturelle Komponente der TJ ist, als auch eine funktionelle Bedeutung bei der TJ-Regulation zu haben scheint, ist es ein geeignetes Objekt, dem das Interesse in dieser Arbeit gilt.

Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es einerseits, die Rolle von ZO-1 in der TJ herauszuarbeiten, vor allem im Hinblick auf regulatorische Eigenschaften und andererseits ZO-1 im Rinderhirnendothel (RHE) -Modell darzustellen, bzw. seine Präsenz unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen. Folgende Strategie wird dabei verfolgt:

Da am hiesigen Labor bezüglich der Erfahrungen am RHE-Modell nur wenige Daten über das ZO-1-Protein vorlagen, wird im ersten Teil der Arbeit der aktuelle Stand der Forschung zum Thema TJ, mit Schwerpunkt ZO-1, durch eine ausführliche Literaturrecherche dargestellt. Die folgenden Fragen werden dabei berücksichtigt:

- Wie ist die TJ anatomisch aufgebaut?
- Wie ist ZO-1 in die TJ strukturell eingebunden?
- Was passiert bei Öffnung und Schließung der TJ? Welche Rolle spielt ZO-1 dabei?
- Welche Besonderheiten haben TJ im Bereich der BHS?
- Durch welche Mechanismen könnte ZO-1 an der TJ-Regulation beteiligt sein? Gibt es Hinweise auf Synthese / Abbau, zelluläre Umverteilung oder sterische Konformationsänderungen des ZO-1 Proteins bei der TJ-Regulation?

Der zweite Teil der Arbeit befaßt sich mit den eigenen Versuchen am RHE-Modell. Die Untersuchungen wurden an einem *in vitro* Modell der BHS durchgeführt. In diesem Ansatz werden primär kultivierte zerebrale Rinderendothelzellen verwendet, die unter optimalen Bedingungen die Fähigkeit besitzen auch *in vitro* TJ auszubilden.

Erarbeitet wurden hier folgende Aspekte:

- Qualitativer Nachweis von ZO-1 in der RHE-Primärkultur
- Zelluläre ZO-1 Lokalisation in der Zellkultur
- Semiquantitative ZO-1 Bestimmung in der Zellkultur
- Stimulation der Zellkultur mit Bakterien und bakteriellen Zellwandbestandteilen und die Auswirkungen auf den ZO-1-Gehalt der RHE-Zelle.

2 Grundlagen

2.1 Blut-Hirn-Schranke

2.1.1 Funktion, Physiologie

Rolle des Endothels

Das zerebrale Kapillarendothel bildet eine selektiv durchlässige Barriere zwischen dem Blutmilieu auf der einen und dem Hirngewebe auf der anderen Seite. Das anatomische Korrelat dieser Schranke bilden die sogenannten *tight junctions* (TJ), die die Zellen der einschichtigen Endothelzellige interzellulär dicht miteinander verbinden und somit einen freien parazellulären Austausch hydrophiler Substanzen zwischen Blut und Hirn verhindern (Hauw *et al.* 1983). Ein passiver Stoffaustausch für lipophile Substanzen ist transzellulär, durch Diffusion über die Zellmembran möglich. TJ kommen außer in Endothelien auch in Epithelien vor. Neben der Barrierefunktion bewirken TJ eine Organisation der Zellmembran in einen apikalen und einen basolateralen Abschnitt. Dies bewirkt, daß membrangebundene Strukturen ihre basolaterale bzw. apikale Domäne nicht überschreiten können und die Zelle somit polarisiert ist (Alberts *et al.* 1994, Molecularbiology of the cell, S.951).

Folgende Besonderheiten sind für das Hirnendothel mit Schrankenfunktion charakteristisch: Für hydrophile Substanzen bestehen transportervermittelte transzelluläre Systeme, wie der GLUT-1 Transporter für D-Glucose, der viermal so häufig in der basolateralen Membrandomäne vorkommt, wie in der apikalen (Farell *et al.* 1991; Pardridge *et al.* 1991). Ionenpumpen sind an der Produktion der interstitiellen Hirngewebsflüssigkeit beteiligt und verantwortlich für dessen homöostatische Elektrolytzusammensetzung (Bradbury und Lightman 1990). Wichtig hierfür ist die Na⁺-K⁺-ATPase, die sich an der dem Hirngewebe zugewandten basolateralen Seite der Endothelzelle befindet. Diese Pumpe befördert K⁺ aus dem Interstitium des Hirngewebes in die Endothelzelle und Na⁺ aus der Zelle hinaus. Das erzeugte Na⁺-Konzentrationsgefälle wird für gradientengetriebene Symport und Antiport-Mechanismen

genutzt. Beispielsweise wird so die Konzentration des inhibitorischen Transmitters Glycin, durch Na^+ -getriebenen Einstrom in die Endothelzelle, im Interstitium des Hirngewebes niedrig gehalten. Da die Na^+ - K^+ -ATPase in allen Hirnkapillaren vorkommt, ist sie auch für mehr als ein Fünftel der Liquorproduktion verantwortlich (Klinke und Silbernagel 1994, Lehrbuch der Physiologie, S.742).

Substanzen, die in das Innere der Endothelzellen gelangen, werden teilweise von einem spezialisierten Enzymsystem umgebaut, sodaß deren weiterer Transport in Richtung Hirn entweder verhindert oder aber erst ermöglicht wird (Gherzi-Egea *et al.* 1995). Beispiele für diese enzymatisch-metabolische selektive Barriere sind die hohen Aktivitäten der Alkalischen Phosphatase (AP) (Leduc und Wislocki 1952), der γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GT) (Orlowski *et al.* 1974) und der Monaminoxidase (MAO) (Mésesse *et al.* 1989).

Typisch für Hirnedothelzellen ist außerdem eine geringe pinozytotische Aktivität, wodurch eine niedrige Rate unspezifischen Transports durch Endozytose gewährleistet ist (Goldstein *et al.* 1983). Die Bewegung von Wasser über die Barriere folgt dem osmotischen Gradienten (Grégoire *et al.* 1990). Nirgends im menschlichen Körper, und auch bei anderen Vertebraten, sind Endothelzellen so eng durch *tight junctions* miteinander verknüpft, wie in den Hirnkapillaren (Abbott *et al.* 1991; Cserr und Bundgaard 1984). Kennzeichnend dafür sind hohe transendotheliale elektrische Widerstände *in vivo* ($> 1.000 \Omega / \text{cm}^2$) (Crone und Oleson 1982) und *in vitro*. Eine wichtige Rolle scheinen in diesem Zusammenhang Astrozyten zu spielen, auf deren Bedeutung in Kapitel 3.3.1 eingegangen wird.

Die Gesamtheit dieser selektiven Barriere zwischen Blut und Hirngewebe wird als Blut-Hirn-Schranke bezeichnet. Ihr Zweck besteht darin, dem Gehirn sein sehr spezifisches inneres Milieu zu erhalten, den Substratbedarf für den Hirnstoffwechsel zu befriedigen und letztendlich das Gehirn vor unerwünschten Stoffen, die frei im Blut zirkulieren, zu schützen.

Aufbau der BHS in Abhängigkeit der Lokalisation im ZNS

Je nach Lokalisation im zentralen Nervensystem ist die Blut-Hirn-Schranke jedoch unterschiedlich aufgebaut. Das bedeutet, daß das Kapillarendothel in verschiedenen Regionen unterschiedlich stark durchlässig für verschiedene Substanzen ist. Im Bereich der zirkumventri-

kulären Organe bei der Ratte ist zum Beispiel die Permeabilität der Kapillaren für C^{14} markierte α -Aminoisobutrylsäure 100-400fach höher als in Hirnkapillaren der grauen und weißen Substanz. Die Kapillaren sind hier stärker gefenstert und der vesikuläre Transport ist vergleichsweise um das siebenfache erhöht (Gross *et al.* 1986). Man kann hier daher nicht mehr von einer intakten Blut-Hirn-Schranke sprechen; vielmehr handelt es sich um die viel durchlässigere Blut-Liquor-Schranke (Poirier *et al.* 1983). Ein Übertritt von Plasmabestandteilen aus dem Interstitium in den Ventrikelliquor wird in diesen Regionen durch eine relativ enge Ependymanordnung (s. auch Kapitel 4.1.1) weitgehend verhindert. Eine gewisse Blut-Liquor-Schranke existiert auch im Bereich des Plexus choroideus. Hier ist sogar das Ependym nicht mehr so dicht angeordnet wie im Bereich der zirkumventrikulären Organe, so daß die Schrankenfunktion hier am schwächsten ausgeprägt ist und ein Stoffaustausch zwischen Blut, Hirngewebe und Liquor, der für die Aufnahme von Nukleotiden und Vitaminen eine Rolle spielt, möglich ist (Klinke und Silbernagel 1994, S.743).

2.1.2 BHS-spezifische Marker

Bereits nicht spezialisierte Endothelzellen lassen sich generell durch Markierung bestimmter Strukturen nachweisen. Dazu gehören z.B. der Faktor VIII assoziierte von Willebrandfaktor (vWF) (Barnes and Scott 1983), das *Angiotensin converting enzyme* (ACE) (Yang *et al.* 1971) und die *Griffonia-simplicifolia*-Agglutinin-I-(GSA-I) Bindestelle, die bestimmten Glykoproteinen an der Zelloberfläche entspricht und endothelzellspezifisch mit GSA-I reagiert (Laitinen 1987).

Das Kapillarendothel im ZNS mit ausgeprägter Schrankenfunktion verfügt zusätzlich über spezifischere Marker, wie das *Endothelial barrier antigen* (EBA) (Rosenstein *et al.* 1992) und die Alkalische Phosphatase (AP) (Vorbrot 1988). In perizytenfreien Reinkulturen von bovinen Hirnendothelzellen (RHEZ) konnte eine starke Monaminoxidaseaktivität (MAO) als typisches Merkmal der enzymatischen BHS nachgewiesen werden (Méresse *et al.* 1989).

Ein anderer BHS-spezifischer Endothelzellmarker ist das P-Glykoprotein, das an der luminalen Zellseite lokalisiert ist (Sugawara *et al.* 1990). Es handelt sich um ein Produkt des *Multidrug resistance gene*, das ebenfalls eine metabolische Schrankenfunktion einnimmt (Huwy-

ler *et al.* 1996).

Die BHS spezifische γ -Glutamyltranspeptidase (γ GT) erwies sich als nicht endothelzellspezifisch. Obwohl die γ GT an der luminalen Seite des Hirnendothels vorkommt, scheint deren Hauptaktivität in den Perizyten der Hirnkapillaren zu liegen (Risau *et al.* 1992). Als Marker für Hirnendothel (und für retinales Endothel) in Reinkultur ist die γ GT dennoch geeignet, da sie in Endothelien anderer Herkunft nicht vorkommt.

2.1.3 Pathophysiologie der BHS

Eine erhöhte Durchlässigkeit der BHS kann durch verschiedene Noxen ausgelöst werden. Die Möglichkeiten der Schädigung sind vielgestaltig, da die BHS-Funktion durch unterschiedliche Mechanismen an verschiedenen Orten gestört werden kann. Im folgenden wird der Schwerpunkt auf die Darstellung der erregerbedingten entzündlichen BHS-Störung gelegt.

Bakterielle Meningitis als Ursache der BHS-Störung

Bei bakteriellen Meningitiden gelangen die Erreger meist über die Blutbahn (Bakteriämie) in den Subarachnoidalraum. Als Eintrittspforte werden der *Plexus choroideus* (Pfister *et al.* 1994), die *Sinus durae matris* und die *Lamina cribrosa* des Siebbeins (Tunkel und Scheld 1993), also Orte der Blut-Liquor-Schranke, diskutiert. Die Rolle des Kapillarendothels zum Zeitpunkt der Erregerinvasion mit Überwindung der BHS ist noch nicht abschließend geklärt. Erst in kürzerer Zeit gab es Hinweise auf eine direkte Erregerpenetration über das Endothel. So zum Beispiel für *S. pneumoniae* (Ring *et al.* 1998).

Das Entzündungsgeschehen im Liquorraum wird durch definierte Bakterienbestandteile, wie Peptidoglykan oder Lipopolysaccharid (LPS) ausgelöst. Deren Freisetzung wird sowohl durch das Bakterienwachstum, als auch durch antibiotikabedingten bakteriellen Zerfall begünstigt. Die Vermittlung der entzündungsaktivierenden Wirkung über CD-14-Rezeptoren auf mononukleäre Zellen gilt für gramnegative Erreger als gesichert. Bei grampositiven Erregern wird dies noch diskutiert. Es kommt zur Freisetzung von Zytokinen, wie IL-1- β , TNF- α , PG-E₂, PAF und MIP-2. Zellen, die das CD-14-Epitop nicht auf ihrer Oberfläche tragen, werden

durch Komplexe aus Bakterienbestandteilen und löslichem CD-14 aktiviert (Patrick *et al.* 1992). Dies sind zum Beispiel die Endothelzellen. Charakteristisch für die bakterielle Meningitis ist eine granulozytäre Pleozytose des Liquors, die nach gegenwärtigen Vorstellungen folgendermaßen entstehen könnte: Zum einen kommt es durch die Zytokin- und LPS-aktivierten Endothelzellen zur verstärkten Leukodiapedese durch chemotaktische Faktoren, wie Komplementfaktor C5a und IL-8 (Kadurugamuwa *et al.* 1989), zum anderen vermitteln zum Beispiel CD-18- und CD-28-Rezeptoren, sowie Integrine (z.B. LFA-1, CR3, CR4) und Selektine auf Leukozyten deren Adhäsion an Endothelzellen. Die Endothelzelle ist in ihrem aktivierten Zustand selbst in der Lage, die Leukozytenadhäsion zu fördern. Endotheliale Adhäsionsmoleküle (z.B. ICAM-1) sowie Selektine (z.B. P-Selektin) können verstärkt auf der Zelloberfläche exprimiert werden und mit den entsprechenden Liganden der Leukozyten interagieren (Roitt, Brostoff, Male in Immunology, 1996, Kapitel 14). Die Leukozyten wiederum werden zur Freisetzung von gewebeschädigenden Stoffen, wie Proteasen und toxischen Sauerstoff- und Stickstoffmetaboliten angeregt. Diese Stoffe schädigen auch die Endothelzellen, wodurch die BHS-Integrität folglich gestört wird. Das Zytokin IL-1 β führt zu einer signifikanten BHS-Öffnung. TNF- α allein hat diesen Effekt zwar nicht, wirkt aber synergistisch mit IL-1 β und verstärkt dessen Effekt (Quagliariello *et al.* 1991).

Andere Ursachen für die BHS-Störung

Da die Möglichkeiten der BHS-Öffnung so vielfältig sind, werden im folgenden nur einige Beispiele für pathologische Vorgänge genannt, die ebenfalls mit einer Öffnung der BHS einhergehen. Sie finden hier der Vollständigkeit halber Erwähnung. Dies sind unter anderem ionisierende Strahlen (d'Avella *et al.* 1992, A69), Infusionen hyperosmolarer Lösungen (Dorovini *et al.* 1983), niedrige pH-Werte des arteriellen Blutes (Nagy *et al.* 1985, A164), Hitzestreß (Sharma und Cervos-Navarro 1990), Hypoxie (Dux *et al.* 1984; Plateel *et al.* 1997), Temperaturschwankungen des Gehirns nach Ischämie (Dietrich *et al.* 1990), akute hohe arterielle Blutdrücke (Ziylan 1984), Hirntrauma (Xu *et al.* 1991). Auch Krankheiten wie die Multiple Sklerose (Poser 1993) und die Alzheimersche Erkrankung (Claudio 1996) gehen mit BHS-Störungen einher.

BHS und Hirnödem

Der Zusammenbruch der BHS führt zum Einstrom von Flüssigkeit und Proteinen in den interstitiellen Raum des Hirngewebes und in den Subarachnoidalraum und verursacht das häufig bei bakteriellen Meningitiden zu beobachtende vasogene Hirnödem. Dieses Ödem wird als vasogen bezeichnet, da ihm eine Störung der Gefäßfunktion zugrunde liegt.

Abzugrenzen hiervon ist das zytotoxische Hirnödem, das primär auf einer Zellschwellung der Nervenzellen beruht und meist durch deren Mangelversorgung (z.B. Ischämie) bedingt ist, oder aber, wie im Fall der Entzündung, auch durch zytotoxische Effekte der aus den Leukozyten oder Bakterien freigesetzten Stoffe. Ein anderer zytotoxischer Mechanismus zur Entstehung des Hirnödems ist die Freisetzung von antidiuretischem Hormon (ADH=Vasopressin). Dadurch kommt es zur Hypotonizität der extrazellulären Flüssigkeit und deshalb zu einer verstärkten osmotischen Bewegung von Wasser in das Gehirn und somit zur Zellschwellung (Tunkel und Scheld 1993).

Was auch immer die Ursache für das Ödem ist, bei allen Formen besteht die Gefahr der Ausbildung eines erhöhten intrakraniellen Drucks.

2.2 Aufbau der tight junction

Für ein besseres Verständnis der Regulationsmechanismen zur Öffnung und Schließung von *tight junctions*, ist die Kenntnis von deren anatomischem Aufbau unerlässlich. Erst in den letzten Jahren sind molekularbiologische Fortschritte erzielt worden, die zur Entdeckung einzelner Proteinkomponenten führten. Vielen dieser Bestandteile konnte bislang weder eine klare funktionelle Bedeutung zugeschrieben werden, noch sind Einzelheiten der Interaktionen der einzelnen Proteine bekannt. Die *tight junction* (*Zonula occludens*), die zur Undurchlässigkeit des Interzellularraums führt, befindet sich immer in der Nähe (apikal) der sogenannten *adherens junction* (*Zonula adhaerens*), die für den mechanischen Zusammenhalt der Zellen untereinander verantwortlich ist. Zusammen werden *tight* und *adherens junction* als *apical junctional complex* bezeichnet und bilden eine funktionelle Einheit.

In der *tight junction* (TJ) unterscheidet man transmembranöse von peripheren (oder *Plaque*-) Proteinen. Es bestehen Verbindungen der TJ-Proteine zum Aktin-Zytoskelett. Das transmembranöse Protein Occludin war bislang das einzige nachgewiesene TJ-Fibrillenprotein, das die Zellen parazellulär gürtelförmig abdichtet und somit barrierebildend ist. Erst kürzlich wurden zwei neue transmembranöse Proteine, Claudin-1 und Claudin-2 entdeckt. Die MAGUK- (membran-assoziierte Guanylatkinase Homologa) Proteine ZO-1, ZO-2 und ZO-3, sowie Cingulin und das 7H6-Antigen sind zytoplasmatische *Plaque*proteine. Das ras-Zielprotein AF-6 wurde als periphere TJ-Komponente entdeckt. Symplekin und ZA-1TJ sind auch TJ-assoziierte *Plaque*proteine, kommen aber nicht in Endothelzellen vor (Keon *et al.* 1996; Kapprell *et al.* 1990).

In der *adherens junction* spielen die folgenden Proteine eine Rolle: Cadherin, als transmembranöses interzelluläres Adhäsionsmolekül; α -, β - und γ -Catenin als dessen zytoplasmatische *Plaque*-Proteine, die wiederum über α -Actinin, Vinculin und Radixin eine Verbindung zu dem dichten Gürtel der bipolaren Aktinfilamente des Zytoskeletts herstellen.

Die Abbildung 1 stellt die wichtigsten TJ- und AJ-Strukturen schematisch dar und dient der Veranschaulichung der in diesem Kapitel dargestellten wichtigsten TJ-Proteine.

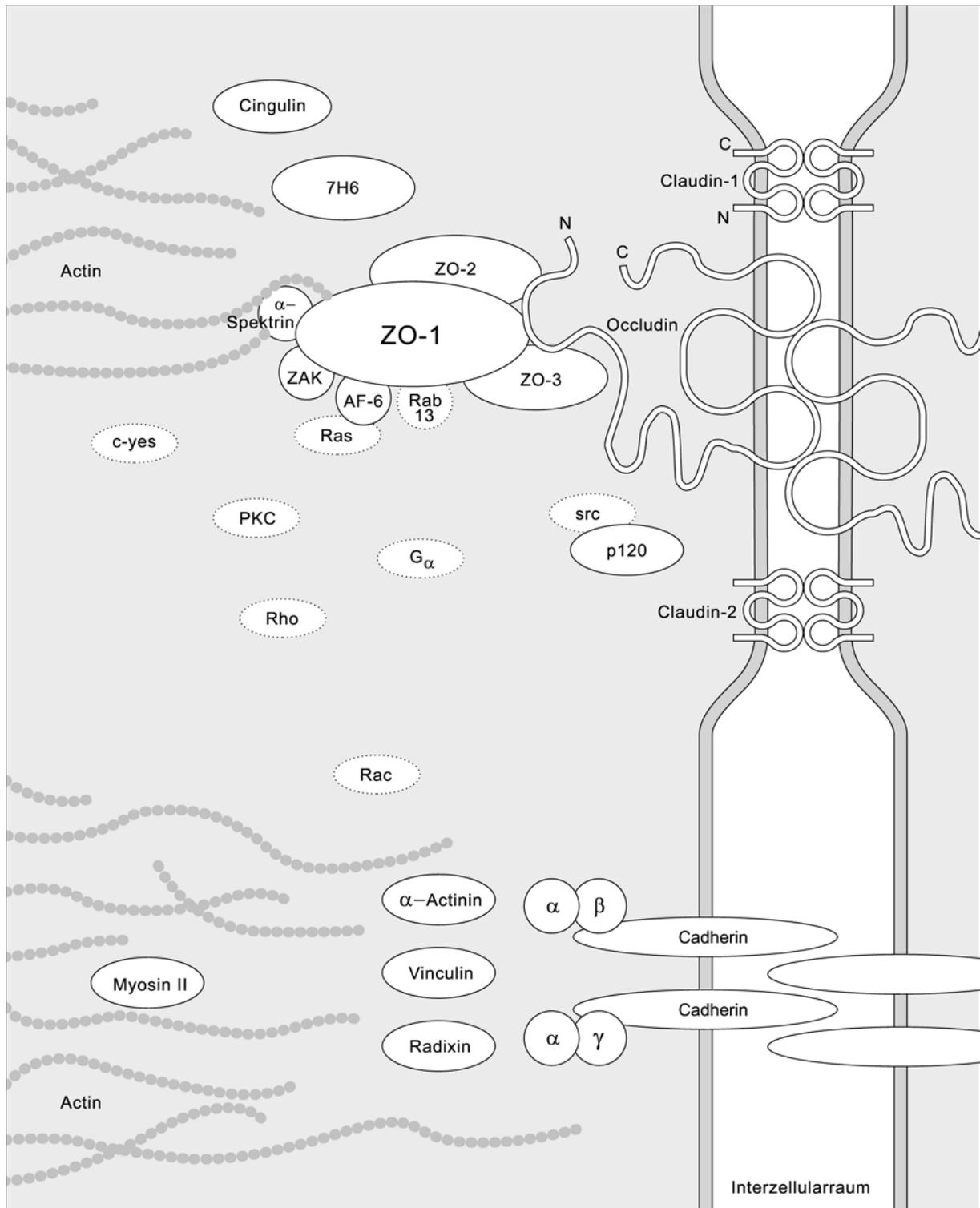


Abb. 1: schematische Darstellung der TJ (oberer Teil) und der AJ (unterer Teil)

Occludin

Da Occludin das TJ-Protein im eigentlichen Sinne ist, wird es an dieser Stelle ausführlich beschrieben.

Charakterisiert wurde Occludin erstmals 1993 in Japan (Furuse *et al.*), als ein TJ-assoziiertes Protein in Epithel- und Endothelzellen. Diese Arbeitsgruppe isolierte ein 65 kDa schweres Protein zunächst in einer Junctions-Fraktion von Hühnerhepatozyten und entschlüsselte seine cDNA-Sequenz. Mittels Gefrierbruchtechnik konnte das Protein innerhalb der TJ-Fibrillen mit Antikörpern gegen Occludin lokalisiert werden (Fujimoto 1995). Angemerkt sei, daß die Anzahl der Fibrillenbanden mit dem parazellulären elektrischen Widerstand und der Impedanz gegenüber wasserlöslichen Substanzen korreliert (Reuss 1991). Unterschiede in der Aminosäure (AS)-Sequenz bei verschiedenen Spezies konnten durch *cDNA-cloning* nachgewiesen werden (Ando-Akatsuka *et al.* 1996). Unter den Säugetieren mit Plazenta ergaben die Occludinvarianten von Mensch, Hund, Maus eine etwa 90 prozentige Übereinstimmung der AS-Sequenz. Die cDNA konnte für alle Spezies etwa 65 kDa schwere Proteine voraussagen, die zwei extrazelluläre Schleifen von je etwa 47 AS enthalten, die jeweils C- und N-terminal über transmembranöse Abschnitte an zytoplasmatische Domänen gebunden sind. Daraus folgt, daß es vier transmembranöse Segmente gibt, die Furuse mit M1-M2 für die N-terminale und mit M3-M4 für die C-terminale Schleife benennt. Nach Ando-Akatsuka *et al.* (1996) existiert, angepaßt an das Strukturmodell für Hühneroccludin nach Furuse *et al.* (1993), für die humane Variante des Occludins ein kürzerer N-terminaler zytoplasmatischer Rest von AS 1 bis 66 und ein langer C-terminaler zytoplasmatischer Rest von AS 266 bis 522. Der kurze zytoplasmatische Abschnitt zwischen M3 und M4 liegt zwischen AS 162 und 172. Bei neutralem pH-Wert befindet sich der Großteil der geladenen Aminosäuren in diesen zytoplasmatischen Abschnitten von Occludin. Die extrazellulären Schleifen beinhalten in ihrer humanen Variante insgesamt nur neun geladene AS, was suggeriert, daß die Schleifen benachbarter Zellen über energetisch günstige hydrophobe Kontakte im parazellulären ionenreichen Milieu verknüpft sind. Vor allem in der ersten Schleife soll ein hoher Gehalt an Glyzin für eine hochflexible Struktur zuständig sein, wobei ein hoher Tyrosingehalt für eine dichte Schichtung der Schleifen verantwortlich sein soll. Diese molekulare Anatomie bildet möglicherweise die Voraussetzung für eine reißverschlußartige Verzahnung der

Voraussetzung für eine reißverschlußartige Verzahnung der extrazellulären Schleifen benachbarter Zellen, um den Parazellularraum zu versiegeln.

Der Nachweis dafür, daß Occludin tatsächlich als funktionelle Komponente der TJ an deren Schrankenfunktion beteiligt ist, liefert ein Transfektionsversuch von McCarthy *et al.* (1996). Lac-Repressorgen-transfizierte MDCK-Zellen wurden mit Hühner-Occludin cDNA transfiziert und dann zur Produktion von „zellfremdem“ Occludin angeregt. Das neugebildete Hühner-Occludin konnte dann exakt an den vorbestehenden TJs nachgewiesen werden und dessen Konzentration positiv mit einem um 30-40% erhöhten TER korreliert werden. Durch Expressierung des zusätzlichen Hühner-Occludins stieg die Anzahl von TJ-Fibrillenbänden im Mittel um 15% an, und die Gesamtbreite des TJ-Netzwerkes nahm von 175 nm auf 248 nm zu.

Die Interaktionen mit dem ZO-1-Protein und dessen Rolle für die Lokalisation von Occludin in der TJ stellten sich in der Literatur bisher widersprüchlich dar: Furuse *et al.* (1994) beschrieben eine 148 AS lange ZO-1 / ZO-2-Bindungsdomäne (E358 / 504) im carboxyterminalen zytoplasmatischen Ende von Occludin, die gleichzeitig für die Lokalisation von Occludin an der TJ notwendig sein soll. Die sich daraus ergebende Schlußfolgerung war, daß ZO-1 für die Lokalisation von Occludin an der TJ notwendig sei. Diese Hypothese wurde durch Versuche mit Fibroblasten, die normalerweise keine TJ ausbilden, bestärkt: Bei der Transfektion von Occludin-negativen-Fibroblasten mit Human-Occludin, kam es nur dann zu dessen Anreicherung an Zellkontaktstellen, wenn dort bereits ZO-1 konzentriert war (Van Itallie und Anderson 1997). Später zeigten jedoch andere Versuche, daß es gelingt, um die ZO-1 / ZO-2-Bindungsdomäne verkürzte Occludinmoleküle an der TJ zu lokalisieren, wodurch die Notwendigkeit der ZO-1-Occludininteraktion für diesen Vorgang wieder in Frage gestellt wurde (Balda *et al.* 1996). Allerdings kam es nur dann zur Lokalisation dieses deletären Occludins (ohne ZO-1-Bindestelle) an der TJ, wenn bereits komplettes Occludin in der nativen Zelle vorhanden war. Es besteht daher wohl noch die Möglichkeit einer lateralen Occludin-Occludin-Interaktion. Neuere Versuche konnten zeigen, daß Occludin ein Phosphoprotein ist und daß Phosphorylierungen dieses Proteins eine Rolle bei der TJ-Bildung spielen könnte

(Sakakibara *et al.* 1997). Über Regulationsmöglichkeiten der TJ, an denen Occludin beteiligt sein könnte, wird in Kapitel 3 und 4 gesprochen.

Claudin-1, Claudin-2

Erst kürzlich kam es zur Entdeckung von zwei weiteren transmembranösen TJ-Proteinen, Claudin-1 und Claudin-2, die auch Bestandteile der parazellulären Versiegelung sind. Es handelt sich um zwei 22 kDa schwere Proteine mit 211 bzw. 230 AS. Von beiden Proteinen wird berichtet, daß sie jeweils vier transmembranöse Domänen besitzen (wie Occludin), jedoch keinerlei Ähnlichkeit in der AS-Sequenz zu Occludin haben. (Furuse *et al.* 1998a). In einem Versuch wurde Claudin-cDNA in TJ-negative Mäuse-L-Fibroblasten transfiziert, wobei sich gut entwickelte TJ-Banden ausbildeten. In diesen Claudin-TJ-Banden wurde Occludin an der TJ rekrutiert, was sich allerdings nur durch eine geringe Anzahl kurzer occludinpositiver Banden zeigen ließ. Bei der Kotransfektion von Occludin mit Claudin-1 kam es dagegen zur deutlichen Occludineinlagerung in die gut ausgebildeten Claudin-1 Banden. Diese Versuche suggerieren, daß Claudin hauptsächlich für die TJ-Bildung zuständig ist und es sich bei Occludin eher um ein akzessorisches Protein handelt (Furuse *et al.* 1998b).

MAGUK-Proteine: ZO-1, ZO-2 und ZO-3

Die TJ-assoziierten Plaque-Proteine ZO-1, ZO-2 und ZO-3 sind Mitglieder der membran-assoziierten-Guanylatkinase Homologa (MAGUK-Proteinfamilie), die sich durch ganz bestimmte homologe Proteinbindungsdomänen auszeichnen (Woods und Bryant 1993). Alle MAGUK-Proteine besitzen eine oder mehrere PSD95 / dlg / ZO-1 (PDZ)-Domänen, eine *src homology 3* (SH3)-Domäne und eine Region, die Homologie zur Guanylatkinase (GUK) aufweist (Fanning *et al.* 1996).

Vertreter der MAGUK-Familie bei den Nicht-Vertebraten sind der *Drosophila lethal disc-large* Tumorsuppressor Dlg-A (Woods und Bryant 1991) und das *Drosophila Tamou Protein* (TamA), das dem ZO-1-Protein sehr ähnlich ist (Takahisa *et al.* 1996), sowie das *Caenorhabditis elegans*-Protein LIN-2, ein Signaltransduktionsprotein (Hoskins *et al.* 1995). Ebenfalls

zu den MAGUK gehören die Ionenkanal-assoziierten synaptischen Proteine (*channel clustering proteins*), wie das PSD-95 / SAP90 (*postsynaptic density-95 / synapse-associated protein 90*) (Cho *et al.* 1992; Kistner *et al.* 1993). Ferner ist p55, ein erythrozytäres Membranprotein, (Ruff *et al.* 1991) ebenfalls Mitglied der MAGUK-Familie. Das jüngst entdeckte MAGUK-Protein MAGI-1 spielt eventuell eine Rolle bei Signaltransduktionsvorgängen zwischen Zelloberfläche und Zellkern (Dobrostotskaya *et al.* 1997). Kennzeichnend für all diese Proteine sind deren Vorkommen an Zellkontaktstellen, wie Synapsen, TJ und *intercalated discs* (= modifizierte AJ in kardialen Myozyten).

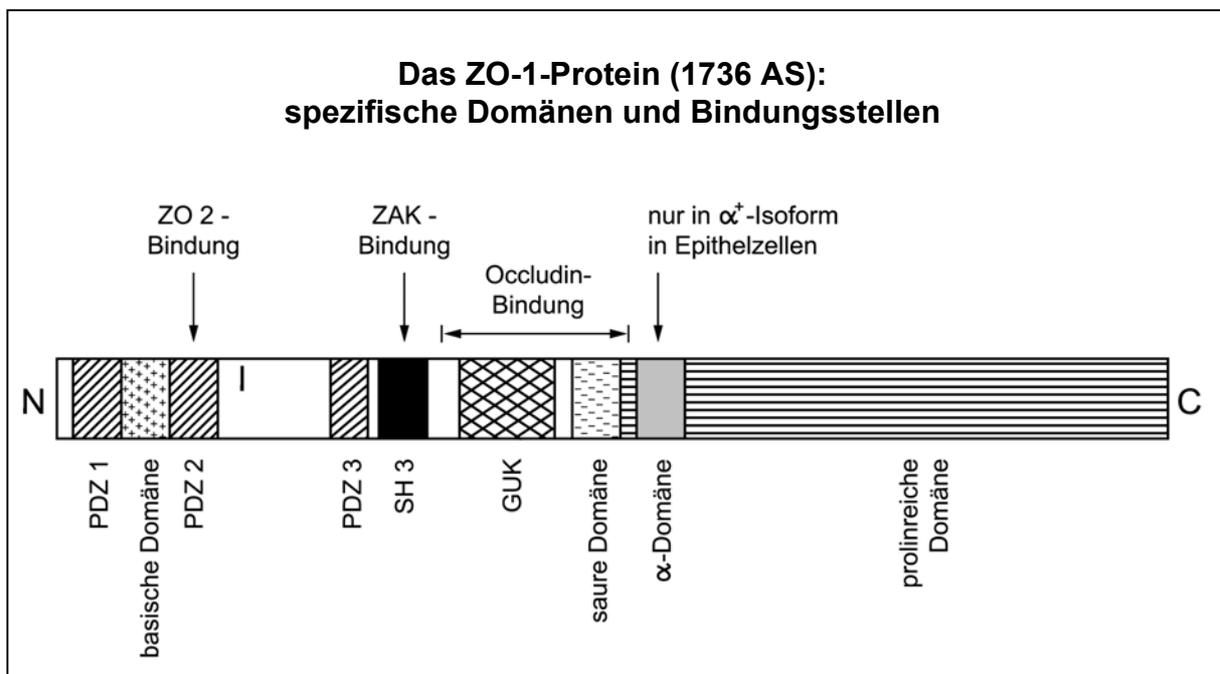


Abb. 2: ZO-1, ein MAGUK-Protein

Die **PDZ-Domänen** sind etwa 80-100 AS lang und besitzen Proteinbindungsmodule, die in der Lage sind, kurze Peptidmotive innerhalb ihrer Zielproteine zu erkennen. Fast immer handelt es sich dabei um die letzten drei bis fünf AS im extremen C-terminalen zytoplasmatischen Abschnitt eines transmembranösen Proteins, über die die Bindung vermittelt wird (Sheng 1996). Beispielsweise bindet das zweite von drei PDZ Domänen in PSD-95 / SAP90-Molekülen den zytoplasmatischen C-Terminus von zwei synaptischen Ionenkanälen, nämlich den *shaker-type* K⁺-Kanal (Kim *et al.* 1995) und den NMDA-Rezeptor (Kornau *et al.* 1995).

Viele Hinweise deuten darauf hin, daß es über die PDZ-Domänen zur Anhäufung und Verankerung dieser Proteine in den Synapsen kommt (deshalb auch die Bezeichnung „*channel clustering proteins*“, s.o.).

In den TJ verfügt Occludin als transmembranöses Protein allerdings C-terminal nicht über eine PDZ-Bindestelle. Die C-terminale 150-AS-Bindungsdomäne von Occludin, die für die ZO-1-Bindung notwendig ist (s.o.), interagiert mit ZO-1 wahrscheinlich unabhängig von dessen PDZ1-, PDZ2-, PDZ3-Domänen, bzw. von der SH3-Domäne: Die primäre Occludin-Bindungsstelle von ZO-1 soll in einer 244-AS-Domäne zwischen AS 633 und AS 876 in der N-terminalen Hälfte des Proteins lokalisiert sein (Fanning *et al.* 1998), in der aber die GUK-Domäne liegt (s.u.). Dieselbe Arbeitsgruppe hat gezeigt, daß die PDZ2-Domäne von ZO-1 dessen Bindung an ZO-2 vermittelt. Tatsächlich ist ZO-2 über seine eigene PDZ2-Domäne direkt an ZO-1 gebunden (Itoh *et al.* 1999). Damit ist eine Möglichkeit gegeben, Heterodimere zwischen MAGUK-Proteinen zu bilden, die durch direkte PDZ-PDZ-Interaktionen vermittelt werden. Dies ist für andere MAGUK-Proteine bereits vorher beschrieben worden (Kim *et al.* 1996).

Die **SH3-Domänen** wurden ursprünglich in Nicht-Rezeptor-Protein-Tyrosinkinasen der Src-Familie gefunden und später in zahlreichen Zytoskelett- und Signaltransduktionsproteinen beschrieben, in denen sie direkte Protein-Protein-Bindungen vermitteln. Bindungspartner von SH3 für die MAGUK sind bis auf eine Ausnahme nicht charakterisiert worden: Die SH3-Domäne von ZO-1 bindet an eine Serin-Proteinkinase. Diese Kinase, auch ZO-1-assoziierte Kinase (ZAK) genannt, phosphoryliert eine C-terminal gelegene Region zwischen der SH3- und der GUK-Domäne von ZO-1 (Balda *et al.* 1996). Eine Besonderheit dieser Kinase ist, daß sie als Phosphatgruppendonator sowohl GTP, als auch ATP verwenden kann.

Die **Guanylatkinase (GUK)** katalysiert normalerweise die Konversion von GMP zu GTP. Die GUK-Domäne der MAGUK-Proteine ist bisher allerdings ohne nachgewiesene enzymatische Aktivität, obwohl sie in der Lage ist GMP spezifisch zu binden (Kistner *et al.* 1995). Entscheidend für die GUK-Domäne scheint auch wiederum ihre Eigenschaft der Proteinbindung zu sein: Es gelang Kim *et al.* (1997) ein neues Guanylatkinase-assoziiertes synaptisches Protein (GKAP) zu identifizieren, das spezifisch mit der GUK-Domäne der Ionenkanal-

assoziierten synaptischen MAGUKs, wie den PSD-95 / SAP90, interagiert. Zwischen GKAP und ZO-1 kam es zu keiner entsprechenden Interaktion. Die GUK-Domänen der synaptischen MAGUKs zeigen im Vergleich zu denen der TJ-MAGUKs ZO-1 und ZO-2 allerdings nur eine 30%ige AS Übereinstimmung (Willott *et al.* 1993; Jesaitis und Goodenough 1994), was einer differenzierten Spezifität der Domäne in unterschiedlichen MAGUK-Subfamilien Rechnung tragen würde. Interessanterweise liegt die GUK-Domäne von ZO-1 genau in dessen Occludin-Bindungsstelle (s.o.). Außer der GUK-Domäne beinhaltet diese Region des ZO-1-Proteins noch eine saure Domäne unbekannter Funktion. Beide Domänen sind auch in ZO-2 (mit 63%iger Identität) und ZO-3 (mit 43%iger Identität) enthalten (Fanning *et al.* 1998). Eine direkte Bindung der TJ-MAGUKs mit Occludin ist daher über diese Region denkbar. Tatsächlich wurde auch für den N-Terminus von ZO-2, sowie für ZO-3 eine direkte Bindung mit dem zytoplasmatischen 148 AS C-Terminus von Occludin beschrieben (Itoh *et al.* 1999; Haskins *et al.* 1998).

Das **ZO-1 Protein** ist das meistuntersuchte Protein innerhalb des zytoplasmatischen Plaques der TJ. Es handelt sich um ein 220 kDa schweres Phosphoprotein (Stevenson *et al.* 1986). ZO-1 koimmunopräzipitiert zusammen mit den beiden anderen Plaqueproteinen ZO-2 (160 kDa) und ZO-3 (130 kDa) (Gumbiner *et al.* 1991.; Jesaitis und Goodenough 1994; Balda *et al.* 1993). Zusammenfassend werden an dieser Stelle nur die beschriebenen Bindungen von den ZO-MAGUK-Proteinen mit anderen TJ-Strukturen dargestellt (s. Abb. 1, Seite 10).

Zwischen ZO-1 und ZO-2 gibt es eine PDZ-vermittelte Interaktion (s.o.). ZO-1 bindet direkt an ZO-3; ZO-3 ist aber wahrscheinlich nicht direkt an ZO-2 gebunden (Haskins *et al.* 1998). Die ZO-1-, ZO-2 und ZO-3-Bindungen an Occludin wurde oben bereits beschrieben. Direkte Verbindungen zu α -Catenin, das über β -Catenin an den zytoplasmatischen Teil von Cadherin der *adherens junction* bindet, werden sowohl für ZO-1, als auch für ZO-2 über die N-terminale Hälfte vermittelt (Itoh *et al.* 1999). Direkte Verbindungen zu den Aktinfilamenten des Zytoskeletts sind zunächst für ZO-1 über eine bisher unbekannt Region in der C-terminalen Hälfte des Proteins beschrieben worden. Diese Verbindung ist für F-Aktin spezifisch und ATP-unabhängig (Fanning *et al.* 1998). ZO-2 / Aktin-Verbindungen über den C-Terminus von ZO-2 bestehen wahrscheinlich auch (Itoh *et al.* 1999). Bereits viel früher wurde eine ZO-1-Bindung an das Zytoskelett über α -Spektrin beschrieben (Itoh *et al.* 1993). Zwi-

schen ZO-1 und einer N-terminalen RA-Domäne von AF-6 bestehen ebenfalls direkte Verbindungen (Yamamoto *et al.* 1997).

Weitere Einzelheiten über ZO-1, zu Signaltransduktionsvorgängen und TJ-Regulation werden in den Kapiteln 3 und 4 besprochen.

Cingulin und 7H6

Cingulin (140 kDa) ist zwar als TJ-Komponente schon recht früh entdeckt worden (Citi *et al.* 1988), dennoch sind bisher weder Interaktionen mit anderen Strukturen noch Funktionen des Proteins genau bekannt. Cingulin ist allerdings ein Phosphoprotein, was eine regulatorische Funktion des Proteins an der TJ nahelegt (Citi und Denisenko 1995).

Das 7H6-Antigen ist ein 155 kDa schweres TJ-assoziiertes Molekül (Zhong *et al.* 1993). Es handelt sich ebenfalls um ein Phosphoprotein, dessen Lokalisation an der TJ und dessen Phosphorylierungszustand vom funktionellen Schrankenstatus abhängt. Bei der TJ-Öffnung scheint es von der Barriere weg zu dissoziieren und in einen dephosphorylierten Zustand überzugehen (Zhong *et al.* 1994). Bindungsinteraktionen sind auch hier nicht bekannt.

Es gibt noch eine Reihe weiterer Strukturen, die in einem räumlichen und funktionellen Zusammenhang mit der TJ stehen. Dazu gehören beispielsweise die kleinen G-Proteine wie Rab13, Rho und Rac, die heterotrimeren G-Proteine der G α Familie, die Proteinkinase C (PKC), das src-Substrat p120, sowie andere Kinasen bzw. Enzyme. Diese Proteine nehmen vor allem Funktionen der Signaltransduktion der TJ ein. Ihre strukturelle Einbindung in die TJ Anatomie steht nicht im Vordergrund. Einzelheiten werden in den Kapiteln 3.2, 3.3.2 und 4.2 besprochen.

3 Tight junction Regulation

Die Kapitel 3.1 und 3.2 sind der Darstellung des aktuellen Standes der Forschung über allgemeine Prinzipien der TJ Regulation gewidmet. Besonderes Augenmerk wird dabei auf das ZO-1 Protein gerichtet, da es einerseits eine strukturelle Komponente der TJ ist und andererseits eine Rolle bei der Regulation der TJ zu spielen scheint. Besonderheiten der TJ im Bereich der Blut-Hirn-Schranke werden in Kapitel 3.3 erläutert. Eine allgemeine Darstellung von ZO-1 folgt in Kapitel 4.1. Spezielle Aspekte zur Beteiligung von ZO-1 an TJ Regulationsvorgängen sind Thema in Kapitel 4.2.

3.1 Zwei wichtige Modelle zur TJ-Bildung *in vitro*

Viele Hinweise zur TJ-Regulation konnten aus Versuchen mit zwei unterschiedlichen Modellen zur TJ-Biogenese in MDCK-(*Madin-Darby canine kidney*) Epithelzellen¹ gewonnen werden. Das eine ist das **Ca²⁺-switch-Modell**, was am längsten benutzt wird und gut etabliert ist, das andere das **ATP-Entzug-Modell**, was erst in jüngerer Zeit an Beachtung gewann. Interessanterweise scheinen sich die Mechanismen des TJ-Aufbaus in beiden Modellen zu unterscheiden, was auf die Vielfalt der Regulationsmöglichkeiten hindeutet. Der Hauptunterschied liegt wohl in den Interaktionen der TJ-Proteine mit dem Zytoskelett. Es sollte bedacht werden, daß es zwar wahrscheinlich viele gleichartige Regulationsmechanismen der TJs in Endothel- und Epithelzellen gibt, dennoch gewisse Unterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen nicht ausgeschlossen sind.

3.1.1 Ca²⁺-switch-Modell²

Das Ca²⁺-switch-Modell fand bereits frühzeitig Beachtung für die Ausbildung von Zellkontakten in polarisierten Zellkulturen (Cereijido *et al.* 1978). Bei niedrigen extrazellulären Ca²⁺-

¹ Eine große Ähnlichkeit von MDCK- und Hirnendothelzellen wurde im Hinblick auf ultrastrukturelle, enzymatische und antigene Eigenschaften festgestellt (Veronesi 1996), was unter Vorbehalt erlaubt, Versuche mit MDCK-Zellen modellhaft auf Hirnendothelzellen zu übertragen.

² Eine Zusammenfassung der Vorgänge beim Ca²⁺-switch-Modell ist in Kapitel 8 in Tabellenform dargestellt

Konzentrationen ($< 5 \mu\text{M}$) bilden MDCK-Zellen in konfluenten Zellrasen nur minimale Zellkontakte aus und die einzelne Zelle bleibt abgerundet, ohne polarisiert zu sein. Bei der Abwesenheit von Zellkontakten scheinen unter diesen Bedingungen sowohl TJ-Proteine (z.B. ZO-1) als auch *adherens-junction*-Proteine (z.B. Uvomorulin = E-Cadherin) innerhalb des Zytoplasmas der Zelle verteilt zu sein (Siliciano und Goodenough 1988; Gumbiner *et al.* 1988). Der TER der Zellkultur, als Parameter für die TJ-Integrität, ist praktisch gleich null. In diesem Zustand ist die Extrahierbarkeit von TJ-Proteinen mit Detergenzien wie Triton X-100 deutlich erhöht, was eine abgeschwächte Interaktion dieser Proteine mit dem Zytoskelett vermuten läßt (Stuart und Nigam 1995). Der Nachweis der TJ-Proteine in der Triton X-100-unlöslichen Fraktion wird generell mit deren verstärkter (direkten oder indirekten) Assoziation mit Triton X-100-unlöslichen Strukturen des Zytoskeletts (inklusive Aktinfilamente und / oder Intermediärfilamente) erklärt.

Bei Anhebung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf physiologische $1,8 \text{ mmol / l}$ (Ca^{2+} -switch) treten TJs, die apikal-basolaterale Polarität und die Reorganisation des subkortikalen Zytoskeletts sowohl morphologisch als auch immunzytochemisch innerhalb von Stunden in Erscheinung. Der TER, als spätes Ereignis der TJ-Bildung, beginnt sich bereits nach 5-10 h zu entwickeln.

Auch in Hirnendothelzellkulturen war durch Entzug extrazellulären Kalziums eine TJ-Öffnung erkennbar (Rutten *et al.* 1987).

Eine Studie von Howarth *et al.* (1994) untersuchte neben dem **Verteilungszustand von ZO-1** auch dessen **Phosphorylierungsstatus** unter Ca^{2+} -Entzug. Die Chelatierung extrazellulären Kalziums in einer konfluenten MDCK-Zellkultur mit BAPTA führte kurzfristig zu einer schnellen TJ-Öffnung mit deutlicher Lösung der Zellen aus dem Zellverband, ohne daß sich die Verteilung von ZO-1 an Zellkontaktstellen und dessen Phosphorylierungsstatus signifikant änderte. Wenn die extrazelluläre Kalziumkonzentration jedoch drei Tage lang niedrig gehalten wurde, dann war allerdings sowohl das ZO-1 deutlich in das Zytoplasma umverteilt und dessen Phosphatgehalt geringfügig aber signifikant reduziert. Demzufolge korreliert der Phosphatgehalt von ZO-1 positiv mit dessen Lokalisation an Zellkontaktstellen. Das *adherens-*

junction-Molekül **E-Cadherin** spielt eine Rolle bei der TJ-Bildung. Die E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion, die der Entstehung der TJ vorausgeht, ist Ca^{2+} -abhängig (Gumbiner *et al.* 1988). In einer Veröffentlichung von Rajasekaran *et al.* (1996) wurde die Rolle von E-Cadherin und Cateninen im Zusammenhang mit der TJ-Bildung näher beleuchtet: In MDCK-Zellkulturen in Ca^{2+} -armen Medium wurde eine Ca^{2+} -abhängige, E-Cadherin-vermittelte Zelladhäsion und die TJ-Bildung verhindert. In diesem Zustand war E-Cadherin zum größten Teil in großen und kleinen granulären Haufen im Zytoplasma der Zelle und nur in geringfügigem Maße unregelmäßig an der Zelloberfläche lokalisiert. Auch ZO-1 zeigte ein ähnliches Verteilungsmuster und ist an der Zelloberfläche kaum nachweisbar. In den großen granulären Haufen war ZO-1 mit E-Cadherin kolokalisiert. Wenn nun die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration auf 1,8 mmol / l angehoben wurde, so war bereits nach 2 h das gesamte ZO-1 an die Zelloberfläche umverteilt, während ein Großteil von E-Cadherin immer noch im Zellinneren lokalisiert war. Eine große ZO-1-Fraktion kolokalisierte 2 h nach Ca^{2+} -switch immer noch mit oberflächenständigem E-Cadherin. 48 h nach dem Ca^{2+} -switch jedoch war ZO-1 in apikalen Bereichen der TJ und E-Cadherin, deutlich getrennt von ZO-1, basal davon im AJ-Bereich lokalisiert. Zu keinem Zeitpunkt des durch Ca^{2+} getriggerten TJ-Aufbaus kam es jedoch zu einer Koimmunopräzipitation dieser beiden Proteine, was eine indirekte Interaktion vermuten läßt. Tatsächlich kam es zur Koimmunopräzipitation von ZO-1 mit α -, β - und γ -**Catenin** zum Zeitpunkt der Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung. Diese Verbindungen wurden jedoch während des Verlaufes des TJ-Aufbaus immer schwächer und waren nach 48 h nicht mehr nachweisbar. E-Cadherin ist zwar in den ZO-1-Immunopräzipitaten nicht vorhanden gewesen, was auf eine schwache oder instabile Interaktion von E-Cadherin mit ZO-1-Catenin-Komplexen hindeutet. Dennoch war E-Cadherin zu jedem Zeitpunkt des Ca^{2+} -switches zusammen mit β -Catenin in ZO-1-freien Immunopräzipitaten nachweisbar. Dieser Umstand deutet darauf hin, daß die ZO-1-Bindung an Catenin die Catenin-E-Cadherin-Interaktion schwächen könnte. In vollpolarisierten *monolayers* (nach 48 h) gab es keine ZO-1-Catenin-Komplexe mehr. Das Verteilungsmuster von β -Catenin während des Ca^{2+} -switches entsprach genau dem von E-Cadherin, was für eine Vermittlung der ZO-1-E-Cadherin-Interaktion spricht. Die Rolle von α - und γ -Catenin ist in diesen Versuchen nicht hinreichend untersucht worden. Ein Transfektionsversuch konnte zeigen, daß E-Cadherin in MDCK-Zellen unabdingbar für die Translokation von ZO-1 in die TJ-Region an der Zelloberfläche

während der Ca^{2+} -gesteuerten TJ-Entstehung notwendig ist. Es sollte aber bedacht werden, daß E-Cadherin in E-Cadherin-transfizierten S180-Sarkomzellen weder einen direkten Effekt auf die Lokalisation von ZO-1 noch auf dessen Phosphorylierungsstatus hatte, was für zelltypspezifische Vorgänge spricht (Howarth *et al.* 1994).

Bei Chelatierung des extrazellulären Ca^{2+} mit EGTA in verschiedenen bereits konfluenten Epithelzellkulturen mit ausgebildeten TJ ist der TER-Verlust besonders hoch und die Proteinumverteilung besonders ausgeprägt, wenn EGTA im **basolateralen Bereich der Epithelzellen** appliziert wird (Collarez-Buzato *et al.* 1994). Andererseits konnte eine kurzfristige basolaterale Exposition von MDCK-Zellen mit Trypsin unter der Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen die Bildung aberranter TJ-Banden im basolateralen Zellbereich induzieren. Dies ging einher mit einem um 90% gestiegenen TER und wahrscheinlich auch mit einer Kolo-kalisation der aberranten TJ mit ZO-1. Dieser Effekt war weder unter kalziumfreien Bedingungen noch bei apikaler Applikation von Trypsin auszulösen (Lynch *et al.* 1995). Beide Studien belegen, daß die Wirkung von Ca^{2+} -Ionen auf die Zelle bevorzugt über spezifische Membranstrukturen der basolateralen Domäne vermittelt werden.

Bisher war nur von den Auswirkungen variierteter extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen auf die Zelle die Rede. Nigam *et al.* (1992) zeigten, daß die **globale intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration** während der TJ-Biogenese nach Ca^{2+} -switch stark ansteigt und mit Veränderungen im Bereich der Zellkontakte einhergeht. Daß intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen für die TJ-Bildung eine Rolle spielen, wurde durch deren intrazelluläre Chelatierung gezeigt: Mit Hilfe von BAPTA-AM und Dimethyl-BAPTA-AM wurde Ca^{2+} intrazellulär während des Ca^{2+} -switches chelatiert, wodurch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration sank. Dies bewirkte, daß es zur starken Hemmung des TER-Aufbaus kam, ZO-1 deutlich verspätet zur Plasmamembran umverteilt wurde und daß der Teil der ZO-1-Fraktion, der unter den normalen Bedingungen des Ca^{2+} -switches aus der Triton X-100-löslichen Fraktion in die zytoskelettgebundene Triton X-100-unlösliche Fraktion übergeht, unter diesen Umständen in der Triton X-100-löslichen Fraktion verweilt. Die E-Cadherin-Umverteilung und die Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts war allerdings durch die intrazelluläre Ca^{2+} -Chelatierung nicht betroffen (Stuart *et al.* 1994).

Nun ist es aber nicht so, daß ein Ca^{2+} -Strom von außen über die Plasmamembran in das Innere der Zelle für die TJ-Bildung entscheidend wäre (Contreras *et al.* 1992). Vielmehr ist Ca^{2+} aus **intrazellulären Ca^{2+} -Speichern** ein wichtiger Bestandteil einer Signaltransduktionskaskade, die für die intrazelluläre TJ-Biogenese von Bedeutung ist: Eine spezifische Störung des Kalziumspeichers Endoplasmatisches Retikulum (ER) mit dem Ca^{2+} -ATPase-Hemmstoff Thapsigargin (TG) führte zu einer Entleerung des Kalziums aus dem ER in das Zytosol der Zelle und machte diese dadurch unempfindlich für nachfolgende Stimulationen zur ER Kalziumfreisetzung (z.B. durch IP_3). Wenn man TG vor der Ausbildung von Zellkontakten im Ca^{2+} -switch-Modell applizierte, so führte dies nach Ca^{2+} -switch zur Unterbrechung der TJ- und Desmosomen-Biogenese, ohne daß die E-Cadherin-vermittelte Zelladhäsion dadurch offensichtlich gestört wurde. Die ZO-1- und Desmoplakin-Umverteilung und die Entwicklung des TER, wurden durch TG dosisabhängig gehemmt, obwohl die totale zytosolische Ca^{2+} -Konzentration durch TG im Vergleich zu Kontrollen *unverändert* blieb. Außerdem wurde die Stabilisierung von ZO-1 in der Triton X-100-unlöslichen Zytoskelettfraction durch TG gehemmt (Stuart *et al.* 1996). Diese Befunde zeigen, daß die frühe epitheliale TJ-Biogenese von kalziumsensitiven intrazellulären Mechanismen abhängt, bei denen die thapsigargin-sensitiven intrazellulären Kalziumspeicher (ER) eine wichtige Rolle spielen. Das Vorkommen von Ca^{2+} in normalen Konzentrationen im Zytosol reicht für eine intrazelluläre TJ-Entstehung allein nicht aus, wenn es durch TG gleichzeitig zur Störung des ER als Ca^{2+} -Speicher kommt.

Bei den bisher beschriebenen Vorgängen in Zellkulturen unter kalziumarmen Bedingungen bewirkte die Anhebung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf normale Werte die Ausbildung von TJs. Dies impliziert, daß es einen Mechanismus geben muß, der in der Lage ist, das **Ca^{2+} -Signal** von der äußeren Zellmembran **zur zytoplasmatischen Seite zu vermitteln**, wo bekanntlich der TJ-Aufbau stattfindet: z.B. die Umstrukturierung der Aktinfilamente (Meza *et al.* 1980), die Translokation von ZO-1 zur Plasmamembran (Siliciano und Goodenough 1988) und die Ca^{2+} -abhängige E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsion, die der Entstehung der TJ vorausgeht (Gumbiner *et al.* 1988). Der Ca^{2+} -induzierte TJ-Aufbau kann mit Antikörpern gegen die extrazelluläre Domäne von E-Cadherin durch Blockierung der Zelladhäsion gehemmt werden (Vestweber und Kemler 1985; Gumbiner *et al.* 1988). Dieser Umstand spricht für eine Funktion von E-Cadherin, das Ca^{2+} -Signal über die Plasmamembran von au-

ßen nach innen zu vermitteln. Pharmakologische Studien von Balda *et al.* (1991), die sich den Ca^{2+} -switch zunutze machten, gaben erste Hinweise auf die Beteiligung von G-Proteinen, Phospholipase C, Proteinkinase C und Calmodulin bei der Signaltransduktion. Diese Mechanismen werden, sofern sie bekannt sind, im Kapitel 3.2 besprochen.

3.1.2 ATP-Entzug-Modell³

Durch ATP-Entzug eines konfluenten Zellrasens in Kultur lassen sich ischämische Zustände der Zellen im Gewebe annähernd simulieren. Daher hat dieses Modell Relevanz für Ischämie-Reperfusion- oder Hypoxie-Reoxigenierungs-Verletzungen.

Im Vergleich zum Ca^{2+} -switch Modell sind die biochemischen Vorgänge im ATP-Entzugs-Modell erst in jüngerer Zeit in das Interesse der Forschung gerückt. Die Aufklärung der Signaltransduktionskaskaden bedarf noch weitergehender Studien, um den Kenntnisstand dem Ca^{2+} -switch-Modell anzugleichen.

Eine wichtige Studie von Tsukamoto und Nigam (1997) führte zu einem besseren Verständnis der intrazellulären Vorgänge nach ATP-Entzug in MDCK-Zellen und stellte die Unterschiede zum Ca^{2+} -switch-Modell heraus:

Um die ATP-Konzentrationen innerhalb der Zelle schnell zu senken, kam die gebräuchliche Kombination des Glykolysehemmstoffs 2-Desoxy-D-Glucose mit dem Hemmstoff der oxidativen Phosphorylierung, Antimycin A, zur Anwendung. Innerhalb von 15 min kam es zu **TER-Verlusten** der MDCK-*monolayer* auf 5% der Ausgangswerte, was einer funktionellen TJ-Öffnung entspricht. Die TER-Werte waren den ATP-Konzentrationen proportional und konnten reversibel nach bis zu 3 h ATP-Entzug wieder auf ihre Ausgangswerte gebracht werden, was einherging mit dem entsprechenden ATP-Anstieg auf Ausgangswerte.

Während der TJ-Öffnung durch ATP-Entzug blieben die TJ-Proteine ZO-1, ZO-2 und Cingulin bis 3 h nach ATP-Entzug im allgemeinen an den Zellkontaktstellen kolokalisiert, auch wenn es vereinzelte Unregelmäßigkeiten in den Färbemustern gab: Am eindruckvollsten war der Verlust der diffusen intrazellulären Färbung von ZO-2 und Cingulin der schon nach 3

h ATP-Entzug erkennbar wurde. Das lineare ZO-1-Färbemuster war zu diesem Zeitpunkt nur gelegentlich unterbrochen. Veränderungen in der Zellform waren nach 3 h ATP-Entzug erkennbar, was für **Störungen des Aktin-Zytoskeletts** spricht, während die **Zellkontakte** durchweg **intakt** blieben. Histochemisch ließen sich nur geringfügige Änderungen im kortikalen Aktinring der Zellen nachweisen, während die *stress fibers* jedoch deutlich zerissen. Im Gegensatz zu den geringfügigen Veränderungen der TJ-Proteinlokalisationen (anders als bei Ca^{2+} -Entzug) gab es einen signifikanten Anstieg der Anfärbbarkeit der **Na^+ - K^+ -ATPase** außerhalb der basolateralen Membrandomänen, was für Polaritätsänderungen der Zelle spricht. Nach 6 h ATP-Entzug - einem Zustand, in dem eine Erholung der Zellen offensichtlich nicht mehr möglich ist - waren die Veränderungen dramatischer, auch die Zellkontakte lösten sich und der kortikale Aktinring war retrahiert.

Der ATP-Entzug bewirkte, daß ZO-1, ZO-2 und Cingulin zeitabhängig und reversibel (bis zu 3 h nach ATP-Entzug) für Triton X-100 extrem unlöslich wurden, was auf **verstärkte Zytoskelett-Interaktionen** hindeutet. Gleichzeitig kam es nach ATP-Entzug zur Bildung großer **makromolekularer Komplexe von TJ-Proteinen**, in denen auch ZO-1 und ZO-2 vorkam. Die Assoziation von ZO-1 und ZO-2, durch Koimmunopräzipitation nachgewiesen, war durch den ATP-Entzug jedoch unbeeinflusst. Eine verstärkte Assoziation dieses makromolekularen Komplexes während ATP-Entzug kam unterdessen mit dem 240 kDa schweren Aktin-Zytoskelettprotein **Fodrin** zustande. Fodrin war in Kontrollzellen diffus in subplasmalemalen Regionen und im Zytosol verteilt. Nach ATP-Entzug kam es zum signifikanten Anstieg der Kolo-kalisation von Fodrin in der TJ-Gegend. Auch dieser Vorgang war nach ATP-Anstieg in normalem Zellmedium reversibel. Obwohl Fodrin mit dem ZO-1-haltigen Komplex koimmunopräzipitierte, blieb der Interaktionsmodus - direkt oder indirekt - unklar.

Hinweise auf biochemische Regulationsstellen im ATP-Entzug-Modell, bei denen Rho-GTPasen und Phosphorylierungsmechanismen eine Rolle spielen, werden in Kapitel 3.2 besprochen.

³ Eine Zusammenfassung der Vorgänge im ATP-Entzug-Modell ist in Kapitel 8 in Tabellenform dargestellt

3.2 Signaltransduktion bei der TJ-Regulation

Im vorangehenden Kapitel 3.1 wurde deutlich, daß die Regulation der TJ-Integrität auf unterschiedlichen Wegen erreicht werden kann. Die intrazellulären Vorgänge sind dabei so verschiedenartig, daß sie sich teilweise zu widersprechen scheinen. Man muß daher annehmen, daß es verschiedene Mechanismen auf der Ebene der Signaltransduktion gibt, die nebeneinander existieren können.

Die Auswirkungen variabler Ca^{2+} -Konzentrationen auf die TJ-Strukturen, die Notwendigkeit regulierter intrazellulärer Kalziumspeicher und die Bedeutung von ATP für die TJ-Bildung wurden bereits im obigen Kapitel ausführlich beschrieben. Hier sollen die Signaltransduktionsmechanismen auf biochemischer Ebene näher erläutert werden, die zu den oben beschriebenen Änderungen innerhalb der Zelle während der TJ-Regulation führen. Das Wissen über zusammenhängende Signaltransduktionskaskaden bei der TJ-Regulation ist bis heute immer noch sehr gering und spekulativ, sodaß sich die folgende Darstellung nur auf Fragmente aus bislang unbekanntem intrazellulären Vorgängen beschränken kann.

Analog zum vorangegangenen Kapitel werden zunächst Vorgänge beschrieben, die durch ein extrazelluläres Ca^{2+} -Signal ausgelöst werden (**Ca^{2+} -switch**). Danach werden intrazelluläre Vorgänge beleuchtet, die im funktionellen Zusammenhang mit dem **ATP-Entzug-Modell** stehen.

Proteinkinase C (PKC) und heterotrimere G-Proteine

Die Beteiligung von G-Proteinen, Phospholipase C, Proteinkinase C und Calmodulin bei der intrazellulären Signaltransduktion nach Veränderung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Balda *et al.* 1991) wurde bereits erwähnt.

In einer Studie von Balda *et al.* (1993) wurden die Effekte des **PKC-Agonisten 1,2-Dioctanoylglycerol (DiC8)** auf den TJ-Aufbau in MDCK-Zellen bei *niedrigen* extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß DiC8 unter diesen Be-

dingungen in der Lage war, ZO-1 zur Plasmamembran umzuverteilen, das Aktin-Zytoskelett neu zu organisieren (F-Aktin-Umverteilung aus der Zellkerngegend zur Zellperipherie) und TJ-Fibrillenbildung zu induzieren.

Diese Effekte waren alle deutlich, aber im Vergleich zu den Wirkungen des Ca^{2+} -switches weniger stark ausgeprägt. Durch DiC8 gelang es zwar die parazelluläre Permeabilität erheblich zu senken, was durch einen verringerten Mannitolflux gezeigt werden konnte, dennoch war es durch DiC8 allein nicht möglich, erhöhte elektrische Widerstände der Zellkultur (TER) aufzubauen, obwohl der TER-Aufbau während des Ca^{2+} -switches durch DiC8 potenziert werden konnte. Keinen Effekt hatte DiC8 auf die Ca^{2+} -abhängige Umverteilung von E-Cadherin zur Zellmembran. Normalerweise blockieren Anti-E-Cadherin AK die Ca^{2+} -induzierte TJ-Bildung (Gumbiner *et al.* 1988). In Gegenwart von Anti-E-Cadherin AK und Ca^{2+} induzierte DiC8 allerdings dennoch die oben beschriebene ZO-1- und Aktin-Umverteilung. Diese Befunde sprechen dafür, daß die PKC-Aktivität in der Signaltransduktionskaskade durch E-Cadherin gesteuerten Zellkontakt aktiviert wird, bzw. daß die PKC durch DiC8 in der Kaskade „stromabwärts“ von E-Cadherin aktiviert wird, ohne daß DiC8 einen direkten Effekt auf E-Cadherin hätte. Der Zellkontakt scheint von Bedeutung zu sein, da weder Ca^{2+} noch DiC8 in vereinzelter MDCK-Zellen eine ZO-1-Umverteilung bewirkten. Zu Beginn der Ca^{2+} -gesteuerten Kaskade steht wohl E-Cadherin, welches durch eine direkte Aktivierung der PKC mit DiC8 hier quasi übersprungen wird. Der Phosphatgehalt von ZO-1, ZO-2 und p130 (ZO-3) - Proteine, die sowohl vor als auch nach TJ-Bildung als makromolekularer Komplex koimmunopräzipitierten - änderte sich in dieser Studie weder im Ca^{2+} -switch, noch nach DiC8-Stimulation. Diese Proteine scheinen dieser Studie zufolge daher keine Substrate für Phosphorylierungsmechanismen durch die PKC-Aktivierung in dieser Kaskade zu sein, obwohl es sich um Phosphoproteine handelt.

Eine andere Studie untersuchte die Effekte von verschiedenen Proteinkinaseinhibitoren auf die TJ-Bildung in MDCK-Zellen während des Ca^{2+} -switches (Denisenko *et al.* 1994). Die **Proteinkinaseinhibitoren H-7, H-8 und Staurosporin** verhinderten während des Ca^{2+} -switches einen TER-Aufbau in MDCK-Zellkulturen. Von allen drei Inhibitoren nimmt man an, sie haben eine besonders starke (aber nicht spezifische!) Hemmwirkung gegen Proteinkinase C. Die ZO-1- und Cingulinumverteilung zur Zellperipherie blieb unter der Gegenwart

von H-7 aus, während die Umverteilungen von E-Cadherin und Desmoplakin zur AJ bzw. zum Desmosom unbeeinflusst waren. Andererseits verhindert H-7 die Organisation des Aktin-Zytoskeletts.

Interessanterweise wurde eine TJ-*Öffnung* nach Entfernung des extrazellulären Kalziums durch H-7 in einer anderen Untersuchung verhindert (Citi *et al.* 1994). In beiden Studien nahm man an, daß die H-7-Wirkung über **Störungen der Organisation des Aktin-Zytoskeletts** vermittelt würden.

Stuart *et al.* (1995) unternahmen weitere Untersuchungen mit Proteinkinaseinhibitoren. Eine enzymatische Untersuchung stellte ein 33%ige Steigerung der Gesamtzell-PKC-Aktivität, sowie eine mehr als verdoppelte Aktivität der membranassoziierten PKC-Aktivität während des normalen Ca^{2+} -switches fest. Außerdem schien die ζ -**Isoform der PKC** während des Ca^{2+} -switches eine Translokation zur lateralen Plasmamembran zu erfahren und dort mit ZO-1 zu kolokalisieren. Durch **Calphostin C**, einem **spezifischen irreversiblen PKC-Inhibitor**, und durch H-7 konnte auch hier der TER-Aufbau gehemmt, sowie die ZO-1-Umverteilung verzögert werden. Die E-Cadherin- und Desmoplakin- und sogar die Aktin-Umverteilungsvorgänge blieben durch Calphostin C unbeeinflusst, während H-7 leichte Veränderungen im Aktin-Färbeverhalten verursachte. Im Ca^{2+} -switch stieg 2 h nach Zellkontakt der ZO-1-Phosphatgehalt deutlich an. Calphostin C hemmte den ZO-1-Phosphatgehaltsanstieg um 85% und H-7 um 69,8%. Die verminderte Phosphatgehaltszunahme durch die Proteinkinaseinhibitoren war parallel zu den verminderten TER-Werten. In Versuchen mit aufgereinigten TJ-Proteinen und aufgereinigter PKC konnte ZO-1 (wahrscheinlich auch ZO-2 und ZO-3) als direktes Zielprotein für Phosphorylierungen der PKC identifiziert werden. Obwohl die ZO-1-Umverteilung zur Zellmembran durch PKC-Hemmung verzögert wurde, so hatte dies dennoch keinen Einfluß auf die zunehmende Triton X-100-Unlöslichkeit von ZO-1 während des Ca^{2+} -switches. Die Zytoskelettassoziation von ZO-1 nach TJ-Aufbau ist daher zwar Ca^{2+} -abhängig aber wohl PKC-unabhängig.

Die Tatsache, daß weder Calphostin C noch H-7 in konfluenten MDCK-*monolayers* (bei normalen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen!) TER-Veränderungen oder veränderte ZO-1-Lokalisationen hervorruft, spricht für eine **spezifische Rolle der PKC beim TJ-Aufbau**.

Die Mitwirkung der PKC und intrazellulärer Kalziumspeicher bei TJ-Regulationsmechanismen macht eine Beteiligung von heterotrimeren G-Proteinen im Frühstadium der Signaltransduktion sehr wahrscheinlich.

Dodane und Kachar (1996) untersuchten MDCK- und Caco-2-Zellen auf das Vorkommen und den Verteilungszustand verschiedener **Isoformen** der **Proteinkinase C** und von **G-Proteinen**. Die PKC-Familie besteht aus mindestens 11 Subspezies (α , β I, β II, γ , δ , ϵ , ζ , η , ι , θ , λ und μ). G-Proteine sind heterotrimere (α -, β - und γ -Untereinheiten) Guanin-Nukleotid-(GTP) bindende Proteine, die als molekulare Schalter für rezeptorvermittelte Signaltransduktion dienen. Sie leiten Signale von der Zelloberfläche zu verschiedenen intrazellulären Effektoren, wie der Adenylatzyklase, der Phospholipase A₂ und C, Ionenkanälen oder der cGMP-Phosphodiesterase, die wiederum intrazelluläre Mediatoren, wie Ca²⁺ oder cAMP mobilisieren. Die G-Proteine mit Rezeptor-Effektor Aktivität leiten sich von einer großen Genfamilie ab. Über die α -Untereinheiten lassen sich vier wichtige Klassen ($G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12}$) mit mindestens 21 Isotypen differenzieren.⁴

Von acht untersuchten Isoformen der PKC war in beiden Zelltypen nur die **PKC- ζ** an interzellulären Kontaktstellen lokalisiert. Auch die Zellkerne waren positiv für die PKC- ζ gefärbt. In subkonfluenten Zellkulturen war die PKC- ζ nur dort an der Zellmembran lokalisiert, wo Zellkontakte ausgebildet waren. Die PKC- ζ kolokalisierte in Immunfluoreszenzversuchen mit ZO-1. Von fünf verschiedenen Anti-G α Antikörpern reagierte der G α_{12} -AK ähnlich, wie die PKC- ζ -AK. G α_{12} war ebenfalls die einzige Isoform, die sich an der Plasmamembran -und dort nur im Bereich von Zellkontakt- nachweisen ließ. Zudem lies sich G α_{12} punktuell im Zytoplasma, vor allem perinukleär, darstellen. Eine Kolokalisation mit ZO-1 ist auch für G α_{12} wahrscheinlich.

Denker *et al.* (1996) konnten die G α -Untereinheit G α_{12} in Wildtyp MDCK-Zellen nachweisen. G α_{12} war in der basolateralen Membranregion lokalisiert und überlappte teilweise mit der TJ-Region (ZO-1). Die G α_0 -Untereinheit kommt normalerweise nicht in MDCK-Zellen vor. G α_0 -transfizierte MDCK-Zellen und eine mit einer daueraktivierten punktmutierten Variante von G α_0 (Q205L α_0) transfizierte MDCK-Zellen wurden auf die topographische Verteilung

⁴ Eine gute allgemeine Darstellung intrazellulärer Signaltransduktionsvorgänge findet sich in Alberts *et al.*: Molecular Biology of the Cell, Third Edition (1994), Garland Publishing Kapitel 15

dieser artefiziell exprimierten Proteine in der Zelle und auf die TER-Entwicklung dieser Zelltypen im Vergleich zu Wildtyp $G\alpha_{i2}$ -MDCK-Zellen im Ca^{2+} -switch untersucht. Die transfizierten Zellen zeigten ein ähnliches Verteilungsmuster für $G\alpha_o$, wie für $G\alpha_{i2}$ in Wildtypzellen in der subapikalen Region zwischen TJ und AJ mit partieller Überlappung mit ZO-1. Die TER-Entwicklungsgeschwindigkeit nach Ca^{2+} -switch war in $G\alpha_o$ -daueraktivierten Q205L α_o -MDCK-Zellen im Verhältnis zu $G\alpha_o$ - und $G\alpha_{i2}$ -MDCK-Zellen deutlich erhöht. Dies spricht klar für eine Funktion von G-Proteinen bei der frühen TJ-Biogenese. Dieser Befund steht gut im Einklang mit der Tatsache, daß die TER-Werte aller drei Zellvarianten 28h nach Zellkontakt im Ca^{2+} -switch wieder auf ähnlichen Niveaus waren. Die Aktivierung der G-Proteine scheint also keinen Einfluß auf den Grad der TJ-Integrität bereits bestehender TJ zu haben. Die Assoziation mindestens einer Fraktion von $G\alpha_o$ mit ZO-1 wirft allerdings weitere Fragen nach funktionellen Zusammenhängen zwischen G-Proteinen und TJ-Komponenten wie ZO-1 auf. Die Vielfalt der $G\alpha$ -Subtypen und die Tatsache, daß $G\alpha_o$ nicht natürlicherweise in MDCK-Zellen vorkommt, macht präzise Aussagen über die Beteiligung einer spezifischen $G\alpha$ -Untereinheit bei der TJ-Regulation in verschiedenen Zelltypen zwar sehr schwierig, dennoch zeigen die Ergebnisse klar, daß heterotrimere G-Proteine an der Signaltransduktion bei der TJ-Biogenese beteiligt sind.

Kleine GTPasen: Rab und Ras; kleine G-Proteine Rac und Rho

Rab13 ist eine kleine GTPase aus der Rab/Ypt1/Sec4-Familie (Ras-Superfamilie), deren Mitglieder vor allem für regulatorische Schlüsselfunktionen im vesikulären Transport bekannt sind. In Caco-2-Zellen, anderen Epithelien und auch in Endothelzellen gelang es Rab13 in der TJ-Region, kolokalisiert mit ZO-1 nachzuweisen (Zahraoui *et al.* 1994). Im Ca^{2+} -switch-Experiment kam es in Caco-2-Zellen nach Ca^{2+} -Entzug zur Umverteilung von ZO-1 und Rab13 ins Zytoplasma. In subkonfluenten Zellkulturen konnte Rab13 nur dann im Bereich der Zellmembran nachgewiesen werden, wenn an dieser Stelle ein Kontakt zu benachbarten Zellen bestand. Vergleichende Untersuchungen der Rab13-Verteilung in Fibroblasten, die zwar AJ aber keine TJ besitzen zeigten, daß Rab13 dort nie im Bereich von Zellkontakten zu lokalisieren war, sondern in vesikulären Strukturen des Zytoplasmas. Eine Aktivierung der E-

Cadherin vermittelten Zelladhäsion reichte nicht aus, um Rab13 zur Plasmamembran zu befördern, wenn dort keine TJ vorhanden waren. Rab13 ist daher möglicherweise außer am vesikulären Transport polarisierter Zellen auch an deren TJ-Regulation beteiligt.

Eine andere Studie untersuchte *in vivo* Interaktionen von **AF-6** mit ZO-1 und **Ras-Proteinen** in NIH3T3-Zellen (Yamamoto *et al.* 1999). Aktiviertes Ras vermittelt sein Signal stromabwärts über Effektoren wie Raf-1, Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase, RalGDS und RIN1. Ras-Mutationen gehören zu den häufigsten Mutationen bei menschlichen Tumoren. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl ZO-1, als auch die aktivierte Form von Ras (GTP bindend) über zwei verschiedene RA-Domänen an AF-6 bindet. AF-6 und ZO-1 koimmunopräzipitierten sowohl in der Triton X-100 löslichen, als auch in der unlöslichen Fraktion, was für die Kolo-kalisation der beiden Proteine in verschiedenen funktionellen Zuständen der Zelle spricht. Aktiviertes Ras führte *in vitro* zu einer Hemmung der AF-6-ZO-1-Interaktion. Ob eine Aktivierung von Ras allerdings diese Interaktion während der Regulation von Zelladhäsionsvorgängen modulierte, wurde bis dato nicht untersucht.

Zur **Familie der kleinen Rho G-Proteine** gehören die Subfamilien Rho, Rac und Cdc42. Die **Rho-Subfamilie** besteht aus den drei Mitgliedern Rho-A, -B, -C, die sehr vielfältige zelluläre Funktionen haben, die in den meisten Fällen mit dem Zytoskelett (besonders dem Aktinzytoskelett) in Verbindung gebracht werden. Von Nusrat *et al.* (1995) wurde beschrieben, daß Rho durch eine Beeinflussung der Aktinfilamentorganisation im apikalen Bereich polarisierter Epithelien die TJ reguliert.

Eine spezifische **Hemmung der Funktion der Rho-Subfamilie** mit C3, einer *Cl. botulinum* ADP-Ribosyltransferase, führte in MDCK-Zellen zu einem schnellen Verschwinden von Streßfasern und zur Hemmung der Lokalisation von Ezrin, Radixin, Moesin (ERM) in der Zellperipherie und von Vinculin an Zellkontakten (Kotani *et al.* 1997). Nach einer Stunde lösten sich die Aktinfilamente an Zellkontaktstellen auf, während die Zellen sich aus dem Verband lösten. Zu diesem Zeitpunkt nahm auch die Anfärbbarkeit von E-Cadherin und ZO-1 an Zellkontaktstellen ab. Dies spricht für eine Funktion der Rho-Subfamilie beim Erhalt der Integrität sowohl der AJ als auch der TJ. In einem Ca^{2+} -switch-Versuch konnte dagegen gezeigt werden, daß die Ca^{2+} -induzierte Umverteilung von E-Cadherin und von ZO-1 an Zell-

kontaktstellen durch C3 gehemmt wurde (Takaishi *et al.* 1997). Das spricht für die Notwendigkeit von Rho für den Ca^{2+} -induzierten AJ- und TJ-Aufbau. Ebenso konnte die PKC-vermittelte (12-O-Tetradekanoylphorbol-13-Azetat- (TPA) induzierte) ZO-1-Lokalisation an Zellkontaktstellen mit C3 im Ca^{2+} -switch gehemmt werden. Daraus läßt sich die Notwendigkeit von Rho auch für den PKC-vermittelten TJ-Aufbau ableiten.

Die **Rac-Subfamilie** spielt eine Rolle beim Aufbau der AJ: Rac-daueraktivierte Mutanten vermochten in MDCK-Zellen einen signifikanten Anstieg der Aktinfilamente, von E-Cadherin und von β -Catenin an Zelladhäsionsstellen zu bewirken, während ZO-1 durch Rac-Aktivierung unbeeinflusst blieb. Ein Effekt von C3 auf diese Vorgänge in Rac-daueraktivierten MDCK-Mutanten blieb aus, was für eine Rho-Unabhängigkeit der Rac-induzierten cadherinvermittelten Zelladhäsion spricht (Takaishi *et al.* 1997).

Bisher war die Rede von Signaleffekten im Ca^{2+} -switch-Modell. Da sich diese Mechanismen der TJ-Regulation vom **ATP-Entzug-Modell** zu unterscheiden scheinen, werden die Erkenntnisse über mögliche Signaltransduktionsvorgänge in diesem Modell im folgenden gesondert besprochen.

Eine wichtige Rolle scheint der im vorigen Abschnitt besprochenen **Rho GTPase** auch im ATP-Entzug-Modell zuzukommen. Gopalakrishnan *et al.* (1998) konnten in MDCK-Zellen zeigen, daß eine Hemmung des Rho-Signals zu einer Limitierung des TJ-Aufbaus mit verminderter Lokalisation von ZO-1 und Occludin an Zellkontaktstellen führte, die mit einem reduziertem Phosphatgehalt von Occludin einherging, während eine Aktivierung von Rho zur ZO-1- und Occludinakkumulation an Zellkontaktstellen führte und den Phosphatgehalt von Occludin steigerte. Im Vergleich dazu kam es während des ATP-Entzugs zu einem schnellen reversiblen Phosphatgehaltsverlust in ZO-1 und Occludin. Der Zusammenhang zwischen Rho und ATP-Entzug wurde mit folgendem Versuchsaufbau untersucht: In MDCK-Zellen mit dominant-negativ exprimiertem Rho (Rho-N19) kam es nach ATP-Entzug zu einem vergleichsweise extremen Verlust der TJ-Strukturen, während eine Rho-Daueraktivierung in MDCK-Mutanten (Rho-V14) die Wirkung des ATP-Entzugs deutlich abschwächten. Dieses Ergebnis und die Untersuchung des Phosphoaminosäuregehalts der TJ-Proteine sprechen für eine Vermittlung des Rho-Signals an spezifische Kinasen, die **Occludin** als Zielprotein an

Serin / Threoninstellen phosphorylieren. Eine (Dauer-)Aktivierung von Rho schützte die TJ vor Beschädigungen durch ATP-Entzug. Dieser Rho-Signaltransduktionsweg scheint während der TJ-Öffnung durch ATP-Entzug gehemmt zu werden.

Die Reversibilität der Vorgänge an der TJ bis zu 3 h nach ATP-Entzug wurde in Kapitel 3.1.2 besprochen. Der in dieser Zeitspanne mögliche Wiederaufbau der TJ-Integrität durch eine Anhebung der ATP-Konzentration scheint von **Tyrosinphosphorylierungsmechanismen** abhängig zu sein (Tsukamoto und Nigam 1999): Eine spezifische Hemmung der Tyrosinkinase mit **Genistein** vor Anhebung der ATP-Konzentrationen nach ATP-Entzug verhinderte deutlich den Wiederaufbau des TER in MDCK-Zellen. Die Studie konnte auch zeigen, daß es während des ATP-Entzugs zu einer reversiblen **Umverteilung von Occludin** ins Zellinnere und zu einer verringerten Triton X-100-Löslichkeit kam. Die Umkehr der Occludinumverteilung sowie des Löslichkeitsverhaltens nach Normalisierung der ATP-Werte wurde durch Genistein ebenso gehemmt, wie der Übergang von ZO-1 und ZO-2 in die Triton X-100-lösliche Fraktion, während deren Assoziation in makromolekularen Komplexen durch Genistein unbeeinflusst blieb. Während des Anstiegs der ATP-Konzentrationen kam es auch zu einem Anstieg der Tyrosinphosphorylierung der Proteine **ZO-2, ZO-3** und **Occludin** (aber *nicht* von ZO-1!), die unter der Gegenwart von Genistein vollständig unterblieb. Dieses Ergebnis spricht für eine Beteiligung von Tyrosinphosphorylierungsmechanismen bei der Regeneration der Zellen nach ATP-Entzug.

3.3 Besonderheiten der TJ im Bereich der BHS

3.3.1 Astrozyten und Endothel

Im Bereich des Hirnkapillarendothels sind die TJs vergleichsweise stark ausgebildet, was sich durch besonders hohe transepitheliale Widerstände zeigt und worin ein Charakteristikum der BHS besteht. Der Unterschied der Hirnkapillaren zu Kapillaren außerhalb des Gehirns besteht vor allem in der engen topographischen Beziehung zu Astrozyten, die mit ihren Fortsätzen bis an die Hirnkapillaren heranreichen. Die Tatsache, daß Hirnendothelzellen typische BHS-

Charakteristika⁵ ausbilden ist keine Eigenschaft, deren Ursache allein in der Hirnendothelzelle selbst liegt.

Schon vor etwa 20 Jahren zeigten Versuche, daß Gliazellen(-faktoren) die γ GT (ein typischer Hirnendothelzellmarker) in isolierten Hirnendothelzellen induzierten (DeBault und Cancilla 1980). In Transplantationsversuchen von Janzer und Raff (1987) waren Astrozyten in der Lage auch in **Endothelzellen nichtneuronalen Ursprungs** BHS-artige Eigenschaften zu induzieren.

Arthur *et al.* (1987) zeigten, daß Rattenhirnendothelzellen, die nach der vierten Zellpassage keine TJs mehr ausbildeten, nur bei Wachstum auf einem **speziellen Endothelzell-Matrix-Substrat** und in Gegenwart von **astrozytenkonditioniertem Medium** wieder TJ bildeten, die ihrem Ausprägungsgrad nach den TJ der BHS *in vivo* entsprachen. Eine derartige TJ-Bildung ließ sich unter den gleichen Voraussetzungen auch in bovinen aortalen und pulmonalarteriellen Endothelzellen induzieren (Shivers *et al.* 1988).

Viele typische Hirnendothelcharakteristika werden durch von Astrozyten freigesetzte Stoffe induziert. Aber auch das Endothel scheint Einfluß auf die Morphologie und Eigenschaften der Astrozyten zu haben.

In Experimenten mit Kokulturen aus Hirnendothelzellen und Astrozyten ließen sich in reziproken Wirkungen der beiden Zelltypen aufeinander jeweils **BHS-typische Membranveränderungen** induzieren, die sich in Monokulturen der Zellen nicht fanden. So bildeten die Endothelzellen BHS-typische (astrozyteninduzierte) TJ aus, während die Astrozyten verstärkt typische (hirnendothelinduzierte) *membrane assemblies* bildeten, die sich interessanterweise nicht in einer Kokultur mit aortalem oder pulmonalarteriellem Endothel induzieren ließen (Tao-Cheng und Brightman 1988).

Mit hirnendothelzellkonditioniertem Medium konnte das Astrozytenwachstum angeregt werden. Es kam zu einer Stimulation der DNA-Synthese in Astrozyten und Perizyten, die durch einen isolierten Faktor hirnendothelialen Ursprungs (ein > 50 kDa Protein) bedingt war (Estrada *et al.* 1990).

⁵ siehe hierzu Kapitel 2.1.1 und 2.1.2

Die *in vitro*-Interaktionen von Astrozyten und Perizyten mit kapillarartigen Strukturen aus Rinderhirnendothel wurden in Kokulturrexperimenten von Minakawa *et al.* (1991) untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß Endothelzellen Astrozyten chemotaktisch in die Nähe der Kapillarstrukturen lockten und sogar deren Differenzierungsgrad erhöhten.

In einer postkonfluenten **Rinderhirnendothelzellkultur** wurde die Wirkung eines konditionierten Mediums von C6-Gliomzellen (Mensch, Ratte) auf die TJ-Dichte überprüft. Es kam zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der TER-Werte, die mit einer verminderten Sucrose- und Dextranpermeabilität einhergingen. Die Rinderhirnendothelzellen (RHE) bildeten unter dem Einfluß von Astrogliomfaktoren einen differenzierteren Hirnendothelzell-Phänotyp aus, der neben dichteren TJ noch eine verstärkte γ GT-Aktivität und eine reduzierte pinozytotische Aktivität aufwies (Raub *et al.* 1992).

3.3.2 Signaltransduktion im BHS Bereich

Nachdem das meiste Wissen über die TJ-Regulation und Signaltransduktion an epithelialen Modellen erarbeitet wurde, drängt sich die Frage auf, ob sich die dort erworbenen Erkenntnisse auf das endotheliale BHS-Modell übertragen lassen. Welche besonderen Eigenschaften hat das Hirnendothel und ermöglicht somit die spezifischen BHS-Charakteristika?

Früh gab es Hinweise auf die induktive Wirkung von **Astrozyten** und deren lösliche Faktoren, die den TJs in Hirnendothelzellen erst zu ihrer BHS-typischen Dichte verhalfen (s.o.). In einem *in vitro* Modell für die BHS eignete sich eine Kombination von astrozyten-konditioniertem Medium mit Agenzien wie Forskolin, die zur Erhöhung der **intrazellulären cAMP** Konzentrationen führten, zur Ausbildung besonders hoher TER-Werte und niedriger Endozytoseraten in Rinderhirnendothelzellen (RHEZ) (Rubin *et al.* 1991).

Die **Alkalische Phosphatase**, ein hirnendothelspezifisches Enzym, ließ sich sowohl durch Astrozyten in Kokultur als auch durch Aktivierung des **cAMP**-Signalwegs induzieren (Beuckmann *et al.* 1995).

Auf Rinderhirnendothelzellen (RHEZ) konnten β_1 - und β_2 -**Rezeptoren** nachgewiesen werden, die funktionell an die **Adenylatzyklase** gekoppelt waren (Durieu-Trautmann *et al.* 1991), was einen möglichen Mechanismus der Vermittlung der noradrenergen Innervation der Hirnkapillaren darstellt.

Wolburg *et al.* (1994) beschrieben, daß die TJ-Komplexität (TJ-Fibrillenverzweigungen) in RHE-Monokulturen innerhalb von 5 h nach Einsaat stark abnahm und danach relativ konstant blieb, während die Assoziation von TJ-Partikeln an der zytoplasmatischen Membran (*P-face*) weiterhin kontinuierlich abnahm. Die *P-face*-Assoziation war sowohl durch Erhöhung des intrazellulären **cAMP** und durch **Astrozyten**(-medium) zu steigern, was mit einer erhöhten TJ-Dichte einherging. Die TJ-Komplexität war ebenfalls durch cAMP-Erhöhungen zu steigern, während sie durch Phorbolster (PKC-Agonist) abnahm, ohne daß dadurch die Permeabilität beeinträchtigt wurde. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß strukturelle Veränderungen der TJ durch Astrozyten und / oder cAMP hervorgerufen werden und von Bedeutung für spezielle BHS-Eigenschaften sind.

In einer Studie mit RHEZ konnte die kontaktfreie Kokultur mit C6-Gliomzellen (Ratte) hohe TER-Werte reproduzieren. Eine forskolininduzierte intrazelluläre **cAMP**-Erhöhung korrelierte mit erhöhten TER-Werten. Allerdings war die C6-induzierte vielfache Steigerung der TER-Werte cAMP-unabhängig, ließ sich aber durch Aktivierung der **PKC** (mit DiC8 oder Phorbolster) noch steigern. Eine Hemmung der PKC blockierte dagegen den C6-Effekt auf die RHEZ. Dies spricht für eine Beteiligung der PKC bei der Vermittlung des C6-Effekts, unabhängig vom cAMP-Signalweg. Ein irreversibler TER-Verlust durch **Pertussistoxin** machte die Beteiligung eines **G-Proteins** wahrscheinlich. Es kam dabei nicht zur Beeinträchtigung der Zellvitalität. Ein ähnlicher Effekt wurde mit **TGF- β** erzielt. Beide Substanzen wirkten besonders stark bei basolateraler Applikation, was der anatomischen Nähe der Astrozytenfortsätze *in vivo* entspricht (Raub 1996).

Die Aktivierung der PKC, die demnach bei der Vermittlung der Astrozytenwirkung auf die TJ-Integrität eine Rolle spielt und die cAMP-Erhöhung scheinen Bestandteil unterschiedlicher Signaltransduktionskaskaden zu sein.

Ein wichtiges Modell für die Wirkung von cAMP auf die Verminderung der parazellulären Permeabilität ist die Beteiligung der **Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK)** an kontraktile Vorgängen in der Endothelzelle. Folgender Mechanismus wird dabei diskutiert: Man nimmt an, daß cAMP-abhängige Proteinkinasen die MLCK phosphorylieren und so inaktivieren (z.B. induziert durch Forskolin). Durch diese cAMP-bedingte Inaktivierung der MLCK wird nun eine Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten des Zytoskeletts verhindert und damit auch die ATP- und Ca^{2+} -gesteuerte Kontraktion der Mikrofilamente mit konsekutiver TJ-Öffnung unterbunden, was zu einer relativen TJ-Schließung führt (Sheldon *et al.* 1993). Bei einer Aktivierung der MLCK mit konsekutiver Phosphorylierung der Myosinleichtketten führte dagegen in peripheren Endothelzellen zur Zellkontraktion mit erhöhter TJ-Permeabilität (Garcia *et al.* 1995).

3.3.3 Endothelzellen, Zytokine und Lipopolysaccharid

Die Stimulation von Epithel- oder Endothelzellen mit **Zytokinen** geht häufig mit Veränderungen des Zytoskeletts einher. Die Stimulation von intestinalen Epithelzellen (T84) mit **IFN- γ** bewirkte einen langsamen (innerhalb von Stunden bis Tagen), dosisabhängigen TER-Verlust, der mit reduzierten ZO-1-Mengen und Störungen des apikalen Aktinrings einherging (Youakim und Ahdieh 1999).

Ähnliche Wirkungen ließen sich auch in humanen Kapillarendothelien (Praeputium) beobachten. Dort führten sowohl **IFN- γ** als auch **TNF- α** zu TER-Verlusten, ZO-1-Verteilungsstörungen und zur Umstrukturierung des filamentösen Aktins (F-Aktin) zu *stress fiber*-Formationen. Da F-Aktin mit ZO-1 kolokalisiert war und die zytokininduzierten Umverteilungsvorgänge und *stress fiber*-Bildung durch Cytochalasin D gehemmt wurden, nahm man an, daß Umstrukturierungen des F-Aktin-Zytoskeletts bei der endothelialen TJ-Regulation eine Rolle spielen und auch zu ZO-1-Umverteilungsvorgängen führen (Blum *et al.* 1997).

In zerebralen Endothelzellen hatten die Zytokine **TNF- α** und **IL-6** neben einer Wirkung auf die TJ auch noch eine spezifische Hemmwirkung auf die Endozytose der Zellen (Duchini *et al.* 1996).

Schließlich werden noch einige Aspekte zum Thema **Lipopolysaccharid (LPS)** besprochen, um das Verständnis der direkten Wirkung gramnegativer Bakterien auf Endothelzellen zu verbessern.

Untersuchungen mit *H.influenzae* (und auch mit *E.coli*) konnten nachweisen, daß zytotoxische Effekte auf Rinderhirnendothelzellkulturen (RHEZ), die mit einer Zerstörung der Konfluenz der Zellkultur einhergingen, in konzentrationsabhängiger Weise auf LPS (genauer auf dessen Komponente Lipid A) zurückzuführen waren. Die zytotoxischen Effekte ließen sich mit Polymyxin B, einem Antibiotikum, was an Lipid A bindet und LPS so inaktiviert, hemmen (Patrick *et al.* 1992).

An mononukleären Zellen wird die Wirkung von LPS über mCD14-Rezeptoren vermittelt. Endothelzellen besitzen diese Rezeptoren nicht. Neben zytotoxischen Effekten induziert LPS eine IL-6-Freisetzung in Endothelzellen. Damit LPS diese Effekte in Endothelzellen auslösen kann, ist die Gegenwart von löslichem CD14 (**sCD14**) notwendig (Arditi *et al.* 1993). Die Aktivierung eines LPS induzierten Signaltransduktionswegs, bei dem es zur Tyrosinphosphorylierung von drei unterschiedlichen MAP-Kinase-Isoformen (ERK1, -2 und p38) kommt, ist sCD14-abhängig (Arditi *et al.* 1995).

4 Das ZO-1 Protein

4.1 Allgemeine Erkenntnisse über ZO-1

4.1.1 Vorkommen und zelluläre Lokalisation von ZO-1

Das ZO-1 Protein ist zwar ein obligatorischer Bestandteil der TJ in Epithel- und Endothelzellen und wurde dort auch als erstes beschrieben (Stevenson *et al.* 1986), dennoch kommt es auch in Geweben vor, die frei von TJs sind. Das ZO-1 Protein ist daher *kein* spezifischer TJ-Marker.

Im Folgenden wird der Erkenntnisgewinn über das Vorkommen von ZO-1 und dessen zelluläre Lokalisation chronologisch dargestellt.

Der Nachweis von ZO-1 gelang Stevenson *et al.* (1986) zunächst im Bereich der TJ von Mäusehepatozyten, sowie in anderen epithelialen Zellen des Kolons, der Nieren und der Hoden und außerdem in arteriellen Endothelien. In MDCK-Zellen konnte ZO-1 ebenfalls im Bereich des *junctional complex* nachgewiesen werden.

Zellkontakt war die Voraussetzung dafür, daß die ZO-1 Lokalisation an der Plasmamembran im Bereich von Zellkontaktstellen in humanen Darmepithelzellen (Caco-2) stattfinden konnte. In kontaktfreien Zellpopulationen unter Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freien Bedingungen nach Trypsinisierung zeigte die Immunfluoreszenz eine diffuse ZO-1 Verteilung im Zytoplasma. Diese Vorgänge waren reversibel (Siliciano und Goodenough 1988; Anderson *et al.* 1989).

Ein Bericht von Li und Poznansky (1990) lenkte das Interesse verstärkt auf ZO-1 in Endothelzellen. Im Immunoblot konnte auch hier der ZO-1-Gehalt boviner aortaler Endothelzellen positiv mit der Ausprägung der Konfluenz von *monolayers* korreliert werden. Die Immunfluoreszenz war für ZO-1 in der Zellperipherie nur dort positiv, wo Kontakt zwischen Nachbarzellen bestand.

Der Nachweis von ZO-1 in Gefäßen des zerebralen Kortex (Mensch, Ratte) im Bereich der Zellgrenzen der Endothelzellen implizierte, daß **ZO-1 ein Bestandteil der BHS** ist (Watson *et al.* 1991).

Die Vorstellung, daß ZO-1 ein spezifisches TJ assoziiertes Protein sei, mußte mit der Entdeckung des Proteins in Astrozyten und anderen nichtepithelialen Zellen aufgegeben werden. Zu diesen anderen Zellen, von denen man annimmt, daß sie keine TJ besäßen, gehören Schwannzellen, dermale Fibroblasten, Gliom(C6)-, Sarkom(S-180)- und Myelom(P3)-zellen. Das ZO-1 Verteilungsmuster in der Immunfluoreszenz war in den verschiedenen Zellreihen recht unterschiedlich: So war ZO-1 in Astrozyten diskret an Zellkontaktstellen und im Zytoplasma verteilt sichtbar. ZO-1 ließ sich in S-180 Sarkomzellen diffus im Zytoplasma und in der Zellperipherie anfärben. Die ZO-1 Anfärbbarkeit in dermalen Fibroblasten war nicht stärker als die Hintergrundaktivität. Dennoch war ZO-1 im Immunoblot auch in diesen Zellen deutlich nachweisbar (Howarth *et al.* 1992).

Eine weitergehende Untersuchung zum Vergleich der ZO-1-Lokalisation in epithelialen und nichtepithelialen Zellen gab Anlaß, die bisher angenommene Funktion von ZO-1 als TJ-Protein zu überdenken. Durch ultradünne Gefrierschnitt-Immuno-Elektronenmikroskopie gelang es die Lokalisation von ZO-1 und Cadherin in Darmepithelzellen und Hepatozyten (mit TJ), bzw. in kardialen Myozyten und Fibroblasten (ohne TJ) zu präzisieren. Man entdeckte, daß in den intestinalen Epithelien, die stark ausgeprägte TJ besitzen, ZO-1 und Cadherin deutlich von einander getrennt in *tight* bzw. *adherens junctions* lokalisiert waren. Interessanterweise war ZO-1 in Hepatozyten, deren TJ schwächer ausgeprägt sind, nicht nur in der TJ, sondern auch in der AJ Gegend zu finden. In den nichtepithelialen Zellen (ohne TJ) war ZO-1 mit Cadherinen der AJ vergesellschaftet (Itoh *et al.* 1993).

ZO-1 wurde in den zirkumventrikulären Organen des ZNS im Bereich von Kapillarendothelien und Ependymzellen mit unterschiedlichen Verteilungsschwerpunkten nachgewiesen. Im Vergleich mit dem Hirnparenchym mit bekannter ausgeprägter BHS ergab sich folgender Befund: Die ZO-1 Färbung des Hirnparenchyms mit BHS Eigenschaften zeigte ein kontinuierliches ZO-1 Muster entlang der Hirnkapillaren in den Endothelzellen, während die Epen-

dymzellen hier schwächer markiert waren. Innerhalb der einzelnen zirkumventrikulären Organe kam es zwar zu unterschiedlichen ZO-1 Verteilungsmustern, aber insgesamt waren die Kapillaren hier nur diskontinuierlich positiv für ZO-1, während die Ependymzellen tendenziell eine deutlich stärkere ZO-1-Färbung zeigten (Petrov *et al.* 1994). Dieses Ergebnis steht gut im Einklang mit den gängigen Vorstellungen zur BHS und zur Blut-Liquorschranke (s. Kapitel 2.1.1), wenn man postuliert, daß die ZO-1 Färbeintensität mit der TJ Dichte korreliert.

Eine weitere Untersuchung zeigte, daß ZO-1 vor und während der Ausbildung von Zellkontakten in verschiedenen Epithelien im Zellkern lokalisiert ist (Gottardi *et al.* 1996; detaillierte Erläuterungen hierzu in Kapitel 4.2.2).

In den Versuchen einer anderen Arbeitsgruppe kam es während früherer Stadien des TJ-Aufbaus in MDCK-Zellen zu einer ZO-1-Catenin-Komplexbildung (Rajasekaran *et al.* 1996).

Die Tatsache, daß sowohl die ZO-1-Cadherin-Interaktion, als auch die ZO-1-Lokalisation innerhalb einer Zellreihe, je nach funktionellem Zustand der TJ-Öffnung variiert, zeigt deutlich, daß hier ein dynamisch reguliertes System besteht, in dem unter anderem Umverteilungsprozesse stattfinden. Die Lokalisation von ZO-1 innerhalb einer einzelnen Zelle scheint von unterschiedlichen Faktoren abhängig zu sein. Diese Phänomene werden in den Kapiteln 3.1 und 4.2 ausführlich besprochen. Das Vorkommen von ZO-1 im Bereich der AJ in Zellen, in denen es keine TJ gibt, zeigt deutlich, daß ZO-1 kein TJ spezifisches Protein ist.

4.1.2 Biochemische und physikalische Eigenschaften von ZO-1

Das ZO-1 Protein ist ein 220 kDa schweres Phosphoprotein (Stevenson *et al.* 1986). Es handelt sich um ein Mitglied der MAGUK Proteinfamilie (Woods und Bryant 1993), deren charakteristische homologe Domänen in Kapitel 2.2 ausführlich beschrieben wurden. Die komplette cDNA der humanen ZO-1 Variante wurde 1993 sequenziert und sagte ein Protein mit 1736 AS voraus. Eine Besonderheit der Primärstruktur ist eine 943 AS lange prolinreiche C-terminale Sequenz (mit 14,1% Prolin-Anteil) (Willott *et al.* 1993). Innerhalb dieser Region gibt es eine 80 AS Domäne, die „ α “ genannt wurde. Diese Sequenz kommt allerdings nicht in

allen ZO-1 Molekülen vor, was bedeutet, daß es zwei Isoformen von ZO-1 gibt (Willott *et al.* 1992). Es stellte sich heraus, daß die Isoformen spezifisch für bestimmte Zellreihen sind: Die kürzere, α -deletäre Form von ZO-1 ($ZO-1\alpha^-$) findet sich in den TJ von Endothelzellen, außerdem in hochspezialisierten Zellen wie Sertoli-Zellen (mit TJ) und in Podozyten des Nierenglomerulums (zwischen den Podozyten bestehen allerdings *keine* TJ). Das längere $ZO-1\alpha^+$ dagegen fand sich in Epithelzellen, unabhängig davon, wie stark deren transepitheliale elektrische Widerstände ausgeprägt waren (Balda und Anderson 1993). Die Arbeitsgruppe postulierte, die $ZO-1\alpha^-$ Isoform würde in TJ mit hoher Plastizität exprimiert, während die $ZO-1\alpha^+$ Isoform eher typisch für weniger plastische TJ sei.

Physikalische und biochemische Eigenschaften des ZO-1 Proteins in MDCK-Zellen und Mäusehepatozyten wurden von Anderson *et al.* (1988) untersucht: Das Molekulargewicht von ZO-1 betrug 210 kDa in MDCK-Zellen und 225 kDa in Mäusehepatozyten. Die Größe des Proteins wurde mit $s_{20,w}=5,3$ (MDCK) und $s_{20,w}=6$ (Mäusehepatozyten), bzw. Stokes Radien von $R_a=8,6$ nm (MDCK) und $R_a=9$ nm (Mäusehepatozyten) angegeben. Aus diesen Werten schloß man, daß es sich in der aufgereinigten Form von ZO-1 um ein asymmetrisches Molekül handle. In MDCK-Zellen ermittelte man eine ZO-1 Menge von etwa 30.000 Molekülen pro Zelle, was etwa 700 Molekülen auf 1 μ m TJ-Fibrillenlänge entspricht. Was die Löslichkeit von ZO-1 in Detergenzien betrifft, ergaben sich für MDCK-Zellen und Mäusehepatozyten ähnliche Ergebnisse: unter denaturierenden Bedingungen, wie hohen pH-Werten (pH11) und in 6molarem Harnstoff war ZO-1 optimal aus Membranfraktionen zu lösen. In 0,3 molarer KCl-Lösung war maximal 30% des ZO-1 löslich. Triton X-100 oder Octyl- β -D-Glucopyranosid (jeweils als 2%ige Lösung) vermochten das Protein überhaupt nicht zu lösen.

4.1.3 Assoziation von ZO-1 zu anderen Tight-junction-Strukturen

siehe Kapitel 2.2

4.2 Aspekte zur Rolle von ZO-1 bei der Tight-junction-Regulation⁶

Nach der Darstellung der TJ-Regulation und möglicher Signaltransduktionsvorgänge in Kapitel 3 liegt der Schwerpunkt hier auf der isolierten Betrachtung von ZO-1 und dessen möglicher Beteiligung an der TJ-Regulation. Was passiert mit ZO-1 während Veränderungen an der TJ auftreten? Denkbare Veränderungen des ZO-1 Proteins könnten quantitativer Natur sein (Modulation der Proteinbiosynthese), die Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle betreffen (Umverteilungsvorgänge), oder das Molekül könnte sterisch verändert werden (Konformationsänderungen z.B. durch Phosphorylierung).

4.2.1 Synthese / Abbau

Folgende Untersuchungen überprüften quantitative Veränderungen des ZO-1-Gehalts in verschiedenen Zelltypen unter verschiedenen Bedingungen.

Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem absoluten oder relativen ZO-1-Gehalt einer Zelle und der Dichte der TJ?

Eine vergleichende Studie an zwei verschiedenen **MDCK-Zelllinien (I und II)** sprach dagegen: Die beiden Zelltypen unterschieden sich in Kultur zwar durch sehr unterschiedliche TER-Werte (30-fach), während die Zellmorphologie, die TJ-Struktur und der der ZO-1-Gehalt in beiden Zelltypen identisch war (Stevenson *et al.* 1988). Obwohl in dieser statischen Vergleichsmessung der absolute ZO-1 Gehalt trotz unterschiedlicher TER-Werte identisch war, gibt es Hinweise dafür, daß bei der dynamischen Regulation der TJ Veränderungen der TER-Werte mit ZO-1 Gehaltänderungen in der Zelle einhergehen. So stieg beispielsweise der ZO-1-Gehalt in murinen Mammaepithelzellen (31EG4) nach **Dexamethasonstimulation** (synthetisches Glukokortikoid) um das 2,3fache an während der TER 65fach gesteigert wurde, ohne daß Phosphorylierungsveränderungen an ZO-1 auftraten. Der Serin/Threonin-Phosphataseinhibitor **Ocadainsäure (OA)** bewirkte in dexamethasonvorbehandelten Zellen

⁶ zusammenfassende Darstellung der Veränderungen von ZO-1 während der TJ-Regulation in Kapitel 8 in Tabellenform

ein Absinken des TER innerhalb von 24h auf basale Werte, eine partielle Umverteilung von ZO-1 und einen Verlust der ZO-1-Menge auf 73% der basalen Menge. Die Unterbrechung von Phosphorylierungs/Dephosphorylierungsmechanismen durch OA scheint die Glukokortikoidwirkung auf dem Weg der Signaltransduktion auszuschalten (und nicht auf Glukokortikoidrezeptorebene), wobei die ZO-1-Menge und die ZO-1-Lokalisation verändert wurde, ohne daß der Phosphorylierungszustand von ZO-1 selbst bei diesen Vorgängen beteiligt war (Singer *et al.* 1994).

Li und Poznansky beschrieben bereits 1990 eine Korrelation zwischen dem ZO-1-Gehalt und der Ausprägung der Monolayerkonfluenz boviner aortaler Endothelzellen.

Oben wurde beschrieben, daß Zellkontakte und normale extrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel während der TJ-Entstehung notwendig sind, um ZO-1 aus dem Zytoplasma zu Zellkontaktstellen umzuverteilen (Siliciano und Goodenough 1988). Diese Studie besagte zudem, daß für den Umverteilungsvorgang keine neue Proteinsynthese notwendig sei.

Die ZO-1-mRNA und ZO-1-Proteingehalte in Caco-2-Zellen zeigten in Abhängigkeit vom **Zellkontakt** jedoch große Unterschiede. Unter Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freien Bedingungen lösten sich die Zellkontakte und der ZO-1-Proteingehalt sank schnell auf ein Minimum, während die ZO-1-mRNA-Menge maximal war. Nach Wiederherstellung des Zellkontaktes durch Anhebung des **Ca^{2+} -Spiegels** kam es im Verlauf von 3 Wochen in Kultur zu einer Abnahme der ZO-1-mRNA-Konzentration auf ein zehntel, während die ZO-1-Menge auf ein 5 bis 8faches im selben Zeitraum anstieg. Ob diese Vorgänge unmittelbar auf den Zellkontakt selbst zurückzuführen sind oder auf Veränderungen des Ca^{2+} -Spiegels blieb in dieser Studie genauso offen, wie die Frage nach funktionellen Veränderungen, wie dem TER während der beschriebenen Veränderungen (Anderson *et al.* 1989).

Immunoblotuntersuchungen von Gardner (1995 und 1996) an bovinen retinalen Kapillarendothelzellen ergaben, daß die zelluläre Proteinmenge von ZO-1 durch Stimulation mit **Histamin** innerhalb von Stunden abnahm, nach etwa 24 h aber wieder auf Ausgangswerte stiegen. Diese Effekte waren konzentrationsabhängig und konnten über H_1 - und H_2 -

Rezeptorblockade teilweise antagonisiert werden. **Astrozytenkonditioniertes Medium** konnte die gesamte zelluläre ZO-1-Proteinmenge in diesen Zellen steigern.

Eine quantitative ZO-1 Minderung in ratten retinalen Pigmentepithelzellen fand nach Inkubation von Monolayerkulturen mit Serum statt. Nach 6h begann ein begrenzter TER-Verlust einzusetzen und 48h nach Inkubation war die ZO-1-Menge auf ein Drittel der Kontrollzellen gesunken. Der Effekt war konzentrationsabhängig, spezifisch für die apikale Membrandomäne (daher wohl rezeptorvermittelt) und reversibel. Eine Veränderung der Aktinorganisation fand nicht statt (Chang *et al.* 1997).

In intestinalen Epithelzellen (T84) bewirkte **Interferon- γ** (IFN- γ) einen langsamen (innerhalb von Stunden bis Tagen), dosisabhängigen TER-Verlust, der mit reduzierten ZO-1-Mengen und Störungen des apikalen Aktinrings einherging. Der zelluläre Gehalt von ZO-2 und Occludin erfuhr dagegen keine nennenswerten Änderungen. Allerdings wurde ZO-2 und Occludin ins Zytoplasma umverteilt (Youakim und Ahdieh 1999).

4.2.2 Umverteilung

Bereits in Kapitel 4.1.1 wurde deutlich, daß je nach funktionellem Zustand der TJ ZO-1 in der Zelle an unterschiedlichen Stellen lokalisiert sein kann. Hier werden die Bedingungen zusammengefaßt, die zu ZO-1-Umverteilungen während der TJ-Regulation führen.

In Kapitel 3.1.1 wurden die ZO-1-Umverteilungsvorgänge im Rahmen von Ca^{2+} -switch-Versuchen ausführlich erläutert. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß **Zellkontakte** und normale extrazelluläre **Ca^{2+} -Spiegel** während der TJ-Entstehung notwendig sind, um ZO-1 aus dem Zytoplasma zu Zellkontaktstellen umzuverteilen und daß umgekehrt der Entzug von Ca^{2+} zum Verlust von Zellkontakten und später zur Umverteilung von ZO-1 ins Zytoplasma führt, wobei die Verbindungen von ZO-1 mit dem Zytoskelett gelöst werden. Wirkungen von Proteinkinase C-Inhibitoren und Thapsigargin auf die ZO-1-Umverteilung wurden im Rahmen der Ca^{2+} -switch Versuche bereits erläutert und machten die Notwendigkeit von PKC-

Signalwirkungen beziehungsweise von intakten intrazellulären Ca^{2+} -Speichern für die Umverteilung von ZO-1 zur Zellmembran deutlich (s. Kapitel 3.1.1 und 3.2).

Bei ATP-Entzug kam es dagegen innerhalb des zeitlichen Fensters (3 h), in dem eine reversible Öffnung der TJ möglich ist, offensichtlich nicht zu ZO-1-Umverteilungen, jedoch zu verstärkten Assoziationen von ZO-1 mit Zytoskelettproteinen. (s. Kapitel 3.1.2).

Eine Studie wies in verschiedenen Epithelzellen (MDCK-, CV-1- und LLC-PK1-Zellen) unter zellkontaktfreien Bedingungen, wie sie vor der Ausbildung von *monolayers* oder während Wundheilungsprozessen bestehen, das Vorkommen von **ZO-1 im Zellkern** nach. Während der Reifung eines Monolayers, sowie während der Wundheilung nahm die nukleäre ZO-1-Lokalisation zugunsten einer Umverteilung zur Plasmamembran graduell in dem Maße ab, wie die Konfluenz des Zellrasens zunahm. Man nahm daher an, daß die nukleäre ZO-1-Lokalisation invers zum Ausmaß der Zellkontakte korreliert war. Die nukleäre ZO-1-Fraktion war komplett Triton X-100-extrahierbar. Beide bekannten ZO-1-Isoformen ($\text{ZO-1 } \alpha^+$ und α^-) ließen sich in Transfektionsversuchen im Zellkern lokalisieren (Gottardi *et al.* 1996). Ob ZO-1 aktiv als intrazellulärer Botenstoff an der Vermittlung einer Information teilnimmt, die zur Reduktion des Zellkontakts führt, oder ob ZO-1 selbst an der Regulation nukleärer Prozesse beteiligt ist, die in Verbindung mit Wachstums- oder Differenzierungsvorgängen stehen, blieb hypothetisch. In jedem Fall ist dies die einzige Studie, die die nukleäre Lokalisation erwähnt. Es ist nicht auszuschließen, daß in anderen Studien, in denen von zytoplasmatischer Lokalisation von ZO-1 gesprochen wird, ZO-1 ebenfalls im Zellkern vorkommt, dies aber aufgrund von Überlagerungseffekten unerkannt blieb.

Der Effekt der ZO-1-Umverteilung durch den Serin / Threonin-Phosphataseinhibitor **Ocaldainsäure** (OA) in dexamethasonvorbehandelten 31EG4-Zellen wurde in Kapitel 4.2.1 schon beschrieben. Da OA die TER- und TJ-aufbauende Wirkung von Glukokortikoiden antagonisierte, wurde ebenfalls die Wirkung des Serin/Threonin-Proteinkinaseinhibitors **H-7** untersucht (Singer *et al.* 1994). Durch H-7 wurde das ZO-1-Verteilungsmuster in der Zellperipherie in Abwesenheit von Dexamethason in 31EG4-Zellen zwar gestört, der TER blieb aber unbeeinflusst. In Gegenwart von Dexamethason wurde dagegen das ZO-1-Muster der Zellpe-

riphie durch H-7 nicht verändert, was für einen stabilisierenden Effekt der Glukokortikoide auf die TJ spricht.

TGF- β führte in der gleichen Zelllinie bis zu 24 h nach Dexamethasonvorbehandlung und in nicht-vorbehandelten Zellen zur ZO-1-(und auch F-Aktin-) Umverteilung ins Zytoplasma, ohne Veränderungen der ZO-1-Proteinmenge und verhinderte den glukokortikoidinduzierten TER-Aufbau. Nach längerer Dexamethasonpräinkubation (48 h) jedoch, wo der TER bereits induziert war, hatte TGF- β keinen Effekt mehr auf die ZO-1-Lokalisation und den TER (Woo *et al.* 1996).

FCCP, ein Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung, induzierte in MDCK-*monolayers* einen abrupten TER-Verlust (innerhalb von 20 sec), der mit einer ZO-1-Umverteilung von der Plasmamembran weg und einem pH-Abfall einherging. Die ATP-Niveaus blieben während dessen unverändert. 2 h nach Entfernung von FCCP kehrten sich die beschriebenen Vorgänge wieder um (Li und Poznansky 1990).

Hepatozyten Wachstumsfaktor (**HGF**), ein parakrines Zytokin, führte in MDCK-*monolayers* zu ZO-1-Umverteilungen ins Zytoplasma und verhinderte während der Ca^{2+} -getriggerten TJ-Entstehung die Umverteilung zur Zellmembran. In der Gegenwart von HGF während des Ca^{2+} -switches kam es zur gesteigerten Tyrosinphosphorylierung von β -Catenin. Wenn nun während des Ca^{2+} -switches der **Tyrosinphosphatasehemmstoff Vanadat** inkubiert wurde, so verhinderte dies auch die ZO-1-Umverteilung zur Plasmamembran (Grisendi *et al.* 1998).

Die Umverteilung von ZO-1, E-Cadherin und F-Aktin als Ereignis bei TJ-Öffnung durch **Tyrosinphosphorylierungsmechanismen** (Collarez-Buzato 1998) wird in Kapitel 4.2.3 besprochen.

4.2.3 Sterische Konformationsänderungen

Bei den beschriebenen sterischen Konformationsänderungen handelt es sich um Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsereignisse, die im Zusammenhang mit TJ-Regulation stehen.

ZO-1 wurde zunächst als Phosphoprotein mit Phosphorylierungen an Serinresiduen beschrieben (Anderson *et al.* 1988). DNA-Analysen von ZO-1 ließen 177 Serinresiduen erkennen (Itoh *et al.* 1993), von denen 33 zu einer komplementären Sequenz von Kaseinkinase II (Pinna 1990) und 34 zu einer komplementären Sequenz der Proteinkinase C (PKC) (Kishimoto *et al.* 1985) passen.

Nachdem in zwei MDCK-Zelllinien (MDCK-I und -II) mit stark unterschiedlichen TER-Werten keine Unterschiede in Bezug auf ZO-1-Menge und TJ-Struktur festzustellen war (Stevenson *et al.* 1988, B130), ist es interessant zu wissen, daß der ZO-1-Phosphatgehalt in der Zelllinie mit dem niedrigeren TER (MDCK-II) etwa doppelt so hoch war, wie der ZO-1-Phosphatgehalt in MDCK-I-Zellen mit dem höheren TER (Stevenson *et al.* 1989).

Im Folgenden werden Mechanismen der TJ-Öffnung dargestellt, die zeigen, daß eine Änderung des TER nicht notwendigerweise mit Änderungen des Phosphatgehalts von ZO-1 korreliert.

Bei der Steigerung der TJ-Dichte durch **Glukokortikoide** war in 31EG4-Zellen der ZO-1-Phosphorylierungsstatus ebenso unverändert, wie durch Einwirkung von Ocadainsäure (Serin / Threoninphosphatasehemmer). Wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, antagonisiert Ocadainsäure die Glukokortikoidwirkung auf die TJ durch Eingriff in Phosphorylierungsgeschehen, ohne daß sich der ZO-1-Phosphatgehalt dabei änderte (Singer *et al.* 1994).

In **Ca²⁺-switch** Experimenten gab es bisher unterschiedliche Befunde über die Phosphorylierung von ZO-1 (vgl. Kapitel 3.1.1 und 3.2).

Bei Inkubation von MDCK-II-Zellen mit niedrigen Ca²⁺-Konzentrationen (Ca²⁺-Chelatierung mit BAPTA) kam es sogar bei beginnender Lösung der Zellkontakte und starkem TER-Verlust solange nicht zu Veränderung des ZO-1-Phosphatgehalts, wie ZO-1 noch an der Zellmembran lokalisiert war. Erst nach dreitägiger Inkubation bei niedrigen Ca²⁺-Konzentrationen, wo ZO-1 komplett ins Zellinnere umverteilt war, kam es zu geringfügiger Abnahme des totalen ZO-1-Phosphatgehalts (Howarth *et al.* 1994). Demzufolge korreliert der Phosphatgehalt von ZO-1 positiv mit dessen Lokalisation an Zellkontaktstellen.

Bei Ca^{2+} -switch oder der Stimulation der PKC mit DiC8 kam es kurzfristig nicht zur Änderung des ZO-1-Phosphorylierungsstatus in MDCK-II-Zellen (Balda *et al.* 1993).

Dennoch stieg in einer anderen Studie im Ca^{2+} -switch 2 h nach Zellkontakt der ZO-1-Phosphatgehalt deutlich an. Calphostin C (spezifischer Proteinkinase C-Inhibitor) hemmte den ZO-1-Phosphatgehaltanstieg um 85% und H-7 um 69,8%. Die verminderte Phosphatgehaltzunahme durch die Proteinkinaseinhibitoren war parallel zu den verminderten TER-Werten. In Versuchen mit aufgereinigten TJ-Proteinen und aufgereinigter PKC konnte ZO-1 (wahrscheinlich auch ZO-2 und ZO-3) als direktes Zielprotein für Phosphorylierungen der PKC identifiziert werden (Stuart *et al.* 1995).

Aus dem **ATP-Entzug-Modell** gibt es Hinweise, daß es während des ATP-Entzugs zu einem schnellen reversiblen Phosphatgehaltverlust in ZO-1 und Occludin kommt (Gopalakrishnan *et al.* 1998).

Bei Anstieg der ATP-Konzentrationen in diesem Modell kam es auch zu einem Anstieg der Tyrosinphosphorylierung der Proteine ZO-2, ZO-3 und Occludin (aber *nicht* von ZO-1!), die unter der Gegenwart des Tyrosinkinasehemmstoffs Genistein vollständig unterblieb (Tsukamoto und Nigam 1999). Dieses Ergebnis spricht für eine Beteiligung von Tyrosinphosphorylierungsmechanismen bei der Regeneration der Zellen nach ATP-Entzug, bei denen ZO-1 offenbar keine Rolle spielt.

Da die Permeabilitätseigenschaften der TJ auch von der Intaktheit der **adherens junction** abhängt, wird auch ein Blick auf mögliche TJ-Regulationsvorgänge durch Phosphorylierungen von AJ-Strukturen geworfen. Die enge funktionelle Verknüpfung von AJ und TJ wird bereits dadurch deutlich, daß die E-Cadherin-vermittelte Ca^{2+} -abhängige Zell-Zell-Adhäsion, eine Voraussetzung der TJ-Bildung ist (Gumbiner *et al.* 1988), sowie daß die ZO-1-Umverteilung zur TJ-Region im Ca^{2+} -switch cadherinabhängig und β -Catenin vermittelt zu sein scheint (Rajasekaran *et al.* 1996).

Obwohl in früheren Studien **Tyrosinphosphorylierungen** von AJ-Strukturen nachgewiesen wurden und bestimmte Tyrosinkinasen (src-Familie) in der AJ-Gegend lokalisiert sind (Tsukita *et al.* 1991), haben erst die Untersuchung von Staddon *et al.* (1995a) gezeigt, daß erhöhte Tyrosinphosphorylierung die TJ-Permeabilität in MDCK-Zellen und in Rinderhirnendothelzellen steigert. Durch TER-Messungen wurde die TJ-Permeabilität

zellen steigert. Durch TER-Messungen wurde die TJ-Permeabilität überprüft, während Tyrosinphosphorylierungen durch spezifische Hemmung der Tyrosinphosphatase mit Phenylarsinoxid (PAO) ausgelöst wurden. PAO führte in beiden Zelltypen zu einem TER-Verlust. In MDCK-Zellen wurde dann gezeigt, daß es bedingt durch PAO-Tyrosinphosphatasehemmung zu erhöhtem **Tyrosinphosphatgehalt von ZO-1** und β -Catenin (aber nicht α -Catenin) kam.

Auch andere Studien berichteten von ZO-1-Tyrosinphosphorylierungen: z.B. bedingt durch Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) in A431-Zellen (Van Itallie *et al.* 1995), was zusätzlich noch zu ZO-1-Umverteilungen und Veränderungen der Aktinorganisation führte.

In MDCK-Zellen führten induzierte Tyrosinkinaseaktivitäten zu Umverteilungen von ZO-1, E-Cadherin und F-Aktin und zu TER-Verlusten (Collareze-Buzato 1998).

In v-src-transfizierten MDCK-Zellen kam es zur Tyrosinphosphorylierung von ZO-1 und β -Catenin, sowie von Ezrin/Radixin/Moesin (ERM), was mit einer Schwächung der Zelladhäsion einherging, die aber nicht auf die Tyrosinphosphorylierung von β -Catenin zurückzuführen war (Takeda *et al.* 1995). Das bedeutet, daß der Phosphorylierung von β -Catenin wohl keine Schlüsselrolle bei der TJ-Regulation zukommt.

Das src-Tyrosinkinasesubstrat p120, konnte in Epithel- und Hirnendothelzellen mit dem Cadherin-Catenin-Komplex koimmunopräzipitiert werden und war im AJ-Bereich zu lokalisieren (Staddon *et al.* 1995b).

Diese Befunde zeigen, daß Tyrosinphosphorylierungen sowohl im TJ- als auch im AJ-Bereich regulatorisch auf die TJ wirken können. Eine Beteiligung von ZO-1 an diesen Vorgängen ist zwar offenkundig, dennoch ist es bisher nicht bewiesen, ob die Tyrosinphosphorylierung von ZO-1 tatsächlich regulierend auf die TJ-Permeabilität wirkt, oder ob sie eine Nebenerscheinung von Phosphorylierungen anderer Strukturen bei Regulation der TJ oder AJ ist.

5 Experimente

In den vorangehenden Kapiteln wurden die Mechanismen der TJ-Regulation durch eine eingehende Literaturrecherche ausführlich erläutert, wobei dem ZO-1-Protein besondere Aufmerksamkeit gewidmet wurde. Die TJ-Öffnung von Hirndothelzellen ist ein entscheidender Vorgang bei der Pathophysiologie von entzündlichen Prozessen wie bakteriellen Meningitiden und führt zu einer Störung der Blut-Hirn-Schranken-Funktion. Im experimentellen Teil dieser Arbeit wurde das ZO-1-Protein in einem Rinderhirndothelzellmodell unter verschiedenen Bedingungen der Zellkultur untersucht. Die Rinderhirndothelzellen wurden in diesem Modell für eine Primärkultur präpariert.

5.1 Material und Methoden

5.1.1 Präparation boviner Hirndothelzellen für eine Primärkultur (modifizierte Methode nach Bowman *et al.* 1983)

Schlachthof

Transport der Rinderhirne vom Schlachthof zum Labor: Das Hirn wurde inklusive Kleinhirn und Hirnstamm samt *Pia mater* etwa 5 bis 10 min nach Tötung eines weiblichen Tieres vom Schlachter aus der Kalotte entfernt und in einem sterilen Behälter in 2 Liter 0,9% NaCl mit 25.000 IE Heparin / l und 1% Penicillin / Streptomycin, gekühlt, ins Labor transportiert.

Präparationsschritte

Alle folgenden Arbeitsschritte wurden steril durchgeführt.

Zunächst wurde die *Leptomeninges* durch stumpfe Präparation mit dem Finger und Pinzette entfernt. Das Hirn wurde bis zur Zerkleinerung unter dem Abzug in gekühltem PBS (PBS-Puffer pH7,3 Serag Wiessner, Nr 740530) mit 1% Penicillin/Streptomycin (s.Tabelle) aufbe-

wahrt. Daraufhin wurde die *Substantia grisea* stumpf mit dem Skalpell abgetragen und anschließend zerkleinert. Die zerkleinerte graue Substanz wurde in einen Erlenmeyerkolben mit Rührfisch und der ersten Enzymlösung (DispaseII) überführt:

DispaseII-Lösung:

Dispase II (Neutralprotease)	0,6 g	Aus Bacillus polymyxa Boehringer-Mannheim, Nr 165859
Penicillin / Streptomycin	1%	10.000 IU / ml Gibco BRL Life Technologies, Nr 15140-114
Fungizone	1%	Amphotericin B, 250 UG / ml Gibco BRL Life Technologies, Nr 15290-026
M199		M199W / 25MM Hepes Gibco BRL Life Technologies, 20011-029
ad 50 ml M199		

Diese Suspension aus DispaseII-Lösung und der zerkleinerten grauen Substanz (Gesamtvolumen ca. 160 ml) wurde für zwei Stunden bei 37 °C unter stetigem Rühren inkubiert, danach gesiebt und auf etwa sechs bis sieben 50 ml-Falcons verteilt, die jeweils schon 30 ml einer 15%igen Dextranlösung enthielten.

15%ige Dextranlösung:

Dextran Stammlösung (30%)	30%ige Lösung in <i>Aqua bidest.</i>	Dextran (MG=60.000) ICN Biomedicals, Nr 101513
Dextran (27%)	9 Teile Dextran (30%) + 1 Teil M199 (10fach konz.)	
Dextran (15%)	55,5% Dextran (27%) + 44,5% M199	

Nach Schütteln der Falcons wurden diese für 20 min bei 4 °C und 3000g zentrifugiert, der Überstand danach abgesaugt und das Pellet in 50 ml einer frisch hergestellten C/D-Lösung aufgenommen. Diese Suspension wurde 12 Stunden lang bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert.

C / D-Lösung:

Collagenase / Dispase	0,04 g / 50 ml	Aus <i>V.alginolyticus</i> / <i>B.polymyxa</i> , Boehringer-Mannheim, Nr 1097113
Penicillin / Streptomycin	1%	
Fungizone	1%	
<i>ad</i> 50 ml M199		

Nach der Inkubation wurde die Suspension 10 min bei 37 °C und 190 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml M199 aufgenommen und diese Suspension in 2 ml Portionen auf 5 vorbereitete Percoll-Röhrchen vorsichtig überschichtet.

Percoll-Röhrchen:

Stock-Percoll	1 Teil M199 (10fach konz.) + 9 Teile Percoll + Hepes 15 mM	Percoll, Pharmacia-Biotech AB, Nr 17 0891-01; Hepes 1,5 M, Serva, Nr 25245
Percoll 45%	55% M199 + 45% Stock-Percoll	
Percoll 45% in 8 ml Portionen in spezielle Röhrchen geben (<i>cave</i> : Röhrchen inklusive der Zentrifugeneinsätze sorgfältig austarieren!) und bei 37.500 g, 4 °C, 40 min zentrifugieren		

Die beschichteten Percollröhrchen wurden bei 800 g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren waren 3 korpuskuläre Banden innerhalb des rötlichen Percolls zu erkennen. Die mittlere Bande (Endothelzellen) wurde jeweils mit einer Pipette aufgenommen und in einem Falcon gesammelt, der auf 50 ml mit M199 aufgefüllt und daraufhin 10 min bei 190 g zentrifugiert wurde. Das Pellet entsprach den Endothelzellen und wurde mit einer Proteinase aus dem Endothelzellverband gelöst: Dazu wurde das Pellet bei 37 °C in ca. 5 ml Trypsin (Trypsin-EDTA-Lösung, einfach, in PBS; Trypsin 0,05%, EDTA 0,02%, Boehringer Mannheim, Nr 210242) aufgenommen und währenddessen ständig mit einer Pipette durchmischt. Dieser Vorgang wurde solange durchgeführt, bis während der simultanen mikroskopischen Beurteilung die Zellen in kleinen Haufen oder auch vereinzelt zu erkennen waren. Die Trypsinaktivität wurde durch Zugabe serumhaltigen Mediums gestoppt: Die Suspension wurde mit M199 20% NCS (37 °C, s. Tabelle) auf 50 ml aufgefüllt und anschließend 10 min lang bei 190 g

zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml vorgewärmtes M199 20% NCS aufgenommen und bis zur Weiterverarbeitung bei 37 °C aufbewahrt.

M199 20%NCS:

NCS	20%	Neonatales Kälberserum PAA Laboratories, Nr B15-001
Penicillin / Streptomycin	1%	
L-Glutamin 200MM	0,1% (200 µM)	Gibco BRL Life Technologies, Nr 25030-024
<i>ad</i> M199		

Die Zahl der gewonnenen Zellen ermittelte man mit einer Neubauerkammer: Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:9 mit Methylenblau verdünnt und gemischt. Die Neubauerzählkammer wurde mit dieser Suspension gefüllt und es wurden 4 mal 16 Gruppenquadrate ausgezählt. Die Summe der ausgezählten Quadrate dividiert durch 4 ergab die Gesamtzahl der Zellen in der Suspension (10 ml) in Millionen.

Zelleinsaat in ELISA-Platten

Vor der Zellaussaat wurden die 96-well-ELISA-Platten (*Nunclon Microwell 96F*, Nunc InterMed, Nr 1-67008) folgendermaßen vorbereitet: Die Vertiefungen mit flachem Boden wurden mit 2 mg-%iger Fibronectinlösung für 45 min vorbeschichtet (50 µl / well). Kurz vor Zugabe der Endothelzellsuspension wurde die Fibronectinlösung vorsichtig, ohne Berühren des Bodens abgesaugt. Die Zellsuspension sollte so verdünnt werden, daß pro well eine Menge von 50.000 Zellen in 200 µl Medium (M 199 20% NCS) enthalten ist. Das entspricht etwa $2,5 \cdot 10^5$ Zellen / ml Medium. Die Zellsuspension wird mit einer Eppendorf-Multipipette in die Vertiefungen gegeben (200 µl / well). Die ELISA-Platten sollten bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5% gelagert werden. Der Mediumwechsel fand nach optischer Beurteilung alle 1 bis 2 Tage statt.

5.1.2 ZO-1-Nachweis

5.1.2.1 ZO-1-ELISA mit bovinen Hirnendothelzellen

Materialien:

Waschmedium	ISCOVE'S-Medium (Dulbecco):		Gibco BRL Life Technologies; Nr 42200-030
Serum	Fötale Kälberserum (FCS)	Mycoplex™ Fötale Kälberserum	PAA Laboratories, Nr A 15 – 773
Fixierung	Formaldehyd	0,2%ige Lösung in PBS	aus Formaldehyd 37% hergestellt Merck, Nr 1.0400.3
Zellen aufbrechen	Triton X-100	3%ige Lösung in PBS (tOctylphenoxy-polyethoxyethanol)	SIGMA Nr: T 8540
1. AK	Anti-ZO-1-Antikörper:	Ratte Anti ZO-1 (<i>tight junction</i> assoziiertes Polypeptid) monoklonaler Antikörper Verdünnung: 1: 2.000 in ISCOVE'S Medium mit 1% FCS	Chemicon International, Inc., Nr: MAB 1520
2. AK	Peroxidase-markierter Anti-Fab ₂ -Antikörper	Peroxidase-konjugierter Fab ₂ -Fragment Ziege Anti-Ratte IgG (H+L) Verdünnung: 1: 2.000 in ISCOVE'S Medium mit 1% FCS	Jackson Immuno-research Laboratories, Inc. Nr: 112 - 036 - 003
Substrat	Tetramethylbenzidin (TMB)	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin Flüssigsubstrat System	SIGMA Nr: T 8540
Stopp-lösung	Schwefelsäure	2 N in <i>Aqua bidest.</i>	

Vorbereitung von Lösungen:

1. Waschmedium: ISCOVE'S mit 1% FCS
2. Antikörperlösungen: beide AK wurden in ISCOVE'S 1% FCS im Verhältnis 1:2.000 verdünnt und konnten dann bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für einige Monate aufbewahrt werden.

Alle Lösungen wurden während des Versuchs bei Raumtemperatur verwendet.

Durchführung:

Die Mikrotiterplatten mit den RHE wurden kurzfristig aus dem Brutschrank genommen und sofort zur Durchführung des ELISA verwendet.

Arbeitsschritte:

Zu Beginn wurden die Platten in ISCOVE'S 1% FCS zwei mal 5 min mit $150\text{ }\mu\text{l}$ / well gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 15 min in Formaldehyd mit $100\text{ }\mu\text{l}$ / well fixiert und danach mit $100\text{ }\mu\text{l}$ Triton X-100 pro well für 4 min aufgebrochen. Blockierung: 30 min in ISCOVE'S 1% FCS, $150\mu\text{l}$ / well. Der erste Antikörper wurde für 60 min mit $50\mu\text{l}$ / well inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal in $150\text{ }\mu\text{l}$ ISCOVE'S 1% FCS / well gewaschen, wonach der zweite, peroxidasemarkierte Antikörper ebenfalls für 60 min mit $50\mu\text{l}$ / well pipettiert wurde. Der dreifache Waschvorgang mit ISCOVE'S 1% FCS und $150\mu\text{l}$ / well wurde wiederholt, bevor schließlich $100\text{ }\mu\text{l}$ Tetramethylbenzidin pro Vertiefung als Substratlösung für Peroxidase auf die fixierten Zellen gegeben wurde. Die enzymatische Reaktion wurde nach genau 30 min durch Zugabe von Schwefelsäure 2 N ($100\mu\text{l}$ / well) gestoppt, sodaß sich letztendlich in jeder Vertiefung der Platte $200\text{ }\mu\text{l}$ Volumen befanden. Bei der Zugabe der Säure fand ein pH-abhängiger Farbumschlag der Flüssigkeit von bläulich nach gelb statt. Im Anschluß wurde die Extinktion der Flüssigkeit bei 450 nm gemessen.

5.1.2.2 Proteinbestimmung (Methode nach Bradford 1976)

Materialien:

Proteinstandard	bovines Serumalbumin (BSA)	Initiale Fraktionierung durch kalte Alkoholpräzipitation	SIGMA Nr. A 4503
Proteinreagenz	Bio Rad Protein Assay	Farbstoffkonzentrat enthält Phosphorsäure 55% Methanol 15%	Bio Rad Laboratories Nr: 500-0006 Kontr. Nr. 426458
NaCl-Lösung	0,9 % physiologische Kochsalzlösung in <i>Aqua bidest.</i>		
Waschmedium	ISCOVE'S-Medium (Dulbecco):		Gibco BRL Life Technologies;Nr: 42200-030

Vorbereitung von Lösungen:

Als Proteinstandardlösung wurde eine 200 mg%ige BSA-Lösung verwendet; 100 µl-Aliquots wurden bei -20 °C gelagert.

Alle Lösungen wurden während des Versuchs bei Raumtemperatur verwendet.

Durchführung:

Die Mikrotiterplatten wurden dem Brutschrank entnommen und direkt verwendet.

Arbeitsschritte:

Zu Beginn wurden die Zellen zunächst zwei mal 5 min und dann einmal 30 min in ISCOVE'S (ohne Zusätze) mit 150 µl / *well* gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde vorsichtig abgesaugt und die Proteinstandardverdünnungsreihe hergestellt: 100 µl Proteinstandard (= 200 µg BSA) aus dem Aliquot wurden 1: 10 mit 0,9% NaCl-Lösung verdünnt (Konzentration 200µg / ml). Eine Verdünnungsreihe wurde entweder in der Mikrotiterplatte oder separat in Eppis hergestellt.

Verdünnungsreihe aus Proteinstandard pipettieren (in μl)									
200	175	150	125	100	75	50	25	10	0
Jeweils mit 0,9 % NaCl-Lösung auf 200 μl auffüllen									

Aus jedem hergestellten Standard der Verdünnungsreihe wurden 3x 20 μl in jeweils drei leere Vertiefungen einer Mikrotiterplatte für eine 3-fach-Bestimmung pipettiert. Das Proteinreagenz wurde folgendermaßen verdünnt: 3 ml Proteinreagenz + 17 ml *Aqua bidest.* = 20 ml (ausreichend für eine 96-well-Platte). 200 μl des verdünnten Reagenz wurden in jedes zu testende *well* mit Probe (Endothelzellen) und in die wells mit dem Standardprotein gegeben. Nach der Reagenzzugabe wurden die Platten für fünf Minuten auf einem Rüttler geschüttelt, bis die Lösung in den *wells* mit den Proben eine homogene Färbung annahm. Anschließend wurden Extinktionsmessungen im *dual mode* bei 620 nm und 492 nm (Referenzfilter) durchgeführt. Die Differenz der gemessenen optischen Dichten bei 620 nm und 492 nm wurde als Parameter der Gesamtproteinmenge pro *well* interpretiert.

5.1.2.3 Harnstoffextraktion von ZO-1 (modifizierte Methode nach Li und Poznansky 1990)

Materialien:

Pufferlösung A: Stammlösung auf 100 ml *Aqua bidest.*

Substanz	Molekulargewicht (MM in unit)	Konzentration	Einwaage / Volumen	Hersteller
Dithiotreitol	154,24	1 mM	15,424 mg	
EDTA	Stammlösung 500 mM	1 mM	0,2 ml	Riedel-de-Haen, Nr 27248
Tris-HCl	121,1	10 mM	121,14 mg	Sigma, Nr F 1503
Harnstoff	66,06	6 M	39,636 g	Merck

Diese Pufferlösung wurde bei +4 °C aufbewahrt.

Proteaseinhibitoren für Puffer A (jeweils 3 separate Stammlösungen)

Substanz	Molekulargewicht (MM in unit)	Konzentration	Einwaage / Volumen	Hersteller
PMSF (Phenylmethylsulfonyl-fluorid)	174,2	100 mM	17,42 mg / ml Isopropanol	Boehringer-Mannheim, Nr 236 608
Leupeptin	475,6	400 µM	1,9024 mg / 10 ml <i>Aqua bidest.</i>	Sigma; Nr: L-2884
Trypsin-Inhibitor		2mg / ml	2 mg / ml <i>Aqua bidest.</i>	

Diese Stammlösungen wurden in 100 µl Portionen aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Pufferlösung B (2-fach konzentriert): Lösung *ad* 20 ml *Aqua bidest.*

Substanz	Molekulargewicht (MM in unit)	Konzentration	Einwaage / Volumen	Hersteller
Glycerol		20%	4 ml	Merck
SDS		4,6%	0,92 g	Dodecylsulfat-Natriumsalz, Merck-Schuchardt, Nr 822050
Tris-HCl (Trishydroxymethylaminomethan)	121,14	125 mM	0,300285 g	Sigma, Nr: F1503
Dithiothreitol	154,24	100 mM	0,30848 g	

Vorbereitung der Lösungen:

Die Proteaseinhibitoren wurden erst kurz vor der Zugabe der RHE-Zellen der Pufferlösung A zugefügt: Je 100 µl auf 10 ml Puffer A. Alle Lösungen waren während des Versuches auf Eis gelagert und die Arbeitsschritte wurden ebenfalls auf Eis durchgeführt.

Durchführung:

Die aus der RHE Präparation gewonnenen Zellen befanden sich noch als Suspension in M199 mit 20% NCS und wurden bei 190 g für 10 min zentrifugiert. Um die Zellen vom Medium und Serum zu befreien, wurde das Pellet in 14 ml PBS (RT) aufgenommen und 15 min bei 800 g zentrifugiert. Das neue Pellet wurde auf Eis mit einer Menge von Puffer A versetzt, die mindestens gleichen Volumens war, wie die des Pellets. Die Mischung wurde in einem kleinen Eppendorfggefäß mit einer 200 µl-Pipettenspitze 20 mal aufgezogen und anschließend 10 min ins Ultraschallbad mit Eiswasser gegeben. Die Suspension wurde ein zweites Mal mit einer 200 µl-Pipettenspitze 20 mal aufgezogen und danach bei 61.000 g 1 h bei 4 °C in einer *SIGMA 3K30* zentrifugiert, Bremse: Progr. Nr 8. Der Überstand wurde aufgenommen und a) für Gelelektrophorese mit gleicher Menge Pufferlösung B versetzt (= Probe) oder b) bei -20 °C gelagert.

5.1.2.4 Gelelektrophorese (Methode nach Sambrook *et al.*)**Materialien und Durchführung:**

0,8 mm-5%-SDS PAGE (Polyacrylamidgel)

Trenngel:

Lösung A	3,3 ml	30% Acrylamid	300 g Acrylamid (Serva, Nr 10676) + 8 g Bis-Acrylamid (Serva, Nr 35925) <i>ad</i> 1000 ml <i>Aqua bidest.</i> , filtrieren, entgasen
Lösung B	5,0 ml	1,5 M Tris-HCl pH8,8	181,5 g Tris +800 ml <i>Aqua bidest.</i> , mit 12 M HCl auf pH8,8 titrieren, <i>ad</i> 1000 ml <i>Aqua bidest.</i> , entgasen
Lösung C	0,2 ml	10% SDS in <i>Aqua bidest.</i>	Dodecylsulfat Natriumsalz, Merck-Schuchardt, Nr 822050
<i>Aqua bidest.</i>	11,5 ml		
Temed	20 µl		Tetramethylethylendiamin 116,21g / mol, Merck, Nr 1.10732.0010
Ammoniumperoxi dsulfat 10%	180 µl		Merck, Nr 1201

Die Lösung wurde nach Zugabe von TEMED und Ammoniumpersulfat geschwenkt und das Gel in eine vorbereitete Glasplattenkammer bis etwa 2 cm unter Oberkante gegossen. Die Luftblasen wurden oberhalb des Gels durch Auffüllen der Kammer mit *Aqua bidest.* entfernt. Nach 30minütiger Inkubation wurde das Wasser abgegossen.

Sammelgel:

Lösung A	1,0 ml	30% Acrylamid	
Lösung D	2,5 ml	0,5 M Tris HCl, pH6,8	60 g Tris + 800 ml <i>Aqua bidest.</i> , mit 12 M HCl auf pH6,8 titrieren, <i>ad</i> 1000 ml <i>Aqua bidest.</i> , entgasen
Lösung C	100 µl	10% SDS in <i>Aqua bidest.</i>	
Aqua bidest.	6,5 ml		
Temed	10 µl		Tetramethylethylendiamin 116,21 g / mol, Merck, Nr 1.10732.0010
Ammoniumper- oxidsulfat 10%	100 µl		Merck, Nr 1201

Die Lösung wurde nach Zugabe von TEMED und Ammoniumpersulfat geschwenkt und das Gel bis zur Oberkante der Glasplatte überschichtet. Der Kamm wurde eingesetzt und das Gel 30 min inkubiert.

Elektrophoresekammer:

Die Klammern, die untere Leiste und der Kamm wurden von der Glasplattenkammer entfernt. Der Übergang zwischen Sammel- und Trenngel wurde markiert. Die untere Elektrophoresekammer wurde mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Dann setzte man die Glasplattenkammer schräg ein, sodaß die Luftblasen entweichen konnten. Die obere Elektrophoresekammer wurde mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Die Proben aus der Harnstoffextraktionsmethode und ein Proteinstandard (*high range*, BioRad Nr 161-0305) wurden mit Hamiltonpipette aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 100 Volt begonnen, während die Proteine im Sammelgel liefen. Wenn die Lauffront das Trenngel erreichte, stellte man das Gerät auf 250 Volt um. Als die Lauffront etwa 2 cm vor der Unterkante des Gels ankam, wurden die Laufspuren mit 5 µl

Malachitgrün markiert und der Farbstoff bis etwa einen cm in das Trenngel laufen gelassen. Wenn dies geschah, wurde der Strom abgeschaltet. Das Gel wurde 30 min in *Coomassi-Blau* gefärbt. Entfärbt wurde mit einer Entfärbelösung aus 10% Eisessig und 30% Ethanol in *Aqua bidest.* Es waren mehrere Waschvorgänge während etwa zwei Stunden notwendig, bis die Proteinbanden deutlich hervortraten und der Hintergrund stark entfärbt war. Zum Schluß wurde das Gel in einem *BioRAD Slabdryer* (Modell 483) getrocknet.

5.1.2.5 Westernblot (Methode nach Sambrook *et al.*)

Materialien:

SDS-PAGE aus Elektrophorese; Whatman Filterpapier; Nitrozellulosemembran; Ethanol; 0,5*Tb(E)-Puffer ohne SDS; 0,5*Tb(E)-Puffer mit 0,1% SDS; Blotgerät (Schleicher & Schuell Carboglas)

Durchführung:

4 Streifen Whatmanpapier und 1 Streifen Nitrozellulosemembran wurden auf die Größe des Gels geschnitten. Die Nitrozellulosemembran wurde 10 sec mit Ethanol abgespült.

Equilibrieren (10 min):

0,5*Tb(E)-Puffer ohne SDS	2x Whatmanpapier 1x Nitrozellulose
0,5*Tb(E)-Puffer mit 0,1% SDS	2x Whatmanpapier SDS-PAGE

Die Kohlefaserplatten des Blotgeräts wurden mit Ethanol und einem weichen Papiertuch abgewaschen. Auf die untere Platte des Blotgeräts (Kathode(-)) wurden in der Reihenfolge von unten nach oben übereinandergelegt:

- 2x Whatmanpapier aus 0,5*Tb(E)-Puffer mit 0,1% SDS
 1x Nitrozellulosemembran aus 0,5*Tb(E)-Puffer mit 0,1% SDS
 1x SDS-PAGE aus 0,5*Tb(E)-Puffer ohne SDS
 2x Whatmanpapier aus 0,5*Tb(E)-Puffer ohne SDS

Es wurde mit einer Stromstärke von 0,8 – 0,9 mA / cm² für 2 h geblottet. Daraufhin wurde die Nitrozellulosemembran zunächst 1 h bei RT, danach übernacht bei +4 °C in 10% H-Milch (0,3% Fett) Lösung in PBS blockiert.

5.1.2.6 Immunoblot

Materialien und Durchführung:

1. AK	Anti ZO-1-AK (Beschreibung: s.o.)	Anti Phosphotyrosin-AK Klon XPY06, Genzyme, Nr. MAB 1006
Verdünnung	1:1.000	2 µg / ml
In	PBS, Tween20 (0,2%) (Polyoxyethylensorbitanmono- laurat, Sigma, Nr P9416); 1% BSA; 0,02% NaN ₃ (Natriumazid)	PBS, Tween20 (0,2%); 1% BSA; 0,02% NaN ₃ (Natriumazid)
Entsprechen in 10 ml ween 0,2% in PBS	10 µl AK 0,1 g BSA 100 µl NaN ₃ 2%	100 µl AK (200µg/ml) 0,1 g BSA 100 µl NaN ₃ 2%
2. AK	Anti Ratte P _{ox}	Anti Maus P _{ox} -IgG, Sigma, Nr. A-2028
Verdünnung	1: 5.000	1:5.000
In	PBS, Tween 0,2%; 1% BSA	PBS, Tween 0,2%; 1% BSA
Entsprechen in 15 ml Tween 0,2% in PBS	3 µl AK 0,15 g BSA	3 µl AK 0,15 g BSA

Die Nitrozellulosemembran wurde direkt nach Beendigung der Übernachtblockierung mit dem Erstantikörper für 1 h inkubiert. Es folgten drei 10 min Waschschrte in PBS mit Tween20 (0,2%), bevor der Zweitantikörper für eine weitere Stunde inkubiert wurde. Daraufhin wurde der dreifache Waschvorgang wiederholt. Im Photolabor (Dunkelraum) wurde die Nitrozellulosemembran schließlich für eine Minute in Luminollösung (*ECL-Westernblotting detection reagent 1&2*, mersham Life Science, Nr RPN2106) gegeben. Die Filmbelichtung fand im direkten Anschluß mit variablen Belichtungszeiten statt.

5.1.2.7 ZO-1 Immunfluoreszenz

Die Einsaat der frisch präparierten Rinderhirnendothelzellen fand auf Glas- oder Kunststoffobjektträgern in einer Zelldichte analog der ELISA-Mikrotiterplatten (50.000 Zellen / well) statt. Die Zellkultur ließ man bei ein- bis zweitägigem Mediumwechsel bis zur Konfluenz wachsen.

Materialien:

4% Paraformaldehyd	50 ml 2-fach konz.PBS (192 mM NaOH, 244 mM NaH ₂ PO ₄ , pH7,0-7,2) + 40 ml <i>Aqua bidest.</i> auf 60 °C erhitzen. 4 g Paraformaldehyd (SIGMA) und 5 ml 100 mM MgCl ₂ unter Rühren hinzugeben. Mit <i>Aqua bidest.</i> auf 100 ml auffüllen und filtrieren. Lichtgeschützt bei 4 °C lagern.
PBS	PBS-Puffer pH7,3 Serag Wiessner, Nr 740530
0,1% Triton X-100	0,1%ige Lösung in PBS
M199 10% NCS	
M199 5% NCS	
1. AK: Anti ZO-1	AK aus ZO-1 ELISA, 1:100 in M199 10% NCS verdünnt.
2. AK: FITC	FITC markierter Ziege Anti-Ratte monoklonaler Antikörper . 1:50 in 1%igem Ziegennormalserum in PBS verdünnt.

Durchführung:

Frühstens nachdem die Endothelzellen in den gekammerten Objektträgern konfluent waren, konnte man eine Ausbildung von *tight junctions* postulieren. Die Fixierung der Zellen konnte dann nach Entfernung des Wachstumsmediums mit 4% Paraformaldehyd-Lösung während 20-minütiger Inkubation erfolgen. Im Anschluß fanden fünf Waschgänge in PBS statt, die nach dem zehnmütigen Aufbrechen der Zellen mit 0,1%igem Triton X-100 wiederholt wurden.

Anmerkung: die Fixierung und das Aufbrechen der Zellen analog der Methode des ZO-1 E-LISAs führte zu ähnlich guten Ergebnissen.

Unspezifische Bindungsstellen wurden nun für 20 min in M199 10% NCS blockiert, bevor der Erstantikörper (Anti ZO-1) für 1,5 h inkubiert wurde. Danach wurde wieder fünfmal gewaschen; aber diesmal mit M199 5% NCS. Der zweite Antikörper (FITC-Ziege Anti-Ratte) wurde ebenfalls für 1,5 h, aber im Dunkeln (!) inkubiert. Der letzte fünffache Waschvorgang konnte mit PBS durchgeführt werden. Es war darauf zu achten, daß die FITCS markierten Zellen hierbei so wenig wie möglich lichtexponiert wurden und bis zum Mikroskopieren im Dunkeln aufbewahrt wurden. Mikroskopiert wurde mit einem ZEISS-Phasenkontrast-Fluoreszenzlicht-Mikroskop mit eingebauter Kamera. Fotografiert wurde mit einem KODAK 400 ASA Diapositiv-Film bei variablen Belichtungszeiten zwischen 1 und 3 min.

5.2 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden experimentelle Ansätze beschrieben, die zum Ziel hatten, das ZO-1-Protein in einer primären Rinderhirnendothelzellkultur (RHE) darzustellen.

Der Nachweis der aus dem Rinderhirn präparierten Zellen als Endothelzellen wurde durch eine von-Willebrand-Faktor (vWF)-Färbung geführt. Für die Immunfluoreszenz wurden zwei Antikörper verwendet. Der Erstantikörper war ein anti-humaner vWF-AK (Maus), während der Zweitantikörper ein FITC-markierter Anti-Maus-AK (Ziege) war. In der phasenkontrastmikroskopischen Betrachtung war eine Immunfluoreszenz der Zellen zwar deutlich erkennbar; die Intensität war aber aufgrund der Heterologie des Systems (Anti-humaner AK – bovine Hirnendothelzelle) eher schwach ausgeprägt.

5.2.1 Qualitativer ZO-1-Nachweis in RHE-Zellen

Die Darstellung des ZO-1-Proteins als Proteinkomponente in Rinderhirnendothelzellen gelang durch die folgenden Arbeitsschritte:

Nach der Präparation der RHEZ wurden deren Proteinbestandteile durch Harnstoffextraktion (modifizierte Methode von Li und Poznansky) gewonnen. Mittels Gelelektrophorese wurden die Proteine nach Molekulargewicht getrennt. Zur Einschätzung der Molekülgrößen der in der Probe aufgetrennten Proteine wurde ein Proteinstandard mit Myosin (213 kDa), β -Galaktosidase (119 kDa), bovinem Serumalbumin (83 kDa) und Ovalbumin (47 kDa) verwendet. Myosin hat eine Molekülmasse, die in der Größenordnung von ZO-1 (~220 kDa) liegt. Es wurden jeweils zwei Gele verwendet, von denen eines gefärbt und getrocknet wurde, sodaß sich die Proteine direkt darstellen ließen. Die Proteine des anderen Gels wurden durch Westernblot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das ZO-1-Protein wurde dann mit Erst- und Zweitantikörper auf der Nitrozellulosemembran markiert. Geeignete Antikörperkonzentrationen wurden zuvor in *Dot-Blot*-Versuchen ermittelt. Der peroxidase markierte Zweitantikörper setzte das Substrat der Luminollösung um, welches daraufhin ein lumineszie-

rendes Signal aussendete. Durch Filmbelichtung konnte dieses Signal an der Stelle der Nitrozellulosemembran erfaßt werden, wo sich das ZO-1-Protein nach dem Westernblot befand.

In *Abbildung 3* ist ein 5% SDS-Gel zu sehen, in dem vier verschiedene Spuren aufgetragen wurden. Oberhalb des Gels ist die entsprechende Filmbelichtung von ZO-1 aus dem Western- und Immunoblot dargestellt. In der ersten Spur (HS = *high range*-Proteinstandard) ist Myosin (213 kDa) abgebildet. Die Spuren 1 – 3 enthalten verschiedene Probenlysate aus RHE-Zellen. In Spur 1 und Spur 2 wurden Probenlysate aus zwei verschiedenen Hirnpräparationen, die nach der Harnstoffextraktionsmethode hergestellt wurden, aufgetragen. Spur 3 enthielt eine Probe, bei der die Proteine nach der herkömmlichen SDS-Kochmethode (Sambrook *et al.*) aus den RHE-Zellen gewonnen wurden.

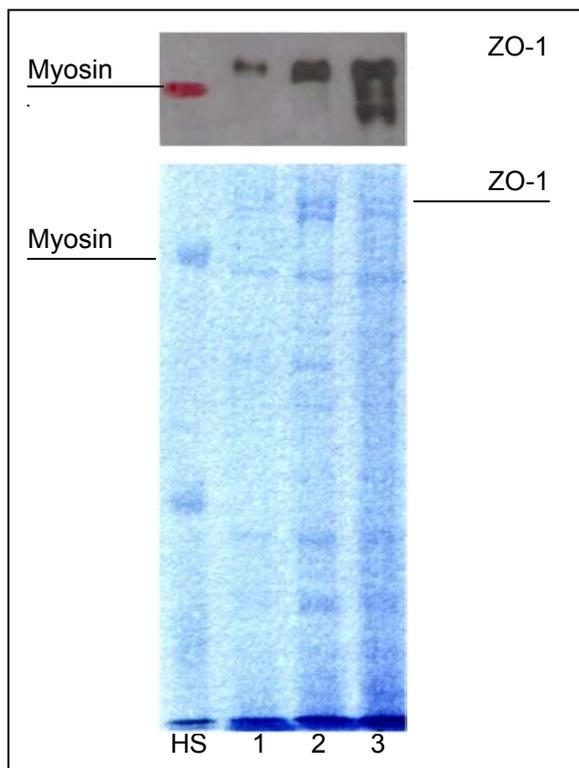


Abb. 3:
 Darstellung von ZO-1 aus der Proteinfraction von RHE-Zell-Lysaten im Westernblot (5% SDS-Gel, unterer Teil) und im Immunoblot (nach Filmbelichtung, oberer Teil)

Bei Herstellung der Probenlysate nach der SDS-Methode kam es zu einer Fraktionierung von ZO-1, wie sich an der auseinandergezogenen Bande aus Spur 3 im Immunoblot erkennen läßt. Bei der Harnstoffextraktionsmethode trat dieser Effekt nicht auf, weshalb sich diese Methode zur Darstellung von ZO-1 im Immunoblot besser eignet.

5.2.2 Lokalisation von ZO-1 in einer konfluenten RHE-Kultur

Wenn Endothelzellen in der Zellkultur wachsen, ist frühestens nach Erreichen der Konfluenz des Zellrasens anzunehmen, daß TJ vorhanden sind. Also erst dann, wenn die Endothelzellen Kontakt untereinander haben. Dieser Zeitpunkt konnte trotz konstanter Zellzahl pro Fläche bei Einsaat je nach RHEZ-Präparation um einige Tage variieren. Das ist womöglich auf in-konstante Wachstumsgeschwindigkeiten der Zellen nach der Präparation zurückzuführen. Im Durchschnitt waren die RHEZ ab dem 6. Tag nach Einsaat konfluent.

Die ZO-1-Immunfluoreszenz wurde im beschriebenen Fall am 7. Tag nach Einsaat der Zellen vorgenommen, da zu dem Zeitpunkt nach phasenkontrastmikroskopischer Beurteilung ein klar erkennbarer konfluenter Zellrasen aus morphologisch ausdifferenzierten Endothelzellen bestand.

Es sind zwei verschiedene Bildausschnitte in den *Abbildungen 4* und *5* als Phasenkontrast-Fluoreszenzlicht Aufnahmen dargestellt. Die aufgebrochenen Zellen wurden zur Darstellung des ZO-1-Proteins im UV-Licht fotografiert. Um die Zellmorphologie mit Zellkernen besser zu erkennen, wurden die selben Bildausschnitte zum Vergleich auch im sichtbaren Licht aufgenommen.

In *Abb. 4* ist eine starke randständige Fluoreszenz der Endothelzellen zu sehen. Diese Lokalisation entspricht der räumlichen Verteilung der TJ in der Zellperipherie. Das bedeutet, daß ZO-1 bei bestehendem Zellkontakt in einer ausdifferenzierten RHE-Zellkultur im Bereich der TJ lokalisiert ist.

Eine deutliche Fluoreszenz läßt sich in *Abb. 5* im Bereich der Zellkerne erkennen. Dies ist insofern interessant, als daß die nukleäre Lokalisation von ZO-1 während der *monolayer*-Bildung in verschiedenen Epithelzellen nur einmal beschrieben wurde (Gottardi *et.al.* 1996, s. Kapitel 4.2.2). In dieser Studie wurde festgestellt, daß die nukleäre ZO-1-Lokalisation in dem Maße abnahm, wie die Konfluenz des Zellrasens zunahm. Während dessen kam es zu einer ZO-1-Umverteilung zur Zellperipherie in die TJ-Region. Wenn man eine Analogie der Vorgänge für den Fall der RHE-Zellkultur postuliert, dann ist anzunehmen, daß die Zellen im Bildausschnitt der *Abb. 5* noch nicht den voll ausgeprägten Grad der Konfluenz erreicht hatten, als die Immunfluoreszenz am siebten Tag nach Einsaat der Zellen vorgenommen wurde.

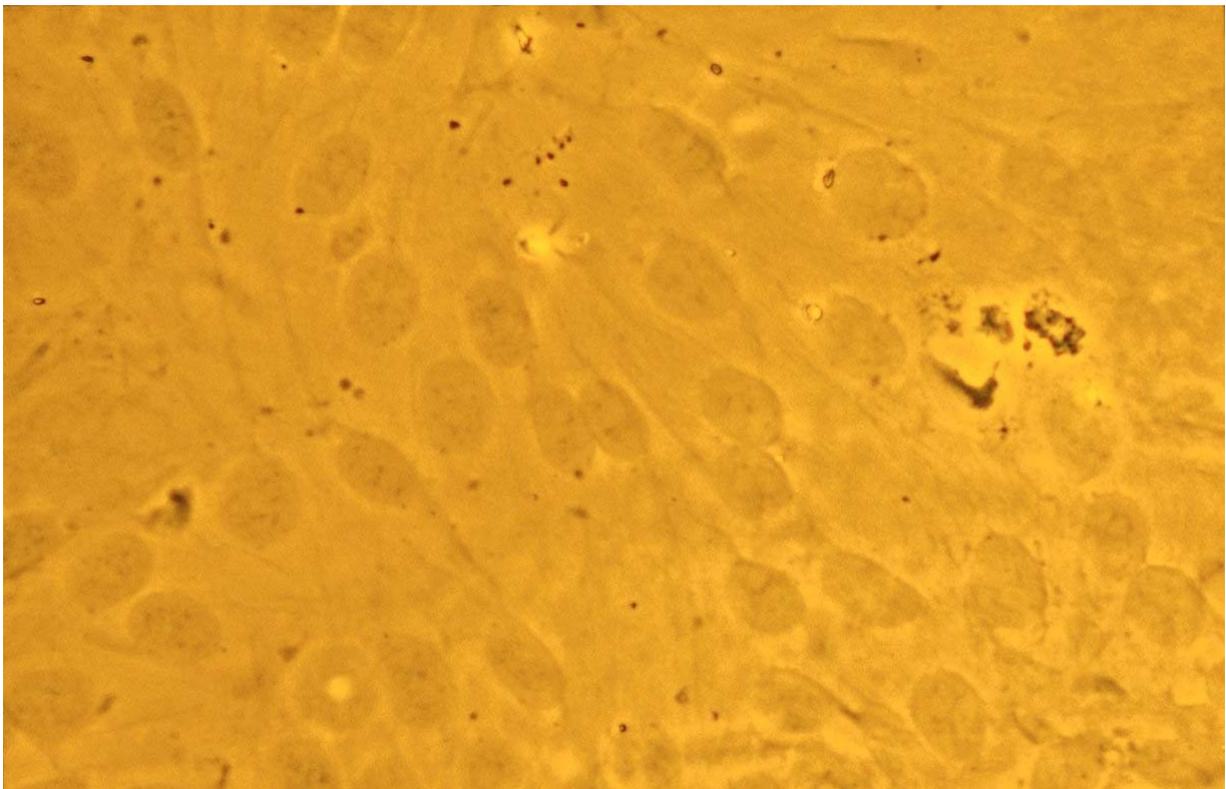
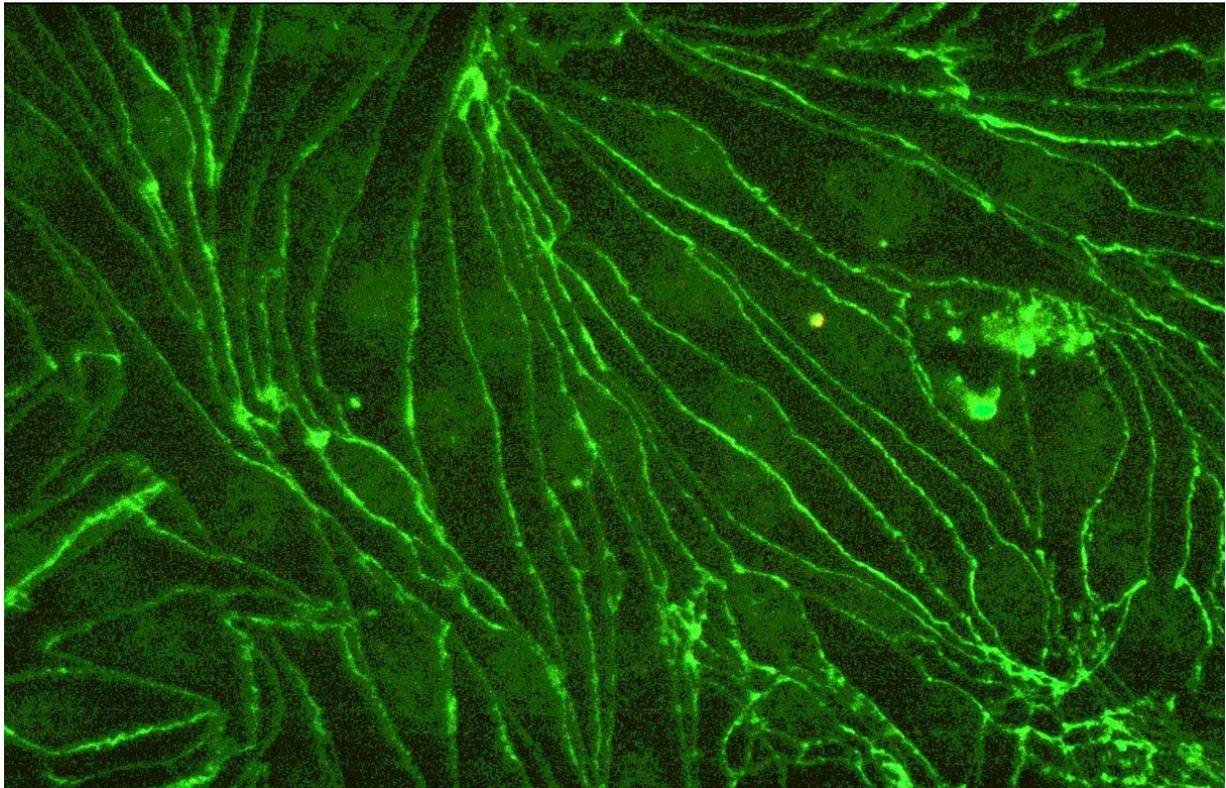


Abb. 4: RHE-Zellkultur 7 Tage alt. Konfluenter Zellrasen. Oben: ZO-1-Immunfluoreszenz; Unten: Sichtbares Licht (identischer Bildausschnitt).

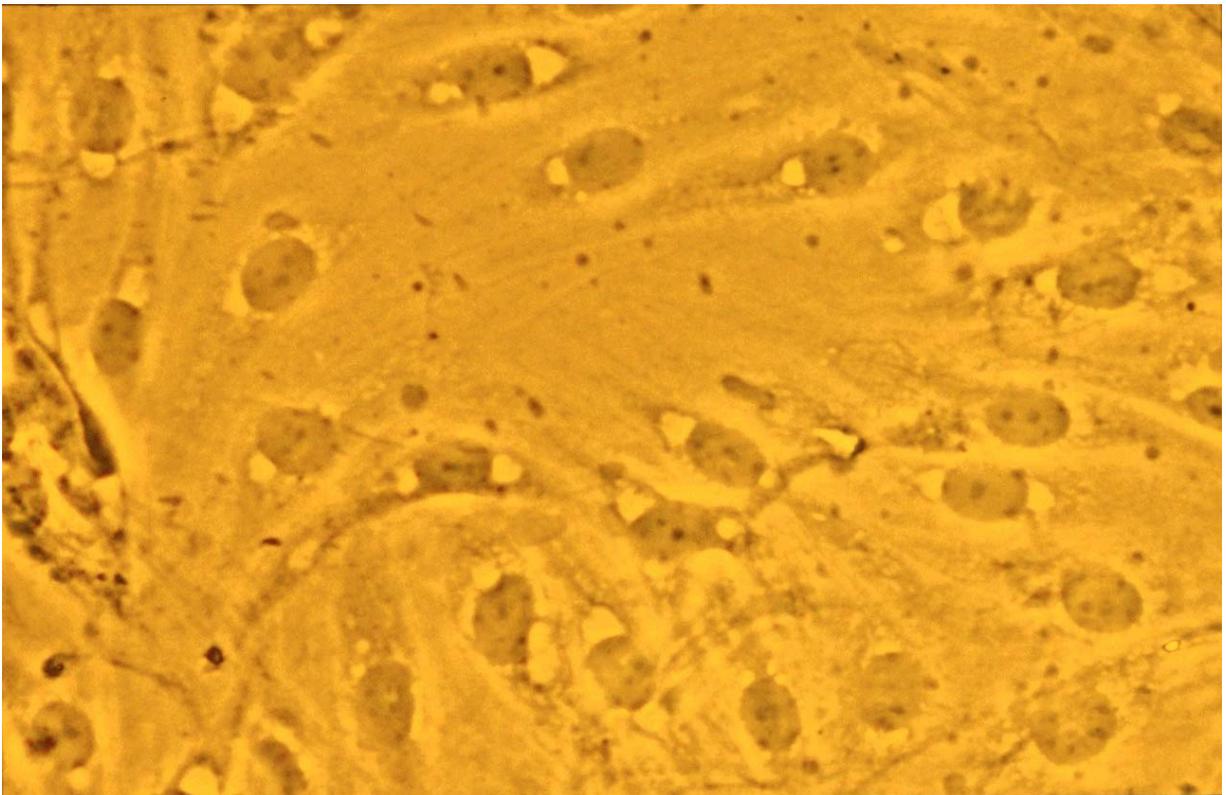
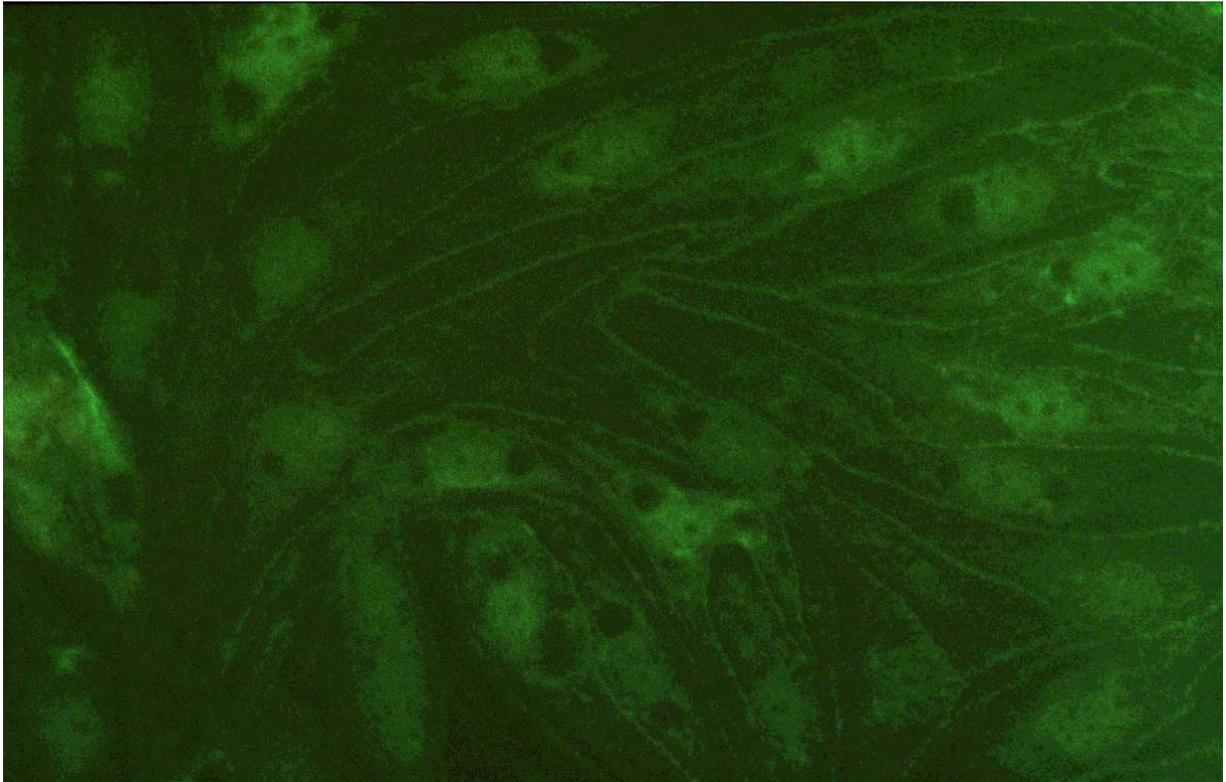


Abb. 5: RHE-Zellkultur 7 Tage alt. Subkonfluenter Zellrasen. Oben: ZO-1-Immunfluoreszenz; Unten: Sichtbares Licht (identischer Bildausschnitt).

5.2.3 Semiquantitativer Nachweis von ZO-1 in RHE-Zellen

In dieser Arbeit ging es darum, das ZO-1-Protein in RHE-Zellen aus der Primärkultur im ELISA (*enzyme linked immuno-sorbant assay*) darzustellen. Bei dieser Methode wurde eine konstante Anzahl RHE-Zellen (50.000 / *well*) unmittelbar nach deren Präparation in die Vertiefungen (*wells*) der 96-*well*-Elisaplaten eingesät. Bei der Messung der optischen Dichte im ZO-1-ELISA wurde für jede Versuchsbedingung die unspezifische Bindung des Zweitantikörpers separat ermittelt. Dieser Meßwert wurde dann als Hintergrundaktivität vom eigentlichen ZO-1-Meßwert (Erst- und Zweit-AK) subtrahiert.

Wie bereits erwähnt, ist die Wachstumsgeschwindigkeit der RHE-Zellen inkonstant, was sich in verschiedenen Präparationen bereits durch unterschiedliche Zeitpunkte der Konfluenz der Kultur bemerkbar machte. Im Bezug auf die Aussage der Meßwerte im ZO-1-ELISA führte dieser Umstand zu folgendem Problem:

Obwohl die Zellzahl bei Einsaat der Zellen konstant gehalten werden konnte, war es dennoch nicht möglich, für den Zeitpunkt der ZO-1-ELISA-Messung (z.B. am 6. Tag nach Einsaat) zu postulieren, daß in allen *wells*, in denen eine Messung vorgenommen wurde, die gleiche Anzahl an RHE-Zellen vorhanden war. Nach Erreichen der Konfluenz war es nicht mehr möglich, die Anzahl der Zellen pro Fläche der Zellkulturplatten zu ermitteln. Der im ZO-1-ELISA gemessenen optischen Dichte (OD) fehlte daher eine zuverlässige Bezugsgröße. Dieser Schwierigkeit wurde dadurch begegnet, daß man jeder Gruppe von *wells* mit RHE-Zellen, bei der eine Messung im ZO-1-ELISA durchgeführt wurde, eine zweite Gruppe von *wells* gegenüberstellte, die exakt den gleichen Versuchsbedingungen ausgesetzt war, wie die erste Gruppe. In der zweiten Gruppe wurde der Gesamtproteingehalt der Zellkultur ermittelt. Diese Meßgröße diente stellvertretend für die Zellzahl pro *well* als Referenzwert für die OD des ZO-1-Wertes.

In speziell für jede Proteingehaltsmessung angefertigten Eichgeraden wurde kontrolliert, daß die ODs der Proteinmessungen den Proteinmengen proportional waren.

Für die semiquantitative Darstellung der ZO-1-Menge⁷ einer RHE-Zellkultur bewährte sich die Verwendung eines OD (ZO-1) / OD (Gesamtprotein)-Quotienten. Die Rohdaten der Messungen (OD des ZO-1-Gehalts (Mittelwerte), OD des Gesamtproteingehalts (Mittelwerte) und die jeweiligen Standardabweichungen) wurden in einem Diagramm zusammengefaßt und dem Diagramm zur Darstellung des OD (ZO-1) / OD (Gesamtprotein)-Quotienten gegenübergestellt.

Aufgrund des variablen Wachstums- und Differenzierungsverhaltens verschiedener Zellpopulationen nach Präparation waren die absoluten Meßwerte unterschiedlicher Versuchsreihen nicht direkt miteinander zu vergleichen. Absolute Meßwerte ließen direkte Vergleiche daher nur innerhalb einer Population aus derselben Hirnpräparation zum gleichen Zeitpunkt zu. Die Versuchsanordnung war gut geeignet, um Wirkungen variierteter Versuchsbedingungen auf den ZO-1-Gehalt darzustellen.

Zeitkinetik des ZO-1-Gehalts der RHE-Zellen im Verlauf der *monolayer*-Bildung

Hier wurde der ZO-1-Gehalt der RHE-Zellen im Verlauf der Entwicklung einer konfluenten Zellkultur nach Präparation der Zellen als Primärkultur dargestellt.

Bei der Präparation der RHE-Zellen aus dem Rinderhirn waren mehrere Arbeitsschritte notwendig, während derer sich die Zellen in enzymatischen Verdauungen befanden, um die Zellen letztendlich vom umgebenen Gewebe zu isolieren. Unter diesen Vorgängen litten die Zellen und verloren ihre typische spindelförmige Endothelzellform, die sie im Zellverband in den kapillären Strukturen *in vivo* besaßen. Die typischen BHS-induzierenden Bedingungen, wie die Astrozyten, waren in der reinen Zellkultur nicht mehr vorhanden.

Dennoch bildeten die Zellen in der Kultur durch Proliferation innerhalb von einigen Tagen wieder *monolayers* aus und nahmen auch wieder ihre charakteristische Spindelform ein (s. *Abb. 6-9*).

⁷ wenn im Folgenden von ZO-1-Menge die Rede ist, so ist damit der Quotient der optischen Dichten von ZO-1 und dem Gesamtprotein gemeint.

In den *Abbildungen 6 bis 9* sind RHE-Zellkulturen verschiedenen Alters in Phasenkontrastaufnahmen dargestellt, um die morphologischen Veränderungen während des Wachstums der Zellen unter Kulturbedingungen zu veranschaulichen. *Abb. 6* zeigt Zellen einen Tag nach der Einsaat. In *Abb. 7* ist die RHE-Zellkultur zwei Tage alt. Beginnende Konfluenz des Zellrasens ist am fünften Tag nach Einsaat zu sehen (*Abb. 8*). *Abb. 9* zeigt die Zellen am siebten Tag.

Die Frage belief sich bei diesem Versuch darauf, zu untersuchen, in welcher Weise sich die artifiziiellen Bedingungen der Zellkultur während der *monolayer*- und TJ-Bildung auf den ZO-1-Gehalt auswirkten.

Der ZO-1-Gehalt und parallel dazu der Gesamtproteingehalt wurde ab dem ersten Tag nach Einsaat der Zellen täglich bis zum neunten Tag ermittelt. Der Tag, an dem die Zellen eingesät wurden (Tag null), ließ keine Messungen zu, da die frisch präparierten Zellen in den *wells* noch nicht ausreichend adhärenent waren und so bei den einzelnen Arbeitsschritten (Waschvorgänge etc.) verloren gingen. Zu alte Zellkulturen waren wegen Ablösungen der Zellen ebenfalls nicht mehr für genaue Messungen zu gebrauchen. Im Einzelfall war die optische Beurteilung der Zellkulturen mit dem Phasenkontrastmikroskop maßgebend für die Entscheidung, ob eine Messung sinnvoll war, oder nicht.

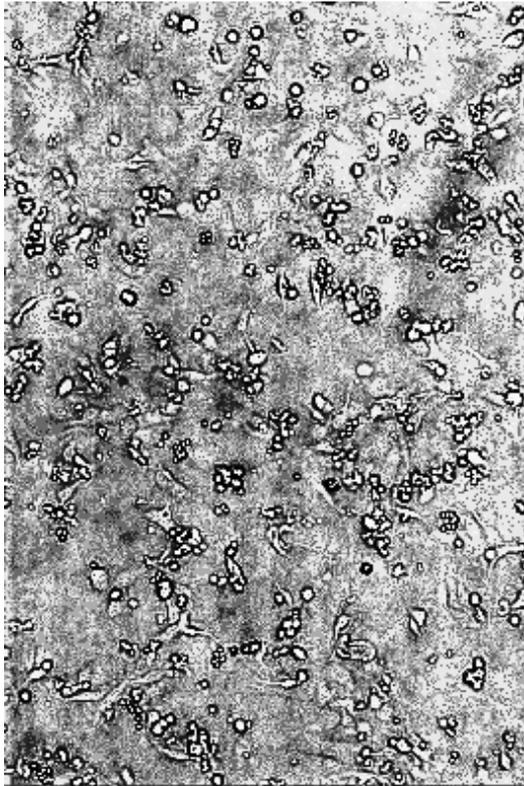


Abb. 6: RHE-Zellkultur 1 Tag alt

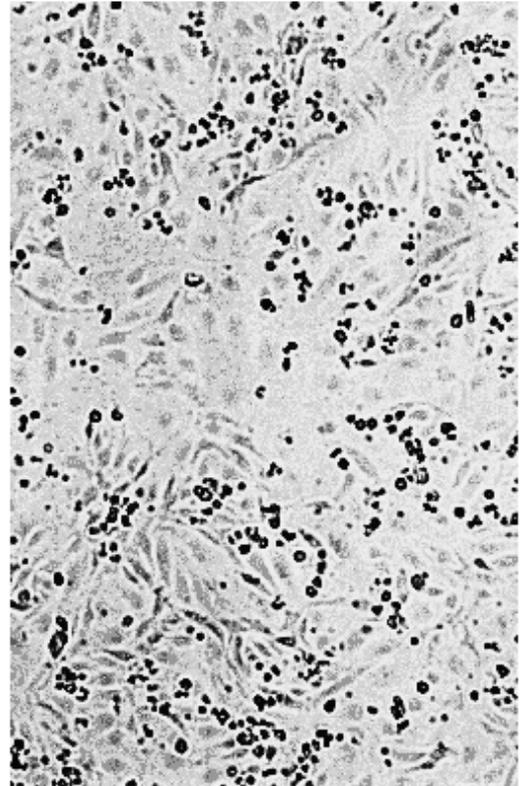


Abb. 7: RHE-Zellkultur 2 Tage alt

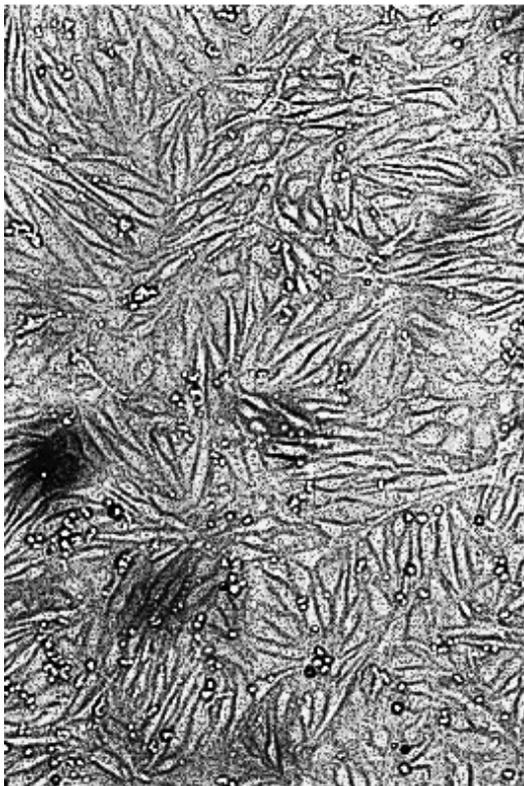


Abb. 8: RHE-Zellkultur 5 Tage alt

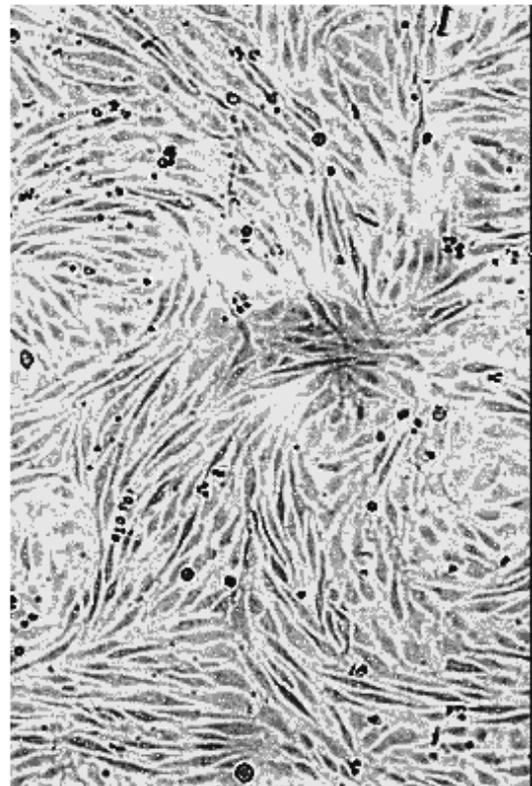


Abb. 9: RHE-Zellkultur 7 Tage alt

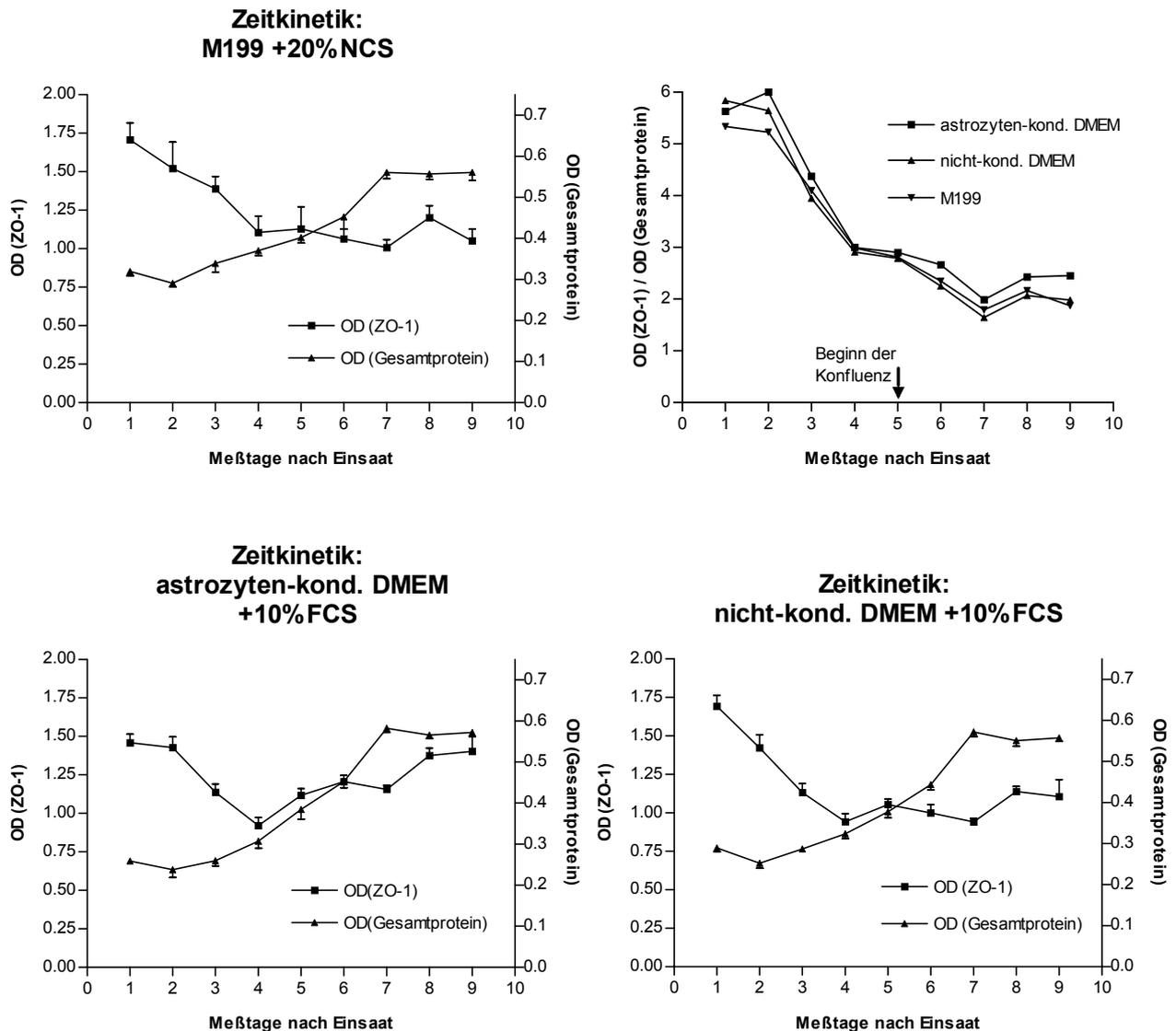


Abb. 10: ZO-1-Gehalt der RHEZ im Verlauf der Monolayerbildung

Diese ZO-1-Zeitkinetik (Abb. 10) wurde vergleichend unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen, die alle aus der selben Präparation stammten, wuchsen ab dem Zeitpunkt der Einsaat in drei verschiedenen Medien, um deren Effekte auf den ZO-1-Gehalt im Verlauf des Wachstums mitzubeurteilen. Verwendet wurde das übliche Zellmedium, M199 mit 20% NCS, sowie rattenastrozytenkonditioniertes DMEM mit 10% FCS⁸, als auch nichtkonditioniertes DMEM mit 10% FCS.

⁸ 2 Tage lang rattenastrozytenkonditioniertes Medium wurde freundlicherweise von Frau D. Schmidt zur Verfügung gestellt

Unter allen drei Bedingungen ließ sich ab dem zweiten Meßtag nach Einsaat eine Zunahme des Gesamtproteingehalts in der Kultur konstatieren (s. *Abb. 10*). Dieser Effekt erklärt sich durch die Proliferation der Endothelzellen. Ein Plateau war unter allen drei Bedingungen ab dem siebten Meßtag zu sehen, ab wann die Proteinmengen nicht mehr zunahmten. Dieses Phänomen hängt sehr wahrscheinlich mit dem Erreichen der Konfluenz zusammen. Die Ausbildung von Zellkontakten zwischen den Endothelzellen wirkt sich hemmend auf die Proliferation aus.

Die Betrachtung der ZO-1-ODs zeigt, daß diese bis zum vierten Meßtag trotz gleichzeitiger Zunahme des Gesamtproteins unter den drei verschiedenen Bedingungen deutlich abfielen. Der steile Verlust der ZO-1-Menge war jedoch mit Beginn der Konfluenz am fünften Meßtag abgeschwächt. Im Bezug auf das Gesamtprotein war ab dem siebten Meßtag sogar wieder ein Anstieg der ZO-1-Menge festzustellen. Zu diesem Zeitpunkt konnte man davon ausgehen, daß TJ zwischen den Zellen bestanden.

Unter den Bedingungen mit astrozytenkonditioniertem Medium lagen die ZO-1-Mengen ab dem zweiten Meßtag ständig geringfügig über denen, wo kein astrozytenkonditioniertes Medium verwendet wurde. Ob die ZO-1-Menge tatsächlich durch das astrozytenkonditionierte Medium bedingt vergleichsweise höher war als unter den Bedingungen ohne astrozytenkonditioniertes Medium, ist aufgrund der Geringfügigkeit des Unterschieds in dieser Messung nicht mit letzter Sicherheit zu sagen.

Einen möglichen Erklärungsansatz für die quantitativen Veränderungen der ZO-1-Menge in RHE-Zellen unter Kulturbedingungen, bei dem proliferative Effekte eine Rolle spielen könnten, liefert das folgende Experiment zur Variation der RHE-Zellzahl bei der Einsaat der Zellen.

Titration der RHE-Zellzahl bei Einsaat der Zellkultur

In diesem Versuch wurden verschieden große Zellmengen nach der Präparation in die Kulturplatten eingesät. Es sollte untersucht werden, welchen Effekt die Anzahl der Zellen bei Ein-

saat zu einem definierten Zeitpunkt der ZO-1- und Proteinmessung auf die ZO-1-Menge in der Kultur hatte. Die Zellzahl pro *well* bei Einsaat wurde für die Messungen jeweils um 50% verringert (logarithmus dualis).

Die Messungen wurden einheitlich am sechsten Tag nach Einsaat durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt war eine Kontrollpopulation konfluent, die mit der üblichen Zellzahl von 50.000 / *well* eingesät wurde. Dies entspricht in der Verdünnungsreihe etwa $6,2 \cdot 10^4$ Zellen / *well*. Bei mikroskopischer Beurteilung der Zellkulturen boten beide Zellpopulationen das Bild optimal gewachsener *monolayer*. Bei höher eingesäten Zellzahlen überlagerten sich die Zellen zunehmend stärker, während bei niedriger eingesäten Zellmengen auch nach dem sechsten Tag zellfreie Gebiete in der Kultur zu sehen waren. Zellzahlen von weniger als $1,6 \cdot 10^4$ Zellen bei der Aussaat lagen zum Zeitpunkt der Messungen außerhalb des Meßbereichs, da die Hintergrundaktivität des Zweitantikörpers im Verhältnis zur spezifischen Aktivität (mit ZO-1-AK) zu groß war.

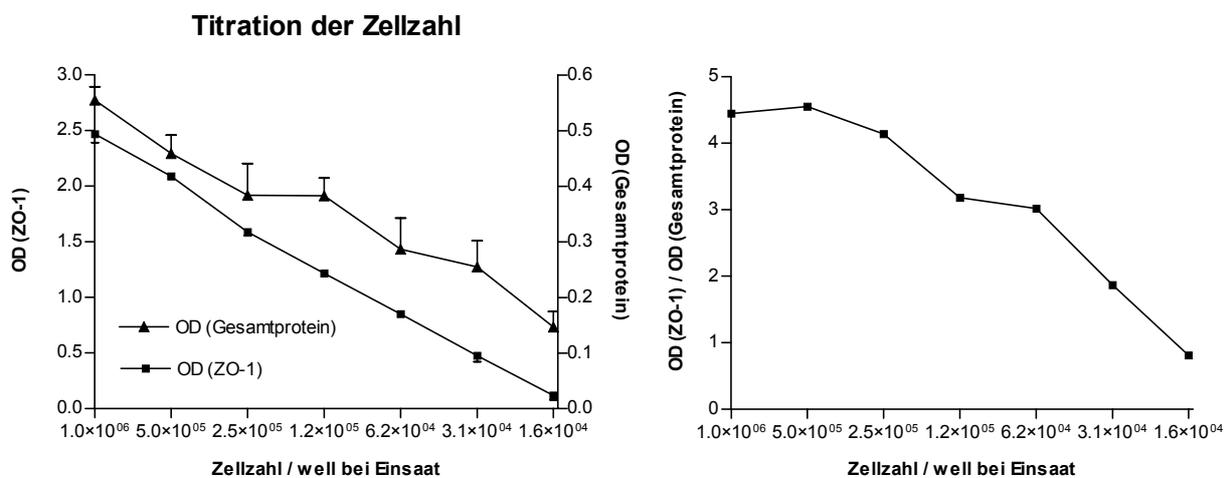


Abb. 11: Titration der Zellzahl. Wirkung auf die ZO-1-Menge.

Wie zu erwarten, war der Gesamtproteingehalt in denjenigen *wells* um so niedriger, je geringer die Zellzahl bei Einsaat war (s. *Abb. 11*). Interessanterweise war die relative ZO-1-Menge zum Zeitpunkt der Messung um so höher, je größer die Zellzahl bei Einsaat gewesen ist.

Die Tatsache, daß die ZO-1-Menge am sechsten Tag nach der Einsaat von $1,0 \cdot 10^6$ Zellen

unterhalb der ZO-1-Menge bei Einsaat von $5,0 \cdot 10^5$ lag, ist wahrscheinlich auf die ungünstigen Kulturbedingungen bei zu hohen Zellzahlen zurückzuführen.

Stimulationen konfluenter RHE-Kulturen: Wirkung auf die ZO-1-Menge

In den vorangehenden Abschnitten wurde beschrieben, wie sich der ZO-1-Gehalt von RHE-Zellen unter variierten Bedingungen der Zellkultur verhält. Im folgenden geht es um die Darstellung der ZO-1-Menge in konfluenten Zellrasen nach Stimulation der Kultur mit Bakterien und bakteriellen Zellwandbestandteilen.

Exemplarisch für gramnegative Keime wurden Stimulationen der RHE-Zellkultur mit LPS als deren pathogener Zellwandkomponente durchgeführt. Für den Bereich der grampositiven Bakterien dienten den Stimulationen zwei verschiedene *Str. pneumoniae*-Stämme, von denen der eine bekapselt war (Stamm 3.B) und der andere unbekapselt (Stamm R6X).

Die Vermittlung konzentrationsabhängiger zytotoxischer Effekte von LPS auf RHE-Zellen wurden in Kapitel 3.3.3 beschrieben. Die Notwendigkeit von löslichem CD14 für die LPS Wirkung führte zur Veranlassung, daß alle Stimulationen mit LPS unter serumhaltigen Bedingungen durchgeführt wurden.

Eine **24-stündige LPS-Stimulation** einer RHE-Kultur wurde am fünften Tag nach Einsaat mit dekadisch logarithmisch verdünnten LPS-Konzentrationen zwischen 100 µg / ml M199 (20% NCS) und 1 pg / ml M199 (20% NCS) durchgeführt. (LPS von *E. coli* O55:B5, Difco, Nr. 3120-25-0). Die ZO-1-ELISA- und Gesamtproteinmessung fand anschließend (am 6.Tag nach Einsaat) statt.

In *Abb. 12* ist ein konzentrationsabhängiger Effekt von LPS auf die ZO-1-Menge in der RHE-Zellkultur deutlich zu sehen. Je höher die LPS-Menge während der 24 h Stimulation war, desto stärker wurde die ZO-1-Menge in dieser Zeit in den RHE-Zellen reduziert. Beachtenswert ist, daß nach 24 h LPS Wirkung der Gesamtproteingehalt der Zellen in konzentrationsabhängiger Weise reduziert war. Da zytotoxische Effekte von LPS auf die RHE-Zellen anzu-

nehmen sind (beschrieben von Patrick *et al.* 1992, s. Kapitel 3.3.3), läßt sich der Proteinverlust möglicherweise auf Adhärenzverluste der Zellen in der Kultur zurückführen.

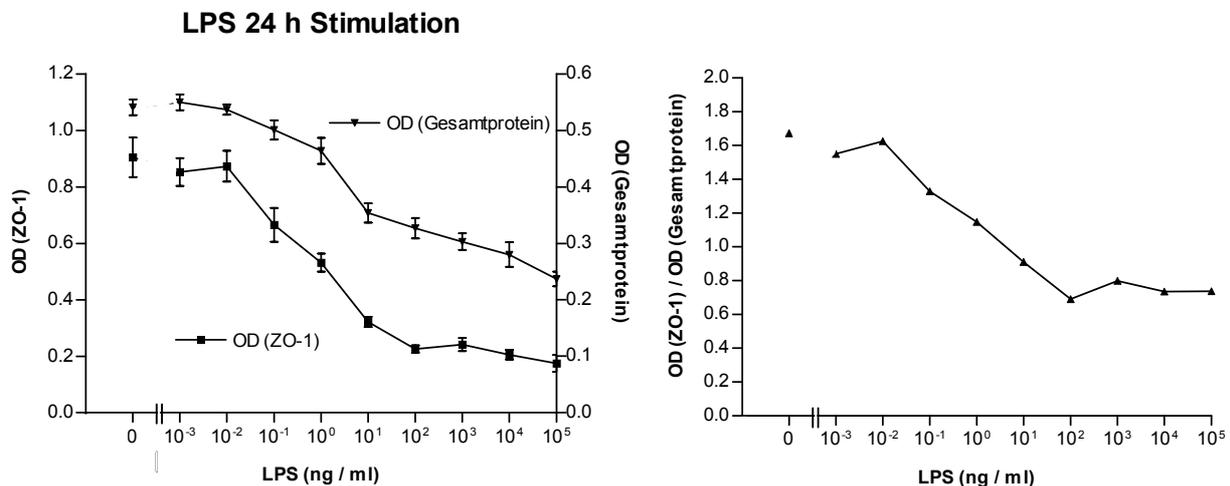


Abb. 12: Wirkung von LPS auf die ZO-1-Menge in RHEZ

24 h-Stimulationen mit *Str. pneumoniae* wurden ebenfalls unter serumhaltigen Bedingungen durchgeführt (ohne Abb.). Die Keime wurden in Todd Hewitt-Medium mit 0,5% Hefe gezüchtet (übernacht bei 37 °C, CO₂ 9%), nach Überimpfung (1: 50) bei einer OD von 0,6 – 0,7 in PBS bei RT gewaschen. Danach wurden die Keime für 20 min bei 60 °C in 0,5 ml PBS hitzeinaktiviert. Bei einer Wellenlänge von 600 nm wurde die OD der 1: 10 in PBS verdünnten Keimsuspension gemessen und anhand einer Eichkurve die Keimkonzentration ermittelt.

Vor der Beimpfung der RHE-Zellkulturen wurden die Pneumokokken im Zehnerlogarithmus in M199 (20% NCS) zwischen 10⁰ und 10⁹ Keimen / ml verdünnt.

Unabhängig von der Keimkonzentration ließ sich nach 24 h weder beim **bekapselten Stamm 3.B** noch beim **unbekapselten Stamm R6X** eine Wirkung auf die ZO-1-Menge der RHE-Zellen erkennen.

5.3 Diskussion

Das Ziel des experimentellen Teils dieser Arbeit war es, das ZO-1-Protein unter verschiedenen experimentellen Bedingungen in einer Primärkultur boviner Hirnendothelzellen darzustellen.

ZO-1-Nachweis in der RHE-Zelle.

Der qualitativen Darstellung von ZO-1 dienten folgende Methoden: Die Proteinfraction der RHEZ wurde durch Harnstoffextraktion gewonnen. Durch Gelelektrophorese wurde die Proteinfraction aufgetrennt und per Westernblot auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Der eigentliche ZO-1-Nachweis gelang schließlich durch Immunoblot der Nitrozellulosemembran. Nach anfänglichen Versuchen, die Proteinfraction der RHEZ durch eine gebräuchliches SDS-Kochverfahren (Sambrook *et al.*) darzustellen, bewährte sich schließlich eine modifizierte Methode der Harnstoffextraktion (Li und Poznansky, 1990), da vor allem im Immunoblot schärfere Banden von ZO-1 in einem nichtdissoziierten Zustand dargestellt werden konnten. Hinweise auf ein optimales Löslichkeitsverhalten von ZO-1 in 6molarem Harnstoff (Anderson *et al.* 1988, s. Kapitel 4.1.2) bestätigen die Eignung der Harnstoffextraktion als Methode der Wahl zur Darstellung von ZO-1 im Immunoblot.

ZO-1 ist in konfluenten RHEZ gürtelförmig in der Zellperipherie lokalisiert und in subkonfluenten Arealen zusätzlich im Bereich des Zellkerns.

Eine Immunfluoreszenzfärbung ermöglichte die Lokalisation von ZO-1 in einer konfluenten RHE-Zellkultur. Eine bandenförmige ZO-1-Färbung im Bereich der Zellperipherie in konfluenten RHEZ-Kulturen paßt gut zu bisher publizierten Daten für andere Zelltypen: Kontakt der Zellen untereinander und normale extrazelluläre Kalziumspiegel waren eine Voraussetzung für die ZO-1-Lokalisation an der Zellmembran in Caco-2-Zellen (Anderson *et al.* 1989) und MDCK-Zellen (Siliciano und Goodenough 1988). In bovinen aortalen Endothelzellen war die ZO-1-Immunfluoreszenz nur dort in der Zellperipherie positiv, wo Kontakt zwischen

Nachbarzellen bestand (Li und Posnanzky 1990)⁹. Die Lokalisation von ZO-1 im Zellkern vor der Zellkontaktbildung wurde bisher einmalig für verschiedene Epithelzellen beschrieben (Gottardi *et al.* 1996).

Der Nachweis von ZO-1 im Bereich des Zellkerns in subkonfluenten Zellgebieten der RHEZ-Kultur ist somit die erste Beschreibung von ZO-1 im Zellkernbereich für Endothelzellen. Die simultane Lokalisation von ZO-1 im Bereich des Zellkerns und der Zellperipherie verleitet zur Annahme, daß es sich hierbei um die Erfassung des Zeitpunktes der ZO-1-Umverteilung vom Zellkern zur Zellperipherie während des Erreichens der Konfluenz des Zellrasens handelt. Dieser Befund wirft einige Fragen auf:

Spielt ZO-1 eine aktive Rolle als intrazellulärer Botenstoff bei der Vermittlung von Informationen zwischen Zellkern und Zellperipherie während der Entstehung von TJ? Oder vermittelt ZO-1 auch Informationen von der Zellperipherie zum Zellkern, die zu TJ-Öffnung und Zellkontaktverlust führen? Die Rolle von ZO-1 in der Zellperipherie als TJ-Strukturprotein ist unumstritten. Welche Funktion aber hat ZO-1 im Zellkern? Beeinflußt es durch seine Präsenz nukleäre Prozesse der Proteinsynthese oder die Mitoserate der Zelle, die im Zusammenhang mit Proliferations- und Differenzierungsvorgängen stehen? Die Proliferation von Endothelzellen wird durch Zellkontakt gehemmt. Ist ZO-1 an der Kontaktinhibition beteiligt? Die Umverteilungsvorgänge von ZO-1 zwischen Zellperipherie und Zellkern / Zytoplasma legen nahe, daß das Protein selbst Signaltransduktionsfunktionen einnimmt, die über seine bekannte Rolle als TJ-Strukturprotein weit hinausgehen. Weitergehende Untersuchungen sind zur Klärung dieser Fragen notwendig.

ZO-1-Gehalt der RHEZ im Verlauf der Monolayer-Bildung. Eine Zeitkinetik.

ZO-1-Gehaltmessungen der RHEZ-Kultur wurden durch einen ZO-1-ELISA und eine Gesamtproteingehaltbestimmung der Zellkultur (nach Bradford) realisiert. Der Gesamtproteingehalt der Zellkultur diente dabei als Bezugsgröße für den ZO-1-Wert, stellvertretend für die Zellzahl.

Bei Betrachtung der Ergebnisse vor dem Hintergrund der bisher in der Literatur veröffentlicht-

⁹ Umverteilungen von ZO-1 zwischen Zellmembran und Zytoplasma bei der experimentellen TJ-Regulation wurden in den Kapiteln 3.1, 4.1.1 und 4.2.2 ausführlich besprochen. Deren Diskussion an dieser Stelle würde den Rahmen der Arbeit sprengen.

ten Daten läßt sich folgendes feststellen:

Der in der vorliegenden Untersuchung festgestellte Verlust der ZO-1-Menge während der Entwicklung des konfluenten RHE-Zellrasens ist in sofern interessant, als daß für RHEZ-Monokulturen nach der Einsaat sowohl ein schneller kurzfristiger Verlust der TJ-Komplexität (TJ-Fibrillenverzweigungen), als auch eine längerfristiger Verlust von TJ-Partikeln an der zytoplasmatischen Membran beschrieben wurde (Wolburg *et al.* 1994, s. Kapitel 3.3.2). Eine Steigerung der TJ-Dichte wurde in der Studie von Wolburg durch astrozytenkonditioniertes Medium bewirkt. Veränderungen des ZO-1-Proteingehalts in RHE-Zellen wurden dort allerdings nicht untersucht. Eine andere Studie berichtete für bovine retinale Kapillarendothelzellen eine durch astrozytenkonditioniertes Medium bedingte Steigerung der zellulären ZO-1-Menge (Gardner *et al.* 1995, s. Kapitel 4.2.1). In der vorliegenden Untersuchung bewirkt nun astrozytenkonditioniertes Medium eine leichte, aber konstante Erhöhung des ZO-1-Gehalts in RHE-Zellen. Ein Befund, der gut im Einklang mit den beiden erwähnten Studien steht¹⁰.

Die Tatsache, daß es in dieser Untersuchung ab dem siebten Tag nach Einsaat der Zellen wieder zu einem Anstieg der ZO-1-Menge in der Kultur kam, paßt gut zu einem Befund, der in Caco-2-Zellkulturen erhoben wurde (Anderson *et al.* 1989, s. Kapitel 4.2.1): Dort wurde im Verlauf von drei Wochen nach der Ausbildung von Zellkontakten ein Anstieg der ZO-1-Menge in der Kultur festgestellt. Da in der vorliegenden Untersuchung aus methodischen Gründen (s. Kapitel 5.2.3) ab etwa dem zehnten Tag nach Zelleinsaat keine ZO-1-Gehaltmessungen der RHE-Kultur mehr vorgenommen werden konnten, läßt sich der leichte Anstieg der ZO-1-Menge zwei Tage nach beginnender Konfluenz der Zellkultur als Auftakt zu einem möglicherweise längerdauernden Prozeß von TJ-Veränderungen in der Zellkultur interpretieren, an denen ZO-1 in quantitativer Weise beteiligt ist.

Hinweise, die eine Erklärung der quantitativen Veränderungen des ZO-1-Gehalts der RHEZ im Verlauf der Zellkultur geben könnten, liefert auch das im folgenden diskutierte Experiment zur Variation der Zellzahl bei der Einsaat.

¹⁰ Die Bedeutung von Astrozyten für BHS-Charakteristika der Endothelzellen wird in den Kapiteln 3.3.1 und 3.3.2 ausführlich dargestellt.

Varierte Zelldichten bei Einsaat der RHEZ. Effekte auf den ZO-1-Gehalt.

Wenn man bedenkt, daß die Zellen in den Kulturen mit hoher Zelldichte (hohe Zellzahl bei Einsaat) früher Kontakt miteinander hatten als in den Kulturen mit niedriger Zelldichte, so erklärt das, daß die Proliferationsneigung dieser Zellen verringert ist und in weniger Zellen neue mitotische Wachstumszyklen stattfinden, um die Konfluenz des Zellrasens zu erreichen. Jede neue Generation von Endothelzellen in der Zellkultur, der die *in vivo* Bedingungen der BHS fehlen, ist daher auch um so weniger in der Lage BHS-spezifische Eigenschaften auszubilden. Somit nimmt wohl auch die TJ-Dichte und damit auch der ZO-1-Gehalt der Zellen um so stärker ab, je mehr Proliferationszyklen die einzelne Zelle durchmacht. Wenn kein Zellkontakt zwischen den Zellen besteht, kommt es auch nicht zu einer kontaktinduzierten Proliferationshemmung der Zellen. Positiv formuliert bleibt einer Hirnendothelzelle um so mehr ihrer BHS-spezifischen Eigenschaften erhalten, desto weniger sich neue Tochterzellen durch Proliferation außerhalb des physiologischen Umfeldes (mit Astrozyten etc.) bilden. Deshalb ist wahrscheinlich auch die ZO-1-Menge in den Zellkulturen um so größer, je höher deren Zellzahl bei Einsaat war. In diesem Sinne ist wohl auch der Verlust der ZO-1-Menge der RHEZ-Kultur vor dem Erreichen der Konfluenz im Zeitkinetikversuch zu erklären. Die Tatsache, daß die ZO-1-Menge am sechsten Tag nach der Einsaat von $1,0 \cdot 10^6$ Zellen nicht oberhalb der ZO-1-Menge bei Einsaat von $5,0 \cdot 10^5$ lag, könnte auf die ungünstigen Kulturbedingungen bei zu hohen Zellzahlen zurückzuführen sein.

Die Zellproliferation, die mit dem Verlust von ZO-1 einhergeht, ist eine Möglichkeit, die oben dargestellten Phänomene zu erklären. Ein anderer Parameter, der die ZO-1-Menge beeinflussen könnte, ist der Zellkontakt der RHEZ untereinander.

Im Versuch zur Titration der Zellzahl waren die Kulturen mit höheren Zellzahlen bei der Einsaat aufgrund ihrer erhöhten Zelldichten früher konfluent. Je mehr Zellen zu Beginn in die Kultur eingesät wurden, desto länger bestand zum Zeitpunkt der ZO-1-Messung Zellkontakt untereinander. Im Einklang mit dem eigenen Befund zur Zeitkinetik, bei dem der ZO-1-Gehalt erst nach dem Erreichen der Konfluenz ansteigt, könnte auch hier der höhere ZO-1-Gehalt der RHEZ durch das längere Bestehen der *monolayer* erklärt werden. Auch eine ältere Untersuchung konnte für bovine aortale Endothelzellen eine Korrelation der ZO-1-Menge mit dem Grad der Konfluenz des Zellrasens durch *Immunoblotting* nachgewiesen werden (Li und

Poznansky 1990, s. Kapitel 4.1.1).

Der hohe ZO-1-Gehalt in Zellkulturen, die mit hoher Zelldichte eingesät wurden, läßt sich somit durch zwei Effekte erklären:

Zum ersten war durch frühzeitige Kontaktinhibition der Zellproliferation die Mitoserate und der Generationenwechsel der Zellen reduziert. Der ZO-1-Verlust, wie er im Zeitkinetikversuch während der Proliferation vor dem Erreichen der Konfluenz dokumentiert ist, bleibt niedriger als in Zellpopulationen, die mit niedriger Zellzahl eingesät wurden.

Zum zweiten bestand in den Zellpopulationen, die mit hoher Dichte eingesät wurden, seit längerer Zeit ein konfluenter Zellrasen. Auch im Zeitkinetikversuch stieg erst seit bestehender Konfluenz der ZO-1-Gehalt an. Man kann daher für RHEZ postulieren, daß die Dauer seit dem Bestehen der Konfluenz mit erhöhten ZO-1-Mengen einhergeht.

Lipopolysaccharid reduziert konzentrationsabhängig den ZO-1-Gehalt konfluenter RHE-Zellkulturen.

Nach 24-stündiger Einwirkzeit auf einen konfluenten RHE-Zellrasen bewirkte LPS eine konzentrationsabhängige Reduktion des ZO-1-Gehalts in der Zellkultur. Da LPS das pathogen wirksame Agens gramnegativer Keime ist, die Ursache bakterieller Meningitiden sein können, die wiederum mit Blut-Hirn-Schranken-Störungen verbunden sind, ist die quantitative Wirkung auf den ZO-1-Gehalt von Endothelzellen bemerkenswert. Eine Öffnung von *tight junctions*, die mit einer Reduzierung der ZO-1-Menge einhergeht ist denkbar, wurde mit dem Versuchsaufbau jedoch nicht erfaßt. Da zytotoxische Effekte von LPS auf Endothelzellen anzunehmen sind (Patrick *et al.* 1992, s. Kapitel 3.3.3), kommt es in jedem Fall zu Störungen der BHS-Funktion. Nicht untersucht wurden Wirkungen von LPS auf die Lokalisation von ZO-1 in den RHEZ. Eine interessantes Thema für weitergehende Untersuchungen wären daher die Wirkungen von LPS auf die TJ-Integrität und auf Umverteilungsvorgänge von ZO-1.

Da LPS neben zytotoxischen Effekten auch eine Freisetzung des Zytokins IL-6 in Endothelzellen induziert (Arditi *et al.* 1993, s. Kapitel 3.3.3), sind zwei weitere Befunde aus der Literatur in diesem Zusammenhang interessant: Zu ZO-1-Umverteilungen und TER-Verlusten kommt es durch Stimulationen mit den Zytokinen IFN- γ und TNF- α in humanen Kapillaren-

dothelien der Vorhaut (Blum *et al.* 1997, s. Kapitel 3.3.3). Eine Stimulation intestinaler Epithelzellen (T84) mit IFN- γ führte auch zu TER-Verlusten und bewirkte Verluste der ZO-1-Menge (Youakim und Ahdieh 1999, s. Kapitel 3.3.3).

Da *Str. pneumoniae* weder als bekapselter noch als unbekapselter Stamm eine Wirkung auf den ZO-1-Gehalt in RHEZ *in vitro* hatte, BHS-Störungen bei *Str. pneumoniae*-Meningitiden aber auftreten (s. Kapitel 2.1.3), wären auch hier weiterführende Untersuchungen wünschenswert, um Effekte grampositiver Erreger auf die TJ-Integration und ZO-1-Umverteilungen in RHEZ zu erforschen.

5.4 Schlußfolgerung

Die Ergebnisse des experimentellen Teils dieser Arbeit erlauben folgende Feststellungen zum ZO-1-Protein in der RHEZ-Kultur:

- Das ZO-1-Protein läßt sich durch Immunfluoreszenz einer konfluenten RHEZ-Kultur im Bereich der Zellperipherie der einzelnen Endothelzelle nachweisen.
- In subkonfluenten Arealen ist zusätzlich eine deutliche Lokalisation von ZO-1 im Bereich der Zellkerne erkennbar.

⇒ Daher kommt es während des Wachstums einer RHEZ-Kultur zum Zeitpunkt der Konfluenz wahrscheinlich zu Umverteilungsvorgängen von ZO-1 aus dem Bereich des Zellkerns in die Zellperipherie. Welche Funktion ZO-1 im Bereich des Zellkerns hat, bleibt allerdings weiterhin unklar und bedarf weitergehender Untersuchungen.

- Bei der Entwicklung eines konfluenten RHE-Zellrasens kommt es unter Kulturbedingungen während der Zellproliferation zu einem deutlichen Verlust der RHEZ an ZO-1.
- Dieser ZO-1-Verlust läßt sich durch astrozytenkonditioniertes Medium oder durch Einsaat höherer Zellmengen begrenzen.

⇒ Diese Befunde begründen die Annahme, daß sowohl das fehlende BHS-Milieu der *in-vivo*-Bedingungen als auch Effekte der Zellproliferation den ZO-1-Verlust bedingen.

- Ab Erreichen der Konfluenz steigt der ZO-1-Gehalt der RHEZ in der Kultur wieder an.

⇒ Da ZO-1 ein Strukturprotein der *tight junction* ist und eine TJ-Differenzierung erst nach Ausbildung der Zellkontakte zu erwarten ist, kann man annehmen, daß ZO-1 sowohl durch seine quantitative Zunahme in der RHEZ-Kultur als auch durch die Umverteilung zur Zellperipherie an der TJ-Bildung der RHEZ *in vitro* beteiligt ist.

- Der LPS induzierte Verlust der ZO-1-Menge in der konfluenten RHEZ-Kultur ist konzentrationsabhängig.
- *Str. pneumoniae* hatte weder als bekapselte noch als unbekapselte Form einen Effekt auf die ZO-1-Menge in der konfluenten RHEZ-Kultur.

⇒ Da diese Befunde zu den Stimulationen keine ausreichenden Informationen zur Interpretation der Mechanismen der BHS- und TJ-Störung und der Beteiligung von ZO-1 an diesen Vorgängen darstellen, bilden sie eher eine Grundlage, die als Anregung zu weitergehenden Untersuchungen dienen könnte.

6 Zusammenfassung

Die *tight junctions* (TJ) der Hirnkapillaren sind das anatomische Korrelat der Blut-Hirn-Schranke (BHS). Das ZO-1-Protein ist die älteste beschriebene Struktur der TJ. Bei entzündlichen Prozessen wie bakteriellen Meningitiden kommt es zur Störung der BHS-Integrität, die mit der Öffnung von TJs einhergeht.

In dieser Arbeit wurde im Rahmen einer ausführlichen Literaturrecherche unter Berücksichtigung neuester Erkenntnisse zunächst der anatomische Aufbau der TJ dargestellt. Daraufhin wurden prinzipielle Regulationsmöglichkeiten der TJ-Öffnung und -Schließung erörtert. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf zwei unterschiedliche *in-vitro*-Modelle, der Ca^{2+} -switch und das ATP-Entzug-Modell, gerichtet. Mögliche Signaltransduktionsvorgänge bei der TJ-Regulation fanden im Anschluß Erwähnung. Um auf die besonderen Verhältnisse der TJ im Bereich der BHS einzugehen, wurden spezielle Aspekte dort hervorgehoben.

Das *tight junction* Protein ZO-1 stand im Mittelpunkt dieser Arbeit. Deshalb wurde ihm ein besonderes Kapitel gewidmet, um die Frage nach der Beteiligung von ZO-1 an der TJ-Regulation zu beantworten. Gezielt wurden dabei spezielle Aspekte herausgearbeitet, um zu erfahren, was mit ZO-1 bei Vorgängen der TJ-Regulation geschieht. Verschiedene Möglichkeiten der Beteiligung von ZO-1 an diesen Vorgängen wurden gesondert betrachtet. Besondere Beachtung fand dabei die Darstellung von Änderungen des ZO-1-Proteingehalts der Endothelzellen (bzw. Epithelzellen), von Möglichkeiten der Änderung der intrazellulären Lokalisation von ZO-1 (Umverteilungsvorgänge) und von sterischen Konformationsänderungen von ZO-1, wobei es hier in erster Linie um Phosphorylierungsmechanismen geht.

Eigene Experimente an einem Rinderhirnendothel (RHE) -Modell dienen der Darstellung von ZO-1 unter verschiedenen Bedingungen in der Zellkultur.

Zunächst wurde ZO-1 im Western- und Immunoblot qualitativ in den RHE-Zellen dargestellt. Durch Immunfluoreszenzfärbungen konnte die zelluläre Lokalisation von ZO-1 sichtbar gemacht werden. In einer konfluenten Zellkultur war ZO-1 in der Zellperipherie in scharf konturierten Banden darzustellen. Als besonderer Befund ist die Lokalisation von ZO-1 im Bereich der Zellkerne in subkonfluenten Arealen in der RHE-Kultur hervorzuheben. Dies ist bisher

nur für bestimmte Epithelzelllinien unter zellkontaktfreien Bedingungen beschrieben worden. Im Verlauf der Ausbildung konfluenter RHE-Zellrasen wurde der ZO-1-Gehalt der RHE-Zellen in Form einer Zeitkinetik bestimmt. Während der Proliferation und Ausdifferenzierung der Zellen kam es zunächst zu einem Verlust von ZO-1 in den RHE-Zellen. Erst nach Erreichen der Konfluenz, wo die Gegenwart von TJ postuliert werden kann, stieg der ZO-1-Gehalt wieder an. Insgesamt war die ZO-1-Menge in einer Kultur mit astrozytenkonditioniertem Medium im Vergleich zur astrozytenmediumfreien Kultur leicht erhöht.

In einem anderen Versuch wurde die Zellzahl bei der Einsaat der RHE-Zellen in die Kultur variiert. Je nach eingesäter Zellmenge wurde die Kultur zu unterschiedlichen Zeitpunkten konfluent (bei hohen Zellzahlen früher als bei niedrigen). Der ZO-1-Gehalt wurde in allen Kulturen zum gleichen Zeitpunkt nach sechs Tagen gemessen. Dabei zeigte sich, daß in Kulturen, in denen hohe Zellzahlen eingesät wurden und die Konfluenz früher erreicht wurde, die ZO-1-Menge pro Zelle höher lag als in den Kulturen mit niedrigeren Zellzahlen bei der Einsaat. Diese Feststellung steht gut im Einklang mit dem oben genannten Befund zur Zeitkinetik des ZO-1-Gehalts im Verlauf der *monolayer*-Bildung. Es ist anzunehmen, daß die RHE-Zellen, die vor der Präparation der Zellen für die Zellkultur unter den *in vivo* BHS-Bedingungen lebten, noch stärker ausgeprägte spezifische BHS-Endothelzellcharakteristika aufwiesen als die Zellen der Zellkultur, denen das spezifische Milieu der BHS fehlte. Dies betrifft auch den Gehalt der RHE-Zellen an TJ-Protein ZO-1. Während der Proliferation der RHE-Zellen *in vivo* verloren die Zellen an ZO-1-Gehalt. Da die Zellen bis zum Erreichen der Konfluenz bei der Einsaat hoher Zellzahlen wegen der hohen Zelldichte weniger proliferieren mußten, war hier der ZO-1-Verlust entsprechend geringer. Die TJ-Bildung nach Ausbildung von Zellkontakten ging dagegen wieder mit einem leichten Anstieg der ZO-1-Menge einher.

Bakterien sind im Bereich des Hirnendothels während einer bakteriellen Meningitis gegenwärtig. Um deren Wirkung auf den ZO-1-Gehalt der RHE-Zellen zu ermitteln, sind Stimulationsversuche mit einem bekapselten und einem unbekapselten Stamm von *St. Pneumoniae* sowie mit LPS als pathogener Komponente der Zellwand gramnegativer Keime durchgeführt worden. Nur LPS führte in konzentrationsabhängiger Weise zur Verminderung von ZO-1 in der RHE-Zellkultur.

7 Tabellen

Ca²⁺-switch-Modell:

Prinzip des Ca²⁺-switches; Wirkung von Substanzen auf die Tight junction

TJ-Regulation	TER	Zellkontakt	Umverteilung v. ZO-1 ins Zytoplasma (ZP) bzw. zur Zellmembran (ZM)	Zytoskelettveränderungen	Triton X-100 Löslichkeit v. ZO-1	Phosphatgehalt von ZO-1	Bemerkungen	Referenzen
Prinzip des Ca ²⁺ -switches bei Veränderung der extrazell. Ca ²⁺ -Konzentration:								
Extrazell. Ca²⁺ ↓ (< 5 µM)	↓	-	ZM → ZP	+	↑	↔ später ↓ (Howarth et al. 1994)	Vermittlung über E-Cadherin; Beteiligung von intrazell. Ca ²⁺ -Speichern, PKC, G-Proteinen	Cereijido et al. 1978; Siliciano und Goodenough 1988;
Extrazell. Ca²⁺ ↑ (1,8 mM)	↑	+	ZP → ZM (nur bei bestehendem Zellkontakt: Balda et al. 1993)	+	↓	Nach 2h ↑ (Stuart et al. 1995) ↔ (Balda et al. 1993)		Stuart und Nigam 1995
Effekte von Substanzen bei niedrig gehaltenen extrazell. Ca ²⁺ -Konzentrationen Ca ²⁺ (< 5 µM):								
DiC8 (PKC-Agonist)	↔		ZP → ZM (nur bei bestehendem Zellkontakt)	+		↔	E-Cadherin-Umverteilung unbeeinflusst	Balda et al. 1993
Effekte von Substanzen bei hoch gehaltenen extrazell. Ca ²⁺ -Konzentrationen Ca ²⁺ (1,8 mM):								
C3 (ADP-Ribosyltransferase, spezif. Rho-Inhibitor)			ZO-1(ZM) ↓	+	(Aktinlösung)		Schnelles Verschwinden von ERM, Vinculin	Kotani et al. 1997
Effekte von Substanzen während des Ca ²⁺ -switches von niedrigen zu hohen Ca ²⁺ -Konzentrationen: (Ca ²⁺ ↓) → (Ca ²⁺ ↑)								
DiC8 (PKC-Agonist)	↑↑			+				Balda et al. 1993
H-7 (unspezifischer PKC-Inhibitor)	↔		↔ (verhindert)	-	(verhindert)		E-Cadherin- und Desmoplakin-Umverteilung unbeeinflusst	Denisenko et al. 1994
Calphostin C (spezifischer PKC-Inhibitor).	↔		(ZP → ZM) stark verzögert	+	(unbeeinflusst)	↓ (unbeeinflusst)	- (gehemmt) ZO-1 als Zielprotein der PKC identifiziert	Stuart et al. 1995

TJ-Regulation	TER	Zellkontakt	Umverteilung v. ZO-1 ins Zytoplasma (ZP) bzw. zur Zellmembran	Zytoskelettveränderungen	Triton X-100 Löslichkeit v. ZO-1	Phosphatgehalt von ZO-1	Bemerkungen	Referenzen
C3 (spezifischer Rho-Inhibitor)			↔ (gehemmt) Rho notwendig für PKC-vermittelte ZO-1-Umverteilung zur ZM				E-Cadherin-Umverteilung auch gehemmt;	Takaishi et al. 1997
HGF (Hepatocyte growth factor)			↔ (gehemmt)				Gesteigerte Tyrosinphosphorylierung von β -Catenin	Grisendi et al. 1998
Vanadat (Tyrosinphosphataseinhibitor)								

ATP-Entzug-Modell: Prinzip des ATP-Entzugs; Wirkung von Substanzen auf die Tight junction

TJ-Regulation	TER	Zellkontakt	Umverteilung v. ZO-1 ins Zytoplasma (ZP) bzw. zur Zellmembran (ZM)	Zytoskelettveränderungen	Triton X-100 Löslichkeit v. ZO-1	Phosphatgehalt von ZO-1	Bemerkungen	Referenzen	
Prinzip des ATP-Entzug-Modells bei Veränderungen der intrazellulären ATP-Konzentrationen:									
Intrazell. ATP ↓ (alle Effekte bis zu 3 h reversibel)	↓	+	ZO-1: ↔ (ZM) Aber Occludin: ZM → ZP	+	(nach 3 h)	↓ (Gopalkrishnan et al. 1998)	Bildung großer makromolekularer TJ-Proteinkomplexe, die mit Fodrin assoziieren	Tsukamoto und Nigam 1997, 1999	
Intrazell. ATP ↑ (innerhalb von 3 h nach ATP-Entzug)	↑	+	ZO-1: ↔ (ZM) Aber Occludin: ZP → ZM	+	↑↑	↑ (Gopalkrishnan et al. 1998)	Rückbildung der großen makromolekularen TJ-Proteinkomplexe Tyrosinphosphorylierung (ZO-2, ZO-3, Occludin) ↑, aber nicht von ZO-1!	Tsukamoto und Nigam 1997, 1999	
Effekte von Substanzen während des Anhebens der intrazellulären ATP-Konzentrationen: (ATP↓) → (ATP↑)									
Genistein (spezifischer Tyrosinkinaseinhibitor)	↔	+	ZO-1: ↔ (ZM) Occludin: ↔ (ZP)	+	(nach 3 h)	↔	Hemmung der Tyrosinphosphorylierung v. ZO-2, ZO-3 und Occludin	Bildung großer makromolekularer TJ-Proteinkomplexe unbeeinflusst	Tsukamoto und Nigam 1999

Was geschieht mit ZO-1?**Wirkung verschiedener Substanzen auf die Tight junction**

TJ-Regulation	TER	ZO-1-Protein- gehalt	ZO-1- Umverteilung ins Zytoplasma (ZP) bzw. zur Zellmembran	ZO-1- Phosphatgehalt	Zytoskelett veränderungen	Triton X-100- Löslichk. v. ZO-1	Bemerkungen	Referenzen
Substanzen, die zu Veränderungen des ZO-1-Proteingehalts und der ZO-1-Lokalisation führen:								
Dexametha- son (Glukokortikoid)	↑	↑		↔			31EG4-Mammaepithel- zellen (Maus)	Singer et al. 1994
Ocadainsäure (Serin/Threonin Proteinphos- phataseinhibi- tor)	↓	↓	+	↔			dexamethasonvor- behandelte 31EG4-Zellen	
Ca²⁺ ↓(↑) und Zellkontkt. ↓(↑)		↓ (↑)					Caco-2-Zellen. 3 Wochen nach Anheben des Ca ²⁺ -Spiegels stieg der ZO-1-Gehalt auf das 5- 8fache an.	Anderson et al. 1989
a) Zellkontakt ↓ b) Konfluenz ↑			a) ZO-1 im Zellkern(ZK) b) (ZK)→(ZM)				MDCK-, CV-1-, LLC-PK1- Zellen, Studie zu Wundheilung und Monolayerreifung	Gottardi et al. 1996
Histamin (Wir- kung konzentrationsabhän- gig, reversibel)		↓					Bovines retinales Kapillar- endothel. Effekt war durch H ₁ - und H ₂ -Rezeptorblockade zu antagonisieren	Gardner et al. 1995 / 1996
Astrozyten- konditionier- tes Medium	↑	↑					Bovines retinales Kapillar- endothel	
Interferon γ	↓	↓			+		Intestinale T84-Zellen	Youakim und Ahdieh 1999
TGF-β	(-)	↔	(ZM)→(ZP) Effekt nicht nach 48 h Dexamethason- präinkubation!				31EG4-Zellen mit / ohne 24 h dexamethasonvorbe- handlung; TGF-β hemmt den dexamethasonindu- zierten TER-Anstieg	Woo et al. 1996
FCCP (Ent- koppler der oxidativen Phosphorylie- rung)	↓		(ZM)→(ZP)				MDCK-Zellen; TER-Verlust innerhalb 20 sec.; pH-Abfall ATP-Niveau ↔ Alle Effekte reversibel	Li und Poz- nansky 1990
HGF (Hepato- zyten Wachs- tumsfaktor)			(ZM)→(ZP)				MDCK-Zellen	Grisendi et al. 1998

TJ-Regulation	TER	ZO-1-Proteingehalt	ZO-1-Umverteilung ins Zytoplasma (ZP) bzw. zur Zellmembran (ZM)	ZO-1- Phosphatgehalt	Zytoskelett- veränderungen	Triton X-100- Löslichkeit v. ZO-1	Bemerkungen	Referenzen
Substanzen, die zu Veränderungen des ZO-1-Phosphorylierungszustandes führen:								
Phenylarsen-oxid (Tyrosinphosphataseinhibitor)	↓			↑ (Tyr)			MDCK-, Rinderhirn-endothelzellen; In MDCK nachgewiesen: Tyrosinphosphorylierungen von ZO-1 und β-Catenin	Staddon et al. 1995
EGF (epidermaler Wachstumsfaktor)			(ZM)→(ZP)	↑ (Tyr)	+		A431-Zellen	Van Itallie et al. 1995
Vandetanib / H₂O₂ (Tyrosinphosphataseinhibitoren)	↓		(ZM)→(ZP) (auch E-Cadherinumverteil.)	↑ (Tyr) ZO-1: ?	+		MDCK-II-Zellen; Hemmung der Effekte durch Tyrphostin 25 (Tyrosinkinaseinhibitor)	Collarezi-Buzato et al. 1998

Andere Hinweise zu ZO-1-Umverteilungen, -Proteinmengen und -Phosphorylierungen sind den beiden vorangehenden Tabellen zu entnehmen.

Legende zu den Tabellen

- ↑ steigt
- ↓ sinkt
- ↔ unverändert
- + ja
- nein
- ? unklar

8 Literaturverzeichnis

1. **Abbott, NJ; Revest, PA:** Control of brain endothelial permeability. *Cerebrovasc. Brain. Metab. Rev.* 3: 39-72 (1991)
2. **Alberts, B; Bray, D; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Watson, JD:** Molecular biology of the cell. *Garland Publishing, Inc. New York & London.* (1994)
3. **Anderson, JM; Stevenson, BR; Jesaitis, LA; Goodenough, DA; Mooseker, MS:** Characterization of ZO-1, a protein component of the tight junction from mouse liver and Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* 106: 1141-9 (1988)
4. **Anderson, JM; Van Itallie, CM; Peterson, MD; Stevenson, BR; Carew, EA; Mooseker, MS:** ZO-1 mRNA and protein expression during tight junction assembly in Caco-2 cells. *J. Cell Biol.* 109: 1047-56 (1989)
5. **Ando-Akatsuka, Y; Saitou, M; Hirase, T; Kishi, M; Sakakibara, A; et al.:** Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. *J. Cell Biol.* 133: 43-7 (1996)
6. **Arditi, M; Zhou, J; Dorio, R; Rong, GW; Goyert, SM; Kim, KS:** Endotoxin-mediated endothelial cell injury and activation: role of soluble CD14. *Infect. Immunol.* 61: 3149 (1993)
7. **Arditi, M; Zhou, J; Torres, M; Durden, DL; Stins, M; Kim, KS:** Lipopolysaccharide stimulates the tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinases p44, p42, and p41 in vascular endothelial cells in a soluble CD14-dependent manner. *J. Immunol.* 155: 3994-4003 (1995)
8. **Arthur, FE; Shivers, RR; Bowman, PD:** Astrocyte-mediated induction of tight junctions in brain capillary endothelium: an efficient in vitro model. *Brain. Res.* 433: 155-9 (1987)
9. **Balda, MS; Anderson, JM:** Two classes of tight junctions are revealed by ZO-1 isoforms. *Am. J. Physiol.* 264: C918-24 (1993)
10. **Balda, MS; Anderson, JM; Matter, K:** The SH3 domain of the tight junction protein ZO-1 binds to a serine protein kinase that phosphorylates a region C-terminal to this domain. *FEBS. Lett.* 399: 326-32 (1996)
11. **Balda, MS; Gonzalez-Mariscal, L; Contreras, RG; Macias-Silva, M; Torres-Marquez, ME; Garcia Sainz, JA; Cereijido, M:** Assembly and sealing of tight junctions: possible participation of G-proteins, phospholipase C, protein kinase C and calmodulin. *J. Membr. Biol.* 122: 193-202 (1991)

12. **Balda, MS; Gonzalez-Mariscal, L; Matter, K; Cereijido, M; Anderson, JM:** Assembly of the tight junction: the role of diacylglycerol. *J. Cell Biol.* 123: 293-302 (1993)
13. **Balda, MS; Whitney, JA; Flores, C; Gonzalez, S; Cereijido, M; Matter, K:** Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J. Cell Biol.* 134: 1031-49 (1996)
14. **Barnes, MJ; Scott, DM:** Glycopeptides secreted by the endothelium. Biochemical interactions at the endothelium (Cryer, A. Hrsg.) *Elsevier, Amsterdam.* S. 111-65 (1983)
15. **Beuckmann, C; Hellwig, S; Galla, HJ:** Induction of the blood/brain-barrier-associated enzyme alkaline phosphatase in endothelial cells from cerebral capillaries is mediated via cAMP. *Eur. J. Biochem.* 229: 641-44 (1995)
16. **Blum, MS; Toninelli, E; Anderson, JM; Balda, MS; Zhou, J; O'Donnell, L; Pardi, R; Bender, J:** Cytoskeletal rearrangement mediates human microvascular endothelial tight junction modulation by cytokines. *Am. J. Physiol.* 273: H286-94 (1997)
17. **Bowman, PD; Ennis, SR; Rarey, KE; Betz, AL; Goldstein, GW:** Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: a model for study of blood-brain barrier permeability. *Ann. Neurol.* 14: 396-402 (1983)
18. **Bradbury, MW; Lightman, SL:** The blood-brain interface. *Eye.* 4: 249-54 (1990)
19. **Bradford, MM:** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54 (1976)
20. **Cereijido, M; Robbins, ES; Dolan, WJ; Rotunno, CA; Sabatini, DD:** Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J. Cell Biol.* 77: 853-80 (1978)
21. **Chang, C; Wang, X; Caldwell, AB:** Serum opens tight junctions and reduces ZO-1 protein in retinal epithelial cells. *J. Neurochem.* 69: 859-67 (1997)
22. **Cho, KO; Hunt, CA; Kennedy, MB:** The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the drosophila disc-large tumor suppressor protein. *Neuron.* 9: 929-42 (1992)
23. **Citi, S; Denisenko, N:** Phosphorylation of the tight junction protein cingulin and the effects of protein kinase inhibitors and activators in MDCK epithelial cells. *J. Cell Sci.* 108: 2917-26 (1995)

24. **Citi, S; Sabanay, H; Jakes, R; Geiger, B; Kendrick-Jones, J:** Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. *Nature*. 333: 272-6 (1988)
25. **Citi, S; Volberg, T; Bershadsky, AD; Denisenko, N; Geiger, B:** Cytoskeletal involvement in the modulation of cell-cell junctions by the protein kinase inhibitor H-7.J. *Cell Sci*. 107: 169-78 (1994)
26. **Claudio, L:** Ultrastructural features of the BBB in biopsy tissue from Alzheimer's disease patients. *Acta. Neuropathol.* (Berl.) 91: 6-14 (1996)
27. **Collarez, Buzato, CB; Jepson, MA; Simmons, NL; Hirst, BH:** Increased tyrosine phosphorylation causes redistribution of adherens junction and tight junction proteins and perturbs paracellular barrier function in MDCK epithelia. *Eur. J. Cell Biol.* 76: 85-92 (1998)
28. **Collarez-Buzato, CB; McEwan, GT; Jepson, MA; Simmons, NL; Hirst, BH:** Paracellular and junctional protein distribution depend on basolateral extracellular Ca²⁺ in cultured epithelia. *Biochim. Biophys. Acta.* 1222: 147-58 (1994)
29. **Contreras, RG; Miller, HJ; Zamora, M; Gonzalez-Mariscal, L; Cereijido, MM:** Interaction of calcium with the plasma membrane of epithelial (MDCK) cells during junction formation. *Am. J. Physiol.* 263: C313-8 (1992)
30. **Crone, C; Oleson, SP:** Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain. Res.* 241: 49-55 (1982)
31. **Cserr, HF; Bundgaard, M:** Blood-brain interfaces in vertebrates: a comparative approach. *Am. J. Physiol.* 246: R277-88 (1984)
32. **d'Avella, D; Ciccirello, R; Albiero, F; Mesiti, M; Gagliardi, ME; Russi, E; d'Aquino, A; Tomasello, F; d'Aquino, S:** Quantitative study of blood-brain barrier permeability changes after experimental whole-brain radiation. *Neurosurgery*. 30: 30-4 (1992)
33. **DeBault, LE; Cancilla, PA:** Induction of gamma glutamyltranspeptidase in isolated cerebral endothelial cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 131: 79-88 (1980)
34. **Denisenko, N; Burighel, P; Citi, S:** Different effects of protein kinase inhibitors on the localisation of junctional proteins at cell-cell contact sites. *J. Cell Sci.* 107: 961-81 (1994)
35. **Denker, BM; Saha, C; Khawaja, S; Nigam, SK:** Involvement of a heterotrimeric G protein alpha subunit in tight junction biogenesis. *J. Biol. Chem.* 271: 25750-3 (1996)
36. **Dietrich, WD; Busto, R; Halley, M; Valdes, I:** The importance of brain temperature in alterations of the blood-brain barrier following cerebral ischemia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 49: 486-97 (1990)

37. **Dobrosotskaya, I; Guy, RK; James, GL:** MAGI-1, a membrane associated guanylate kinase with a unique arrangement of protein-protein interaction domains. *J. Biol. Chem.* 272: 31589-97 (1997)
38. **Dodane, V; Kachar, B:** Identification of isoforms of G proteins and PKC that colocalize with tight junctions. *J. Membr. Biol.* 149: 199-209 (1996)
39. **Dorovini, Zis, K; Sato, M; Goping, G; Rapoport, S; Brightman, M:** Ionic lanthanum passage across cerebral endothelium exposed to hyperosmotic arabinose. *Acta. Neuropathol.* Berl. 60: 49-60 (1983)
40. **Duchini, A; Govindarajan, S; Santucci, M; Zampi, G; Hofman, FM:** Effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 on fluid-phase permeability and ammonia diffusion in CNS-derived endothelial cells. *J. Investig. Med.* 44: 474-82 (1996)
41. **Durieu-Trautmann, O; Foignant, N; Strosberg, AD; Couraud, PO:** Coexpression of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors on bovine brain capillary endothelial cells in culture. *J. Neurochem.* 56: 775-81 (1991)
42. **Dux, E; Temesvari, P; Joo, F; Adam, G; Clementi, F; Dux, L; Hideg, J; Hossmann, KA:** The blood-brain barrier in hypoxia: ultrastructural aspects and adenylate cyclase activity of brain capillaries. *Neuroscience.* 12: 951-8 (1984)
43. **Estrada, C; Bready, JV; Berliner, JA; Pardridge, WM; Cancilla, PA:** Astrocyte growth stimulation by a soluble factor produced by cerebral endothelial cells in vitro. *J. Neuropathol. Exp. Neur.* 49: 539-49 (1990)
44. **Fanning, AS; Jameson, BJ; Jesaitis, LA; Anderson, JM:** The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 273: 29745-53 (1998)
45. **Fanning, AS; Lapierre, LA; Brecher, AR; Van Itallie, CM; Anderson, JM:** Protein interactions in the tight junction: the role of MAGUK proteins in regulating tight junction organization and function. *Curr. Topics Membr.* 43: 211-35 (1996)
46. **Farrell, CL; Pardridge, WM:** Blood-brain barrier glucose transporter is asymmetrically distributed on brain capillary endothelial luminal and abluminal membranes: an electron microscopic immunogold study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 5779-83 (1991)
47. **Fujimoto, K:** Freeze fracture replica electron microscopy combined with SDS labeling of integral membrane proteins. Application to the immunogold labeling of intracellular junctional complexes. *J. Cell Sci.* 108: 3443-49 (1995)
48. **Furuse, M; Fujita, K; Hiiragi, T; Fujimoto, K; Tsukita, S:** Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.* 141: 1539-50 (1998a)

49. **Furuse, M; Hirase, T; Itoh, M; Nagafuchi, A; Yonemura, S; Tsukita, S; Tsukita, S:** Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 123: 1777-88 (1993)
50. **Furuse, M; Itoh, M; Hirase, T; Nagafuchi, A; Yonemura, S; Tsukita, S; Tsukita, S:** Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J. Cell Biol.* 127: 1617-26 (1994)
51. **Furuse, M; Sasaki, H; Fujimoto, K; Tsukita, S:** A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J. Cell Biol.* 143: 391-401 (1998b)
52. **Garcia, JG; Davis, HW; Patterson, CE:** Regulation of endothelial cell gap formation and barrier disjunction: role of myosin light chain phosphorylation. *Am. J. Physiol.* 163: 510-2 (1995)
53. **Gardner, TW:** Histamine, ZO-1 and increased blood-retinal barrier permeability in diabetic retinopathy. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 93: 583-621 (1995)
54. **Gardner, TW; Leshner, T; Khin, S; Vu, C; Barber, AJ; Brennan, WA Jr:** Histamine reduces ZO-1 tight-junction protein expression in cultured retinal microvascular endothelial cells. *Biochem. J.* 320 : 717-21 (1996)
55. **Gherzi-Egea, JF; Leininger, Müller, B; Cecchelli, R; Fenstermacher, JD:** Blood-brain interfaces: relevance to cerebral drug metabolism. *Toxicol. Lett.* 82-83: 645-53 (1995)
56. **Goldstein, GW; Betz, AL:** Recent advances in understanding brain capillary function. *Ann. Neurol.* 14: 389-95 (1983)
57. **Gopalakrishnan, S; Raman, N; Atkinson, SJ; Marrs, J:** Rho GTPase signaling regulates tight junction assembly and protects tight junctions during ATP depletion. *Am. J. Physiol.* 275: C798-809 (1998)
58. **Gottardi, CJ; Arpin, M; Fanning, AS; Louvard, D:** The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 10779-84 (1996)
59. **Grégoire, N:** La barriere hémato-encéphalique. *J. Radiol.* 71: 481-7 (1990)
60. **Grisendi, S; Arpin, M; Crepaldi, T:** Effect of hepatocyte growth factor on assembly of zonula occludens-1 protein at the plasma membrane. *J. Cell Physiol.* 176: 465-71 (1998)
61. **Gross, PM; Sposito, NM; Pettersen, SE; Fenstermacher, JD:** Differences in function and structure of the capillary endothelium in gray matter, white matter and a circumventricular organ of rat brain. *Blood. Vessels.* 23: 261-70 (1986)

62. **Gumbiner, B; Lowenkopf, T; Apatira, D:** Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88(8): 3460-4 (1991)
63. **Gumbiner, B; Stevenson, B; Grimaldi, A:** The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *J. Cell Biol.* 107: 1575-87 (1988)
64. **Haskins, J; Gu, L; Wittchen, ES; Hibbard, J; Stevenson, BR:** ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J. Cell Biol.* 141: 199-208 (1998)
65. **Hauw, JJ; Lefauconnier, JM:** La barriere hémato-encéphalique. I. Données morphologiques. *Rev. Neurol. Paris.* 139: 611-24 (1983)
66. **Hoskins, R; Hajinal, A; Harp, S; Kim, SK:** The *C. elegans* vulval induction gene *lin-2* encodes a member of the MAGUK family of cell junction proteins. *Development.* 122:97-111 (1995)
67. **Howarth, AG; Hughes, MR; Stevenson, BR:** Detection of the tight junction-associated protein ZO-1 in astrocytes and other nonepithelial cell types. *Am. J. Physiol.* 262: C461-9 (1992)
68. **Howarth, AG; Singer, KL; Stevenson, BR:** Analysis of the distribution and phosphorylation state of ZO-1 in MDCK and nonepithelial cells. *J. Membr. Biol.* 137: 261-70 (1994)
69. **Huwlyer, J; Drewe, J; Klusemann, C; Fricker, G:** Evidence for P-glycoprotein-modulated penetration of morphine-6-glucuronide into brain capillary endothelium. *Br. J. Pharmacol.* 118: 1879-85 (1996)
70. **Itoh, M; Morita, K; Tsukita, S:** Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. *J. Biol. Chem.* 274: 5981-6 (1999)
71. **Itoh, M; Nagafuchi, A; Yonemura, S; Kitani, Yasuda, T; Tsukita, S; Tsukita, S:** The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. *J. Cell Biol.* 121: 491-502 (1993)
72. **Janzer, RC; Raff, MC:** Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature.* 325: 253-7 (1987)
73. **Jesaitis, LA; Goodenough, DA:** Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *J. Cell Biol.* 124: 949-61 (1994)

74. **Kadurugamuwa, JL; Hengstler, B; Bray, MA; Zak, O:** Inhibition of complement-factor-5a-induced inflammatory reactions by prostaglandin E2 in experimental meningitis. *J. Infect. Dis.* 160: 715-19 (1989)
75. **Kapprell, H; Duden, R; Owaribe, K; Schmelz, M; Franke, WW; et al.:** Subplasmalemmal plaques of intercellular junctions: common and distinguishing proteins. Morphoregulatory molecules. Edelman et al. (Hrsg.) *Wiley & Jones, New York* S. 285-314 (1990)
76. **Keon, BH; Schäfer, S; Kuhn, C; Grund, C; Franke, WW:** Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein. *J. Cell Biol.* 134: 1003-18 (1996)
77. **Kim, E; Cho, KO; Rothschild, A; Sheng, M:** Heteromultimerization and NMDA receptor-clustering activity of chapsyn-110, a member of the PSD-95 family of proteins. *Neuron.* 17: 103-13 (1996)
78. **Kim, E; Naibitt, S; Hsueh, YP; Rao, A; Rothschild, A; Craig, AM; Sheng, M:** GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules. *J. Cell Biol.* 136: 669-78 (1997)
79. **Kim, E; Niethammer, M; Rothschild, A; Jan, YN; Sheng, M:** Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature.* 378: 85-8 (1995)
80. **Kishimoto, A; Nishiyama, K; Nakanishi, H; Uratsuji, Y; Nomura, H; Takeyama, Y; Nishizuka, Y:** Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 260: 12492-9 (1985)
81. **Kistner, U; Garner, CC; Linial, M:** Nucleotide binding by the synapse associated protein SAP90. *FEBS. Lett.* 359: 159-63 (1995)
82. **Kistner, U; Wenzel, BM; Veh, RW; Cases, Langhoff, C, Garner, AM; Appeltauer, U; Voss, B; Gundelfinger, EC; Garner, CC:** SAP90, a rat presynaptic protein related to the product of the drosophila tumor suppressor gene Dlg-A. *J. Biol. Chem.* 268: 4580-83 (1993)
83. **Klinke, R; Silbernagel, S (Hrsg.):** Lehrbuch der Physiologie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart New York.* (1994)
84. **Kornau, HC; Schenker, LT; Kennedy, MB; Seeburg, PH:** Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science.* 269: 1737-40 (1995)

85. **Kotani, H; Takaishi, S; Sasaki, T; Takai, Y:** Rho regulates both association of both the ERM family and vinculin with the plasma membrane in MDCK cells. *Oncogene*. 14: 1705-13 (1997)
86. **Laitinen, L:** Griffonia simplicifolia lectins bind specifically to endothelial cells and some epithelial cells in mouse tissues. *Histochem. J.* 19: 225-34 (1987)
87. **Leduc, EH; Wislocki, GB:** The histochemical localization of acid and alkaline phosphatases, non-specific esterase and succinic dehydrogenase in the structures comprising the hematoencephalic barrier of the rat. *J. Comp. Neurol.* 97: 242-279 (1952)
88. **Li, XS; Poznansky, MJ:** Characterization of the ZO-1 protein in endothelial and other cell lines. *J. Cell Sci.* 97: 231-7 (1990)
89. **Li, XS; Poznansky, MJ:** Effect of FCCP on tight junction permeability and cellular distribution of ZO-1 protein in epithelial (MDCK) cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1030: 297-300 (1990)
90. **Lynch, RD; Tkachuk, Ross, LJ; McCormack, JM; McCarthy, KM; Rogers, RA; Schneeberger, EE:** Basolateral but not apical application of protease results in a rapid rise of transepithelial electrical resistance and formation of aberrant tight junction strands in MDCK cells. *Eur. J. Cell Biol.* 66: 257-67 (1995)
91. **McCarthy, KM; Skare, IB; Stankewich, MC; Furuse, M; Tsukita, S; Rogers, RA; Lynch, RD; Schneeberger, EE:** Occludin is a functional component of the tight junction. *J. Cell Sci.* 109: 2287-98 (1996)
92. **Méresse, S; Dehouk, MP; Delorme, P; Bensaid, M; Tauber, JP; Delbart, C; Fruchart, JC; Cecchelli, R:** Bovine brain endothelial cells express tight junctions and monamine oxidase activity in long-term culture. *J. Neurochem.* 53: 1363-71 (1989)
93. **Meza, I; Ibarra, G; Sabenero, M; Martinez, Palomo, A; Cereijido, M:** Occluding junctions and cytoskeletal components in a cultured transporting epithelium. *J. Cell Biol.* 87: 746-54 (1980)
94. **Minakawa, T; Bready, J; Berliner, J; Fisher, M; Cancilla, PA:** In vitro interaction of astrocytes and pericytes with capillary-like structures of brain microvessel endothelium. *Lab. Invest.* 65: 32-40 (1991)
95. **Nagy, Z; Szabo, M; Huttner, I:** Blood-brain barrier impairment by low pH buffer perfusion via the internal carotid artery in rat. *Acta. Neuropathol. Berl.* 68: 160-3 (1985)
96. **Nigam, SK; Rodriguez, Boulan, E; Silver, RB:** Changes in intracellular calcium during the development of epithelial polarity and junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 6162-66 (1992)
97. **Nusrat, A; Giry, M; Turner, JR; Colgan, SP; Parkos, CA; Carnes, D; Lemichez, E; Boquet, P; Madara, JL:** Rho protein regulates tight junctions and perijunctional

- actin organization in polarized epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 10629-33 (1995)
98. **Orlowski, M; Sessa, G; Green, JP:** Gamma-glutamyl transpeptidase in brain capillaries: possible site of a blood-brain barrier for amino acids. *Science.* 184: 66-68 (1974)
99. **Pardridge, WM:** Advances in cell biology of blood-brain barrier transport. *Semin. Cell. Biol.* 2: 419-26 (1991)
100. **Patrick, D; Betts, J; Frey, EA; Prameya, R; Dorovini, Zis, K; Finlay, BB:** Haemophilus influenzae lipopolysaccharide disrupts confluent monolayers of bovine brain endothelial cells via a serum-dependent cytotoxic pathway. *J. Infect. Dis.* 165: 865-72 (1992)
101. **Petrov, T; Howarth, AG; Krukoff, TL; Stevenson, BR:** Distribution of the tight junction-associated protein ZO-1 in circumventricular organs of the CNS. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 21: 235-46 (1994)
102. **Pfister, H; Fontana, A; Täuber, M; Tomasz, A; Scheld, W:** Mechanisms of brain injury in bacterial meningitis: workshop summary. *Clin. Infect. Dis.* 19: 463-79 (1994)
103. **Pinna, LA:** Casein kinase 2: an 'eminence grise' in cellular regulation? *Biochim. Biophys. Acta.* 1054: 267-84 (1990)
104. **Plateel, M; Teissier, E; Cecchelli, R:** Hypoxia dramatically increases the nonspecific transport of blood-borne proteins to the brain. *J. Neurochem.* 68: 874-7 (1997)
105. **Poirier, J; Fleury, J; Gherardi, R:** La barriere hémato-encéphalique. Données morphologiques. *Rev. Med. Interne.* 4: 131-44 (1983)
106. **Poser, CM:** The pathogenesis of multiple sclerosis. Additional considerations. *J. Neurol. Sci.* 115: S3-15 (1993)
107. **Quagliarello, VJ; Wispelwey, B; Long, WJ; Scheld, WM:** Recombinant human interleukin-1 induces meningitis and blood-brain barrier injury in the rat. Characterization and comparison with tumor necrosis factor. *J. Clin. Invest.* 87: 1360-6 (1991)
108. **Rajasekaran, AK; Hojo, M; Huima, T; Rodriguez-Boulan, E:** Catenins and zonula occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions. *J. Cell Biol.* 132: 451-63 (1996)
109. **Raub, TJ:** Signal transduction and glial cell modulation of cultured brain microvessel endothelial cell tight junctions. *Am. J. Physiol.* 271: C495-503 (1996)
110. **Raub, TJ; Kuentzel, SL; Sawada, GA:** Permeability of bovine brain microvessel endothelial cells in vitro: barrier tightening by a factor released from astrogloma cells. *Exp. Cell. Res.* 199: 330-40 (1992)

111. **Reuss, L:** Tight junction permeability to ions and water. *Tight junctions*. Cereijido, M (Hrsg.) Boca Raton, CRC Press S. 49-66 (1991)
112. **Ring, A; Weisner, JN; Tuomanen, EI:** Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J. Clin. Invest.* 102: 347-60 (1998)
113. **Risau, W; Dingler, A; Albrecht, U; Dehouck, MP; Cecchelli, R:** Blood-brain barrier pericytes are the main source of gamma-glutamyltranspeptidase activity in brain capillaries. *J. Neurochem.* 58: 667-72 (1992)
114. **Roitt, IM; Brostoff, J; Male, DK:** Immunology. *Mosby Verlag*. Kapitel 14 (1996)
115. **Rosenstein, JM; Krum, JM; Sternberger, LA; Pulley, MT; Sternberger, NH:** Immunocytochemical expression of the endothelial barrier antigen (EBA) during brain angiogenesis. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.* 66: 47-54 (1992)
116. **Rubin, LL; Hall, DE; Porter, S; Barbu, K; Cannon, C; Horner, HC; Janatpour, M; Liaw, CW; Manning, K; Morales, J; et al.:** A cell culture model of the blood-brain barrier. *J. Cell Biol.* 115: 1725-35 (1991)
117. **Ruff, P; Speicher, DW; Husain, Chishti, A:** Molecular identification of a major palmitoylated erythrocyte membrane protein containing the src homology 3 motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 6595-99 (1991)
118. **Rutten, M; Hoover, RL; Karnovsky, MJ:** Electrical resistance and macromolecular permeability of brain endothelial monolayer cultures. *Brain Res.* 425: 301-10 (1987)
119. **Sakakibara, A; Furuse, M; Saito, M; Ando-Akatsuka, Y; Tsukita, S:** Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J. Cell Biol.* 137: 1393-1401 (1997)
120. **Sambrook, J; Foitsch, EF; Maniatis, T:** Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989)
121. **Sharma, HS; Cervos, Navarro, J:** Brain oedema and cellular changes induced by acute heat stress in young rats. *Acta. Neurochir. Suppl. Wien.* 51: 383-6 (1990)
122. **Sheldon, R; Moy, A; Lindsley, K; Shasby, S; Shasby, DM:** Role of myosin light-chain phosphorylation in endothelial cell retraction. *Am. J. Physiol.* 265: L606-12 (1993)
123. **Sheng, M:** PDZs and receptor/channel clustering: rounding up the latests suspects. *Neuron.* 17: 575-8 (1996)

124. **Shivers, RR; Arthur, FE; Bowman, PD:** Induction of gap junctions and brain endothelium-like tight junctions in cultured bovine endothelial cells: local control of cell specialization. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 20: 1-14 (1988)
125. **Siliciano, JD; Goodenough, DA:** Localization of the tight junction protein ZO-1 is modulated by extracellular calcium and cell-cell contact in MDCK cells. *J. Cell Biol.* 107: 2389-99 (1988)
126. **Singer, KL; Stevenson, BR; Woo, PL; Firestone, GL:** Relationship of serine/threonine phosphorylation/dephosphorylation signaling to glucocorticoid regulation of tight junction permeability and ZO-1 distribution in nontransformed mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 269: 16108-15 (1994)
127. **Staddon, JM; Herrenknecht, K; Smales, C; Rubin, LL:** Evidence that tyrosine phosphorylation may increase tight junction permeability. *J. Cell Sci.* 108: 609-19 (1995)
128. **Staddon, JM; Smales, C; Schulze, C; Esch, FS; Rubin, LL:** p120, a p120 related protein (p100) and the cadherin/catenin complex. *J. Cell Biol.* 130: 369-81 (1995)
129. **Stevenson, BR; Anderson, JM; Braun, ID; Mooseker, MS:** Phosphorylation of the tight junction protein ZO-1 in two strains of Madin-Darby canine kidney cells which differ in transepithelial electrical resistance. *Biochem. J.* 263, 597-99 (1989)
130. **Stevenson, BR; Begg, DA:** Concentration -dependent effects of cytochalasin D on tight junctions and actin filaments in MDCK epithelial cells. *J. Cell Sci.* 107: 367-75 (1994)
131. **Stevenson, BR; Siliciano, JD; Mooseker, MS; Goodenough, DA:** 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: 755-66 (1986)
132. **Stevenson, JD; Anderson, JM; Goodenough, DA; Mooseker, MS:** Tight junction structure and ZO-1 content are identical in two strains of Madin Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance. *J. Cell Biol.* 107: 2401-8 (1988)
133. **Stuart, RO; Nigam, SK:** Regulated assembly of tight junctions by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 6072-6 (1995)
134. **Stuart, RO; Sun, A; Bush, KT; Nigam, SK:** Dependence of epithelial intercellular junction biogenesis on thapsigargin-sensitive intracellular calcium stores. *J. Biol. Chem.* 271: 13636-41 (1996)
135. **Stuart, RO; Sun, A; Panichas, M; Hebert, SC; Brenner, BM; Nigam, SK:** Critical role for intracellular calcium in tight junction biogenesis. *J. Cell Physiol.* 159: 423-33 (1994)
136. **Sugawara, I; Hamada, H; Tsuruo, T; Mori, S:** Specialized localization of P-glycoprotein recognized by MRK 16 monoclonal antibody in endothelial cells of the brain and the spinal cord. *Jpn. J. Cancer. Res.* 81: 727-30 (1990)

137. **Takahisa, M; Togashi, S; Suzuki, T; Kobayashi, M; Murayama, A:** The drosophila tamou gene, a component of the activating pathway of extramacrochaetae expression, encodes a protein homologous to mammalian cell-cell junction associated protein ZO-1. *Genes. Dev.* 10: 1783-95 (1996)
138. **Takaishi, K; Sasaki, T; Kotani, H; Nishioka, H; Takai, Y:** Regulation of cell-cell adhesion by rac and Rho small G proteins in MDCK cells. *J. Cell Biol.* 139: 1047-59 (1997)
139. **Takeda, H; Nagafuchi, A; Yonemura, S; Tsukita, S; Behrens, J; Birchmeier, W; Tsukita, S:** V-src kinase shifts the cadherin-based cell adhesion from the strong to the weak state and beta catenin is not required for the shift. *J. Cell Biol.* 131: 1839-47 (1995)
140. **Tao, Cheng, JH; Brightman, MW:** Development of membrane interactions between brain endothelial cells and astrocytes in vitro. *Int. J. Dev. Neurosci.* 6: 25-37 (1988)
141. **Tsukamoto, T; Nigam, SK:** Tight junction proteins form large complexes and associate with the cytoskeleton in an ATP-depletion model for reversible junction assembly. *J. Biol. Chem.* 272: 16133-39 (1997)
142. **Tsukamoto, T; Nigam, SK:** Role of tyrosine phosphorylation in the reassembly of occludin and other tight junction proteins. *Am. J. Physiol.* 276: F737-50 (1999)
143. **Tsukita, S; Oishi, K; Akiyama, T; Yamanishi, Y; Yamamoto, T; Tsukita, S:** Specific proto-oncogenic tyrosine kinases of src family are enriched in cell-to-cell adherens junctions where the level of tyrosine phosphorylation is elevated. *J. Cell Biol.* 113: 867-79 (1991)
144. **Tunkel, AR; Scheld, MD:** Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Annu. Rev. Med.* 44: 103-20 (1993)
145. **Van Itallie, CM; Anderson, JM:** Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts. *J. Cell Sci.* 110: 1113-21 (1997)
146. **Van Itallie, CM; Balda, MS; Anderson, JM:** Epidermal growth factor induces tyrosine phosphorylation and reorganization of the tight junction protein ZO-1 in A431 cells. *J. Cell Sci.* 108: 1735-42 (1995)
147. **Veronesi, B:** Characterization of the MDCK cell line for screening neurotoxicants. *Neurotoxicology.* 17: 433-43 (1996)
148. **Vestweber, D; Kemler, R:** Identification of a putative cell adhesion domain of uvo-morulin. *Eur. Mol. Biol. Organ.* 139: 3393-8 (1985)

149. **Vorbrodt, AW (Hrsg.):** Ultrastructural cytochemistry of enzymatic activities in brain microvasculature. *G. Fischer Verlag, Stuttgart*. S. 12-8 (1988)
150. **Watson, PM; Anderson, JM; Van Itallie, CM; Doctrow, SR:** The tight-junction-specific protein ZO-1 is a component of the human and rat blood-brain barriers. *Neurosci. Lett.* 129: 6-10 (1991)
151. **Willott, E; Balda, MS; Fanning, AS; Jameson, B; Van Itallie, C; Anderson, JM:** The tight-junction protein ZO-1 is a homologous to the Drosophila discs-large tumor suppressor protein of septate junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 7834-8 (1993)
152. **Willott, E; Balda, MS; Heintzelman, M; Jameson, B; Anderson, JM:** Localization and differential expression of two isoforms of the tight junction protein ZO-1. *Am. J. Physiol.* 262: C1119-24 (1992)
153. **Wolburg, H; Neuhaus, J; Kniesel, U; Krauss, B; Schmid, EM; Ocalan, M; Farrell, C; Risau, W:** Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J. Cell Sci.* 107: 1347-57 (1994)
154. **Woo, PL; Cha, HH; Singer, KL; Firestone, GL:** Antagonistic regulation of tight junction dynamics by glucocorticoids and transforming growth factor-beta in mouse mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 271: 404-12 (1996)
155. **Woods, DF; Bryant, PJ:** ZO-1, DlgA and PSD-95/SAP90: homologous proteins in tight, septate and synaptic cell junctions. *Mech. Dev.* 44: 85-9 (1993)
156. **Woods, DF; Bryant, PJ:** The discs-large tumor suppressor gene of drosophila encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell.* 66: 451-64 (1991)
157. **Xu, RX; Yi, SY; Wang, BY:** Experimental evaluation of blood-brain barrier permeability using colloidal gold particles as tracers in early-stage brain injury. *Chin. Med. J. Engl.* 104: 634-8 (1991)
158. **Yamamoto, T; Harada, N; Kano, K; Taya, S; Canaani, E; Matsuura, Y; Mizoguchi, A; Die, C; Kaibuchi, K:** The Ras target AF-6 interacts with ZO-1 and serves as a peripheral component of tight junctions in epithelial cells. *J. Cell Biol.* 139: 785-95 (1997)
159. **Yamamoto, T; Harada, N; Kawano, Y; Taya, S; Kaibuchi, K:** In vivo interaction of AF-6 with activated Ras and ZO-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259: 103-7 (1999)
160. **Yang, HYT; Erdös, EG; Levin, Y:** Characterization of a dipeptide hydrolase (kinase II: Angiotensin I converting enzyme). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 177: 291-300 (1971)
161. **Youakim, A; Ahdieh, M:** Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin. *Am. J. Physiol.* 276: G1279-88 (1999)

162. **Zahraoui, A; Joberty, G; Arpin, M; Fontaine, JJ; Hellio, R; Tavitian, A; Louvard, D:** A small rab GTPase is distributed in cytoplasmic vesicles in non polarized cells but colocalizes with tight junction marker ZO-1 in polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* 124: 101-15 (1994)

163. **Zhong, Y; Enomoto, K; Isomura, H; Sawada, N; Minase, T; Oyamada, M; Konishi, Y; Mori, M:** Localization of the 7H6 antigen at tight junctions correlates with the paracellular barrier function of MDCK cells. *Exp. Cell. Res.* 214: 614-20 (1994)

164. **Zhong, Y; Saitoh, T; Minase, T; Sawada, N; Enomoto, K; Mori, M:** Monoclonal antibody 7H6 reacts with a novel tight junction-associated protein distinct from ZO-1, cingulin and ZO-2. *J. Cell Biol.* 120: 477-83 (1993)

165. **Ziylan, YZ:** Pathophysiology of the opening of the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers in acute hypertension. *Exp. Neurol.* 84: 18-28 (1984)

9 Lebenslauf

Name: Gregor Frank Severin A i c h e l e

Geburtsdatum: 27. Februar 1971

Geburtsort: Düsseldorf

Schule: 1981: Theodor-Flidner-Gymnasium Düsseldorf-Kaiserswerth, Abitur 1990

Ausbildung: 1990: Schreinerlehre: Schreinerei Himmes, Ratingen, Gesellenprüfung: 1992

Medizinstudium: ab SS 93 an der **Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf:**

- Physikum Frühjahr 1995 (Note: 2,0)
- Staatsexamen Frühjahr 1996 (Note: 3,0)
- Staatsexamen Frühjahr 1999 (Note: 2,0)

An der **Université de Nantes (Frankreich)**,
Studienjahr 1997/98:
ERASMUS-Stipendium der europäischen Union

Scheine und Praktika in:

- Gynäkologie / Geburtshilfe (3 Monate)
- Pädiatrie (3 Monate)
- Neurologie / Neurochirurgie / Psychiatrie (3 Monate)

weitere Famulaturen:

- Allgemeine Chirurgie, Düsseldorf (Sommer 1995)
- Accident & Emergency, Dublin (Frühjahr 1997)
- HNO, Universitätsklinik Düsseldorf (Sommer 1998)

Praktisches Jahr (Oktober 1999 bis August 2000):

- Chirurgie, **Université de Nantes (Frankreich)** (in den Abteilungen Viszeralchirurgie, Urologie und Traumatologische Notaufnahme)
- HNO, **Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**
- Innere Medizin, **Taunton & Somerset Hospital (England)**

Ärztliche Tätigkeit: Arzt im Praktikum an der HNO-Universitätsklinik Regensburg seit Januar 2002

Forschung: ab SS 1996: experimentelle Doktorarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Heinrich-Heine-Universität

Fertigstellung SS 1999

Fremdsprachen: Englisch und Französisch fließend

Regensburg, den 22. Januar 2002

ZO-1, ein tight-junction-assoziiertes Protein. Ein Überblick und experimentelle Untersuchungen an einer primären zerebralen Endothelzellkultur.

Zusammenfassung der Inauguraldissertation von Gregor Aichele 2002

Die *tight junctions* (TJ) der Hirnkapillaren sind das anatomische Korrelat der Blut-Hirn-Schranke (BHS). Das ZO-1-Protein ist die älteste beschriebene Struktur der TJ. Zur Störung der BHS-Integrität, die mit der Öffnung von TJ einhergeht, kommt es z.B. bei entzündlichen Prozessen, wie bakteriellen Meningitiden.

Das Ziel der Arbeit war die Rolle von ZO-1 in der TJ herauszuarbeiten. Im ersten Teil der Arbeit geschah dies im Rahmen einer ausführlichen Literaturrecherche, die den aktuellen Stand der Forschung berücksichtigt. Zunächst wurden prinzipielle Regulationsmöglichkeiten der TJ-Öffnung und – Schließung erörtert. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf zwei unterschiedliche *in-vitro*-Modelle, den Ca^{2+} -switch und das ATP-Entzug-Modell, gerichtet. Mögliche Signaltransduktionsvorgänge bei der TJ-Regulation wurden besprochen. Um auf die besonderen Verhältnisse der TJ im Bereich der BHS einzugehen, wurden deren spezielle Aspekte hervorgehoben. Verschiedene Möglichkeiten der Beteiligung von ZO-1 an den Vorgängen der TJ-Regulation wurden gesondert betrachtet. Besondere Beachtung fanden dabei Veränderungen des ZO-1-Proteingehalts in Endothelzellen (bzw. Epithelzellen), Änderungen der intrazellulären Lokalisation von ZO-1 (Umverteilungsvorgänge), sowie sterische Konformationsänderungen von ZO-1, wobei es hier in erster Linie um Phosphorylierungsmechanismen geht.

Im experimentellen Teil wurde das ZO-1-Protein in einer primären bovinen Hirnendothelzellkultur untersucht. Der qualitative ZO-1-Nachweis in den Rinderhirnendothelzellen (RHE) gelang durch Western- und Immunoblot. Durch Immunfluoreszenzfärbungen konnte die zelluläre Lokalisation von ZO-1 sichtbar gemacht werden. In einer konfluenten Zellkultur war ZO-1 in der Zellperipherie der einzelnen Endothelzelle in scharf konturierten Banden darzustellen. Ein besonderer Befund ist die Lokalisation von ZO-1 im Bereich der Zellkerne in subkonfluenten Arealen in der RHE-Kultur. Dies ist bisher nur für bestimmte Epithelzelllinien unter zellkontaktfreien Bedingungen beschrieben worden. Während der Ausbildung der Konfluenz kommt es daher wahrscheinlich zu Umverteilungsvorgängen von ZO-1 aus dem Bereich des Zellkerns in die Zellperipherie.

Im Verlauf der Ausbildung konfluenter RHE-Zellrasen wurde der ZO-1-Gehalt der RHE-Zellen in Form einer Zeitkinetik bestimmt. Dazu wurde ein ZO-1-ELISA und eine Gesamtproteingehaltsbestimmung der Zellkultur (nach Bradford) verwendet. Während der Proliferation und Ausdifferenzierung der Zellen kam es unter Kulturbedingungen zu einem deutlichen Verlust von ZO-1 in den RHE-Zellen. Der ZO-1-Verlust ließ sich in Gegenwart von astrozytenkonditioniertem Medium oder durch Einsaat höherer Zellmengen begrenzen. Diese Befunde begründen die Annahme, daß sowohl das fehlende BHS-Milieu (u.a. Astrozyten) unter *in-vitro*-Bedingungen, als auch Effekte der Zellproliferation den ZO-1-Verlust bedingen. Erst nach Erreichen der Konfluenz des Zellrasens stieg der ZO-1-Gehalt wieder an. Da ZO-1 ein Strukturprotein der *tight junction* ist und eine TJ-Differenzierung erst nach Ausbildung der Zellkontakte (bei Konfluenz) zu erwarten ist, kann man annehmen, daß ZO-1 sowohl durch seine quantitative Zunahme in der RHEZ-Kultur als auch durch die Umverteilung zur Zellperipherie an der TJ-Bildung der RHEZ *in vitro* beteiligt ist.

Während einer bakteriellen Meningitis sind die Keime im Bereich des Hirnendothels gegenwärtig. Um die bakterielle Wirkung auf den ZO-1-Gehalt der RHE-Zellen zu ermitteln, sind Stimulationsversuche mit einem bekapselten und einem unbekapselten Stamm von *Str. pneumoniae* sowie mit LPS als pathogener Komponente der Zellwand gramnegativer Keime durchgeführt worden. Nur LPS führte in konzentrationsabhängiger Weise zur Verminderung von ZO-1 in der RHE-Zellkultur.

Mein besonderer Dank gilt meinem Bruder Kilian Aichele
und meinem Freund Tomas Mühlhoff.