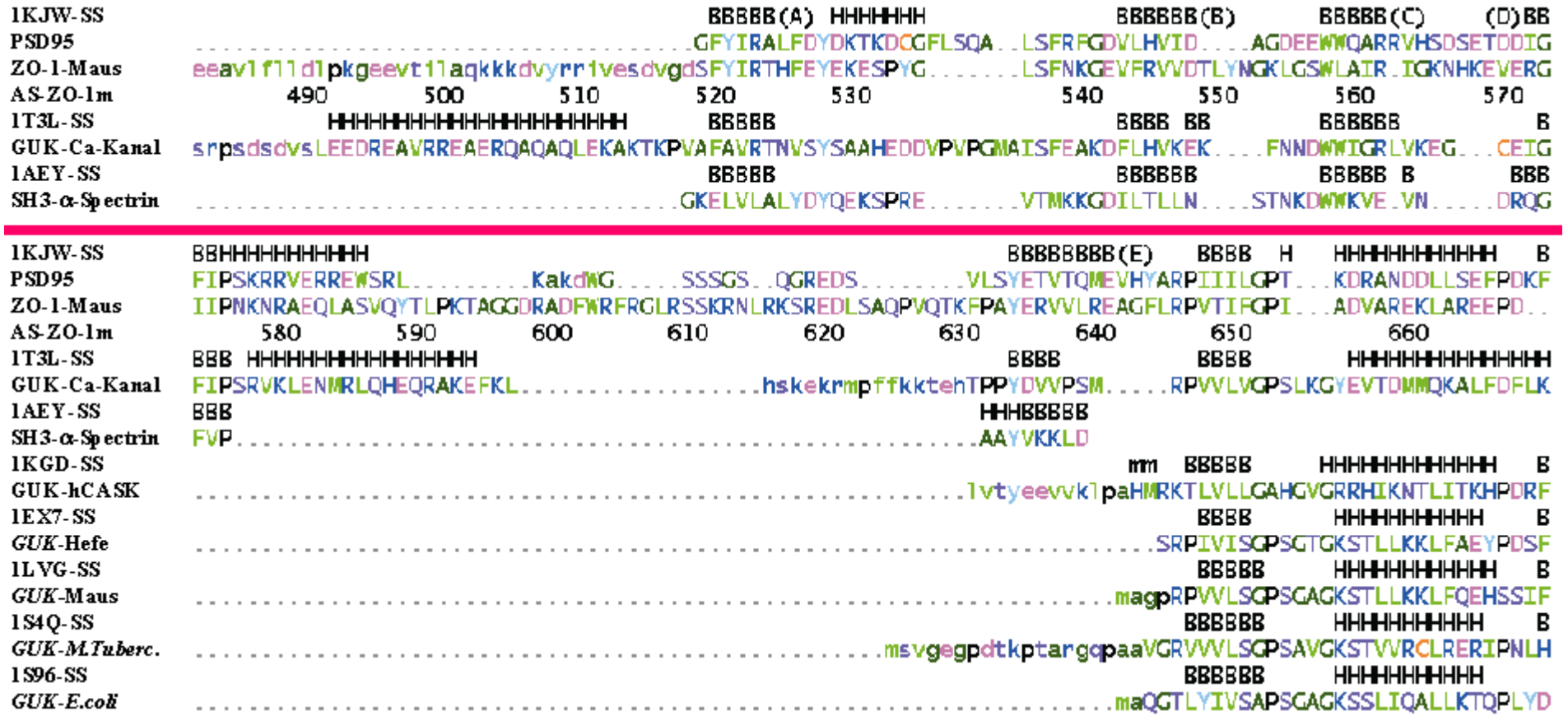
7. Anhang

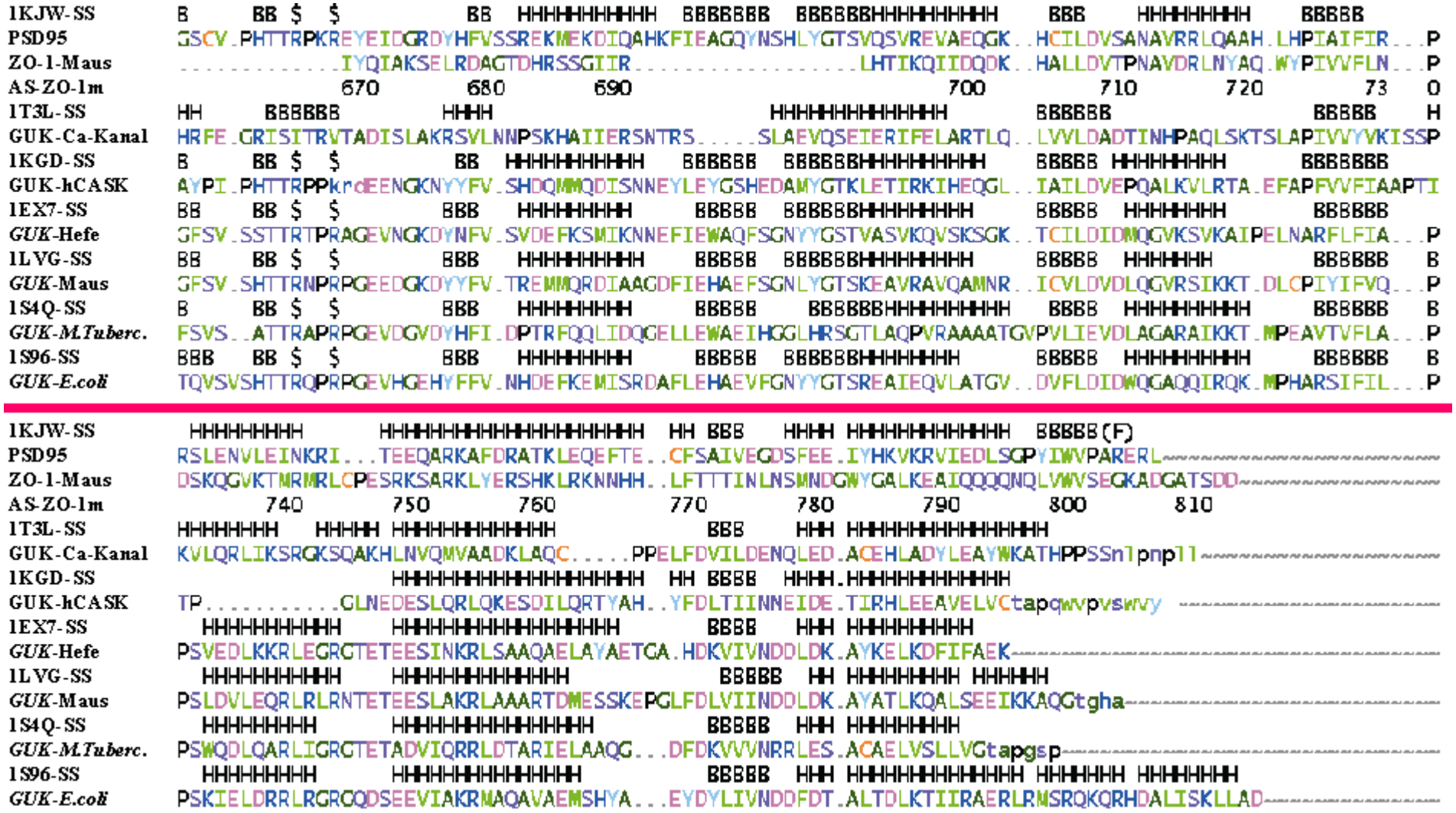
7.1. Weitere Alignments

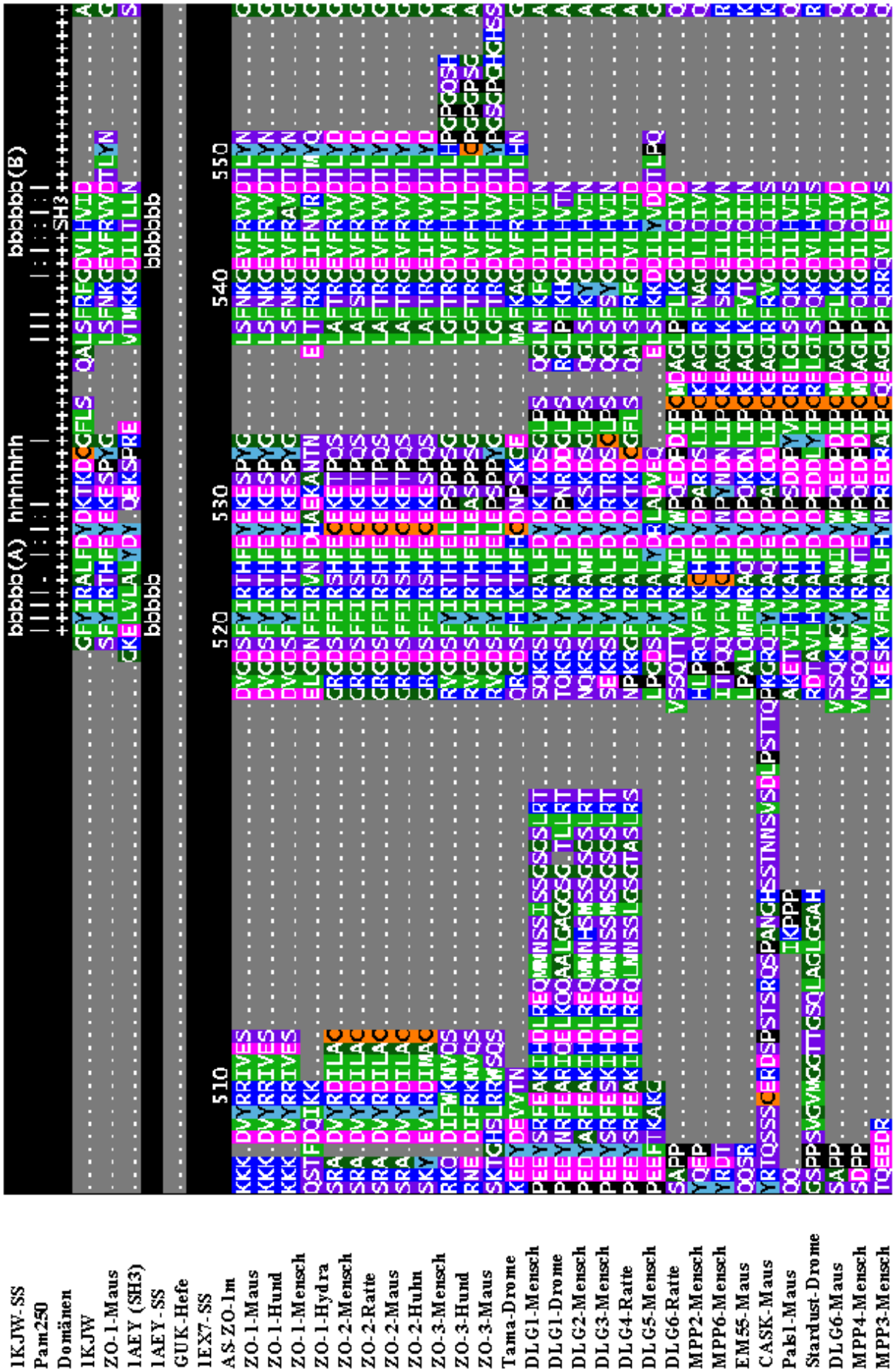
Erklärungen zu den folgenden Alignments:
Die AS sind nach ihren physikalischen Eigenschaften eingefärbt (basische AS (H, K, R) dunkelblau; saure AS (D, E) rot; hydrophobe AS (F, I, L, M, V, W) grün, wobei kleine hydrophobe AS (A, G) in dunklerem grün gehalten sind; polare AS (N, Q, S, T) violett; AS mit besonderen Eigenschaften sind P (schwarz); Y (hellblau) und C (orange).
Alle Sequenzen sind an ZO-1 von Maus und der entsprechenden AS-Nr. (AS-ZO-1m) ausgerichtet. Die β-Stränge A-F in 1KJW sind in Klammern an den entsprechenden Positionen gekennzeichnet.

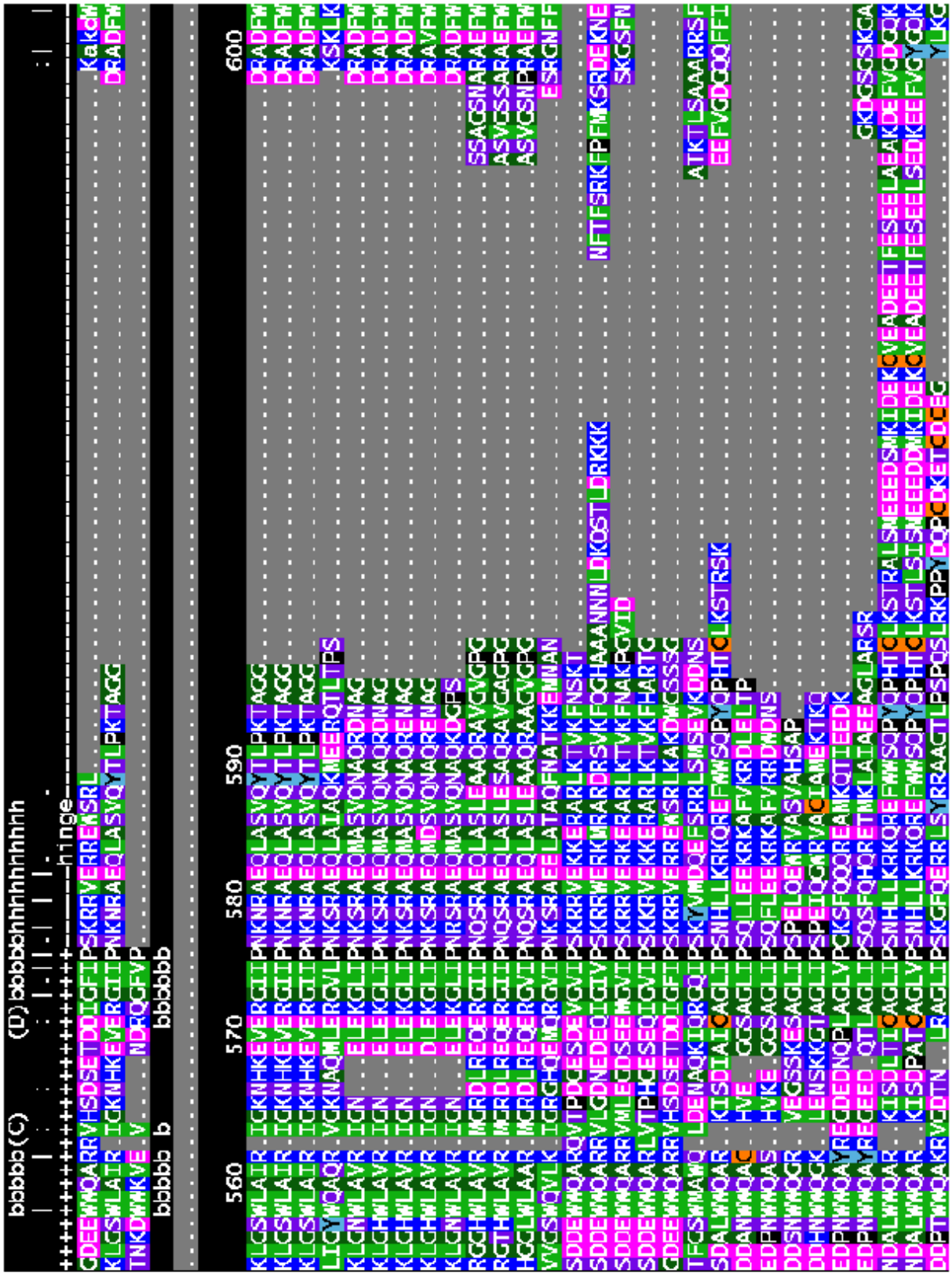
Auf Seite 149-150 findet sich ein erweitertes Alignment von Abb. 3.7. Zusätzlich zu der für die Homologiemodelle genutzten SH3-Hinge-GUK-Struktur von PSD95 (1KJW) und der ZO-1-Sequenz sind hier zum Vergleich noch eine weitere SH3-Struktur (1AEY von α-Spektrin) sowie andere bekannte GUK-Kristallstrukturen (Siehe dazu Abb. 3.4) enthalten. Aufeinanderfolgende Abschnitte sind mit einer dicken roten Linie getrennt.
Angegeben ist für jede PDB-Nummer erst die in der PDB-Struktur vorliegende Sekundärstruktur (SS) als Helix (H) oder β-Strang (B). In der jeweils nächsten Zeile befindet sich der Proteinname in Kurzform (genauer in Abb. 3.4) und die zur Strukturaufklärung genutzte Proteinsequenz (davon in großen Buchstaben die Bereiche, die in den Kristallsstrukturen sichtbar waren. Mit „mm“ in GUK von hCASK sind zwei AS bezeichnet, die wahrscheinlich als Klonierungsartefakt von der Swissprotsequenz abweichen (statt HM müssten sich dort die Aminosäuren FK befinden). Mit „$“ sind für die GMP-Bindung in den GUK-Domänen essentielle Arginine gekennzeichnet. M.Tuberc. = *Mycobacterium tuberculosis.*

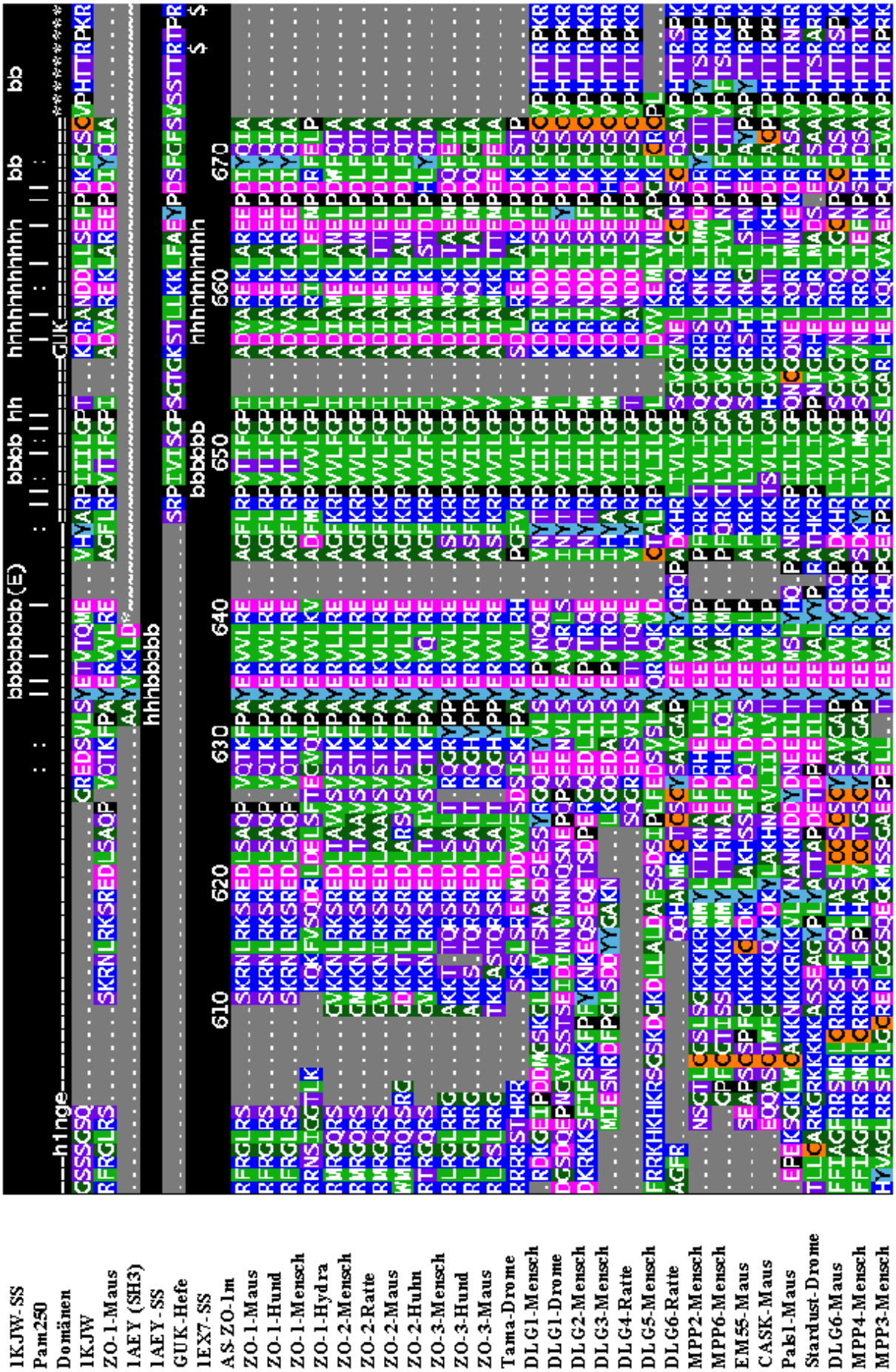
Auf den Seiten 151-155 sind oben erneut die Sequenzen von 1KJW, ZO-1, 1AEY und 1EX7 mit Angabe der Sekundärstrukturen (SS; h= Helix; b= β-Strang) angeordnet. Statt durch Graustufen wie in Abb. 3.7 sind die unterschiedlichen Grade an Konservierung der AS zwischen 1KJW und ZO-1 mit “|“ für völlige Übereinstimmung und “:“ bzw. “.“ für größere bzw. kleinere Sequenzähnlichkeit markiert. Die Domänen sind mit „+“ für SH3, „-“ für Hinge, „=“ für GUK sowie „*“ für die GMP-Bindungsregion von GUK bezeichnet.
Anschließend folgen, beginnend mit Maus-ZO-1, 28 ausgewählte MAGUK-Proteine aus verschiedenen Spezies (Drome = *Drosophila melanogaster*) mit ihren SH3-Hinge-GUK-Bereichen.


1KJW-SS
PSD95
ZO-1-Maus
AS-ZO-1m
1T3L-SS
GUK-Ca-Kanal
1AEY-SS
SH3-α-Spectrin
1KGD-SS
GUK-hCASK
1EX7-SS
GUK-Hefe
1LVG-SS
GUK-Maus
1S4Q-SS
GUK-M.Tuberc.
1S96-SS
GUK-E.coli
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
660

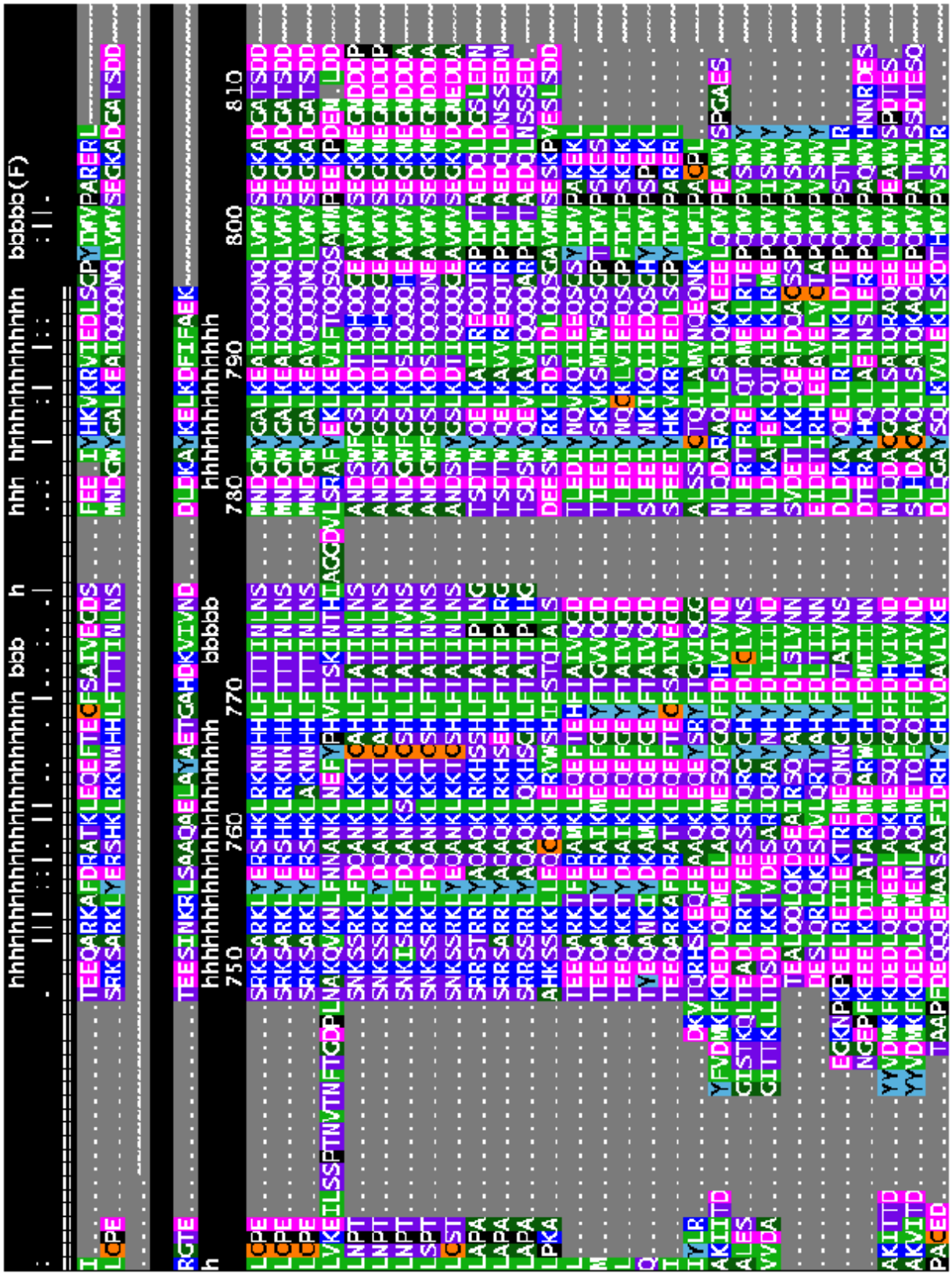

1KJW-SS
PSD95
ZO-1-Maus
AS-ZO-1m
1T3L-SS
GUK-Ca-Kanal
1KGD-SS
GUK-hCASK
1EX7-SS
GUK-Hefe
1LVG-SS
GUK-Maus
1S4Q-SS
GUK-M.Tuberc.
1S96-SS
GUK-E.coli
670
680
690
700
710
720
730
740
750
760
770
780
790
800
810


1KJW-SS
Pam250
Domänen
1KJW
ZO-1-Maus
1AEY (SH3)
1AEY-SS
GUK-Hefe
1EX7-SS
AS-ZO-1m
ZO-1-Maus
ZO-1-Hund
ZO-1-Mensch
ZO-1-Hydra
ZO-2-Mensch
ZO-2-Ratte
ZO-2-Maus
ZO-2-Huhn
ZO-3-Mensch
ZO-3-Hund
ZO-3-Maus
Tama-Drome
DLG1-Mensch
DLG1-Drome
DLG2-Mensch
DLG3-Mensch
DLG4-Ratte
DLG5-Mensch
DLG6-Ratte
MPP2-Mensch
MPP6-Mensch
EM55-Maus
CASK-Maus
Pals1-Maus
Stardust-Drome
DLG6-Maus
MPP4-Mensch
MPP3-Mensch

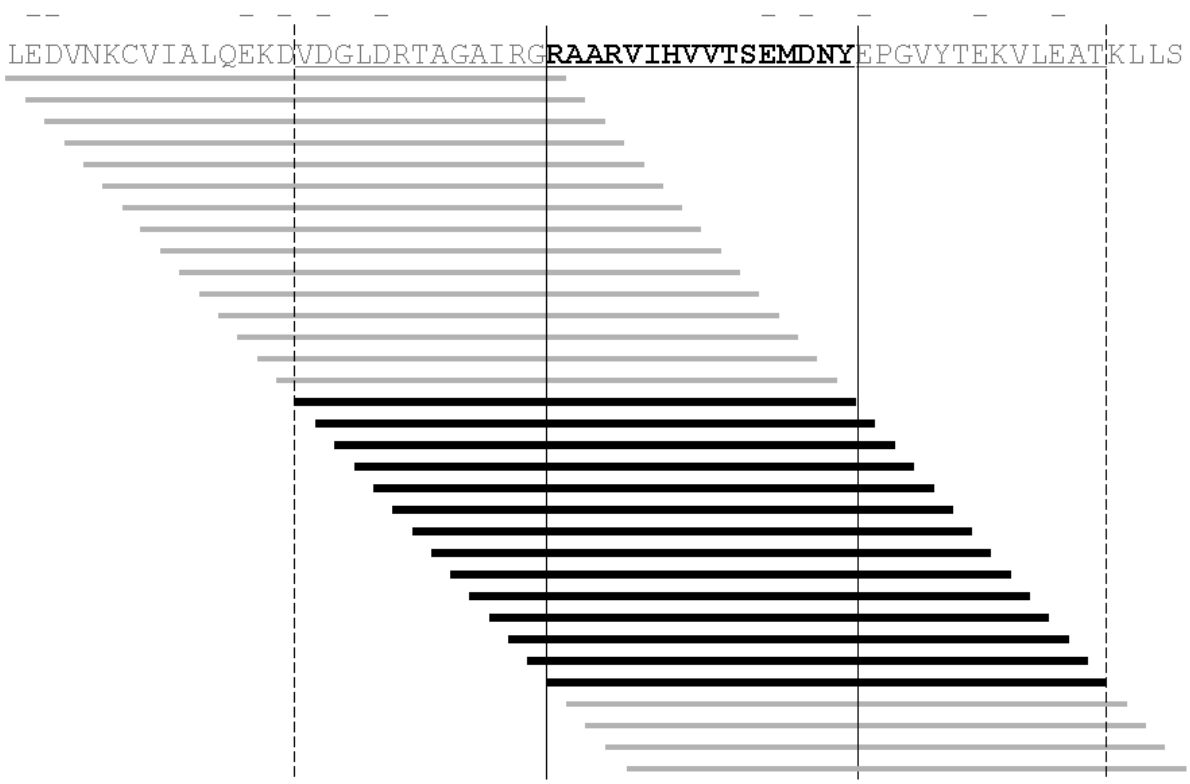

1KJW-SS
Pam250
Domänen
1KJW
ZO-1-Maus
1AEY (SH3)
1AEY-SS
GUK-Hefe
1EX7-SS
AS-ZO-1m
ZO-1-Maus
ZO-1-Hund
ZO-1-Mensch
ZO-1-Hydra
ZO-2-Mensch
ZO-2-Ratte
ZO-2-Maus
ZO-2-Huhn
ZO-3-Mensch
ZO-3-Hund
ZO-3-Maus
Tama-Drome
DLG1-Mensch
DLG1-Drome
DLG2-Mensch
DLG3-Mensch
DLG4-Ratte
DLG5-Mensch
DLG6-Ratte
MPP2-Mensch
MPP6-Mensch
EM55-Maus
CASK-Maus
Pals1-Maus
Stardust-Drome
DLG6-Maus
MPP4-Mensch
MPP3-Mensch


1KJW-SS
Pam250
Domänen
1KJW
ZO-1-Maus
1AEY (SH3)
1AEY-SS
GUK-Hefe
1EX7-SS
AS-ZO-1m
ZO-1-Maus
ZO-1-Hund
ZO-1-Mensch
ZO-1-Hydra
ZO-2-Mensch
ZO-2-Ratte
ZO-2-Maus
ZO-2-Huhn
ZO-3-Mensch
ZO-3-Hund
ZO-3-Maus
Tama-Drome
DLG1-Mensch
DLG1-Drome
DLG2-Mensch
DLG3-Mensch
DLG4-Ratte
DLG5-Mensch
DLG6-Ratte
MPP2-Mensch
MPP6-Mensch
EM55-Maus
CASK-Maus
Pals1-Maus
Stardust-Drome
DLG6-Maus
MPP4-Mensch
MPP3-Mensch

1KJW-SS
Pam250
Domänen
1KJW
ZO-1-Maus
1AEY (SH3)
1AEY-SS
GUK-Hefe
1EX7-SS
AS-ZO-1m
ZO-1-Maus
ZO-1-Hund
ZO-1-Mensch
ZO-1-Hydra
ZO-2-Mensch
ZO-2-Ratte
ZO-2-Maus
ZO-2-Huhn
ZO-3-Mensch
ZO-3-Hund
ZO-3-Maus
Tama-Drome
DLG1-Mensch
DLG1-Drome
DLG2-Mensch
DLG3-Mensch
DLG4-Ratte
DLG5-Mensch
DLG6-Ratte
MPP2-Mensch
MPP6-Mensch
EM55-Maus
CASK-Maus
Pals1-Maus
Stardust-Drome
DLG6-Maus
MPP4-Mensch
MPP3-Mensch


1KJW-SS
Pam250
Domänen
1KJW
ZO-1-Maus
1AEY (SH3)
1AEY-SS
GUK-Hefe
1EX7-SS
AS-ZO1m
ZO-1-Maus
ZO-1-Hund
ZO-1-Mensch
ZO-1-Hydra
ZO-2-Mensch
ZO-2-Ratte
ZO-2-Maus
ZO-2-Huhn
ZO-3-Mensch
ZO-3-Hund
ZO-3-Maus
Tama-Drome
DLG1-Mensch
DLG1-Drome
DLG2-Mensch
DLG3-Mensch
DLG4-Ratte
DLG5-Mensch
DLG6-Ratte
MPP2-Mensch
MPP6-Mensch
EM55-Maus
CASK-Maus
Pals1-Maus
Stardust-Drome
DLG6-Maus
MPP4-Mensch
MPP3-Mensch

7.2. Schema zum Verständnis der Peptidmappingexperimente



Angegeben ist als Beispiel die Maus-α-Catenin-Sequenz von AS 520-580, aber dasselbe Prinzip gilt auch für die Occludin oder ZO-1-Peptidmembranen. Es wurden jeweils Peptide mit einer Länge von 29 AS auf den Membranen synthetisiert und die Sequenz bei benachbarten Peptidpunkten um je 1 AS C-terminal verschoben (symbolisiert durch die Linien). Einige der Peptidpunkte weisen eine Bindung auf (fette Linien, hier an CC1). Sie umfassen als Gesamtsequenz den Bereich α-Catenin$_{535\text{-}576}$ (unterstrichen und Enden markiert mit unterbrochenen Linien). Diese äußeren Grenzen der bindenden Peptidsequenzen sind in den Abb. 3.23, 3.24 und 3.25 (dort sind die synthetisierten Peptide auf den Membranen nur 20 AS lang) angegeben.
Die Interaktion könnte durch eine Bindung an den allen Peptiden gemeinsamen Sequenzbereich α-Catenin$_{548\text{-}563}$ erklärt werden (fett und mit durchgehenden Linien markiert). Bei α-Catenin sind jedoch teilweise so große Bindungsbereiche zu beobachten, dass die beteiligten Peptidpunkte gar keine Sequenz mehr gemeinsam haben (Abb. 3.24). Hier muss es Wechselwirkungsmotive geben, die sich beim Verschieben des Sequenzrahmens wiederholen. Dies könnte auch im gezeigten Beispiel der Fall sein, da wir als Teil des Interaktionsmechanismus ionische Wechselwirkungen zwischen positiven (basischen) farbstoffmarkierten ZO-1-Peptiden und negativen (sauren) membrangebundenen Sequenzen (in Abb. mit „-“ gekennzeichnet) von Occludin und α-Catenin annehmen. Alle bindenden Peptide im Beispiel haben die sauren AS E559 und D561 gemeinsam, in den N-terminalen Peptiden liegen zusätzlich noch D536 und D539, während die C-terminalen Peptide E564, E570 und E574 enthalten.

7.3. Abstract

The exact sites, structures and molecular mechanisms of interaction between junction organizing zona occludence protein 1 (ZO-1) and the tight junction protein occludin or the adherens junction protein α-catenin are unknown. Binding studies by surface plasmon resonance spectroscopy and peptide mapping combined with comparative homology modeling utilizing crystal structures led for the first time to a molecular model revealing the binding of both occludin and α-catenin to the same binding site in ZO-1. Our data support a concept that ZO-1 successively associates with α-catenin at the adherens junction and occludin at the tight junction.

Strong spatial evidence indicates that the occludin C-terminal coiled-coil domain dimerizes and interacts as a four-helix bundle with the identified structural motifs in ZO-1. The dimerisation of occludin was supported by biophysical experiments (size exclusion chromatography, light scattering), while surface plasmon resonance spectroscopy found an oligomerisation of ZO-1. In the interacting regions of α-catenin and ZO-1 CC-helices were also predicted. α-Catenin likewise consists of several four-helix bundles according to crystal structures and homology models. In peptidemapping experiments occludin$_{406\text{-}521}$ and α-catenin$_{509\text{-}906}$ interacts with the hinge region (ZO-1$_{591\text{-}632,\ 591\text{-}622}$ respectively) and with (ZO-1$_{726\text{-}754,\ 756\text{-}781}$) in the GUK domain of ZO-1 containing coiled-coil and α-helical structures respectively. The selectivity of both protein-protein interactions is defined by complementary shapes and charges between the participating epitopes. In conclusion, a common molecular mechanism of forming an intermolecular helical bundle between the hinge region/GUK domain of ZO-1 and α-catenin and occludin is identified as a general molecular principle organizing the association of ZO-1 at adherens and tight junctions.

Lebenslauf

Zur Person	Name:	Sebastian Ludwig Müller
	Anschrift:	Ruhlsdorfer Str. 89c 14532 Stahnsdorf
	geboren am:	18.11.1974 in Haldensleben
	Familienstand:	ledig, keine Kinder
Schulbildung	09/1981 - 08/1989	Polytechnische Oberschule " Karl Liebknecht" in Haldensleben
	09/1989 - 07/1993	Gymnasium Kleinmachnow (früher Erweiterte Spezialoberschule Kleinmachnow) mit erweiterter mathematisch-naturwissenschaftlich-technischer Richtung Abitur mit 1,1
Ersatzdienst	08/1994 - 10/1995	Altenpflegeheim Bethesda in Teltow
Studium	10/1993 - 07/2000	Universität Potsdam, Abschluss als Diplombiochemiker (Note 1,6) Thema der Diplomarbeit: Untersuchungen zur Regulation von Radikalabwehrenzymen in Gehirnkapillarendothelzellen unter oxidativem Streß
Berufspraxis	08/2000 - 12/2000	Stipendiat im Graduiertenkolleg GRK 238 Schadensmechanismen im Nervensystem - Einsatz von bildgebenden Verfahren
	01/2001 - 12/2004	wissenschaftlicher Mitarbeiter Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie (FMP) Berlin Thema: Untersuchungen zum Bindungsmechanismus von Occludin und α-Catenin an ZO-1

Publikationen

Schroeter ML, Mertsch K, Giese H, Müller S, Sporbert A, Hickel B, Blasig IE. (1999). Astrocytes enhance radical defence in capillary endothelial cells constituting the blood-brain barrier. *FEBS Lett*. **449**, 241-4.

Csonka C, Pataki T, Kovacs P, Müller SL, Schroeter ML, Tosaki A, Blasig IE. (2000). Effects of oxidative stress on the expression of antioxidative defense enzymes in spontaneously hypertensive rat hearts. *Free Radic Biol Med*. **29**, 612-9.

Schroeter ML, Müller S, Lindenau J, Wiesner B, Hanisch UK, Wolf G, Blasig IE. (2001). Astrocytes induce manganese superoxide dismutase in brain capillary endothelial cells. *Neuroreport.* **12**, 2513-7.

Schmidt A, Utepbergenov DI, Mueller SL, Beyermann M, Schneider-Mergener J, Krause G, Blasig IE. (2004). Occludin binds to the SH3-hinge-GuK unit of zonula occludens protein 1: potential mechanism of tight junction regulation. *Cell Mol Life Sci*. **61**, 1354-65.

Müller SL, Portwich M, Schmidt A, Utepbergenov DI, Huber O, Blasig IE, Krause G. (2005). The tight junction protein occludin and the adherens junction protein alpha-catenin share a common interaction mechanism with ZO-1. *J Biol Chem*. **280**, 3747-56.

Blasig IE, Winkler L, Lassowski B, Mueller SL, Zuleger N, Krause E, Krause G, Gast K, Kolbe M, Piontek J. (2005). The dimerisation concept of transmembrane tight junction proteins *submitted*

Vorträge

Treffen von über Radikale arbeitenden Forschergruppen aus Norddeutschland in Berlin (23.1.01):
Einfluß von Cytokinen und Hypoxie auf antioxidativ wirkende Enzyme der Blut-Hirn-Schranke.

Graduiertenkolleg GRK 238 Symposium „Next Neuroscience generation: Relevance of cell death in development and disease of the brain.“ in Berlin (24./25.02.03):
Interactions between the Blood-Brain Barrier (BBB) Proteins Occludin and ZO-1

44.Frühjahrstagung der Pharmakologen in Mainz (März 2003)
Entwicklung eines Modells für die Interaktion zwischen den tight-junction Proteinen ZO-1 und Occludin

Abschlussveranstaltung des Graduiertenkollegs GRK 238 in Berlin (Nov. 2004):
Interactions between tight and adherens junction proteins - Structure-Function-Relationship of proteins in the blood-brain barrier

Poster

6th Int. Conference *Cerabral vascular biology* (2001):
Haseloff RE, Schmidt A, Müller SL, Blasig IE.
Protein expression in brain endothelial cells: astrocyte influence and effects of hypoxia

7. Intern. Dahlem Symposium für Signaltransduktion in Berlin (27-29.09.01):
Coiled coil structural motifs are causing the interaction of the tight junction proteins occludin and ZO-1

8. PhD-Symposium von MDC/FMP (1.7.02):
Homology modelling of the interaction of the tight junction proteins occludin and ZO-1 supported by SPR-Binding Studies.

6th Symposium on Signal Transduction in the Blood-Brain Barriers Szeged, Ungarn (18-21.9. 2003):
The tight junction protein occludin and the adherens junction protein alpha-catenin are both interacting with ZO-1 via a helix–helix interaction mechanism.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel verfasst habe.

Diese Arbeit wurde bisher noch an keiner Universität vorgelegt.

Ich erkläre, dass ich mich bisher nicht an einer anderen Einrichtung um einen Doktorgrad beworben habe und keine derartigen Titel besitze.

Berlin, August 2005 Sebastian Ludwig Müller