

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Die Tabelle 2.1 listet die verwendeten Materialien auf.

Tab. 2.1: Geräte und Materialien

Geräte und Materialien	Modell	Hersteller
Agarosegelkammer	Agagel Mini	Biometra GmbH, Göttingen Deutschland
Kryo-Container	5100 Cryo 1 °C Freezing Container	Nalgene Labware, Rochester, NY, USA
Elektroporationsküvetten (1 mm)	-	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Elektroporator	EasyjecT prima	EquiBio / Thermo Electron, Milford, MA, USA
Filterpapier (Westernblot)	Extra dickes Filterpapier 15 x 20 cm, 30 mm	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
French®Press	French Pressure Cell Press	SLM Aminco (Polytec GmbH, Waldbronn, Deutschland)
Gel-Dokumentationsgerät	BioDoc CCD Kamera	Biometra GmbH, Göttingen Deutschland
Gewebekulturflaschen	Cellstar: Tissue Culture Flasks, 25 cm ² und 75 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Gewebekulturschalen	35 x 10 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Gewebekulturtestplatte	Gewebekulturtestplatte mit 6 oder 24 Vertiefungen	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Deutschland
Größenausschluss- chromatographie-Säulen	Superdex 200 (S200) Superdex 75 (S75) Superdex Peptide Tricorn 10/300 GL	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
HPLC: Pumpen Entgaser UV-Vis-Detektor Steuerungseinheit	LC10-AS DGU-14A SPD-10A CBM-10A	Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
Konzentratoren	Amicon Ultra-15 (5000 MWCO)	Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland
Kühlzentrifuge	Sorvall RC 285	Du Pont de Nemours Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Laser-Scanning-Mikroskop	LSM 510 META-UV	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Laser-Scanning-Mikroskop	LSM 510 META-NLO	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Oberflächenplasmonresonanz- spektroskopie-Gerät	BIACORE 2000	BIACORE AB, Uppsala, Schweden
PCR-Thermocycler	DNA Engine	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Rotator	Blood tube Rotator SB1	Stuart Scientific, Stone Staffordshire, UK
SDS-Gelelektrophoresekammer	Mighty Small II SE250/SE260 (Hoefer)	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Spektrophotometer	DU 640	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Sterilwerkbank	S-1200	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Taumler	Polymax2040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland

2. Material und Methoden

Tischkühlzentrifuge	5810R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge	5415C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Transfermembran (Nitrozellulose)	Hybond™-ECL	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Transfermembran (PVDF)	Hybond™-P	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Transilluminator	Lumi-Imager F1™	Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland
Westernblot-Apparatur	Trans-Blot SD Semi-Dry transfer cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Zellinkubator	CB 210	Binder GmbH, Tuftlingen, Deutschland

Die Tabelle 2.2 listet die verwendeten Chemikalien auf.

Tab. 2.2: Chemikalien

Hersteller	Produkt
Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland	ECL Western blotting detection reagents; LMW Gel Filtration Calibration Kit; HMW Gel Filtration Calibration Kit
Biacore AB, Uppsala, Schweden	2-2-Puridinyldithioetaneamin-Hydrochlorid (PDEA); Sensor Chip CM5
Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland	Ammoniumperoxodisulfat (APS); Magermilchpulver; Tetramethylethyldiamin (TEMED)
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	Acryl-/Bisacrylamid-Mix (30 %/ 0,8 %); Agar-Agar; Ampicillin-Natriumsalz; Bromphenolblau; 1,4-Dithiothreitol (DTT); Ethylendiamintetraacetat (EDTA); Essigsäure; Ethidiumbromid; α-D(+)-Glucose Monohydrat; Glycerol; Hefeextrakt; Kaliumchlorid (KCl); Kanamycin-Sulfat; Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl₂); Magnesiumsulfat (MgSO₄); D(+)-Maltose Monohydrat; Natriumacetat; Parafilm®M; Pepton aus Casein; D(+)-Saccharose; Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan; Wasser HPLC rein
Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot, Deutschland	100 bp DNA-Marker (GeneRuler™); 1 kb DNA-Marker (GeneRuler™); dNTP's; Isopropyl-β-D-thiopyranosid (IPTG); Loading Dye Solution (6x)
Fluka, Steinheim, Deutschland	Coomassie™ Brilliant Blue G250; Perchlorsäure
Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES); Lipofectamine™ 2000; NuPAGE LDS Probenpuffer (4x); SeeBlue Plus 2 Prestained Marker
J.T. Baker, Deventer, Holland	Aceton; Isopropanol; Methanol; Natriumchlorid (NaCl); Natriumhydroxid (NaOH)
Merck Biosciences Ltd, Darmstadt, Deutschland (auch Calbiochem)	Benzonase; Di-Kaliumhydrogenphosphat (K₂HPO₄); G418 Sulfat; Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄); Nonidet P40 (NP-40); Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaureat (Tween 20)
Molecular probes, Eugene, Oregon, USA	4',6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)
New England BioLabs (NEB), Frankfurt am Main, Deutschland	MBP-Amylose Resin
Pierce, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, Deutschland	EZ-Link® Sulfo-NHS-SS-Biotin; UltraLink Immobilized NeutrAvidin™ Protein Plus
Seromed, Berlin, Deutschland	Trypanblau
SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Agarose; Glycin; Natrium-Dodecylsulfat (SDS)
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland	Blocking Buffer 10x (B6429); Albumin aus Rinderserum (BSA); Desoxycholsäure Natriumsalz (DOC); Dimethylsulfoxid (DMSO); 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (EDC); Ethanolamin; L-Glutathion reduziert; Glutaraldehyd; Glutathion-Agarose; HEPES;

2. Material und Methoden

	2-Mercaptoethanol; Natriumazid; N-Hydroxysuccinimid (NHS); Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); Paraformaldehyd; Poly-L-Lysin; Ponceau S; Proteaseinhibitorcocktail für Bakterien; Proteaseinhibitorcocktail für Eukaryoten; Triton® X-100; Trizma®-base
Thermo Electron Corporation; Pittsburgh, PA, USA	Einbettmedium Immun-Mount
VEB Laborchemie, Apolda, DDR	Borsäure
Biochrom AG, Berlin, Deutschland	Dimethylsulfoxid (DMSO ; <i>cell culture quality</i>)

Die Tabelle 2.3 listet die verwendeten Enzyme auf.

Tab. 2.3: Enzyme

Enzym	Hersteller
T4-DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
BD Advantage™ 2 Polymerase Mix	BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Deutschland
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	New England BioLabs, Frankfurt am Main, Deutschland
Benzonase	Merck Biosciences Ltd, Darmstadt, Deutschland
<i>Bam</i> H1	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
<i>Dpn</i> 1	New England BioLabs, Frankfurt am Main, Deutschland
<i>Eco</i> R1	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
<i>Sal</i> 1	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

Die Tabelle 2.4 listet die verwendeten Antikörper auf.

Tab. 2.4: Antikörper

Antikörper	Organismus	Kurzform	Hersteller
primäre Antikörper			
Anti-Claudin1	Kaninchen	R α Cld1	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*
Anti-Claudin2	Kaninchen	R α Cld2	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*
Anti-Claudin3	Kaninchen	R α Cld3	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*
Anti-Claudin4	Maus	M α Cld4	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*
Anti-Claudin5	Kaninchen	R α Cld5	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*
Anti-Occludin	Kaninchen	R α Occ	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*
Anti-ZO-1 (ZO1-1A12)	Maus	M α ZO-1	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*
Anti-FLAG	Kaninchen	R α FLAG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Anti-GFP	Maus	M α GFP	Clontech Laboratories Inc., Mountain View, CA, USA
Anti-GST (GST-2)	Maus	M α GST	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Anti-MBP	Kaninchen	R α MBP	New England BioLabs (NEB), Frankfurt am Main, Deutschland
sekundäre Antikörper			
Anti-Maus HRP-Konjugat	Ziege	G α M-HRP	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*
Anti-Kaninchen HRP-Konjugat	Ziege	G α R-HRP	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*
Anti-Maus Cy3-Konjugat	Ziege	G α M-Cy3	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*
Anti-Kaninchen Cy3-Konjugat	Ziege	G α R-Cy3	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland*
Anti-Kaninchen AlexaFluor-488-Konjugat	Ziege	G α R-AlexaFluor488	Molecular probes, Eugene, Oregon, USA

*: vormals Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA; HRP: *horse radish peroxidase*

2. Material und Methoden

Die Tabelle 2.5 listet in dieser Arbeit verwendete, nicht selbst erstellte Plasmide auf.

Tab. 2.5: Plasmide

Plasmid	Merkmale	Referenz
pEYFP-N1	4,7 kb; Kan ^r /Neo ^r ; SV40 ori; pUC ori; P _{CMV} _{IE} ; EYFP (Reporter) C-terminal	BD Biosciences Clontech, Freiburg, Deutschland
pECFP-N1	4,7 kb; Kan ^r /Neo ^r ; SV40 ori; pUC ori; P _{CMV} _{IE} ; ECFP (Reporter) C-terminal	BD Biosciences Clontech, Freiburg, Deutschland
pECFP-ER	4,8 kb; Neo ^r /Kan ^r ; SV40 ori; pUC ori; P _{CMV} _{IE} ; ECFP (Reporter); ER-Lokalisationssequenz vom Calreticulin	BD Biosciences Clontech, Freiburg, Deutschland
pEYFP-Golgi	4,9 kb; Neo ^r /Kan ^r ; SV40 ori; pUC ori; P _{CMV} _{IE} ; EYFP (Reporter); Membrananker-Signalpeptid des Human-β-1,4-GT	BD Biosciences Clontech, Freiburg, Deutschland
pEYFP-Endo	5,4 kb; Neo ^r /Kan ^r ; SV40 ori; pUC ori; P _{CMV} _{IE} ; EYFP (Reporter); c-Myc-RhoB	BD Biosciences Clontech, Freiburg, Deutschland
pMAL-C2X	6,7 kb; Amp ^r ; pMB1 ori; M13 ori; P _{tac} ; lacI ^q ; lacZα; Maltose-Bindeprotein (MBP) N-terminal	New England Biolabs (NEB), Frankfurt am Main, Deutschland
pGEX-4T1	4,9 kb; Amp ^r ; pBR322 ori; P _{tac} ; lacI ^q ; Glutathione-S-Transferase (GST) N-terminal	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
pECFP-N1_Cld3 _{Stop}	5,4 kb; Kan ^r /Neo ^r ; Cld3 im pEYFP-N1-Vektor; keine YFP-Expression durch Stoppcodon	Dr. J. Piontek, FMP, Berlin, Deutschland
pEYFP-N1_Cld5-FLAG _{Stop}	5,4 kb; Kan ^r /Neo ^r ; Cld5 mit C-terminalen FLAG-tag im pEYFP-N1-Vektor; keine YFP-Expression durch Stoppcodon	Dr. J. Piontek, FMP, Berlin, Deutschland
pEYFP-C2-YFP-AQP1	5,5 kb; Kan ^r /Neo ^r ; Aquaporin-1 im pEYFP-N1-Vektor; YFP N-terminal	Dr. S.P. Tsunoda, FMP, Berlin, Deutschland
pCRFR1-YFP	<i>Corticotropin releasing factor receptor 1</i> im pEYFP-N1 Vektor; YFP C-terminal	Dr. O. Krätke, FMP, Berlin, Deutschland
pcDNA3.1-Cld1	Cld1 (Maus) im pcDNA3.1-Vektor	Dr. J. Piontek, FMP, Berlin, Deutschland
pSKCl-3	3,7 kb; Amp ^r ; Cld3 (Maus) im pBluescript II SK(-) Vektor (Fermentas Life Sciences)	Dr. M. Furuse, Kyoto, Japan
pGTCI5	3,7 kb; Amp ^r ; Cld5 (Maus) im pGEM [®] -T Easy Vektor (Promega GmbH)	Dr. M. Furuse, Kyoto, Japan
pProEx-1-CPE	5,6 kb; Amp ^r ; CPE im pPROEX-1 Vektor (Invitrogen)	Dr. Y. Horiguchi, Osaka, Japan

EYFP: *Enhanced yellow fluorescent protein gene*; ECFP: *Enhanced cyan fluorescent protein gene*; P_{CMV}: *Human cytomegalovirus Promotor*; P_{tac}: induzierbarer „tac“-Promotor; Neo^r/Kan^r: Neomycin/Kanamycin Resistenzgen; Amp^r: Ampicillin Resistenzgen

Die Tabelle 2.6 listet die verwendeten *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämme auf.

Tab. 2.6: *Escherichia coli*-Stämme

Stamm	Merkmale	Referenz
<i>E. coli</i> DH5α TM	F ⁻ Φ80dlacZΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
<i>E. coli</i> ER2566	F ⁻ λ- <i>fhuA2</i> [lon] <i>ompT lacZ::T7 gene 1 gal sulA11 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10-TetS)2 R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1 [dcm]</i>	New England BioLabs, Frankfurt am Main, Deutschland
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])	Studier <i>et al.</i> , 1990

2. Material und Methoden

Die Tabelle 2.7 listet die verwendeten Kulturmedien und Zusätze für Bakterien- und eukaryotische Zellkulturen auf.

Tab. 2.7: Kulturmedien für Bakterien- und Gewebekulturen

Bezeichnung	Verwendungszweck/Zusammensetzung	Hersteller/Referenz
LB-Medium (Luria-Bertani, Vollmedium)	<u>Standardmedium bei der Anzucht von <i>E. coli</i>:</u> 1 % (w/v) NaCl; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v) Pepton aus Casein; pH 7,5 mit NaOH.	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
LB-Agar	LB-Medium mit 20 g/L Agar-Agar	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
SOC-Medium	<u>Vollmedium nach Transformation von <i>E. coli</i>:</u> 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgSO ₄ ; MgCl ₂ ; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 2 % (w/v) Pepton aus Casein; pH 7,0 mit NaOH. Medium autoklavieren und steril 20 mM Glucose hinzufügen.	Hanahan, 1983
<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (DMEM)	<u>Zellkulturmedium:</u> mit 3,7 g/L NaHCO ₃ und 1,0 g/L D-Glucose; ohne L-Glutamine	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
HEK-Standardmedium	<u>Zellkulturmedium für HEK-293-Zellen:</u> DMEM mit 10 % (v/v) Fötale Kälberserum (FCS), 1 % (v/v) L-Alanyl-L-Glutamine, 100 mg/ml Penicillin/Streptomycin	Modifiziert nach Moore <i>et al.</i> , 1967
Opti-MEM	<u>Zellkulturmedium für Transfektionen</u>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Einfriermedium	<u>Zellkulturmedium zum Einfrieren von Zellen:</u> 50% (v/v) DMEM, 40 % (v/v) FCS, 9 % (v/v) DMSO, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin	-
Fötale Kälberserum (FCS)	-	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
L-Alanyl-L-Glutamine	200 mM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	<u>Antibiotikum für Zellkulturmedien:</u> 1,0 mg/ml (Wirkkonzentration)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
G418-Sulfat	<u>Antibiotikum für Zellkulturmedien:</u> 0,5 mg/ml (Wirkkonzentration)	Merck Biosciences Ltd, Darmstadt, Deutschland
Kanamycin-Sulfat	<u>Antibiotikum für Bakterienkulturen:</u> 40 µg/ml (Wirkkonzentration)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin-Natriumsalz	<u>Antibiotikum für Bakterienkulturen:</u> 100 µg/ml (Wirkkonzentration)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA (0,05% / 0,02%)	<u>Für das Passagieren von adhärenen Kulturen:</u> in PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
<i>Phosphate buffer saline</i> (PBS)	136,89 mM NaCl; 2,68 mM KCl; 6,47 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,47 mM KH ₂ PO ₄	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PBS mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺ (PBS-CM)	136,89 mM NaCl; 2,68 mM KCl; 6,47 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,47 mM KH ₂ PO ₄ ; 0,33 mM MgCl ₂ ; 0,90 mM CaCl ₂	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden verschiedene kommerziell erhältliche *Kits* von QIAGEN (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet. Je nach erforderlicher Plasmid-DNA-Menge wurde das QIAprep® Spin Miniprep *Kit* oder das QIAGEN® Plasmid Midi *Kit* verwendet. Um DNA in höherer Qualität für Transfektionen zu reinigen, wurde das

QIAGEN[®] Plasmid Mini oder das QIAGEN[®] Plasmid Midi *Kit* verwendet. Die Präparationen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde in sterilem, HPLC-reinem Wasser (Carl Roth GmbH) aufgenommen.

Die Methoden zur Bestimmung der DNA-Konzentration und –Reinheit, zur Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie für Agarose-Gelelektrophoresen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Die PCR wurde durch die *Taq*-DNA-Polymerase (New England BioLabs) bzw. die *Pfu*-DNA-Polymerase (Fermentas Life Sciences) katalysiert (Tab. 2.3). Die in der PCR verwendeten Primer (BioTeZ Berlin-Buch GmbH, Berlin, Deutschland) sind in den Tabellen 2.8, 2.9 und 2.10 aufgelistet. Für die Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das *MinElute Gelextraction Kit* (QIAGEN GmbH) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Restriktionen von DNA wurden mit verschiedenen Restriktionsenzymen der Hersteller New England BioLabs und Fermentas Life Sciences durchgeführt (Tab. 2.3). Je nach verwendetem Enzym wurde der vom Hersteller empfohlene Puffer und die benötigte Menge an Enzym verwendet. Die Restriktionsreaktion verlief im Heizblock bei 37 °C für 12 bis 18 h.

Ligationen wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (Fermentas Life Sciences) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Ligationsreaktion verlief 3 h bei 16 °C oder über Nacht (ÜN) bei 4 °C und wurde anschließend in *E. coli* DH5 α transformiert.

Elektrokompetente *E. coli* wurden nach Sambrook *et al.* (1989) erzeugt. Transformationen von Plasmiden oder Ligationsansätzen erfolgten durch Elektroporation (EasyjecT prima; EquiBio) in elektrokompetente *E. coli* Stämme (Tab. 2.6) nach Herstellerangaben. Die Zellen wurden nach der Transfektion in 500 μ l 37 °C warmes SOC-Medium ohne Antibiotikum aufgenommen und 1 h im Schüttler bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden die Zellen, entsprechend der Antibiotika-Resistenz des transformierten Plasmids, auf Ampicillin oder Kanamycin versetzte LB-Agar-Platten ausplattiert und ÜN im Brutschrank bei 37 °C kultiviert (Medien und Zusätze siehe Tab. 2.7).

2.2.2 Klonierung von MBP- und GST-Expressionskonstrukten

2.2.2.1 MBP- und GST-Fusionskonstrukte von Claudin-3 und -5

Die Cld5- (pGTCL-5; Tab. 2.5) und Cld3- (pSKCL-3; Tab. 2.5) cDNAs wurden von Dr. M. Furuse (Kyoto, Japan) zur Verfügung gestellt. Die entsprechenden cDNA-Sequenzen der Aminosäuresequenzen 141-161 und 138-167 von Cld5 sowie 140-161 und 137-166 von Cld3 wurden mittels PCR amplifiziert (2.2.1). Die bei der PCR verwendeten Primer (Tab. 2.8) enthielten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*H1 oder *Sal*1. Der PCR-Ansatz

wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen nach Herstellerangaben geschnitten, und die gewünschten DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese von den übrigen DNA-Fragmenten getrennt und gereinigt (2.2.1). Gleichmaßen wurden die Expressionsvektoren pMAL-c2X (MBP, Tab. 2.5, New England BioLabs) und pGEX-4T1 (GST, Tab. 2.5, Amersham Biosciences Europe GmbH) mit *Bam*H1 und *Sal*I verdaut und gereinigt. Gereinigte PCR- und Vektorfragmente wurden nach Herstellerangaben durch T4-DNA-Ligase ligiert (2.2.1). Von den Ligationsansätzen wurden 1-5 µl in elektrokompente *E. coli* DH5α Zellen transformiert (2.2.1). Der Erfolg der Klonierungen wurde durch DNA-Sequenzierungen überprüft (2.2.4).

Tab. 2.8: MBP- und GST-Konstrukte von Claudin-3 und Claudin-5

Konstrukt	Plasmid-bezeichnung	DNA-Matrize	Primersequenz (5` nach 3`)
MBP-Cld5 ₁₄₁₋₁₆₁	pLW9	pGTCL-5	GCTGGGGATCCAACATCGTTGTCCGCGAG GCGCAGGTCGACTCACAGCTCGTACTTCTG
MBP-Cld5 ₁₃₈₋₁₆₇	pLW10	pGTCL-5	CCGGGATCCTGGTTCGCCAACATCGTTGTC GGCGTCGACTCAGATGTACAGCGCCGCGCC
GST-Cld5 ₁₄₁₋₁₆₁	pLW7	pGTCL-5	GCTGGGGATCCAACATCGTTGTCCGCGAG GCGCAGGTCGACTCACAGCTCGTACTTCTG
GST-Cld5 ₁₃₈₋₁₆₇	pLW8	pGTCL-5	CCGGGATCCTGGTTCGCCAACATCGTTGTC GGCGTCGACTCAGATGTACAGCGCCGCGCC
MBP-Cld3 ₁₄₀₋₁₆₁	pLW5	pSKCL-3	TGCGGATCCAACACCATCATCAGGGATTTC GTAGTCGACTCATCCCATCTCCCGCTTCTG
MBP-Cld3 ₁₃₇₋₁₆₆	pLW6	pSKCL-3	CCGGGATCCTGGTTCGCCAACACCATCATC GGCGTCGACTCACACGTACAACCCAGCTCC
GST-Cld3 ₁₄₀₋₁₆₁	pLW3	pSKCL-3	TGCGGATCCAACACCATCATCAGGGATTTC GTAGTCGACTCATCCCATCTCCCGCTTCTG
GST-Cld3 ₁₃₈₋₁₆₇	pLW4	pSKCL-3	CCGGGATCCTGGTTCGCCAACACCATCATC GGCGTCGACTCACACGTACAACCCAGCTCC
MBP-Cld5 _{wt}	pLW11	pGTCL-5	AAAGGATCCATGGGGTCTGCAGCGTTGGAAATTC AAAGTCGACTTAGACATAGTTCTTCTTGTC
His ₆ -Cld5	pKZ1	pGTCL-5	AAAGGATCCATGGGGTCTGCAGCGTTGGAAATTC AAAGTCGACTTAGACATAGTTCTTCTTGTC

Von den beiden Primersequenzen der jeweiligen Konstrukte gibt die obere den Vorwärtsprimer und die untere den Rückwärtsprimer an. Die durch die Primer generierten Restriktionsschnittstellen sind „fett“ hervorgehoben: *Bam*H1 = GGATCC; *Sal*I = GTCGAC. Die Plasmidbezeichnung gibt den Erzeuger an: pLW: Lars Winkler; pKZ: Nikolaj Zuleger (FMP, Berlin, Deutschland). Alle Konstrukte wurden im Rahmen dieser Arbeit erzeugt.

2.2.2.2 MBP- und GST-Fusionskonstrukte von *Clostridium perfringens* Enterotoxin

Die CPE-cDNA (pPROEX-1-CPE; Tab. 2.5) wurde von Dr. Horiguchi (Osaka, Japan) erhalten. Die den Aminosäuresequenzen 290-319 und 116-319 entsprechenden DNA-Sequenzen wurden mittels PCR amplifiziert (2.2.1). Die verwendeten Primer (Tab. 2.9) enthielten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Eco*R1 oder *Sal*I (Fermentas Life Sciences). Der Ablauf der weiteren Klonierung ist identisch mit der Klonierung von den MBP- oder GST-Konstrukten der 2.EZS von Cld3 und Cld5 (2.2.2.1).

Tab. 2.9: MBP- und GST-Konstrukte von *Clostridium perfringens* Enterotoxin

Konstrukt	Plasmid-bezeichnung	DNA-Matrize	Primersequenz (5' nach 3')
GST-CPE ₂₉₀₋₃₁₉	pAS4	pPROEX-1-CPE	AAAGAATTCAGCTTAGATGCTGGACAATATG TAAGTCGACTTAAAATTTTTGAAATAATATTGAATAAG
GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉	pLW16	pPROEX-1-CPE	AAAGAATTCAGATCTGTATCTACAACCTGCTGG TAAGTCGACTTAAAATTTTTGAAATAATATTGAATAAG
MBP-CPE ₁₁₆₋₃₁₉	pAS1	pPROEX-1-CPE	AAAGAATTCAGATCTGTATCTACAACCTGCTGG TAAGTCGACTTAAAATTTTTGAAATAATATTGAATAAG

Von den beiden Primersequenzen der jeweiligen Konstrukte gibt die obere den Vorwärtsprimer und die untere den Rückwärtsprimer an. Die durch die Primer generierten Restriktionsschnittstellen sind „fett“ hervorgehoben: *EcoRI* = GAATTC; *SalI* = GTCGAC. Die Plasmidbezeichnung gibt den Erzeuger an: pLW: Lars Winkler; pAS: Ariane Schuster (FMP, Berlin, Deutschland). Alle Konstrukte wurden im Rahmen dieser Arbeit erzeugt.

2.2.2.3 Eukaryotische Expressionskonstrukte

Für die Klonierung von Cld3- und Cld5-Konstrukten in eukaryotische Expressionssysteme wurden die cDNAs der Plasmide pGTCL-5 und pSKCL-3 (Tab. 2.5; Dr. M. Furuse, Kyoto, Japan) verwendet. Um Cld5-Konstrukte mit einer C-terminalen Fusion mit einem Cyan-Fluoreszenzprotein (CFP) oder Yellow-Fluoreszenzprotein (YFP) zu generieren, wurde die Cld5-cDNA-Sequenz durch PCR amplifiziert (2.2.1). Die verwendeten Primer beinhalteten eine Schnittstelle für die Restriktionsenzyme *BamHI* oder *SalI*. Diese amplifizierten DNA-Fragmente sowie die Plasmide pECFP-N1 und pEYFP-N1 (BD Biosciences Clontech) wurden mit den Restriktionsendonukleasen *SalI* und *BamHI* geschnitten und entsprechende Plasmide und Inserts miteinander ligiert (2.2.1). Die verwendeten Primer für die Generierung der Konstrukte sind in der Tab. 2.10 aufgelistet.

Tab. 2.10: CFP- und YFP-Konstrukte von Claudin-5

Konstrukt	Plasmid-bezeichnung	DNA-Matrize	Primersequenz (5' nach 3')
Cld5 _{wt} -YFP	pEYFP-N1_Cld5-YFP	pGTCL-5	TTTGGATCCACATAGTTCTTCTTGTCGTAATCGCC AAAGTCGACATGGGGTCTGCAGCGTTGGAAATTC
Cld5 _{wt} -CFP	pECFP-N1_Cld5-CFP	pGTCL-5	TTTGGATCCACATAGTTCTTCTTGTCGTAATCGCC AAAGTCGACATGGGGTCTGCAGCGTTGGAAATTC
Cld5 ₁₋₁₂₃ -YFP	pLW30	pGTCL-5	TTTGGATCCACATAGTTCTTCTTGTCGTAATCGCC TTTGTGACATGCAGTGCACCACCTGCG
Cld5 ₁₀₂₋₂₁₈ -YFP	pLW31	pGTCL-5	TTTGGATCCGCTCCTCCCCTGAGTGC AAAGTCGACATGGGGTCTGCAGCGTTGGAAATTC

Von den beiden Primersequenzen der jeweiligen Konstrukte gibt die obere den Vorwärtsprimer und die untere den Rückwärtsprimer an. Die durch die Primer generierten Restriktionsschnittstellen sind „fett“ hervorgehoben: *BamHI* = GGATCC; *SalI* = GTCGAC. Die Konstrukte pEYFP-N1_Cld5-YFP und pECFP-N1_Cld5-CFP wurden von Dr. J. Piontek (FMP, Berlin, Deutschland) generiert.

2.2.3 Ortsspezifische Mutagenese

Die Einführung von sequenzspezifischen Mutationen in die 1.EZS oder 2.EZS von Cld3 oder Cld5 wurde nach der leicht modifizierten QuikChange[®]-Methode (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) durchgeführt. Ausgangsvektoren für die Mutagenese waren pECFP-N1_Cld3_{Stop} (Tab. 2.5); pECFP-N1_Cld3_{Stop} (Tab. 2.5) und pEYFP-N1_Cld5-YFP (Tab. 2.10). Für die Mutagenese wurde ein komplementäres Primerpaar synthetisiert (BioTeZ Berlin-Buch GmbH), dessen Oligonukleotidsequenz die gewünschte Mutation enthielt. Nach Anlagerung an die komplementäre Matrizen-DNA erzeugte eine DNA-Polymerase (Advantage[™] 2 Polymerase, BD Biosciences Clontech) eine Kopie der Matrizen-DNA, die sich nur an der zu mutierenden Position von der Matrize unterschied. Der Reaktionsansatz und das Programm der Temperaturzyklen (Tab. 2.11) wurden zweigeteilt. Die komplementären Primer wurden für die Amplifikation der DNA-Matrize in 15 µl Reaktionsansätzen (Tab. 2.11) fünf Zyklen lang getrennt eingesetzt (Syntheseschritt 1). Anschließend wurden die Ansätze vereint, weitere 0,3 µl Advantage[™] 2 Polymerase hinzugegeben und durch einen zweiten Temperaturzyklus amplifiziert (Syntheseschritt 2). Um neusynthetisierte Plasmide gegenüber der DNA-Matrize anzureichern, wurde der PCR-Ansatz mit 0,5 µl (5 U) *Dpn1* bei 37 °C für 16 h enzymatisch behandelt und die Reaktion bei 80 °C für 20 min inaktiviert. *Dpn1* spaltet spezifisch die bakterielle, methylierte Matrizen-DNA (Vovis und Lacks, 1977) nicht jedoch die PCR-synthetisierte DNA. Das synthetisierte Plasmid liegt zirkulär, mit Strangbrüchen vor, die nach Transformation in *E. coli* von bakteriellen Enzymen repariert werden. Eine vollständige Liste der Mutagenese-Primer ist in Tab. 2.12 zu finden. Für die Generierung von

Tab. 2.11: Reaktionsansatz der Mutagenese

Einzelreaktionsansatz		Programm der Temperaturzyklen		
Konz.	Zusammensetzung	Zyklenzahl	Temperatur	Zeit
0,5 µl	Plasmid-DNA (60 ng)	Syntheseschritt 1		
1,5 µl	10x PCR-Reaktionspuffer	1	95 °C	2 min
1,9 µl	Primer (5 µM)	5	95 °C	30 s
0,3 µl	dNTPs (10 mM)		65 °C	45 s
10,5 µl	H ₂ O (HPLC rein)		68 °C	10 min
0,3 µl	Advantage [™] 2 Polymerase	1	10 °C	∞
15,0 µl	Gesamtvolumen	Syntheseschritt 2		
		1	95 °C	30 s
		17	95 °C	30 s
			62,5 °C	1 min
			68 °C	10 min
		1	68 °C	20 min
		1	4 °C	∞

2. Material und Methoden

Cld3_{wt}-CFP und Cld3_{N148D}-CFP wurden als Matrizen-DNA die Plasmide pECFP-N1_Cld3_{Stop} und pAS6 verwendet. Deren Stoppcodon TGA wurde durch den Mutationsansatz auf zwei Nukleotide –TC reduziert. Dadurch ergibt sich eine Leserastermutation, die Cld3 mit dem YFP-Gen in den gleichen Leserahmen bringt und das Stoppcodon entfernt.

Tab. 2.12: Durch ortsgerichtete Mutagenese erzeugte Claudin-3- und Claudin-5-Konstrukte

Konstrukt	Plasmid-bezeichnung	DNA-Matrize	Primersequenz (5` nach 3`)
Cld5 _{R145A} -YFP	pLW41	pEYFP-N1_Cld5-YFP	CAACATCGTTGTCCGCGAGTTCATGATC GATCATAGAACTCGGCACAAACGATGTTG
Cld5 _{R145Q} -YFP	pEYFP-N1-Cld5 _{R145Q} -YFP	pEYFP-N1_Cld5-YFP	TGGTTCGCCAACATCGTTGTCCAGGAGTTCATGATCCGACG GTG CACCGTCGGATCATAGAACTCTGGACAAACGATGTTGGCGAA CCA
Cld5 _{E146A} -YFP	pLW42	pEYFP-N1_Cld5-YFP	CATCGTTGTCCGCGCGTTCATGATCCG CGGATCATAGAAACGCGCGGACAACGATG
Cld5 _{E146N} -YFP	pEYFP-N1-Cld5 _{E146N} -YFP	pEYFP-N1_Cld5-YFP	TTCGCCAACATCGTTGTCCCGCAACTTCTATGATCCGACGGTG CCG CGGCACCGTCGGATCATAGAAAGTTGCGGACAACGATGTTGGC GAA
Cld5 _{F147A} -YFP	pLW22	pEYFP-N1_Cld5-YFP	CCAACATCGTTGTCCGCGAGGCAATATGATCCGACGGTGCCGG TG CACCGGCACCGTCGGATCATAAGCTCGCGGACAACGATGTT GG
Cld5 _{Y148A} -YFP	pEYFP-N1-Cld5 _{Y148A} -YFP	pEYFP-N1_Cld5-YFP	AACATCGTTGTCCGCGAGTTCGCTGATCCGACGGTGCCGGTG TCA TGACACCGGCACCGTCGGATCAGCGAACTCGCGGACAACGAT GTT
Cld5 _{Y148L} -YFP	pLW43	pEYFP-N1_Cld5-YFP	GTCCGCGAGTTCCTTGATCCGACGGTG CACCGTCGGATCAAGGAACTCGCGGAC
Cld5 _{D149A} -YFP	pLW45	pEYFP-N1_Cld5-YFP	CGCGAGTTCATAGCTCCGACGGTGCCGG CCGGCACCGTCGGAGCATAGAACTCGCG
Cld5 _{D149N} -YFP	pKS2	pEYFP-N1_Cld5-YFP	CGTGTCCGCGAGTTCATTAACCCGACGGTGCCGGTGTCAC GTGACACCGGCACCGTCGGTTATAGAACTCGCGGACAACG
Cld5 _{P150A} -YFP	pLW44	pEYFP-N1_Cld5-YFP	CGAGTTCATGATCCGACCGTGCCGGTG CACCGGCACCGTCGCATCATAGAACTCG
Cld5 _{T151A} -YFP	pLW39	pEYFP-N1_Cld5-YFP	GTTCTATGATCCGCGCGTCCGGTGTCAC GTGACACCGGCACCGCCGGATCATAGAAC
Cld5 _{V152A} -YFP	pLW40	pEYFP-N1_Cld5-YFP	CTATGATCCGACGCGCCGGTGTCACAG CTGTGACACCGCGCGTCCGGATCATAC
Cld5 _{P153A} -YFP	pLW24	pEYFP-N1_Cld5-YFP	GATCCGACGGTGCAAGTGTACAGAAAG CTTCTGTGACACTGCCACCGTCGGATC
Cld5 _{V154A} -YFP	pLW33	pEYFP-N1_Cld5-YFP	CGACGGTGCCGCGTCCAGAGAAGTAC GTACTTCTGTGACCGCCGGCACCGTCCG
Cld5 _{S155A} -YFP	pLW34	pEYFP-N1_Cld5-YFP	GACGGTGCCGGTGCCACAGAAGTACGAG CTCGTACTTCTGTGCCACCGGCACCGTC
Cld5 _{Q156A} -YFP	pLW46	pEYFP-N1_Cld5-YFP	GTGCCGGTGTGAGCAAGTACGAGCTGG CCAGCTCGTACTTCGCTGACACCGGCAC
Cld5 _{Q156E} -YFP	pLW57	pEYFP-N1_Cld5-YFP	GTGCCGGTGTGAGAGAAGTACGAGCTGG CAGCTCGTACTTCTCTGACACCGGCAC
Cld5 _{K157A} -YFP	pLW23	pEYFP-N1_Cld5-YFP	CGACGGTGCCGGTGTCCAGGCAATACGAGCTGGGCGCGGCGC TG CAGCGCCGCGCCAGCTCGTATGCTCTGTGACACCGGCACCGT CG
Cld5 _{K157M} -YFP	pLW59	pEYFP-N1_Cld5-YFP	CCGGTGTACAGATGTACGAGCTGGGC GCCAGCTCGTACATCTGTGACACCGG
Cld5 _{Y158A} -YFP	pLW35	pEYFP-N1_Cld5-YFP	GTGTACAGAAAGCCGAGCTGGGCGCG CGCGCCAGCTCGCCCTTCTGTGACAC

2. Material und Methoden

Cld5 _{E159A} -YFP	pLW47	pEYFP-N1_Cld5-YFP	GTCACAGAAGTAC <u>GCG</u> CTGGGCGGGCG CGCCGCGCCAG <u>GCG</u> GTA CTT CTGTGAC
Cld5 _{E159Q} -YFP	pLW36	pEYFP-N1_Cld5-YFP	GTCACAGAAGTAC <u>CAG</u> CTGGGCGGGCG CGCCGCGCCAG <u>GCTG</u> GTA CTT CTGTGAC
Cld5 _{L160A} -YFP	pLW48	pEYFP-N1_Cld5-YFP	CAGAAGTACGAG <u>GCG</u> GGGCGGGCGCTG CAGCGCCGCGCC <u>GCG</u> CTCGTA CTT CTG
Cld5 _{A163G/A185T} -YFP	pLW38	pEYFP-N1_Cld5-YFP	GTACGAGCTGGG <u>GCGCGGC</u> CTGTACATCGG GCTGGTTCGCGAACATCGTTG CCGATGTACAG <u>GCCG</u> GCCCGCAGCTCGTAC CAACGATGTTCGCGAACACAGC
Cld5 _{Q44N} -YFP	pLW52	pEYFP-N1_Cld5-YFP	CAACATCGTGACGGCG <u>AAC</u> CAGACTTGAAGGGGC GCCCTTCCAAGTCGT <u>GTT</u> CGCCGTCACGATGTTG
Cld5 _{L50Q/W51R} -YFP	pLW63	pEYFP-N1_Cld5-YFP	ACGACTTGAAGGGG <u>CAAAGG</u> ATGTCGTGCGTGGT ACCACGCACGACAT <u>CCTTTG</u> CCCCCTTCCAAGTCGT
Cld3 _{wt} -CFP	pLW61	pECFP-N1_Cld3 _{Stop}	GCAAGGACTACGT <u>CTC</u> GAATTCTACC GGTAGAATT <u>CGAG</u> ACGTAGTCCTTGC
Cld3 _{N148A}	pAS7	pECFP-N1_Cld3 _{Stop}	CATCATCAGGGATTCTAT <u>GCA</u> CCGTTGGTGCCCGAGGCC GGCCTCGGGACCAACGG <u>TGC</u> ATAGAAATCCCTGATGATG
Cld3 _{N148D}	pAS6	pECFP-N1_Cld3 _{Stop}	CATCATCAGGGATTCTAT <u>GAC</u> CCGTTGGTGCCCGAGGCC GGCCTCGGGACCAACGG <u>GTC</u> ATAGAAATCCCTGATGATG
Cld3 _{N148D} -CFP	pLW60	pAS6	GCAAGGACTACGT <u>CTC</u> GAATTCTACC GGTAGAATT <u>CGAG</u> ACGTAGTCCTTGC
MBP-Cld5 _{141-160/F147A/S155P}	pLW55	pLW9	CCAACATCGTTGTCCGCGAG <u>GCA</u> TATGATCCGACGGTGCCGG TG CACCGGCACCGTCGGATCATA <u>TGC</u> CTCGGGACACGATGTT GG
MBP-Cld5 _{141-160/K157A}	pLW56	pLW9	CGACGGTGCCGGTGTACAG <u>GCA</u> TACGAGCTGGGCGGGCGC TG CAGCGCCGCGCCAGCTCGTA <u>TGC</u> CTGTGACACCGGCACCGT CG
MBP-Cld5 _{141-160/Y148A}	pLW19	pLW9	GCCAACATCGTT <u>GCC</u> CGGAGTTCTATG CATAGAACTCGCG <u>GCA</u> AACGATGTTGGC

Die Plasmidbezeichnung gibt den Erzeuger an: pLW: Lars Winkler; pAS: Ariane Schuster (FMP, Berlin, Deutschland); pKS: Katrin Schulz (FMP, Berlin, Deutschland). Die Konstrukte pEYFP-N1-Cld5_{R145Q}-YFP; pEYFP-N1-Cld5_{E146N}-YFP und pEYFP-N1-Cld5_{Y148A}-YFP wurden von Nikolaj Zuleger (FMP, Berlin, Deutschland) erzeugt. Alle Konstrukte wurden im Rahmen dieser Arbeit generiert.

2.2.4 DNA-Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurde das *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Für die Sequenzierungs-PCR wurden ~200 ng Plasmid-DNA, 1 µl (4-6 pMol) Sequenzierungsprimer, 1 µl BigDye Reaction Mix, 1,5 µl Reaktionspuffer (5x) mit H₂O HPLC rein auf 10 µl aufgefüllt und gemischt. Die Reaktion erfolgte im PCR-Thermocycler (Bio-Rad Laboratories GmbH) nach Herstellerangaben. Die DNA des Sequenzierungs-PCR-Ansatzes wurde anschließend mit 40 µl Fällungsreagenz (112,5 mM Na-Acetat; 76 % (v/v) Ethanol in H₂O, HPLC rein) für 15 min bei Raumtemperatur (RT) ausgefällt und bei 20.000 x g für 20 min zentrifugiert. Nach Trocknung des DNA-Pellets im Heizblock, wurde die DNA durch das Sequenzierungslabor des FMP aufbereitet und sequenziert.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Expression und Reinigung von MBP-Proteinen

Alle in dieser Arbeit erstellten MBP-Konstrukte wurden durch Klonierung in den pMAL-c2x-Vektor (New England BioLabs) generiert. Diese Konstrukte wurden in *E. coli* Expressionsstämme ER2566 oder BL21 (Tab. 2.6) transformiert und auf LB-Agar-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37 °C im Inkubator angezogen. Am nächsten Abend wurden 5 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) mit einer Einzelkolonie angeimpft und ÜN bei 37 °C unter ständigem Schütteln bei 240 upm kultiviert. Am darauf folgenden Morgen wurden 500 ml LB-Medium (37 °C) mit 1 g Glukose und 100 µg/ml Ampicillin 1:300 im 2 L-Erlenmeyerkolben mit der ÜN-Kultur angeimpft. Die Kultur wuchs bei 37 °C und 240 upm im Inkubator bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 0,8. Die Expression der plasmidkodierten MBP-Proteine wurde mit 1 mM IPTG induziert und die Kultur anschließend bei 37 °C weiterkultiviert. MBP-CPE-Konstrukte wurden mit 1 mM IPTG induziert, auf 30 °C heruntergekühlt und weiterkultiviert. Nach weiteren 3 h im Inkubator wurde die Kultur bei 3220 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert (5810R; Eppendorf AG), das Zellpellet in 15 ml MBP-Lysepuffer resuspendiert und durch zwei bis drei Passagen in einem Homogenisator (French[®]Press; SLM Aminco) aufgeschlossen. Das Lysat wurde bei 4 °C und 20.000 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand anschließend bei 4 °C und 60.000 x g für 1 h zentrifugiert. Dieser Zentrifugationsüberstand wurde 1:3 mit PBS mit 1 mM EDTA verdünnt und auf eine Säule geladen, die mit 5 ml equilibriertem MBP-Amylose-Säulenmaterial (New England BioLabs) gefüllt war. Die an das Säulenmaterial gebundenen MBP-Proteine wurden viermal mit 25 ml MBP-Waschpuffer gespült. Die MBP-Proteine wurden in 15 Fraktionen à 1 ml durch MBP-Elutionspuffer eluiert. Der Proteingehalt und die Reinheit der Proteine in den Elutionsfraktionen wurden durch Protein-Konzentrationsbestimmung (2.3.3) und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; 2.3.4) überprüft. Gegebenenfalls wurden die Elutionsfraktionen ankonzentriert (2.3.3) oder durch Dialyse umgepuffert. Die Proteinproben wurden entweder sofort verwendet, kurzfristig im Kühlschrank (<1 Woche) oder bei -80 °C in 200 µl Aliquots gelagert.

Tab. 2.13: Puffer für die MBP-Proteinreinigungen

Puffer	Zusammensetzung
MBP-Lysepuffer	PBS; 0,1 mM PMSF; 0,2 mM Proteaseinhibitor für Bakterien; 1 µl Benzonase (250 U/µl)
MBP-Waschpuffer	PBS; 1 mM EDTA
MBP-Elutionspuffer	PBS; 1 mM EDTA; 10 mM Maltose

PBS: siehe Tab. 2.7

2.3.2 Expression und Reinigung von GST-Proteinen

Alle in dieser Arbeit erstellten GST-Konstrukte wurden durch Klonierung in pGEX-4T1 (Amersham Biosciences Europe GmbH) generiert. Die Kultivierung, Expression und Ernte der GST-Konstrukte war identisch mit den Bedingungen für die MBP-Konstrukte (2.3.1) mit Ausnahme des LB-Mediums, dem für die GST-Konstrukte keine Glucose zugesetzt wurde. GST-CPE-Konstrukte wurden mit 1 mM IPTG induziert, die Kultur auf 30 °C heruntergekühlt und weiterkultiviert. Nach der Ernte der Zellen wurde das Zellpellet in 20 ml GST-Lysepuffer resuspendiert und durch zwei bis drei Passagen in einem Homogenisator (French[®] Press; SLM Aminco) aufgeschlossen. Das Lysat wurde bei 4 °C und 60.000 x g für 1 h zentrifugiert. Der unverdünnte Zentrifugationsüberstand wurde auf eine mit ca. 2 ml Glutathion-Agarose gefüllte Säule geladen. Das Säulenmaterial wurde viermal mit 25 ml GST-Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte in fünfzehn 1 ml Fraktionen mit GST-Elutionspuffer. Die Proteinproben wurden entweder sofort verwendet, kurzfristig im Kühlschrank (<1 Woche) oder bei –80 °C in 200 µl Aliquots gelagert.

Tab. 2.14: Puffer für die GST-Proteinreinigungen

Puffer	Zusammensetzung
GST-Lysepuffer	PBS mit 0,1 mM PMSF, 0,2 mM Proteaseinhibitor für Bakterien, 1 mM EDTA, 1 µl Benzonase (250 U/µl) und 1 % (v/v) Triton [®] X-100
GST-Waschpuffer	PBS, 1 mM EDTA und 1 % (v/v) Triton [®] X-100
GST-Elutionspuffer	50 mM Tris/HCl pH 8,5; 10 mM reduziertes Glutathion

PBS: siehe Tab. 2.7

2.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung, Konzentrierung und Acetonfällung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry *et al.* (1951) mit dem *Protein Assay Kit* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) nach Herstellerangaben. Albumin aus Rinderserum (BSA) wurde als Proteinstandard verwendet. Die Proben wurden in einem Spektrophotometer DU 640 (Beckman Coulter GmbH) bei 750 nm Wellenlänge und RT vermessen.

Zur Konzentrierung der gereinigten Proteinproben wurden Amicon Ultra-15 (5000 MWCO; Millipore GmbH) Konzentratoren nach Herstellerangaben verwendet.

Um Proteinproben geringer Konzentration in der SDS-PAGE analysieren zu können, wurden die Proteinproben auf Eis mit dem vierfachen Volumen eiskalten Acetons versetzt (Endkonzentration 80 %) und ÜN auf Eis im Kühlraum ausgefällt. Am nächsten Morgen wurden die Proteine in den Proben durch Zentrifugation (30 min, bei 4 °C und 20.000 x g) in der Kühlzentrifuge (5810R; Eppendorf AG) pelletiert. Die Proteinpellets wurden mit 10-15 µl

SDS-Probenpuffer (1x; Tab. 2.15) versetzt, resuspendiert und zur Analyse auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

2.3.4 SDS-PAGE, Fixierung und Färbung von Polyacrylamidgelen

Mit Hilfe der SDS-PAGE lassen sich Proteine ihrer Größe nach auftrennen. Die in dieser Arbeit verwendeten SDS-Polyacrylamidgele und Puffer für die Gelelektrophorese wurden nach dem Standardprotokoll aus Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer (4x) versetzt, für 5 min auf 95 °C erhitzt und auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Cld-enthaltende Proteinproben wurden bei 60 °C für 10 min erwärmt. Bei der Elektrophorese-Apparatur handelte es sich um eine Hoefer SE 250 (Amersham Biosciences Europe GmbH). Verwendet wurden zumeist 12%ige Gele. Die Gele wurden anschließend entweder mit Coomassie-Färbelösung fixiert und gefärbt und danach in Wasser durch mehrmaliges, kurzes Aufkochen in der Mikrowelle entfärbt oder ungefärbt für Immunoblot-Analysen weiter verwendet.

Tab. 2.15: SDS-Probenpuffer und Coomassie-Färbelösung

Puffer	Zusammensetzung
4x SDS-Probenpuffer	200 mM Tris/HCl pH 6,8; 8 % (w/v) SDS; 40 % (v/v) Glycerol; 0,4 M DTT; 0,04 % (w/v) Bromphenolblau
Coomassie-Färbelösung	0,2 g Coomassie TM Brilliant Blue G250; 25 ml 95%iges Ethanol; 17 ml 96%ige Perchlorsäure ad 400 ml dest. H ₂ O

2.3.5 Immunoblot-Methode (Westernblot)

Bei dem spezifischen Nachweis von Proteinen durch die Immunoblot-Methode werden Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Transfermembran (HybondTM-ECL und HybondTM-P; Amersham Biosciences Europe GmbH) übertragen (Towbin *et al.*, 1979) und spezifisch durch Antikörper nachgewiesen. Bei der verwendeten Blot-Apparatur handelte es sich um eine *Semi-Dry*-Transferzelle (Bio-Rad Laboratories GmbH). Für den Proteintransfer wurde ein SDS-Polyacrylamidgel 5 min in Transferpuffer (Tab. 2.16) equilibriert. Gleichzeitig wurden Nitrozellulose-Membranen mit Transferpuffer befeuchtet. PVDF-Membranen wurden zuerst durch Methanol aktiviert, bevor sie mit Transferpuffer benetzt werden konnten. Die Transfermembran wurde in der Blot-Apparatur auf Filterpapiere gebettet (3 mm; Bio-Rad Laboratories GmbH), die mit Transferpuffer vollgesogen waren. Auf die Membran wurde das SDS-Polyacrylamidgel gelegt. Den Abschluss bildete wiederum ein mit Puffer getränktes Filterpapier. Der Proteintransfer erfolgte bei konstanter Spannung (20

V) für 45 min. Um den Transfererfolg zu überprüfen, wurde die Membran anschließend mit Ponceau-Färbelösung (Tab. 2.16) gefärbt. Nach Entfernung der Ponceau-Färbung durch Schwenken in Wasser wurde die Membran ÜN in TBSTM (Tab. 2.16) bei 4 °C geschwenkt. Am nächsten Morgen wurde die Membran einmal 10 min in TBST (Tab. 2.16) gewaschen. Danach wurde der primäre Antikörper (Tab. 2.4) in geeigneter Verdünnung (Herstellerangaben) in TBST mit oder ohne Zusatz von Magermilchpulver zu der Membran gegeben und für 1,5 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem zehnmütigen Waschen mit TBST wurde für 45 min der sekundäre Antikörper (Tab. 2.4; G α M-HRP; G α R-HRP; HRP = *horse radish peroxidase*-Konjugat) hinzugegeben. Nach drei weiteren zehnmütigen Waschschritten in TBST wurde die Membran mit der *ECL Western blotting detection reagents* (Amersham Biosciences Europe GmbH) nach Herstellerangaben entwickelt und mittels Lumi-Imager F1TM (Boehringer-Mannheim GmbH) dokumentiert. Um die Membranen mit einem anderen Antikörper zu inkubieren, wurden gebundene Antikörper durch zweistündige Inkubation mit Ablösepuffer (Tab. 2.16) von der Membran gelöst, mit TBST gespült und über Nacht erneut blockiert.

Tab. 2.16: Puffer für die Immunoblot-Methode

Puffer	Zusammensetzung
Transferpuffer	25 mM Tris-Base; 192 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol
TBST	20 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05 % (v/v) Tween-20
TBSTM	TBST mit 3 % (w/v) Trockenmilchpulver
Ablösepuffer	62,5 mM Tris/HCl pH 6,7; 100 mM 2-Mercaptoethanol; 2 % (w/v) SDS
Ponceau-Färbelösung	0,2 % (w/v) Ponceau S in 1 % (v/v) Essigsäure

2.3.6 Membrangekoppelte Peptidbibliotheken (*peptide array*)

Peptidbibliotheken ermöglichen die parallele Analyse von Protein-Wechselwirkungen eines zu analysierenden Proteins mit einer großen Anzahl an verschiedenen Peptiden. Die parallele Synthese von Peptiden an Zellulosemembranen wird als SPOT-Synthese (Frank, 2002) bezeichnet, da die Synthese der einzelnen Peptide auf kleine kreisförmige Bereiche der Membran (*Spots*) begrenzt ist. Die Peptide sind durch den C-Terminus mit der Membran verbunden. Die in dieser Arbeit verwendeten Membranen wurden in Kooperation mit der Abteilung Peptidsynthese des FMP (Angelika Ehrlich) synthetisiert.

Um hydrophobe Peptide auf der Membran für wässrige Lösungen zugänglich zu machen, wurde die Membran für 10 min mit 20 % DMSO behandelt und anschließend 10 min mit PBS

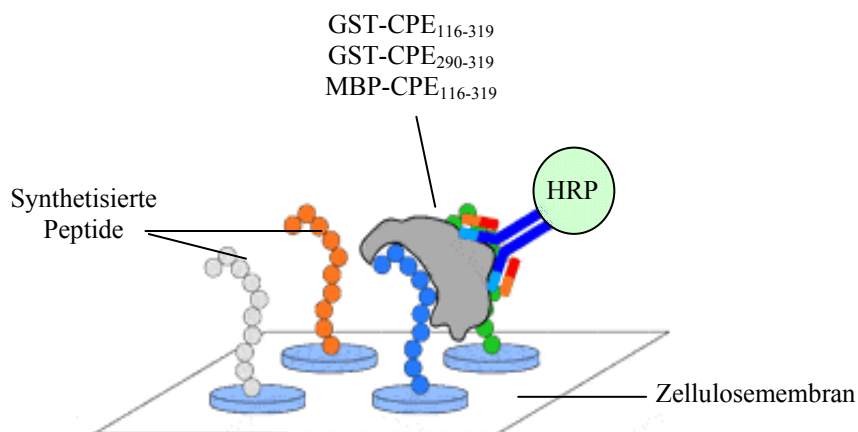


Abb. 2.1: Prinzip der Interaktionsanalyse durch membrangebundene Peptidbibliotheken.

Peptide verschiedener Sequenz und Länge werden C-terminal direkt auf eine Zellulosemembran synthetisiert. Diese Peptidbibliotheken können mehrere Tausend verschiedene Peptide in jeweils kreisförmigen Arealen, den sogenannten *Spots*, umfassen. GST- oder MBP-Fusionsproteine werden in wässriger Lösung zu den Membranen gegeben und binden an Peptide deren Sequenz eine Interaktion erlaubt.

gewaschen. Die Membran wurde anschließend für 3 h mit Blockierungspuffer 1 (Tab. 2.17) blockiert. Nach einem weiteren Waschschrift für 10 min mit TBST (Tab. 2.16) erfolgte die Inkubation der Membran mit 10 µg/ml des zu untersuchenden Proteins in Blockierungspuffer 1 ÜN im Kühlraum unter leichtem Schwenken. Nach drei Waschschriften, für jeweils 10 min mit TBST, folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper 1:2000 MαGST (Tab. 2.4) für GST-Proteine und 1:2000 RαMBP (Tab. 2.4) für MBP-Proteine in Blockierungspuffer 1 (Tab. 2.17) für 3 h. Nach dreimaligem Waschen mit TBST für 10 min wurde der sekundäre Antikörper 1:5000 (Tab. 2.4; RαM-HRP bzw. GαR-HRP) in Blockierungspuffer für 1,5 h auf die Membran gegeben. Nach weiterem dreimaligen Waschen für 10 min in TBST wurde die Membran mit *ECL Western blotting detection reagents* (Amersham Biosciences Europe GmbH) nach Herstellerangaben entwickelt und anschließend am Lumi-Imager F1™ (Boehringer Mannheim GmbH) digital dokumentiert. Die Chemilumineszenz der Membranen wurde durch das Programm LumiAnalyst™ für jeden *Spot* in Form von *Boehringer light units* (BLU) quantifiziert. Um die Membranen ein zweites Mal zu verwenden, wurden die gebundenen Proteine durch zweistündige Inkubation mit Ablösepuffer (Tab. 2.16) von der Membran gelöst, in dest. H₂O gespült und getrocknet im Kühlschrank gelagert.

Tab. 2.17: Puffer für membrangebundene Peptidbibliotheken

Puffer	Zusammensetzung
Blockierungspuffer 1	5 ml 10 x Blocking Reagenz (Sigma-Aldrich Chemie GmbH); 5 ml 10 x TBST; 2,5 g Saccharose; ad 50 ml Milli-Q® Reinstwasser

2.3.7 Immunoblot-Bindungstest (*Overlay assay*)

In dieser *in vitro* Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen wurden 5 µg gereinigtes MBP-Cld5₁₃₈₋₁₆₇, MBP-Cld3₁₄₀₋₁₆₁, MBP-Cld3₁₃₇₋₁₆₆, MBP-CPE₁₁₆₋₃₁₉ oder MBP in einem SDS-Polyacrylamidgel (2.3.4) aufgetrennt und nach der Immunoblot-Methode (2.3.5) auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membranen wurden mit TBST (Tab. 2.16) gespült und ÜN bei 4 °C unter leichtem Schwenken in Blockierungspuffer 1 (Tab. 2.17) blockiert. Am nächsten Morgen wurden die Membranen dreimal für 10 min in TBST gewaschen und ÜN mit 10 µg/ml des Bindungspartners in Blockierungspuffer 1 bei 4 °C inkubiert. MBP-Cld-Fusionsproteine und MBP wurden mit GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ inkubiert, während MBP-CPE₁₁₆₋₃₁₉ mit GST-Cld3₁₃₇₋₁₆₆ inkubiert wurde. Nach zweimaligen Waschen mit TBST und zweimaligen Waschen mit PBS für 10 min wurden die Membranen zum Vernetzen der Proteine in 4%iger (v/v) Paraformaldehydlösung für 30 min bei RT geschwenkt und kurz mit PBS gespült. Die Vernetzungsreaktion wurde durch Inkubation der Membranen für 30 min in einer 2%igen (w/v) Glycin-Lösung bei RT gestoppt. Es folgte eine weitere Blockierung der Membran mit Blockierungspuffer 1 für 3 h bei RT. Vor und nach der dreistündigen Inkubation der Membranen mit dem primären Antikörper MaGST (1:2000; Tab. 2.4) in Blockierungspuffer 1 bei RT wurden die Membranen dreimal mit TBST-Puffer gewaschen. Der sekundäre GaM-HRP Antikörper (1:5000; Tab. 2.4) in Blockierungspuffer 1 wurde für 1,5 h bei RT zu der Membran gegeben. Nach erneutem Waschen wurden die Membranen mit dem *ECL Western blotting detection reagents* (Amersham Biosciences Europe GmbH) nach Herstellerangaben entwickelt und anschließend am Lumi-Imager F1TM (Boehringer Mannheim) digital dokumentiert. Parallel zu den Membranen wurde ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel mit 15 µg der Proteinproben beladen und nach der elektrophoretischen Trennung durch Coomassie-Färbelösung (Tab. 2.15) gefärbt.

2.3.8 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie (auch Gelfiltration genannt) ist ein säulenbasiertes Trennverfahren, das Moleküle aufgrund von Größenunterschieden (Stokes Radius) voneinander separiert. Bei dem Säulenmaterial handelt es sich um eine poröse Matrix aus sphärischen Partikeln, deren Porengröße einen definierten Bereich umspannt. Bei einem Gemisch aus Molekülen unterschiedlicher Größe eluieren Moleküle, die die Porengröße der Matrix überschreiten, im Ausschlussvolumen (V_0). Diese Moleküle passieren die Säule mit der gleichen Geschwindigkeit, wie der Fluss des Puffers. Moleküle mit partiellem Zugang zur Matrix eluieren von der Säule antiproportional zur Molekülgröße bei einem definierten

Elutionsvolumen (V_e). Moleküle, die aufgrund der Größe in jede Pore diffundieren können, eluieren nahe des Totalvolumens der Säule (V_t). V_0 und V_t können praktisch durch die Elutionsvolumina von Blue Dextran 2000 (2000 kDa) und Aceton (0,3 % in Wasser) bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde die analytische Säule Superdex 200 (S200; Amersham Biosciences Europe GmbH) für die Molekulargewichtsbestimmung von Fusionsproteinen und die Superdex Peptide Tricorn 10/300 GL (Amersham Biosciences Europe GmbH) für die Molekulargewichtsbestimmung von Peptiden verwendet. Um die Elutionsvolumina V_0 und V_t sowie V_e verschiedener Protein- und Peptidproben für die Säulen S200 und Superdex Peptide Tricorn 10/300 GL zu bestimmen, wurden die Säulen an ein Hochleistungsflüssigkeits-chromatographie (HPLC)-System (Shimadzu Corporation) angeschlossen und mit filtriertem PBS-Puffer equilibriert. Die lyophilisierten Peptide wurden in PBS pH 7,4 resuspendiert. Die Proteinproben und Peptidproben wurden 10 min bei 20.000 x g zentrifugiert. 50 bis 100 μ l des Überstands wurden auf die jeweilige Säule gegeben. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min wurden die Proteine aufgetrennt und die UV-Absorption der Proteine bei 280 nm bzw. 216 nm (A_{280} bzw. A_{216}) gegenüber der Zeit aufgezeichnet. V_e , V_0 und V_t waren im Chromatogramm als Absorptionsmaxima bei säulen- und probenspezifischem Elutionsvolumen abzulesen. Aus V_e , V_0 und V_t ließ sich der Verteilungskoeffizient (K_{av}) durch die Formel $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$ errechnen. Die K_{av} -Werte verschiedener Größenmarker für die S200 aus den LMW und HMW Gel Filtration *Calibration Kit* (Amersham Biosciences Europe GmbH) gegen das Molekulargewicht dieser Markerproteine aufgetragen, ergibt eine Eichgerade, die zur Errechnung des Molekulargewichtes der Elutionsmaxima von Proteinproben herangezogen werden kann. Für die Erstellung der Eichgerade der Superdex Peptide Tricorn 10/300 GL wurden Markerpeptide verschiedener Größe (520 Da, 1347 Da, 2150 Da, 3046 Da, 3968 Da) verwendet. Basierend auf den Eichgeraden errechnen sich die Molekulargewichte (M_w) von Proteinproben für die S200 in dieser Arbeit aus der Formel $M_w = e^{((K_{av} - 1,076) / -0,1345)}$ und für die Superdex Peptide Tricorn 10/300 GL aus $M_w = e^{((K_{av} - 3,0232) / -0,3279)}$. Gegebenenfalls wurden 1 ml Fraktionen aufgefangen, deren Proteine durch Acetonfällung (2.3.3) ausgefällt und in der SDS-PAGE (2.3.4) analysiert wurden.

2.3.9 Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie

Die Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie ermöglicht es Bindungskinetiken in Echtzeit zu verfolgen. Für die Analyse der CPE-Interaktion mit der 2.EZS von Cld3 und Cld5 wurden die Peptide Cld3₁₄₀₋₁₅₉: Cys-(Acp)-NTIIRDFYNPLVPEAQKREM, Cld3₁₄₀₋₁₅₉/N148D: Cys-

(Acp)-NTIIRDFYDPLVPEAQKREM und Cld5₁₄₁₋₁₆₀: Cys-(Acp)-NIVVREFYDPTVPVSQKYEL synthetisiert (ACP: 6-Amino-Capronsäure als Abstandshalter; Synthese in Kooperation mit Dr. M. Beyermann, FMP). Am N-Terminus der Peptide befand sich ein Cystein, durch das die Peptide durch Thiolkopplung an die Dextranschicht eines CM5-Chip (Biacore AB) C-terminal immobilisiert werden konnten. Dazu wurde in einem BIACORE 2000 Gerät (BIACORE AB) ein CM5-Chip mit filtrierten und entgasten PBS pH 7,4 (Tab. 2.7) über Nacht gespült (5 µl/min) und zur Kopplung mit einem 1:1 Gemisch 400 nM 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carboimid (EDC) und 100 mM N-Hydroxysuccinimid (NHS) in Milli-Q[®] Reinstwasser bei einer Flussrate von 5 µl/min für 20 min aktiviert. Der CM5-Chip wurde danach mit 80 mM 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure (PDEA) in 0,1 M Boratpuffer pH 8,5 bei 0,5 µl/min für 8 min gespült. Die restlichen durch EDC/NHS aktivierten Carboxylgruppen wurden durch 1 M Ethanolamin (5 µl/ml, 20 min) blockiert. Die lyophilisierten Peptide wurden mit einer Konzentration von 1,0 mg/ml in 10 mM Natriumacetat pH 5,0 resuspendiert und bei einer Flussrate von 0,5 µl/min an die Chip-Oberfläche gekoppelt. Nach Erreichen des benötigten Immobilisierungsniveaus wurden die übrigen Thiolgruppen durch Deaktivierungspuffer (100 mM Natriumacetat pH 4, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol) gesättigt. Das Immobilisierungsniveau betrug in den Experimenten zwischen 250 und 500 ΔRU (je nach Peptid zwischen 0,1 bis 0,2 pM). Bei dem Vergleich der Bindungsaffinität von CPE₁₁₆₋₃₁₉ mit CPE₂₉₀₋₃₁₉ an das Cld3_{wt}-Peptid betrug das Immobilisierungsniveau von Cld3_{wt} ca. 1600 ΔRU. Die Resonanzeinheit (RU) gibt indirekt die Masse nahe der Chipoberfläche an. Eine Änderung von 1000 RU entspricht einer Änderung der Oberflächenkonzentration von 1 ng/mm². Der Aufbau eines Oberflächenresonanzsystems ist in Anhang 8.1 gezeigt.

Alle kinetischen Experimente wurden bei einer konstanten Temperatur von 25 °C und einer Flussrate von 8 µl/min durchgeführt. Als Laufpuffer diente filtrierter und entgaster PBS-Puffer (pH 7,4) mit 2 mM DTT. Die zu analysierenden Bindungspartner (Analyt) wurden vor den Experimenten 2 x 2 h gegen Laufpuffer (4 °C) dialysiert und bei 20.000 x g zentrifugiert. Nach einem programmierten Assoziations-/Dissoziations-Zyklus wurde der Analyt für 4 min über die Chipoberfläche gegeben (32 µl; Assoziationsphase). Auf die Assoziationsphase folgten 4 min Dissoziationsphase, bei der über die Chip-Oberfläche anstelle des Analyten Laufpuffer floss. Anschließend wurde die Chipoberfläche durch zwei kurze Waschschrte regeneriert. Abhängig von der Stabilität der Analyt-/Ligand-Bindung wurden die Regenerationsphasen variiert, um die Basislinie zu erhalten. Die Regeneration erfolgte normalerweise mit 10 mM NaOH, 1 M NaCl in dest. H₂O. Bei sehr starken Bindungen wurde

eine 0,2%ige SDS-Lösung verwendet. Allerdings konnte auch mit diesem Regenerationspuffer die Chipoberfläche nach der Bindung von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ an Cld3₁₄₀₋₁₅₉ nur schwer bzw. nicht regeneriert werden. Das Oberflächenplasmonresonanz-Signal wurde alle 0,5 s aufgenommen und gegenüber der Zeit aufgetragen (Sensogramm). Ein Beispielsensogramm ist schematisch in Anhang 8.1 dargestellt. Jedem Sensogramm wurde die Resonanzintensität der Kontrollflusszelle (kein Ligand) abgezogen, sodass im Sensogramm die Δ RU-Werte zu sehen sind. Von den Analyten wurden verschiedene Konzentrationen analysiert. Aus den Sensogrammen ließ sich für jede Konzentration die maximale Assoziation in Δ RU entnehmen. Die Δ RU-Werte von mindestens drei unabhängigen Experimenten pro Konzentration wurden gemittelt und in die Stoffmenge (mol) umgerechnet (1000 RU: GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ = 20,27 fmol; GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ = 33,27 fmol).

2.4 Zellkulturmethoden

2.4.1 Kultivierung von Zellen

Madin-Darby *canine kidney* (MDCK)-II-Zellen (Erhalten von Dr. Papsdorf, FMP) und *human embryonal kidney* (HEK-293)-Zellen (Erhalten von Dr. Krätke, FMP) wurden in HEK-Standardmedium (Tab. 2.7; *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM), 10 % Fötale Kälberserum, 2 mM L-Alanyl-L-Glutamine, 100 U Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin) kultiviert. Die HEK-293-Zellen stammen aus einer humanen embryonalen Nierenzelllinie epithelialen Ursprungs. Die Zellen wurden mit DNA-Fragmenten vom Adeno-Virus Typ 5 transfiziert (Graham *et al.*, 1977).

HEK-293-Zellen wurden bei 37 °C und 10 % CO₂ im Brutschrank (Binder GmbH) kultiviert. Optimales, adhärentes Zellwachstum wurde in Gewebekulturflaschen der Firma Greiner Bio-one GmbH (Tab. 2.1) erreicht, die zuvor mit 25 µg/ml (Endkonzentration) Poly-L-Lysin zur besseren Anheftung der Zellen für 30 min beschichtet worden waren. Alternativ wurden die Zellen auch in Gewebekulturtestplatten mit sechs oder 24 Vertiefungen (2 cm² und 10 cm², TPP Techno Plastic Products AG) ausgesät, sowie in 10 cm² Einzelschalen (Greiner Bio-One GmbH), wahlweise auf Glasdeckgläschen, die ebenfalls mit Poly-L-Lysin beschichtet waren. Bei konfluentem Zellwachstum wurden die Zellen alle drei bis vier Tage 1:3 verdünnt, indem das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann für <10 min mit Trypsin/EDTA-Lösung (Tab. 2.7; Volumen entsprechend der Kulturgefäßfläche; bei 75 cm² wurden 1,5 ml verwendet) bei 37 °C behandelt wurden. Die Zellen wurden durch leichtes Klopfen von der Gefäßoberfläche gelöst und, angepasst an das entsprechende Kulturgefäß, in HEK-Standardmedium resuspendiert. In entsprechender Verdünnung wurden

die Zellen in ein neues Kulturgefäß überführt und durch leichtes Schwenken gleichmäßig verteilt. Sämtliche Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sterilwerkbank S-1200 (BDK Luft- und Feintechnik GmbH) durchgeführt.

2.4.2 Kryokonservierung und Auftauen von eukaryotischen Zellen

Zur Langzeitlagerung wurden eukaryotische Zellkulturen (z. B. einer 75 cm²-Gewebekulturflasche) durch Trypsinierung vom Substrat abgelöst, in 10 ml HEK-Standardmedium (siehe Tab. 2.7) resuspendiert und für 5 min bei 4 °C und 1200 upm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 3,75 ml Einfriermedium (Tab. 2.7) resuspendiert, in 750 µl Aliquots bei –80 °C in einem Kryocontainer (Nalgene Labware, Rochester, NY, USA) eingefroren und im flüssigem Stickstoff gelagert. Da DMSO bei RT toxisch auf die Zellen wirkt, wurden alle Einfrierschritte auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad bei 37 °C erwärmt, zügig in vorgewärmtes Kulturmedium in einem Kulturgefäß überführt und durch Schwenken gleichmäßig verteilt.

2.4.3 Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Plasmid-DNA

Transfektionen von eukaryotischen Zellen mit Plasmid-DNA wurden mit LipofectamineTM2000 (Invitrogen) durchgeführt.

Am Tag vor der Transfektion wurden Kulturgefäße mit Poly-L-Lysin (25 µg/ml, Endkonzentration) für 30 min beschichtet, HEK-293-Zellen subkonfluent (Zelldichte ~70 %) eingesät und über Nacht kultiviert. Am darauf folgenden Tag sollten die Zellen eine Zelldichte von 90-95 % erreicht haben. An die Kulturgefäßfläche angepasste Volumina LipofectamineTM2000 und Mengen Plasmid-DNA (siehe Herstellerangaben, Invitrogen) wurden jeweils mit Opti-MEM-Medium (Invitrogen) gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die DNA- und LipofectamineTM2000-Ansätze vereint, vorsichtig gemischt und für weitere 20 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde bei den zu transfizierenden Kulturen ein Mediumwechsel gegen HEK-Standardmedium (Tab. 2.7) ohne Antibiotikum durchgeführt und das DNA-LipofectamineTM2000-Gemisch hinzugegeben. Transfektionen wurden über Nacht (12-16 h) durchgeführt. Am Morgen erfolgte ein weiterer Mediumwechsel gegen HEK-Standardmedium.

2.4.4 Generierung von stabil transfizierten HEK-293-Zellen

Um klonale Variationen zu minimieren, wurden keine Einzelklone sondern eine Mischzelllinie präpariert, in der die Zellen verschiedene Expressionsniveaus des jeweiligen

Cld5-YFP-Konstruktes aufwiesen. Dazu wurden HEK-293-Zellen in Poly-L-Lysin (25 µg/ml Endkonzentration) beschichtete 25 cm²-Kulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH) ausgesät, im HEK-Standardmedium (Tab. 2.7) bis zu einer Zelldichte von ~90 % kultiviert und mit dem entsprechenden Cld5-YFP-Konstrukt transfiziert (2.4.3). Die transfizierten HEK-293-Zellen wurden in HEK-Standardmedium mit 0,5 mg/ml G418 (Tab. 2.7; BD Biosciences Clontech) kultiviert. Nach ungefähr zwei Wochen setzte massives Zellsterben ein. In dieser Phase wurde, je nach Bedarf, öfter das Kulturmedium gewechselt, die Zellen in kleinere Kulturgefäße replattiert und zwischenzeitlich in HEK-Standardmedium ohne Antibiotika kultiviert. Zwei bis drei Wochen nachdem keine Zellen mehr abstarben, wurden die G418-resistenten Zellen vereint (stabil transfizierte, unsortierte Zellen). Zellen, die kein YFP exprimierten, wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie, unter Verwendung des FACSVantage SE System von BD Biosciences Clontech, ausselektiert. Mehr als 95 % der Zellen exprimierten danach das entsprechende Cld5-YFP-Konstrukt (stabil transfizierte, sortierte Zellen). Die Selektion mittels Durchflusszytometrie wurde von Hans-Peter Rahn (Max-Delbrück-Centrum, Berlin) durchgeführt.

2.4.5 Zelloberflächenbiotinylierung

HEK-293-Zellen wurden mit einer Zelldichte von ca. 70 % in Poly-L-Lysin-beschichtete 10 cm²-Gewebe Kulturschalen (Greiner Bio-One GmbH) ausgesät und nach 24 Stunden mit Cld5-YFP transfiziert (2.4.3). Alternativ wurden stabil transfizierte, unsortierte Cld5-YFP-exprimierende HEK-293-Zellen ausplattiert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen im Eiswasserbad abgekühlt und zweimal mit eiskaltem PBS-CM gewaschen. Alle anschließenden Schritte wurden mit 4 °C kalten Lösungen und auf Eis durchgeführt. Die Kulturen wurden im Kühlraum für 50 min mit 0,4 mg/ml EZ-link-NHS-SS-biotin (Pierce, Perbio Science Deutschland GmbH) in 1,3 ml PBS-CM unter ständigem, sanftem Schwenken (40 upm) inkubiert. Die Kulturen wurden zweimal mit PBS-CM gewaschen, die Biotinylierungsreaktion durch Inkubation für 15 min mit 5 ml 50 mM Glycin in PBS-CM pro 10 cm²-Schale gestoppt und die Zellen drei weitere Male mit PBS-CM gewaschen. Die Zellen wurden abgeschabt (in PBS-CM), pelletiert (300 x g, 2 min, 4 °C), die Zellpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur Analyse wurden die Zellpellets in 200 µl RIPA-Puffer (Tab. 2.18) mit Proteaseinhibitorcocktail (1:25 nach Herstellerangaben, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) für 10 min auf Eis lysiert und unlösliche Zellbestandteile bei 10.000 x g, 5 min und 4 °C abzentrifugiert. Gleichzeitig wurden Zentrifugationssäulchen (MoBiTec, Göttingen,

Deutschland) mit 40 µl (50 % Suspension) UltraLink *immobilized* NeutrAvidin™ Protein Plus (Pierce, Perbio Science Deutschland GmbH) Säulenmaterial befüllt und zweimal mit 500 µl RIPA-Puffer gewaschen (2 min, 300 x g, 4 °C). Das Säulenmaterial wurde mit den Lysatüberständen vermischt, die Säulchen verschlossen und der Ansatz für 2 h bei 4 °C im Rotator (Stuart Scientific) inkubiert. Die an das Säulenmaterial gebundenen biotinylierten Proteine wurden durch Zentrifugation für 2 min bei 300 x g und 4 °C von den ungebundenen Lysatbestandteilen getrennt, der Durchfluss aufgefangen und gekühlt aufgehoben. Das Säulenmaterial wurde viermal mit 500 µl RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitorcocktail (1:125 nach Herstellerangaben; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) gewaschen. Die biotinylierten Proteine wurden mit 40 µl SDS-Probenpuffer und 40 mM DTT versetzt, für 15 min bei RT geschüttelt und durch Zentrifugation (2 min, 300 x g, 4 °C) eluiert. Die Elutionsfraktionen (Zelloberflächenfraktion) sowie 10 % der Lysatfraktionen (Zentrifugationsüberstand) wurden auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel (2.3.4) getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran (2.3.5) transferiert. Claudine wurden durch die primären Antikörper α Cld3 bzw. α Cld5 1:4000 in TBST und den sekundären Antikörper G α R-HRP 1:5000 in TBST mit 1 % Magermilchpulver nachgewiesen (Antikörper siehe Tab. 2.4) und mit dem *ECL Western blotting detection reagents* (Amersham Biosciences Europe GmbH) nach Herstellerangaben entwickelt. Die Chemilumineszenzintensitäten wurden mit Hilfe des Lumi-Imager F1™ (Boehringer-Mannheim GmbH) in Form von BLU-Werten bestimmt. Die BLU-Gesamtintensitäten der immunreaktiven Banden eines Konstruktes in einer Spur wurden sowohl für die Lysatfraktion, als auch für die Zelloberflächenfraktion quantifiziert. Für jedes Cld5-YFP-Konstrukt wurden diese Gesamtintensitäten der Zelloberflächenfraktionen auf die Gesamtintensität der Zelloberflächenfraktion der Cld5_{wt}-YFP-Spur normalisiert (interner Standard in jedem Experiment). Entsprechend wurden die Gesamtintensitäten der Lysatfraktionen normalisiert. Anschließend wurde aus den normalisierten Intensitätsniveaus der Zelloberflächenfraktionen und der Lysatfraktionen der Quotient gebildet, der die Zelloberflächenbiotinylierungsrate ergibt. Diese liegt für Cld5_{wt} bei 1,0. Für jedes Konstrukt wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Tab. 2.18: Lysepuffer für HEK-293-Zellen (RIPA-Puffer)

Puffer	Zusammensetzung
RIPA-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1,0 % (v/v) NP-40; 0,5% (w/v) DOC und 0,1 % (w/v) SDS

2.4.6 Immunfluoreszenzfärbungen

Für immunzytochemische Färbungen wurden HEK-293-Zellen in einer Gewebekulturtestplatte (24 Vertiefungen) auf Poly-L-Lysin-beschichtete (25 µg/ml; 1 h; 37 °C) Deckgläschen (12 mm Ø) eingesät und mit der gewünschten Plasmid-DNA transfiziert (2.4.3). Zwei bis drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und die Deckgläschen in eine Deckgläschenhaltevorrichtung überführt. Für Kokulturen wurden HEK-293-Zellen in unbeschichteten 2 mm²-Kulturgefäßen (Gewebekulturtestplatte) kultiviert und mit entsprechender Plasmid-DNA jeweils einzeln transfiziert. Die in der Kokultur zu vereinenden Einzelkulturen wurden ein Tag nach der Transfektion durch 10-minütige Behandlung der Zellen mit Trypsin/EDTA (37 °C) abgelöst, in HEK-Kulturmedium resuspendiert auf Poly-L-Lysin-beschichtete (25 µg/ml, 1 h, 37 °C) Deckgläschen (12 mm Ø) 1:2 gemischt ausgesät. Die Kokulturen wurden zwei weitere Tage kultiviert und in eine Deckgläschenhaltevorrichtung überführt. Die Halterung mit den Deckgläschen wurden nacheinander in drei vorbereitete Bäder überführt, die sich eisgekühlt im Eis-/Wasserbad befanden. Im ersten Bad wurden die Zellen durch Aceton für 5 min fixiert, gefolgt von 1 min im Ethanolbad und 1 min im PBS-Bad. Die Deckgläschen wurden danach in einer Petrischale mit der Zellseite nach oben auf Parafilm[®]M platziert und bei RT jeweils für 10 min mit zwei bis drei Tropfen Blockierungspuffer 2 (1 % BSA; 0,05 % Tween 20; 0,02 % Natriumazid in PBS) überschichtet. Anschließend wurde der Blockierungspuffer abgesaugt und die Deckgläschen mit dem ersten Antikörper oder einem Antikörpergemisch in 60 µl Blockierungspuffer 2 für 1 h bei RT inkubiert. Standardgemäß wurden die Antikörper (Tab. 2.4), sofern nicht anders angegeben, mit einer Verdünnung von 1:250 eingesetzt. Anschließend wurden die Deckgläschen fünfmal mit Blockierungspuffer 2 gewaschen und danach mit dem zweiten Antikörper (oder einer Antikörpermischung) in 60 µl Blockierungspuffer 2 für 30 min bei RT inkubiert. Um Zellkerne anzufärben wurde zum zweiten Antikörperansatz 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) hinzugesetzt. Erneut fünfmal mit Blockierungspuffer 2 gewaschen, wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten durch ein Tropfen Einbettmedium auf Objektträger fixiert. Die Objektträger wurden zur Aushärtung ÜN bei 4 °C oder für 2 h bei RT gelagert und anschließend durch ein LSM510-META (UV oder NLO) konfokales Mikroskop mit einem PlanNeofluar 100x/1.3 Öl-Objektiv (Carl Zeiss Jena GmbH) analysiert. Die Eigenfluoreszenzen von YFP-Fusionsproteinen und die Fluoreszenzen der gegen GαR-AlexaFluor488 oder GαM-AlexaFluor488 (Tab. 2.4) gefärbten Präparate wurden bei einer Anregungswellenlänge (λ_{exc}) von 488 nm (Argon-Laser) und die Emission (λ_{em}) zwischen 500 und 530 nm detektiert. Cy3-konjugierte Anti-Maus-

oder Anti-Kaninchen-Antikörper wurden bei $\lambda_{\text{exc}} = 543$ nm (HeNe-Laser) angeregt und bei $\lambda_{\text{em}} > 560$ nm detektiert. DAPI wurde bei $\lambda_{\text{exc}} = 364$ nm angeregt und bei $\lambda_{\text{em}} = 385\text{-}470$ nm detektiert.

2.4.7 Lebendzellfärbungen

Für Lebendzellfärbungen wurden HEK-293-Zellen in unbeschichtete 10 cm^2 -Kulturgefäße eingesät und mit gewünschter Plasmid-DNA transfiziert (2.4.3). Nach 24 h wurden die Zellen durch Behandlung mit Trypsin/EDTA (siehe Kap. 2.4.1) abgelöst, in 4 ml HEK-Standardmedium durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert und gleichmäßig auf zwei Poly-L-Lysin ($25\text{ }\mu\text{g/ml}$; 1 h; $37\text{ }^\circ\text{C}$) beschichtete Deckgläschen ($35\text{ mm } \varnothing$) in 10 cm^2 -Gewebekulturtestplatten replattiert. Nach zwei Tagen wurden die Deckgläschen in einen Deckgläschenhalter eingespannt und mit DMEM ohne Phenolrot mit 10 mM HEPES pH 7,5 überschichtet. Die Zellen wurden im LSM510-META (UV oder NLO) mit einem PlanNeofluar $100\times/1.3$ Öl-Objektiv (Carl Zeiss Jena GmbH) bei RT analysiert. Die Plasmamembranen wurden durch Zugabe von $60\text{ }\mu\text{l}$ Trypanblau ($0,05\text{ }\%$ (w/v) in PBS) sichtbar gemacht ($\lambda_{\text{exc}} = 543$ nm und $\lambda_{\text{em}} > 560$ nm). YFP wurde bei einer $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm angeregt und bei einer λ_{em} zwischen 500 bis 530 nm detektiert. Für die parallele Detektion von CFP und YFP wurde CFP bei einer $\lambda_{\text{exc}} = 458$ nm angeregt und bei einer λ_{em} zwischen 463 bis 495 nm detektiert, sowie YFP bei einer $\lambda_{\text{exc}} = 514$ nm angeregt und bei einer λ_{em} zwischen $526,8$ bis $633,8$ nm detektiert.

Um die Anreicherung von Cld5 an Zell-Zell-Kontakten zwischen zwei Cld5-YFP- (oder Cld3-CFP-) exprimierenden Zellen zu quantifizieren, wurden die Fluoreszenzintensitätsprofile der konfokalen Aufnahmen im Querschnitt von lebenden Zellen analysiert. Das Prinzip der Anreicherung ist schematisch in Abbildung 3.9 A (Kap. 3.3.2.3) dargestellt. Plasmamembranen an Zell-Zell-Kontakten wurden durch Fluoreszenzintensitätsmaxima der Trypanblaufärbung identifiziert. Gemessen wurde die YFP-Fluoreszenzintensität, die mit dem Trypanblau-Fluoreszenzintensitätsmaximum in einem Zell-Zell-Kontakt zwischen zwei Cld-exprimierenden Zellen kolokalisierte (b). Ebenso wurde die YFP-Fluoreszenzintensität gemessen, die mit dem Trypanblau-Fluoreszenzintensitätsmaximum in einem Kontakt zwischen einer Cld5-YFP-exprimierenden und einer nichtexprimierenden Zelle kolokalisierte (a). Als Maß für die Anreicherung an einem Zell-Zell-Kontakt zwischen zwei Cld-exprimierenden Zellen wurde die Intensitätsrate (I) durch die Formel $I = (b/2)/a$ bestimmt. Der Wert b wurde durch zwei geteilt, um eine Anreicherung aufgrund doppelter Cld5-enthaltender Membranen (wie in b) gegenüber einer Membran (wie in a) auszuschließen. Eine Intensitätsrate über 1,5 wurde als Anreicherung definiert. Für jedes Cld5-Konstrukt wurden

mindestens 20 zufällig ausgewählte Zellpaare aus mindestens zwei Experimenten analysiert. Für jedes Zellpaar wurden fünf YFP-Fluoreszenzintensitätswerte für (a) und ebenso viele für (b) quantifiziert.

Neben dem Zelloberflächenbiotinylierungsansatz (2.4.5) wurde die Plasmamembranlokalisation von Cld5-YFP-Konstrukten durch die Analyse der Kollokalisierung der Claudine mit Trypanblau in Lebendzellfärbungen quantifiziert. Wie zuvor für die Anreicherung von YFP-Konstrukten an Zell-Zell-Kontakten beschrieben, wurden im Intensitätsprofil die Fluoreszenzintensitäten der Trypanblaufärbung und der YFP-Konstrukte gemessen. Eine Lokalisation von Cld5-YFP in der Plasmamembran wurde angenommen, wenn das Intensitätsniveau der Trypanblau-Fluoreszenz am Ort des Intensitätsmaximums der YFP-Fluoreszenz des membrannächsten Scheitelpunkts mindestens 65 % der maximalen Intensität der Trypanblau-Fluoreszenz betrug (Abb. 3.7 A). Ein Scheitelpunkt definiert sich über die Mindesthöhe von 100 % über dem Niveau der Hintergrundintensität. Für jede Zelle wurden fünf Intensitätsprofile an Cld-Kontakten und fünf Intensitätsprofile an Zell-Zell-Kontakten zwischen einer Cld-exprimierenden Zelle und einer nichtexprimierenden Zelle untersucht. Es wurden mindestens 20 Zellen pro Mutante in zwei unabhängigen Experimenten vermessen und der Durchschnittswert der Plasmamembranlokalisation errechnet.

2.4.8 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Mit der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-(FRET)-Methode können Proteininteraktionen indirekt bestimmt werden. Dabei wird Photonenenergie strahlungsfrei von einem bei 458 nm angeregten CFP-Fluorophor (Donor) auf ein YFP-Fluorophor (Akzeptor) übertragen, wenn der Abstand zwischen beiden nicht mehr als 10 nm beträgt (Karpova *et al.*, 2003).

Für die FRET-Analyse wurden HEK-293-Zellen in 10 cm²-Kulturgefäßen ausgesät. Bei einer Zelldichte von etwa 90 % wurden HEK-293-Zellen mit jeweils 2 µg Cld5_{wt}-CFP und YFP-Konstrukten von Cld5_{wt} oder Cld5-Mutanten kotransfiziert. Als Negativkontrollen wurden Kotransfektionen von Cld5_{wt}-CFP und den Plasmamembranproteinen CRFR1-YFP (*Corticotropin releasing factor receptor 1*, Dr. O. Krätke, FMP) oder YFP-AQP1 (Aquaporin-1, Dr. S.P. Tsunoda, FMP) vorgenommen, da angenommen wird, dass diese nicht mit Cld5 interagieren. AQP1 und CRFR-1 werden normalerweise nicht in HEK-293-Zellen exprimiert (Gao *et al.*, 2005; Heinrich *et al.*, 1998). Weitere Negativkontrollen waren Kotransfektionen von CFP und YFP, sowie CFP und Cld5_{wt}-YFP. Als Positivkontrolle wurde ein CFP-YFP-Fusionsprotein verwendet.

Einen Tag nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen auf Poly-L-Lysin-beschichtete (25 µg/ml, 1 h, 37 °C) 10 cm²-Deckgläser replattiert und zwei weitere Tage in HEK-Standardmedium kultiviert. Am dritten Tag nach der Transfektion wurden die bewachsenen Deckgläser in einen Deckgläserhalter eingespannt und mit DMEM ohne Phenolrot mit 10 mM HEPES pH 7,5 überschichtet. Die Zellen wurden im LSM510-META (UV oder NLO; Carl Zeiss Jena GmbH) analysiert.

FRET wurde nach der Akzeptor-Bleich-Methode bestimmt, bei der das YFP-Fluorophor photochemisch zerstört (geblichen) wird. Das bewirkt einen Anstieg der CFP-Emission, die als Maß für die FRET-Effizienz (E_F) dient. Die Intensität der CFP-Emission wird zur Bestimmung der E_F vor (I_A) und nach (I_B) dem selektiven Bleichen des YFP-Akzeptors gemessen. Die E_F errechnet sich nach der Formel $E_F = ((I_A - I_B) \times 100) / I_A$. Um I_A und I_B zu bestimmen, wurden Cld-Kontakte von Zellpaaren, die sowohl YFP- als auch CFP-Fluoreszenz zeigten, gesucht. Das Areal der Kolo-kalisation von YFP und CFP wurde zur Messung der Intensität eng umrahmt. Innerhalb des Rahmens wurde eine Zeitserie von vier Zyklen, die jeweils drei Einzelschritte umfassten, aufgenommen. Im ersten Schritt wurde die YFP-Intensität gemessen. Im zweiten Schritt wurde die CFP-Intensität gemessen und im dritten Schritt wurde das YFP-Fluorophor bei 514 nm und 100 % Laserintensität geblichen. Nach der Zeitserie wird der anfängliche CFP-Intensitätswert I_B mit dem höchsten CFP-Intensitätswert I_A in der oben genannten Formel in Beziehung gesetzt. In jedem Experiment wurde Cld5_{wt}-CFP/Cld5_{wt}-YFP als interner Standard verwendet. Die relative FRET-Effizienz

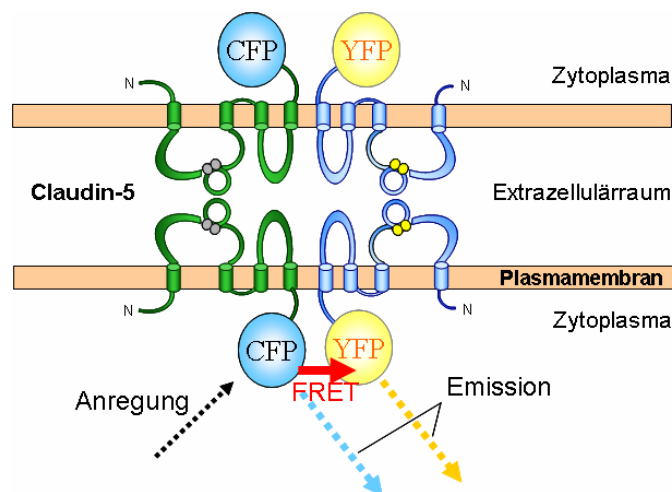


Abb. 2.2: Prinzip der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Methode.

Nach Kotransfektion von Cld5_{wt}-CFP und Cld5_{wt}-YFP in HEK-293-Zellen lokalisieren beide Fusionsproteine an Zell-Zell-Kontakten zwischen zwei Cld5-exprimierenden Zellen. Interagiert Cld5-CFP mit Cld5-YFP innerhalb der Plasmamembran einer Zelle (*cis*-Interaktion) kommt es nach Anregung des CFP zum Transfer von Photonenenergie auf das YFP, das nun ebenfalls Fluoreszenz emittiert. Der Abstand zwischen beiden Fluorophoren darf dabei nicht mehr als 10 nm betragen. Ein Transfer von Photonenenergie ist nicht zwischen Cld5-YFP und Cld5-CFP zweier benachbarter Zellen (*trans*-Interaktion) möglich, da zwischen YFP und CFP die Plasmamembranen beider Zellen liegen. Die FRET-Methode ermöglicht es daher, *cis*-Interaktionen von *trans*-Interaktionen getrennt zu analysieren.

wurde aus dem Quotienten der FRET-Effizienz von Cld5_{wt}-CFP/YFP-Fusionsprotein-Paarungen (Cld5-YFP-Mutanten und YFP-Kontrollkonstrukte) geteilt durch die durchschnittliche FRET-Effizienz der Cld5_{wt}-CFP/Cld5_{wt}-YFP-Paarungen errechnet. Für die Quantifikation der relativen FRET-Effizienzen wurden folgende Laser- und Detektoreinstellungen festgelegt: YFP: Laserintensität 1 %, *Pinhole* 400 μm , Detector Gain 700; CFP: Laserintensität 15 %, *Pinhole* 400 μm , Detector Gain 700. Aufgrund von Vorversuchen (siehe 3.5.1) wurden nur Zellpaare verwendet, bei denen die relative CFP-Fluoreszenzintensität zwischen 400 und 2000 und die relative YFP-Fluoreszenzintensität zwischen 250 und 3000 lag. Um die Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, musste das YFP-/CFP-Fluoreszenzintensitätsverhältnis der Einzelmessung über 0,8 betragen. Die emittierte Fluoreszenz des CFP wurde zwischen 462,6 und 494,7 nm und die YFP-Fluoreszenz zwischen 526,8 und 633,8 nm detektiert.

2.4.9 Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie

Mit Cld5_{wt}-YFP und Cld5-YFP-Mutanten transient oder stabil transfizierte (sortierte) HEK-293-Zellen wurden in Poly-L-Lysin-beschichtete (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 min, 37 °C) 25 cm^2 -Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH) bis zur Konfluenz kultiviert, mit PBS-CM gewaschen und für 2 h mit 2,5 % Glutaraldehyd (in PBS-CM) in der Zellkulturflasche fixiert. Für die Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie wurden die Zellen, wie in Mack und Wolburg (2006) publiziert, durch Hartwig Wolburg (Universität Tübingen) präpariert und analysiert.

2.4.10 *Clostridium perfringens* Enterotoxin-Zellinkubationsansatz

HEK-293-Zellen wurden mit einer Zelldichte von 70 % in Poly-L-Lysin-beschichtete (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 min, 37 °C) 2 cm^2 -Gewebekulturtestplatten (24 Vertiefungen) eingesät und in HEK-Standardmedium kultiviert. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen mit Cld5-Konstrukten transfiziert (siehe 2.4.3) und für weitere zwei bis maximal drei Tage kultiviert. Danach wurden die konfluenten HEK-293-Zellen für 1 h bei 37 °C mit dialysierten 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ GST oder GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ in 500 μl HEK-Standardmedium inkubiert. Die Gewebekulturtestplatte wurde anschließend auf Eis gestellt und viermal mit eiskaltem PBS-CM gewaschen. Danach wurden die Zellen durch vorsichtiges Abspülen vom Kulturgefäßboden mit 1 ml eiskaltem PBS-CM resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (500 x g, 5 min, 4 °C) geerntet, bis zur weiteren Verwendung im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert oder sofort weiterverwendet. Um die CPE-Bindung an die transfizierten Zellen

quantitativ zu bestimmen, wurden die Zellpellets in 30 μ l RIPA-Puffer (Tab. 2.18) mit 1:25 Proteaseinhibitorcocktail (Herstellerangaben, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) für 10 min auf Eis lysiert und anschließend bei 10.000 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Zentrifugationsüberstand wurde mit 8 μ l NuPAGE-LDS-Probenpuffer (4x; Invitrogen) und 1,5 μ l DTT (1 M) versetzt und für 5 min bei 60 °C inkubiert. Exakt die Hälfte des Volumen der Proben wurde auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, die Proteine aufgetrennt, anschließend nach der Immunoblot-Methode (siehe 2.3.5) auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert, ÜN in TBSTM (Tab. 2.16) blockiert und danach mit Antikörpern (Tab. 2.4) inkubiert. Die Membran wurde mit dem primären Antikörper M α GST (1:2000) in TBST (Tab. 2.16) mit 1 % Magermilchpulver und dem sekundären Antikörper G α M-HRP (1:5000) in TBST gefärbt und mit der *ECL Western blotting detection reagents* (Amersham Biosciences Europe GmbH) im Lumi-Imager F1TM (Boehringer-Mannheim GmbH) entwickelt. Anschließend wurden die gebundenen Antikörper (Amersham Biosciences Europe GmbH) durch Ablösepuffer (Tab. 2.16) entfernt, die Membran zweimal für 10 min mit TBST bei RT gewaschen, erneut ÜN blockiert und mit Antikörpern inkubiert. Bei dem primären Antikörper handelte es sich um einen R α Cld5-Antikörper (1:4000 in TBST) und bei dem Sekundärantikörper um G α R-HRP (1:5000 in TBST mit 1 % Magermilchpulver).

Die Biolumineszenz der immunreaktiven Banden der α GST- bzw. α Cld5-Färbungen wurde in Form von BLU-Werten mit Hilfe des LumiAnalystTM-Programms (Boehringer Mannheim) quantifiziert. Für die Quantifikation von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ (CPE-Bindung; BLU_{CPE}) und der Cld5-Konstrukte (Cld-Expressionsniveau; BLU_{Cld}) wurden die Banden bei ca. monomerem Molekulargewicht verwendet, die zugleich auch die prominentesten Signale aufwiesen. Die einzelnen BLU-Werte wurden jeweils auf die Werte für Cld5_{wt}-YFP-exprimierende HEK-293-Zellen (BLU_{Cld5wt}), die mit GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ inkubiert wurden (BLU_{Cld5wt,CPE}), als interner Standard relativiert. Die relative CPE-Bindung wurde anschließend auf das relative Cld-Expressionsniveau normalisiert: relative CPE-Bindung = ((BLU_{CPE} / BLU_{Cld5wt,CPE}) / (BLU_{Cld}/BLU_{Cld5wt})).

2.5 Statistik

Für die statistische Datenerhebung wurden die Programme ORIGIN 6 und Excel (Microsoft) verwendet. Die Messwerte sind, sofern nicht anders angegeben, als Mittelwerte \pm Standardfehler des Stichproben-Mittelwertes (SEM) dargestellt. Signifikanztests wurden mit Anova oder Excel als ungepaarte T-Tests durchgeführt; p<0,01 war signifikant.