

3 Ergebnisse

3.1 Bioinformatische Analyse von Occludin und ZO-1

Zu Beginn der Arbeit waren bioinformatische Untersuchungen notwendig, um potentielle Sequenzbereiche von Occludin und ZO-1 zu ermitteln, die möglicherweise zueinander in Wechselwirkung treten können. In der Abbildung 3.1 sind die mittels Biomodelling vorhergesagten Regionen der Interaktion zwischen Occludin und ZO-1 dargestellt. Aus Datenbankanalysen (Zusammenarbeit mit G. Krause, Bioinformatikgruppe am FMP) ist ersichtlich, daß für die N-terminale Region vor der Guk-Domäne von ZO-1, für den C-terminalen Bereich und darüber hinaus für potentielle helikale Abschnitte Coiled coil-Eigenschaften vorhergesagt werden können. Diese Bereiche können mit den vorausgesagten potentiellen Coiled coil-Regionen im C-terminalen Bereich von Occludin in Wechselwirkung treten. Coiled coil-Regionen sind bekannte Domänen für Protein-Protein-Interaktionen, bei der helikale Sequenzen verschiedener Proteine miteinander interagieren. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde die Hypothese aufgestellt, daß Occludin mit ZO-1 über Coiled coil-Regionen durch die Bildung einer 3- oder 4-Bündelhelix in Wechselwirkung tritt.

A)

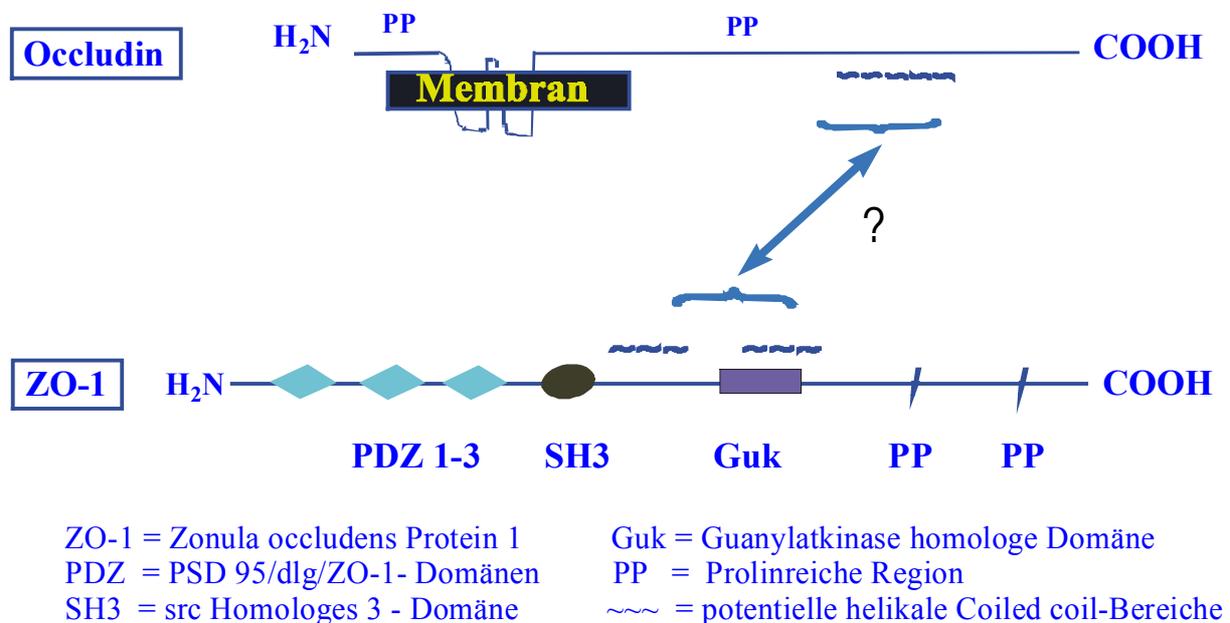


Abb. 3.1 A Bioinformatische Analyse von potentiellen Proteinbindungsdomänen in Occludin und ZO-1. Dargestellt sind die einzelnen Domänen mit den vorausgesagten helikalen bzw. Coiled coil-Abschnitten (~) und die angenommenen Interaktionsbereiche (Pfeil) zwischen Occludin und ZO-1.

B)

KTRRKMDRYDKSNILWDKEHIYDEQPPNVEEWVKNVSAGTQDMPPPPSDYAERVDSPMAYSSN
264

GKVNKGKRSYPESFYKSTPLVPEVAQEIPLTLSVDDFRQPRYSSNGNLET**PSKR**APT**KGKAGKG**
378

HHHH HHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHHH
 ccccccccccccccccccccccccccccccccccccc

KRTDPDHYETDYTTGG**ES**CEELEEDWVREYPPIT**SD**QQRQLYKRNFDAGLQEYKSLQAELDDV
406 **424**

HHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
 CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCc

NKELSRDLKELDDYREESEYMAAADEYNRLKQVK**GS**ADYKSKRNYCKQLKSKLSHIKRMVGD
488

YDRRK**P****521**

C)

-----CC1-----

CCCCCCCCCCCCC

BBBBBBBB

=====

TLPKTAGG**D**RAD**F**WRFRGLR**S**SKRNLRKS**R**EDLSA**Q**PVQTK**F**PAYERVVLREAG**F**LRPV**T**IFG
589 **597** **601** **611** **624** **633** **644**

=====Guk=====

PIADVAREKLAREEPDIYQIAKSELRDAGTDHRSSGIIRLHTIKQIIDQDKHALLDVTPNAVD

-----CC2a-----

CCCCCCCCCCCCCCCCC CCCC

=====

RLNYAQWYPIVVFLNPDSKQGVKTMRMLCPESRKS**A**RKLYERSHKLKRNHHLFT**T**TINLNS
751 **772**

-----CC2b-----

CCCCCCCCCCCCCCCCC

===== BBBB

MNDGWYGALKEAIQQQ**Q**N**Q**LV**V**W**V**SEKADGATSD**D**LDLHDDRLSYLSAPGSEYSMYSTDSRHT
794 **798** **812**

SDYEDTDTEGGAYTDQELDETLNDEVGTPPESAITRSSEPVREDSSGM**H**

890

Abb. 3.1 B, C Sequenzen von Maus-Occludin und Maus-ZO-1. B) Aminosäuresequenz des C-terminalen Bereich von Occludin.264-521. C, potentieller Coiled coil-Bereich. H und h, potentiell helikale Bereiche. Zahlen, relevante Aminosäuresequenznummern. C) Aminosäuresequenz von ZO-1.589-890 mit den entsprechenden Coiled coil-Regionen (C), β -Stränge E (AS 633-640) und F (AS 797-800) (B), der Guk-Domäne von ZO-1 (Guk) und den relevanten Aminosäuresequenznummern entsprechend der ZO-1-Fragmente.

3.2 Polymerasenkettenreaktion zur Herstellung der cDNA-Fragmente von Occludin und ZO-1

Ausgehend von den bioinformatischen Analyseergebnissen wurden vom potentiellen Interaktionsbereich von Occludin zwei Fragmente und vom ZO-1 verschiedene Proteinsequenzen hergestellt. Alle in Tabelle 2.1 aufgeführten cDNA-Fragmente von Occludin und ZO-1 konnten mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion unter den in Abschnitt

2.1.1 genannten Bedingungen amplifiziert werden. Die cDNA-Fragmente von Occludin und ZO-1 sind zur Detektion auf einem 2%-igen Agarosegel aufgetrennt wurden (Abb. 3.2).

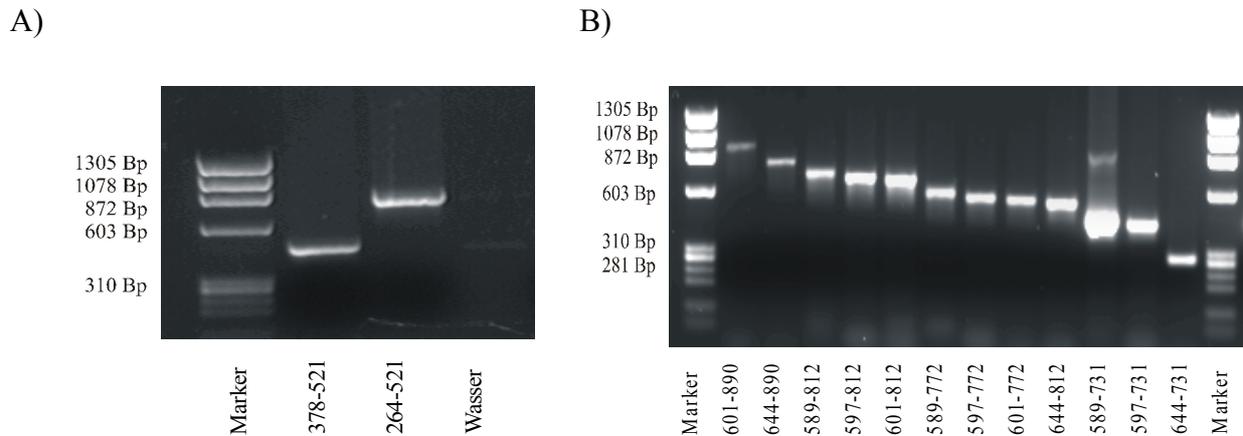


Abb. 3.2 Amplifikate der Polymerasekettenreaktion. (A) PCR-Produkte von Occludin: M: Molekulargewichtsmarker Φ (Gibco BRL, Germany), Occludin.378-521 und Occludin.264-521, Wasser als Kontrolle. (B) PCR-Produkte ausgewählter ZO-1-Fragmente.

3.3 Proteinreinigung von Occludin und den ZO-1-Fragmenten

Zwei-Schritt-Aufreinigung von Occludin. Nach der Subklonierung der Occludin-PCR-Amplifikate in die pMal-c2X- und pGEX-4T-1-Vektoren wurden diese in *E. coli* transformiert und überexprimiert. Der Einfluß der Induktionszeit ist in der Abbildung 3.3 dargestellt. Nach einer Induktionszeit von 90 min (MBP-Fusionsproteine) bzw. 120 min (GST-Occludin.264-521) wurden ausreichende Proteinmengen in *E. coli* exprimiert.

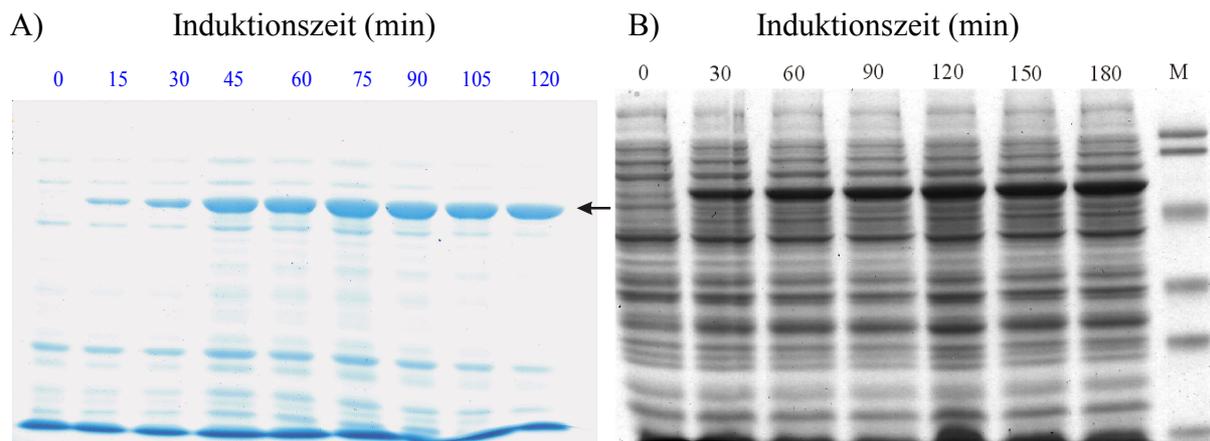


Abb. 3.3 Einfluß der Induktionszeit auf die Expressionshöhe von Occludin (siehe Pfeil) in *E. coli*, bei der die Proteinauftrennung mittels 10%-iger SDS-Page erfolgte. A) Nach 90 min wurde ausreichend MBP-Occludin.264-521 exprimiert. B) Nach 120 min wurde ausreichend GST-Occludin.264-521 exprimiert.

In einem ersten Schritt wurde MBP- bzw. GST-Occludin über eine Amylose-Resin- bzw. GST-Säule aufgereinigt. Mit Hilfe der Anionenaustausch-FPLC wurde in einem zweiten Schritt Abbauprodukte, MBP und GST abgetrennt (Chromatogramme in der Abb. 3.4 B und D). Zur Überprüfung der entsprechenden Fraktionen auf ihren Reinheitsgrad wurden alle nach den Reinigungsschritten gewonnenen Fraktionen auf eine 10%-ige SDS-Page aufgetragen (Abb. 3.4 A und C). MBP- bzw. GST-Occludin wurde somit von noch vorhandenen Proteinverunreinigungen befreit und dadurch in ausreichender Sauberkeit gewonnen.

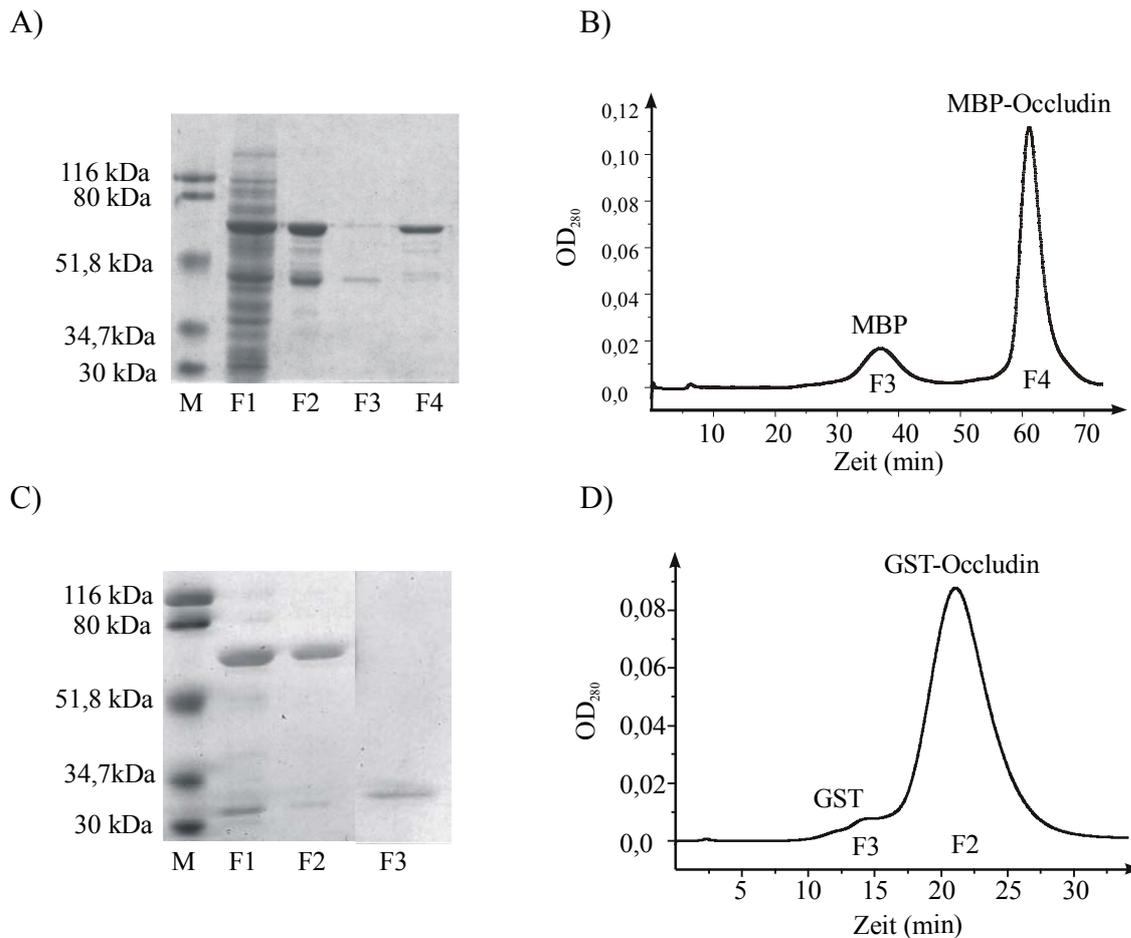


Abb. 3.4 Reinigung von Occludin. A) 10%-ige SDS-Page von MBP-Occludin.378-521. F1, Expressionslysat von Occludin in *E. coli*; F2, Occludinfraktion nach der Reinigung über die Amylosesäule; F3, MBP und F4, MBP-Occludin.378-521 nach der FPLC; M, LMW-Marker. B) Chromatogramm der MBP-Occludinreinigung mittels Affinitätschromatographie (FPLC). Die Extinktion (OD) wurde bei 280 nm gemessen. C) 10%-ige SDS-Page von GST-Occludin.264-521. F1, Occludin nach der Reinigung über die GST-Säule; F2, GST-Occludin.264-521 nach der FPLC und F3, GST nach der FPLC; M, LMW-Marker. D) Chromatogramm der GST-Occludinreinigung mittels Affinitätschromatographie (FPLC). Die Extinktion (OD) wurde bei 280 nm gemessen.

Reinigung der MBP-ZO-1-Proteinfragmente. Die Reinigung erfolgte über eine Amylose-Resin-Säule, bei der eine ausreichende Reinheit für die nachfolgenden

Bindungsuntersuchungen erreicht wurde. In der Abbildung 3.5 ist die gelelektrophoretische Auftrennung ausgewählter ZO-1-Fragmente dargestellt. Eventuell aufgetretene Abbauprodukte (Abbaurate zwischen 5-15%), bedingt durch eine ungenügende Stabilität einiger ZO-1-Fragmente, konnten nicht über ein nachgeschaltetes chromatographisches Verfahren (FPLC) abgetrennt werden. Aus diesem Grund wurden die Proteine immer frisch exprimiert, gereinigt und erst kurz vor den nachfolgende Bindungsmessungen aufgetaut.

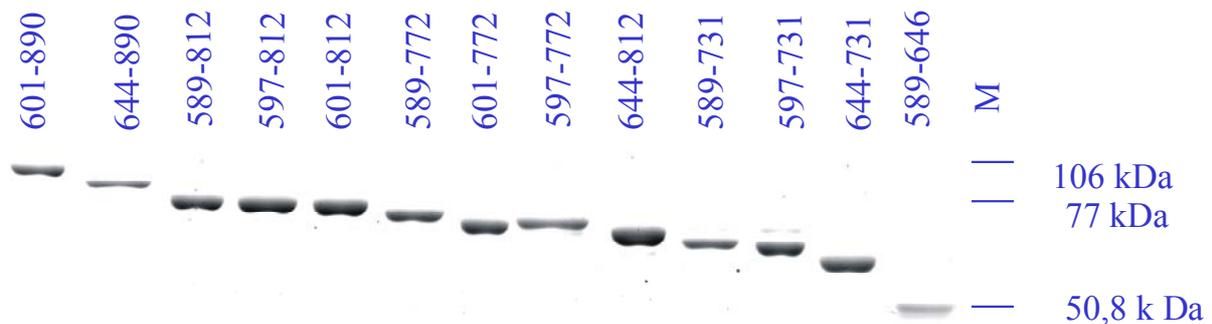


Abb. 3.5 10%-ige SDS-Page zur gelelektrophoretischen Auftrennung ausgewählter ZO-1-Fragmente (obere Zeile) nach der Amylose-Resin-Säulenreinigung. M, LMW-Marker.

3.4 Analytische Ultrazentrifugation zur Bestimmung der Sedimentationseigenschaften von ZO-1

Im Laufe der SPR-Untersuchungen wurde festgestellt, daß einige ZO-1-Fragmente je nach Vorhandensein helikaler Abschnitte Tendenzen zur Oligomerisierung aufwiesen. Zur Bestimmung der Selbstassoziation wurde das MBP-Fusionsprotein ZO-1.589-812 mittels analytischer Ultrazentrifugation untersucht. Dabei wurden die Geschwindigkeitsläufe aufgezeichnet, bei der unterschiedliche S-Werte (Svedberg-Werte) ermittelt wurden. Die exakte Bestimmung der Massen gestaltete sich durch Massenverteilungsüberlagerungen schwierig, da mehrere Oligomerisierungszustände vorlagen. Der erwartete S-Wert für Monomere (1 Molekül) liegt zwischen 5-6. Aus den Kurvenverläufen konnten drei mittlere S-Werte (40, 70 und 103 S-Einheiten) ermittelt werden, die an den unterschiedlichen Fronten in Abb. 3.6 A erkennbar sind. Die Fronten weisen auf einen Oligomerisierungsgrad von bis zu 30 Molekülen hin. Ebenfalls bestätigten elektronenmikroskopische Aufnahmen das Vorhandensein größerer oligomerisierter Moleküle von ZO-1.589-812 (Abb. 3.6 B).

In nachfolgenden Experimenten mit eukaryotischen in SF9-Zellen exprimierten PSG-ZO-1 wurden bei einer Konzentration von 0,15 mg/ml bzw. 0,25 mg/ml mittlere Svedbergkoeffizienten von 7,13 und 7,32 [10^{-13} s] mit einem mittleren Molekulargewicht von

148 und 155 kDa gefunden. Die Daten weisen auf das Vorhandensein von Mono-, Di- sowie Trimeren von PSG-ZO-1 hin (Abb. 3.6 C, D).

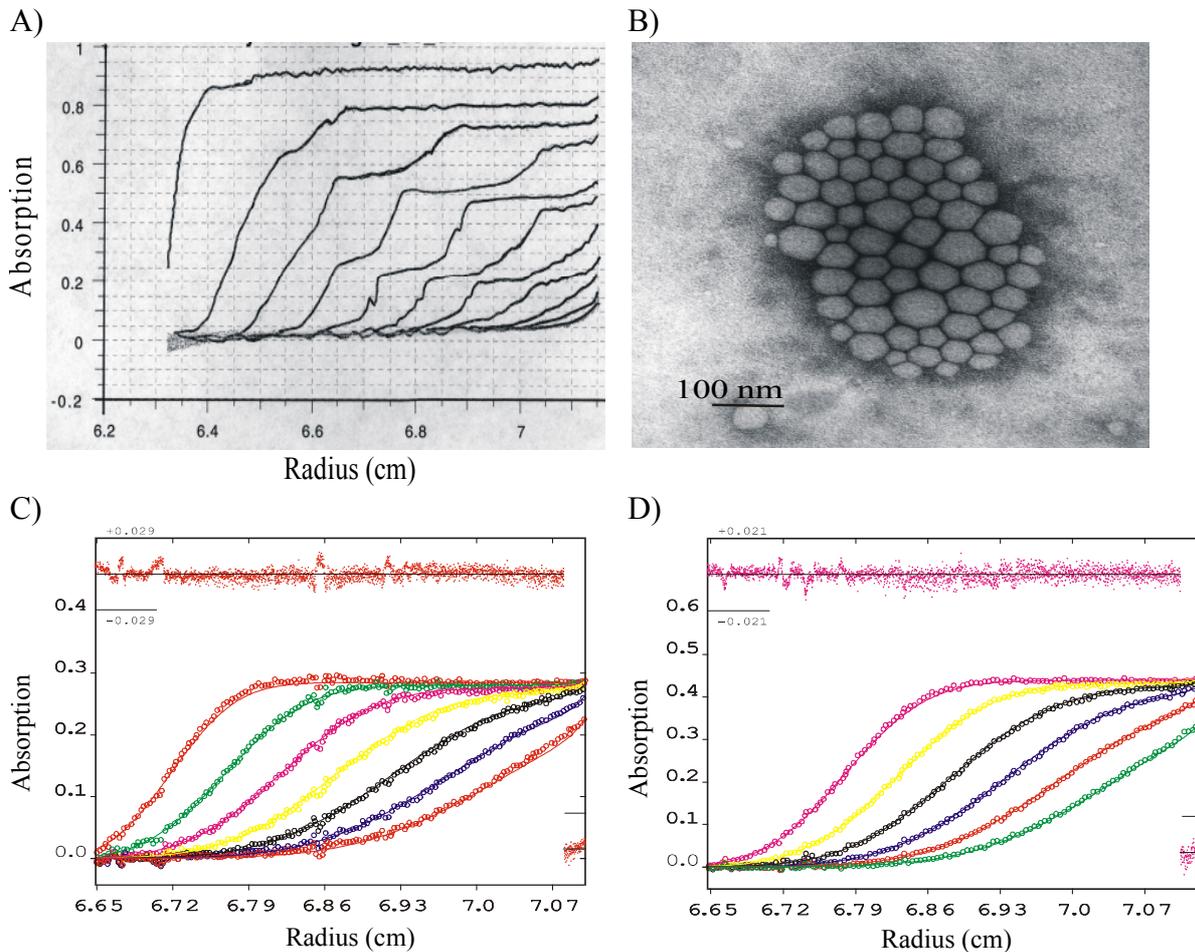


Abb. 3.6 Untersuchung der Sedimentationseigenschaften von ZO-1. A) Analytische Ultrazentrifugation zur Darstellung der Sedimentationsfronten von MBP-ZO-1.589-812. Es wurden mehrere S-Werte bestimmt, die aus der Sedimentation unterschiedlicher Fraktionen resultieren. B) Elektronenmikroskopische Aufnahme. MBP-ZO-1.589-812 wurde mit Uranylacetat kontrastiert, wobei die Größe der Kugeln ca. 30-50 Moleküle entsprechen. C) und D) Analytische Ultrazentrifugation von 0,15 mg/ml bzw. 0,25 mg/ml PSG-ZO-1. Die Bestimmung der S-Werte weisen auf Mono-, Di- und Trimere hin.

3.5 Wechselwirkung von Occludin mit der erweiterten Guk-Domäne von ZO-1

Für die SPR-Messungen wurde nur das MBP-Fusionsprotein von Occludin eingesetzt. Ebenfalls wurden alle ZO-1-Fragmente als MBP-Fusionsproteine exprimiert. Deshalb wird nachfolgend bei der Bezeichnung der entsprechenden Proteinsequenzen auf den Zusatz MBP verzichtet.

Die in den Kopräzipitationsuntersuchungen verwendeten Sequenzen von Fanning und Koautoren (1998) wurden auf homologe Sequenzen der Maus übertragen und als

Occludin.264-521 und ZO-1.644-890 bezeichnet. In der Abbildung 3.7 sind alle untersuchten ZO-1-Fragmente und ihre involvierten Domänen veranschaulicht.

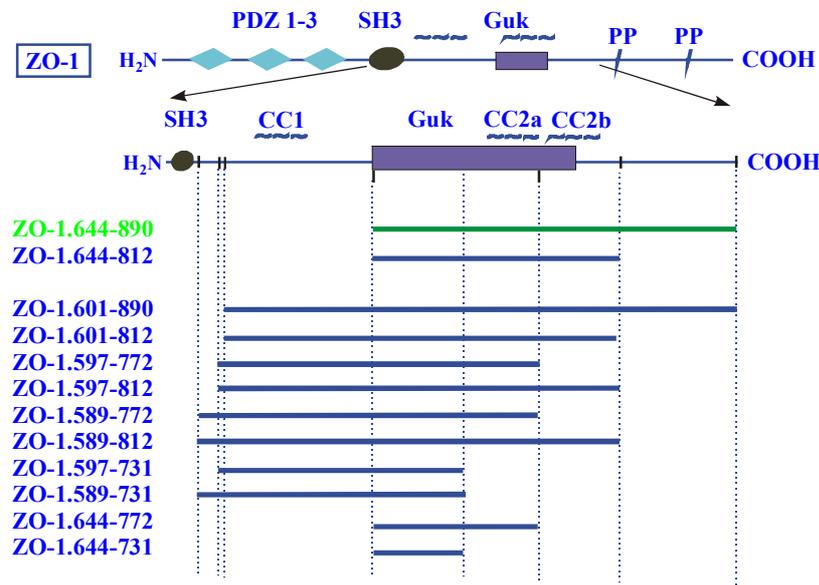


Abb. 3.7 Darstellung untersuchter ZO-1-Fragmente, die die Guk-Domäne und/oder CC1 bzw. CC2 enthalten. Fokussiert wurde auf ein Gebiet um die Guk-Domäne bis zur N-terminal liegenden SH3-Domäne von ZO-1. Die Fragmente wurden mit ihren entsprechenden Aminosäurenummern aus ZO-1 bezeichnet. Ausgangspunkt der Messungen waren ZO-1.644-890 und das auf die eigentliche Guk-Domäne mit C-terminaler Helix CC2 verkürzte ZO-1.644-812.

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)

Das hergestellte Occludin.264-521 ist nach der Aufreinigung sehr instabil und zerfällt nach wenigen Stunden. Aus diesem Grund wurde ein Occludinfragment kloniert, daß die helikalen und Coiled coil-Strukturen enthält und N-terminal auf Occludin.378-521 verkürzt wurde (siehe Abb. 3.1). Das verkürzte Occludin.378-521 war stabiler und wurde deshalb in allen nachfolgenden SPR-Bindungsmessungen eingesetzt.

Das Prinzip der SPR-Spektroskopie wurde im Abschnitt 2.2.1 beschrieben. Occludin.378-521 wurde unter Nutzung der Aminkopplungschemie an den dextranbeschichteten Sensorchip immobilisiert (siehe Abb. 2.1 A). Der Immobilisierungsgrad konnte durch die Änderung des Resonanzsignals direkt ermittelt werden. Es wurden mehrere unabhängige Immobilisierungsexperimente durchgeführt und das Immobilisierungsniveau bestimmt. Die Menge an immobilisiertem Occludin variiert entsprechend der eingesetzten Occludinkonzentrationen (0,5-5 μM) zwischen 500 und 10000 ΔRU (0,5-10 ng/mm^2).

In den folgenden SPR-Bindungsmessungen wurde untersucht, ob die C-terminale saure Region von ZO-1.644-890 für die Bindung an Occludin notwendig ist. Durch C-terminale

Verkürzung dieser verwendeten Fanningsequenz um 78 Aminosäuren wurde eine bis zu vierfach höhere Bindungsantwort von ZO-1.644-812 gemessen (siehe auch Abb. 3.10).

Die weitere Untersuchung der Interaktion zwischen beiden Proteinen zur Charakterisierung des Systems und der verwendeten Auswerteverfahren wurde exemplarisch zwischen ZO-1.644-812 und dem immobilisierten Occludin.378-521 dargestellt, da auch alle anderen Messungen unter den hier aufgeführten Bedingungen erfolgten.

Die Bindung von ZO-1 an das immobilisierte Occludin wurde in mehreren Experimenten bei verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 0,5-5 μM gemessen. Die Sensorgramme bestehen aus drei Phasen: der Assoziation, Dissoziation und Regeneration. In der ersten Phase enthält der Laufpuffer ZO-1 in verschiedenen Konzentrationen, nach Umschalten auf Laufpuffer erfolgt eine Dissoziation, die sich in einer Abnahme des Resonanzsignals zeigt. Indexsprünge am Anfang und Ende in positiver als auch negativer Richtung resultieren aus der veränderte Zusammensetzung des Laufpuffers, der kein ZO-1 mehr enthält und somit auf einen veränderten Brechungsindex des Laufpuffers hinweist. Durch die Subtraktion der Bindungsantwort der Referenzzelle wurde dieser Indexsprung zum größten Teil korrigiert (Abb. 3.8 A). Zur Kontrolle der Interaktion zwischen Occludin und ZO-1 erfolgte die umgekehrte Bindungsmessung, bei der ZO-1.644-812 immobilisiert (siehe Abb. 2.1 C) und die konzentrationsabhängige Assoziation bzw. Dissoziation von Occludin.378-521 unter den gleichen Bedingungen gemessen wurde (Abb. 3.8 B).

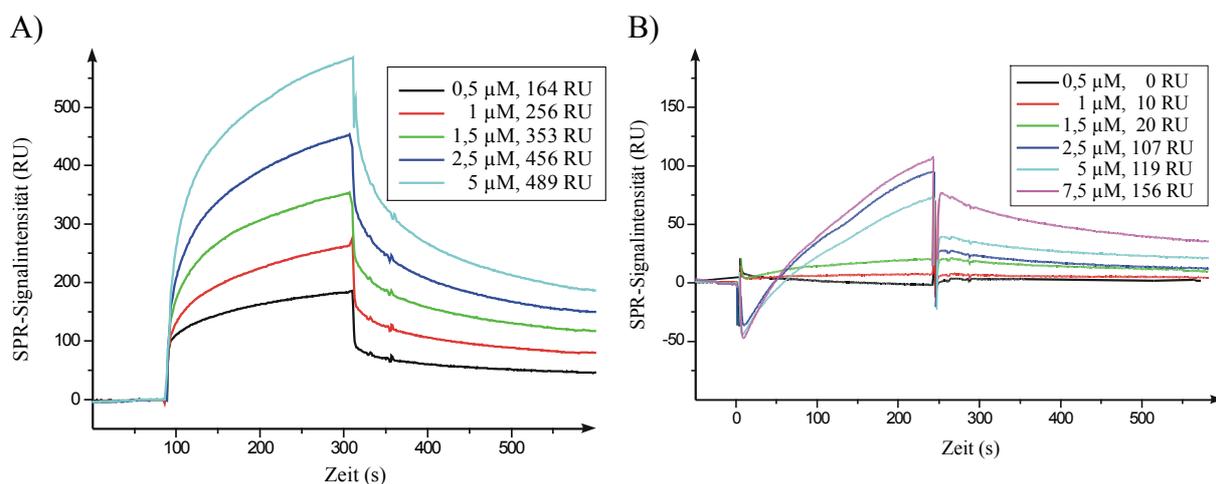


Abb. 3.8 Wechselwirkung von ZO-1.644-812 mit Occludin.378-521. A) Die SPR-Sensorgramme zeigen eine konzentrationsabhängige Bindung von ZO-1.644-812 an Occludin.378-521 ($10,3 \text{ ng/mm}^2$) und die teilweise Dissoziation von diesem durch Spülen der Flußzelle mit Laufpuffer. B) Konzentrationsabhängige Assoziation/Dissoziation zwischen Occludin.378-521 und dem immobilisierten ZO-1.644-812 ($7,35 \text{ ng/mm}^2$).

In allen durchgeführten Messungen war festzustellen, daß die Bindung von Occludin an das immobilisierte ZO-1 bei vergleichbar eingesetzten Konzentrationen und immobilisierten Proteinmengen geringer als bei Immobilisierung von Occludin und Inkubation mit ZO-1 war. In der verwendeten Occludinsequenz 378-521 befinden sich zwei Cysteine (C⁴⁰⁸, C⁴⁹⁹), die unter *in vitro* Bedingungen bei Sauerstoffanwesenheit möglicherweise eine Disulfidbrücke bilden und so Bindungs epitope verdecken. Diese Konformationsänderung kann daher ein Grund der schlechteren Bindung von Occludin an das immobilisierte ZO-1 sein.

Die Ergebnisse der durchgeführten SPR-spektroskopischen Messungen wurden in Abhängigkeit verschiedener ZO-1-Konzentrationen dargestellt, wobei die Normalisierung der Bindungswerte (Δ RU) auf 50 fmol immobilisiertes Occludin erfolgte (Abb. 3.9 A). Für die direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse aller ZO-1-Fragmente wurden die korrigierten Bindungsmengen der einzelnen Sensorgramme unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes der ZO-1-Fragmente in die Stoffmengen n umgerechnet und in Abhängigkeit von der Konzentration dargestellt (Abb. 3.9 B).

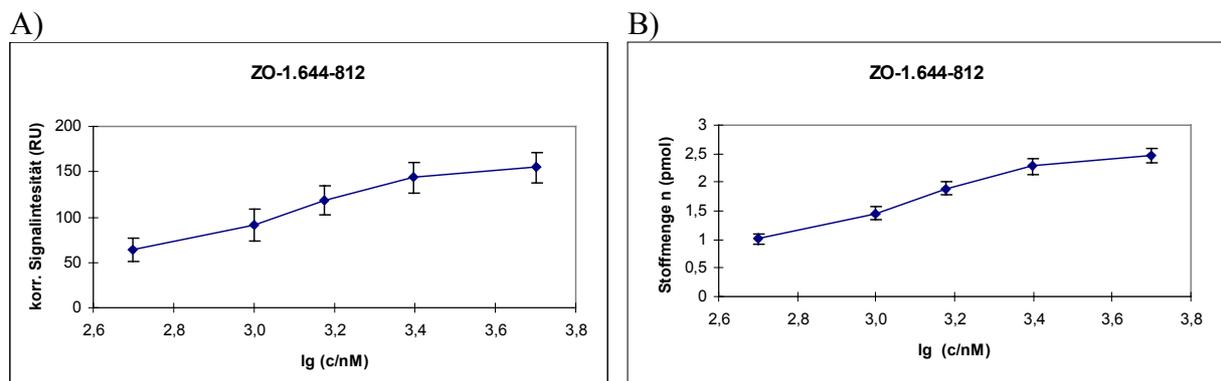


Abb. 3.9 Normierung der Bindungsergebnisse zwischen ZO-1.644-812 und Occludin.378-521. 50 fmol immobilisiertes Occludin.378-521 wurde in allen Messungen zugrunde gelegt und die Bindungsantwort von ZO-1.644-812 mit dem Korrekturfaktor K_1 normiert. A) Aus mehreren Messungen ($n \geq 4$) wurden die korrigierten Bindungswerte ($RU_{\text{korr.}}$) des gebundenen ZO-1.644-812 in Abhängigkeit vom dekadischen Logarithmus der Konzentration $\lg(c/nM)$ dargestellt und die Standardabweichung ($MW \pm SEM$) angegeben. B) Einbeziehung des Molekulargewichtes von ZO-1.644-812 durch eine zweite Korrektur der normierten Bindungswerte und Darstellung der Stoffmenge n (pmol) in Abhängigkeit vom dekadischen Logarithmus der Konzentration $\lg(c/nM)$ von ZO-1.644-812.

3.5.2 Wechselwirkungen von Occludin mit ZO-1-Fragmenten, die die Guk-Domäne und/oder CC1 bzw. CC2 enthalten

Möglicherweise ist die bisher untersuchte, eigentliche Guk-Sequenz von ZO-1 nur ein Teil der Bindungsregion für Occludin und flankierende Bereiche aus dem N-terminalen Teil von ZO-1 haben ebenfalls für die Wechselwirkung beider Proteine Bedeutung. Aufgrund von bioinformatischen Vorhersagen wurde deshalb die Sequenz der ZO-1-Fragmente erweitert, um den potentiellen helikalen Abschnitt CC1, der N-terminal vor der Guk-Domäne liegt, zu erfassen. Folgende ZO-1-Fragmente 601-890, 601-812, 601-772, 597-812, 597-772, 597-731; 589-812, 589-772, 589-731, 644-772 und 644-731 (siehe Abb. 3.7) wurden deshalb hinsichtlich ihrer Bindung an Occludin.378-521 SPR-spektroskopisch vermessen. Zur Kontrolle erfolgten Messungen mit dem ZO-1.502-812, das die SH3- und Guk-Domäne enthält, und mit dem ZO-1.413-619 (bestehend aus der PDZ3- und SH3-Domäne).

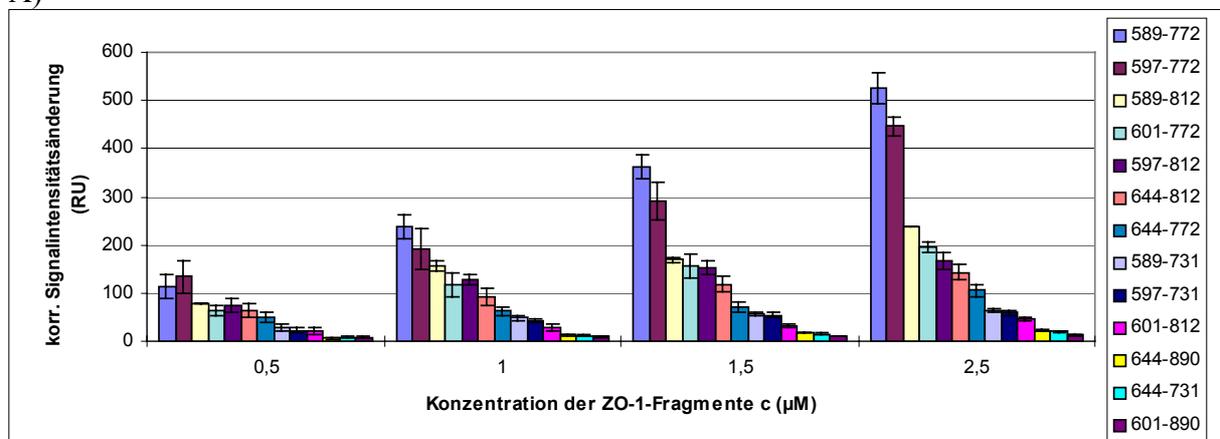
Es wurden konzentrationsabhängige SPR-Sensorgramme aller genannten ZO-1-Fragmente zwischen 0,5 und 2,5 bzw. 5 μ M aufgenommen, um die Bindung an Occludin.378-521 untereinander zu vergleichen. Alle Bindungsmessungen der ZO-1-Fragmente wurden nach dem oben beschriebenen Verfahren für ZO-1.644-812 ausgewertet, indem die Bindungswerte entsprechend der Korrekturfaktoren normiert wurden. Sowohl Bindungsmessungen einer konzentrationsabhängigen Assoziation bzw. Dissoziation für jedes ZO-1-Fragment (siehe Abb. 7.1.1-13 A sowie 7.1.14) als auch die korrigierten Bindungswerte (Abb. 7.1.1-13 C und D) sind im Anhang 7.4 zusammenfassend dargestellt.

3.5.3 Vergleich aller Bindungsergebnisse der ZO-1-Fragmente an Occludin

Aus den Untersuchungen wurde eindeutig eine bessere Bindung der ZO-1-Fragmente festgestellt, die den Abschnitt zwischen SH3- und Guk-Domäne mit CC1 und die helikale Region CC2a enthalten, denen aber die C-terminale Region inklusive CC2b fehlt. Insbesondere die Fragmente ZO-1.589-772 und ZO-1.597-772 zeigten die höchsten Bindungsmengen an Occludin. Bei Vorhandensein des kompletten zweiten potentiell helikalen Abschnittes CC2 fällt die Bindung um das zwei- bis 2,5-fache ab (Vergleich von ZO-1.589-772 mit 589-812; ZO-1.597-772 mit 597-812 und ZO-1.601-772 mit 601-812). Ebenfalls scheinen die Aminosäuren vor 601 (Vorsequenz) Bedeutung bei der Bindung an Occludin zu besitzen, wie die mehr als zweifache Verringerung der Bindungshöhe von ZO-

1.601-772 im Vergleich zu ZO-1.589-772 und 597-772 bewies. Dagegen zeigten Fragmente mit C-terminalen Teil von ZO-1 (ZO-1.644-890 und 601-890) eine über 20-fache geringere Bindung an Occludin. Ebenfalls wurde beim Fragment ZO-1.644-731, das nur den N-terminalen Bereich der Guk-Domäne ohne jegliche potentielle helikale Abschnitte umfaßt, eine drastische Reduzierung der Bindung an Occludin SPR-spektroskopisch gemessen. Zur direkten Vergleichbarkeit der Bindungsmessungen wurde in einem zusammenfassenden Diagramm die Bindung jedes einzelnen ZO-1-Fragmentes an Occludin.378-521 dargestellt. Dabei wurden die normierten SPR-Bindungsmengen (Abb. 3.10 A) und die Stoffmengen (Abb. 3.10 B) in Abhängigkeit der Konzentration dargestellt.

A)



B)

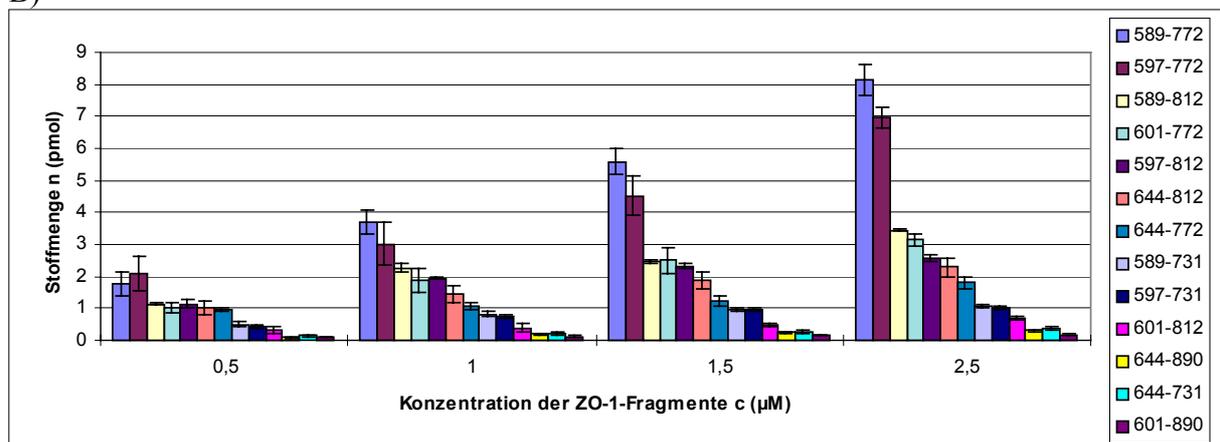


Abb. 3.10 Zusammenfassende Darstellung der Bindung aller untersuchten ZO-1-Fragmente an das immobilisierte Occludin.378-521. Ausgewertet wurden die SPR-Sensorgramme hinsichtlich der Bindungsantwort (RU) an Occludin.378-521 aus $n \geq 3$ unabhängigen Messungen bei je 4 ZO-1-Konzentrationen und die Standardabweichung (\pm SEM) angegeben. Die Daten wurden bei unterschiedlichen Immobilisierungsgraden von Occludin erzeugt und auf ein Immobilisierungsniveau von 50 fmol Occludin angepaßt. A) Darstellung der korrigierten SPR-Bindungsantwort (RU) in Abhängigkeit von der Konzentration c (μM) der ZO-1-Fragmente. B) Diagramm der normierten Stoffmengen n (pmol) in Abhängigkeit von der Konzentration c (μM) der ZO-1-Fragmente.

Das ZO-1.502-812 (Fragment mit SH3- und Guk-Domäne) zeigte in einer Kontrollmessung ebenfalls eine konzentrationsabhängige Bindung an Occludin in wesentlich geringeren Konzentrationsbereichen zwischen 0,1-1 μM . Dagegen konnte keine Bindung von ZO-1.413-619 (mit PDZ3- und SH3-Domäne) an Occludin detektiert werden (Anhang 7.4, siehe Abb. 7.1.14).

Zur weiteren Vergleichbarkeit der Bindung der verschiedenen ZO-1-Fragmente an Occludin.378-521 wurden aus allen durchgeführten Messungen, daß am besten bindende ZO-1-Fragment herausgesucht und gleich 100% gesetzt (Abb. 3.11). Der Vergleich der SPR-Meßergebnisse bestätigte ein statistisch signifikante höchste Bindung von ZO-1.589-772 an Occludin.378-521.

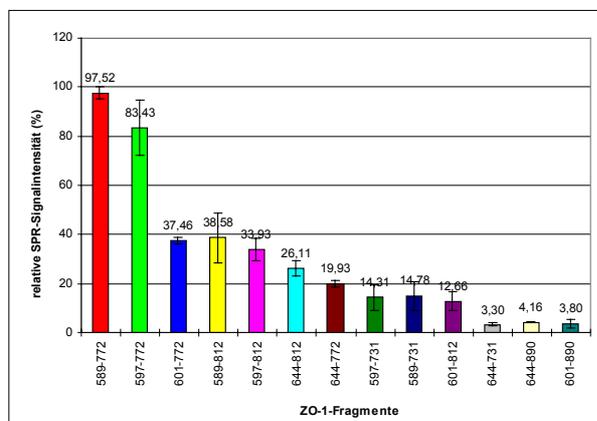


Abb. 3.11 Zusammenfassung aller SPR-Meßergebnisse ($n \geq 6$) bei der Wechselwirkung von 2,5 μM eingesetzter ZO-1-Fragmente mit dem immobilisierten Occludin.378-521. Es wurden die relativen SPR-Signalintensitätswerte (%) in Abhängigkeit der einzelnen ZO-1-Fragmente dargestellt. Die korrigierte Bindungsantwort des am besten bindende ZO-1-Fragmentes wurde in jeder Messung auf 100% bezogen und die prozentuale Bindung der anderen ZO-1-Fragmente an Occludin danach bestimmt.

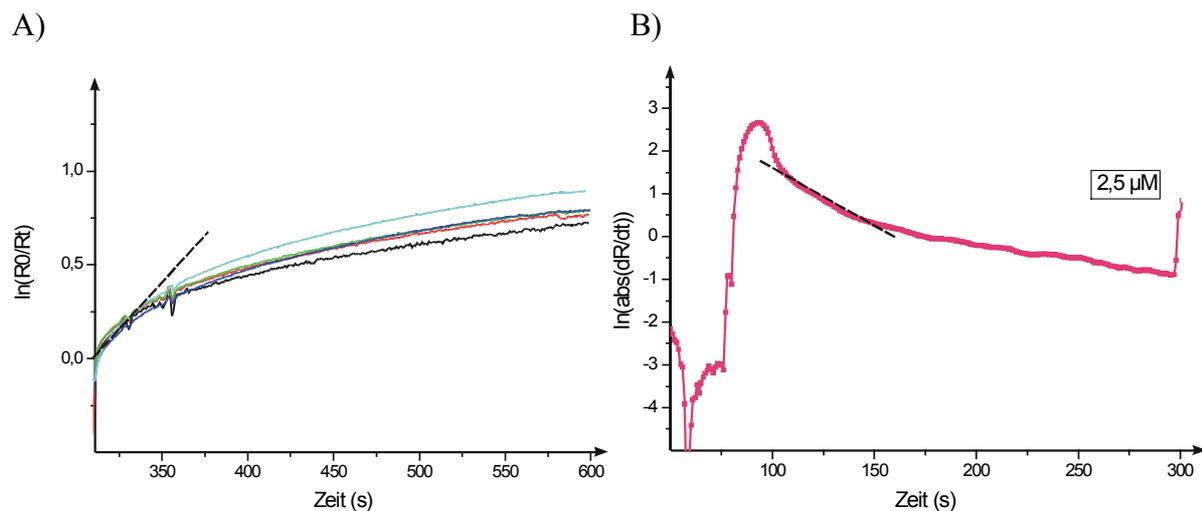
3.5.4 Auswertung der Sensorgramme zur Bestimmung kinetischer Konstanten

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_D -Berechnung) und der Assoziations- und Dissoziationsraten (k_a , k_d) wurde für die Interaktion ein einfaches Bindungsmodell ($A + B \leftrightarrow AB$) angenommen. Die verwendeten Auswerteverfahren werden auch hier exemplarisch zwischen dem immobilisierten Occludin.378-521 und dem ZO-1.644-812 dargestellt, da auch alle anderen Sensorgramme unter diesen Bedingungen ausgewertet wurden.

Alle SPR-Sensorgramme wurden zur Bestimmung der Dissoziationsratenkonstanten k_d am Beginn der Dissoziation in einem Zeitbereich von 50 s ausgewertet. Bei einer Auftragung von $\ln(R_0/R_t)$ gegen t muß sich bei einem angenommenen 1:1 Bindungsmodells eine Gerade in der Dissoziation ergeben. Bei Darstellung dieser Parameter in einem Diagramm erhält man keinen linearen Zusammenhang über den gesamten Bereich der Dissoziation, der in einem Rückbindungseffekt liegen könnte. Dabei werden bei fortschreitender Dissoziation immer

mehr Bindungsstellen an der Oberfläche frei, die zur Wiederbindung gerade abdissoziierten ZO-1 beitragen (Abb. 3.12 A).

Ebenfalls ist die Einschränkung des Zeitbereiches der Assoziation zur Bestimmung der Assoziationsrate, um den linearen Zusammenhang zwischen $\ln(\text{abs}(dR/dt))$ gegen t zu erhalten, unumgänglich. Bei einer Auftragung dieser Parameter in einem Diagramm muß sich bei einer angenommenen 1:1 Bindung eine Gerade mit dem Anstieg k_a ergeben. Am Anfang der Assoziation können massentransportlimitierende Faktoren und am Ende unspezifische Wechselwirkungen des ZO-1 mit der Sensoroberfläche Gründe der Nichtlinearität sein. Zur Bestimmung von k_a wurde deshalb ein linearer Zeitbereich von ca. 50 s rund 20 s nach Beginn der Assoziation ausgewertet. Dargestellt ist die Bestimmung der Assoziationsratenkonstante bei einer Konzentration von 2,5 μM ZO-1.644-812 (Abb. 3.12 B). Aufgrund der angenommenen Selbstassoziation der ZO-1-Fragmente ist die Berechnung der kinetischen Konstanten nur eine erste Näherung, um die Interaktion zwischen beiden Proteinen zu charakterisieren.



Kinetische Parameter	$k_d \times 10^{-3}(\text{s}^{-1})$	$k_a \times 10^3(\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$K_D \times 10^{-7}(\text{M})$
ZO-1.644-812/ Occludin.378-521	$5,69 \pm 0,04$	$7,8 \pm 0,5$	$7,37 \pm 0,54$

Abb. 3.12 Bestimmung der kinetischen Parameter der SPR-Sensorgramme von ZO-1.644-812 bei einer Interaktion mit Occludin.378-521. A) Auftragung von $\ln(R_0/R_t)$ in Abhängigkeit von der Zeit zur Bestimmung der Dissoziationsrate k_d . Auswertung des linearen Zeitbereiches der Dissoziation in den ersten 50 s (gestrichelte Linie) für jede Konzentration zwischen 0,5-2,5 μM von ZO-1.644-812 bei der Bindung an Occludin.378-521. B) Auswertung des linearen Zeitbereiches (gestrichelte Linie) der Assoziation im Bereich von 100-150s. Auftragung von $\ln(\text{abs}(dR/dt))$ in Abhängigkeit von der Zeit zur Bestimmung der Assoziationsrate k_a bei einer Konzentration von 2,5 μM ZO-1.644-812. C) Zusammenfassung der kinetischen Parameter der Wechselwirkung zwischen ZO-1.644-812 und Occludin.378-521.

Eine Vielzahl an SPR-Sensorgrammen der verschiedenen ZO-1-Fragmente mit unterschiedlichen Konzentrationen wurden nach diesen Methoden ausgewertet und die kinetischen Parameter der Bindung bestimmt. Aus k_d und k_a wurden die Bindungsaffinitäten der Wechselwirkung zwischen den jeweiligen ZO-1-Fragmenten und Occludin kalkuliert. Die k_d -, k_a - und K_D -Werte wurden einzeln mit den korrigierten Bindungswerten für jedes ZO-1-Fragment im Anhang 7.4 (Abb. 7.1.1-13 D) dargestellt.

Auch hier war ersichtlich, daß die ZO-1-Fragmente entsprechend der potentiellen helikalen Abschnitte unterschiedliche Affinitäten zu Occludin besitzen. Die kinetischen Parameter für alle ZO-1-Fragmente sind nachfolgend zusammengefaßt (Tab. 3.1).

ZO-1-Fragmente	$k_d \cdot 10^{-4} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_a \cdot 10^4 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	$K_D \cdot 10^{-7} \text{ (M)}$	enthält die Domänen
ZO-1.589-772	$6,94 \pm 0,34$	$0,99 \pm 0,121$	$0,71 \pm 0,12$	CC1, Guk, CC2a
ZO-1.597-772	$10 \pm 1,5$	$0,811 \pm 0,109$	$1,22 \pm 0,03$	CC1, Guk, CC2a
ZO-1.597-812	$18 \pm 0,1$	$1,32 \pm 0,16$	$1,4 \pm 0,23$	CC1, Guk, CC2
ZO-1.601-772	$18,6 \pm 1,6$	$1,4 \pm 0,06$	$1,52 \pm 0,36$	CC1, Guk, CC2a
ZO-1.589-812	$18,2 \pm 1,9$	$0,912 \pm 0,258$	$2,22 \pm 0,83$	CC1, Guk, CC2
ZO-1.601-890	$26 \pm 2,6$	$1,14 \pm 0,18$	$2,29 \pm 0,12$	CC1, Guk, CC2
ZO-1.601-812	$35,4 \pm 2,2$	$1,54 \pm 0,35$	$2,39 \pm 0,39$	CC1, Guk, CC2
ZO-1.644-772	$25,5 \pm 3,1$	$2,67 \pm 0,64$	$2,46 \pm 0,72$	Guk, CC2a
ZO-1.644-731	$58,1 \pm 0,8$	$4,92 \pm 1,04$	$4,03 \pm 0,04$	Guk
ZO-1.589-731	$93,7 \pm 5,7$	$2,09 \pm 0,32$	$4,64 \pm 0,98$	CC1, Guk
ZO-1.597-731	100 ± 1	$1,99 \pm 0,29$	$5,06 \pm 0,61$	CC1, Guk
ZO-1.644-812	$56,9 \pm 0,4$	$0,78 \pm 0,05$	$7,37 \pm 0,54$	Guk, CC2
ZO-1.644-890	$61,3 \pm 0,6$	$3,91 \pm 0,49$	$15,9 \pm 1,8$	Guk, CC2

Tab. 3.1 Zusammenfassung der kinetischen Parameter der Wechselwirkung zwischen den untersuchten ZO-1-Fragmenten und dem immobilisierten Occludin.378-521. Alle SPR-Sensorgramme ($n \geq 6$) wurden in den linearen Zeitbereichen der Dissoziation und Assoziation zur Bestimmung von k_d , k_a ausgewertet und daraus K_D kalkuliert. Die Mittelwerte \pm SEM wurden bei ZO-1-Konzentrationen von 1 und 1,5 μM berechnet. In der rechten Spalte sind die in den ZO-1-Fragmenten enthaltenen Regionen bzw. Domänen aufgezählt. CC, Coiled coil-Regionen CC1, CC2a und CC2b; Guk, Guanylatkinase-ähnliche Domäne.

Insbesondere ZO-1.589-772 zeigte die höchste Bindungsaffinität an Occludin mit einem K_D -Wert von 71 ± 12 nM. Die fast zweifache Verringerung auf 122 ± 3 nM für ZO-1.597-772 und auf 152 ± 36 nM für ZO-1.601-772 belegt die Bedeutung des Abschnittes zwischen SH3- und Guk-Domäne, inklusive der Vorsequenz vor CC1 für die Occludinbindung. Bei Vorhandensein der kompletten zweiten Helix CC2 aber fehlender C-terminaler Region fällt die Bindung um das zwei- bis dreifache im Vergleich zu ZO-1.589-772 ab. Die Guk-Domäne mit dem N-terminalen helikalen Teil CC2a (ZO-1.644-772) zeigte eine Bindungsaffinitäten von 246 ± 72 nM zu Occludin. Um das vier- bis fünffache schlechter waren die Affinitäten der ZO-1-Fragmente, die nur den ersten Teil der Guk-Domäne ohne Helices (ZO-1.644-731:

403 \pm 4 nM) oder CC1 und Guk-Domäne besitzen (ZO-1.589-731: 464 \pm 98 und ZO-1.597-731: 506 \pm 61 nM). Festzustellen ist, daß die Affinität des Ausgangsfragmentes ZO-1.644-890 zum Occludin um das mehr als 20-fache geringer war und auch das eigentliche Guk-Fragment ZO-1.644-812 eine 10-fach schlechtere Bindung an Occludin aufwies (Abb. 3.13).

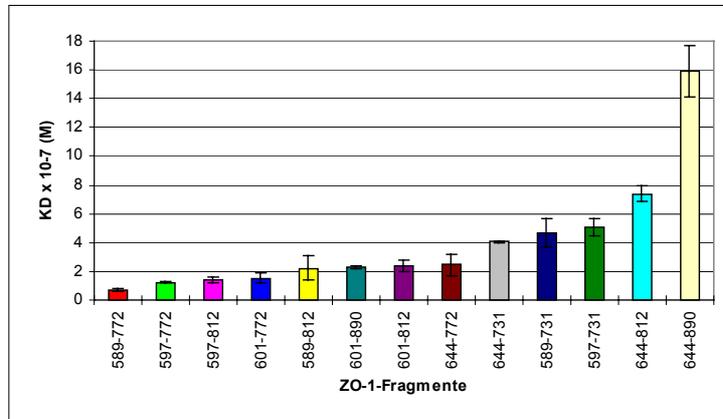


Abb. 3.13 Zusammenfassung der der kalkulierten Mittelwerte K_D ($MW \pm SEM$) der Wechselwirkung verschiedener ZO-1-Fragmente mit Occludin.378-521 (siehe Tab. 3.1). Die Mittelwerte wurden bei ZO-1-Konzentrationen von 1 und 1,5 μM berechnet.

3.5.5 Charakterisierung der Spezifität der Interaktion zwischen Occludin und ZO-1

Die Spezifität der ZO-1-Bindung an Occludin wurde durch eine Infusion mit einem Standard-Proteinmix (Eialbumin, Karbonanhydrase, Phosphorylase B, Myoglobin), BSA und MBP-Galaktosidase (MBP-Gal), dem Expressionsprodukt des verwendeten pMal-c2X-Vektors, überprüft. Es wurde für die aufgeführten Proteine keine Assoziation an das immobilisierte Occludin.378-521 nachgewiesen. Der negative oder positive Indexsprung wurde durch die veränderte Zusammensetzung der Analytlösung im Vergleich zum Laufpuffer hervorgerufen, kehrt aber nach Beenden der Inkubation zur Basislinie zurück (Abb. 3.14). Ebenfalls zeigte bei Messungen der Bindung von GST-Occludin.264-521 an die immobilisierten Peptide, das Expressionsprodukt des pGEX-Vektors GST keine Assoziation an die Peptide (nicht dargestellt).

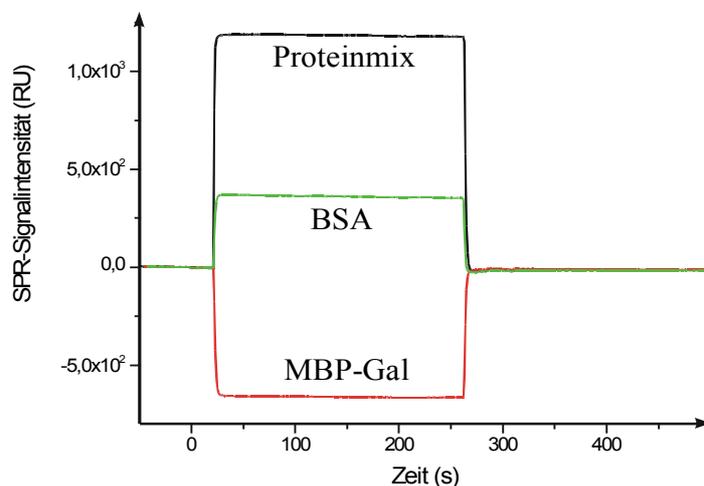


Abb. 3.14 Spezifität der Interaktion zwischen Occludin.378-521 und ZO-1.644-812. Die Infusion mit einem Standard-Proteinmix (Eialbumin, Karbonanhydrase, Phosphorylase B, Myoglobin SERVA), BSA und MBP-Galaktosidase (MBP-Gal) zeigt keine Assoziation an das immobilisierte Occludin.378-521.

3.5.6 Einfluß der SPR-Meßbedingungen auf die Interaktion zwischen Occludin und ZO-1 und Optimierung der Regenerationslösung

Flußrate. Zur Analyse des Massentransportes in der Assoziationsphase wurde die Flußrate variiert. Die Assoziation und Dissoziation ist vom Massentransport des Analyten aus der mobilen Phase in die Dextranmatrix abhängig. Die Diffusionsrate des Analyten in die Dextranmatrix ist von der Schichtdicke und den Konzentrationsunterschieden in der Matrix abhängig (siehe Anhang 7.2). Um die Effekte des Massentransportes zu analysieren, wurde die Bindung von 0,5 μM ZO-1.644-812 an das immobilisierte Occludin.378-521 bei verschiedenen Flußraten im Bereich von 1-20 $\mu\text{l}/\text{min}$ untersucht. Im Bereich von 8-12 $\mu\text{l}/\text{min}$ traten keine signifikanten Signalveränderungen auf (Tab. 3.2, siehe auch Abb. 3.16 A).

Flußrate ($\mu\text{l}/\text{min}$)	SPR-Signal (RU)	$k_d \times 10^{-3}$ (s^{-1})	$k_a \times 10^3$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	K_D (nM)
1	46	5,11	6,99	731
2	51	4,45	5,41	822
4	56	6,12	7,65	800
6	62	5,1	7,27	701
8	70	5,12	6,64	771
10	67	4,75	6,22	763
12	62	4,29	5,66	758
14	54	5,62	6,77	835
16	53	6,13	7,97	787
18	57	4,52	5,67	797
20	54	4,98	6,35	784

Tab. 3.2 Der Einfluß der Flußrate auf das Bindungsverhalten (RU) und auf die kinetischen Parameter k_d , k_a und K_D von 0,5 μM ZO-1.644-812 bei einer Bindung an Occludin.378-521. (1,07 ng/mm^2). Die kinetischen Daten k_d und k_a wurden aus den linearen Zeitbereichen der SPR-Sensorgrammen kalkuliert und K_D berechnet.

Ebenfalls zeigen die Dissoziationskonstanten keine relevanten Unterschiede im gesamten Bereich. Eine genauere Analyse der Assoziationsphasen zeigte, daß 10-20 s nach Assoziationsbeginn der auswertbare lineare Zusammenhang besteht, so daß Massentransportlimitierungen keinen Einfluß im ausgewerteten Bereich haben. Am Anfang der Assoziation (ca. 10 s) ist bei allen Flußraten eine Massenlimitierung zu beobachten (dR/dt gegen R ist konstant; siehe Abb. 3.15 A). Der Wert dR/dt gegen R nimmt bei massentransportlimitierten Reaktionen linear mit der dritten Wurzel der Flußrate zu und entspricht damit dem vom Glaser et al. (1993) beschriebenen Zusammenhang (Abb. 3.15 B).

Aufbauend auf das Ergebnis und zur Einsparung der eingesetzten Proteinmenge wurde bei allen weiteren Messungen mit einer Flußrate von 8 $\mu\text{l}/\text{min}$ gearbeitet.

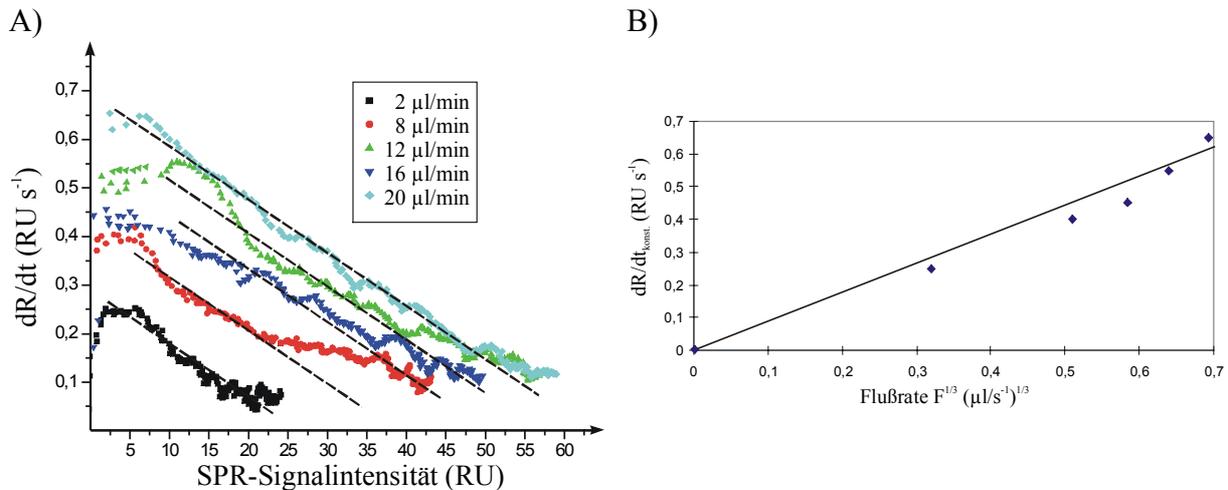


Abb. 3.15 Analyse des Massentransportes in der Assoziationsphase. A) Auftragung von dR/dt in Abhängigkeit von 5 verschiedenen Flußraten (2, 8, 12, 16, 20 $\mu\text{l}/\text{min}$). Die Steigung der Kurven, der k_s entspricht, sind bei allen ungefähr gleich. B) Graphische Auftragung von $dR/dt_{\text{konst.}}$ in Abhängigkeit der Kubikwurzel der Flußrate für 0,5 μM ZO-1.644-812. Eine Anpassung der Geraden ergab für $dR/dt_{\text{konst.}} = 0,82 \text{ J}^{1/3}$.

Kalziumkonzentration. Es wurde der Einfluß verschiedener Kalziumkonzentrationen auf die Wechselwirkung zwischen ZO-1.644-812 und Occludin.378-521 überprüft. Im Bereich von 0-100 mM hatte diese Veränderung keinen Effekt (Abb. 3.16 B).

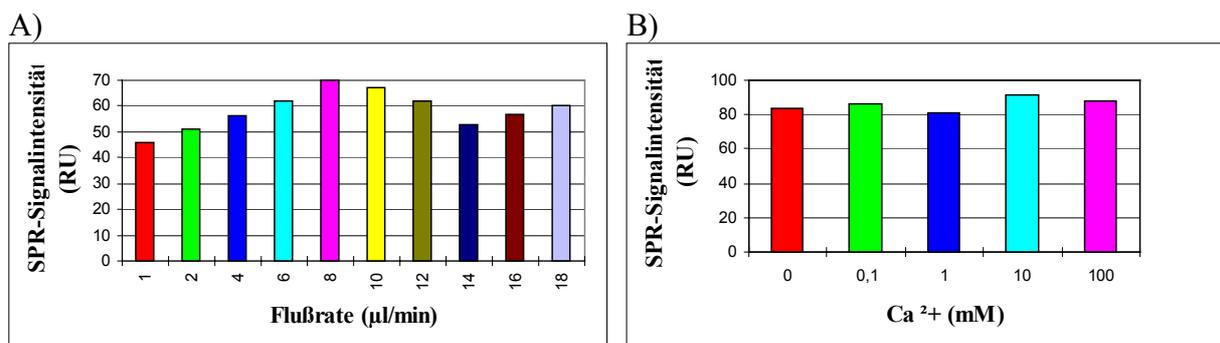


Abb. 3.16 A, B Einfluß der Flußrate und der Kalziumkonzentration auf die Interaktion zwischen 0,5 μM ZO-1.644-812 und 1,07 ng/mm^2 immobilisiertem Occludin.378-521. Wenn nicht anders angegeben, wurde bei einer Flußrate von 8 $\mu\text{l}/\text{min}$, einer Temperatur von 25 $^\circ\text{C}$, und einem pH-Wert von 7,8 ohne Kalziumzugabe gemessen (Standardbedingungen). A) SPR-Signalintensität (RU) bei Veränderung der Flußrate im Bereich von 2 und 18 $\mu\text{l}/\text{min}$. (B) Diagramm der Veränderung der Kalziumkonzentration zwischen 0-100 mM.

pH-Wert. Veränderungen des pH-Wertes im Bereich von 5 bis 9 zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der Menge an gebundenen Protein ZO-1.644-812 an Occludin.378-521 (Abb. 3.16 C)

Temperatur. Die Erhöhung der Temperatur auf 37 °C zur Anpassung an die physiologische Situation ging mit einer 2,5 bis 3-fachen Erhöhung der Bindungsmenge von ZO-1.644-812 an das immobilisierte Occludin.378-521 einher (Abb. 3.16 D).

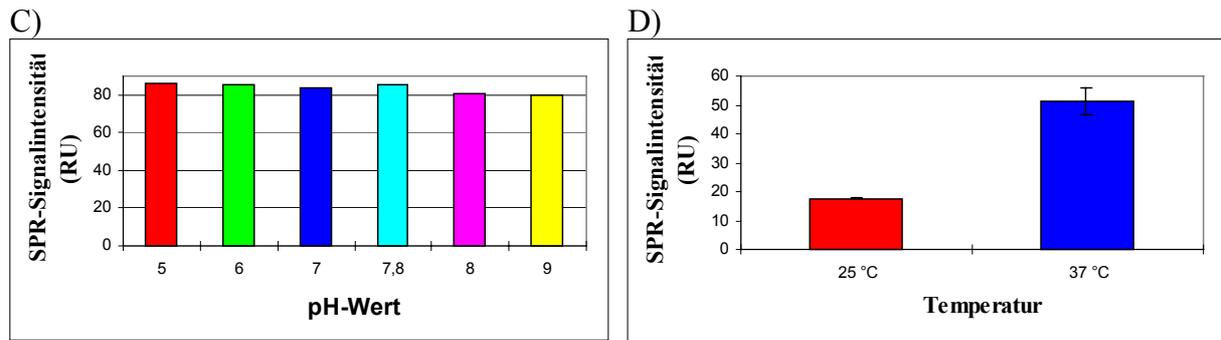


Abb. 3.16 C, D Einfluß des pH-Wertes und der Temperatur auf die Interaktion zwischen 0,5 μM ZO-1.644-812 und 1,07 ng/mm^2 (für C) bzw. 0,51 ng/mm^2 (für D) immobilisiertem Occludin.378-521 unter den in Abbildung 3.16 A genannten Standardbedingungen. (C) Veränderung des pH-Bereiches zwischen 5-9. D) Temperaturmessung bei 25 °C und 37 °C.

Sättigung. Eine komplette Sättigung der Bindung erfolgte nur bei geringem Immobilisierungsniveau von Occludin.378-521 ($\leq 3 \text{ ng}/\text{mm}^2$) und schlechter bindenden ZO-1-Fragmenten (z.B. ZO-1.644-812) nach ca. 30 min (Abb. 3.17 A).

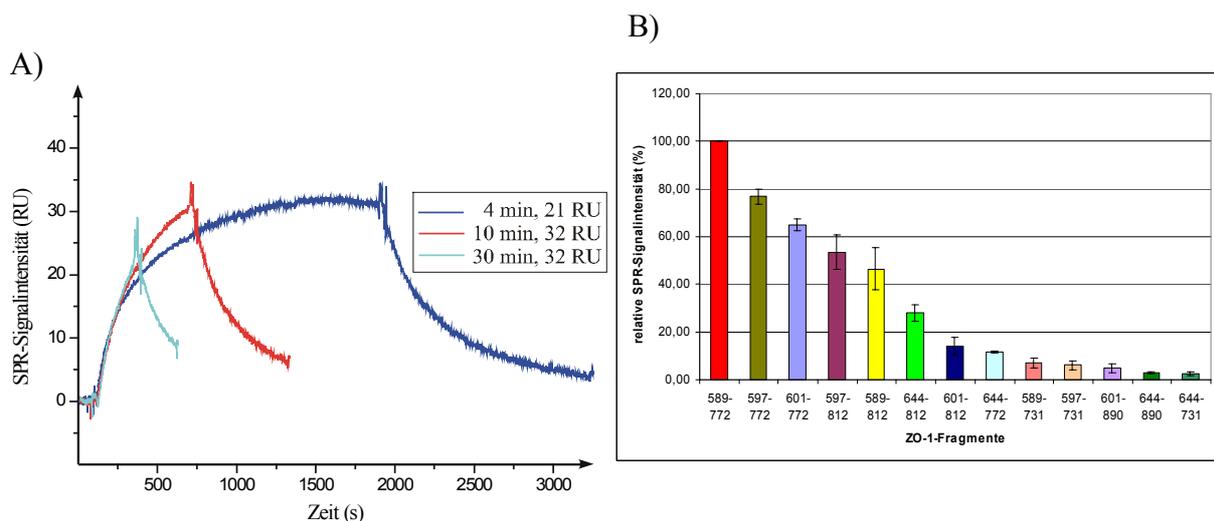


Abb. 3.17 SPR-Messungen unter Sättigungsbedingungen. A) Dargestellt wurde die Bindung zwischen 0,5 μM ZO-1.644-812 und Occludin.378-521 (0,51 ng/mm^2) nach 4-, 10- und 30-minütiger Assoziationsdauer. Eine Sättigung der Bindung erfolgte nach ca. 30 min. B) Mittelwerte der relativen Bindungsmengen (MW \pm SEM [%]) der ZO-1-Fragmente (2,5 μM), die aus drei Immobilisierungsgraden von Occludin.378-521 (10300, 3800 und 1230 RU) bei einer 20-minütigen Infusionsdauer erzeugt wurden.

Die SPR-Sensorgramme der „Sättigungskurven“ nach 20 min Infusionsdauer wurden bei drei unterschiedlichen Immobilisierungsgraden ($10,3 \text{ ng/mm}^2$, $3,8 \text{ ng/mm}^2$ und $1,23 \text{ ng/mm}^2$) von Occludin aufgezeichnet und für die verschiedenen ZO-1-Fragmente im Anhang 7.4 dargestellt (siehe Abb. 7.1.1-13 B). Die einzelnen Sensorgramme erreichen bei vielen ZO-1-Fragmenten in seiner Interaktion zu Occludin bei hohen Immobilisierungsdichten ($\geq 10 \text{ ng/mm}^2$) keine Gleichgewichtsbedingungen, was auf die schon mehrmals angesprochene Problematik der angenommenen Selbstassoziation von ZO-1 zurückzuführen sein könnte. Deshalb wurden Sättigungskurven bei sinkendem Immobilisierungsniveau von Occludin.378-521 aufgenommen, bei der eine Sättigung bei dem überwiegenden Teil der ZO-1-Fragmente erreicht wurde (Abb. 3.17 B).

Optimierung der Regenerationslösung. Die Regeneration hängt von der Aktivierung der Oberfläche, dem Occludin-Immobilisierungsgrad und der Immobilisierungsschemie ab und hatte somit Effekte auf die Interaktion und die Stabilität der Proteine. Die Bindung von ZO-1.589-772 an Occludin.378-521 und einer aktivierten/deaktivierten Referenzzelle wurde unter 5 unterschiedlichen Regenerationsbedingungen gemessen. Eine fast ideale Regenerierung wurde mit $50 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3$ und 200 mM NaCl erreicht. Bei diesen Bedingungen zeigte die Bindung von ZO-1.589-772 an Occludin relativ konstante Werte ($\pm 10\%$ Abweichung vom Ausgangswert). Ebenfalls war die Basisliniendrift am geringsten (Abb. 3.18).

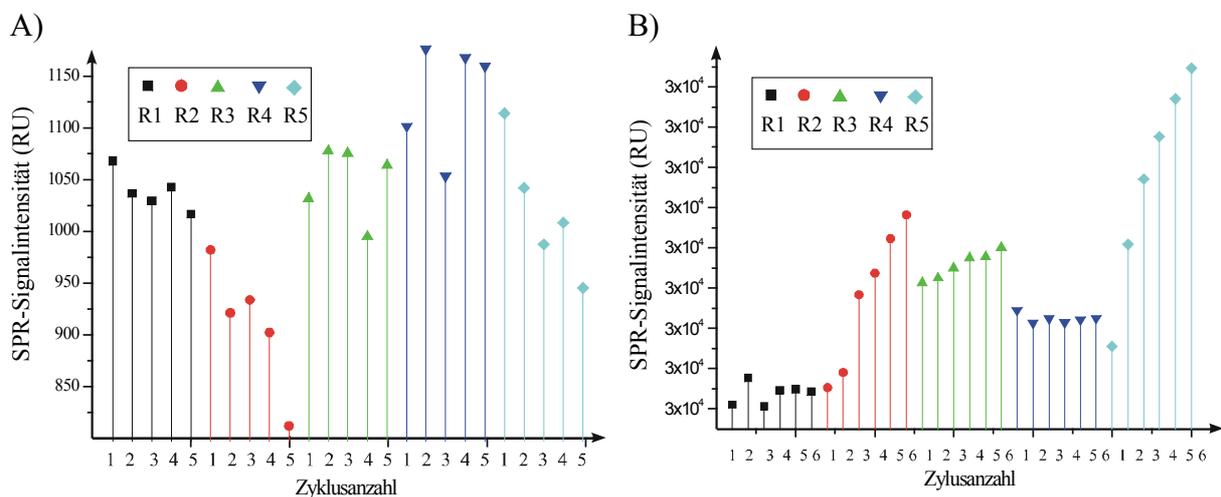


Abb. 3.18 Optimierung der Regenerationsbedingungen der Sensoroberfläche. Jeder Zyklus besteht aus einer 1-minütigen Injektion von $1,5 \mu\text{M}$ ZO-1.589-772 und einer 1-minütigen Injektion der Regenerationslösung. Als Regenerationslösungen dienten: R1, $50 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3$ und 200 mM NaCl ; R2, Glycin/HCl (pH 3); R3, Glycin/HCl (pH 2,5); R4, Glycin/HCl (pH 2) und R5, 1 mM NaOH im Laufpuffer. A) Trend der Bindung von ZO-1.589-772 an Occludin.378-521 ($10,3 \text{ ng/mm}^2$) durch Messung der SPR-Signalintensität (RU) nach 5-maliger Injektion von ZO-1.589-772 und der Regenerationslösungen R1-R5. B) Trend der Basislinie (SPR-Bindungsmenge) nach 5-maliger Injektion von ZO-1.589-772 unter den verschiedenen Regenerationsbedingungen.

Andere Regenerationslösungen, wie Glycin/HCl, pH 3; 2,5; 2 und 1mM NaOH in Laufpuffer zeigten schlechtere Regenerierungsergebnisse. Bei diesen Lösungen stieg oder fiel die Bindung von ZO-1.589-772 an das immobilisierte Occludin, d.h. es wurden keine konstante Bindungsantworten oder eine zu große Drift in der Basislinie gemessen (siehe Abb. 3.18).

3.5.7 Effekt von SIN-1 in pharmakologischen Untersuchungen

Durch die Bestimmung des Einflusses reaktiver Spezies sollte ein möglicher Effekt von SIN-1 auf die Interaktion zwischen ZO-1 und Occludin untersucht werden. Die Abbildung 3.19 A summiert die Ergebnisse für die Bindung von 0,5 μM ZO-1.644-812 an Occludin.378-521 in Gegenwart von SIN-1. Im Vergleich zum SIN-1 freien Experiment (Kontrolle, 31 RU), verringerte SIN-1, in Konzentrationen von 1 und 10 mM, die gebundene Menge von ZO-1.644-812 um das zwei- bis 3,5-fache. Es trat eine Verringerung des SPR-Signals auf 16 RU bzw. 14 RU nach 15 min Inkubationsdauer und 13 bzw. 9 RU nach 30-minütiger Inkubationsdauer auf (Abb. 3.19 A). Die Inkubation von 2,5 μM ZO-1.644-812 mit SIN-1 führte zu einer 3- bis 10-fachen Verringerung der Bindung an Occludin.378-521. Unter Kontrollbedingungen hatten 139 RU gebunden, nach einer Inkubation von 1 mM SIN-1 verringerte sich die Bindung auf 47 RU nach 15 min und 21 RU nach 30 min Inkubationsdauer. Eine Zugabe von 10 mM SIN-1 verstärkte diesen Effekt auf 28 RU nach 15 min und 13 RU nach 30 min Inkubation (Abb. 3.19 B).

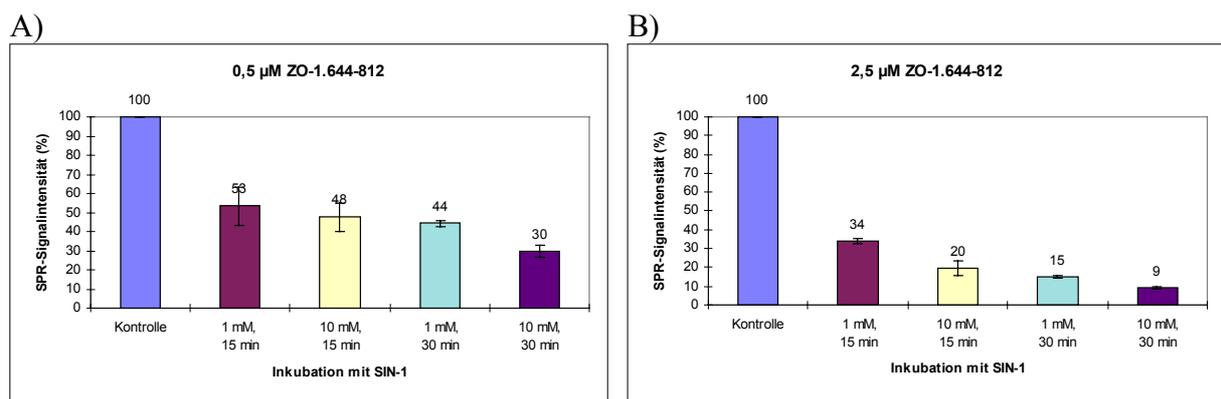


Abb. 3.19 Untersuchungen des Effektes von SIN-1 auf die Interaktion zwischen ZO-1.644-812 und Occludin.378-521 unter Standardbedingungen. (Immobilisierungsgrad 6,37 ng/mm²) A) Assoziation von 0,5 μM ZO-1 an Occludin unter Kontrollbedingungen und bei Zugabe von 1 bzw. 10 mM SIN-1 bei einer Inkubationsdauer von 15 sowie 30 min. B) Assoziation von 2,5 μM ZO-1 an Occludin unter Kontrollbedingungen und bei Zugabe von 1 bzw. 10 mM SIN-1 bei einer Inkubationsdauer von 15 oder 30 min.

Die SPR-Sensorgramme der Bindung von ZO-1.644-812 an Occludin.378-521 unter dem Einfluß von SIN-1 wurden, soweit das möglich war, hinsichtlich ihrer kinetischen Konstanten ausgewertet. Die Auswertung der Zeitbereiche, die einen linearen Zusammenhang der notwendigen Parameter in der Assoziation und Dissoziation ergeben, führen bei einer Inkubation mit 1 bzw. 10 mM SIN-1 zu einer 3,5 bis 6-fachen Verringerung des K_D -Wertes (Tab. 3.3). Es trat eine konzentrations- und zeitabhängige Wirkung von SIN-1 auf die Interaktion zwischen ZO-1.644-812 und Occludin.378-521 auf, die bei dieser Stärke des Effektes auch sicherlich schon bei viel geringeren Konzentrationen meßbar gewesen wäre.

Parameter	$k_d \cdot 10^{-3} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_a \cdot 10^3 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	$K_D \text{ (}\mu\text{M)}$
Kontrolle, ohne SIN-1	$5,69 \pm 0,04$	$7,8 \pm 0,5$	$0,74 \pm 0,05$
1 mM SIN-1, 15 min	$3,59 \pm 1,2$	$1,43 \pm 0,7$	$2,5 \pm 0,4$
10 mM SIN-1, 15 min	$3,96 \pm 0,7$	$0,92 \pm 0,02$	$4,3 \pm 0,6$
1 mM SIN-1, 30 min	$3,87 \pm 0,8$	$1,02 \pm 0,2$	$3,8 \pm 0,7$
10 mM SIN-1, 30 min	$4,76 \pm 1,1$	$0,96 \pm 0,4$	$6,8 \pm 0,9$

Tab. 3.3 Kinetische Konstanten der Wechselwirkung zwischen ZO-1.644-812 und Occludin.378-521 unter dem Einfluß von 1 mM sowie 10 mM SIN-1 nach 15- bzw. 30-minütiger Inkubation. Dargestellt sind die Parameter k_d , k_a und K_D aus der Auswertung linearer Zeitbereiche der Assoziations- und Dissoziationsphasen nach der im Kapitel 3.5.4 beschriebenen Methode.

3.6 Wechselwirkung von Peptidsequenzen aus ZO-1 mit Occludin

Aufgrund der bisher vorliegenden Ergebnisse kristallisierte sich immer mehr eine besondere Beteiligung der helikalen Abschnitte in und vor der Guk-Domäne von ZO-1 an der Wechselwirkung mit Occludin heraus. Deshalb wurde untersucht, welche der potentiellen Coiled coil-Helices die Bindung an Occludin vermittelt und welche einen Einfluß auf Selbstassoziationsvorgänge hat. Des Weiteren sollte das Zusammenwirken in das Modell einer 3 oder 4-Bündelhelix integrierbar sein. Um die Bindungsregion von Occludin an die angenommenen helikalen Abschnitten in ZO-1 detaillierter zu charakterisieren, wurden die Peptide, die CC1, CC2a bzw. CC2b in ZO-1 umfassen, synthetisiert (Peptidsequenzen siehe Anhang 7.1) und in Bindungsmessungen untersucht. Im folgenden sind die einzelnen Ergebnisse diskutiert.

3.6.1 SPR-Bindungsuntersuchungen zwischen den ZO-1-Peptidsequenzen und Occludin

Die Immobilisierung der Peptidsequenzen CC1, CC2a₂₈, CC2a₂₀ und CC2b erfolgte ebenfalls über die Aminkopplung auf dem dextranbeschichteten CM5-Chip (siehe auch 2.2.1, Abb. 3.20). Trotz der schlechten Wasserlöslichkeit der Helix CC2b wurde diese Peptidsequenz mit dem höchsten Immobilisierungsgrad (4,05 ng/mm²) gebunden. Die Immobilisierung zeigte ein sehr von den anderen Peptiden abweichendes Sensorgramm. Es erfolgte eine sprunghaft ansteigende Bindung an die Dextranoberfläche, die sich auch nach fortschreitender Bindung von CC2b an die Chipoberfläche kaum änderte (Abb. 3.20 D). Nach Beendigung der Immobilisierungsprozedur stellte sich trotz langer Equilibrierung der Chipoberfläche mit Laufpuffer kein Gleichgewicht der Basislinie ein; sie nahm beständig ab (nicht gezeigt).

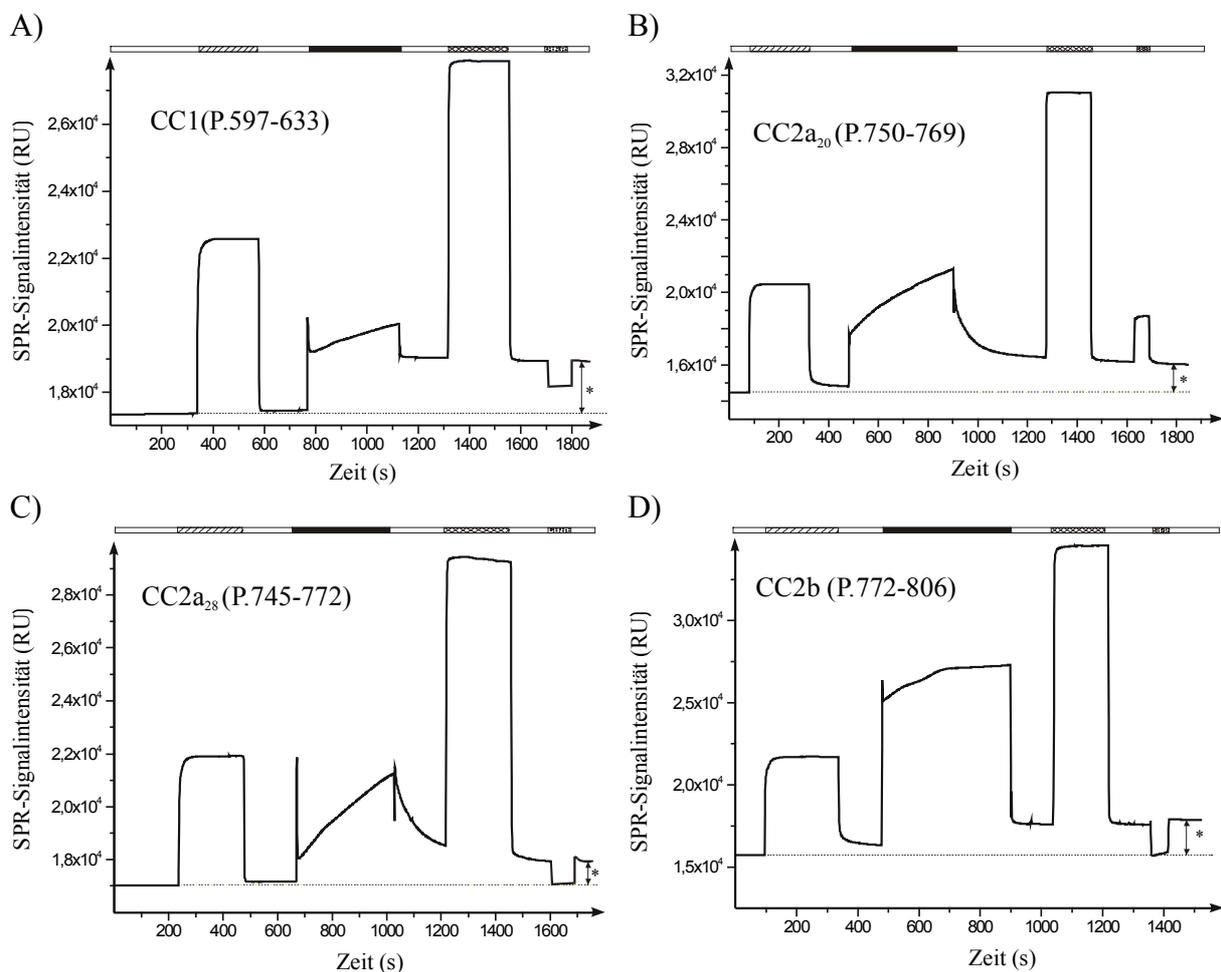


Abb. 3.20 Immobilisierung verschiedener ZO-1-Peptidsequenzen zwischen 0,76 und 4,05 ng/mm² an den CM5-Chip (schwarzer Balken) nach Aktivierung der Chipoberfläche mit EDC/NHS (schraffierter Balken). Nach der Absättigung der restlichen Ester mit Ethanolanin (pH 8,5, gekreuzter Balken) erfolgte ein 1-minütiges Waschen mit der Regenerationslösung (punktierter Balken). A) Immobilisierung des Peptids P.597-633 (CC1) mit 760 RU. B) Immobilisierung des Peptids P.750-760 (CC2a₂₀) mit 1622 RU. C) Immobilisierung des Peptids P.745-772 (CC2a₂₈) mit 1472 RU. D) Immobilisierung des Peptides P.772-806 (CC2b) mit 4050 RU.

Die Bindung von Occludin.378-521 an die Peptidsequenzen von ZO-1 wurde bei verschiedenen Occludinkonzentrationen von 0,25-1,5 μM gemessen. Es wurde unter identischen Bedingungen gemessen, bei der sich Assoziation (Occludin im Laufpuffer), Dissoziation (Occludin-freier Laufpuffer) und Regeneration ablösten. Es erfolgte eine konzentrationsabhängige Bindung von Occludin an die Peptidsequenzen CC1 und CC2a_{22, 28} (Abb. 3.21).

Die SPR-Messungen der Bindung von Occludin.378-521 an CC2b waren sehr widersprüchlich und nicht reproduzierbar, welche auch auf die ungewöhnlichen Immobilisierungsergebnisse zurückzuführen sind. Aus diesem Grund wurde die Interaktion zwischen Occludin und CC2b in der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt.

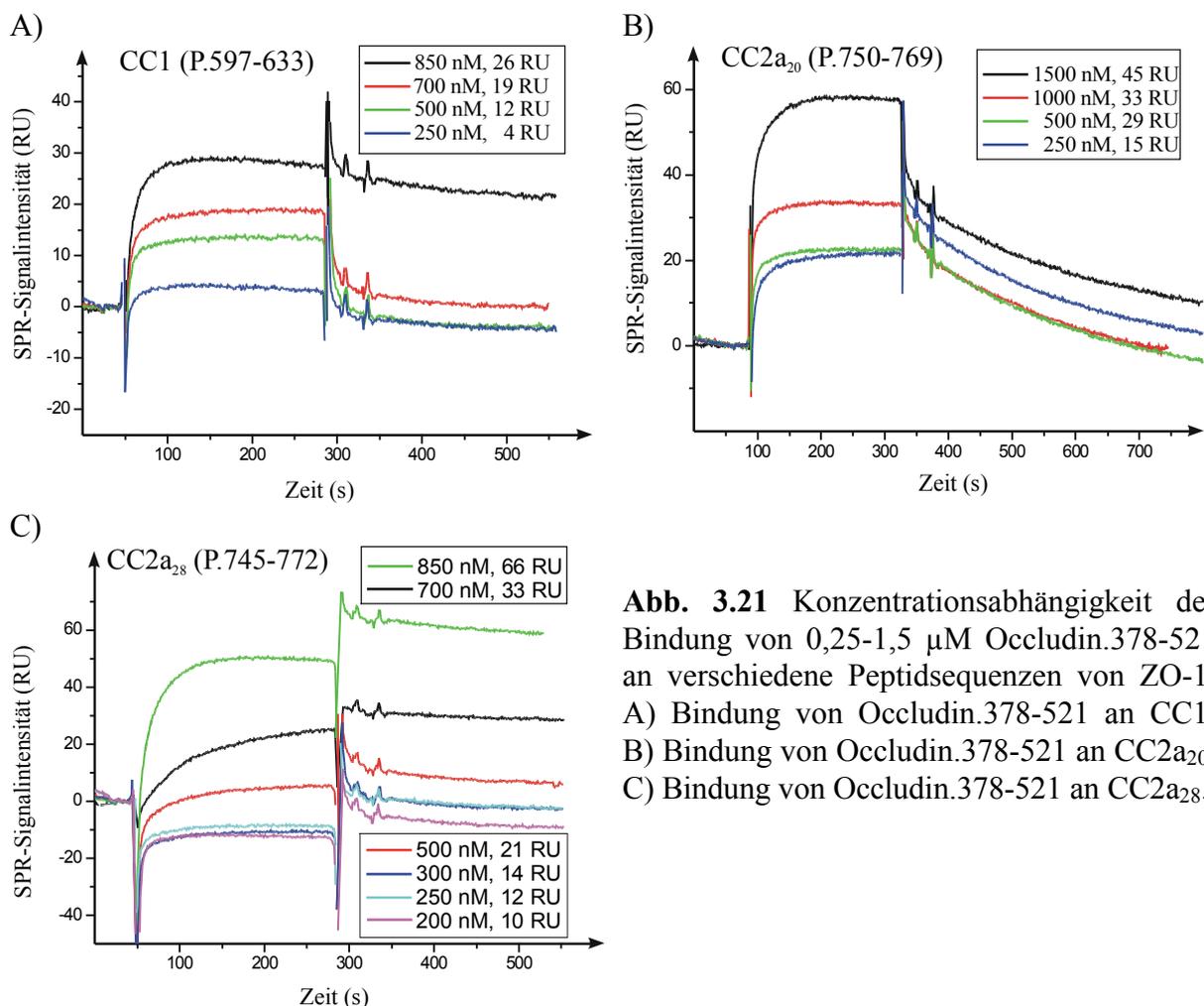


Abb. 3.21 Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von 0,25-1,5 μM Occludin.378-521 an verschiedene Peptidsequenzen von ZO-1. A) Bindung von Occludin.378-521 an CC1. B) Bindung von Occludin.378-521 an CC2a₂₀. C) Bindung von Occludin.378-521 an CC2a₂₈.

Die kinetischen Konstanten der Sensorgramme wurden nach der beschriebenen Methode für die Wechselwirkung der ZO-1-Fragmente mit Occludin ermittelt (siehe 2.2.2). Der Indexsprung wurde durch Subtraktion mit dem Signal in der Referenzzelle beseitigt. Hierbei war eine schnellere Kinetik der Interaktion zwischen dem Occludin und Peptidsequenzen CC1

und CC2a_{20, 28} zu beobachten, d.h. bei der Assoziation wurde schnell eine Sättigung der Bindung erreicht. Auch hier wurden die linearen Zeitbereiche der Dissoziation mit $\ln(R_0/R_t)$ in Abhängigkeit von t (Abb. 3.22 A, C, E) zur Bestimmung von k_d und der Assoziation mit $\ln(\text{abs}(dR/dt))$ in Abhängigkeit von t (Abb. 3.22 B, D, F) zur Bestimmung von k_a ausgewertet.

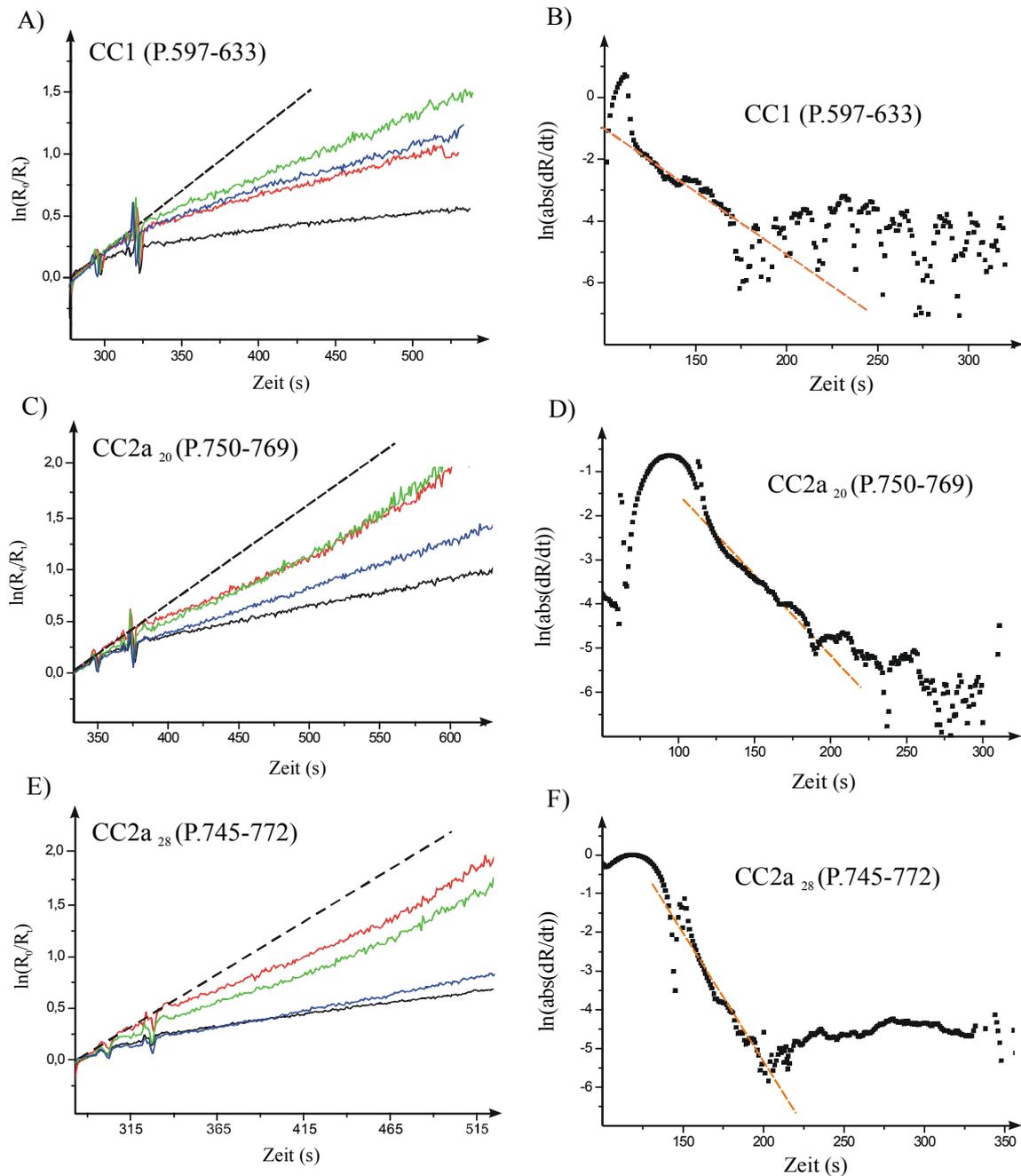


Abb. 3.22 Bestimmung der kinetischen Konstanten aus den SPR-Sensorgrammen der Abb. 3.21. Auswertung der linearen Zeitbereiche der Dissoziation von $\ln(R_0/R_t)$ in Abhängigkeit von t zur Bestimmung von k_d (gestrichelte Linie) in den ersten 50 s nach Beginn der Dissoziationsphase und R_t , Resonanz zur Zeit t . Bestimmung der Assoziationsrate k_a durch Auswertung der linearen Zeitbereiche (gestrichelte Linie) der Assoziation von $\ln(\text{abs}(dR/dt))$ in Abhängigkeit von t . Der lineare Zeitbereich für 0,5 μM Occludin.378-521 lag zwischen 115-170 s für B (CC1); 115-170 s für D (CC2a₂₀) und 150-200 s für F (CC2a₂₈).

Die kinetischen Parameter k_d , k_a und K_D (Raten- und Affinitätskonstanten) sind für die potentiell helikalen Abschnitte in Tabelle 3.4 zusammengefaßt. Durch die SPR-spektroskopischen Messungen der einzelnen Peptidsequenzen aus ZO-1 wurden die SPR-Untersuchungen mit den rekombinanten ZO-1-Fragmenten bestätigt. Die Bindungsaffinitäten der helikalen Abschnitte CC2a₂₀ bzw. CC2a₂₈ von 76 ± 32 und 58 ± 20 nM sind vergleichbar mit ZO-1.589-772 (71 ± 12 nM) und bestätigen die spezifische Bindung von Occludin an die Region CC2a in der Guk-Domäne von ZO-1. Es zeigte sich eine 6- bis 7,5-fache Verringerung der Bindungsaffinität des Abschnittes CC1 an Occludin.378-521 (460 ± 104 nM), der in dem Bereich der Bindung der entsprechenden rekombinanten ZO-1-Fragmente ZO-1.589-731 sowie 597-731 (464 ± 98 bzw. 506 ± 61 nM) lag.

Peptidsequenzen aus ZO-1	$k_d \times 10^{-3} (s^{-1})$	$k_a \times 10^4 (M^{-1}s^{-1})$	$K_D (nM)$
CC1	$16,6 \pm 0,6$	$3,51 \pm 0,98$	460 ± 104
CC2a ₂₀	$9,56 \pm 1,32$	$9,23 \pm 2,33$	76 ± 32
CC2a ₂₈	$6,33 \pm 1,9$	$11,14 \pm 1,77$	58 ± 20

Tab. 3.4 Kinetische Konstanten k_d , k_a und K_D der Wechselwirkung von Occludin.378-521 mit den ZO-1-Peptidsequenzen CC1 sowie CC2a_{20,28}. Ausgewertet wurden die linearen Zeitbereiche der Assoziation und Dissoziation der SPR-Sensorgramme und die Mittelwerte (MW \pm SEM) dargestellt.

3.6.2 Affinitätsbindung und Koimmunopräzipitation von Occludin mit ZO-1-Peptidsequenzen

Die Bindung von Occludin an die potentiell helikalen Abschnitte aus ZO-1 zeigte Unterschiede sowohl in der gebundenen Menge an Occludin als auch in den Affinitätswerten. Sowohl die Peptidsequenz CC2a₂₀ als auch CC2a₂₈ scheinen für die Bindung an Occludin eine herausragende Bedeutung zu haben. Das war auch schon durch SPR-Messungen mit den rekombinanten ZO-1-Fragmenten nachgewiesen worden.

Deshalb wurden zur Überprüfung der SPR-Ergebnisse und weiteren Charakterisierung von CC2a_{20, 28} die biotinylierten Peptide P.745-772 und P.750-769 an Agarose-Streptavidin-Kügelchen gebunden und mit rekombinantem Occludin inkubiert (siehe 2.1.5). Es konnte gezeigt werden, daß MBP-Occludin.378-521 vollständig an die Peptidsequenz CC2a₂₈ aus der Guk-Domäne von ZO-1 bindet (F2 aus Abb. 3.23 A). Weiterhin wurde die Bindung von GST-Occludin.264-521 an CC2a₂₀ und CC2a₂₈ untersucht. Auch hier zeigte sich eine fast vollständige Bindung von GST-Occludin.264-521 an CC2a₂₀ (F2 aus Abb. 3.23 B) und CC2a₂₈ (F4 aus Abb.3.23 B). Eine unspezifische Bindung von GST-Occludin.264-521 an die

Streptavidin-Agarose-Partikel, an die keine Peptide immobilisiert waren, konnte zum großen Teil ausgeschlossen werden (F6 und F8 in der Abb.3.23 B).

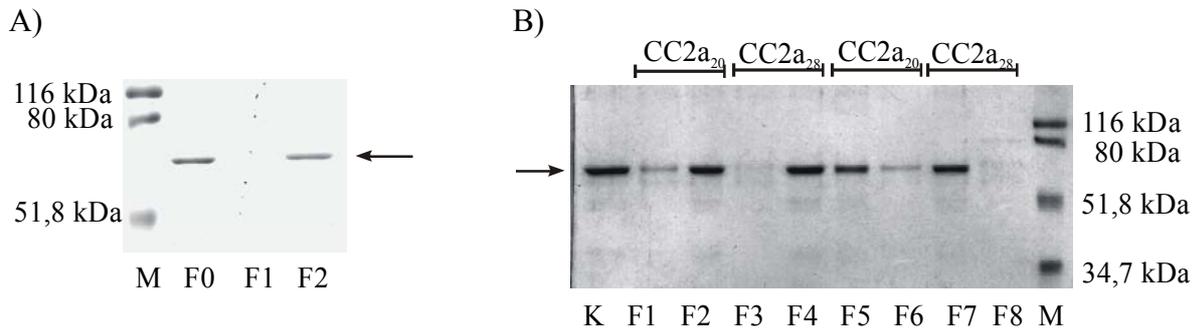


Abb. 3.23 Affinitätsbindung mit dem an Streptavidin-Agarose-Partikel gebundenem CC2a₂₈ (P.745-772) und MBP-Occludin.378-521 (A) sowie von GST-Occludin.264-521 an CC2a₂₀ (P.750-769) bzw. CC2a₂₈ (P.745-772) (B).

A) 10%-ige SDS-Page der Bindungsprobe von MBP-Occludin.378-521 (Pfeil) an CC2a₂₈. F0, MBP-Occludin.378-521; F1, Überstandsfraktion; F2, Elutionsprobe des an CC2a₂₈ gebundenen MBP-Occludin.378-521; M, Molekulargewichtsmarker. B) 10%-ige SDS-Page der Bindungsprobe von GST-Occludin.264-521 (Pfeil) an CC2a_{20,28}. K, GST-Occludin.264-521; F1, F3, F5, und F7, Überstandsfraktionen; F2, Elutionsprobe des an CC2a₂₀ gebundenen GST-Occludin.264-521; F4, Elutionsprobe des an CC2a₂₈ gebundenen GST-Occludin.264-521; F6 und F8, Elutionsproben von GST-Occludin.264-521, bei der keine Peptidsequenzen von CC2a_{20,28} an Streptavidin-Agarose-Partikel immobilisiert waren. M, Molekulargewichtsmarker.

In weiteren Experimenten wurden Koimmunopräzipitationsuntersuchungen mit MDCK-Zellysat durchgeführt, bei der CC2a₂₈ (P.745-772) an die Agarose-Streptavidin-Partikel immobilisiert wurde und die Bindung von Occludin mit Hilfe von Antikörpern im Western Blot detektiert werden sollte (siehe 2.1.5). Dabei zeigte sich aber, daß Occludin aus dem MDCK-Zellysat nicht an das Peptid bindet (F2 in Abb. 3.24).

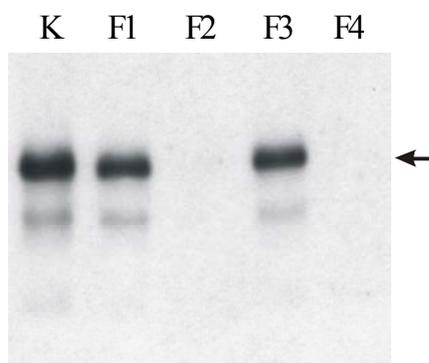


Abb. 3.24 Western Blot von Occludin (Pfeil) aus MDCK-Zellysat zur Darstellung der Bindung an das an Streptavidin-Agarose-Partikel immobilisierte Peptid CC2a₂₈. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteinfractionen in einer 10%-igen SDS-Page wurden die Proteine aus dem MDCK-Zellysat auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit polyklonalen Anti-Occludin-Antikörper detektiert. K, Occludin; F1, Überstandsfraktion; F2, Elutionsprobe des an CC2a₂₈ gebundenen Occludin. Zur Kontrolle wurden die Streptavidin-Agarose-Partikel ohne CC2a₂₈ mit Zellysat inkubiert. F3, Überstandsfraktion. F4, Elutionsprobe.

3.6.3 Charakterisierung der Peptidsequenz CC2a aus der Guk-Domäne von ZO-1 als Bindungsregion für Occludin

Aus den SPR-Messungen war ersichtlich, daß bei Vorhandensein von CC2b in den ZO-1-Sequenzen, die Bindung an das immobilisierte Occludin um das mehr als Zweifache schlechter ist. Aufgrund der hohen Bindungsaffinität des C-terminalen Teils von Occludin an CC2a (SPR-Spektroskopie) und der Bestätigung der Bindung durch Kopräzipitationsexperimente wurde mit der ZO-1-Peptidsequenz CC2a₂₀ eine Peptidbibliothek hergestellt. Dabei wurde die Ausgangssequenz CC2a₂₀ in ihrer Länge systematisch variiert und 120 Peptide aus diesem Peptidabschnitt auf eine Zellulosemembran gebracht (wie unter 2.5 beschrieben). Die kompletten Membranen wurden mit GST-Occludin.264-521 inkubiert und durch entsprechende Antikörper die Bindung von Occludin an den Wildtyp und die variierten Peptidsequenzen nachgewiesen (Abb. 3.25).

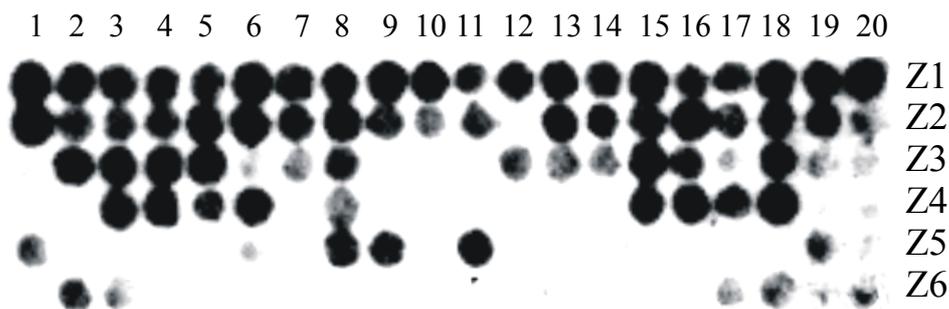


Abb. 3.25 Längenanalyse von CC2a₂₀. Bindung von GST-Occludin.264-521 an 120 systematisch in der Länge variierte Peptidsequenzen von CC2a₂₀ auf einer Zellulosemembran. Die Schwärzung der Membran zeigte eine Wechselwirkung von GST-Occludin.264-521 mit den jeweiligen Peptidsequenzen, die durch entsprechende Antikörpern mit dem ECL-System detektiert wurden. Die Peptidsequenzen wurden durchgehend von links nach rechts beginnend mit Zeile 1 (Z1) bis zur Zeile 6 (Z6) numeriert.

Durch die Auswertung der Lumineszenzintensitäten (aus n=2 Versuchen) konnten die Punktmuster quantitativ untereinander verglichen werden. Die Ergebnisse der Längenanalyse weisen auf einen Abschnitt am C-terminalen Ende der Region CC2a₂₀ hin, der für die Bindung an Occludin Bedeutung hat. Zur Auswertung der Membranen wurde die Bindungsstärke der CC2a₂₀-Wildtypsequenz auf 100% gesetzt und die Bindung von GST-Occludin.264-521 an die variierten Peptidsequenzen anhand der entsprechenden Intensitäten ausgewertet. In der Tabelle 3.5 wurden die Chemilumineszenzintensitäten, die der gebundenen Occludinmenge proportional sind, dargestellt. GST-Occludin bindet noch mit 60%-iger Intensität an diesen C-terminalen Abschnitt mit der Aminosäuresequenz

“LRKNNHHLF“ (ZO-1.761-769) im Vergleich zur Wildtypsequenz (linke Seite der Tab. 3.5). Dieser Bereich entspricht genau einer helikalen Windung einer Coiled coil-Helix. Die hydrophilen Aminosäuren N und H können Wasserstoffbrücken ausbilden, die mit den in Occludin gebildeten Wasserstoffbrücken möglicherweise interagieren. Dagegen wird die Bindung von GST-Occludin.264-521 bei Verkürzung von CC2a₂₀ um diese hintere Aminosäuresequenz drastisch reduziert (rechte Seite in der Tab. 3.5). Die Quantifizierung der Bindung von GST-Occludin.264-521 an alle untersuchten Peptidsequenzen ist im Anhang 7.5 (siehe Tab. 7.1) dargestellt.

Nr.	Peptidsequenz von CC2a	Lumineszenz (%)	Nr.	Peptidsequenz von CC2a	Lumineszenz (%)
1	SARKLYERSHKLRKNNHHLF	100	49	KLYERSHKLRK	1,5
21	YERSHKLRKNNHHLF	84,6	84	YERSHKLR	1,4
28	ERSHKLRKNNHHLF	82,9	94	RKLYERS	1,3
2	SARKLYERSHKLRKNNHHL	78,7	93	ARKLYER	1,3
45	SHKLRKNNHHLF	65,3	110	LYERSH	1,2
36	RSHKLRKNNHHLF	64,7	73	ERSHKLRKN	1,2
78	LRKNNHHLF	63,6	111	YERSHK	1,1
35	ERSHKLRKNNHHL	56,6	107	ARKLYE	1,1
43	ERSHKLRKNNHH	52,5	106	SARKLY	0,9
76	HKLRKNNHH	52,3	83	LYERSHKL	0,8
42	YERSHKLRKNNH	51,9	71	LYERSHKLR	0,8
55	HKLRKNNHHLF	49,3	51	YERSHKLRKNN	0,8
66	KLRKNNHHLF	49,0	72	YERSHKLRK	0,7
20	LYERSHKLRKNNHHL	48,8	96	LYERSHK	0,6
91	RKNNHHLF	48,1	70	KLYERSHKL	0,5
88	HKLRKNNH	47,2	50	LYERSHKLRKN	0,5
64	SHKLRKNNHH	46,8	92	SARKLYE	0,3
75	SHKLRKNNH	46,3	67	SARKLYERS	0,3
3	ARKLYERSHKLRKNNHHLF	45,2	109	KLYERS	0,2
26	LYERSHKLRKNNHH	42,7	82	KLYERSHK	0,1

Tab. 3.5 Darstellung der prozentualen Lumineszenzintensitätswerte (BLU, Boehringer Lichteinheiten), bei der die Lichtintensitäten der Punkte auf der Zellulosemembran aus der Abb. 3.25 ausgewertet wurden (LumiAnalyst™). Dargestellt ist die Bindung von GST-Occludin.264-521 an die 20 am stärksten bindenden Peptidsequenzen (linke Spalten) und die 20 Peptidsequenzen, an die Occludin kaum bzw. nicht mehr bindet (rechte Spalten).

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung einzelner Aminosäuren für die Bindung an Occludin wurde eine Substitutionsanalyse von CC2a₂₀ durchgeführt. Dadurch sollten sogenannte Schlüsselaminosäuren identifiziert werden. Das sind solche, die nicht durch andere oder nur durch physiologisch ähnliche Aminosäuren ohne einen Bindungsverlust ersetzt werden können. Jeder Punkt auf der Zellulosemembran repräsentiert jeweils ein um nur eine AS variiertes Peptid von CC2a₂₀. Die schwarzen Punkte bringen also die Sequenzpositionen zum Vorschein, die Bedeutung für die Interaktion zwischen beiden

Proteinen haben, d.h. weniger starke Schwärzungen resultieren in einer verringerten Bindung von GST-Occludin.264-521 an die jeweiligen Peptide. Aus den Ergebnissen der Substitutionsanalyse (n=2) ist ersichtlich, daß nur Cystein eine Schlüsselfunktion in der Sequenz der CC2a₂₀ in Bezug auf die Occludinbindung hat. Bei Austausch der jeweiligen Wildtyp-AS durch Cystein kam es zu einer Reduzierung der Bindungsstärke (Abb. 3.26, Spalte C). Andere mögliche Schlüssel-AS konnten mit dieser Methode nicht identifiziert werden.

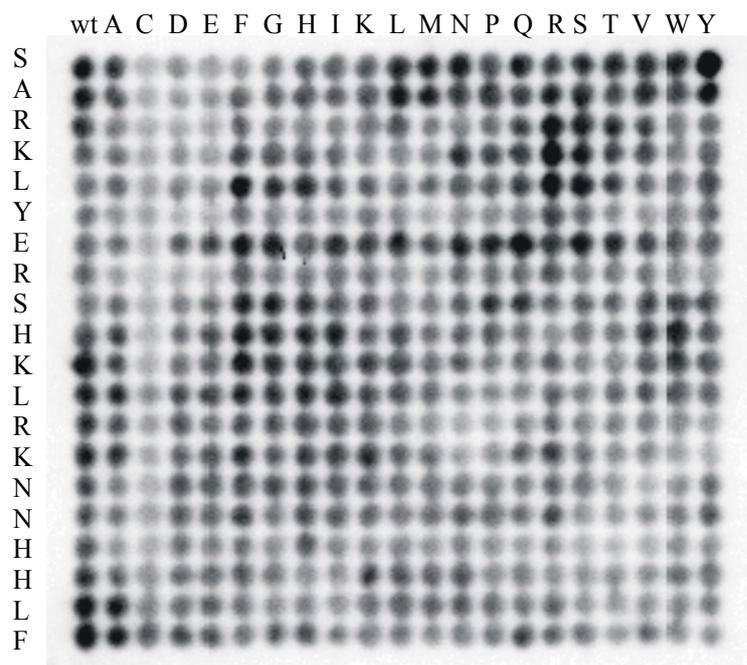


Abb. 3.26 Substitutionsanalyse von CC2a₂₀. Auf einer Zellulosemembran wurde mit Hilfe der SPOT-Technik jede Aminosäure der Wildtypsequenz durch eine der anderen essentiellen 19 Aminosäuren substituiert (AS in der oberen Reihe). In der linken Spalte ist die Wildtypsequenz von CC2a₂₀ angegeben. Die Bindung von GST-Occludin.264-521 wurde durch Anti-GST und einem peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper durch das ECL-System detektiert.

3.7 Circular dichroismus-Spektroskopie von CC1, CC2a und CC2b aus ZO-1 und eines verkürzten C-terminalen Teils von Occludin

In diesen Untersuchungen wurden die helikalen Abschnitte CC1, CC2a_{20, 28} und CC2b hinsichtlich ihres CD-Spektrums in Puffer SP2 und 50% TFE charakterisiert. Die Regionen CC1 und CC2a_{20, 28} zeigen in SP2 eine geringe Helizität um die 5-8%. CC1 konnte nur zu 13-14% in eine α -helikale Konformation unter 50% TFE, einer helixinduzierenden Reagenz, gebracht werden (Abb. 3.27 A). Bei Lösung von CC2a₂₀ und CC2a₂₈ in 50% TFE stieg die Helizität auf 15 bzw. 60% (Abb. 3.27 B). Dagegen zeigte CC2b neben β -Faltblatteigenschaften von 6% (Minimum bei 216 nm) sowohl in SP2 als auch in 50% TFE einen hohen Anteil an helikalen Strukturen von 78 bzw. 94% (Abb. 3.27 C).

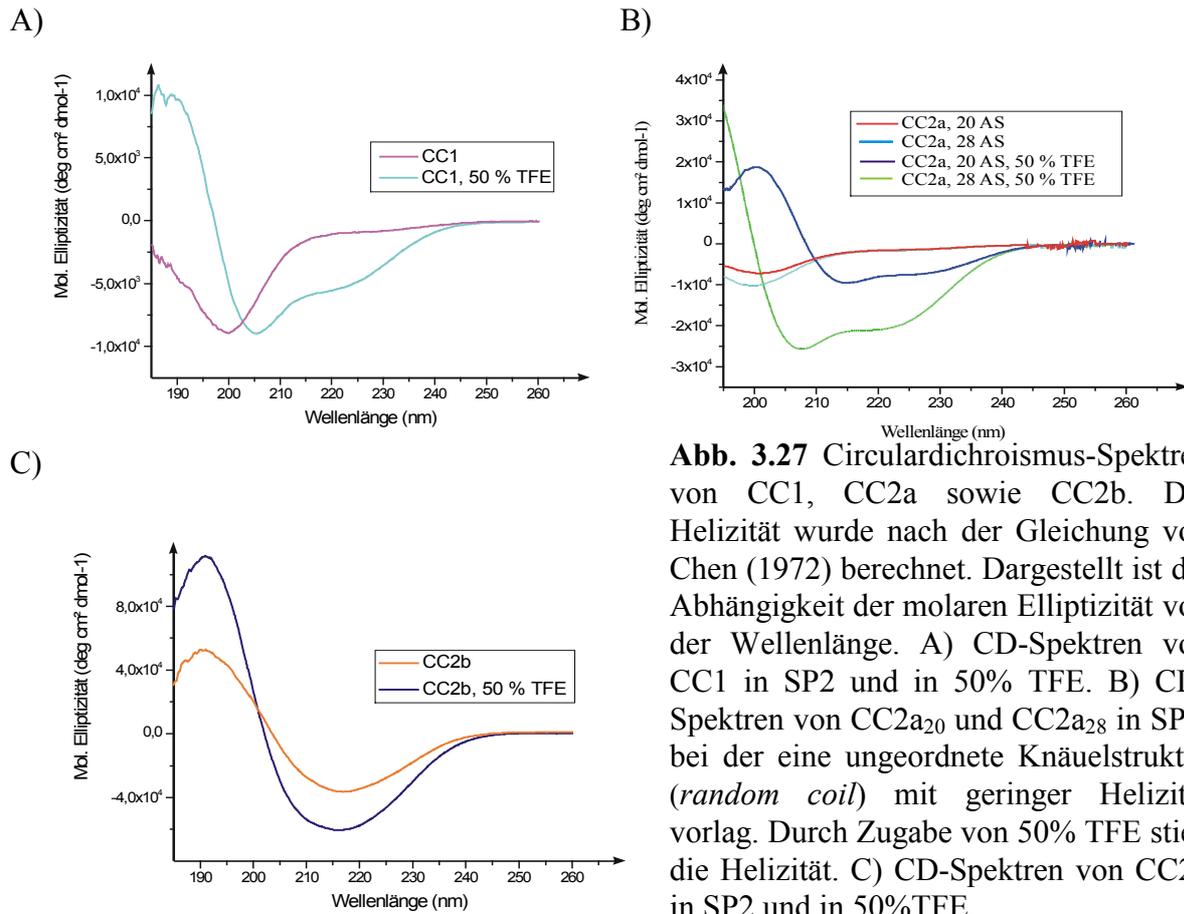


Abb. 3.27 Circular dichroismus-Spektren von CC1, CC2a sowie CC2b. Die Helizität wurde nach der Gleichung von Chen (1972) berechnet. Dargestellt ist die Abhängigkeit der molaren Elliptizität von der Wellenlänge. A) CD-Spektren von CC1 in SP2 und in 50% TFE. B) CD-Spektren von CC2a₂₀ und CC2a₂₈ in SP2, bei der eine ungeordnete Knäuelstruktur (*random coil*) mit geringer Helizität vorlag. Durch Zugabe von 50% TFE stieg die Helizität. C) CD-Spektren von CC2b in SP2 und in 50% TFE.

Zur Untersuchung der vorliegenden Strukturbestandteile des C-terminalen Bereiches von Occludin wurde MBP-Occludin.406-521 herangezogen, das die vorhergesagten helikalen und Coiled coil-Abschnitte umfaßt (F1 in der Abb. 3.28 A).

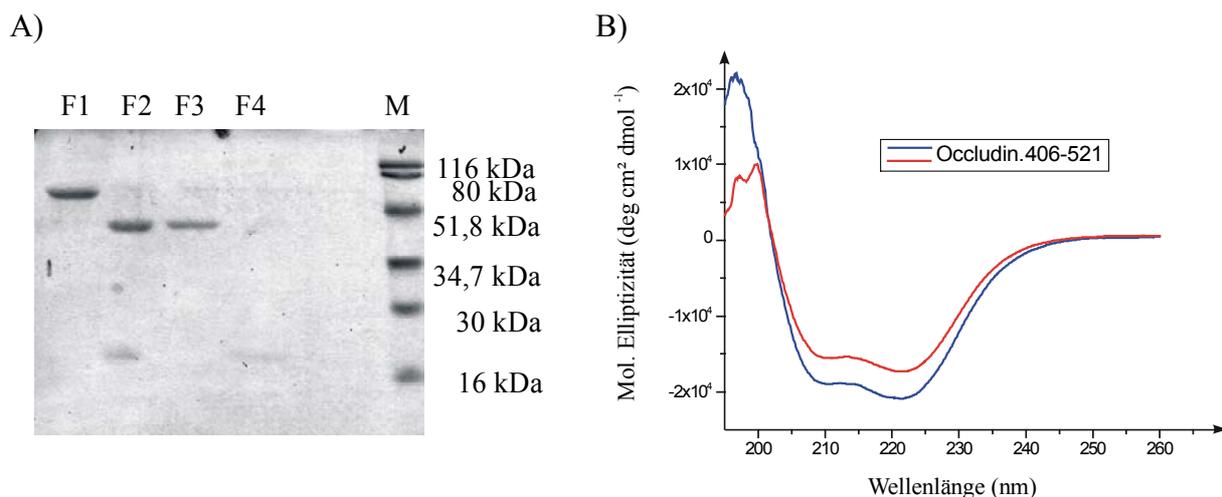


Abb. 3.28 Bestimmung der Strukturbestandteile des C-terminalen Teils von Occludin.406-521. A) 15%-ige SDS-PAGE von MBP-Occludin.406-521 (F1, 1). Abspaltung des MBP (2) vom Occludin.406-521 durch den Faktor X_a (F2). Abtrennung des MBP (2) durch Amylose-Resin (F3). F4, Occludin.406-521 (3). B) Circular dichroismus-Spektren von 2 verschiedenen Occludin.406-521-Fractionen. Die Helizität betrug 52-66% (nach Chen, 1972).

Nach der gezielten Abspaltung des MBP vom Occludin.406-521 mit Hilfe der spezifischen Protease Faktor X_a (F2 in der Abb. 3.28 A) wurde MBP über eine Bindung an Amylose-Resin-Partikel abgetrennt (F3). Das im Überstand gelöste Occludin.406-521 (F4) wurde anschließend CD-spektroskopisch untersucht. Es konnte eine Helizität von 52-66% von Occludin.406-521 in SP2 mit einem Anteil an β -Faltblatteigenschaften von ca. 10% berechnet werden (Abb. 3.28 B).