

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Techniken

2.1.1 Herstellung der Expressionskonstrukte von Occludin und ZO-1

Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (PCR). Gesamt-RNA wurde aus 50 mg Mäusen isoliert. Die Homogenisierung erfolgte in TRIzol Reagenz (Life Technologies, Eggenstein, Germany) unter 10-minütiger Zentrifugation bei 4 °C (10.000 x g) und entsprechender Isolierung der RNA nach den Herstellerangaben. Die Reinheit der RNA wurde mittels horizontaler Flachgelelektrophorese überprüft. Als Gelmatrix wurde Agarose (1-2% in TAE-Puffer: pH 8,8 aus 40 mM Tris/Acetat und 1 mM EDTA), versetzt mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid, verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 1-10 V/cm im TAE-Puffersystem unter Zugabe von 0,25 Volumenanteilen Ladungspuffer (pH 7,5, 10 mM Tris/HCL, 0,25% Bromphenolblau, 30% Glycerol). Die Konzentration der RNA wurde photometrisch über die Extinktion bei 260 nm bestimmt ($1OD_{260} = 40 \mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Die cDNAs wurden aus 1 µg RNA mittels reverser Transkription mit 200 U MuMLV (Moloney murine leukemia virus) reverser Transkriptase unter Nutzung von 10 µM *random hexamer* Primer, bei 40 °C 1 h transkribiert (Promega, Madison/WI, USA).

Die Polymerasekettenreaktion zur Amplifizierung aller cDNA-Transkripte lief unter folgenden Bedingungen ab: 22 Zyklen, 94 °C für 30 s, 68 °C für 1 min, 72 °C für 45 s. Das cDNA-Fragment, entsprechend dem C-terminalen Teil von Occludin (AS 264-521; 774 Bp), wurde mittels PCR unter Verwendung des Primers 5'-TTG TCG ACT AAG TTT CCG TCT GTC ATA GTC-3' und des Primers 5'-AAA GGA TCC AAA ACC CGA AGA AAG ATG GAT CGG-3' amplifiziert. Unterstrichen sind die eingefügten Erkennungsbereiche der Restriktionsendonukleasen von Sall and BamHI und fett hervorgehoben ist das Stopcodon. Das für die SPR-Bindungsmessungen verwendete kürzere Occludinfragment AS 378-521 (432 Bp) wurde mit dem Primer 5'-AAA GGA TCC AAA AGG GCT CCC ACG AAG GGG AAA-3' amplifiziert.

ZO-1- Transkript	Primersequenzen (5'-3'sense; 5'-3'antisense)	Länge (Bp)
ZO-1.644-890	AAAGGATCCCTAAGACCTGTAACCATCTTTGGA GGGGGTCGACCTAATGATGCATTCCAGAGGAATC CTCTC	738
ZO-1.644-812	AAAGGATCCCTAAGACCTGTAACCATCTTTGGA GGGGTCGACCTAGTCATCACTTGTAGCACCATCCGC	507
ZO-1.644-772	AAAGGATCCCTAAGACCTGTAACCATCTTTGGA AATAAATGTCGACTATGTAGTTGTGAAGAGATGGTG ATTGTTTC	387
ZO-1.644-731	AAAGGATCCCTAAGACCTGTAACCATCTTTGGA GGGGTCGACCTAGTCAGGGTTAAGGAACACAAC	264
ZO-1.601-890	CCCCGGATCCTTCTGGAGGTTTCGAGGTCTTCGG GGGGGTCGACCTAATGATGCATTCCAGAGGAATC CTCTC	870
ZO-1.601-812	CCCCGGATCCTTCTGGAGGTTTCGAGGTCTTCGG GGGGTCGACCTAGTCATCACTTGTAGCACCATCCGC	636
ZO-1.601-772	CCCCGGATCCTTCTGGAGGTTTCGAGGTCTTCGG AATAAATGTCGACTATGTAGTTGTGAAGAGATGGTG ATTGTTTC	516
ZO-1.597-812	CCCGGATCCGATAGGGCAGATTTCTGGAGGTTTCGA GGTCTT GGGGTCGACCTAGTCATCACTTGTAGC ACCATCCGC	648
ZO-1.597-772	CCCGGATCCGATAGGGCAGATTTCTGGAGGTTTCGA GGTCTT AATAAATGTCGACTATGTAGTTGTGAAGAGATGGTG ATTGTTTC	528
ZO-1.597-731	CCCGGATCCGATAGGGCAGATTTCTGGAGGTTTCGA GGTCTT GGGGTCGACCTAGTCAGGGTTAAGGAACACAAC	405
ZO-1.589-812	AAAGGATCCCACTTCCAAAGACAGCGGGTGGTGA TAGGGCAGATTTCTGGAGGTTT GGGGTCGACCTAGTCATCACTTGTAGCACCATCCGC	672
ZO-1.589-772	AAAGGATCCCACTTCCAAAGACAGCGGGTGGTGA TAGGGCAGATTTCTGGAGGTTT AATAAATGTCGACTATGTAGTTGTGAAGAGATGGTG ATTGTTTC	552
ZO-1.589-731	AAAGGATCCCACTTCCAAAGACAGCGGGTGGTGA TAGGGCAGATTTCTGGAGGTTT GGGGTCGACCTAGTCAGGGTTAAGGAACACAAC	429

Tabelle 2.1 Bezeichnung der ZO-1-Transkripte (entsprechen der Bezeichnung der ZO-1-Proteine). Darstellung der verwendeten Primer und der Länge der PCR-Amplifikate. Unterstrichen sind die Erkennungsbereiche der Restriktionsendonukleasen von Sall und BamHI und fett hervorgehoben ist das Stopcodon.

Entsprechend verwendete ZO-1-Fragmente wurden aus der Aminosäuresequenz 601-890 (870 Bp) von ZO-1 mittels der Polymerasenkettenreaktion mit Hilfe des cDNA spezifischen Primers 5'-GGG GGT CGA CCT AAT GAT GCA TTC CAG AGG AAT CCT CTC-3' und des Primers 5'-CCC CGG ATC CTC TGG AGG TTT CGA GGT CTT CGC -3' amplifiziert und enthält die Restriktionsstellen für SalI und BamHI (unterstrichen, fett hervorgehoben: Stopcodon). Alle anderen ZO-1 Fragmente wurden aus diesem Fragment mit Hilfe der in Tabelle 2.1 aufgeführten Primer amplifiziert und entsprechend bezeichnet.

Klonierungsstrategie. Die amplifizierten Produkte wurden in den TOPO TA-Vektor nach den Herstellerangaben (Invitrogen, Carlsbad/CA, USA) kloniert. Die entsprechenden PCR-Amplifikate wurden über eine Minipräparationssäule (QIAGEN, Hilden, Germany) gereinigt und in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA, pH 8) aufgenommen. Die nach Inkubation mit BamHI/SalI (3h, 37 °C) erhaltenen Fragmente dieser Konstrukte wurden unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten und mittels *QIAEX DNA Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Hilden, Germany) aus dem Gel mit TE-Puffer eluiert. Nach der Gelreinigung wurden die geschnittenen Produkte in den pMAL-c2X-Vektor nach den Herstellerangaben (New England Biolabs, Beverly/MA, USA) in Fusion mit dem MBP (Maltosebindungsprotein) N-terminal von Occludin und ZO-1 subkloniert. Occludin.264-521 wurde außerdem in den pGEX-4T-1-Vektor (Pharmacia/Amersham, Germany) in Fusion mit GST (Glutathion-S-Transferase) laut Herstellerangaben subkloniert. Alle Klone wurden durch ihre Sequenzierung überprüft, um sicherzugehen, daß keine Fehler während der PCR-Amplifizierung auftraten (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Warrington, UK; Kooperation mit der Sequenzierungsgruppe am FMP).

2.1.2 Überexpression und Reinigung von Occludin und ZO-1

Überexpression. *E. coli* (TOP10F', Invitrogen/CA, USA) wurde mit den entsprechenden rekombinanten pMAL-c2X-/pGEX-4T-1-Plasmiden transfiziert. In *rich*-Medium, das 10g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 125 mM NaCl, 10 mM Glucose mit 100 µg/ml Ampicillin (Roth, Karlsruhe, Germany) enthielt, wurde *E. coli* bis zur Adsorption von 0.5-0.8 bei 600 nm inkubiert. Anschließend wurde die Überexpression durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid, BioTech, St. Leon-Rot, Germany) bis zu einer Endkonzentration von 0.3 mM induziert und die Zellen für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch

Zentrifugation (3000 x g) für 7 min bei 4 °C geerntet und in Säulenpuffer SP1 resuspendiert (20 mM Tris, 200 mM NaCl and 1 mM EDTA; Merck, Darmstadt, Germany). Die Zellen wurden mit Ultraschall 3 x 15 s mit 10 s Pause auf Eis aufgeschlossen und 2 min bei 14000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Die Lysate wurden mit Filtern von 0,45 µm Porendurchmesser von Zellbruchstücken befreit und mit RNase- (Ribonuklease A, 7156.1, Roth, Germany) und Proteinaseinhibitoren (Proteaseinhibitorcocktail, P-8465, Sigma, Steinheim, Germany) inkubiert.

Reinigung. Die MBP-Fusionsproteine wurden über eine Affinitätssäule aus Amylose-Resin (E8021L, New England BioLabs, Inc., USA) entsprechend der Vorschrift aufgereinigt. Die MBP-ZO-1-Fusionsproteine wurden im Säulenpuffer SP2 (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 10 mM Maltose) und MBP-Occludin in SP3 (20 mM Tris, 10 mM Maltose; J.T. Baker, Deventer, Niederlande) eluiert. GST-Occludin.264-521 wurde über eine Glutathion-Agarose-Säule (G-4510, Sigma, Steinheim, Germany) unter den gleichen Bedingungen aufgereinigt und in SP4 (20 mM Tris und 2mM Glutathion) eluiert. Im Anhang 7.1 sind die Aminosäuresequenzen der bearbeiteten Fusionsproteine von Occludin und ZO-1 angegeben.

2.1.3 Zellkultivierung

25 cm² Falcon-Flaschen wurden mit 70 µl Rattenschwanz-Collagen (0,7 mg/ml, Boehringer, Mannheim, Germany) beschichtet, eine Stunde unter der Laminarbox getrocknet und vor Einsaat der MDCKI-Zellen mit PBS (mit Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen. MDCK I-Zellen (10-12. Passage) wurden in 5 ml Wachstumsmedium (10% fötales Kälberserum (FCS); 1% Penicillin/Streptomycin; 1% Amphotericin B; 1% stabiles L-Glutamin (Biochrom, Germany); 10 mg Heparin und 11 mg Na-Pyruvat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), mit 0,2 µm Filter sterilfiltriert; 334 µl EGF-Stammlösung (15 mg in 5 ml, ad 100 ml DMEM mit 4,5 mg Glukose, 3,7 g/l NaHCO₃)) bis zur Ausbildung einer konfluenten Zellschicht bei 37 °C in einem Inkubator (Binder; 95% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS mit Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen und mit 500 µl eines Lysispuffers (25 mM HEPES, pH 7,4; 0,2 mM NaCl; 4 mM EDTA; 0,5% Triton X100; 0,4% Proteaseinhibitorcocktail) versetzt. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen abgeschabt, zweimal für 5 min bei 10000 x g abzentrifugiert und der Occludin-enthaltene Überstand für Western Blot-Untersuchungen eingesetzt.

2.1.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Proteinfractionen wurden über eine 10%-ige SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) analysiert. Die Proteinauftrennung erfolgte in einem denaturierenden Polyacrylamidgel (PAA-Gel) nach einer modifizierten Methode von Laemmli (1970). Sie wurde in vertikalen Flachgelkammern (83x83x1 mm; Biorad, Germany) bei 80-100 V in dem Laufpuffer (25 mM Tris/HCl, 250 mM Glycin, pH 8,3, 0,1% SDS) durchgeführt. Die Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele sind in der Tabelle 2.2 zusammengefasst (Sambrook et al., 1989). Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen (50 mM Tris/HCl, pH 6,8; 100 mM DTT; 10% Glycerol; 2% SDS, 0,1% Bromphenolblau). Vor dem Gelauftrag von 5-10 µl Protein wurden diese 5 min bei 95 °C denaturiert. Als Marker zur Bestimmung der Größe der Proteine diente entweder ein *low molecular weight* Molekulargewichtsmarker (LMW: 116 kDa, Phosphorylase B; 80 kDa, BSA; 51,8 kDa, Ovalbumin; 34,7 kDa, Carbonanhydrase und 30 kDa, Sojabohnentrypsininhibitor) oder ein *high molecular weight* Marker (HMW: 209 kDa Myosin; 120 kDa, β-Galaktosidase; 78 kDa, BSA und 47 kDa, Ovalbumin).

Lösungskomponenten	Volumen der Komponenten (ml) 10%-iges Gel	
	Sammelgel 5 ml	Trenngel 2ml
Wasser	1,4	1,9
30% Acrylamid	0,33	1,7
1 M Tris/HCl, pH 6,8	0,25	-
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	-	1,3
10% SDS (Merck)	0,02	0,05
20% APS (Sigma)	0,02	0,05
TEMED (Biorad)	0,002	0,002
29% (w/v) Acrylamid und 1%-N,N'-Methylenbisacrylamid (Merck, Darmstadt, Germany)		

Tab. 2.2 Zusammensetzung der Komponenten der Sammel- und Trenngele für die Gelelektrophorese (SDS-Page). Im Sammelgel wurden die aufgetragenen Proben bei 80 V für 10 min gesammelt und anschließend im Trenngel nach ihrer Größe für 1,5 h bei 100 V aufgetrennt.

Die Gele wurden 3 h mit dem *Colloidal Blue Staining Kit* angefärbt (Novex, San Diego, CA, USA) und über Nacht in Wasser zur Entfärbung des Hintergrundes gegeben. Die Konzentrationen der Proteine wurden nach der Lowry-Methode (SIGMA Protein Assay Kit: P5656; Sigma Diagnostic, Taufkirchen, Germany) bestimmt.

Western Blot. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (HybondTM, ECL, Amersham) geblottet. Der Transfer erfolgte zwischen zwei horizontalen Platinelektroden (Trans-Blot-SD-System, Biorad) in einem Transferpuffer (pH 8,3; 25 mM Tris/HCl, 150 mM Glycerol, 10% Methanol) im Semi-dry-Verfahren (Sambrook et al, 1989). Die Membran und das Filterpapier wurde in Transferpuffer equilibriert und in der Reihenfolge Filterpapier, Membran, Gel und Filterpapier zwischen die Elektroden gelegt. Die Proteine wurden bei einer Stromstärke von $5 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ Gelfläche für 30-45 min auf die Membran transferiert.

Immunologischer Nachweis. Nach diesem Elektrotransfer der Proteine und vor der Immunfärbung der Membran erfolgte die Blockierung der unspezifischen Bindungen 1 Stunde bei Raumtemperatur in einem Blockierungspuffer (pH 7,5; 4% entfettetes Milchpulver, 20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, 0,1% Twen 20). Anschließend wurde die Membran mehrmals im Waschpuffer (pH 7,5; 20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, 0,1% Twen 20) gewaschen und 3 h mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-Occludin-Antikörper (1:10000, 81-61215, Zymed Laboratories, S. Francisco, USA) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die einstündige Inkubation mit einem Sekundärantikörper (aus Ziege, Anti-Kaninchen-IgG, 1:10000, Zymed, S. Francisco, USA) in Waschpuffer bei Raumtemperatur. Nach 5-maligem Waschen und einer Behandlung mit ECL-Reagenz (*Enhanced Chemilumineszenz*, Amersham) nach den Herstellerangaben wurde die Chemilumineszenzstrahlung mit einem Röntgenfilm (HyperfilmTM, Amersham) detektiert.

2.1.5 Affinitäts- und chromatographische Methoden sowie Synthese von ZO-1-Peptiden

Anionenaustauschchromatographie (FPLC). Zur Abtrennung von MBP und GST aus der über die MBP/GST-Säule gereinigten Occludinfraktion wurde eine Anionenaustauschsäule (DEAE Hi PrepTM Pharmacia/Amersham, Germany) eingesetzt. Die Säule wurde 30 min mit SP3 bei 2 ml/min Fließgeschwindigkeit equilibriert. Occludin wurde auf die Säule aufgetragen und mit 50 ml eines linearen Gradienten von 0,05 bis 0,3 M NaCl in 25 mM Tris/HCl (pH 7,7) zwischen 0-20 min eluiert (Tab. 2.3). Das gereinigte MBP/GST-Occludin wurde für SPR-Messungen und Affinitätsbindungsuntersuchungen mit den ZO-1-Peptidsequenzen verwendet.

Zeit (min)	% c (NaCl in M)
3	7
25	20
35	30
38	45
39	100
41	100
42	1
44	0

Tab. 2.3 Bedingungen der Anionenaustauschchromatographie (FPLC). Darstellung des Zeitregimes und des linearen Gradienten der NaCl-Konzentration zur Eluierung von gebundenem MBP/GST-Occludin.

Filtrationschromatographie. Durch die Gelfiltration wurde Occludin anhand seines Molekulargewichtes und damit seiner Größe von anderen Komponenten getrennt. Dabei wurde die über die Amylose- und GST-Säule aufgereinigte Occludinfraktion durch eine Filtrationssäule (Sephadex G25, Pharmacia/Amersham, Germany) von Maltose und Glutathion befreit. Die Säule wurde zweimal 45 min mit SP3 bei einer Flußrate von 2 ml/min equilibriert und mit 50 ml SP2 eluiert.

Abspaltung des MBP von MBP-Occludin.406-521. Um die Strukturmerkmale des zytosolischen C-terminalen Teils von Occludin zu bestimmen, wurde das MBP-Occludin.406-521 von seinem Fusionsprotein (MBP) abgetrennt. Zwischen MBP und Occludin befindet sich im gesamten Fusionsprotein eine Thrombinspaltstelle, die mit der spezifischen Protease Faktor X_a (P8010S, NEB, Schwalbach, Germany) gespalten wurde. Nach der Amylose-Resin-Aufreinigung von MBP-Occludin.406-521 wurde mit Hilfe einer Gelfiltrationssäule (Sephadex G25, Amersham) die Maltose abgetrennt. Anschließend wurden 100µg MBP-Occludin.406-521 bei Zimmertemperatur mehrere Tage mit 1 µg Faktor X_a unter Schütteln inkubiert. Das aufgespaltene Produkt wurde zur Abtrennung von MBP mit 500µl Amylose-Resin versetzt. Das Occludin.406-521 im Überstand wurde zur Überprüfung seiner Reinheit in einer 15%-igen SDS-Page aufgetrennt und eine saubere Fraktion CD-spektroskopisch untersucht.

Synthese einzelner Peptidsequenzen aus ZO-1. Zur funktionellen Analyse wichtiger Occludin-Bindungsregionen von ZO-1 wurden verschiedene Peptide synthetisch hergestellt. Dabei handelt es sich um die vorhergesagten potentiell helikalen Coiled coil-Abschnitte CC1 (P.597-633), CC2_{a28} (P.745-772), CC2_{a20} (P.750-769) und CC2b (P.772-806). Die Abschnitte CC2_{a28} und CC2_{a20} wurden N-terminal mit einem Biotinrest versehen. Die Sequenzabfolge der Peptide ist im Anhang 7.1 dargestellt.

Affinitätsbindung und Immunopräzipitation. Mit einem Affinitätsverfahren wurde die Interaktion der ZO-1-Peptidsequenzen mit Occludin gemessen. Streptavidin-Agarose-Partikel (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) wurden mit einem Waschpuffer (100 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,8) behandelt. Anschließend wurden die biotinylierten Peptide P.745-772 (CC2a₂₈) und P.750-769 (CC2a₂₀) von ZO-1 in PBS aufgenommen und 25 µl (10 mg/ml) unter ständigem Schütteln (Rotationsschüttler) bei 8 °C an die Partikel immobilisiert. Nach drei Stunden erfolgte die Zugabe von 125 µg/ml MBP-Occludin.378-521 bzw. GST-Occludin.264-521 oder dem Zellysat aus MDCK I-Zellen. Die Inkubation wurde über Nacht unter vorsichtigem Schütteln bei 8 °C durchgeführt. Die gebundenen Proteine wurden dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte bei 95 °C in einem SDS-Ladungspuffer (siehe 2.1.4) und nachfolgend die Auftrennung der Proteine in einer 10%-igen SDS-Page. MBP-Occludin.378-521 bzw. GST-Occludin.264-521 wurden durch Färbung des Gels detektiert. Die Bindung von Occludin aus dem MDCK-Zellysat an die immobilisierten Peptide wurde durch Kopräzipitation über Anti-Occludin-Antikörper (Kaninchen, Zymed, S. Francisco, USA) und einem Sekundärantikörper (81-61215, Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Zymed, S. Francisco, USA) detektiert.

2.1.6 Qualitätskontrolle der eingesetzten Proteinlösungen

Die Kontrolle der Qualitätsparameter der Ausgangslösungen ist für die SPR-Messungen ein wichtiger Schritt, um genaue Ergebnisse über die Interaktionen zwischen den eingesetzten Proteinen zu bekommen. Anzeichen von Lagerungsproblemen der Proteine, die zur Degradierung, Aggregation, Oxidation und andere chemische Veränderungen, Fehlfaltung, Konzentrationsveränderungen bis hin zur Instabilität des Proteins führen und des Einflusses von Kofaktoren treten vielfältige Störungsprozesse auf. Deshalb ist vor dem Beginn der Untersuchungen eine Kontrolle auf alle obengenannte Störungseinflüsse notwendig.

Injektions- und Laufpuffer wurden zur Vermeidung unerwünschter Puffer- und Matrixeffekte untereinander angepaßt (pH-Wert, Ionenstärke, notwendige Kofaktoren). Der in den SPR-Messungen aufgetretene Indexsprung wurde durch den veränderten Brechungsindex des Analyten im Laufpuffer hervorgerufen. Die Konzentrationsbestimmung (Lowry-Methode, Extinktion bei OD_{280nm}) entsprechend dem aktiven Analyten und die Erzeugung homogener Lösungen waren eine Grundvoraussetzung nachfolgender Messungen. Der Reinheitsgrad der

Proteine wurde über die SDS-Page ermittelt und ermöglichte die Überprüfung des korrekten Molekulargewichtes. Identitätsuntersuchungen erfolgten auch durch Immunoblottechniken. Kovalente Modifizierungen der Proteine/AS können fehlende Phosphorylierungen (Fehlfaltung, Inaktivität); Disulfidbrücken (Dimerisierung, Aggregation); Glutathionylierung (Blockierung von Bindungsstellen) und Oxidation (Veränderung der chemischen Eigenschaften) sein. Das GST-Occludin.264-521 kann bei längerer Lagerung zur Glutathionylierung von Occludin führen, d.h. zu einer Modifikation in der AS Cystein. Durch die Anwendung der Filtrationschromatographie zur Entfernung von Glutathion wurde dieser Prozeß verhindert. Die Thermostabilität hat durch Verringerung der Assoziationsgeschwindigkeit und Konzentration an aktivem Protein einen Einfluß auf die SPR-spektroskopischen Messungen. Dieser wurde durch kurzfristiges Auftauen der eingefrorenen Probe erst direkt vor der Messung ausgeschlossen.

2.2 Verwendung des BIAcore-Systems für SPR-spektroskopische Messungen der molekularen Wechselwirkung zwischen ZO-1 und Occludin

2.2.1 Interaktion zwischen ZO-1 und Occludin gemessen mittels SPR-Spektroskopie

Das *BIAcore 2000* Gerät, ein vollautomatisches Gerät der BIAcore AB (Uppsala, Schweden), wendet das SPR-Verfahren an. Dabei befindet sich der Analyt (ZO-1-Fragmente bzw. Occludin) in der mobilen Phase und wird an der Chipoberfläche angereichert. Es erlaubt dadurch die simultane Detektion der Analytbindung an den immobilisierten Liganden (Occludin sowie ZO-1-Sequenzen) und einer nicht modifizierten Kontrolloberfläche unter kontinuierlichen Flußbedingungen in der Detektionskammer. Die Änderung der Massenkonzentration an der Sensoroberfläche ist die Konsequenz aus der Assoziation und Dissoziation zwischen Occludin und ZO-1 und wird als SPR-Antwort (Signalintensitätsänderung [Δ RU]) gemessen.

Die optische Detektion erfolgt durch die Wechselwirkung beider Proteine, die den Brechungsindex in der Nähe der Sensoroberfläche ändert, wodurch sich die Resonanzbedingungen (siehe Abb. 1.8) verändern. Sind alle anderen Parameter während der Messung konstant (Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes, Temperatur, Brechungsindex in der mobilen Phase), können aus dieser zeitabhängigen Resonanzänderung die kinetischen Konstanten der Bindung berechnet werden. Da der Brechungsindex für Proteinlösungen

unabhängig von der Aminosäuresequenz ist, sind Änderungen des Brechungsindex direkt proportional zur Masse des Analyten (Hashimoto, 2000). Die Einheit für das SPR Signal ist die Resonanzeinheit (RU), bei der 1000 RU einen Shift im Resonanzwinkel von $0,1^\circ$ betragen. Eine Antwort von 1000 RU korrespondiert mit einer Änderung in der Oberflächenproteinkonzentration von 1 ng/mm^2 .

Immobilisierung von Occludin.378-521. Die Sensoroberfläche besteht aus einem dextranbeschichteten Goldfilm (CM5-Chip, BIAcore AB, Uppsala, Schweden). Die Dextranmatrix (ca. 100 nm) ist kovalent am Goldchip angebracht. Das Dextran wird durch 5-minütige Perfusion mit 400 mM 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimid (EDC) und 100 mM N-Hydroxysuccinimid (NHS, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) aktiviert. Der EDC/NHS-Komplex bildet auf der Dextranoberfläche aktive Ester, welche mit den Aminogruppen des immobilisierten Proteins reagieren (Abb. 2.1 A).

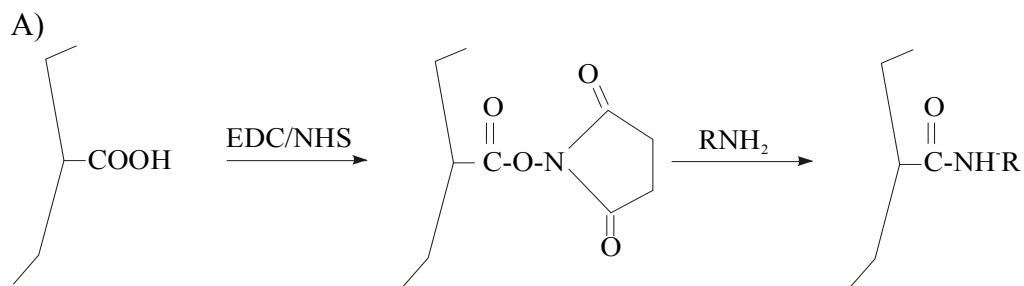


Abb. 2.1 A Chemie der Amin-Kopplungsmethode. Durch einen NHS/EDC-Mix erfolgt die Aktivierung der Karboxylgruppen der Dextranschicht.

Vor seiner Immobilisierung wurde MBP-Occludin.378-521 (in SP3) durch Reduzierung des pH-Wertes mit 10 mM Natriumacetat (pH 5), auf eine pH-Einheit unter seinem isoelektrischen Punkt (IP 6,24) eingestellt. Dadurch kommt es zu einer Vorkonzentrierung von Occludin auf der Sensoroberflächenmatrix. Nach einer kurzen Perfusion der Meßkammer mit Laufpuffer (200 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7.8 und 5 mM Maltose) wurde MBP-Occludin zur Immobilisierung für 8 min injiziert. Die ungesättigten Ester wurden durch 3-minütige Infusion von 1 M Ethanolamin (pH 8.5; Sigma, Steinheim, Germany) deaktiviert, um die Immobilisierung anderer Proteine zu verhindern. Anschließend wurde die Oberfläche mit der Regenerationslösung für eine Minute gewaschen. Das immobilisierte Occludin wurde für weitere 20 min mit Laufpuffer bei einer Flußrate von $5 \mu\text{l/min}$ bei 25°C equilibriert (Abb. 2.1 B). Dieselbe Chipoberfläche konnte für mehrere Untersuchungen über einige Wochen hinweg verwendet werden.

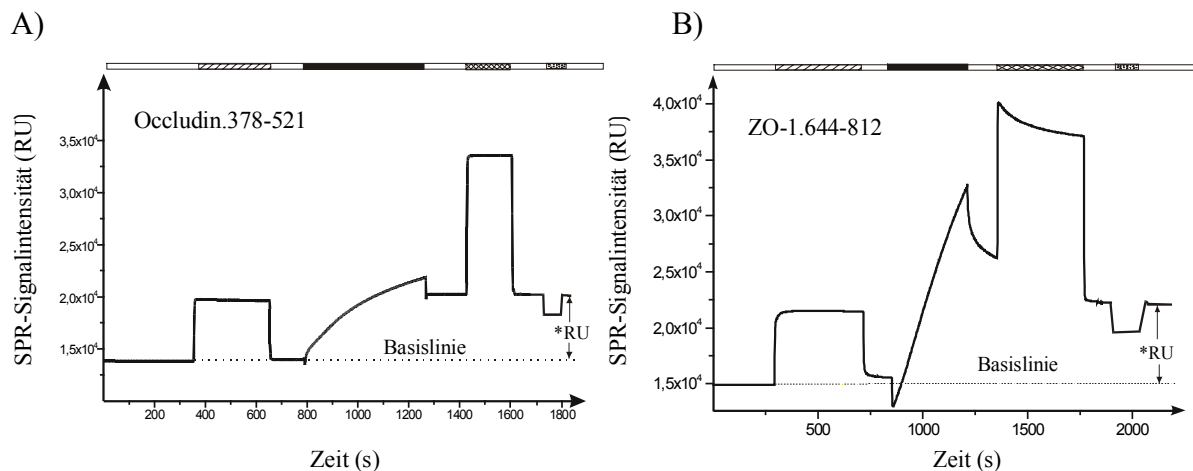


Abb. 2.1 B Darstellung der Immobilisierungsprozedur B) Sensorgramm der Immobilisierung von Occludin.378-521 an die CM5-Sensoroberfläche. Nach der Aktivierung der Chipoberfläche mit einem Mix aus EDC/NHS (schraffierter Balken) wurde Occludin.378-521 an die Chipoberfläche immobilisiert (schwarzer Balken, Immobilisierungsgrad 6370 RU bzw. 6,37 ng/mm²) und die Oberfläche mit 1 M Ethanolamin (pH 8,5, gekreuzter Balken) deaktiviert. Zwischen den einzelnen Schritten wird mit Laufpuffer (leerer Balken) gespült. Anschließend erfolgte die Konditionierung der Oberfläche durch einen kurzen Waschvorgang mit der Regenerationslösung (50 mM Na₂CO₃, 200 mM NaCl, punktierter Balken). C) Sensorgramm der Immobilisierung von ZO-1.644-812 an die CM5-Sensoroberfläche unter den gleichen Bedingungen (Immobilisierungsgrad 7350 RU bzw 7,35 ng/mm²).

Unter den gleichen Bedingungen erfolgte die Immobilisierung der Peptidsequenzen aus ZO-1 (CC1, CC2a₂₈, CC2a₂₀ und CC2b) an die Sensoroberfläche. Für alle Messungen wurden entgaste und filtrierte Lösungen verwendet.

Messung der Wechselwirkung zwischen Occludin und ZO-1. Die Assoziation der MBP-ZO-1-Fusionsproteinen erfolgte für 4 min bei einer Flußrate von 8 µl/min in Laufpuffer; im folgenden ZO-1 freiem Intervall erfolgte die Dissoziation. Ein Bindungsexperiment besteht aus drei Phasen. Die Abbildung 2.2 zeigt ein Beispiel eines SPR-Sensorgrammes mit der Assoziation von ZO-1.644-812 an Occludin.378-521 und der Teildissoziation von ZO-1.644-812 von der Chipoberfläche, gefolgt von der Regenerierung der Occludinoberfläche. Die Perfusion von 2,5 µM ZO-1.644-812 führt zu einem Anstieg des SPR-Signals, das die Bindung an Occludin reflektiert. Nach 4 min wurden 131 RU (0,131 ng/mm²) ZO-1.644-812 gebunden. Die Abbildung zeigt auch die Dissoziationskinetik von ZO-1.644-812 von Occludin während der ersten 4 min. Unterschiede zwischen dem Lauf- und Probenpuffer (z.B. in der Ionenstärke) führten zu einem Indexsprung (*bulk refractive index change*), d.h. zu einem Sprung am Anfang und Ende der Messung. Durch die Subtraktion des Signals der Referenzzelle wurde dieser Puffersprung korrigiert, um präzise kinetische Auswertungen zu

erhalten. Die Occludinoberfläche wurde mit 50 mM Na_2CO_3 und 200 mM NaCl (Regenerationslösung) bis zum Erreichen der Basislinie regeneriert, so daß das SPR-Signal zu dem Ausgangsniveau zurückkehrt. Notwendige Konzentrationen der eingesetzten ZO-1-Fragmente liegen zwischen 10-100 $\mu\text{g/ml}$ bei einem Verbrauch von ca. 100 μl pro Messung.

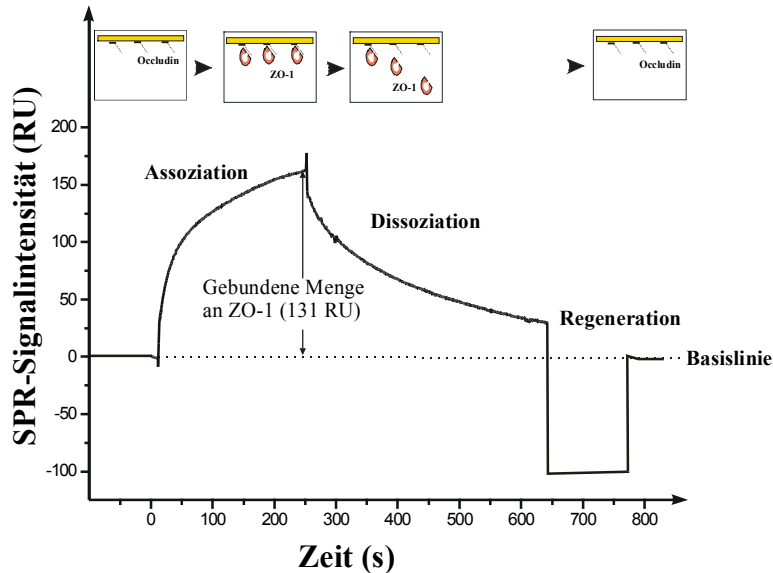


Abb. 2.2 SPR-Sensorgramm der Assoziation, Dissoziation von ZO-1.644-812 von Occludin.378-521 und Regeneration der Sensoroberfläche. Die eingeschobenen Abbildungen illustrieren die Vorgänge an der Chipoberfläche schematisch.

Alle durchgeführten Versuche wurden untereinander angepaßt, indem das Immobilisierungsniveau von Occludin auf der Chipoberfläche auf 50 fmol gesetzt wurde. Die Signalintensitätsänderungen $[\Delta\text{RU}]$, hervorgerufen durch die Bindung von ZO-1 an Occludin, wurden mit dem Korrekturfaktor K_1 multipliziert, der die immobilisierte Menge und das Molekulargewicht von Occludin berücksichtigt. Aufgrund der unterschiedlichen Größen der ZO-1-Fragmente, die zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse ebenfalls beachtet werden muß, wurde eine weitere Normalisierung vorgenommen. Dabei wurden die korrigierten Bindungsmengen ($\Delta\text{RU}_{\text{korrt.}}$) der einzelnen Sensorgramme unter Einbeziehung des Molekulargewichtes der ZO-1-Fragmente in die Stoffmengen n umgerechnet.

2.2.2 Kinetische Analyse der SPR-Sensorgramme

Mit Hilfe der BIAcore Evaluationssoftware 3.1 und Origin 6 (Microsoft) wurden die SPR-Sensorgramme unter Annahme einer homogenen 1:1 Assoziation (Langmuir Bindungsmodell: $A + B \leftrightarrow AB$) ausgewertet. Die SPR-Sensorgramme zeichnen die gebundene Menge an ZO-1 an das immobilisierte Occludin als eine Funktion der Zeit auf. Vor der Bestimmung der kinetischen Parameter der SPR-Sensorgramme wurden die verschiedenen eingesetzten Konzentrationssensorgramme in einem Plot übereinandergelegt, so daß der Injektionsbeginn und die Basislinie bei allen übereinstimmten. Die kinetischen Konstanten k_a und k_d wurden

mit Hilfe der nichtlinearen Analyse der kleinsten Fehlerquadrate berechnet (BIAcore System Manual, 1994; O`Shannessey et al., 1994). Die Kurvenanpassung erfolgte nach der Gleichung:

$$R_t = R_{eq} (1 - e^{-(k_a c + k_d)(t-t_0)}),$$

wobei R_t die Resonanz zur Zeit t und R_{eq} die Resonanz im Gleichgewicht zwischen gebundenen und freiem Analyten, c die Konzentration und t_0 der Assoziationsbeginn ist. Die an die Kurven angepaßte Daten wurden statistisch mit dem Standardparameter χ^2 für die Güte der Anpassung verglichen. Mit Hilfe durchgeführter Berechnungen notwendiger Parameter wurden lokale und Einzel-Anpassungen in bestimmten Zeitbereichen der SPR-Sensorgramme einzelner Konzentrationen ausgewertet. Diese Zeitbereiche wurden so ausgewählt, daß sie bei einer graphischen Auftragung von $\ln(R_0/R_t)$ gegen t für die Dissoziationsphase und $\ln(\text{abs}(dR/dt))$ gegen t für die Assoziation eine Gerade ergeben. Die Anstiege der Geraden ergaben die Werte für k_d und k_a .

2.2.3 Optimierung der Bindungsbedingungen zwischen ZO-1 und Occludin

Zur Untersuchung der Interaktionen zwischen dem immobilisierten MBP-Occludin.378-521 und MBP-ZO-1.644-812 wurden verschiedene methodische Veränderungen durchgeführt, um die Wechselwirkung zu charakterisieren und die SPR-Messungen zu optimieren. Der Einfluß der Meßbedingungen wurde bei einer Flußrate von 8 $\mu\text{l}/\text{min}$, ohne Kalziumzugabe, einem pH-Wert von 7,8 und bei einer Temperatur von 25 °C (Standardbedingungen) untersucht. Wenn nicht anders gekennzeichnet betrug die eingesetzte ZO-1-Konzentration 0,5 μM und das Immobilisierungsniveau von Occludin 1,07 ng/mm^2 .

Flußrate. Die Flußrate wurde im Rahmen von 1-20 $\mu\text{l}/\text{min}$ variiert. Mit Hilfe dieser Messungen wurde analysiert, ob massentransportspezifische Limitierungen einen Einfluß auf die Bindung zwischen ZO-1.644-812 und Occludin.378-521 besitzen.

Kalziumkonzentration. Die Kalziumkonzentrationen wurden im Bereich von 0; 0,1; 1; 10 und 100 mM CaCl_2 im Laufpuffer variiert.

pH-Wert. Der pH-Wert wurde mit verschiedenen Puffern im Bereich von 5-9 verändert. Dabei wurde der Laufpuffer auf unterschiedliche pH-Werte zwischen 6-8 eingestellt. Für die Messungen bei pH 5 kam Natriumacetat (pH 5) zum Einsatz. pH 9 wurde durch Einstellung des Laufpuffers mit 10 mM NaOH erreicht.

Temperatur. Zur Anpassung an die physiologische Situation wurde die Temperatur auf 37 °C erhöht, um den Einfluß der Temperatur auf das Bindungsverhalten von ZO-1.644-812 an Occludin.378-521 (0,51 ng/mm²) unter Standardbedingungen zu bestimmen.

Sättigung. ZO-1.644-812 interagiert über eine Infusionsdauer von 4, 10 und 30 min mit Occludin.378-521 (0,51 ng/mm²). Sättigungskurven aller anderen ZO-1-Fragmente wurden über einen Zeitraum von 20 min unter drei unterschiedlichen Immobilisierungsgraden von Occludin.378-521 auf der Sensorchipoberfläche (10,3 ng/mm²; 3,8 ng/mm² und 1,23 ng/mm²) generiert.

Optimierung der Regenerationslösung. Die Auswahl einer geeigneten Regenerationslösung zur schnellen Ablösung der gebundenen ZO-1-Fragmente von Occludin ist von großer Bedeutung für genaue und reproduzierbare Bindungsmessungen. Durch 5-malige Injektion von 1,5 µM ZO-1.589-772 über eine Minute nach der jeweils ein kurzer 1-minütiger Regenerationsimpuls folgte, wurden 5 verschiedene Regenerationslösungen (R1-R5) hinsichtlich der Bindungsantwort an Occludin.378-521 (1,07 ng/mm²) und der Stabilität der Basislinie untersucht. Als Regenerationslösungen dienten: R1, 50 mM Na₂CO₃ und 200 mM NaCl; R2, Glycin/HCl (pH 3); R3, Glycin/HCl (pH 2,5); R4, Glycin/HCl (pH 2) und R5, Laufpuffer mit 1 mM NaOH.

2.2.4 Pharmakologische Untersuchungen

Da die Funktion der Blut-Hirn-Schranke und damit der TJ-Proteine und deren Wechselwirkung durch NO beeinflussbar ist, wurden in einem weiteren Teil der Arbeit pharmakologischen Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurde der Einfluß von SIN-1 (3-Morpholinosydnonimin; Alexis Biochemicals, Cornerstone, USA), ein Metabolit des Vasodilatators und NO-Liberators Molsidonin, auf die Bindung zwischen ZO-1.644-8912 und Occludin.378-521 gemessen. Die Inkubation von SIN-1 erfolgte unter verschiedenen Konzentrationen von 1 mM und 10 mM und über Inkubationszeiten von 15 und 30 min. SIN-1 wurde kurz vor den Messungen in entsprechender Konzentration dem Laufpuffer zugegeben. Die eingesetzte ZO-1-Konzentration betrug 0,5 bzw. 2,5 µM und der Immobilisierungsgrad von Occludin 6,37 ng/mm².

2.3 Analytische Ultrazentrifugation

Bei der analytischen Ultrazentrifugation wurde der Sedimentationsvorgang der Makromoleküle von MBP-ZO-1.589-812 (0,25 mg/ml) im Zentrifugalfeld (bis zu 250000 x g, 60000 Upm) beobachtet und Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe bestimmt. Dadurch konnte der sprunghafte Anstieg des Brechungsindex entlang der Sedimentationsgrenze und die Konzentrationsverteilung von MBP-ZO-1.589-812 und in Lösung sowie komplexe Assoziationsvorgänge beobachtet werden. Aus den Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimenten (S-Läufe) wurde die Sedimentationskonstante (S-Wert, Svedberg, [10⁻¹³s]) nach einer Gleichung von Holtzhauer (1996) ermittelt. Aus dieser wurde bei bekannten Diffusionsgeschwindigkeiten das Molekulargewicht errechnet und Moleküleigenschaften von MBP-ZO-1.589-812 bestimmt. In weiteren Experimenten wurde unter den gleichen Bedingungen bei 25000 Upm und 20 °C das in Insektenzellen exprimierte PSG-ZO-1 (0,15 mg/ml und 0,25 mg/ml) in einer Sedimentationsanalyse untersucht (in Kooperation mit Dr. D. Utepbergenov und der NMR-Gruppe am FMP, Dr. D. Labudde).

2.4 Circulardichroismus-Spektroskopie

Zur Analyse der Sekundärstruktur wurden verschiedene Peptidsequenzen aus ZO-1 (jeweils 50 µM CC1, CC2a_{20,28} und CC2b) und 8,8 µM des verkürzten C-terminalen Teils von Occludin.406-521 in SP2 und 50% TFE, einer helixinduzierenden Reagenz, CD-spektroskopisch vermessen. Die CD-Spektroskopie nutzt die Polarisierung des Lichtes aus und beruht auf der Überlagerung einer rechts- und links-zirkular polarisierten Lichtwelle zu linear polarisiertem Licht. Für die oben genannten Sequenzen wurde die Differenz $\Delta\epsilon$ der Adsorptionskoeffizienten für links und rechts polarisiertem Licht (ϵ_L und ϵ_R) in einem Wellenbereich von 180-260 nm (UV-CD-Spektroskopie) gemessen und als Elliptizität angegeben:

$$\theta(\lambda) = \text{const.} (\epsilon_L - \epsilon_R) c d,$$

bei der d die Schichtdicke der Küvette und c die Konzentration der Probe ist. Die Abhängigkeit der Elliptizität θ von der Wellenlänge λ wurde im CD-Spektrum aufgezeichnet. Die Berechnung der Molaren Elliptizität θ_M erfolgt nach der Gleichung (Lottspeich und Zorbas, 1998):

$$(\theta_M) \lambda = (M/100) \theta / (c d), \quad \text{mit } \theta = 3300 (\epsilon_L - \epsilon_R) = 3300 \Delta\epsilon.$$

Die Helizität f_H der Proteine wurde bei 222 nm nach der Gleichung (Chen, 1972)

$$f_H = (\theta)_{222} + 2340 / -30300$$

berechnet. Eine quantitative Analyse der Sekundärstruktur erfolgte nach einer Faktoranalyse der vorhandenen Strukturelemente. Dabei wurden Basisspektren für die einzelnen Sekundärstrukturformen aus einem Referenzsatz bekannter Strukturen entnommen (CDNN-Programm der Universität Halle). Jeder Proteinsequenz wurde eine Linearkombination von Beiträgen des CD-Spektrums einer α -helikalen Struktur, einer β -Faltblattstruktur und einer reinen Knäuelstruktur (*random coil*) angepaßt. α -Helices besitzen ein typisches Doppelminimum bei 222 nm, β -Faltblatt-Strukturen ein Minimum bei 216-218 nm und ein Maximum bei 195-200 nm und Knäuelstrukturen ein Minimum bei 195 nm und ein Maximum bei 220 nm. Die Qualität der Anpassungen an die experimentellen CD-Spektren wurden mit dem Kriterium der kleinsten Fehlerquadrate beurteilt.

2.5 Bindungsuntersuchungen zwischen zellulosegebundenen Peptidsequenzen aus der Guk-Domäne von ZO-1 und Occludin

Um Occludin-Bindungs epitope in ZO-1 genauer zu bestimmen, wurde eine Längen- und Substitutionsanalyse der potentiell helikalen Region CC2a₂₀ aus der Guk-Domäne von ZO-1 durchgeführt. In der Längenanalyse wurde die Ausgangssequenz von CC2a₂₀ N- und C-terminal verkürzt und 120 unterschiedlich lange Peptidsequenzen erzeugt (Abb. 2.3).

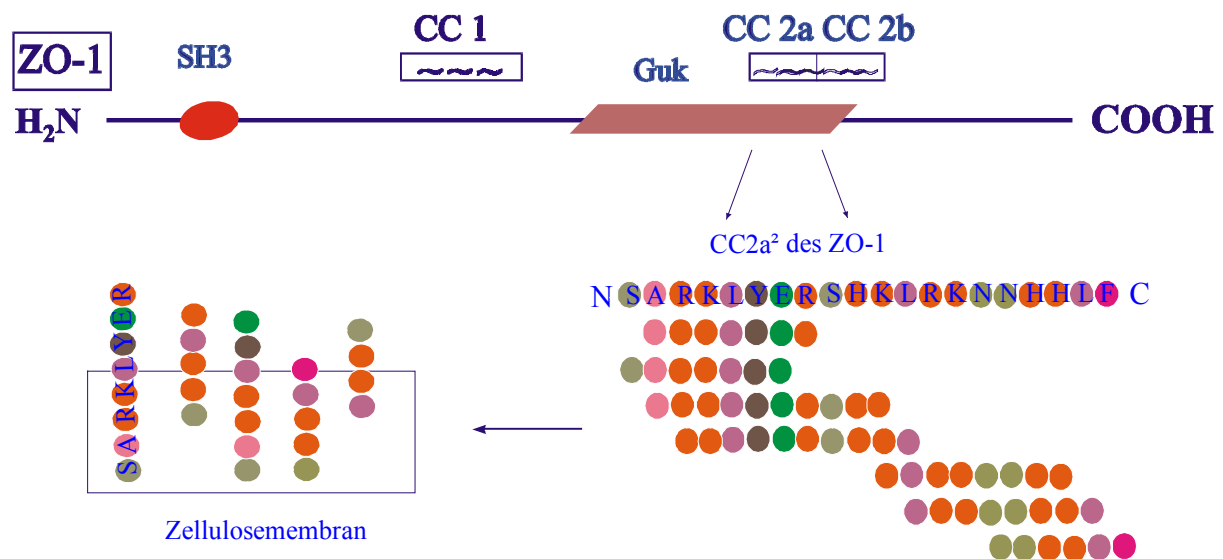


Abb. 2.3 Schematische Darstellung der Längenanalyse des potentiell helikalen Abschnittes CC2a₂₀ der Guk-Domäne von ZO-1. 120 C- und N-terminal-verkürzte Peptidsequenzen aus CC2a₂₀ wurden mit Hilfe der SPOT-Synthesetechnik erzeugt und mit dem C-terminalen Teil kovalent an eine Zellulosemembran gebunden. Die in der Flüssigphase gebundenen Peptide wurden für direkte Bindungsstudien mit GST-Occludin.264-521 an der Membran genutzt.

Eine Substitutionsanalyse der Wildtypsequenz CC2a₂₀, bei der sich die Peptidsequenzen an jeder Aminosäureposition durch Austausch von einer Aminosäure mit einer der anderen codierenden 19 Aminosäuren unterscheidet, diente der Bestimmung der genauen Bindungsstelle von GST-Occludin.264-521 an CC2a₂₀. Die variierten Peptidsequenzen von CC2a₂₀ wurden C-terminal auf eine Zellulosemembran (Whatmann 50, Maidstone, England) mit Hilfe eines multiplen Peptidsyntheseroboters (Abimed, Langenfeld, Germany; Franke, 1992) gebracht und die Membranen bei Raumtemperatur getrocknet (in Kooperation mit der Peptidgruppe von Prof. Schneider-Mergener, Charité). Die hergestellten Membranen wurden 10 min mit Methanol und 3 x 10 min mit TBS (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 40 mM Tris/HCl, pH 8) gewaschen. Zur Unterbindung unspezifischer Proteinbindungen an die Zellulose wurden diese mit einem Blockierungspuffer (Konzentrat, SU-07-250, Genosys Biotechnology, USA in 40 mM Tris/HCl (pH 8), 0,1% Tween 20 und 5% Saccharose) geblockt. Nach dem Waschen mit T-TBS (TBS mit 0,1% Twen 20) für 10 min wurden die Membranen bei 4 °C über Nacht unter vorsichtigem Schütteln im Blockierungspuffer mit 10 µg GST-Occludin.264-521/ml inkubiert. Anschließend wurden die Membranen dreimal für 10 min mit T-TBS gewaschen und für drei Stunden mit 1 µg/ml monoklonalem Anti-GST (G-1160, Maus, Sigma, Germany) inkubiert. Nach nochmaligen Waschen mit T-TBS wurden sie für 1,5 Stunden mit einer Verdünnung von 1:10000 (1 µg/ml) eines Sekundäntikörpers (P-5906, peroxidasemarkierter Anti-Maus-AK, Sigma, Germany) inkubiert. Zum Schluß wurden die Membranen 3-5 mal über einen Zeitraum von 0,5-1 h mit T-TBS gewaschen und 1 min mit einem Chemilumineszenzkit (Pierce, Illinois, USA) inkubiert. Die Chemilumineszenz, hervorgerufen durch die Bindung von GST-Occludin.264-521 an die Peptidsequenzen, wurde mit Hilfe eines Lumineszenzimagers detektiert (LumiAnalyst™, Boehringer, Mannheim, Germany).

2.6 Statistische Auswertung

Für die statistische Datenerhebung wurde das Statistik- und Kalkulationsprogramm von ORIGIN 6 und Excel (Microsoft) verwendet. Dabei wurden die signifikanten Parameter mit dem ANOVA-Test ermittelt und die Meßwerte als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SEM) angegeben.