

7 Anhang

7.0 Abstract

Brain capillary endothelial cells act as a barrier between blood and brain restricting the diffusion of water and solutes through the paracellular pathway. Disturbance of the blood-brain barrier (BBB) integrity contributes to many disorders, including stroke, brain-edema, AIDS-dementia complex and others. The paracellular seal is composed of a series of highly ordered membrane contact strands called tight junctions (TJs). Several proteins were found to be localised in TJs, however the structure and regulation of the multiprotein TJ complex is unclear. Defining how the tight junction proteins interact with each other is a prerequisite for understanding how the BBB functions at the molecular level.

In the present work, the interaction of the functionally diverse TJ proteins occludin and ZO-1 was characterised using surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy, epitope mapping and other affinity studies. Bioinformatic studies predicted a possible coiled coil interaction between ZO-1 and the C-terminal part of occludin. SPR experiments and peptide epitope scans narrowed down the possible interacting sites in ZO-1 to two regions: one located between the SH3 and Guk domains (including CC1, the so-called hinge region) and another at the C-terminal end of the Guk domain of ZO-1 (CC2a). Both regions are responsible for the interaction with occludin.

The helical content of coiled coil regions of ZO-1 was confirmed by circular dichroism experiments. Furthermore, the C-terminal part of occludin involved in the interaction with ZO-1 formed an α -helix in solution. Therefore, the structural requirements of a coiled coil interaction between both proteins are fulfilled.

In vitro binding studies suggest that intermolecular SH3-Guk binding may occur via 3D-domain swapping. This 3D-domain swapping model allows the exchange of complementary substructures to generate dimers or oligomers of ZO-1. The binding of occludin to the hinge region could alter the conformational properties of ZO-1 by destabilizing inter- and intramolecular SH3-Guk interactions to promote oligomerization of ZO-1. It was hypothesised that binding of occludin may enhance the recruiting potential of ZO-1 at the plasmamembrane of tight junctions.

An assumption was made that the SH3 and Guk domains of ZO-1 form an integrated functional unit, based on the results of binding studies and literature data available for other MAGUK proteins and the conservation of residues involved in the intramolecular interaction.

The complexity of protein-protein-interactions at tight junctions has functional and regulatory relevance especially between the TJ proteins occludin and ZO-1. \cdot NO and other reactive species reduce the strength of the ZO-1/occludin interaction. This suggest a molecular mechanism for tight junction permeability depending on the occludin/ZO-1 interaction.

The findings provide a basis for forthcoming investigations, especially structural studies of TJ proteins. Obtained results will be used to create a 3 dimensional computer model of a 3 or 4 bundle helix of the ZO-1/occludin interaction in the TJs of the BBB.

7.1 Nomenklatur und Aminosäuresequenzen der verwendeten Fusionsproteine und Peptide

Nachfolgend sind alle durch Klonierung und Überexpression in *E. coli* hergestellten Konstrukte von Maus-Occludin und ZO-1 dargestellt. Alle Proteine wurden N-terminal als Maltose-Bindungsproteine (MBP) und Occludin.264.521 zusätzlich als Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein exprimiert.

Occludin.264-521:

KTRRKMDRYDKSNILWDKEHIYDEQPPNVEEWVKNVSAGTQDMPPPPSDYAERVDS
PMAYSSNGKVNKGKRSYPESFYKSTPLVPEVAQEIPLTLSVDDFRQPRYSSNGNLET
KRAPTKGKAGKGRTPDPHYETDYTTGGESCEELEEDWVREYPPITSDQQRQLYKR
NFDAGLQEYKSLQAELDDVNKELSRLDKELDDYREESEEYMAAADEYNRLKQVKGS
ADYKSKRNYCKQLKSKLSHIKRMVGDYDRRKP

Occludin.378-521:

KRAPTKGKAGKGRTPDPHYETDYTTGGESCEELEEDWVREYPPITSDQQRQLYKR
NFDAGLQEYKSLQAELDDVNKELSRLDKELDDYREESEEYMAAADEYNRLKQVKGS
ADYKSKRNYCKQLKSKLSHIKRMVGDYDRRKP

Occludin.406-521:

ESCEELEEDWVREYPPITSDQQRQLYKRNFDAGLQEYKSLQAELDDVNKELSRLDKE
LDDYREESEEYMAAADEYNRLKQVKGSADYKSKRNYCKQLKSKLSHIKRMVGDYD
RRKP

ZO-1.644-890:

LRPVTIFGPIADVAREKLAREEPDIYQIAKSELRDAGTDHRSSGIIRLHTIKQIIDQDKHA
LLDVTPNAVDRNLNYAQWYPIVVFLNPDSKQGVKTMRMRLCPESRKSARKLYERSHK
LRKNNHHLFTTTINLNSMNDGWYGALKEAIQQQQNQLVWVSEGKADGATSDDL
HDDRLSYLSAPGSEYSMYSTDSRHTSDYEDTDTEGGAYTDQELDETLNDEVGTPPES
AITRSSEPVREDSSGMHH

ZO-1.644-812:

LRPVTIFGPIADVAREKLAREEPDIYQIAKSELRDAGTDHRSSGIIRLHTIKQIIDQDKHA
LLDVTPNAVDRNLNYAQWYPIVVFLNPDSKQGVKTMRMRLCPESRKSARKLYERSHK
LRKNNHHLFTTTINLNSMNDGWYGALKEAIQQQQNQLVWVSEGKADGATSDD

ZO-1.644-772:

LRPVTIFGPIADVAREKLAREEPDIYQIAKSELRDAGTDHRSSGIIRLHTIKQIIDQDKHA
LLDVTPNAVDRNLNYAQWYPIVVFLNPDSKQGVKTMRMRLCPESRKSARKLYERSHK
LRKNNHHLFTTT

ZO-1.644-731:

LRPVTIFGPIADVAREKLAREEPDIYQIAKSELRDAGTDHRSSGIIRLHTIKQIIDQDKHA
LLDVTPNAVDRNLNYAQWYPIVVFLNPD

ZO-1.601-890:

FWRFRGLRSSKRNLKRSRELDLQAQPVQTKFPAYERVVLREAGFLRPVTIFGPIADV
AREKLAREEPDIYQIAKSELRDAGTDHRSSGIIRLHTIKQIIDQDKHALLDVTPNAVDRNL
NYAQWYPIVVFLNPDSKQGVKTMRMRLCPESRKSARKLYERSHKLRKNNHHLFTTTINL

NSMNDGWYGALKEAIQQQQNQLVWVSEGKADGATSDDLHLHDDRLSYLSAPGSEY
SMYSTDSRHTSDYEDTDTEGGAYTDQELDETLNDEVGTPPESAITRSSEPVREDSSGM
HH

ZO-1.601-812:

FWRFRGLRSSKRNLRKSREDLSAQPVQTKFPAYERVVLREAGFLRPVTIFGPIADV
EKLAREEPDIYQIAKSELRDAGTDHRSSGIIRLHTIKQIIDQDKHALLDVTPNAV
DRLNYAQWYPIVVFLNPDSKQGVKTMRMRLCPEsrksarklyershklrknnhhlftt
INLNSMNDGWYGALKEAIQQQQNQLVWVSEGKADGATSDD

ZO-1.601-772:

FWRFRGLRSSKRNLRKSREDLSAQPVQTKFPAYERVVLREAGFLRPVTIFGPIADV
EKLAREEPDIYQIAKSELRDAGTDHRSSGIIRLHTIKQIIDQDKHALLDVTPNAV
DRLNYAQWYPIVVFLNPDSKQGVKTMRMRLCPEsrksarklyershklrknnhhlftt

ZO-1.597-812:

DRADFWRFRGLRSSKRNLRKSREDLSAQPVQTKFPAYERVVLREAGFLRPVTIFGPI
DVAREKLAREEPDIYQIAKSELRDAGTDHRSSGIIRLHTIKQIIDQDKHALLDVTPNAV
DRLNYAQWYPIVVFLNPDSKQGVKTMRMRLCPEsrksarklyershklrknnhhlft
TTINLNSMNDGWYGALKEAIQQQQNQLVWVSEGKADGATSDD

ZO-1.597-772:

DRADFWRFRGLRSSKRNLRKSREDLSAQPVQTKFPAYERVVLREAGFLRPVTIFGPI
DVAREKLAREEPDIYQIAKSELRDAGTDHRSSGIIRLHTIKQIIDQDKHALLDVTPNAV
DRLNYAQWYPIVVFLNPDSKQGVKTMRMRLCPEsrksarklyershklrknnhhlft
TTT

ZO-1.597-731:

DRADFWRFRGLRSSKRNLRKSREDLSAQPVQTKFPAYERVVLREAGFLRPVTIFGPI
DVAREKLAREEPDIYQIAKSELRDAGTDHRSSGIIRLHTIKQIIDQDKHALLDVTPNAV
DRLNYAQWYPIVVFLNPD

ZO-1.589-812:

TLPKTAGGDRADFWRFRGLRSSKRNLRKSREDLSAQPVQTKFPAYERVVLREAGFLR
PVTIFGPIADVAREKLAREEPDIYQIAKSELRDAGTDHRSSGIIRLHTIKQIIDQDKHALL
DVTPNAV
DRLNYAQWYPIVVFLNPDSKQGVKTMRMRLCPEsrksarklyershklrknnhhlftt
INLNSMNDGWYGALKEAIQQQQNQLVWVSEGKADGATSDD

ZO-1.589-772:

TLPKTAGGDRADFWRFRGLRSSKRNLRKSREDLSAQPVQTKFPAYERVVLREAGFLR
PVTIFGPIADVAREKLAREEPDIYQIAKSELRDAGTDHRSSGIIRLHTIKQIIDQDKHALL
DVTPNAV
DRLNYAQWYPIVVFLNPDSKQGVKTMRMRLCPEsrksarklyershklrknnhhlftt

ZO-1.589-731:

TLPKTAGGDRADFWRFRGLRSSKRNLRKSREDLSAQPVQTKFPAYERVVLREAGFLR
PVTIFGPIADVAREKLAREEPDIYQIAKSELRDAGTDHRSSGIIRLHTIKQIIDQDKHALL
DVTPNAV
DRLNYAQWYPIVVFLNPD

Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide (Maussequenzen) wurden im FMP (Arbeitsgruppe Peptidchemie von Dr. Beyermann), durch die Firma Biosyntan (Gesellschaft für bioorganische Synthesen) und durch die Jerini AG (Prof. Dr. Schneider-Mergener) synthetisiert.

Die Peptide P.745-772 und P.750-769 sind für weitere Bindungsmessungen N-terminal durch Kopplung mit einem Biotinrest modifiziert worden. Die Peptide lagen als Amide vor.

(Biotin-) P.745-772:

PESRK SARKL YERSH KLRKN NHHLF TTT-NH₂

(Biotin-) P.750-769:

SARKL YERSH KLRKN NHHLF-NH₂

Die synthetisierten Peptide von Biosyntan wurden nach den Vorschriften der Firma mit Hilfe der simultanen multiplen Peptidsynthese hergestellt und lagen nach der Lyophilisation in Form ihrer TFE-Salze vor.

P.597-633:

DRADF WRRGL RSSKR NLKRS REDLS AQPVQ TKFPA Y-NH₂

P.772-806:

TINLN SMNDG WYGAL KEAIQ QQNQ LVWVS EGKAD-NH₂

7.2 Theorie zur Berechnung kinetischer Konstanten

In den vorgenommenen Berechnungen zur Bindungskinetik wurde bei den SPR-Untersuchungen das einfache 1:1 Bindungsmodell (Isotherm von Langmuir) angenommen. Wenn der Analyt in der mobilen Phase als A und der oberflächenimmobilisierte Ligand als B bezeichnet wird, gilt folgende Gleichung:



Die Nettorate der Komplexbildung über die Zeit kann unter Einbeziehung der Assoziation und Dissoziation als reversibles Gleichgewicht wie folgt beschrieben werden:

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a [A][B] - k_d [AB] \quad (\text{G 7.2}),$$

wobei k_a die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation und k_d die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation ist.

In der Evaluierungskinetik des BIAcore-Systems ist die Änderung des SPR-Resonanzsignals R eine direkte Folge der Komplexbildung von [AB], die totale Konzentration des Liganden [B] ist die Bindungskapazität R_{\max} . Die Konzentration des verfügbaren Liganden [B] wird als $R_{\max} - R$ dargestellt. Das Resonanzsignal R ist proportional zur der Bildung des Komplexes [AB] an der Sensoroberfläche, bei maximalen Resonanzsignal R_{\max} sind alle Bindungsstellen auf dem Sensorchip belegt. Durch Substitution erhält man aus der Gleichung (G 7.2):

$$\frac{dR}{dt} = k_a c (R_{\max} - R_t) - k_d R_t \quad (\text{G 7.3}),$$

bei der dR/dt die Geschwindigkeit der Bildung des Komplexes [AB] (Änderung der Rate des SPR-Signals); c die Konzentration des Analyten A in der mobilen Phase, R das SPR Signal in RU bei der Zeit t und R_{\max} die maximale Bindungskapazität in RU (maximale Konzentration des Komplexes [AB] auf der Sensoroberfläche) ist.

Durch Umformen erhält man:

$$\frac{dR}{dt} = k_a c R_{\max} - (k_a c + k_d) R_t \quad (\text{G 7.4})$$

Eine Auftragung dR/dt gegen R ergibt eine Gerade mit der Steigung $k_s = k_a c + k_d$. Die Bestimmung von k_s erlaubt die Auftragung gegen die Analytkonzentration c aus der k_a und k_d graphisch bestimmt werden.

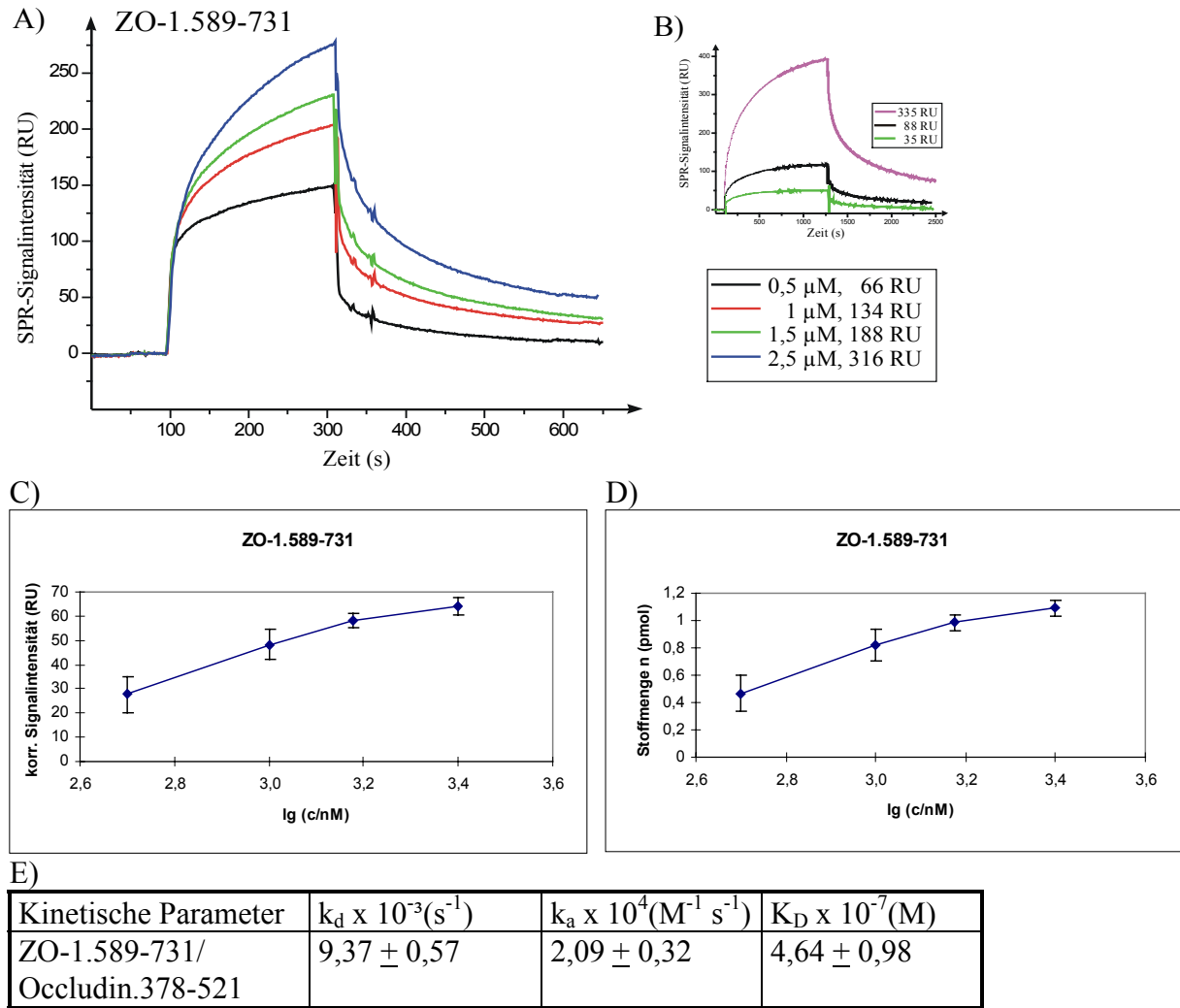
7.3 Abschätzung der Belegungsdichte der immobilisierten Peptidsequenzen auf dem Sensorchip

Die Abschätzung der Belegungsdichte der Peptidsequenzen aus ZO-1 auf der Sensorchipoberfläche erfolgt in Annäherung, da die räumliche Konfiguration der Peptide auf der Chipoberfläche während der Immobilisierung nicht bekannt ist.

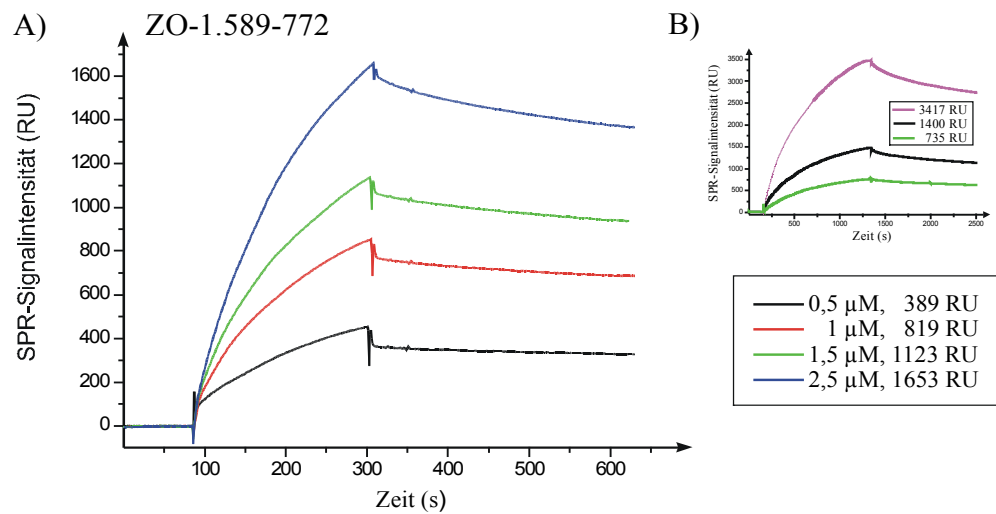
Aus der Literatur ist bekannt, daß $1000 \text{ RU} = 1 \text{ ng/mm}^2$ und die Dicke der Dextranmatrix ca. 100 nm sind. Bei einem angenommenen Molekulargewicht von ca. 3000 g/mol , wiegen 2×10^{11} Peptidmoleküle 1 ng . Für eine Fläche von 1 mm^2 ergibt sich daraus ein Volumen von 10^{-13} m^3 . Für eine Peptidmolekül aus 28-37 AS wird ein Volumen von $2 \times 2 \times 2 \text{ nm}$ angenommen. Aus dieser Berechnung ergibt sich für 2×10^{11} Peptidmoleküle ein Volumen von $1,6 \times 10^{-15} \text{ m}^3$ (1,6% des Gesamtvolumen der Matrix). Bei einem Immobilisierungsgrad von 1000 RU beträgt der mittlere Abschnitt zwischen 2 immobilisierten Peptiden 8 nm .

7.4 Zusammenfassung der SPR-spektroskopischen Daten

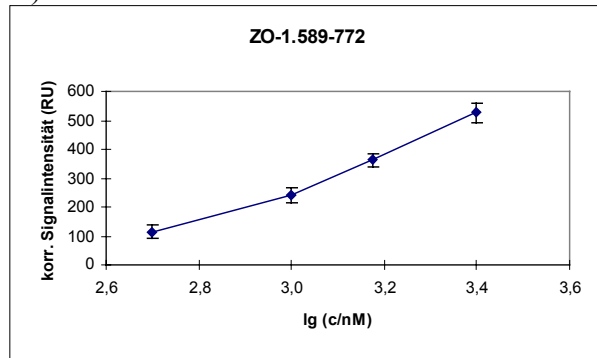
Zusammenfassend wurden die SPR-Sensorgramme für die Wechselwirkung zwischen immobilisierten Occludin.378-521 und mobilen ZO-1-Fragmenten dargestellt. In den Abbildungen A) sind SPR-Sensorgramme für jede konzentrationsabhängige Interaktion zwischen ZO-1-Fragment und Occludin.378-521 (Immobilisierungsniveau $10,3 \text{ ng/mm}^2$) dargestellt. B) Daneben ist die Bindung vom ZO-1-Fragment an Occludin bei höchster eingesetzter Konzentration und 20-minütiger Assoziationsdauer angegeben. Das Immobilisierungsniveau von Occludin betrug $10,3 \text{ ng/mm}^2$; $3,8 \text{ ng/mm}^2$ und $1,23 \text{ ng/mm}^2$. C) Diagramm der korrigierten Bindungsmenge aus $n \geq 4$ Messungen in Abhängigkeit vom dekadischen Logarithmus der Konzentration $\lg(c/nM)$ und Angabe der Standardabweichung ($MW \pm \text{SEM}$). D) Diagramm der Stoffmenge n (pmol) in Abhängigkeit vom dekadischen Logarithmus der Konzentration $\lg(c/nM)$. E) Die kinetische Daten der SPR-Sensorgramme sind in der unteren Tabelle zusammengefaßt.



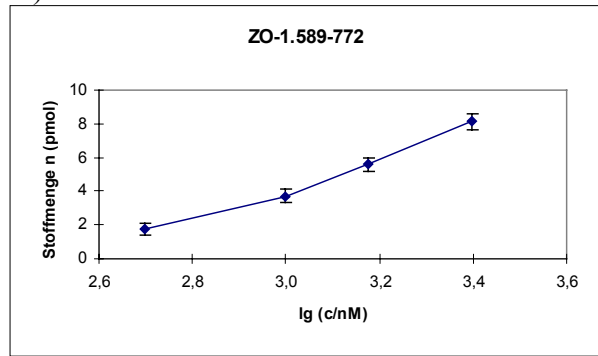
7.1.1 Wechselwirkung von ZO-1.589-731 mit dem immobilisierten Occludin.378-521.



C)



D)

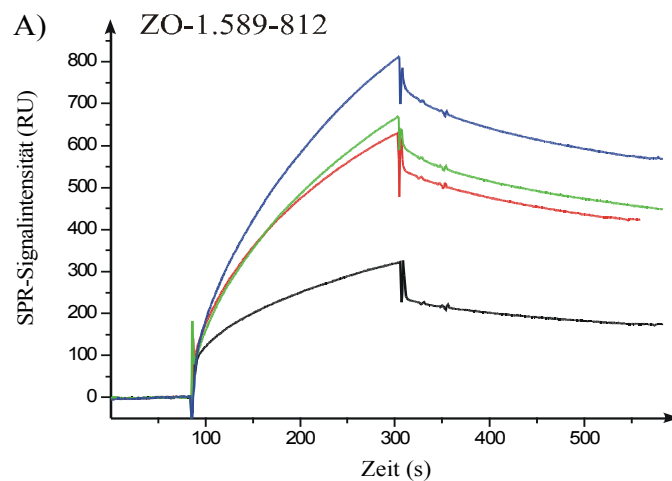


E)

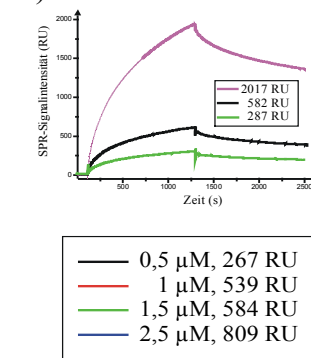
Kinetische Parameter	$k_d \times 10^{-4} (\text{s}^{-1})$	$k_a \times 10^3 (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$K_D \times 10^{-8} (\text{M})$
ZO-1.589-772/ Occludin.378-521	$6,94 \pm 0,34$	$9,99 \pm 1,21$	$71 \pm 1,2$

7.1.2 Wechselwirkung von ZO-1.589-772 mit dem immobilisierten Occludin.378-521.

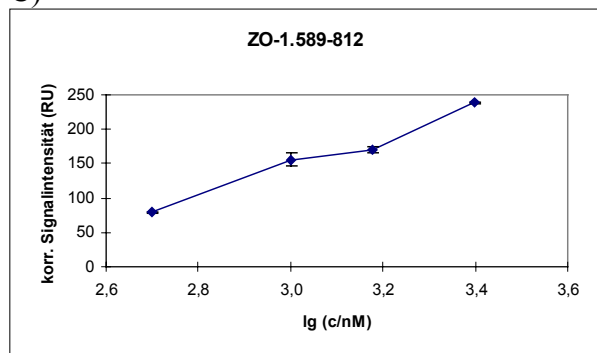
A)



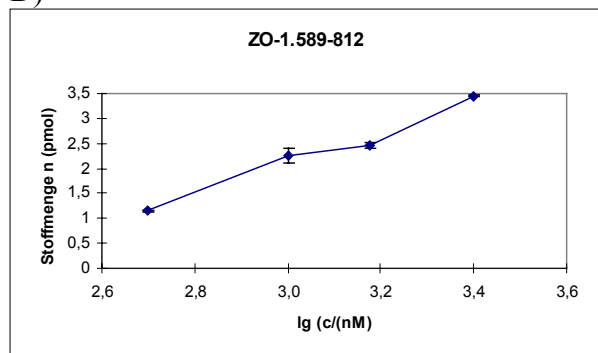
B)



C)



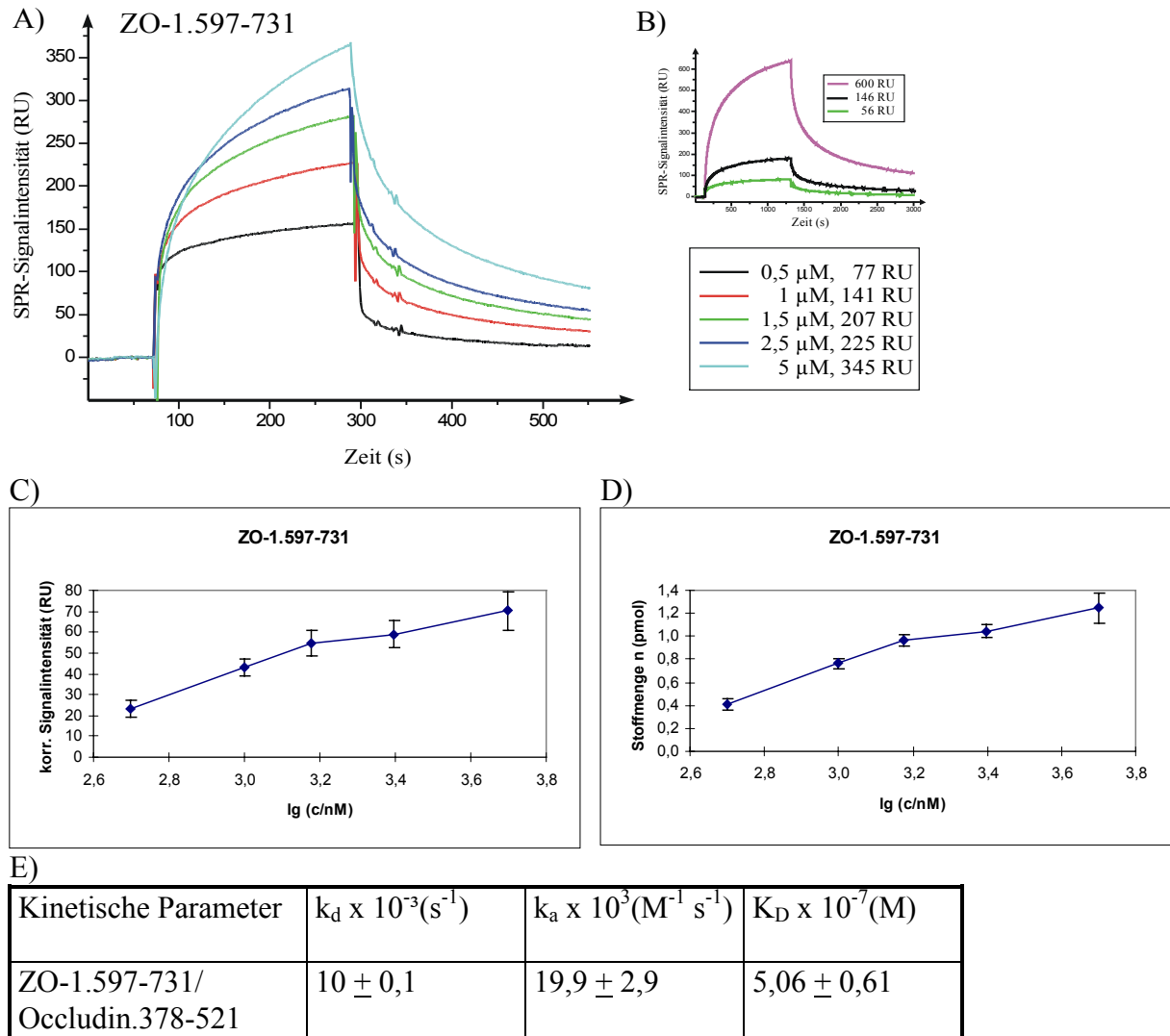
D)



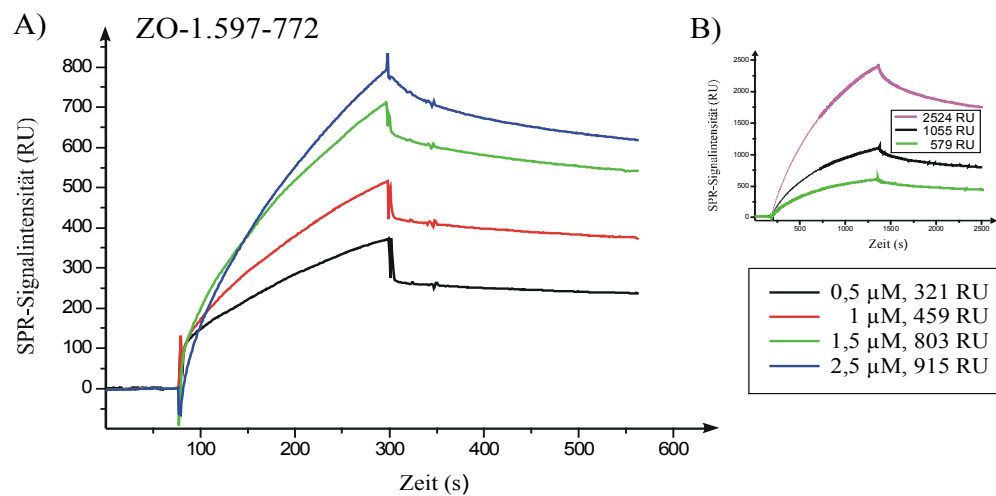
E)

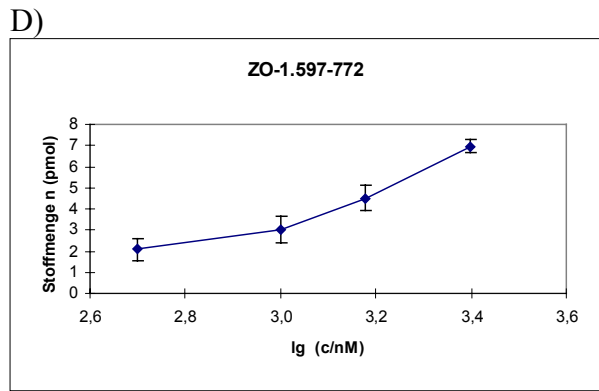
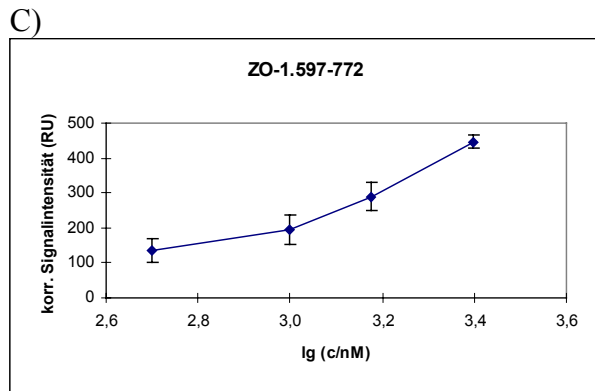
Kinetische Parameter	$k_d \times 10^{-3} (\text{s}^{-1})$	$k_a \times 10^3 (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$K_D \times 10^{-7} (\text{M})$
ZO-1.589-812/ Occludin.378-521	$1,82 \pm 0,19$	$9,12 \pm 2,58$	$2,22 \pm 0,83$

7.1.3 Wechselwirkung von ZO-1.589-812 mit dem immobilisierten Occludin.378-521.



7.1.4 Wechselwirkung von ZO-1.597-731 mit dem immobilisierten Occludin.378-521.

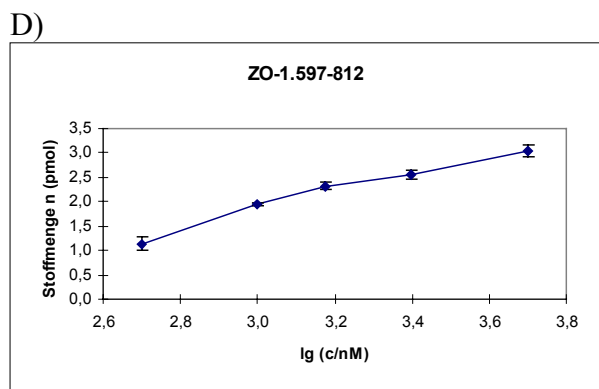
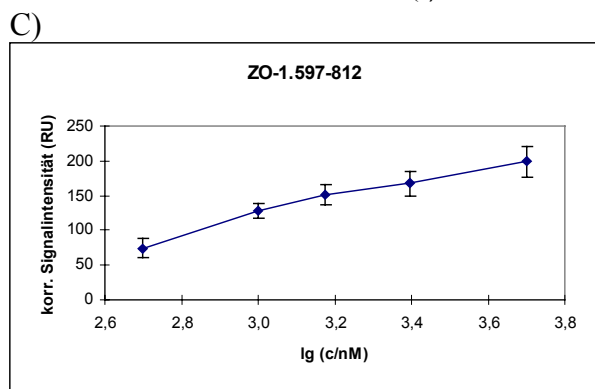
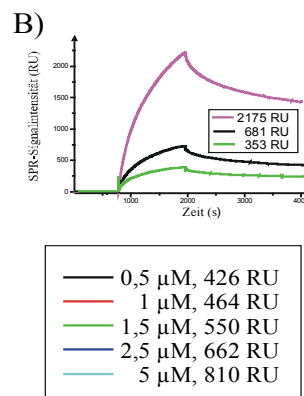
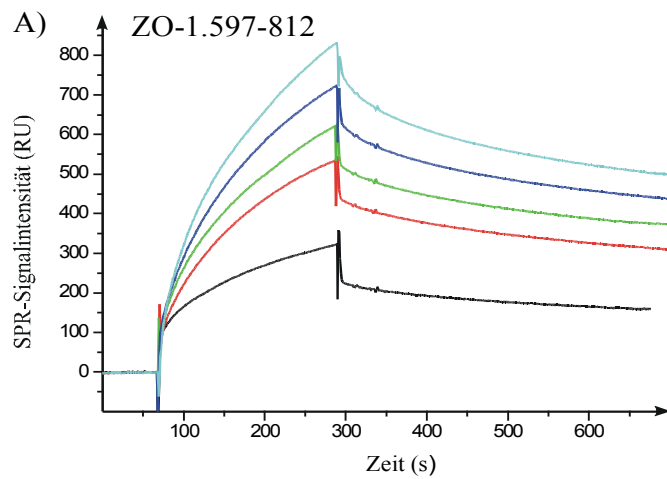




E)

Kinetische Parameter	$k_d \times 10^{-4} (s^{-1})$	$k_a \times 10^3 (M^{-1} s^{-1})$	$K_D \times 10^{-7} (M)$
ZO-1.597-772/ Occludin.378-521	$9,95 \pm 1,55$	$8,11 \pm 1,09$	$1,22 \pm 0,03$

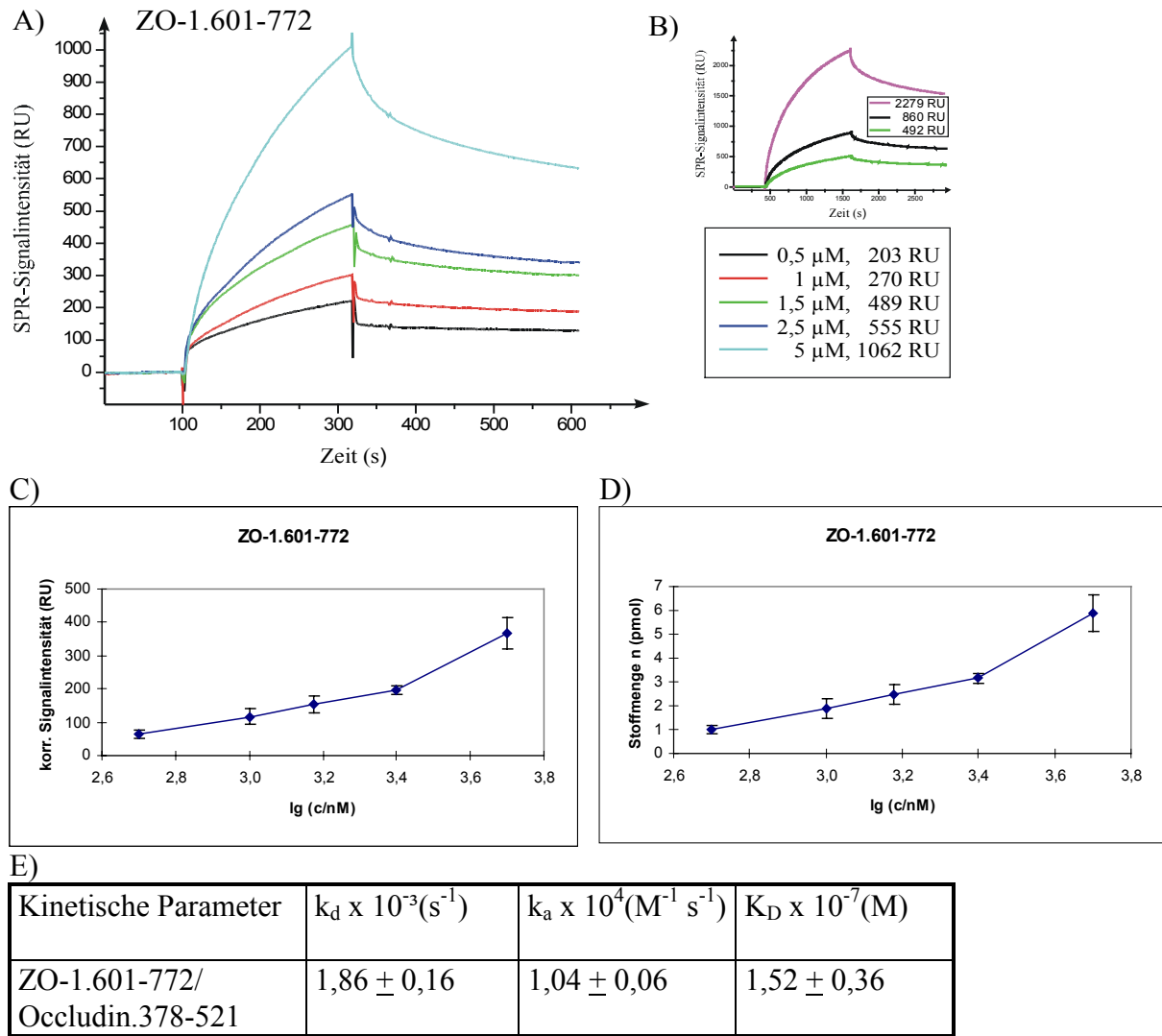
7.1.5 Wechselwirkung von ZO-1.597-772 mit dem immobilisierten Occludin.378-521.



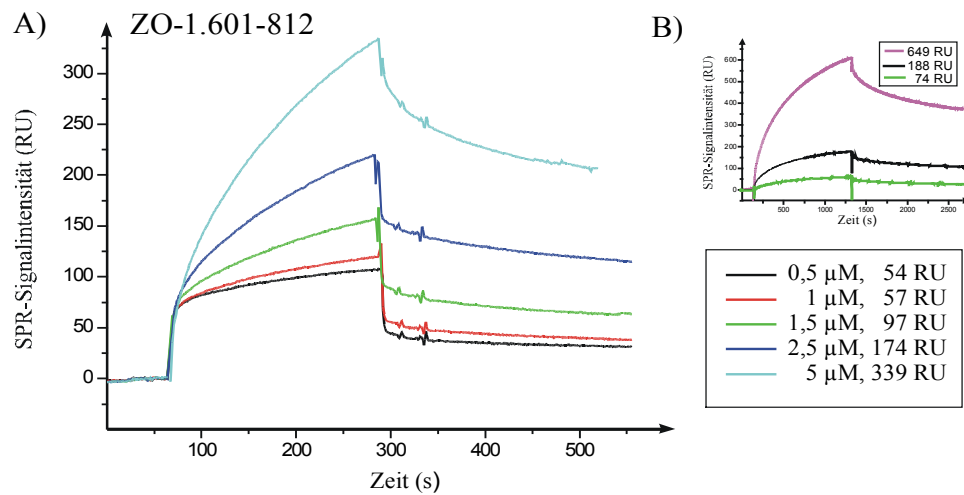
E)

Kinetische Parameter	$k_d \times 10^{-4} (s^{-1})$	$k_a \times 10^3 (M^{-1} s^{-1})$	$K_D \times 10^{-7} (M)$
ZO-1.597-812/ Occludin.378-521	$18 \pm 0,1$	$13,2 \pm 1,6$	$1,4 \pm 0,23$

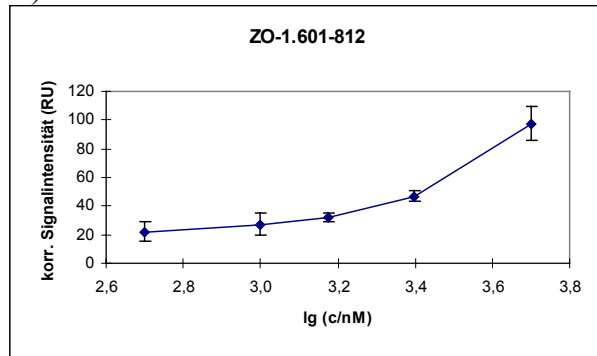
7.1.6 Wechselwirkung von ZO-1.597-812 mit dem immobilisierten Occludin.378-521.



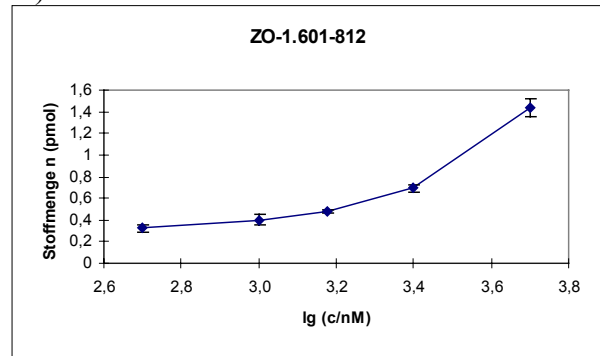
7.1.7 Wechselwirkung von ZO-1.601-772 mit dem immobilisierten Occludin.378-521.



C)



D)

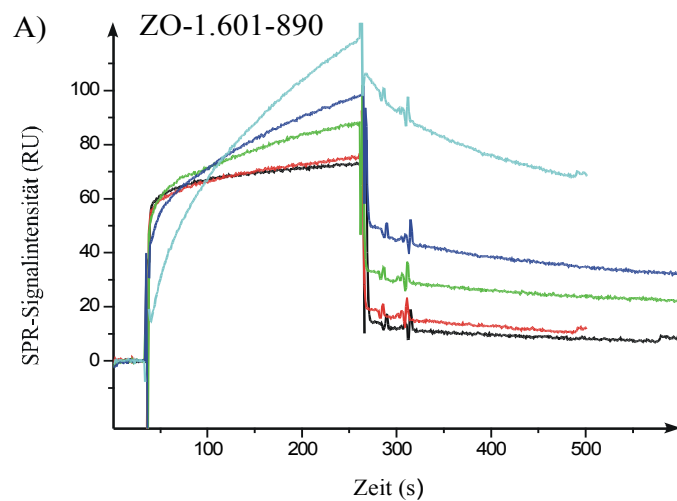


E)

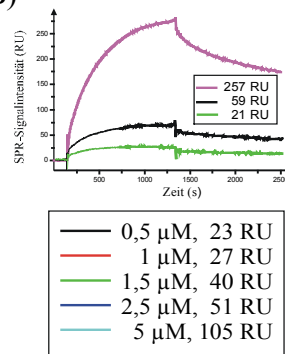
Kinetische Parameter	$k_d \times 10^{-3} (\text{s}^{-1})$	$k_a \times 10^4 (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$K_D \times 10^{-7} (\text{M})$
ZO-1.601-812/ Occludin.378-521	$3,54 \pm 0,22$	$1,54 \pm 0,35$	$2,39 \pm 0,39$

7.1.8 Wechselwirkung von ZO-1.601-812 mit dem immobilisierten Occludin.378-521.

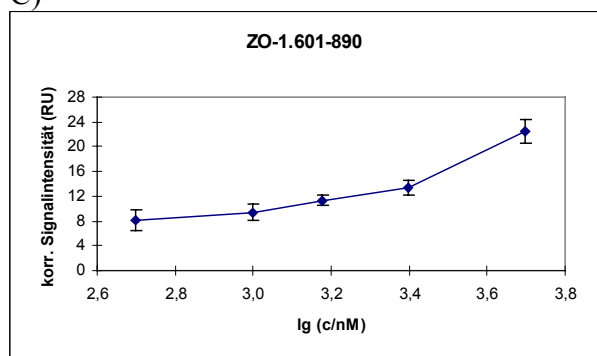
A)



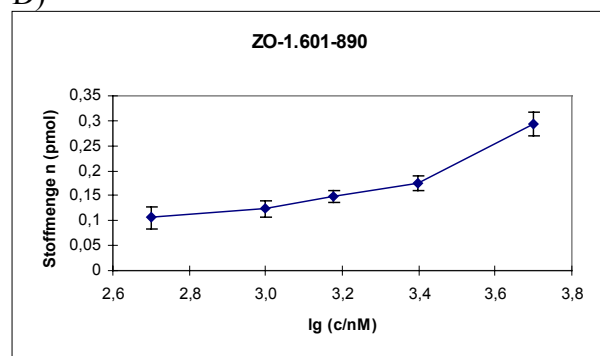
B)



C)



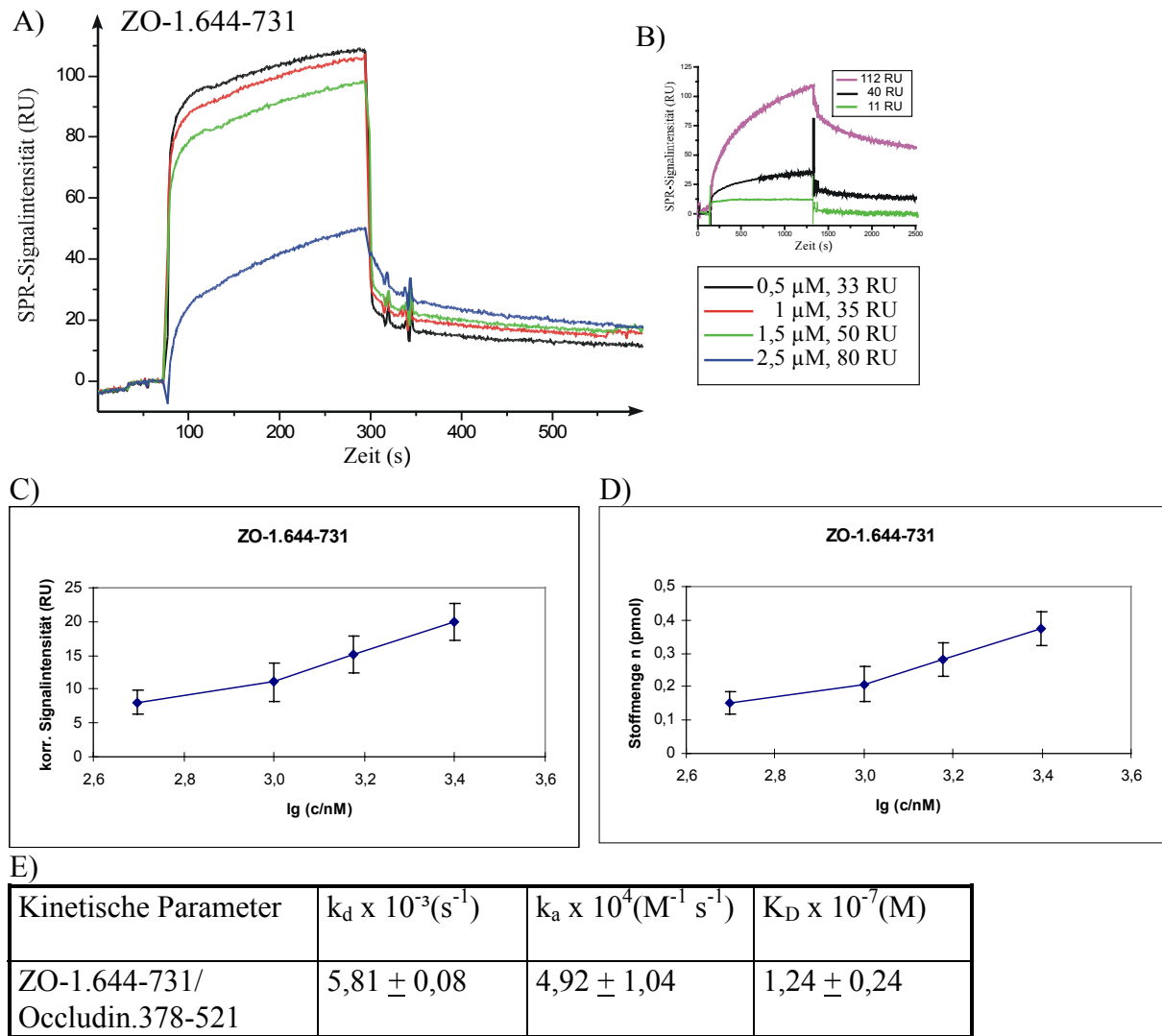
D)



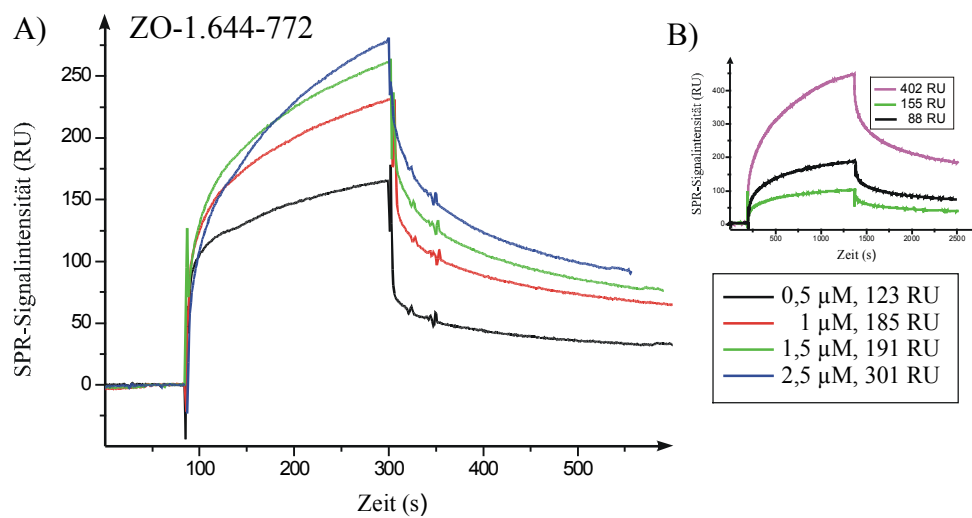
E)

Kinetische Parameter	$k_d \times 10^{-3} (\text{s}^{-1})$	$k_a \times 10^4 (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$K_D \times 10^{-7} (\text{M})$
ZO-1.601-890/ Occludin.378-521	$2,6 \pm 0,26$	$1,14 \pm 0,18$	$2,29 \pm 0,12$

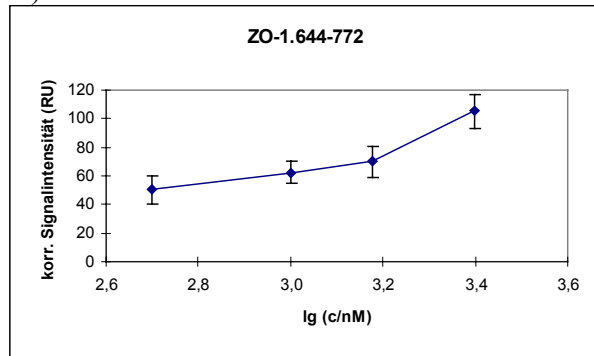
7.1.9 Wechselwirkung von ZO-1.601-890 mit dem immobilisierten Occludin.378-521



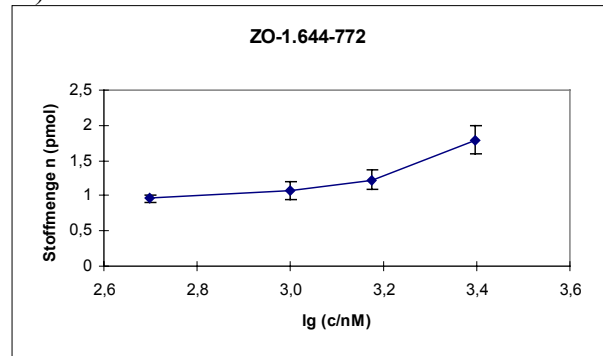
7.1.10 Wechselwirkung von ZO-1.644-731 mit dem immobilisierten Occludin.378-521.



C)



D)

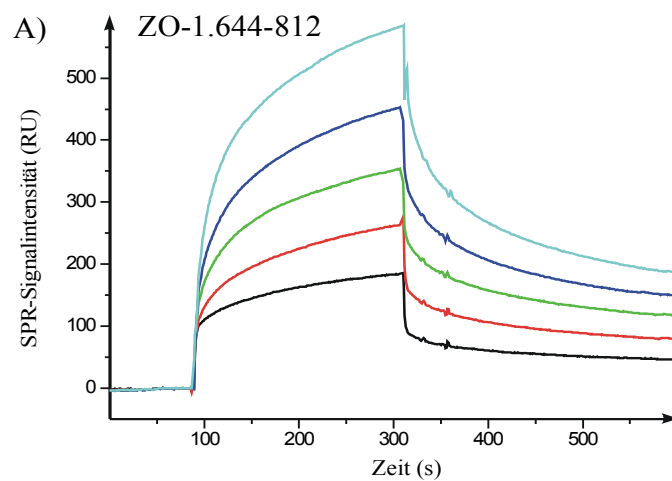


E)

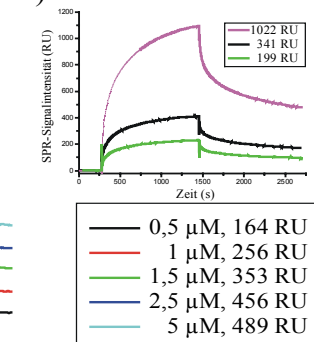
Kinetische Parameter	$k_d \times 10^{-3} (\text{s}^{-1})$	$k_a \times 10^4 (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$K_D \times 10^{-7} (\text{M})$
ZO-1.644-772/ Occludin.378-521	$6,12 \pm 0,34$	$2,67 \pm 0,64$	$2,46 \pm 0,72$

7.1.11 Wechselwirkung von ZO-1.644-772 mit dem immobilisierten Occludin.378-521.

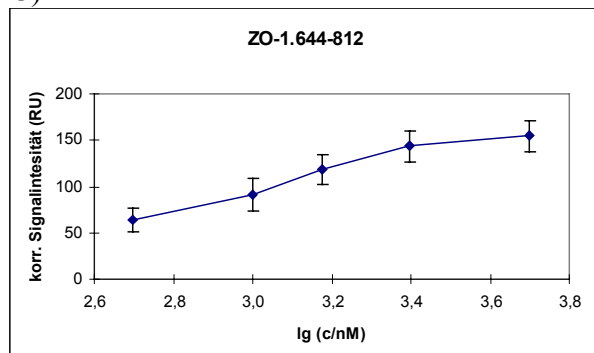
A)



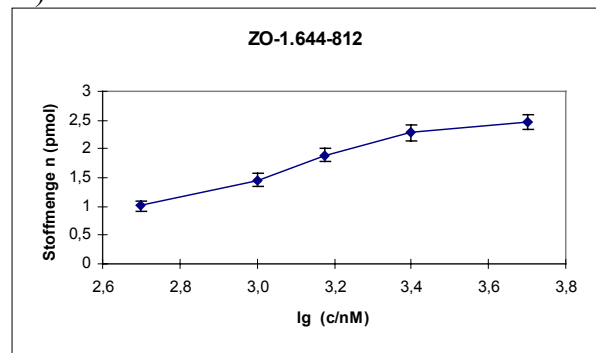
B)



C)



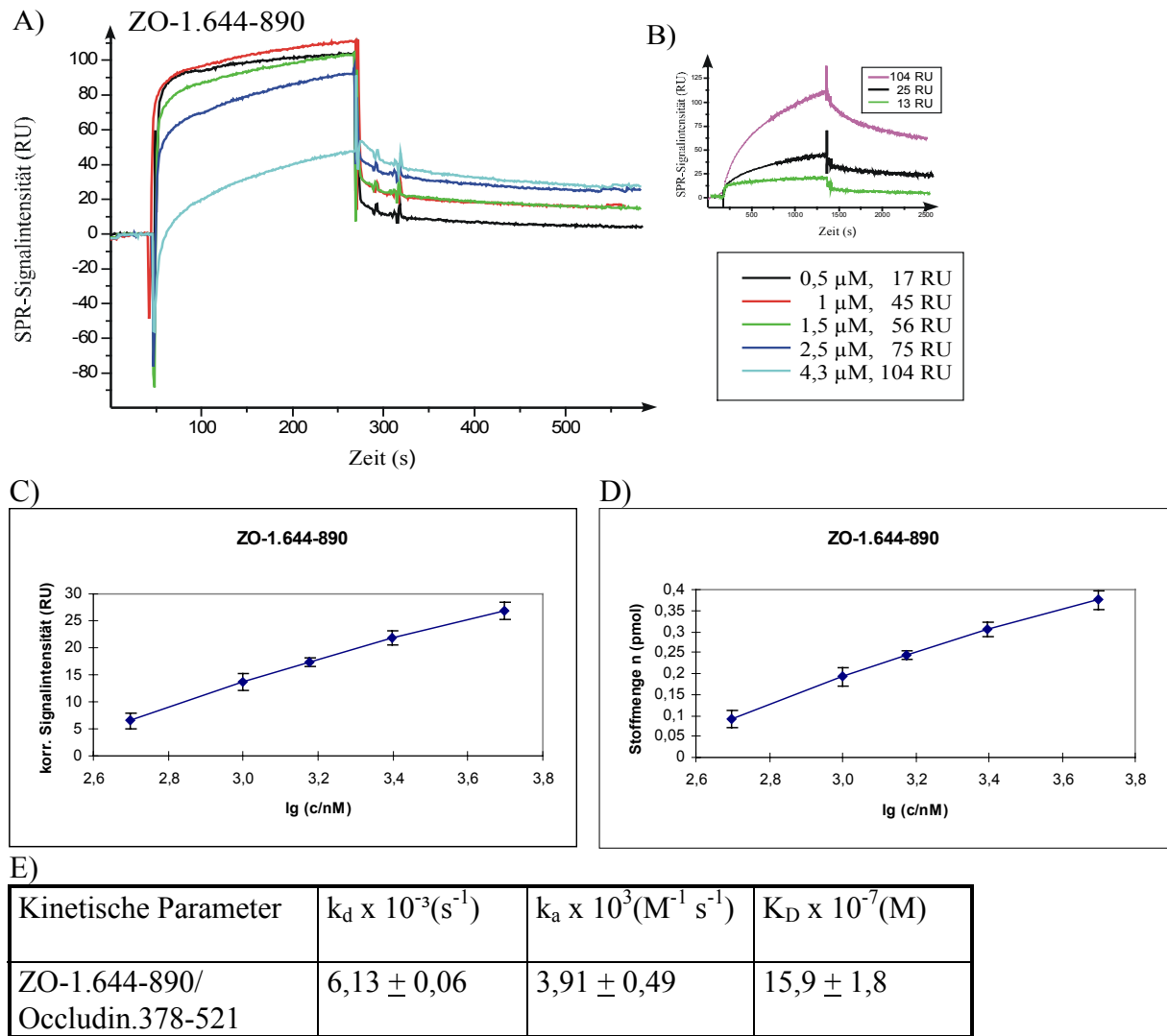
D)



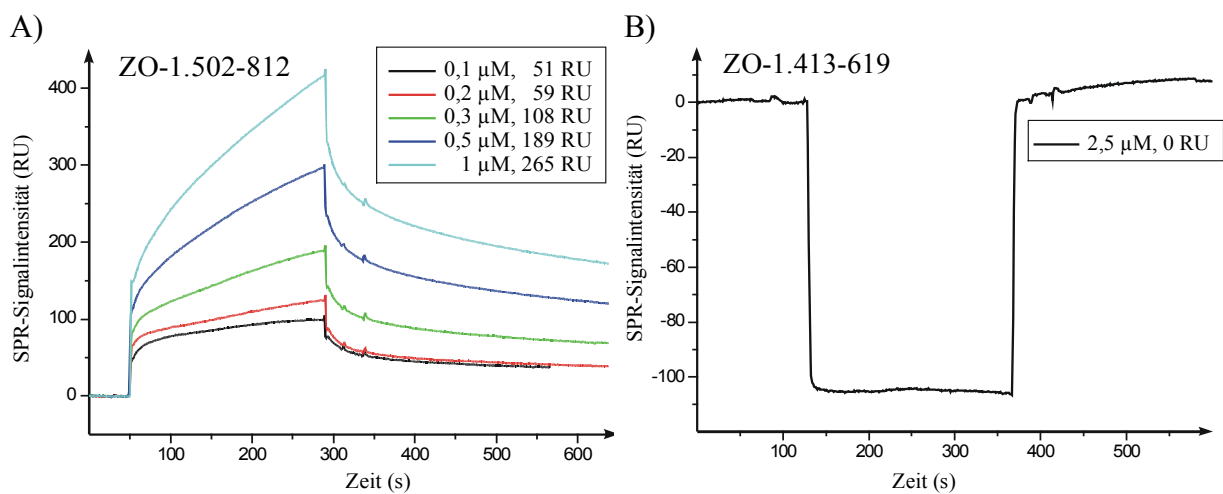
E)

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-1.601-812/ Occludin.378-521	$5,69 \pm 0,04$	$7,8 \pm 0,5$	$7,37 \pm 0,54$

7.1.12 Wechselwirkung von ZO-1.601-812 mit dem immobilisierten Occludin.378-521.



7.1.13 Wechselwirkung von ZO-1.644-890 mit dem immobilisierten Occludin.378-521.



7.1.14 SPR-Kontrollmessungen. A) Wechselwirkung von ZO-1.502-812, das sowohl die SH3- als auch die Guk-Domäne umfaßt, mit dem immobilisierten Occludin.378-521. B) Wechselwirkung von ZO-1.413-619 (bestehend aus PDZ3- sowie SH3-Domäne) mit dem immobilisierten Occludin.378-521. Der Immobilisierungsgrad von Occludin betrug bei beiden Messungen $5,3 \text{ ng/mm}^2$.

7.5 Auswertung der Längenanalyse von CC2a₂₀ mit GST-Occludin.264-521

Sequenz	BLU absol.	BLU in %	BLU Nr.	Sequenz	BLU absol.	BLU in %	BLU Nr.
SARKLYERSHKLKRNHHHLF	24080	100	1	YERSHKLKRN	882	3,7	90
SARKLYERSHKLKRNHHHL	18962	78,7	4	ERSHKLKRN	1514	6,3	81
ARKLYERSHKLKRNHHHLF	10886	45,2	19	RSHKLKRN	3814	15,8	55
SARKLYERSHKLKRNHH	5925	24,6	37	SHKLKRNHH	11271	46,8	17
ARKLYERSHKLKRNHHHL	3388	14,1	58	HKLKRNHHHL	7579	31,5	25
RKLYERSHKLKRNHHHLF	4525	18,8	48	KLKRNHHHLF	11802	49,0	13
SARKLYERSHKLKRN	2027	8,4	73	SARKLYERS	61	0,3	118
ARKLYERSHKLKRNHH	4633	19,2	45	ARKLYERSH	3249	13,5	59
RKLYERSHKLKRNHHHL	6758	28,1	27	RKLYERSHK	733	3,0	94
KLYERSHKLKRNHHHLF	6604	27,4	29	KLYERSHKL	115	0,5	115
SARKLYERSHKLKRN	4148	17,2	51	LYERSHKLKRN	190	0,8	111
ARKLYERSHKLKRN	6503	27,0	31	YERSHKLKRN	168	0,7	113
RKLYERSHKLKRNHH	4486	18,6	49	ERSHKLKRN	277	1,2	106
KLYERSHKLKRNHHHL	4056	16,8	52	RSHKLKRN	1044	4,3	87
LYERSHKLKRNHHHLF	9102	37,8	22	SHKLKRN	11150	46,3	18
SARKLYERSHKLKRN	2134	8,9	72	HKLKRNHH	12602	52,3	10
ARKLYERSHKLKRN	2159	9,0	70	KLKRNHHHL	7714	32,0	24
RKLYERSHKLKRN	1914	7,9	76	LRKRNHHHLF	15315	63,6	7
KLYERSHKLKRNHH	5714	23,7	39	SARKLYER	853	3,5	91
LYERSHKLKRNHHHL	11745	48,8	14	ARKLYERS	1246	5,2	84
YERSHKLKRNHHHLF	20363	84,6	2	RKLYERSH	3996	16,6	53
SARKLYERSHKLKRN	9110	37,8	21	KLYERSHK	20	0,1	120
ARKLYERSHKLKRN	6270	26,0	34	LYERSHKL	204	0,8	110
RKLYERSHKLKRN	3899	16,2	54	YERSHKLKRN	328	1,4	102
KLYERSHKLKRN	5700	23,7	40	ERSHKLKRN	931	3,9	89
LYERSHKLKRNHH	10292	42,7	20	RSHKLKRN	2708	11,2	65
YERSHKLKRNHHHL	9024	37,5	23	SHKLKRN	787	3,3	93
ERSHKLKRNHHHLF	19966	82,9	3	HKLKRN	11364	47,2	16
SARKLYERSHKLKRN	3703	15,4	56	KLKRNHH	6461	26,8	33
ARKLYERSHKLKRN	1824	7,6	78	LRKRNHHHL	1309	5,4	83
RKLYERSHKLKRN	1963	8,2	74	RKRNHHHLF	11576	48,1	15
KLYERSHKLKRN	401	1,7	99	SARKLYE	67	0,3	117
LYERSHKLKRN	6478	26,9	32	ARKLYER	303	1,3	104
YERSHKLKRN	5671	23,6	41	RKLYERS	319	1,3	103
ERSHKLKRNHHHL	13619	56,6	8	KLYERSH	492	2,0	96
RSHKLKRNHHHLF	15582	64,7	6	LYERSHK	154	0,6	114
SARKLYERSHKLKRN	2870	11,9	63	YERSHKL	1001	4,2	88
ARKLYERSHKLKRN	3502	14,5	57	ERSHKLKRN	1813	7,5	79
RKLYERSHKLKRN	5991	24,9	36	RSHKLKRN	5547	23,0	42
KLYERSHKLKRN	2958	12,3	61	SHKLKRN	6576	27,3	30
LYERSHKLKRN	1841	7,6	77	HKLKRN	372	1,5	100
YERSHKLKRN	12507	51,9	11	KLKRN	4553	18,9	47
ERSHKLKRN	12640	52,5	9	LRKRN	2794	11,6	64
RSHKLKRNHHHL	6920	28,7	26	RKRNHHHL	1636	6,8	80
SHKLKRNHHHLF	15721	65,3	5	KRNHHHLF	808	3,4	92
SARKLYERSHKLKRN	2157	9,0	71	SARKLY	207	0,9	109
ARKLYERSHKLKRN	4210	17,5	50	ARKLYE	265	1,1	108
RKLYERSHKLKRN	6047	25,1	35	RKLYER	455	1,9	98
KLYERSHKLKRN	357	1,5	101	KLYERS	48	0,2	119
LYERSHKLKRN	113	0,5	116	LYERSH	299	1,2	105
YERSHKLKRN	187	0,8	112	YERSHK	266	1,1	107
ERSHKLKRN	4750	19,7	44	ERSHKL	2455	10,2	66
RSHKLKRN	3226	13,4	60	RSHKLKRN	1081	4,5	86
SHKLKRNHHHL	5816	24,2	38	SHKLKRN	491	2,0	97
HKLKRNHHHLF	11863	49,3	12	HKLKRN	686	2,8	95
SARKLYERSHKLKRN	2202	9,1	69	KLKRN	1239	5,1	85
ARKLYERSHKLKRN	1502	6,2	82	LRKRN	2338	9,7	68
RKLYERSHKLKRN	4620	19,2	46	RKRN	5464	22,7	43
KLYERSHKLKRN	1942	8,1	75	KRNHHHL	2894	12,0	62
LYERSHKLKRN	2415	10,0	67	NNHHHLF	6638	27,6	28

Tab. 7.1 Dargestellt ist eine quantitative Auswertung der Punktmuster, die eine Bindung von GST-Occludin.264-521 an die entsprechenden Peptidsequenzen aus CC2a₂₀ aus der Guk-Domäne von ZO-1 entspricht. Die Lichtintensitäten (BLU) sind als Absolut- und prozentualen Werte dargestellt. Die Nummer (letzte Spalte) kennzeichnet die Position auf der Membran.

7.6 Abbildungsverzeichnis

Abbildungen

1.1	Schematischer Aufbau der Blut-Hirn-Schranke (BHS)	2
1.2	Schematische Vorstellungen über die Zell-Zell.Kontaktstrukturen	5
1.3	Elektronenmikroskopische Aufnahmen der TJ in Epithelzellen	6
1.4	Das Protein- und Lipidmodell der TJ	7
1.5	Multiple Funktionen der TJ-Stränge und Modell der TJ	9
1.6	Faltungsmodell von Occludin	11
1.7	Gegenwärtige Vorstellung der Proteinkomplexe in den TJ	16
1.8	Prinzip der SPR-Spektroskopie	18
2.1	Darstellung der Immobilisierungsprozedur	30
2.2	SPR-Sensorgramm der Assoziation und Dissoziation von ZO-1.644-812 und der Regenerierung der Sensoroberfläche	32
2.3	Schematische Darstellung der Längenanalyse des potentiell helikalen Abschnittes CC2a ₂₀ der Guk-Domäne von ZO-1	36
3.1	Bioinformatische Analyse von potentiellen Proteinbindungsdomänen in Occludin und ZO-1	38
3.2	Amplifikate der Polymerasekettenreaktion	40
3.3	Einfluß der Induktionszeit auf die Expressionshöhe von Occludin	40
3.4	Reinigung von Occludin	41
3.5	10%-ige SDS-Page ausgewählter ZO-1-Fragmente nach der Amylose-Resin-Säulenreinigung	42
3.6	Untersuchung der Sedimentationseigenschaften von ZO-1	43
3.7	Darstellung untersuchter ZO-1-Fragmente	44
3.8	Wechselwirkung von ZO-1.644-812 mit Occludin.378-521	45
3.9	Normierung der Bindungsergebnisse zwischen ZO-1.644-812 und Occludin	46
3.10	Zusammenfassende Darstellung der Bindung aller ZO-1-Fragmente an Occludin.378-521	48
3.11	Zusammenfassung aller SPR-Meßergebnisse bei der Wechselwirkung von 2,5 µM eingesetzter ZO-1-Fragmente mit dem immobilisierten Occludin	49
3.12	Bestimmung der kinetischen Parameter der SPR-Sensorgramme von ZO-1.644-812 bei der Bindung an Occludin.378-521	50
3.13	Zusammenfassung der K _D -Werte der Wechselwirkung verschiedener ZO-1-Fragmente mit Occludin.378-521	52
3.14	Spezifität der Interaktion zwischen Occludin.378-521 und ZO-1.644-812	52
3.15	Analyse des Massentransports in der Assoziationsphase	54
3.16	Einfluß verschiedener Meßbedingungen auf die Interaktion zwischen ZO-1.644-812 und Occludin.378-521	54
3.17	SPR-Messungen unter Sättigungsbedingungen	55
3.18	Optimierung der Regenerationsbedingungen an der Sensoroberfläche	56
3.19	Effekt von SIN-1 auf die Interaktion zwischen ZO-1.644-812 und Occludin	57
3.20	Immobilisierung verschiedener ZO-1-Peptidsequenzen an den CM5-Chip	59
3.21	Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von Occludin.378-521 an verschiedene Peptidsequenzen von ZO-1	60
3.22	Bestimmung der kinetischen Konstanten aus den SPR-Sensorgrammen	61
3.23	Affinitätsbindung von Occludin mit den Peptiden P.750-769 und P.745-772	63

3.24	Western Blot von Occludin aus MDCK-Zellysat zur Darstellung der Bindung an CC2a ₂₈	63
3.25	Längenanalyse von CC2a ₂₀	64
3.26	Substitutionsanalyse von CC2a ₂₀	66
3.27	Circular dichroismus-Spektren von CC1, CC2a sowie CC2b	67
3.28	Bestimmung der Strukturbestandteile des C-terminalen Teils von Occludin	67
4.1	Semiquantitative Auswertung der SPR-Messungen aller ZO-1-Fragmente hinsichtlich ihrer Bindungsmengen an das immobilisierte Occludin.378-521	77
4.2	Schematische Darstellung der SH3-Guk-Einheit	84
4.3	Hypothetisches 3D-Domänentausch-Modell	87
7.1.1	Wechselwirkung von ZO-1.589-731 mit dem immobilisierten Occludin	117
7.1.2	Wechselwirkung von ZO-1.589-772 mit dem immobilisierten Occludin	117
7.1.3	Wechselwirkung von ZO-1.589-812 mit dem immobilisierten Occludin	118
7.1.4	Wechselwirkung von ZO-1.597-731 mit dem immobilisierten Occludin	119
7.1.5	Wechselwirkung von ZO-1.597-772 mit dem immobilisierten Occludin	119
7.1.6	Wechselwirkung von ZO-1.597-812 mit dem immobilisierten Occludin	120
7.1.7	Wechselwirkung von ZO-1.601-772 mit dem immobilisierten Occludin	121
7.1.8	Wechselwirkung von ZO-1.601-812 mit dem immobilisierten Occludin	121
7.1.9	Wechselwirkung von ZO-1.601-890 mit dem immobilisierten Occludin	122
7.1.10	Wechselwirkung von ZO-1.644-731 mit dem immobilisierten Occludin	123
7.1.11	Wechselwirkung von ZO-1.644-772 mit dem immobilisierten Occludin	123
7.1.12	Wechselwirkung von ZO-1.644-812 mit dem immobilisierten Occludin	124
7.1.13	Wechselwirkung von ZO-1.644-890 mit dem immobilisierten Occludin	125
7.1.14	SPR-Kontrollmessungen	125

Tabellen

2.1	Bezeichnung der ZO-1-Transkripte	22
2.2	Zusammensetzung der Komponenten der Sammel- und Trenngele für die Gelelektrophorese (SDS-Page)	25
2.3	Bedingungen der Anionenaustauschchromatographie (FPLC)	27
3.1	Zusammenfassung der kinetischen Parameter der Wechselwirkung zwischen den untersuchten ZO-1-Fragmenten und dem immobilisierten Occludin	51
3.2	Der Einfluß der Flußrate auf das Bindungsverhalten (ΔRU) und die kinetischen Parameter k_d , k_a , K_D	53
3.3	Kinetische Konstanten der Wechselwirkung zwischen ZO-1.644-812 und Occludin.378-521 unter dem Einfluß von SIN-1	58
3.4	Kinetische Konstanten der Wechselwirkung von Occludin.378-521 mit den Peptidsequenzen CC1 und CC2a aus ZO-1	62
3.5	Darstellung der prozentualen Lumineszenzwerte der Längenanalyse	65
7.1	Auswertung der Längenanalyse von CC2a ₂₀ mit GST-Occludin.264-521	126