

**Identifizierung und Charakterisierung der Bindung zwischen
dem Zonula occludens-Protein 1 und dem Tight junction-
Protein Occludin**

D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des akademischen Grades

D o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biochemie

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
am Institut für Chemie der Freien Universität Berlin

von

Diplom-Ingenieur für Biotechnologie Anke Schmidt
geboren am 26. August 1968 in Suhl

Präsident der Freien Universität Berlin

Univ.-Prof. Dr. Peter Gaehtgens

Dekan des Fachbereiches Biologie, Chemie, Pharmazie

Univ.-Prof. Dr. Konrad Seppelt

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. habil. I.E. Blasig
2. Prof. Dr. H. Oschkinat

eingereicht: 13. Juni 2002

Tag der mündlichen Prüfung: 14. November 2002

Danksagung

Es sei mir gestattet, Dr. I.E. Blasig herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas zu danken. Ebenso danke ich ihm und allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Molekulare Zellphysiologie“ für die ausdauernde Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während der gesamten Zeit der Anfertigung dieser Promotion.

Für die gewinnbringenden Diskussionen und vielen neuen Ideen danke ich besonders herzlich Dr. D.I. Utepbergenov. Bei der Durchführung experimenteller Arbeiten half mir im großen Maße Frau Gislinde Hartmann und dafür bedanke ich mich recht herzlich.

Für die Herstellung einiger Peptide und die Möglichkeit, die SPR-Messungen am FMP durchzuführen, danke ich den Mitarbeitern der AG Peptidchemie unter Leitung von Dr. M. Beyermann, insbesondere Frau Pizarz.

Für die Hilfe bei den experimentellen Arbeiten zum Peptidmapping bedanke ich mich ganz herzlich für die tolle Unterstützung durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Schneider-Mergener aus der Charité. Ein großes Dankeschön an Frau Christiane Landgraf.

Ein Dankeschön gilt auch Dr. D. Labudde für die Durchführung von Arbeiten zur analytischen Ultrazentrifugation.

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
AJ	Adhaerens junction (adhaerens junction)
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäuren
AZ	Astrozyten
BamHI	Restriktionsendonuklease
BHS	Blut-Hirn-Schranke
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CC	Coiled coil
CD	Circulardichroismus
cDNA	komplementäre DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
dNTP`s	2`-Desoxynukleosid-5`-triphosphat (Mix aus äquimolaren Mengen der Nukleoside Adenosin, Thymidin, Guanosin und Zytidin)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EcoRI	Restriktionsendonuklease
EDC	N-Ethyl-N` (dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N` ,N` -tetraessigsäure
EZ	Endothelzellen
FPLC	Flüssigkeitchromatographie (<i>flow performance liquid chromatography</i>)
GKEZ	Gehirnkapillarendothelzellen
GST	Glutathion-S-Transferase
Guk	Guanylatkinase-ähnliche Domäne
HMW	Molekulargewichtsmarker (<i>high molecular weight marker</i>)
IgG	Immunoglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
LMW	Molekulargewichtsmarker (<i>low molecular weight marker</i>)
MBP	Maltosebindungsprotein
MDCK	Madin-Darby Nierenzellen aus Hund (<i>Madin-Darby canine kidney cells</i>)
mRNS	messenger RNA
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase (NO-Synthase)
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDZ	PSD-95/dlg/ZO-1-Domäne
RNase	Ribonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
RU	Resonanzeinheit
Sall	Restriktionsendonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SH3	src homologe 3 Domäne

Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> 9-Zellen (Insektenzellen)
SP	Säulenpuffer
SPR	Oberflächenplasmonresonanz
TER	transepithelialer elektrische Widerstand
TEER	transendothelialer elektrische Widerstand
TFE	Trifluorethanol
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyldiaminomethan
TIR	totale interne Reflexion
TJ	Tight junction
Tris/HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid
T-TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
Upm	Umdrehungen pro Minute
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
wt	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

Zell-Zell-Kontaktproteine

AF-6	akutes lymphatisches Leukämie-Fusinsprotein 6
ASIP	atypisches PKC-isotypspezifisches interagierendes Protein
Dlg	discs large von <i>Drosophila melanogaster</i>
GKAP	Guk-assoziiertes Protein
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül
JAM	junctionales Adhäsionsmolekül
JEAP	junctional angereichertes und assoziiertes Protein
MAGI-1-3	Membran-assoziiertes Guanylatkinase Protein 1-3
MAGUKs	Membran-assoziierte Guanylatkinase homologe Proteine
MUPP1	Multi-PDZ-Domänen Protein 1
PAR	Säugetierhomologes Protein von <i>C. elegans</i>
PILT	Protein, daß später in TJ inkorpiert wird (<i>protein incorporated lately into TJs</i>)
PMP22	peripheres Myelinprotein 22
PSG-ZO-1	PDZ-SH3-Guk-Domänen-enthaltenes ZO-1
SAP	Synapsen-assoziiertes Protein
TMVCF	Transmembranprotein in deletiertem velviocardiofacialen Syndrom
VASP	vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
VCAM	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
ZAK	Zonula Occludens-assoziierte Kinase
ZO-1-3	Zonula Occludens-assoziiertes Protein 1-3
ZONAB	ZO-1-assoziiertes saures Kernbindungsprotein (<i>ZO-1-associated nucleic acid-binding protein</i>)

Mathematische Termini

c	Konzentration des Analyten
k_a	Assoziationsratenkonstante
k_d	Dissoziationsratenkonstante
K_A	Assoziationskonstante
K_D	Dissoziationskonstante
R_t	Resonanz zur Zeit t
R_{eq}	Resonanz im Gleichgewicht zwischen dem gebundenen und freien Analyten

R_{\max}	maximale Resonanz bei Sättigung der Sensorchipoberfläche
dR/dt	Nettowert der Bindungsrate
dR/dt_{const}	Bindungsrate in der Plateauphase am Beginn der Assoziation
t	Zeit

Aminosäuren

Alle Aminosäuren werden mit dem entsprechenden Einbuchstabensymbol bezeichnet:

A, Alanin; C, Cystein; D, Asparaginsäure; E, Glutaminsäure; F, Phenylalanin; G, Glycin; H, Histidin; I, Isoleucin; K, Lysin; L, Leucin; M, Methionin; N, Asparagin; P, Prolin; Q, Glutamin; R, Arginin; S, Serin; T, Threonin; V, Valin; W, Tryptophan; Y, Tyrosin.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG	2
1.1 Die Blut-Hirn-Schranke	2
1.2 Die Bedeutung von Tight junctions und deren Bestandteile	5
1.2.1 Aufbau und Struktur von Tight junctions	5
1.2.2 Zur Rolle von transmembranen Proteinen und ZO-Proteinen in den Tight junctions	11
1.3 Analyse molekularer Wechselwirkungen mit der Oberflächenplasmon- resonanz-Spektroskopie	17
1.4 Zielstellung der Arbeit	19
2 MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Molekularbiologische Techniken	21
2.1.1 Herstellung der Expressionskonstrukte von Occludin und ZO-1	21
2.1.2 Überexpression und Reinigung von Occludin und ZO-1	23
2.1.3 Zellkultivierung	24
2.1.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot	25
2.1.5 Affinitäts- und chromatographische Methoden sowie Synthese von ZO-1-Peptiden	26
2.1.6 Qualitätskontrolle der eingesetzten Proteinlösungen	28
2.2 Verwendung des BIAcore-Systems für SPR-spektroskopische Messungen der molekularen Wechselwirkung zwischen ZO-1 und Occludin	29
2.2.1 Interaktion zwischen ZO-1 und Occludin gemessen mittels SPR-Spektroskopie	29
2.2.2 Kinetische Analyse der SPR-Sensorgramme	32
2.2.3 Optimierung der Bindungsbedingungen zwischen ZO-1 und Occludin	33
2.2.4 Pharmakologische Untersuchungen	34
2.3 Analytische Ultrazentrifugation	35

2.4	Circulardichroismus-Spektroskopie	35
2.5	Bindungsuntersuchungen zwischen zellulosegebundenen Peptidsequenzen aus der Guk-Domäne von ZO-1 und Occludin	36
2.6	Statistische Auswertung	37
3	ERGEBNISSE	38
3.1	Bioinformatische Analyse von Occludin und ZO-1	38
3.2	Polymerasenkettenreaktion zur Herstellung der cDNA-Fragmente von Occludin und ZO-1	39
3.3	Proteinreinigung von Occludin und den ZO-1-Fragmenten	40
3.4	Analytische Ultrazentrifugation zur Bestimmung der Sedimentationseigenschaften von ZO-1	42
3.5	Wechselwirkung von Occludin mit der erweiterten Guk-Domäne von ZO-1	43
3.5.1	Wechselwirkungen von Occludin mit dem C-terminal längeren ZO-1. 644-890 und der eigentlichen Guk-Domäne von ZO-1 (ZO-1.644-812)	44
3.5.2	Wechselwirkungen von Occludin mit ZO-1 Fragmenten, die die Guk-Domäne und/oder CC1 bzw. CC2 enthalten	47
3.5.3	Vergleich aller Bindungsergebnisse der ZO-1-Fragmente an Occludin	47
3.5.4	Auswertung der Sensorgramme zur Bestimmung kinetischer Konstanten	49
3.5.5	Charakterisierung der Spezifität der Interaktion zwischen Occludin und ZO-1	52
3.5.6	Einfluß der SPR-Meßbedingungen auf die Interaktion zwischen Occludin und ZO-1 und Optimierung der Regenerationslösung	53
3.5.7	Effekt von SIN-1 in pharmakologischen Untersuchungen	57
3.6	Wechselwirkung von Peptidsequenzen aus ZO-1 mit Occludin	58
3.6.1	SPR-Bindungsuntersuchungen zwischen den ZO-1-Peptidsequenzen und Occludin	59
3.6.2	Affinitätsbindung und Koimmunopräzipitation von Occludin mit ZO-1-Peptidsequenzen	62
3.6.3	Charakterisierung der Peptidsequenz CC2a aus der Guk-Domäne von ZO-1 als Bindungsregion für Occludin	64

3.7	Circulardichroismus-Spektroskopie von CC1, CC2a und CC2b aus ZO-1 und eines verkürzten C-terminalen Teils von Occludin	66
4	DISKUSSION	69
4.1	Vor- und Nachteile der SPR-Spektroskopie bei der Bestimmung kinetischer Konstanten	69
4.2	Aufklärung des Wechselwirkungsmechanismus zwischen Occludin und ZO-1	73
4.2.1	Coiled coil-Regionen der Guk-Domäne und Bereiche in der Drehangelregion von ZO-1 sind Bindungsepitope für Occludin	73
4.2.1.1	Charakterisierung des Bindungsverhaltens von Occludin an CC2a	78
4.2.1.2	Charakterisierung des Bindungsverhaltens von Occludin an CC2b	80
4.2.1.3	Charakterisierung des Bindungsverhaltens von Occludin an CC1	82
4.2.2	Oligomerisierung von ZO-1 zur Makroproteinkomplexbildung in den Tight junctions?	83
4.3	Ausbildung von Barriereigenschaften durch vielfältige Interaktionen zwischen Proteinen der Tight junction	89
5	SCHLUßFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	92
6	LITERATURVERZEICHNIS	96
7	ANHANG	112
7.0	Abstract	112
7.1	Nomenklatur und Aminosäuresequenzen der verwendeten Fusionsproteine und Peptide	113
7.2	Theorie zur Berechnung kinetischer Konstanten	115
7.3	Abschätzung der Belegungsdichte der immobilisierten Peptide auf dem Sensorchip	116
7.4	Zusammenfassung der SPR-spektroskopischen Daten	116
7.5	Auswertung der Längenanalyse von CC2a ₂₀ mit GST-Occludin	126
7.6	Abbildungsverzeichnis	127