

Struktur, Funktion und Regulation des Tight Junction-Proteins Tricellulin

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Julie Katharina Westphal
aus Berlin

Dezember 2009

Diese Dissertation wurde in der Zeit von November 2006 bis Dezember 2009 am Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie (Prof. Dr. Rudolf Tauber), Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Otmar Huber angefertigt.

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Otmar Huber
Institut für Biochemie II
Friedrich-Schiller-Universität Jena

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Rupert Mutzel
Institut für Biologie
Freie Universität Berlin

Disputation am: 12.02.2010

Bescheinigung
gem. § 7 Abs. 4 der Promotionsordnung vom 04.09.2007
des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie

Hierdurch versichere ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Struktur, Funktion und Regulation des Tight Junction-Proteins Tricellulin“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und dass ich meine Dissertation, im Falle der Ablehnung, nur unter Hinweis auf diese Ablehnung für ein anderes Examen verwenden werde.

Die in dieser Dissertation verwendeten geschützten Warenzeichen sind innerhalb des laufenden Textes nicht immer als solche gekennzeichnet. Aus dem Fehlen der Kennzeichnung kann also nicht geschlossen werden, dass der entsprechende Produktname frei von Rechten Dritter ist.

Julie Katharina Westphal

Berlin, Dezember 2009

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Epithelien.....	1
1.2 Zell-Zell-Kontakte	2
1.2.1 Gap Junctions	2
1.2.2 Desmosomen	2
1.2.3 Adherens Junctions	2
1.2.4 Tight Junctions	3
1.3 Tight Junction-Proteine	5
1.3.1 Occludin	6
1.3.2 Claudine	8
1.3.3 Die Tight Junction-assoziierten Proteine JAM, CAR und ESAM.....	9
1.3.4 Tricellulin.....	10
1.3.5 Cytoplasmatische Tight Junction-Proteine	12
1.4 Ziele der Arbeit.....	14
2 Material und Methoden.....	16
2.1 Material	16
2.1.1 Geräte	16
2.1.1.1 Elektrophorese und Western-Blot.....	16
2.1.1.2 Bakterien- und Zellkultur.....	16
2.1.1.3 Zentrifugen.....	16
2.1.1.4 Sonstige Geräte	17
2.1.2 Chemikalien	17
2.1.3 Radionuklide	19
2.1.4 Verbrauchsmaterialien	19
2.1.5 Materialien für die Zellkultur.....	19
2.1.6 Enzyme.....	20
2.1.7 Reaktions-Kits.....	20
2.1.8 Molekulargewichtstandards für Proteine und DNA.....	21
2.1.9 Puffer und Lösungen	21
2.1.10 Medien	22
2.1.11 Eukaryontische Zelllinien	23
2.1.12 Bakterienstämme.....	23
2.1.13 Antikörper	24
2.1.13.1 Primär-Antikörper.....	24

2.1.13.2	Sekundär-Antikörper.....	24
2.1.14	Expressionsvektoren	25
2.1.15	Oligonukleotide.....	26
2.2	Methoden	28
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	28
2.2.1.1	Polymerase-Chain-Reaction (PCR)	28
2.2.1.2	Aufreinigung von PCR Produkten	28
2.2.1.3	Annealen und Phosphorylierung von Oligonukleotiden	28
2.2.1.4	Restriktionsanalyse	29
2.2.1.5	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	29
2.2.1.6	Elektrophoretische Auftrennung von DNA	30
2.2.1.7	Reinigung von DNA aus Agarosegelen	30
2.2.1.8	Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA.....	31
2.2.1.9	Ethanol-fällung von DNA	31
2.2.1.10	Ligase-Reaktion	31
2.2.1.11	Hitzeschock Transformation in kompetente <i>E. coli</i> -Zellen.....	31
2.2.1.12	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen	32
2.2.1.13	Bestimmung der DNA-Konzentration	32
2.2.1.14	DNA-Sequenzierung.....	33
2.2.1.15	Generierung der verwendeten DNA-Konstrukte.....	33
2.2.2	Zellbiologische Methoden.....	36
2.2.2.1	Zellkultur	36
2.2.2.2	Bestimmung der Zellzahl.....	36
2.2.2.3	Aussäen von Zellen.....	37
2.2.2.4	Transfektion von HEK293-Zellen (Calcium-Phosphat-Präzipitation).....	37
2.2.2.5	Transfektion von MDCK C11-Zellen	37
2.2.2.6	Einfrieren und Auftauen von Zellen	38
2.2.2.7	Ussing-Kammer-Messungen.....	38
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	39
2.2.3.1	Lyse eukaryontischer Zellen	39
2.2.3.2	Co-Immunpräzipitation (IP).....	39
2.2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
2.2.3.4	Proteinfärbung in SDS-Polyacrylamidgelen	41
2.2.3.5	Western-Blot.....	41
2.2.3.6	Immundetektion	41
2.2.3.7	Ubiquitinierungs-Assay	42
2.2.3.8	Biotinylierungs-Assay.....	42
2.2.3.9	Immunfluoreszenzfärbung von Zellen	42
2.2.3.10	Calcium-Switch-Assay	43
2.2.3.11	Rekombinante Expression von Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	43
2.2.3.12	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	44

2.2.3.13	Phosphorylierungs-Assay	45
2.2.3.14	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET)	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	46
3.2	Generierung und Charakterisierung von α-Tricellulin Antiseren	46
3.2.1	Charakterisierung der α -Tricellulin Antiseren.....	47
3.2.1.1	Kreuzreaktivität und Spezifität	47
3.2.1.2	Detektion von endogenem Tricellulin in Zell-Lysaten	49
3.3	Lokalisation und Funktion von Tricellulin und Tricellulin-	
Mutanten	49	
3.3.1	Einfluss der N- und C-terminalen cytoplasmatischen Domänen auf die Lokalisation von Tricellulin.....	50
3.3.2	Expression von Tricellulin-Konstrukten in HEK293-Zellen	55
3.3.3	Funktionelle Analyse von Tricellulin und Tricellulin-Deletionsmutanten.....	55
3.3.4	Einfluss der N- und C-terminalen Deletionen von Tricellulin auf die Assemblierung von Tight Junctions.....	58
3.4	Untersuchungen zur Komplexbildung von Tricellulin	59
3.4.1	Nachweis von homomeren Tricellulin-Tricellulin-Interaktionen.....	60
3.4.2	Bestätigung der homomeren Komplexbildung durch Fluorescence resonance energy transfer (FRET)-Experimente	63
3.5	Heteromerisierung von Tricellulin und Occludin	64
3.5.1	Tricellulin bildet heteromere Komplexe mit Occludin.....	64
3.5.2	Interaktionen zwischen FLAG ₃ -getaggten Tricellulin-Konstrukten und endogenem Occludin.....	66
3.5.3	Interaktion von Tricellulin mit Occludin-Deletionskonstrukten.....	67
3.6	Posttranslationale Modifikationen von Tricellulin.....	68
3.6.1	Phosphorylierung von Tricellulin	68
3.6.2	Ubiquitinierung von Tricellulin	69
3.6.2.1	Untersuchungen zum proteasomalem Abbau von ubiquitiniertem Tricellulin	70
3.6.2.2	Endocytose von Tricellulin.....	71
4	Diskussion	73
4.1	Rolle der cytoplasmatischen Domänen für die Lokalisation von Tricellulin	73
4.2	Barrierefunktion von Tricellulin an trizellulären Tight Junctions	75
4.3	Einfluss der Tricellulin-Konstrukte auf die Dissoziation und Re- Assoziation von Tight Junctions.....	76

4.4 Nachweis von Tricellulin/Tricellulin- und Tricellulin/Occludin-Komplexen.....	76
4.5 Posttranslationale Modifikationen.....	79
4.5.1 Phosphorylierung von Tricellulin	79
4.5.2 Ubiquitinierung und Endocytose von Tricellulin.....	80
5 Zusammenfassung	83
6 Literaturverzeichnis	85
7 Anhang	94

Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volumenanteil im Verhältnis zum Volumen
(v/w)	Gewichtsanteil im Verhältnis zum Volumen
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
APP	Amyloid-Precursor-Protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin [Rinderserumalbumin]
bTJ	bizelluläre Tight Junctions
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CAR	Coxsackievirus und Adenovirusrezeptor
CFP	cyan fluorescent protein [türkis fluoreszierendes Protein]
CK1	Casein Kinase 1
CK2	Casein Kinase 2
Cld	Claudin
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CRFR	Corticotropin-Releasing Factor Receptor
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	desoxyribonucleotid-5'-triphosphat
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ESAM	endothelial cell-selective adhesion molecule
<i>et al.</i>	und andere
FKS	fetales Kälberserum
FL.	full length [Volllänge]
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
g	Erdbeschleunigung; 9,81 m/s ²
G418	Geneticin

GSK-3 β	Glycogen Synthase Kinase 3
GST	Gluthathion-S-Transferase
h	hour(s) [Stunde(n)]
HA	Hemagglutinin
HEK	Human Embryonic Kidney
His	Histidin
IB	Immunblot
IgG	Immunglobulin G
IP	Co-Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JAM	junctional adhesion molecul
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth
LC	low calcium
M	Mol pro Liter
mA	Milliamper
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MEM	Minimum Essential Medium
mg	Milligramm
min	minutes [Minute(n)]
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
NC	normal calcium
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Occ	Occludin
OccC	C-terminale cytoplasmatische Domäne von Occludin
OD	optische Dichte
ON	Oligonukleotid
PAGE	Polyacrylamidgel-Elktrophorese
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PKA	cAMP-dependent Protein Kinase
PKC	Protein Kinase C
pmol	picomol pro Liter
PNK	Polynukleotid Kinase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	ribonucleic acid

RNAi	RNA Interferenz
RT	Raumtemperatur
s.o.	siehe oben
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SDS	sodiumdodecylsulfate
sec	second(s) [Sekunde(n)]
t	time [Zeit]
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TER	transepithelialer Widerstand
TJ	Tight Junctions
Tric	Tricellulin
TricC	C-terminale cytoplasmatische Domäne von Tricellulin
Tris	Tris(hydrocymethyl)aminoethan
Triton-X100	t-Oktylphenoxypolyethoxyethanol
tTJ	trizelluläre Tight Junctions
Tween20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	units [Einheiten(en)]
Ub	Ubiquitin
UV	Ultraviolett
V	Volt
YFP	yellow fluorescent protein [gelb fluoreszierendes Protein]
z.B.	zum Beispiel
ZO	Zonula Occludens

1 Einleitung

1.1 Epithelien

Bei vielzelligen Organismen werden vier Grundgewebearten unterschieden: Muskel-, Nerven- und Bindegewebe sowie Epithelien. Letztere bilden ein- oder mehrlagige Zellschichten aus, die alle inneren oder äußeren Körperoberflächen bedecken. Zu den einschichtigen Epithelien gehört zum Beispiel das Endothel, das die epitheliale Auskleidung der Blut und Lymphgefäße darstellt. Jede Epithelzelle weist eine apikale Seite und eine basale Seite auf, daher werden sie als polar bezeichnet.

Epithelzellen stehen über verschiedene Zell-Zell-Verbindungen miteinander in Kontakt (Abb. 1). Man differenziert innerhalb dieser junctionalen Komplexe zwischen Gap Junctions, Desmosomen, Adherens Junctions und Tight Junctions.

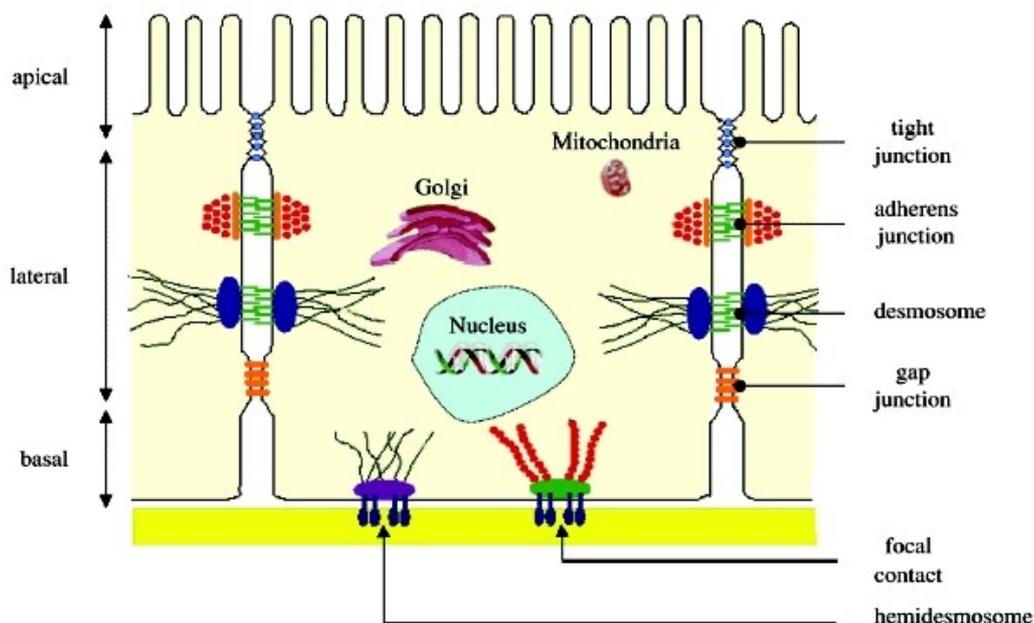


Abb. 1: Schematische Darstellung der Zell-Zell-Kontakte in Epithelzellen. In polaren Zellen unterscheidet man zwischen apikalen, lateralen und basalen Membranregionen. Verschiedene Arten von Zell-Zell-Verbindungen (Tight Junctions, Adherens Junctions, Desmosomen und Gap Junctions) vermitteln interzelluläre adhäsive Wechselwirkungen, wobei Tight Junctions im apikalen Bereich der lateralen Zell-Zell-Kontakte lokalisiert sind. Zell-Matrix-Kontakte sind dagegen nur in der basalen Region angeordnet und bestehen aus fokalen Kontakten und den Hemidesmosomen.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=eurekah&part=A41111>)

1.2 Zell-Zell-Kontakte

1.2.1 Gap Junctions

Gap Junctions sind Zell-Zell-Verbindungen, die beim adulten Organismus hauptsächlich in Epithel- und Gliazellen lokalisiert sind, aber auch im Herzmuskelgewebe und in der Retina. Diese Strukturen stellen eine direkte Verbindung zwischen dem Cytosol zweier benachbarter Zellen her. Jede Zelle bildet dabei einen Halbkanal aus Connexinen aus, wobei sich jeweils sechs Connexine zu einem Connexon zusammenlagern (Musil and Goodenough, 1990). Die beiden Halbkanäle von zwei benachbarten Zellen verbinden sich im Interzellularraum zu einer durchgehenden Pore. Durch diese Kanäle (Durchmesser von 1,5 bis 2 nm) diffundieren kleine geladene und ungeladene Moleküle mit molekularen Massen von bis zu 1.000 Da.

1.2.2 Desmosomen

Desmosomen (Maculae Adhaerens) gehören neben Adhaerens Junctions und Tight Junctions zu den lateralen Zell-Zell-Kontakten und kommen in Epithelien und einigen nicht-epithelialen Geweben vor, zum Beispiel im Herzmuskel. Diese Art der Zellkontakte dient vor allem dem mechanischen Zusammenhalt des Gewebes und damit der Stabilisierung des Zellverbundes gegenüber Zug- und Scherkräften. Zudem tragen Desmosomen zum Formehalt der Zellen bei. Desmosomen sind aus verschiedenen Komponenten aufgebaut, ein Hauptbestandteil ist Desmoplakin. Dieses Protein ist an der Innenseite der Plasmamembran im desmosomalen Plaque lokalisiert. Es bindet an Intermediärfilamente (z.B. Keratin) und stellt somit eine Verbindung zwischen Desmosomen und dem Cytoskelett her. Die zur Familie der Cadherine gehörenden Desmogleine 1-4 und Desmocolline 1-3 (Buxton *et al.*, 1993) sind als integrale Membranproteine über ihre cytoplasmatischen Domänen mit den intrazellulären Plaques verankert. Sie stellen eine Verbindung zwischen Zellen her, indem sie im Interzellularraum mit Cadherinen der Nachbarzellen interagieren.

Durch Desmosomen-ähnliche Zellstrukturen, die Hemidesmosomen, wird eine Verbindung zwischen Zellen und der Basallamina hergestellt. Extrazelluläre Adhäsionsproteine (Integrine) sind über Plektin intrazellulär mit Keratinfilamenten verbunden, diese Interaktion dient der Zellstabilisierung.

1.2.3 Adhaerens Junctions

Adhaerens Junctions dienen ebenfalls der mechanischen Stabilisierung von Zellen (Jamora and Fuchs, 2002). In Epithelzellen befindet sich der Adhäsionsgürtel direkt unter den Tight Junctions. Am Aufbau der Adhärenzverbindungen sind Cadherine (Takeichi, 1991) beteiligt, die Calcium-abhängig bevorzugt homophile Interaktionen mit Cadherinen auf der Oberfläche

benachbarter Zellen eingehen (Tsukita *et al.*, 1992). Mit den cytoplasmatischen Domänen der klassischen Cadherine assoziiert sind die Catenine, wobei β -Catenin und Plakoglobin direkt an die cytoplasmatischen Domänen binden (Conacci-Sorrell *et al.*, 2002; Nagafuchi and Takeichi, 1988). α -Catenin wiederum bindet an β -Catenin und Plakoglobin. α -Catenin wiederum verknüpft unter Mitwirkung von Aktin-bindenden Proteinen wie α -Actinin, Vinculin und Eplin (Abe and Takeichi, 2008; Knudsen *et al.*, 1995; Watabe-Uchida *et al.*, 1998; Weiss *et al.*, 1998) den Cadherin-Catenin-Komplex mit dem Aktin-Cytoskelett (Hülsken *et al.*, 1994; Pokutta and Weis, 2000).

1.2.4 Tight Junctions

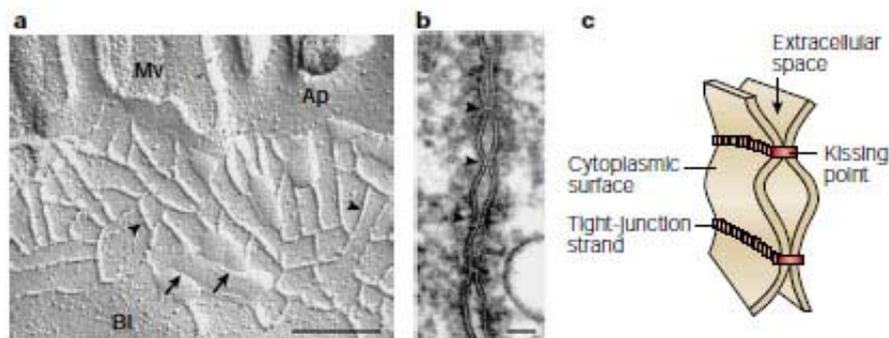


Abb. 2: Die Tight Junction Struktur. (a) Freeze-Fracture-elektronenmikroskopische Darstellung von Tight Junctions in Darmepithelzellen. Die Tight Junctions werden durch die Pfeilspitzen angezeigt und erscheinen als ein Satz von ineinander mündenden intramembranären Partikelsträngen oder Fibrillen; auf der „P Face“ mit komplementären Riefen auf der „E Face“ (Pfeile). (Mv, Microvilli; Ap, apikale Membran; BL, basolaterale Membran). Maßstabsbalken 200 nm. (b) Ansicht der Tight Junction-Ebene. Die „Kissing Points“ der Tight Junctions werden durch die Pfeilspitzen angezeigt. An diesen Stellen ist der Interzellularraum verschlossen. Maßstabsbalken 50 nm. (c) Schema der dreidimensionalen Struktur von Tight Junctions. Jeder Tight Junction-Strang innerhalb einer Plasmamembran assoziiert lateral mit einem anderen Tight Junction-Strang in der gegenüber liegenden Membran einer benachbarten Zelle. So werden gepaarte Tight Junction-Stränge ausgebildet, die den Interzellularraum abdichten (Tsukita *et al.*, 2001).

Tight Junctions (zonulae occludentes) sind Zell-Zell-Verbindungen, die sich im apikalen Bereich epithelialer und endothelialer Zellen befinden (Abb. 2). Die Zellverbindungen haben zwei charakteristische Funktionen. Zum einen kontrollieren sie den parazellulären Transport von Ionen, gelösten Molekülen und Wasser zwischen den Epithelzellen hindurch (Abb. 3), indem sie den Interzellularraum abdichten (Gate-Funktion) (Anderson *et al.*, 2004; Matter and Balda, 2003; Schneeberger and Lynch, 2004; Tsukita *et al.*, 2001). Auf der anderen Seite fungieren Tight Junctions als intramembranäre Diffusionsbarriere und halten die Zellpolarität aufrecht, indem sie apikale und basolaterale Membrankomponenten voneinander separieren (Fence-Funktion) (Anderson, 2001; Gumbiner, 1993; Schneeberger and Lynch, 1992).

Über die Gate-Funktion sind Tight Junctions somit für die Aufrechterhaltung und Regulation der epithelialen Barrierefunktion verantwortlich (Cereijido *et al.*, 1998). Verschiedene Epithelien unterscheiden sich in der Proteinzusammensetzung und weisen daher Unterschiede

in ihrer Dichtigkeit auf. Als Maß für die Dichtigkeit dient der transepitheliale Widerstand (TER) (Powell, 1981).

Ein anderer Transportweg für Ionen und gelöste Moleküle durch das Epithel (Abb. 3) ist der transzelluläre Weg über Kanäle, Transporter, Pumpen und Vesikel (Bazzoni, 2006).

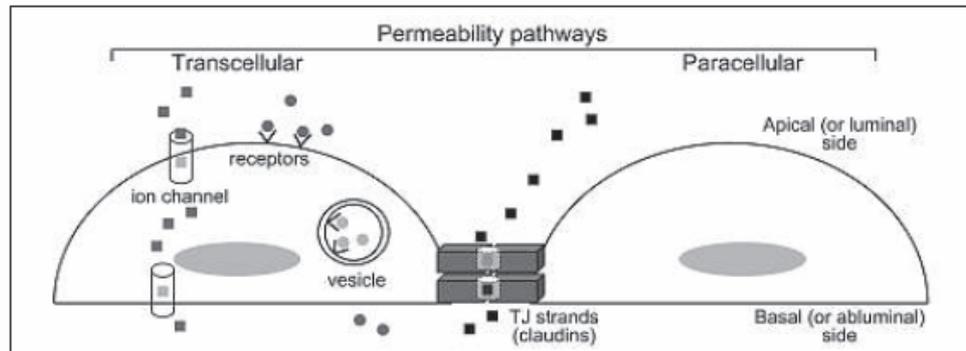


Abb. 3: Schematische Übersicht der Transportwege über epitheliale Barrieren. Über den transzellulären Weg passieren Ionen die Zellmembran über Ionenkanäle. Größere Moleküle binden an Membranrezeptoren und werden innerhalb von Vesikeln von der luminalen zur abluminalen Seite der Zelle transportiert. Über den parazellulären Weg können gelöste Substanzen den Interzellularraum über wässrige Poren innerhalb der Tight Junction-Stränge passieren (Bazzoni, 2006).

Tight Junctions wurden als Kontaktpunkte zwischen benachbarten Membranen identifiziert, die im Transmissionselektronenmikroskop deutlich sichtbar sind (Farquhar and Palade, 1963). Stahelin (Stahelin, 1973) zeigte in Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie-Experimenten, dass solche „kissing points“ mit Netzwerken intramembranöser Partikelstränge korrespondieren. Die Tight Junction-Stränge einer Membran interagieren mit den Strängen in angrenzenden Membranen (Tsukita *et al.*, 2001) und dichten den Interzellularraum zwischen zwei Zellen ab. Daher werden sie als bizelluläre Tight Junctions (bTJ) bezeichnet. Im Gegensatz zu anderen Zellverbindungen wie Adherens Junctions und Desmosomen, bei denen die gegenüberliegenden Membranen einen Abstand von 15 – 20 nm haben, ist der Interzellularraum an den Tight Junctions vollständig abgedichtet.

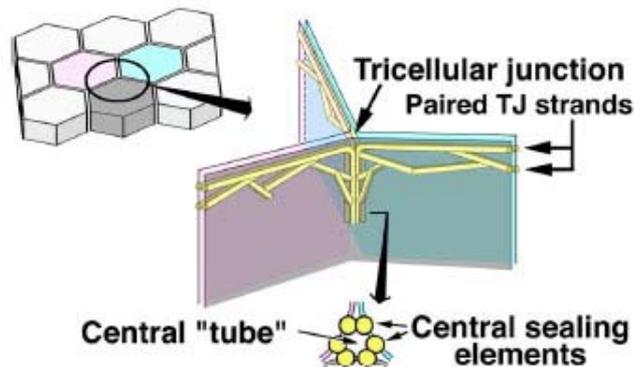


Abb. 4: Schematische Darstellung der Organisation von trizellulären Tight Junctions (tTJ). An Kontaktpunkten von drei benachbarten Zellen, den trizellulären Tight Junctions, sind bizelluläre Tight Junctions (bTJ) diskontinuierlich und erstrecken sich basolateral. Auf der rechten Seite der Abbildung ist schematisch ein vergrößerter Dreizellkontakt aus der linken Abbildung dargestellt (Ikenouchi *et al.*, 2005).

Außerdem treten in epithelialen und endothelialen Geweben Zellkontakte auf, an denen drei benachbarte Zellen aufeinander stoßen (Abb. 4). Auch diese Strukturen wurden durch Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie analysiert (Staehein *et al.*, 1969; Wade and Karnovsky, 1974). An diesen trizellulären Tight Junctions (tTJ) dehnt sich das Tight Junction Netzwerk basolateral aus und die bizellulären Tight Junctions sind diskontinuierlich, wodurch es zur Bildung einer zentralen Pore (Abb. 4) kommt. Diese kann sich als Schwachpunkt der epithelialen Barrierefunktion auswirken (Ikenouchi *et al.*, 2005).

1.3 Tight Junction-Proteine

Bisher konnten über 40 Proteine identifiziert werden, die Bestandteil der Tight Junctions sind (Abb. 5) (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2003). Erkenntnisse der letzten Jahre zeigen, dass diese Zell-Zell-Verbindungen nicht nur als parazelluläre Barrieren von struktureller Bedeutung sind, sondern vielmehr als komplexe Multiprotein-Plattformen zusätzlich in Signalkaskaden involviert sind, die Zellwachstum und Differenzierung kontrollieren.

Zu den Proteinen der Tight Junctions gehören zum einen Transmembranproteine wie Occludin, die Claudine, die JAMs und Tricellulin, die den Interzellularraum durchspannen, die Zell-Zell-Adhäsion vermitteln und somit die parazelluläre Barriere ausbilden. Zum anderen sind mit diesen Transmembranproteinen eine Vielzahl an peripheren cytoplasmatischen Proteinen assoziiert. Letztere bestehen einerseits aus Gerüstproteine, z.B. ZO-1, ZO-2, ZO-3 (Balda *et al.*, 1993; Gumbiner *et al.*, 1991; Stevenson *et al.*, 1986), die die Tight Junctions mit dem Cytoskelett verankern und außerdem der Rekrutierung regulatorischer Proteine wie Kinasen, G-Proteinen und nukleärer Transkriptionsfaktoren an

Daneben wurde beschrieben, dass die C-terminale cytoplasmatische Domäne von Occludin für die Lokalisation des Proteins in den Tight Junction wichtig ist (Matter and Balda, 1998).

Im C-Terminus befindet sich eine coiled-coiled-Domäne, über die die C-terminalen cytoplasmatischen Domänen miteinander Dimere ausbilden (Blasig *et al.*, 2006). Vermutlich ist Dimerisierung bzw. Multimerisierung für die Funktion aller Tight Junction-Proteine notwendig (Tsukita *et al.*, 2001). So konnte die Bildung von Dimeren auch für Claudin-5 gezeigt werden (Blasig *et al.*, 2006).

Im Gegensatz dazu ist über die Funktion des N-Terminus von Occludin nicht sehr viel bekannt. Traweger *et al.* (2002) konnten eine von der E3 Ubiquitin-Protein-Ligase Itch vermittelte Ubiquitinierung von Occludin nachweisen (Traweger *et al.*, 2002).

Außerdem besitzt Occludin zwei extrazelluläre Loops, wobei der erste einen hohen Anteil an Tyrosin und Glycin-Resten hat und in Zell-Zell-Adhäsion involviert ist. Der zweite extrazelluläre Loops spielt dagegen eine Rolle bei der Ausbildung der parazellulären Barriere (Feldman *et al.*, 2005).

Die physiologische Funktion von Occludin ist nicht eindeutig geklärt und in mancher Hinsicht widersprüchlich. In immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen korreliert die Intensität der anti-Occludin-Färbung mit der Anzahl von Tight Junction-Strängen. Für die Bildung von Tight Junctions scheint Occludin jedoch nicht unbedingt notwendig zu sein, da auch ohne die Expression von Occludin Tight Junction-Stränge ausgebildet werden können. In verschiedenen Zelltypen wie Endothelzellen in nicht-neuralem Gewebe und in Sertoli Zellen mancher Spezies wurde zum Beispiel kein Occludin in den Tight Junctions detektiert (Hirase *et al.*, 1997; Moroi *et al.*, 1998).

Überexpression von Wildtyp-Occludin und mutierten Occludin-Varianten in MDCK-Zellen oder Xenopus-Zellen (Balda *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997) lassen vermuten, dass Occludin eine Rolle bei der Regulierung des parazellulären Transports spielt. Zudem kann durch ein synthetisches Peptid, das dem zweiten extrazellulären Loop von Occludin entspricht, die Barrierefunktion der Tight Junctions beeinflusst werden (Wong and Gumbiner, 1997). Andererseits differenzieren Occludin-defiziente embryonale Stammzellen in epitheliale Zellen, die einen normalen Tight Junction-Phänotyp aufweisen und keine Störung der Barrierefunktion zeigen (Saitou *et al.*, 1998). Occludin Knock-Out-Mäuse zeigen zudem keine funktionellen Auffälligkeiten in der Struktur oder Funktion von Tight Junctions (Saitou *et al.*, 2000). Allerdings zeigen diese Mäuse postnatale Wachstumsverzögerung und männliche Sterilität und weisen einen komplexen Phänotyp in verschiedenen Organen auf, wie zum Beispiel chronische Entzündung der Magenschleimhaut, Kalkablagerungen im Gehirn, Verkümmern der Hoden oder Verdünnung der Knochen (Saitou *et al.*, 2000). Dies deutet auf sehr vielschichtige Funktionen von Occludin hin.

1.3.2 Claudine

Occludin-defiziente Zellen bilden Tight Junction-Stränge aus (Saitou *et al.*, 1998). Daher ist Occludin offensichtlich nicht für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der parazellulären Barriere notwendig. Mit Occludin als Sonde wurden zwei weitere integrale Membranproteine mit Sequenzähnlichkeit isoliert (Furuse *et al.*, 1998) und als Claudin-1 und Claudin-2 bezeichnet. Sie sind in den Tight Junctions lokalisiert und zeigen keine Sequenzhomologie zu Occludin (Tsukita *et al.*, 2001). Diese beiden Proteine werden in bestehende Tight Junction-Stränge inkorporiert, wenn sie in Epithelzellen exprimiert werden. Überexpression in L-Fibroblasten führt zur *de novo* Ausbildung von Tight Junction-Strängen (Furuse *et al.*, 1998). Bislang sind 24 Mitglieder der Claudin-Proteinfamilie identifiziert. Sie weisen eine Größe von 18 bis 27 kDa auf und sind in ihrem Aufbau sehr ähnlich, zeigen untereinander auf DNA-Ebene aber wenig Homologie. Claudine haben vier Transmembrandomänen und zwei extrazelluläre Loop-Domänen, sowie kurze N- und C-terminale cytoplasmatische Domänen. Über den C-Terminus binden die Claudine wie Occludin an ZO-1, ZO-2, ZO-3 und MUPP1 (Itoh *et al.*, 1999a; Roh *et al.*, 2002). Diese Domäne wird außerdem für die Translokation der Claudine in die Tight Junctions benötigt (Ruffer and Gerke, 2004).

Der zweite extrazelluläre Loop ist in Trans-Interaktionen zwischen Claudinen benachbarter Tight Junctions involviert. In vorherigen Studien konnten homophile und heterophile cis- und trans-Interaktionen zwischen den Mitgliedern der Claudin-Proteinfamilie identifiziert werden (Krause *et al.*, 2008).

Claudine werden in den meisten Epithelien exprimiert (Chiba *et al.*, 2008; Ruffer and Gerke, 2004) und weisen gewebe- und zelltypspezifische Expressionsmuster auf (Furuse and Tsukita, 2006; Turksen and Troy, 2004; Van Itallie and Anderson, 2006). Zum Beispiel wird Claudin-1 in Epithelien mit fast undurchlässigen Tight Junctions exprimiert, wie im Dickdarm, im distalen Nierentubulus und in der Epidermis. Claudin-2 ist dagegen typisch für Epithelien mit relativ durchlässigen Tight Junctions wie Dünndarm, Leber und proximalem Nierentubulus (Enck *et al.*, 2001; Rahner *et al.*, 2001). Claudin-5 wird vorwiegend in Endothelien exprimiert (Kiuchi-Saishin *et al.*, 2002; Morita *et al.*, 1999; Morita *et al.*, 2002; Morita *et al.*, 2003) und stellt eine Komponente der Blut-Hirn-Schranke sowie der Blut-Hoden-Schranke dar (Kamimura *et al.*, 2002; Nitta *et al.*, 2003).

Claudine stellen die Hauptkomponenten der Tight Junction-Stränge dar. Über geladene Aminosäuren im ersten extrazellulären Loop, die sich je nach Claudin in Position und Ladung unterscheiden, bilden die Claudine in den Tight Junctions wässrige Poren (Kanäle) aus (Colegio *et al.*, 2002). Durch diese wird die parazelluläre Barrierefunktion reguliert und je nach Art der Claudine werden bestimmte Ionen und Moleküle bis zu einer determinierten Größe zwischen benachbarten Zellen hindurch transportiert (Ladungs- und Größenselektivität) (Van Itallie and Anderson, 2006). Die Kombination der Claudine in Zell-

und Gewebetypen trägt zu deren spezifischen Barriereigenschaften bei (Tsukita and Furuse, 2000). So exprimieren MDCK I-Zellen hauptsächlich Claudin-1 und Claudin-4 und bilden dichte Tight Junctions aus. MDCK II-Zellen exprimieren zusätzlich große Mengen an Claudin-2 und bilden durchlässige Zellschichten aus (Stevenson *et al.*, 1988).

1.3.3 Die Tight Junction-assoziierten Proteine JAM, CAR und ESAM

Junctional Adhesion Molecules (JAM) sind glycosylierte integrale Membranproteine mit einer molekularen Masse von etwa 40 kDa, die mit Tight Junctions assoziiert sind und zur Immunglobulin-Superfamilie gehören (Martin-Padura *et al.*, 1998). Es sind drei Mitglieder der JAM-Familie bekannt (Palmeri *et al.*, 2000). Sie besitzen eine Transmembrandomäne, einen kurzen cytoplasmatischen Terminus und eine extrazelluläre Domäne. Letztere beinhaltet zwei Immunglobulin-Domänen und dient der Ausbildung homophiler Dimere (Bazzoni *et al.*, 2000a). Die cytoplasmatische Domäne der JAMs interagiert direkt mit ZO-1 und PAR-3 (Ebnet *et al.*, 2003; Ebnet *et al.*, 2001; Itoh *et al.*, 2001). Exogen exprimiertes JAM kann in L-Fibroblasten keine Tight Junctions ausbilden, ist aber an der Zell-Zell-Adhäsion und dem Aufbau von Tight Junctions in epithelialen und endothelialen Zellen involviert (Liu *et al.*, 2000; Palmeri *et al.*, 2000), sowie an der Extravasation von Monocyten durch endotheliale Zell-Layer beteiligt (Martin-Padura *et al.*, 1998). Die genaue Funktion ist aber im Detail noch nicht geklärt.

Coxsackievirus und Adenovirusrezeptor (CAR) ist ein 46 kDa integrales Membranprotein mit einer Transmembrandomäne, einer langen cytoplasmatischen Domäne und einer extrazellulären Region mit zwei Immunglobulin-ähnlichen Domänen (Bergelson *et al.*, 1997). In Epithelzellen wird CAR an den Tight Junctions exprimiert und assoziiert mit ZO-1 (Cohen *et al.*, 2001). CAR kann über seine Immunglobulin-Domäne Dimere bilden und vermittelt als Zelladhäsionsmolekül homophile Interaktionen mit CAR-Molekülen auf Nachbarzellen (Honda *et al.*, 2000; van Raaij *et al.*, 2000). Weiterhin fungiert dieses Protein als Rezeptor für Adenoviren (Roelvink *et al.*, 1998).

ESAM (endothelial cell-selective adhesion molecule) ist ein weiteres Adhäsionsmolekül, das zur Immunglobulin-Superfamilie gehört. Es wird nur in Endothelien exprimiert (Hirata *et al.*, 2001) und co-lokalisiert mit Claudin-5, Occludin und ZO-1 in Gehirn und Muskelblutkapillaren (Nasdala *et al.*, 2002). ESAM bildet ebenso wie CAR homophile Dimere aus und vermittelt so Zelladhäsion (Hirata *et al.*, 2001).

1.3.4 Tricellulin

Während der epithelial-mesenchymalen Transition reprimiert der Transkriptionsrepressor Snail die Expression von Occludin und Claudinen (Ikenouchi *et al.*, 2003), daher ist es sehr wahrscheinlich, dass bisher unidentifizierte Tight Junction-Proteine ebenfalls durch Snail reprimiert werden könnten. In Microarray Screens wurde unter anderem das Gen für ein bisher unbekanntes Membranprotein identifiziert, das in epithelialen Zellen vorwiegend an Dreizellkontakten lokalisiert (Ikenouchi *et al.*, 2005). Auf Grund dieser Eigenschaft wurde es als Tricellulin bezeichnet. Das Septate Junction-Protein Gliotactin aus *Drosophila* ist das einzige Protein, das eine vergleichbare Lokalisation aufweist (Schulte *et al.*, 2003). Die cDNA von Tricellulin kodiert für ein 555 Aminosäuren langes Polypeptid mit einer molekularen Masse von etwa 63 kDa. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz ergab Ähnlichkeiten zu Occludin. Tricellulin besitzt wie Occludin vier Transmembrandomänen und auf der cytoplasmatischen Seite liegende N- und C-terminale Enden, die sich jedoch hinsichtlich ihrer Länge von Occludin unterscheiden. Innerhalb des C-Terminus findet sich eine Sequenz von etwa 130 Aminosäuren mit der höchsten Homologie zwischen den beiden Proteinen. Neben den strukturellen Übereinstimmungen lässt die Lage der Gene auf eine mögliche evolutionäre Verwandtschaft von Occludin und Tricellulin schließen. Beide Gene liegen benachbart auf dem humanen Chromosom 5.

Neben Tricellulin-a (Tric-a), der längsten Form von Tricellulin, wurden weitere Splice-Varianten des humanen Tricellulins gefunden. Tric-a1, dem das Exon drei fehlt, besitzt eine molekulare Masse von 62 kDa. Beide Isoformen, Tric-a und Tric-a1, weisen am C-Terminus eine Occludin-ELL-Domäne mit einer Ähnlichkeit von 51% zur Sequenz von Occludin auf. Tric-b hat eine Länge von 458 Aminosäuren, wobei bei dieser Splice-Variante die Occludin-ELL-Domäne fehlt. Tric-c weist eine molekulare Masse von 52 kDa auf. Hier wird das Exon zwei alternativ gespleißt, sodass nur zwei Transmembrandomänen gebildet werden (Riazuddin *et al.*, 2006).

Tricellulin wird in epitheliale Gewebe exprimiert (Hoden, Dünndarm, Niere, Lunge, Gehirn) (Ikenouchi *et al.*, 2005) und auch in mehrschichtigen Epithelien konnte Tricellulin detektiert werden (Schlueter *et al.*, 2007). In immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde Tricellulin vorwiegend an trizellulären Zellkontaktpunkten lokalisiert. Schwächere Signale zeigten sich auch an den bizellulären Tight Junctions. Im Gegensatz zu Occludin, das nur in den apikalen Regionen der Tight Junctions lokalisiert ist, weist Tricellulin im Bereich der trizellulären Kontakte eine tiefer in den basolateralen Bereich reichende Lokalisation auf. Die charakteristische Lokalisation von Tricellulin zeigte sich auch in epithelialen Zelllinien wie MTD1A und MDCK II. In Gefrierbruch-Experimenten wurde Tricellulin an der zentralen Pore detektiert.

Die Mechanismen, die zur spezifischen trizellulären Lokalisation von Tricellulin führen, sind bisher nicht bekannt. Überexpression von Tricellulin in L-Fibroblasten, die keine Expression von Occludin und Claudinen aufweisen, zeigte eine gleichmäßige Verteilung des Proteins über die gesamte Membran, wobei die Co-Transfektion mit Claudin-1 zur Anordnung von Tricellulin im Bereich von Zell-Zell-Kontakten führte und Tricellulin mit Claudin-3 und ZO-1 in den Tight Junctions co-lokalisierte (Ikenouchi *et al.*, 2008). Dies sind Hinweise darauf, dass die Anwesenheit weiterer Tight Junction-Proteine für die trizelluläre Lokalisation von Tricellulin notwendig ist.

In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die GST-getaggte C-terminale cytoplasmatische Domäne von Tricellulin *in vitro* an rekombinantes ZO-1 bindet (Riazuddin *et al.*, 2006). Die Bindung an ZO-1 ist aber nicht notwendig für den Einbau von Tricellulin in Claudin-basierte Tight Junctions. Zudem rekrutiert Tricellulin auch kein ZO-1 an die Zell-Zell-Kontakte nach Transfektion in L-Zellen (Ikenouchi *et al.*, 2008). Möglicherweise spielt Occludin bei der Lokalisation von Tricellulin eine Rolle. In Calcium-Switch-Experimenten konnte gezeigt werden, dass Occludin und ZO-1 sich an den bTJ anordnen, wohingegen Tricellulin an den Enden der wachsenden bTJ-Stränge lokalisiert.

Die Expression von Tricellulin an trizellulären Kontaktpunkten in epithelialen Geweben hat Einfluss auf den transepithelialen Widerstand. RNAi-Experimente zeigten, dass die Inhibierung der Tricellulin-Expression die epitheliale Barrierefunktion beeinträchtigt (Ikenouchi *et al.*, 2005).

Starke Überexpression von Tricellulin-a führt zu einer Lokalisation in den trizellulären Tight Junctions und darüber hinaus in den bizellulären Tight Junctions, geringe Überexpression dagegen zeigt Tricellulin-Lokalisation nur an den trizellulären Tight Junctions (Krug *et al.*, 2009). Abhängig von der Lokalisation zeigt Tricellulin verschiedene Eigenschaften. So mindert Tricellulin in bizellulären Tight Junctions die Permeabilität für Ionen und mittlere bis große gelöste Substanzen. In trizellulären Tight Junctions dagegen hat Tricellulin keinen Einfluss auf die Ionenpermeabilität, aber es vermindert die Permeabilität für Makromoleküle von 4 bis 10 kDa. Wahrscheinlich bildet der zentrale Kanal im Bereich von trizellulären Kontakten bei niedriger Tricellulin-Expression einen Durchgang für Makromoleküle.

Posttranslationale Modifikationen von Tricellulin sind in bisherigen Studien nur wenig thematisiert worden. In Lysaten epithelialer Mauszelllinien zeigten sich multiple Tricellulin-Banden im Bereich von 66 bis 72 kDa, nach der Behandlung mit alkalischer Phosphatase ist nur noch die dominante niedrigste Bande detektierbar (Ikenouchi *et al.*, 2005). Dies deutet darauf hin, dass Tricellulin ähnlich wie Occludin phosphoryliert wird (Sakakibara *et al.*, 1997).

Obwohl bisher noch relativ wenig über die Funktion von Tricellulin bekannt ist, wurde bereits eine mit Tricellulin-Mutationen assoziierte Krankheit beschrieben. Mutierte Tricellulin-Allele stehen in Verbindung mit „nonsyndromic deafness“ DFNB49, einem Verlust der Hörfähigkeit, der mit keinen weiteren Symptomen assoziiert ist (Chishti *et al.*, 2008;

Riazuddin *et al.*, 2006). Bedenkt man die ubiquitäre Expression von Tricellulin in epithelalem Gewebe, würde man annehmen, dass eine Tricellulin-Mutation Folgen in allen epithelialen Geweben haben müsste. Im Cortischen Organ im Innenohr befinden sich flüssigkeitsgefüllte Kompartimente mit verschiedener ionischer Zusammensetzung. Für normales Hören ist diese Kompartimentierung essenziell und wird durch besonders dichte Tight Junctions gewährleistet. Möglicherweise können andere Moleküle die Abwesenheit von Tricellulin in anderen epithelialen Geweben kompensieren, aber nicht im Innenohr.

Womöglich hat die beschriebene strukturelle und evolutionäre Verwandtschaft von Occludin und Tricellulin auch funktionelle Auswirkungen. So konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung der Tricellulin-Expression durch RNAi neben der strukturellen Veränderung an trizellulären Tight Junctions zu einer verringerten Occludin-Lokalisation an bizellulären Tight Junctions führt (Ikenouchi *et al.*, 2005). Auch der umgekehrte Versuchsansatz, die Inhibierung der Expression von Occludin durch RNAi lässt eine funktionelle Substitution der beiden Proteine vermuten. In Occludin-defizienten Zellen zeigt sich eine Umverteilung von Tricellulin an die bizellulären Tight Junctions (Ikenouchi *et al.*, 2008). Ausgehend von dieser Beobachtung wird vermutet, dass die verwandten Proteine Tricellulin und Occludin miteinander interagieren, um die Struktur und Funktion von Tight Junctions zu modifizieren.

1.3.5 Cytoplasmatische Tight Junction-Proteine

Mit den Transmembranproteinen der Tight Junctions ist eine Reihe von Proteinen assoziiert, die einen cytoplasmatischen Tight Junction-Komplex ausbilden. Das erste identifizierte assoziierte Protein wurde aus mit Tight Junctions angereicherten Rattenleberextrakten isoliert (Stevenson *et al.*, 1986). Es besitzt eine molekulare Masse von 220 kDa und wurde als ZO-1 (zonula occludens-1) bezeichnet. Dieses periphere Phosphoprotein wird in den Tight Junctions von Epithelien und Endothelien exprimiert. In MDCK-Zellen wurde einige Jahre später ein Protein (ZO-2) mit einer molekularen Masse von 160 kDa identifiziert, das mit ZO-1 interagiert und ebenfalls an den Tight Junctions lokalisiert ist (Gumbiner *et al.*, 1991). Als weiteres ZO-Protein konnte ZO-3 (130 kDa) gefunden werden, das ähnliche Eigenschaften wie ZO-1 und ZO-2 aufweist (Balda *et al.*, 1993). Diese Proteine zeigen untereinander Sequenzhomologien (Haskins *et al.*, 1998; Itoh *et al.*, 1993; Jesaitis and Goodenough, 1994) und beinhalten drei PDZ-Domänen (die Abkürzung PDZ setzt sich aus den jeweils ersten Buchstaben der drei Proteine *post synaptic density* Protein, *Drosophila disc large tumor suppressor* und ZO-1 zusammen). Daneben besitzen die ZO-Proteine eine Src homology 3 (SH3)-Domäne und eine Guanylyl Kinase-ähnliche (GUK) Domäne. Aufgrund letzterer werden sie zur Familie der membrane-associated guanylyl kinase (MAGUK)-Proteine gezählt. Die SH3-Domänen sind nicht-enzymatische Proteindomänen mit einer Länge von 50 bis 70 Aminosäuren, die in der Lage sind, prolinreiche Sequenzen zu binden. Die PDZ-Domäne ist modular aufgebaut und bindet sequenzspezifisch (vier Aminosäuren,

wobei die letzte meistens Valin ist) an kurze Peptide innerhalb anderer Proteine. Viele Mitglieder der Claudin-Proteinfamilie enden mit einem Valin-Rest an ihrem C-Terminus (Furuse *et al.*, 1998; Morita *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die Claudine über diese Domäne an die ZO-Proteine binden (Itoh *et al.*, 1999b). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass auch das Transmembranprotein Occludin über seinen C-Terminus mit ZO-1, ZO-2 und ZO-3 interagiert, allerdings wird diese Bindung über die GUK-Domäne vermittelt (Fanning *et al.*, 1998; Furuse *et al.*, 1994; Haskins *et al.*, 1998; Itoh *et al.*, 1999a). Für den korrekten Transport von ZO-Proteinen an die Tight Junctions ist die Interaktion mit Occludin offenbar nicht notwendig, da diese in Occludin-defizienten Mäusen ebenfalls in den Tight Junctions lokalisiert sind (Itoh *et al.*, 1999b; Saitou *et al.*, 2000). Auch die Sequenz des Junctional Adhesion Moleküls endet mit einem Valin-Rest. In Co-Präzipitationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass JAM direkt mit ZO-1 interagiert (Bazzoni *et al.*, 2000b; Ebnet *et al.*, 2000). Weitere Proteine mit PDZ-Domäne binden an JAM, so zum Beispiel die Calcium/Calmodulin-abhängige Serin Protein Kinase (CASK) (Martinez-Estrada *et al.*, 2001), was zeigt, dass auch über JAM assoziierte Proteine an die Tight Junctions transportiert werden.

Neben ZO-1, ZO-2 und ZO-3 sind verschiedene andere Proteine mit PDZ-Domäne an der cytoplasmatischen Seite der Tight Junctions lokalisiert, wie zum Beispiel die Proteine MAGI-1/-2/-3 (MAGUK inverted -1/-2/-3) (Dobrosotskaya *et al.*, 1997; Ide *et al.*, 1999). Über diese Gerüstproteine sind die Tight Junction-Transmembranproteine mit dem Actomyosin-Cytoskelett verbunden. Verschiedene Arbeiten zeigen, dass die C-Termini von ZO-1 und ZO-2 an Actin-Filamente binden (Fanning *et al.*, 1998; Itoh *et al.*, 1999b; Itoh *et al.*, 1997). Vermutlich spielen diese Interaktionen eine Rolle bei der Regulation der Tight Junction-Funktionen.

An Cadherin-vermittelten adhäsiven Verbindungen sind Komplexe aus Proteinen mit PDZ-Domänen nicht sehr stark ausgebildet, was vermuten lässt, dass der Tight Junction-spezifische cytoplasmatische Proteinkomplex eine zentrale Aufgabe bei intrazellulären Signalweiterleitungsprozessen in epithelialen und endothelialen Zellen inne hat und an der Regulation ihrer Proliferation, Differenzierung und Polarisation beteiligt ist. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Tight Junctions verschiedene weitere Proteine rekrutieren, so zum Beispiel das Tumor Suppressorprotein PTEN, das mit MAGI-3 interagiert (Wu *et al.*, 2000a; Wu *et al.*, 2000b), oder Regulatoren der Zellpolarität wie PAR-3, PAR-6 oder Cdc42 (Joberty *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2000) und Proteine des Vesikeltransports wie Rab3b, Rab13 und Sec6/Sec8 (Grindstaff *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 1994; Zahraoui *et al.*, 1994).

Neben den genannten Proteinen der Tight Junction-Plaques liegen weitere Proteine - wie zum Beispiel Cingulin, AF-6 und MUPP1 - in Assoziation mit Tight Junctions vor.

Cingulin wurde im Jahr 1988 entdeckt und bekam seinen Namen aufgrund seines charakteristisch ringförmigen Immunfluoreszenzmusters in der apikalen Zellregion (Citi *et*

al., 1988). Dieses Phosphoprotein mit einer molekularen Masse von 140-160 kDa wurde in verschiedenen epithelialen und endothelialen Zellen detektiert. Cingulin interagiert mit ZO-1 und anderen intrazellulären Tight Junction-Proteinen. Außerdem bindet es an Myosin und F-Actin (Cordenonsi *et al.*, 1999; D'Atri and Citi, 2001). *In vitro* Untersuchungen zeigten eine Interaktion von Cingulin mit Occludin (Cordenonsi *et al.*, 1999) und JAM (Bazzoni *et al.*, 2000b). Somit sorgt Cingulin für eine Verbindung der Tight Junctions mit dem Cytoskelett, wird aber nicht direkt für die Bildung der Tight Junctions benötigt. Der „ALL-1 fusion partner from chromosome 6“ (AF-6) gehört ebenfalls zu den peripheren Tight Junction-Proteinen. Er bindet an Cingulin sowie über seine PDZ-Domäne an ZO-1 (Cordenonsi *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 1997). Diese Interaktion wird durch aktiviertes Ras inhibiert. MUPP1 (multi-PDZ domain protein 1) besitzt 13 PDZ-Domänen (Simpson *et al.*, 1999; Ullmer *et al.*, 1998) und ist in polarisierten Epithelzellen an den Tight Junctions und nicht an den Adherens Junctions lokalisiert. Das Protein bindet an Claudin-1 und JAM und rekrutiert neben diesen Transmembranproteinen verschiedene cytoplasmatische Proteine, wie zum Beispiel die viralen Onkogene E4-ORF1 (Adenovirus) und 18E6 der Papillomaviren (Lee *et al.*, 2000) an die Tight Junctions.

1.4 Ziele der Arbeit

Tight Junctions sind Zell-Zell-Verbindungen epithelialer und endothelialer Zellen, die für die Aufrechterhaltung der parazellulären Barriere verantwortlich sind. Als molekulares Rückgrat der Tight Junction-Stränge wurden seit 1993 verschiedene Transmembranproteine identifiziert (Occludin, Claudine, JAM und Tricellulin), deren Charakterisierung bis heute ein wichtiger Punkt der Tight Junction-Forschung ist. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, weitere Einblicke in die Funktion und Regulation des kürzlich identifizierten Tight Junction-Proteins Tricellulin zu gewinnen.

Tricellulin wird in epithelalem Gewebe exprimiert und vorwiegend in trizelluläre Tight Junctions (tTJ) eingebaut (Ikenouchi *et al.*, 2005). Bisher ist der Mechanismus der trizellulären Lokalisation dieses integralen Membranproteins allerdings nicht bekannt. Daher war ein Aspekt dieser Arbeit herauszufinden, welche Domänen von Tricellulin für die typische trizelluläre Lokalisation verantwortlich sind. Ein weiteres Ziel war aufzuklären, ob diesbezüglich mutierte Tricellulin-Proteine einen Einfluss auf die Barrierefunktion und die Ionen-Permeabilität eines Epithels haben. Dies könnte neue Erkenntnisse bezüglich der physiologischen Bedeutung von Tricellulin ergeben.

Betrachtet man das Tricellulin-Protein mit seiner in basale Richtung erweiterten Lokalisation an trizellulären Kontakten, dann lässt dies vermuten, dass Tricellulin in diesen Bereichen homophile Interaktionen eingeht. In der Literatur ist beschrieben, dass Occludin ebenso wie verschiedene Claudine Dimere ausbildet. Es wird vermutet, dass dieses Verhalten für die Funktion aller Tight Junction-Proteine notwendig ist (Blasig *et al.*, 2006; Tsukita *et al.*, 2001).

Aus diesem Grund war es von großem Interesse herauszufinden, ob Tricellulin ebenfalls in der Lage ist, homophile Proteinkomplexe auszubilden. Wenn dies der Fall ist, sollte untersucht werden, welche Domänen von Tricellulin für diese homophile Bindung wichtig sind.

Frühere Studien zeigen, dass der Knock-Down von Tricellulin die Organisation der Tight Junctions und auch die Lokalisation von Occludin beeinflusst und dass das Fehlen von Occludin die trizelluläre Lokalisation von Tricellulin beeinträchtigt (Ikenouchi *et al.*, 2005; Ikenouchi *et al.*, 2008). Im Zusammenhang mit der beschriebenen Homologie dieser beiden Tight Junction-Proteine steht zu vermuten, dass Tricellulin neben der Ausbildung homophiler Komplexe auch in der Lage sein könnte, heteromere Komplexe mit Occludin auszubilden. Ziel war es daher festzustellen, ob entsprechende Komplexe nachweisbar sind, und, falls dies der Fall ist, in einem nächsten Schritt zu untersuchen, welche Domänen beider Proteine an einer Interaktion beteiligt sind.

Die Phosphorylierung von Tight Junction-Proteinen spielt eine große Rolle beim Aufbau und bei der Funktion von Tight Junctions. Die Tight Junction-Komponenten werden durch verschiedene Serin/Threonin- und Tyrosin-Kinasen unter verschiedenen Bedingungen phosphoryliert. Dadurch wird die Stabilität von Tight Junctions beeinflusst. Somit werden im Endeffekt die Barrierefunktion und Permeabilitätseigenschaften eines Epithels verändert (Feldman *et al.*, 2005; Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2008). Deregulierte Phosphorylierung von Tight Junction-Komponenten könnte bei verschiedenen Krankheiten wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Nieren- und Lungenerkrankungen und Karzinogenese eine Rolle spielen (Mullin, 2004; Mullin *et al.*, 2005). Es gibt Hinweise, dass Occludin das Substrat verschiedener Kinasen wie Protein Kinase C (PKC), Protein Kinase A (PKA), MAP Kinasen oder Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) ist (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2008). Die Phosphorylierung von Tricellulin wurde bisher noch nicht im Detail untersucht, aber es wird vermutet, dass dieses Protein ebenfalls phosphoryliert wird (Ikenouchi *et al.*, 2005). Daher war es interessant zu untersuchen, ob und durch welche Kinasen Tricellulin phosphoryliert werden kann.

In diesem Zusammenhang wurde für Occludin gezeigt, dass es durch die Bindung der E3 Ubiquitin-Protein Ligase Itch an die N-terminale cytoplasmatische Domäne ubiquitiniert wird (Murakami *et al.*, 2009; Traweger *et al.*, 2002). Andere Studien zeigen, dass verschiedene Claudine ubiquitiniert und endocytiert werden (Matsuda *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2009). Dies legt nahe, dass auch Tricellulin möglicherweise durch Ubiquitin posttranslational modifiziert wird. In diesem Zusammenhang sollte daher untersucht werden, welche Bedeutung die Ubiquitinierung für die Stabilität und die Endocytose bzw. das Recycling von Tricellulin hat.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

2.1.1.1 Elektrophorese und Western-Blot

Elektrophorese-Apparatur Dual Vertical Mini Gel	(C.B.S. Scientific Company, Inc, Del Mar, CA., USA)
Netzgerät Power Pac 300	(Bio-Rad, München, DE)
Netzgerät Standard Power Pack P25	(Biometra, Göttingen, DE)
PerfectBlue Semi-Dry Elektroblotter	(Peqlab, Erlangen, DE)

2.1.1.2 Bakterien- und Zellkultur

Begasungs-Brutschrank Function Line	(Heraeus-Christ, Hanau, DE)
Brutschrank Function Line	(Heraeus-Christ, Hanau, DE)
Dr. Lange Universal-Thermostat Wasserbad	(Lange, Berlin, DE)
Incubator Shaker C25KC	(New Brunswick Scientific Edison, SJ, USA)
Lichtmikroskop Axiovert 25	(Zeiss, Oberkochen, DE)
Nicool LM10 (Gefriergerät für Zellen)	(Air Liquide, Düsseldorf, DE)
Sterile Werkbank Hera Safe HS12	(Heraeus-Christ, Hanau, DE)
Stickstofftank zur Lagerung von Zellen	(Taylor-Wharton, Hollywood, USA)
Varioklav® Dampfsterilisator	(H+P Labortechnik, Oberschleißheim, DE)
Warmluft-Rundschüttler HT	(Infors AG, Bottmingen, CH)

2.1.1.3 Zentrifugen

Centrifuge 5417C	(Eppendorf, Hamburg, DE)
Centrifuge 5417R, gekühlt	(Eppendorf, Hamburg, DE)
Kühlzentrifuge Sorvall Evolution RC Superspeed mit GSA- und SS34-Rotoren	(Thermo Scientific, Weltham, MA, USA)
Vakuumzentrifuge Centrivac	(Heraeus-Christ, Hanau, DE)
Zellzentrifuge Megafuge 2.0R, gekühlt	(Heraeus-Christ, Hanau, DE)

2.1.1.4 Sonstige Geräte

2720 Thermal Cycler	(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
ABI Prism™ Genetic Analyzer 310	(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
Branson Sonifier Ultraschall	(Ultraschall & Labortechnik, Schwäbisch Gmünd, DE)
Dr. Lange Universal-Thermostat Wasserbad	(Lange, Berlin, DE)
Film-Entwicklereinheit Optimax TR	(MS Laborgeräte, Heidelberg, DE)
FLA-3000	(Fuji Film, Düsseldorf, DE)
Geltrockner Model 583	(Bio-Rad, München, DE)
Heizblock QBT	(Grant Instruments, Cambridge, UK)
Konvokales Mikroskop LSM510	(Zeiss, Oberkochen, DE)
Mikroskop Axioplan	(Zeiss, Oberkochen, DE)
MS 1 Minishaker	(IKA-Labortechnik, Staufen, DE)
MultiCal® pH526 pH-Meter	(WTW, Weilheim, DE)
Multiplate Reader SpectraMax 340 _{PC}	(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)
Nanodrop ND-1000	(PeqLab, Erlangen, DE)
Semi-Dry Transfer Cell Trans Blot SD	(Bio-Rad, München, DE)
UV-Spektrophotometer DU640	(Beckman Instruments GmbH, München, DE)
Wasserbad Multi Temp III	(Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, DE)

2.1.2 Chemikalien

2-Mercaptoethanesulfonic acid (MESNA)	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE)
2-Mercaptoethanol	(Roth, Karlsruhe, DE)
Acrylamid, Rotiphorese® GEL 30, 30 % (w/v) Acrylamid/0,8 % (w/v) Bisacrylamid	(Roth, Karlsruhe, DE)
Adenosin-5'-triphosphat; ATP	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE)
Agar	(Merck, Darmstadt, DE)
Agarose, ultra pure	(Invitrogen, Karlsruhe, DE)
Ammoniumpersulfat; APS	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE)
Ampicillin, Natriumsalz	(Roth, Karlsruhe, DE)
Bacto-Agar	(Difco, Detroit, USA)
Bacto-Tryptone	(Difco, Detroit, USA)
Bromphenolblau	(Merck, Darmstadt, DE)

BSA Fraktion V	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE)
Chloroform	(Roth, Karlsruhe, DE)
Collagen A	(Biochrom AG, Berlin, DE)
Complete™-EDTA free	(Roche Applied Science, Mannheim, DE)
Complete™ -EDTA	(Roche Applied Science, Mannheim, DE)
DAPI	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE)
Desoxycholsäure Natriumsalz	(Roth, Karlsruhe, DE)
dNTP's PCR-Grade	(Roche Applied Science, Mannheim, DE)
EDTA	(Merck, Darmstadt, DE)
Hyperfilm ECL	(Amersham Biosciences, Freiburg, DE)
Ethanol	(J.T.Baker, Griesheim, DE)
Ethidiumbromid	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE)
Glutathion Agarose	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE)
Glycerin	(Roth, Karlsruhe, DE)
Glycin	(Roth, Karlsruhe, DE)
Goat Serum	(PAA Laboratories GmbH, Cölbe, DE)
Harnstoff	(Roth, Karlsruhe, DE)
Hi-Di™ Formamide	(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
Iodacetamide	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE)
Isopropylthiogalactosid; IPTG	(AppliChem, Darmstadt, DE)
Kaliumacetat	(Riedel-de Haen®, Seelze, DE)
Kanamycindisulfat	(Merck, Darmstadt, DE)
MG132	(Calbiochem, San Diego, USA)
NaOH	(Roth, Karlsruhe, DE)
Natriumacetat	(Merck, Darmstadt, DE)
Natriumchlorid	(Roth, Karlsruhe, DE)
NeutrAvidin beads	(Pierce, Rockford, IL., USA)
Nickel-NTA-Agarose	(Qiagen, Hilden, DE)
NP-40	(Roche Applied Science, Mannheim, DE)
Paraformaldehyd	(Merck, Darmstadt, DE)
Phenol	(AppliChem, Darmstadt, DE)
Polyethylenimine	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE)
Poly-L-Lysin	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE)
ProTaq Mount Fluor	(Biocyc GmbH&Co.KG, Luckenwalde, DE)
Protein-A-Sepharose™ CL-4B	(Amersham Biosciences, Freiburg, DE)
Serva Blue R tablets	(Serva Electrophoresis, Heidelberg, DE)
Sodiumdodecylsulfat; SDS	(Merck, Darmstadt, DE)

Sulfo-NHS-SS-Biotin	(Pierce, Rockford, IL., USA)
TEMED	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE)
Tris-Base	(Merck, Darmstadt, DE)
Triton X-100	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE)
Tween 20	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE)
Xylencyanol FF	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE)

Alle weiteren nicht aufgeführten Laborchemikalien wurden in p. A. Qualität von den Herstellern Merck (Darmstadt, DE), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, DE) oder Roth (Karlsruhe, DE) bezogen.

2.1.3 Radionuklide

γ -[³² P]-ATP (spez. Aktivität > 5.000 Ci/mmol)	(Hartmann Analytic, Braunschweig, DE)
--	---------------------------------------

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units	(Milipore, Eschborn, DE)
Deckgläschen	(Menzel-Gläser, Braunschweig, DE)
Dialyseschläuche,	
ViskinAusschlussgröße 10 kDa	(Roth, Karlsruhe, DE)
Filterpapier Whatman® 3MM	(Biometra, Göttingen, DE)
Multiwell™-Zellkulturplatten, 6-well	Falcon/Becton-Dickinson, Heidelberg, DE)
Objektträger	(R.Langenbrinck, Emmendingen. DE)
PolyScreen®, PVDF (Polyvinylidenfluorid)	
Transfer Membrane	(Perkin Elmer, Weiterstadt, DE)
Röntgenfilm, Biomax MR	(Kodak, Stuttgart, DE)
Sterilfilter Minisart®, Porengröße 0,2 µM	(Sartorius, Göttingen, DE)

Alle sterilen Einwegmaterialien wie Pipetten, Reaktionsgefäße und Schraubdeckel-Röhrchen, Schalen für die Bakterien- und Zellkultur, wurden von Falcon/Becton-Dickinson (Heidelberg, DE), Nunc (Wiesbaden, DE), Sarstedt (Nürnberg, DE) oder Greiner Labortechnik (Frickhausen, DE) bezogen.

2.1.5 Materialien für die Zellkultur

DMEM High Glucose	(PAA Laboratories GmbH, Cölbe, DE)
DMSO	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE)

FKS	(Biochrom KG Seromed®, Berlin, DE)
G 418 Sulfat, Geneticin	(Biochrom KG Seromed®, Berlin, DE)
Minimal Essential Medium Eagle (MEM)	(PAA Laboratories GmbH, Cölbe, DE)
PBS Dulbecco's (0,9 mM Ca ²⁺ , 0,5 mM Mg ²⁺)	(PAA Laboratories GmbH, Cölbe, DE)
PBS Dulbecco's w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺	(PAA Laboratories GmbH, Cölbe, DE)
Penicillin/Streptomycin 100×	(Invitrogen, Karlsruhe, DE)
S-MEM	(GIBCO BRL/Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA)
Trypsin-EDTA; 0,25 %	(Invitrogen, Karlsruhe, DE)

2.1.6 Enzyme

Benzonase	(Merck, Darmstadt, DE)
cAMP-dependent Protein Kinase (PKA), 500.000 U/ml	(New England Biolabs, Frankfurt, DE)
Casein Kinase 1, rekombinant, 1.000.000 U/ml	(New England Biolabs, Frankfurt, DE)
Casein Kinase 2, rekombinant, 500.000 U/ml	(New England Biolabs, Frankfurt, DE)
Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3β), 50.000 U/ml	(New England Biolabs, Frankfurt, DE)
Polynukleotid Kinase; PNK	(Epicentre, Madison, WC, USA)
Pwo-DNA-Polymerase	(Roche Applied Science, Mannheim, DE)
Quick T4-DNA-Ligase	(New England BioLabs, Frankfurt, DE)
Restriktionsenzyme	(New England Biolabs, Frankfurt, DE bzw. Roche Applied Science, Mannheim, DE)
RNase A	(Macherey-Nagel, Düren, DE)
Shrimp alkaline phosphatase	(Roche Applied Science, Mannheim, DE)

2.1.7 Reaktions-Kits

ABI PRISM™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing V.1.1 Reaction Kit	(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
BCA-Protein Assay Reagent Kit	(Pierce, Weiskirchen, DE)
FuGENE® HD Transfection Reagent	(Roche Applied Science, Mannheim, DE)
Montage™ PCR Filtereinheiten	(Millipore, Billerica, MA, USA)
Nucleo-Seq	(Macherey-Nagel, Düren, DE)
Plasmid DNA Purification Kit	(Macherey-Nagel, Düren, DE)
Pwo-Master	(Roche Applied Science, Mannheim, DE)

Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymed, München, DE)

2.1.8 Molekulargewichtstandards für Proteine und DNA

1 kb Ladder	(Invitrogen, Karlsruhe, DE)
100 bp Ladder	(Invitrogen, Karlsruhe, DE)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	(Fermentas, St.-Leon-Rot, DE)
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	(Fermentas, St.-Leon-Rot, DE)

2.1.9 Puffer und Lösungen

50× TAE-Puffer	5 mM EDTA, 2 M Tris, mit Eisessig auf pH 8.0 einstellen
20× SSC	3 M NaCl, 300 mM Natriumcitrat, pH 7,0
2× HBS	55 mM HEPES/NaOH, pH 7,03, 274 mM NaCl, 1,5 mM Na ₂ HPO ₄
2× SDS-Probenpuffer	65 mM Tris/HCl, pH 6,8, 3 % (w/v) SDS, 30 % (v/v) Glycin, 5 % (w/v) 2-Mercaptoethanol, 4 mg/ml Bromphenolblau 4 mg/ml Pyronin G
6× DNA-Ladepuffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, ca. 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF, 30 % (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA
Dialysepuffer	20 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, pH 8,0
Elutionspuffer (GST-Proteine)	40 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 20 mM Glutathion, pH 8,0
Elutionspuffer (MBP-TEV-Proteine)	40 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 20 mM Maltose, pH 8,0
Elutionspuffer denat.	100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris/HCl, 8 M Harnstoff, pH 4,5
Entfärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure (96 %), 40 % (v/v) Ethanol
Färbelösung	30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Ethanol, 0,1 % (w/v) Serva Blue R-Tablets
Lysepuffer denat.	100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris/HCl, 8 M Harnstoff, pH 8,0
Lysis/Wasch-Puffer (GST-Proteine)	40 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0
PBS	150 mM NaCl, 8,38 mM NaH ₂ PO ₄ , 1,67 mM KH ₂ HPO ₄
Minipräp	
Puffer P1	50 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 µg/ml RNase A,

	10 mM EDTA
Puffer P2	200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS
Puffer P3	3 M Kaliumacetat pH 5,5
RIPA-Puffer	25 mM Tris pH 6,8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % (w/v) Desoxycholsäure Natriumsalz, 1 % (v/v) NP40, 0,1 % (w/v) SDS; Complete + EDTA protease inhibitor mixture
SDS-Laufpuffer	24,8 mM Tris, 192 mM Glycerin, 0,01 % (w/v) SDS
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
TST-Puffer	150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 0,1 % (v/v) Tween 20
Waschpuffer denat.	100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris/HCl, 8 M Harnstoff, pH 6,3
Western-Blot	
Anodenpuffer I	300 mM Tris/HCl, pH 9,4
Anodenpuffer II	30 mM Tris/HCl, pH 9,4
Kathodenpuffer	25 mM Tris/HCl, pH 9,6, 40 mM Aminocaprinsäure, 0,1 % (w/v) SDS

2.1.10 Medien

Expressionsmedium	LB-Medium, 1 % (w/v) Glucose, 50 µg/ml Ampicillin bzw. 25 µg/µl Kanamycin
Gefriermedium	70 % MEM, 20 % (v/v) FKS, 10 % (v/v) DMSO
LB-Amp/Kana-Agar	1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium, 50 µg/ml Ampicillin, 25 µg/µl Kanamycin
LB-Amp-Agar	1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium, 50 µg/ml Ampicillin
LB-Medium	1 % (w/v) Bacto-Trypton, 5 % (w/v) Bacto-Yeast Extract, 86 mM NaCl
Medium für HEK293-Zellen	DMEM (High Glucose), 10 % (v/v) FKS (hitzeinaktiviert), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Medium für Ca ²⁺ -Switch	S-MEM, 10 % (v/v) FKS (hitzeinaktiviert, gegen PBS dialysiert), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Medium für MDCK C11-Zellen	MEM, 10 % (v/v) FKS (hitzeinaktiviert), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

2.1.11 Eukaryontische Zelllinien

Tab. 1: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten eukaryontischen Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
MDCK II	niederohmige Hunde-Nierenzelllinie (adhärent, epithelial)
MDCK C11	niederohmige Hunde-Nierenzelllinie (adhärent, epithelial)
MDCK C7	niederohmige Hunde-Nierenzelllinie (adhärent, epithelial)
HT29/B6-Zellen	humane Kolonkarzinomzelllinie (adhärent, epithelial)
NRC-Zellen	normale Rattencholangiocyten (Gallenwegsepithelzellen)
H184a1-Zellen	humane Brustzelllinie (adhärent, epithelial)
HEK293-Zellen	humane, embryonale Nierenzelllinie (adhärent, epithelial)

2.1.12 Bakterienstämme

Tab. 2: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp
<i>E. coli</i> XL1blue	supE44, hsdR17, recA1, end A1, gyrA96, thi, relA1, lacF ⁺ [proAB ⁺ , lacq, lacZΔM15, Tn10(tetr)]
<i>E. coli</i> BL21 (RE4)	<i>E. coli</i> BL21 (B F ⁻ dcm ompT hsdS(rB ⁻ mB ⁻) gal) mit pREP4 transfiziert

2.1.13 Antikörper

2.1.13.1 Primär-Antikörper

Tab. 3: Auflistung der für Western Blots (WB) und für die Immunfluoreszenzmikroskopie (IF) verwendeten Primär-Antikörper und ihrer eingesetzten Konzentrationen bzw. Verdünnungen

Antikörper	Antigen	Typ	WB	IF	Referenz
anti-FLAG-M2	FLAG-Tag	Maus, monoklonal	0,25 µg/ml	0,5 µg/ml	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, DE)
anti-GST	GST-Tag	Kaninchen monoklonal	0,5 µg/ml		J. Wienands (Universität Bielefeld, DE)
anti-myc (Klon: 9E10)	MYC-Tag	Maus, monoklonal	1,3 µg/ml	3 µg/ml	gereinigt aus Hybridoma, Zellkultur- ÜS (L. Kosel)
anti-Occludin	Occludin (C-Terminus)	Kaninchen polyklonal	1 µg/ml	3 µg/ml	Zymed Laboratories (San Francisco, USA)
anti-β-Actin	β-Actin	Maus, monoklonal	1 µg/ml		Sigma-Aldrich (Taufkirchen, DE)
anti-Tricellulin (Serum)	Tricellulin (C-Terminus)	Meerschweinchen, polyklonal	1:500		diese Arbeit
anti-Tricellulin (Serum)	Tricellulin (C-Terminus)	Kaninchen, polyklonal	1:5.000		diese Arbeit
anti-ZO-1	ZO-1	Kaninchen, polyklonal	0,25 µg/ml	0,5 µg/ml	Zytomed (Berlin, DE)
HA-Tag (6E2)	HA-Tag	Maus, monoklonal	1:1.000	1:100	Cell signaling (Danvers, MA, USA)

2.1.13.2 Sekundär-Antikörper

Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRPO)-konjugierte Antikörper
(Dianova, Hamburg, DE):

Anti-Maus IgG aus der Ziege, affinitätsgereinigtes F(ab')₂ Fragment (Verdünnung 1:10.000)

Anti-Kaninchen IgG (H+L) aus der Ziege, affinitätsgereinigtes F(ab')₂ Fragment
(Verdünnung 1:10.000)

Anti-Meerschweinchen IgG aus der Ziege (Verdünnung 1:10.000)

Fluorophor-konjugierte Antikörper für die Immunfluoreszenzmikroskopie (Invitrogen,
Karlsruhe, DE):

Alexa Fluor™ 488 Ziege Anti-Maus IgG (Verdünnung 1:1.000)

Alexa Fluor™ 594 Ziege Anti-Kaninchen IgG (Verdünnung 1:1.000)

2.1.14 Expressionsvektoren

Tab. 4: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Expressionsvektoren und ihre Charakteristika

Vektor	Charakteristika
pcDNA3 (Invitrogen, Karlsruhe, DE)	eukaryontischer Expressionsvektor, CMV-Promotor, Ampicillin und Neomycin-Resistenzen
pcDNA3-HA-Ubiquitin (freundlicherweise von Professor Ivan Dikic, Goethe Universität, Frankfurt am Main, DE zur Verfügung gestellt)	eukaryontischer Expressionsvektor, kodiert für N-terminal HA-getaggtes Ubiquitin
p3xFLAG-CMV10 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE)	eukaryontischer Expressionsvektor, kodiert für ein N-terminales 3×FLAG-Tag
p3xFLAG-CMV14 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE)	eukaryontischer Expressionsvektor, kodiert für ein C-terminales 3×FLAG-Tag
pcDNA6V5His-B (Invitrogen, Karlsruhe, DE)	eukaryontischer Expressionsvektor, CMV Promotor, kodiert für eine Blastocidin-Resistenz
pCS2+-myc ₆ (freundlicherweise von Dr. Ralph Rupp, Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen, DE zur Verfügung gestellt)	eukaryontischer Expressionsvektor, CMV-Promotor
pMal-p2s-TEV	pMal-p2s prokaryontischer Expressionsvektor zur rekombinanten Herstellung Maltosebindeprotein (MBP)-getaggtter Fusionsproteine, enthält eine TEV-Protease Schnittstelle (New England Biolabs, Frankfurt)
pGEX-4T1 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, DE)	prokaryontischer Expressionsvektor zur rekombinanten Herstellung von Glutathion-S-Transferase (GST)Fusionsproteinen
pQE30 (Qiagen, Hilden, DE)	prokaryontischen Expressionsvektor zur rekombinanten Herstellung His ₆ -getaggtter Fusionsproteine
pFLAG-CMV4 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE)	eukaryontischer Expressionsvektor, kodiert für ein N-terminales FLAG-Tag
pFLAG-CMV4-Tricellulin (kloniert von Luise Kosel)	eukaryontischer Expressionsvektor, kodiert für FLAG-Tricellulin
pFLAG-CMV4-ΔNTricellulin (kloniert von Luise Kosel)	eukaryontischer Expressionsvektor, kodiert für FLAG-ΔNTricellulin
pFLAG-CMV4-TricellulinΔC (kloniert von Luise Kosel)	eukaryontischer Expressionsvektor, kodiert für FLAG-TricellulinΔC

Vektor	Charakteristika
pcDNA3-NCFP, pcDNA3-CCFP pcDNA3-NYFP, pcDNA3-CYFP (freundlicherweise von Prof. Michael Schäfer Charité – Universitätsmedizin Berlin, DE zur Verfügung gestellt)	CFP/YFP-Tag (N- bzw C-terminal)

2.1.15 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion GmbH (Martinsried, DE) synthetisiert.

Tab. 5: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Name	Bezeichnung	Orientierung	Schnittstelle	Sequenz
ON591	hTricellulin	for		5'-CTG GGT CTT GGC ATG TCC ATG-3'
ON592	hTricellulin	rev		5'-CAT GGA CAT GCC AAG AAC CAG-3'
ON625	hTricellulin	for	<i>Asp718</i> <i>BamHI</i>	5'-GCG GGT ACC GGA TCC GCC GCC ATG TCA AAT GAT GGA AGA TCC-3'
ON626	hTricellulin (-stop)	rev	<i>Asp718</i> <i>BamHI</i>	5'-GCG GGT ACC GGA TCC AGA ATA ACC TTG TAC ATC CC-3'
ON627	hTricellulin (+stop)	rev	<i>Asp718/BamHI</i>	5'-GCG GGT ACC GGA TCC TTA AGA ATA ACC TTG TAC ATC-3'
ON628	hTricellulin (+stop)	rev	<i>BamHI</i>	5'-GCG GGA TCC CTA TGC CCA CGA CTT CAT GTA G-3'
ON630	hTricellulin (Δ N)	for	<i>BamHI</i>	5'-GCG GGT ACC GGA TCC GCC GCC ATG GTG GAG GAG TAT AAC CTG AG-3'
ON662	hTricellulin (Δ C +stop)	rev	<i>BamHI</i>	5'-GCG GGA TCC TTA AGC TGC CTC ATG CCT CCA-3'
ON663	hTricellulin (Δ C -stop)	rev	<i>BamHI</i>	5'-GCG GGA TCC AGC TGC CTC ATG CCT CCA-3'
ON786	HA-Tag	for	<i>NheI</i>	5'-CTA GCC ACC ATG ACC AGC TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT A-3'
ON787	HA-Tag	rev	<i>NheI</i>	5'AGC TTA GCG TAA TCT GGA ACA TCG TAT GGG TAG CTG GTC ATG GTG G-3'
ON843	hTricellulin (f.l.)	for	<i>HindIII</i>	5'-GGA TCC AAG CTT GCC GCC ATG TCA AAT GAT GGA AGA TCC-3'

Name	Bezeichnung	Orientierung	Schnittstelle	Sequenz
ON844	hTricellulin (f.l.)	rev	<i>XhoI</i>	5'-CGA TCG CTC GAG CCC CCG CCT CCG CCA GAA TAA CCT TGT ACA TCC C-3'
ON845	hTricellulin (f.l.)	for	<i>HindIII</i>	5'-GTA CAA AAG CTT GGG CGG AGG CGG GGG CAT GTC AAA TGA TGG AAG ATC C-3'
ON846	hTricellulin (f.l.)	rev	<i>XhoI</i>	5'-GGA TCC CTC GAG TTA AGA ATA ACC TTG TAC ATC-3'
T7		for		5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
SP6		rev		5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG-3'
FLAG for		for		5'-ACG GTG GGA GGT CTA TAT AAG-3'
FLAG rev		rev		5'-TGC GGA GGT GTC ACA GGG ATG-3'

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Die PCR ist eine Methode, um DNA-Fragmente zu amplifizieren (Saiki *et al.*, 1985).

In dieser Arbeit wurden die PCR-Reaktionen entweder mit dem Pwo-Master-Kit oder mit Hilfe der thermostabilen Pwo-DNA-Polymerase mit Proof-reading-Eigenschaft unter folgenden Bedingungen durchgeführt.

PCR-Ansätze:

Pwo-Master-Kit

1 µl Template DNA (10 ng)

2 µl Primer 1 (100 pmol/µl)

2 µl Primer 2 (100 pmol/µl)

20 µl H₂O

25 µl pwo-Master

Pwo-DNA-Polymerase

1 µl Template (50 ng)

2 µl Primer 1 (100 pmol/µl)

2 µl Primer 2 (100 pmol/µl)

5 µl dNTPs (10 mM)

0,5 µl Pwo-DNA-Polymerase

34,5 µl H₂O

PCR Bedingungen:

4 min	95 °C	
10 sec	95 °C	}—35x
30 sec	50-60 °C	
60 sec	72 °C	
2 min	72 °C	
∞	15 °C	

2.2.1.2 Aufreinigung von PCR Produkten

Die in der PCR-Reaktion generierten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des Montage™ PCR-Kits (Millipore) aufgereinigt. Dies diente dem Entfernen von Primern, nicht-inkorporierten Nukleotiden und Salzen und der Aufkonzentrierung des PCR-Produkts.

2.2.1.3 Annealen und Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Für die Ligation in einen Vektor benötigen synthetisierte Oligonukleotide eine 5'-Phosphatgruppe. Die Oligonukleotide wurden zunächst in folgendem Ansatz denaturiert (95 °C, 4 min) und anschließend 10 min bei 70 °C inkubiert, damit sie sich aneinander lagern.

Annealing-Ansatz:

2 µl Oligonukleotid 1 (100 pmol/µl)

2 µl Oligonukleotid 2 (100 pmol/µl)

1 µl 20× SSC

15 µl H₂O

Im auf Raumtemperatur abgekühlten Ansatz wurden die Phosphatgruppen durch das Enzym Polynukleotid Kinase an die nun doppelsträngigen Oligonukleotide angefügt.

PNK-Ansatz:

2 µl annealte Oligonukleotide

1 µl 10× T4-PNK-Puffer

1 µl 10 mM ATP

5,5 µl H₂O

0,4 µl PNK

Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C wurde das Enzym bei 70 °C für 10 min inaktiviert.

2.2.1.4 Restriktionsanalyse

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen vom Typ II lassen sich DNA-Doppelstränge an definierten Sequenzen (Palindrome aus 4, 6 oder 8 Basen) endonukleolytisch spalten. Die Restriktionsanalyse dient sowohl der Herstellung von DNA-Fragmenten für Klonierungen als auch der Identifizierung der entstandenen Klonierungsprodukte.

Für einen Verdauansatz wurden 0,2–1 µg DNA eingesetzt, zusätzlich 1/10 Volumen des vom Hersteller empfohlenen 10× Enzympuffers sowie 1–10 Units Restriktionsenzym/µg DNA. Der Verdauansatz wurde mit bidest. H₂O auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 6× DNA-Ladepuffer (2.1.9) gemischt und auf einem 0,8–1,5 %igen Agarosegel (je nach Größe der Restriktionsfragmente) elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.1.6).

2.2.1.5 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Für die Präparation eines Vektorfragments für eine Ligation wurde dieses zusätzlich dephosphoryliert. Dazu wurde 1 µl (10 U) der „shrimp alkaline phosphatase“ (SAP) verwendet.

Dieses Enzym entfernt die Phosphatreste an den 5'-Enden der DNA-Fragmente, sodass eine Religation des Vektors unterdrückt wird.

SAP-Ansatz:

- 6 μl H₂O
- 1 μl 10 \times SAP-Puffer
- 2 μl DNA (1 μg)
- 1 μl SAP

Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und das Enzym anschließend für 15 min bei 65 °C inaktiviert. Die verdauten DNA-Fragmente wurden dann elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.1.6) und aufgereinigt (2.2.1.7).

2.2.1.6 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Bei der Agarosegel-Elektrophorese handelt es sich um eine Methode zur Analyse von Nukleinsäuren. Aufgrund ihrer negativen Ladung lassen sich Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld innerhalb eines festen Trägermaterials nach ihrer Größe auftrennen. Je nach Größe der DNA-Fragmente werden 0,8 – 1,5 %ige horizontale Agarosegele verwendet.

Zum Gießen eines Agarosegels wurde die Agarose entsprechend der Gelkonzentration abgewogen und in der Mikrowelle in 1 \times TAE-Puffer (Volumen entsprechend der Gelgröße und -konzentration) gelöst. Ethidiumbromid ist ein in die DNA interkalierender Farbstoff. Durch Zugabe von Ethidiumbromid (1 μl /50 ml) in die Agarose-Lösung lässt sich die DNA bei einer Wellenlänge von $\lambda = 312$ nm sichtbar machen. Die Agaroselösung wurde dann in eine Gelkammer gegossen und auf der Seite der Kathode ein Kamm zur Formung von Taschen eingesetzt. Nach dem vollständigen Aushärten des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel mit 1 \times TAE-Puffer überschichtet, sodass es knapp mit dem Puffer bedeckt war. In die Taschen wurden die aufzutrennenden Proben (gemischt mit 6 \times DNA-Ladepuffer) pipettiert und eine Spannung von 80 V angelegt, anschließend wurden die DNA-Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten oder das Gel wurde unter UV-Licht fotografiert. Eine gleichzeitig aufgetragene 100 bp- bzw. 1 kb-Basenleiter diente als Größenstandard.

2.2.1.7 Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Die zu eluierende DNA wurde zunächst in einem Agarosegel aufgetrennt (2.2.1.6) und die entsprechende Bande unter langwelligem UV-Licht (366 nm) mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Mit Hilfe des Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kits wurde die DNA aus dem Gelstück aufgereinigt. Dabei wurde die Agarose aufgelöst und die freigesetzte DNA über eine reversible Bindung an einer Silica-Matrix gereinigt. Die Durchführung verlief entsprechend den Angaben des Herstellers.

2.2.1.8 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

Die Phenol-Chloroform-Extraktion wird angewendet, um DNA von unerwünschten Verunreinigungen wie zum Beispiel Proteinen zu reinigen.

Zur Durchführung wurde ein Mindestvolumen von 100 µl der DNA/Protein-Lösung benötigt (evtl. mit H₂O auffüllen), dazu wurde das gleiche Volumen an Phenol gegeben und ~30 sec gevortext. Das Gemisch wurde 2 min bei 20.800 × g zentrifugiert (Centrifuge 5417C) und die Oberphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, dazu wurden 100 µl Chloroform gegeben, 30 sec gevortext und wieder zentrifugiert (s.o.). Die DNA-enthaltende Oberphase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und eine Ethanol-fällung (2.2.1.9) durchgeführt.

2.2.1.9 Ethanol-fällung von DNA

Diese Methode wird zur Reinigung der DNA von Salzen und/oder zum Konzentrieren von DNA durchgeführt.

Die DNA-Lösung wurde mit dem 2,5fachen Volumen an absolutem Ethanol in Gegenwart von 0,3 M Na-Acetat unter Kälteeinwirkung gefällt (mindestens 30 min bei -20 °C). Die gefällte DNA wurde abzentrifugiert (20 min, 4 °C, 20.800 × g, Centrifuge 5417R) und das Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Dann wurde erneut wie zuvor zentrifugiert, das DNA-Pellet anschließend getrocknet und in einem geeigneten Volumen 1× TE-Puffer (2.1.9) aufgenommen.

2.2.1.10 Ligase-Reaktion

In der Ligase-Reaktion werden zwei DNA-Fragmente durch die Quick-T4-DNA-Ligase, ein Enzym das die kovalente Verknüpfung von 3'-Hydroxidgruppen des Vektors mit den 5'-Phosphatgruppen des Inserts katalysiert, miteinander verbunden.

Für eine Reaktion wurde ein etwa 5-fach molarer Überschuss an DNA-Restriktionsfragment, PCR-Fragment oder Oligonukleotiden gegenüber dem Vektor-Fragment eingesetzt, zusätzlich wurden 1/10 Volumen 10× Ligasepuffer (enthält ATP) und 1 µl T4-Ligase (2.000 U) eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde 20 min bei 20 °C inkubiert, anschließend in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (2.2.1.11) und dann auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert.

2.2.1.11 Hitzeschock Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen

Die chemisch (CaCl₂) kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und jeweils 20 – 150 µl der Zellen zu der zu transformierenden Plasmid-DNA bzw. dem Ligationsansatz (2.2.1.10) gegeben. Die Ansätze wurden 10 Minuten auf Eis gestellt, danach wurde ein Hitzeschock

durchgeführt (60-120 sec, je nach Bakterienstamm, 42 °C). Die Ansätze wurden 2 min auf Eis gestellt, bevor 300-500 µl LB-Medium dazupipettiert wurden.

Die Zellen wurden 45 min bei 37 °C inkubiert und anschließend auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausplattiert und für 12 – 16 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.1.12 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

Minipräp

Zur Isolierung der Plasmide wurde eine Über-Nacht-Kultur (3 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum) mit einer Einzelkolonie, die von einer Agarplatte mit transformierten *E. coli*-Zellen (2.2.1.11) gepickt wurde, angeimpft und 12-16 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert.

Zunächst wurden 1,5 ml der Kultur bei $2.700 \times g$ zentrifugiert (5 min, Centrifuge 5417C) und der Überstand abgenommen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (3 min, $2.700 \times g$, Centrifuge 5417C) wurde der Überstand vollständig abgesaugt. Anschließend wurde das Bakterienpellet in 150 µl Puffer P1 (2.1.9) resuspendiert und 150 µl Puffer P2 (2.1.9) ins Tube gegeben, wodurch die Bakterien lysiert wurden. Die genomische DNA und Proteine wurden durch die Zugabe von 150 µl Puffer P3 (2.1.9) präzipitiert und bei $20.800 \times g$ für 10 min abzentrifugiert (4 °C, Centrifuge 5417R). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (5 min, 4 °C, $20.800 \times g$, Centrifuge 5417R). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 900 µl 100 % Ethanol (-20 °C) gefällt (20 min, 4 °C, $20.800 \times g$, Centrifuge 5417R). Der Überstand wurde abgesaugt und das DNA-Pellet mit 200 µl 70 %igem Ethanol (-20 °C) gewaschen (5 min, 4 °C $20.800 \times g$, Centrifuge 5417R), bei 42 °C getrocknet und in 20 µl bidest. H₂O aufgenommen.

Zur Kontrolle der aufgereinigten Plasmide wurde eine Restriktionsanalyse (2.2.1.4) durchgeführt, und im Anschluss daran folgte die Sequenzanalyse der DNA (2.2.1.14).

Midipräp (Plasmid DNA Purification Kit)

75 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Die DNA-Isolation erfolgte mit Hilfe des Plasmid DNA Purification Kit laut Herstellerangaben, die gefällte DNA wurde in 32 µl oder 52 µl TE-Puffer (2.1.9) aufgenommen und die DNA-Konzentration bestimmt (2.2.1.13).

2.2.1.13 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe des Nanodrop-ND-1000, die Absorption der Lösung bei 260 nm wurde bestimmt und anhand des folgenden Verhältnisses kann die Konzentration berechnet werden:

$OD_{260} = 1$ entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA

Zur Bestimmung der Reinheit der DNA wird außerdem die OD bei 280 nm gemessen, bei dieser Wellenlänge haben die meisten Proteine ihr Absorptionsmaximum. Je größer dieser Wert ist, desto mehr Proteine enthält die zu bestimmende Probe.

$$\text{Reinheitsfaktor} = OD_{260} / OD_{280}$$

Bei einem Reinheitsfaktor zwischen 1,8 und 2,0 liegt die DNA ohne Proteinverunreinigungen vor.

2.2.1.14 DNA-Sequenzierung

Zur Kontrolle der klonierten DNA-Konstrukte wurde eine Sequenzierungs-PCR durchgeführt. Diese beruht auf der Didesoxymethode (Sanger *et al.*, 1992). Neben den üblichen 2'-Desoxynukleotid-Triphosphaten wurden in der PCR-Reaktion modifizierte, fluoreszenzmarkierte 2',3'-Didesoxynukleotid-Triphosphate verwendet. Bei letzteren fehlen die 3'-Hydroxidgruppen, wodurch bei der Amplifizierung die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen verhindert wird und es zu Kettenabbrüchen kommt. Es entstehen markierte DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die entsprechend ihrer Größe über Kapillarelektrophorese aufgetrennt und basenspezifisch detektiert werden.

Sequenzierungsansatz:

3 μl H₂O
 2 μl 5× BigDye Sequencing Buffer
 2 μl Big Dye Terminator Ready Reaction Mix
 1 μl Primer (10 pmol/ μl)
 2 μl Template-DNA (~200 ng)

PCR-Bedingungen:

1 min	96 °C	}—25x
10 sec	96 °C	
5 sec	50 °C	
4 min	60 °C	
∞	15 °C	

Nach Aufreinigung über das NucleoSEQ-Kit zur Entfernung überschüssiger Nukleotide entsprechend den Angaben des Herstellers wurde das Eluat in der Speedvac eingengt, mit 20 μl Hi-Di™ Formamide versetzt und 3 min bei 96 °C denaturiert. Anschließend wurde mit dem ABI Prism™ Genetic Analyzer 310 eine Sequenzanalyse durchgeführt.

2.2.1.15 Generierung der verwendeten DNA-Konstrukte

Zur Synthese von Expressionsplasmiden, die für Volllänge Tricellulin kodieren, wurden die Primer ON625 und ON626, bzw. ON625 und ON627 verwendet. Mittels PCR (2.2.1.1) wurde aus dem Vektor pFLAG-CMV4-Tric die Sequenz von Tricellulin mit *BamHI*-Schnittstellen amplifiziert.

Deletionskonstrukte von Tricellulin, denen entweder der N- oder der C-Terminus fehlt, wurden aus den Templates pFLAG-CMV4- Δ NTric, bzw. pFLAG-CMV4-Tric Δ C amplifiziert. Die dafür benötigten Primer waren ON630 und ON626 oder ON627 für die N-terminal deletierten Konstrukte. Für die C-terminal deletierten Konstrukte wurden die Primer ON625 und ON663 oder ON662 verwendet.

Ein weiteres mutiertes Tricellulin-Konstrukt ist an beiden cytoplasmatischen Termini deletiert. Für die Synthese wurde mittels PCR (2.2.1.1) aus dem Template p3 \times FLAG-CMV10-Tric mit Hilfe der Primer ON630 und ON663 oder ON662 die Sequenz von Δ NTric Δ C amplifiziert.

Die generierten PCR-Produkte wurden aufgereinigt (2.2.1.2), mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI verdaut (2.2.1.4) und der Verdauansatz wurde elektrophoretisch (2.2.1.6) aufgetrennt. Die aus dem Gel ausgeschnittenen DNA-Fragmente (2.2.1.7) wurden anschließend in ebenfalls mit *Bam*HI und SAP (2.2.1.5) verdaute Vektoren ligiert (2.2.1.10).

Die Tricellulin-Konstrukte wurden in die Vektoren p3 \times FLAG-CMV10 bzw. p3 \times FLAG-CMV14 ligiert (2.2.1.10) Das Konstrukt Δ NTric Δ C wurde außerdem in den Vektor pCS2+-myc₆ ligiert.

Für die Expression von Tricellulin mit einem N-terminalen HA-Tag wurden zunächst die Primer ON786 und 787 annealed, phosphoryliert (2.2.1.3) und anschließend mit den Restriktionsenzymen *Nhe*I und *Hind*III verdaut (2.2.1.4). Nach der Aufreinigung aus einem Agarosegel (2.2.1.7) wurden die DNA-Fragmente in den Vektor pcDNA6V5His-B ligiert (2.2.1.10), der mit den gleichen Restriktionsenzymen sowie mit SAP (2.2.1.5) verdaut wurde. In das neu generierte Expressionsplasmid wurden die Sequenzen von Tricellulin, Δ NTricellulin, Tricellulin Δ C und Occludin kloniert.

Die Konstrukte p3 \times FLAG-CMV10-Occludin, P3 \times FLAG-CMV10- Δ NOccludin und p3 \times FLAG-CMV10-Occludin Δ C wurden von Max Dörfel kloniert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Für die Protein-Expression (2.2.3.11) der mit verschiedenen Tags fusionierten C-terminalen cytoplasmatischen Domäne von Tricellulin wurde die entsprechende DNA-Sequenz aus dem Template-Vektor pGEX-TEV-C-cyto-Tric mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI (2.2.1.4) herausgeschnitten. Das aufgereinigte DNA-Fragment (2.2.1.7) wurde anschließend in die Vektoren pGEX4T1, pQE30 oder pMal-p2s-TEV kloniert.

Die Tricellulin-Sequenzen für die C-terminal getaggtten YFP/CFP-FRET-Vektoren wurden mittels PCR (2.2.1.1) aus dem Template p3×FLAG-CMV14-Tric amplifiziert. Hierfür wurden die Primer ON845 und ON844 verwendet und das PCR-Produkt anschließend mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *NhoI* verdaut (2.2.1.4) und in die Vektoren pcDNA3-CCFP bzw. pcDNA3-CYFP kloniert.

N-terminal getaggte FRET-Plasmide wurden in der gleichen Weise konstruiert, nur wurde als Template das Plasmid p3×FLAG-CMV10-Tric und für die PCR die Primer ON845 und ON846 verwendet. Das PCR-Produkt wurde in die Vektoren pcDNA3-NCFP oder pcDNA3-NYFP ligiert (2.2.1.10).

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Zellkultur

Für die Zellkultur-Versuche wurden entweder HEK293-Zellen oder MDCK C11-Zellen verwendet. Bei HEK293-Zellen handelt es sich um eine humane embryonale Nierenzelllinie und MDCK C11-Zellen sind niederohmige Epithelzellen aus der Hundeniere.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Begasungs-Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in Medium auf Zellkulturschalen.

Alle Materialien für die Zellkultur waren entweder steril verpackte Einmalartikel oder wurden vor der Benutzung in einem Autoklaven bei 120 °C mit Wasserdampf sterilisiert.

Kultivierung und Passagieren von HEK293-Zellen

Die Kultivierung der adhärent wachsenden Zellen erfolgte in DMEM-Medium auf Zellkulturplatten.

Zum Passagieren der Zellen wurde eine konfluent bewachsene Kulturschale zunächst mit PBS^{-/-} gewaschen, bevor 1 ml Trypsin auf die Zellen gegeben wurde. Dieses wurde sofort wieder entfernt, sodass nur ein dünner Film auf den Zellen verblieb. Nach etwa 5 min wurden die Zellen vorsichtig abgeklopft, in 10 ml Medium resuspendiert und in der entsprechenden Verdünnung in frischem Medium ausgesät.

Kultivierung und Passagieren von MDCK C11-Zellen

MDCK C11-Zellen wurden in MEM-Medium auf Zellkulturschalen kultiviert, das Medium stabil transfizierter Klone (2.1.10) enthielt zusätzlich 0,2 mg/ml G418.

Konfluent bewachsene Zellkulturschalen wurden mit PBS^{-/-} gewaschen und für etwa 5 min mit Trypsin inkubiert, bevor die Zellen in 10 ml neuem Medium aufgenommen und in der gewünschten Verdünnung ausgesät wurden.

2.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer kann die Zahl der Zellen in einer Zellsuspension bestimmt werden. In die Kammer werden etwa 20 µl der Suspension gefüllt und vier große Quadrate unter dem Mikroskop ausgezählt.

Die Zelldichte berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert der vier Großquadrate} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.2.2.3 Aussäen von Zellen

Anhand der bestimmten Zellzahl (2.2.2.2) ließen sich die gewünschten Verdünnungen für die Experimente berechnen. Zellen, die für Co-Immunpräzipitationen (2.2.3.2) transfiziert (2.2.2.4, 2.2.2.5) werden sollten, wurden in 6-Well-Platten in der benötigten Zelldichte ausgesät.

Für Immunfluoreszenzfärbungen (2.2.3.9) wurden die Zellen auf entsprechend beschichteten Deckgläschen ausgesät.

2.2.2.4 Transfektion von HEK293-Zellen (Calcium-Phosphat-Präzipitation)

Mit Hilfe dieser Methode kann DNA in Zellen eingebracht werden, indem sie als Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitate durch Endocytose von den Zellen aufgenommen wird.

Für die Transfektion wurden pro Well 1×10^6 Zellen ausgesät (2.2.2.3) und nach 24 h transfiziert. Für einen Transfektionsansatz wurden 2 µg DNA mit 250 mM CaCl₂-Lösung verdünnt und dann unter ständigem Vortexen in das gleiche Volumen 2× HBS-Puffer gemischt. Die so entstehenden möglichst homogenen DNA-Ca₂(PO₄)₂-Präzipitate wurden nach 15 min Inkubation unter leichtem Schwenken tropfenweise in das Medium der zuvor ausgesäten Zellen gegeben. Nach 6–8 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen vorsichtig mit PBS^{+/+} gewaschen. Danach wurde 3 ml frisches Medium auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden für 48 h im Brutschrank inkubiert, bevor sie lysiert wurden (2.2.3.1).

2.2.2.5 Transfektion von MDCK C11-Zellen

Herstellung stabil exprimierender Klone

Zur Generierung von MDCK C11-Zellen, die Tricellulin-Konstrukte stabil exprimieren, wurden die Zellen mit Polyethylenimine transfiziert. Die Transfektion erfolgte nach Erhardt *et al.* (Erhardt *et al.*, 2006). Die Selektion wurde mit MEM-Medium, dem zunächst 1 mg/ml G418 zugesetzt war durchgeführt. Die Konzentration des Selektionsantibiotikum wurde sukzessive reduziert, bis zu einem Endwert von 0,2 mg/ml G418. In diesem Medium wurden die Zellen anschließend kultiviert.

Für diese Arbeit wurden MDCK C11-Klone generiert, die entweder mit dem Leervektor p3×FLAG-CMV14 transfiziert wurden oder mit den entsprechenden Vektoren, sodass sie eines der folgenden Tricellulin-Konstrukte exprimieren: Tricellulin-FLAG₃, ΔNTricellulin-FLAG₃ oder TricellulinΔC-FLAG₃.

Transiente Transfektion von MDCK C11-Zellen

Die Zellen wurden in einer Dichte von $2 - 4 \times 10^5$ ausgesät (2.2.2.3) und nach 24 h mit dem FuGENE® HD Transfection Reagent laut Herstellerangaben in einem DNA:Fugene-Verhältnis von 2:6 transfiziert. Die Lyse der Zellen (2.2.3.1) erfolgte nach weiteren 24 h.

2.2.2.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen

In Form von Gefrierkulturen können Zellen in Gefriermedium dauerhaft in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden.

Zum Einfrieren der Zellen wurde eine konfluent bewachsene Schale mit PBS^{-/-} gewaschen, die Zellen trypsiniert und in 10 ml Medium aufgenommen. Dann wurden die Zellen zentrifugiert (Zellzentrifuge Megafuge 2.0R, RT, 5 min, $310 \times g$), in 1 ml Gefriermedium aufgenommen und die Zellsuspension in ein 1,5 ml Kryoröhrchen überführt. Mit Hilfe des Nicol LM10 wurden die Zellen in Stickstoffdampf eingefroren (30 min Stufe 3, 10 min Stufe 10) und anschließend im Stickstofftank gelagert.

Die gelagerten Zellen wurden wieder in Kultur genommen, indem ein Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C zügig aufgetaut wurde und die Zellen in 10 ml vorgewärmten Medium resuspendiert wurden. Zur restlosen Entfernung des zellschädigenden DMSO wurden die Zellen zentrifugiert (Zellzentrifuge Megafuge 2.0R, RT, 5 min, $310 \times g$). Dann wurde das Zellpellet in 10 ml frischem Medium aufgenommen und in eine Kulturschale überführt.

2.2.2.7 Ussing-Kammer-Messungen

Der Physiologe Hans Ussing entwickelte diese Methode zur Messung des aktiven Ionentransport und des Widerstandes von Epithelien.

Die Messungen wurden freundlicherweise von Dr. Susanne M. Krug am Institut für Klinische Physiologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin, durchgeführt.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Lyse eukaryontischer Zellen

Die in einer 6-Well-Platte konfluent gewachsenen Zellen wurden 24 bzw. 48 Stunden nach der Transfektion (2.2.2.4, 2.2.2.5) oder dem Aussäen (2.2.2.3) mit PBS⁺⁺ gewaschen und anschließend mit RIPA-Puffer (2.1.9) lysiert. Dafür wurden die Zellen 10 Minuten im Kühlschrank mit RIPA-Puffer (200 µl/Well) inkubiert und anschließend mit der Pipette in ein Reaktionsgefäß überführt. Um störende DNA zu entfernen, wurden die Lysate mit Benzonase (0,2 µl/200 µl) verdaut (1-2 h, 4 °C). HEK293-Zell-Lysate wurden außerdem mit jeweils drei Pulsen Ultraschall (Amplitude 40 %, 3 × 1 sec) beschallt. Danach wurden die zellulären Rückstände abzentrifugiert (Centrifuge 5417R, 4 °C, 20.800 × g, 10 min) und die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt, um die Lysate in Western-Blots (2.2.3.5) oder Co-Immunpräzipitationen (2.2.3.2) zu analysieren.

2.2.3.2 Co-Immunpräzipitation (IP)

Protein-Protein-Wechselwirkungen können mit Hilfe der Co-Immunpräzipitation in Zell-Lysaten (2.2.3.1) nachgewiesen werden. Über spezifische Antikörper können Protein-Komplexe isoliert und die enthaltenen Proteine im Western Blot (2.2.3.5) detektiert werden.

Für IPs in HEK293-Zell-Lysaten wurden pro Ansatz 300 µl Lysat mit 25 µl Protein-A-Sepharose (mit 2 bzw. 4 µg anti-FLAG-M2 Antikörper in RIPA-Puffer für 30 min beladen) für 1 h bei 4 °C im Überkopf-Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Beads 3 × mit RIPA-Puffer gewaschen (Centrifuge 5417R, 4 °C, 1.050 × g, 3 min), das Pellet in 2× SDS-Protein-Probenpuffer resuspendiert und die Proteine im Western-Blot (2.2.3.5) analysiert.

Für Co-Immunpräzipitationsexperimente in stabil transfizierten MDCK C11-Zellen (2.2.2.5) wurden nach der Lyse der Zellen (2.2.3.1) pro Ansatz 250 – 300 µl Lysat mit 2 µg anti-Occludin Antikörper, bzw. Rabbit-IgG für 1 h bei 4 °C inkubiert. Dann wurden die Ansätze zentrifugiert (Centrifuge 5417R, 4 °C, 20.800 × g, 10 min) und die Überstände für 45 min bei 4 °C mit Protein-A-Sepharose inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze zentrifugiert (Centrifuge 5417R, 4 °C, 1.050 × g, 3 min), der Überstand abgenommen und die Beads 3 × mit RIPA-Puffer gewaschen (Centrifuge 5417R, 4 °C, 1.050 × g, 3 min), bevor die Proteine im Western-Blot (2.2.3.5) analysiert wurden.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wird zur Auftrennung von Proteingemischen angewendet. Die Polyacrylamidgele entstehen durch Copolymerisation von Acrylamidmonomeren und Bisacrylamid. Die Proteinproben werden in Anwesenheit von SDS, einem anionischen Detergenz und β -Mercaptoethanol bei 95 °C aufgekocht, sodass Sekundär- und Tertiärstrukturen aufgelöst werden. An die denaturierten Proteinmoleküle lagern sich SDS-Moleküle an, wodurch alle Proteine eine negative Ladung erhalten und in der anschließenden Elektrophorese entsprechend ihrer molekularen Massen aufgetrennt werden können. Die Elektrophorese erfolgt in einem 1970 von U.K. Laemmli (Laemmli, 1970) eingeführten diskontinuierlichem Tris-HCl/Tris-Glycin Puffersystem. Dabei überschichtet ein weitporiges Sammelgel (Tris/HCl-Puffer pH 6,8) ein engporiges Trenngel (Tris/HCl-Puffer pH 8,8). Der pH-Wert des Sammelgels liegt sehr nah am isoelektrischen Punkt des Glycins im Elektrodenpuffer, dadurch hat dieses zum Beginn der Trennung eine sehr niedrige elektrophoretische Mobilität, die Chlorid-Ionen in den Gelpuffern haben dagegen eine sehr hohe Mobilität, die Mobilitäten der Proteine liegen dazwischen. Beim Anlegen eines elektrischen Feldes beginnen alle Ionen im Sammelgel mit der gleichen Geschwindigkeit in Richtung der Anode zu wandern und bilden einen „Stapel“ in der Reihenfolge ihrer Mobilitäten aus. Dadurch erfolgt eine Aufkonzentrierung und Vortrennung der Proteine beim Start. An der Grenze zum engporigen Trenngel erfahren die Proteine einen hohen Reibungswiderstand. Das davon unbeeinflusste Glycin überholt die Proteine, sodass diese in einem homogenen Puffer vorliegen und im Trenngel nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden.

Für die Elektrophorese wurde das vertikale Gelelektrophoresesystem der Firma C.B.S für Gele der Größe 80 × 85 × 0,75 mm verwendet. Die Acrylamidkonzentration des Sammelgels (Höhe ca. 1,5 cm) betrug 5,0 % und die des Trenngels (Höhe ca. 6 cm) 7,5, 10 oder 14 %, je nach Größe der aufzutrennenden Proteine.

Tab. 6: Ansätze für die Präparation von SDS-Polyacrylamidgelen verschiedener Konzentrationen

	Trenngele			Sammelgel
	7,5 %	10 %	14 %	5 %
H ₂ O	4,6 ml	3,77 ml	2,7 ml	1,57 ml
Tris (1,5 M, pH 8.8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	
Tris (0,5 M, pH 6.8)				0,83 ml
Acrylamid	2,5 ml	3,3 ml	4,6 ml	0,5 ml
10 % SDS	100 ml	100 ml	100 ml	33,33 μ l
10 % APS	100 μ l	100 μ l	100 μ l	33,33 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l	10 μ l	6 μ l

2.2.3.4 Proteinfärbung in SDS-Polyacrylamidgelen

Im Polyacrylamidgel können Proteine nach der Elektrophorese (2.2.3.3) mit Coomassie Brilliant Blue R-250 angefärbt werden. Dabei handelt es sich um einen Triphenylmethanfarbstoff, der unspezifisch an Proteine bindet und sie blau färbt. Die Nachweisgrenze liegt im Bereich von 0,1–2 µg Protein pro Bande. Die Färbung erfolgte für 5 bis 10 min in der Färbelösung (RT), anschließend wurden die Gele in der Entfärbelösung so lange geschüttelt, bis die proteinfreie Gelmatrix weitgehend entfärbt war.

2.2.3.5 Western-Blot

Die Western Blot Analyse dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen. Zunächst wird ein Proteingemisch in einem SDS-Polyacrylamidgel nach der Größe der Proteine aufgetrennt (2.2.3.3). Die Proteine werden dann mit Hilfe einer Semi-Dry Blotting Apparatur auf eine PVDF-Membran übertragen.

Dazu wurden zunächst zwei 3MM-Whatmanfilter in Gelgröße mit Anodenpuffer 1 und Anodenpuffer 2 getränkt und auf die Anode der Blotapparatur gelegt. Auf die Filter wurde die Membran (in Gelgröße) gelegt, nachdem sie mit Methanol aktiviert und in Anodenpuffer 2 geschwenkt worden war. Das Sammelgel wurde entfernt und das Gel danach auf die Membran gelegt, als letzte Schicht folgten drei weitere mit Katodenpuffer getränkte Lagen Whatman-Filter. Der Deckel der Blotapparatur (Kathode) wurde aufgesetzt und für 20 min wurde eine Stromstärke von 200 mA pro Gel angelegt, sodass die Proteine aus dem Gel auf die Membran übertragen wurden.

2.2.3.6 Immundetektion

Nach dem Blotten wurden unspezifische, freie Proteinbindestellen der Membran abgesättigt (Blocken), dazu wurde die Membran mindestens eine Stunde in TST-Puffer (2.1.9) inkubiert. Auf das Blocken folgte die Inkubation mit dem gegen das zu detektierende Protein gerichteten primären Antikörper. Für die Inkubation wurde die Membran mit dem entsprechend verdünnten Antikörper bei Raumtemperatur 1 h oder über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran 3 × 5 Minuten mit TST-Puffer (2.1.9) gewaschen. Es folgte die Inkubation (30 min) mit dem sekundären Antikörper. Dieser ist gegen den konstanten Teil des primären Antikörpers gerichtet und an eine Peroxidase gekoppelt. Anschließend wurde die Membran erneut 3 × 5 Minuten mit TST-Puffer (2.1.9) gewaschen.

Für den spezifischen Nachweis der an den Sekundärantikörper gekoppelten Peroxidase wurde ECL-Lösung verwendet. Bei der Reaktion der Peroxidase mit der ECL-Lösung wurde das in dieser enthaltene Luminol in einen angeregten Zustand versetzt und die bei der Rückkehr in den energieärmeren Zustand als Lichtenergie abgegebene Energie konnte auf einem Röntgenfilm als Schwärzung nachgewiesen werden.

2.2.3.7 Ubiquitinierungs-Assay

Um zu untersuchen, ob Tricellulin ubiquitiniert wird, wurden stabil transfizierte MDCK-Klone (2.2.2.5) zusätzlich transient mit pcDNA3-HA-Ubiquitin, bzw. pcDNA3 als Kontrolle, transfiziert (2.2.2.5). Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit 50 μ M MG132, einem Proteasomen-Inhibitor inkubiert (1 h, 37 °C), mit PBS^{+/+} gewaschen und anschließend mit RIPA-Puffer lysiert (2.2.3.1). Mit den Lysaten wurde dann eine Co-Immunpräzipitation (2.2.3.2) durchgeführt und die Proteinkomplexe im Western Blot (2.2.3.5) analysiert.

2.2.3.8 Biotinylierungs-Assay

Stabil transfizierte MDCK C11-Klone (2.2.2.5) wurden ausgesät (4×10^5) und zusätzlich transient mit pcDNA3-HA-Ubiquitin, bzw. pcDNA3 als Kontrolle, transfiziert (2.2.2.5). Die Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen und der Endocytose-Assay erfolgte nach Nishimura und Sasaki (Nishimura and Sasaki, 2008).

2.2.3.9 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Methanolfixierung

HEK293-Zellen (5×10^7) wurden auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen (2 h, RT) ausgesät, nach 24 h transfiziert (2.2.2.4) und 48 h später mit PBS^{+/+} gewaschen.

Stabil transfizierte MDCK C11-Klone (1×10^6) (2.2.2.5) wurden auf Deckgläschen (mit Kollagen A beschichtet; 20 min, RT) ausgesät und nach 24 h mit PBS^{+/+} gewaschen.

Die Zellen wurden anschließend mit Methanol fixiert (-20 °C, 10 min) und ein weiteres Mal mit PBS^{+/+} gewaschen.

Formaldehyd-Fixierung

Die stabil transfizierten MDCK C11-Klone (1×10^6) (2.2.2.5) wurden auf mit Collagen A beschichteten Deckgläschen (20 min, RT) ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen $2 \times$ mit PBS^{+/+} gewaschen und mit Formaldehyd fixiert (3,7 %, RT, 20 min). Danach wurden die Zellen 3×5 min mit PBS^{+/+} gewaschen, wobei beim zweiten Waschen zwei Tropfen 1 M Glycin (pH 8,5) zu den Zellen gegeben wurde, um restliches Formaldehyd zu inaktivieren. Anschließend wurden die Zellen permeabilisiert (0,1 % (v/v) Triton X-100, 4 min, RT) und erneut 3×5 min mit PBS^{+/+} gewaschen.

Blockieren und Antikörper-Inkubation

Die fixierten Zellen wurden für 1 h mit 5 % (v/v) Goat Serum in PBS^{+/+} inkubiert, um unspezifische, freie Proteinbindestellen abzusättigen. Danach wurden die Zellen mit dem entsprechenden primären Antikörper inkubiert (Verdünnung in 0,1 % (v/v) Goat Serum in PBS^{+/+}, 1 h, RT) und anschließend $5 \times$ mit PBS^{+/+} gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (gekoppelt an ein Fluorophor, 1:1.000 Verdünnung in 0,1 % (v/v)

Goat Serum in PBS⁺⁺) und DAPI (1:1.000 Verdünnung in 0,1 % (v/v) Goat Serum in PBS⁺⁺) erfolgte für 30 min bei RT. Danach wurden die Zellen erneut 5 × mit PBS⁺⁺ gewaschen. Die Deckgläschen wurden im letzten Schritt mit ProTaq's Mount Fluor eingedeckelt und im Dunkeln gelagert. Zum Auswerten der Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Zellen mit dem konvokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM510 analysiert und fotografiert.

2.2.3.10 Calcium-Switch-Assay

Stabil transfizierte MDCK C11-Klone (1×10^6 -Zellen/well) wurden auf Deckgläschen ausgesät und in MEM-Medium (normal-Calcium) für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 1 × mit PBS⁻ gewaschen und in S-MEM (low-Calcium) für 10-90 min inkubiert. Danach wurden die Zellen 1 × mit PBS^{+/+} gewaschen und wieder in MEM (normal-Calcium) inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert und angefärbt (2.2.3.9)

2.2.3.11 Rekombinante Expression von Fusionsproteinen in *E. coli*

Fusionsproteine mit Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum*, dem Maltose-Bindeprotein (MBP) oder sechs Histidinresten (His₆-Tag) lassen sich in *E. coli* gut exprimieren und es ist möglich, sie affinitätschromatisch aufzureinigen (2.2.3.11). In diesen Vektoren wird die Expression über einen tac-Promotor reguliert, wodurch die Expression über Zugabe von IPTG induziert werden kann.

Induktion der Protein-Expression durch IPTG

Die entsprechenden Expressionsplasmide wurden zunächst in *E. coli* BL21 (RE4) transformiert (2.2.1.11). Mit einer Einzelkolonie wurden 50 ml Expressionsmedium angeimpft und diese Vorkultur wurde für 12 – 16 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 20 ml der Vorkultur wurden in 400 ml Expressionsmedium (Hauptkultur) überführt und bis zu einer OD₅₇₈ von 0,6-0,8 bei 37 °C wachsen gelassen. Die Induktion der Protein-Expression erfolgte mit 0,5 mM IPTG für 1 h unter weiterem Schütteln bei 30 °C.

Aufschluss der Bakterien durch Ultraschallbehandlung

Nach der Induktion wurden die Bakterien durch Zentrifugation (Kühlzentrifuge Sorvall Evolution RC Superspeed, 6.000 × g, 4 °C, 15 min) pelletiert, in 5 ml Lysepuffer (+ CompleteTM-EDTA, bei His₆-Proteinen wurde CompleteTM-EDTA-free verwendet) resuspendiert. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte auf Eis durch Ultraschallbehandlung mit 3 × 40 Pulsen bei einer Intensität von 40 % am Branson-Sonifier. Danach wurden unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation (Kühlzentrifuge Sorvall Evolution RC Superspeed, 20.800 g, 4 °C, 30 min) sedimentiert und die rekombinanten Fusionsproteine im Überstand affinitätschromatisch aufgereinigt.

Affinitätschromatische Aufreinigung von Fusionsproteinen

Native Aufreinigung von GST-C-cyto-Tric und MBP-TEV-TricC

Zur Vorbereitung der affinitätschromatographischen Reinigung wurde eine Säule mit einem Gelbett von 1 ml Glutathion-Agarose Beads gegossen und mit 10 ml kaltem Lysepuffer äquilibriert. Für die Aufreinigung von MBP-TEV-getagten Fusionsproteinen wurde Amylose-Resin als Säulenmaterial verwendet. Im Anschluss wurde der gewonnene Überstand des Bakterienlysats auf die Säule aufgetragen, zweimal mit 10 ml Waschpuffer gewaschen und mit 10 ml des entsprechenden Elutionspuffer (2.1.9) eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen mit 0,5-1,5 ml Volumen aufgefangen und jeweils 10 µl jeder Fraktion entnommen und durch SDS-PAGE (2.2.3.3) und anschließender Coomassie-Färbung (2.2.3.4) analysiert. Fusionsproteinhaltige Fraktionen wurden vereinigt und gegen Dialysepuffer (2.1.9) dialysiert. Alle Schritte der Aufreinigung wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt.

Denaturierende Aufreinigung von His₆-C-cyto-Tricellulin

Für die denaturierende Aufreinigung His₆-getaggtter Proteine wurde Nickel-NTA-Agarose als Säulenmaterial verwendet. Die weiteren Schritte erfolgten wie oben für GST-Proteine beschrieben.

Im Anschluss wurde das aufgereinigte und gegen PBS (2.1.9) dialysierte Fusionsprotein aufkonzentriert, dafür wurden Amicon Säulen mit einem Ausschlussvolumen von 5 kDa verwendet und diese bei 4 °C zentrifugiert (Zellzentrifuge Megafuge 2.0R, 4.000 × g, 60 min). Das aufkonzentrierte Protein wurde erneut in einer SDS-Polyacrylamidelektrophorese (2.2.3.3) aufgetrennt und das Gel dann mit eiskaltem 100 mM KCl auf Eis angefärbt. Die deutlich weiß werdenden Proteinbanden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die Gelstücke durch ein Drahtnetz gedrückt. Während der Inkubation über Nacht in H₂O wurde das Protein aus dem Gel gelöst und die Gelreste abzentrifugiert (Centrifuge 5417R, 20.800 × g, 4 °C). In einer erneuten SDS-PAGE (2.2.3.4) wurde die Proteinkonzentration im Vergleich mit einem BSA-Standard bestimmt.

Mit dem gereinigten Protein wurde durch die Firma Pineda-Antikörper-Service (Berlin) Meerschweinchen und Kaninchen immunisiert und die Antiseren wurden in dieser Arbeit charakterisiert und eingesetzt.

2.2.3.12 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden mit der Bicinchoninsäure (BCA)-Methode bestimmt. In alkalischer Lösung reduzieren Proteine Cu₂₊ zu Cu⁺. Dadurch wird mit BCA ein violetter Farbkomplex gebildet. Dieser weist bei 567 nm ein Absorptionsmaximum auf und kann photometrisch quantifiziert werden (Smith *et al.*, 1985). Eine entsprechende Verdünnung der zu bestimmenden Proteine (20 µl) und ein BSA-Standard (0,05-0,5 mg Protein/ml) wurden mit 200 µl BCA-Reagenz gemischt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die Absorptionmessung erfolgte in einem Multiplate Reader gegen den verwendeten Puffer als

Leerwert. Die Konzentration wurde über die mit den BSA-Standards ermittelte Eichgerade berechnet.

2.2.3.13 Phosphorylierungs-Assay

Rekombinant exprimiertes und affinitätschromatographisch gereinigtes GST-Fusionsprotein (2 µg) wurden in 200 µl Dialysepuffer (40 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 8,0) mit 25 µl GSH Beads (50 % slurry) versetzt und für 1 h bei 4 °C im Überkopf-Schüttler vorinkubiert. Nach Zentrifugation (Centrifuge 5417R, 2.700 × g, 2 min) wurden die Beads 1 × in Dialysepuffer und 1 × in Kinasepuffer (entsprechend den Herstellerangaben) gewaschen. Für die Phosphorylierung wurden 50 U (CK1, GSK3β, PKA) bzw. 2,5 U (CK2) Kinase und 0,3-0,7 µCi γ-[³²P]-ATP (6.000 Ci/mmol) eingesetzt. Die Phosphorylierung wurde für 30 min bei 25 °C durchgeführt, die GSH-Beads anschließend 4 × mit Dialysepuffer gewaschen, bei 2.700 × g pelletiert und mit 25 µl 2× SDS-Probenpuffer versetzt und die phosphorylierten Proteine auf einer SDS-PAGE (2.2.3.3) aufgetrennt.

Die Radioaktivität wurde an einem FLA-3000 gemessen und mit AIDA image analysis software ausgewertet.

2.2.3.14 Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET)

Dabei handelt es sich um eine Methode, um Protein-Protein-Interaktionen in Zellen nachzuweisen. Für die Messungen werden Fusionproteine verwendet, wobei an das erste Protein das Donorfluorophor und an das zweite Protein das Akzeptorfluorophor gebunden wird. Wenn die Proteine in einem Abstand von wenigen Nanometern voneinander lokalisiert sind, kann Anregungsenergie vom Donorfluorophor strahlungsfrei auf das Akzeptorfluorophor übertragen werden und eine Akzeptorfluoreszenz kann gemessen werden.

Die FRET-Messungen wurden von der Arbeitsgruppe von PD Dr. Ingolf E. Blasig am FMP in Berlin-Buch durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Für die Generierung von α -Tricellulin Antiseren, für deren Spezifitätsanalysen, sowie für die Charakterisierung von Tricellulin wurde die cDNA der C-terminalen cytoplasmatischen Domäne von Tricellulin in die prokaryontischen Expressionsvektoren pGEX-4T1, pQE30 und pMal-p2s-TEV kloniert. Diese Konstrukte wurden anschließend in *E.coli* transformiert, die Fusionsproteine exprimiert und affinitätschromatographisch aufgereinigt. Die Analyse der Proteinaufreinigung erfolgte über SDS-PAGE. Exemplarische Elutionsprofile der GST-, His₆- oder MBP-TEV getaggen C-terminalen cytoplasmatischen Domäne von Tricellulin sind in Abb. 6 dargestellt.

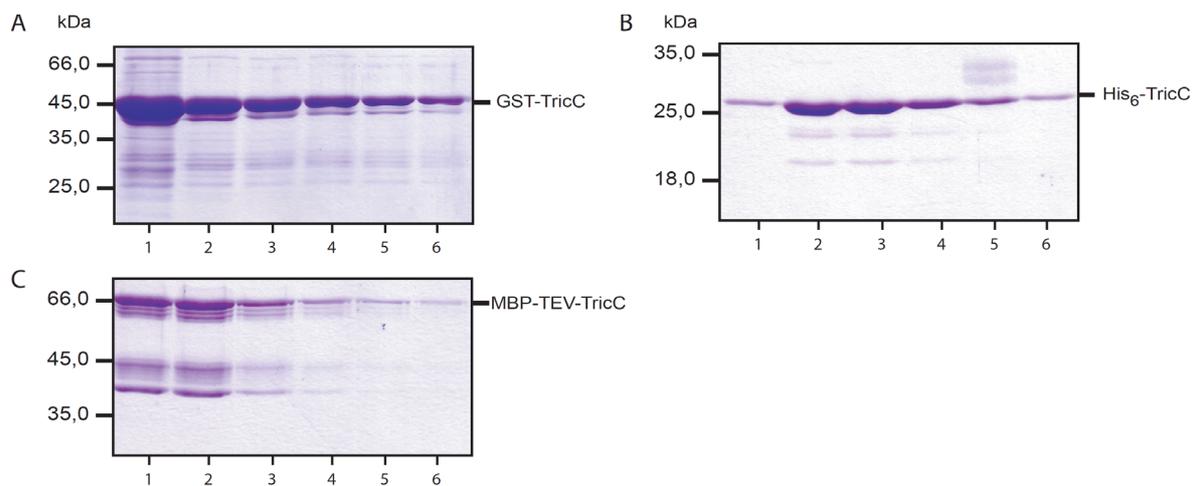


Abb. 6: Elutionsprofile rekombinant exprimierter Fusionsproteine. (A) Die GST-getaggte C-terminale cytoplasmatische Domäne von Tricellulin (B) His₆-C-cyto-Tricellulin (C) Die C-terminale cytoplasmatische Domäne von Tricellulin mit einem N-terminalen MBP-TEV-Tag. Es sind jeweils die ersten sechs eluierten Fraktionen aufgetragen.

3.2 Generierung und Charakterisierung von α -Tricellulin Antiseren

Um endogenes Tricellulin in Zell-Lysaten nachweisen zu können, wurden α -Tricellulin Antiseren in Kaninchen und Meerschweinchen erzeugt.

Die cDNA der C-terminalen cytoplasmatischen Domäne von Tricellulin wurde in den prokaryontischen Expressionsvektor pQE30 kloniert, um rekombinante Tricellulin-Proteine synthetisieren zu können. Für die Immunisierung der Tiere wurde die His₆-getaggte C-terminale Domäne von Tricellulin in *E. coli* BL21 RE4 exprimiert und unter denaturierenden Bedingungen affinitätschromatographisch aufgereinigt (Abb. 6B). Das gereinigte

rekombinante Protein wurde mit Hilfe eines Amicon Zentrifugationsfilters Ultra-4 mit 5 kDa Ausschlussvolumen aufkonzentriert. Nach der Trennung über ein SDS-Polyacrylamidgel wurde das Antigen aus dem Gel isoliert, bevor es zur Immunisierung von zwei Kaninchen und einem Meerschweinchen eingesetzt wurde. Am 130. Tag nach der ersten Immunisierung wurden die α -Tricellulin Antiseren gewonnen und deren Spezifität in den folgenden Experimenten analysiert.

3.2.1 Charakterisierung der α -Tricellulin Antiseren

3.2.1.1 Kreuzreaktivität und Spezifität

Für die Untersuchung der Spezifität der α -Tricellulin Antiseren wurden die GST-getaggten C-terminalen Domänen von Tricellulin (TricC) und Occludin (OccC), sowie die His₆-getaggte C-terminale Domäne von Tricellulin auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf PVDF-Membranen geblottet und die Immundetektion mit den α -Tricellulin Antiseren aus dem Meerschweinchen (Verdünnung 1:500) und den zwei Kaninchen (Verdünnung 1:5.000) durchgeführt. Dabei konnten die GST- oder His₆-getaggten Tricellulin-Konstrukte spezifisch detektiert werden (Abb. 7, Spuren 2, 3, 5, 6, 8 und 9). Die Antiseren zeigten keine Kreuzreaktion mit GST-OccC (Abb. 7, Spur 1, 4 und 7), allerdings wurde bei His₆-TricC eine unspezifische Bande bei ungefähr 48 kDa detektiert (Abb. 7, Spuren 2, 5 und 8). Diese unspezifische Reaktion ist bei α -Tric Antiserum aus Meerschweinchen am schwächsten nachweisbar.

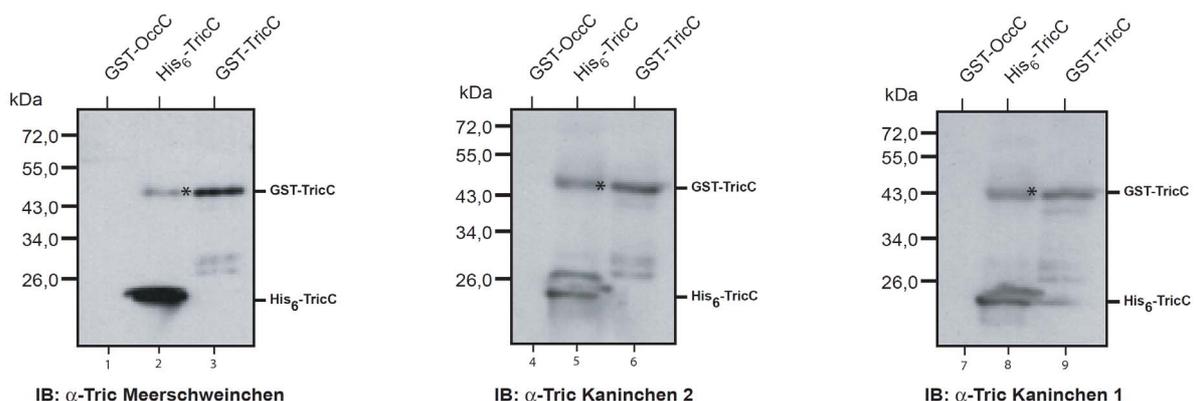


Abb. 7: Analyse der Spezifität und Kreuzreaktivität der α -Tricellulin Antiseren. In einer SDS-PAGE wurden die aufgereinigten GST- bzw. His₆-getaggten C-terminalen cytoplasmatischen Domänen von Occludin (Spuren 1, 4 und 7) oder Tricellulin (Spuren 2, 3, 5, 6, 8 und 9) aufgetrennt (jeweils 0,05 μ g) und anschließend geblottet. Die Immundetektion erfolgte mit den angezeigten α -Tricellulin Antiseren (eingesetzte Verdünnungen: α -Tric Antiserum aus Meerschweinchen 1:500, α -Tric Antiserum aus Kaninchen 1:5.000). * unspezifische Detektion durch die Antiseren

Zur weiteren Überprüfung der Spezifität wurden die Antiseren mit jeweils 50 μ g GST-TricC oder GST-Protein vorinkubiert. Die in der Lösung enthaltenen α -Tricellulin Antikörper

wurden durch das zugegebene Tricellulin-Konstrukt gebunden und durch Sedimentation entfernt. Die Inkubation mit GST diente als Kontrolle. Die Überstände wurden zur Immundetektion in einer Western Blot Analyse eingesetzt, sodass das Meerschweinchen-Antiserum in einer Verdünnung von 1:500 vorlag und die Kaninchen Antiseren 1:5.000 verdünnt waren. Mit dem mit GST vorbehandelten Antiserum konnten GST-TricC und MBP-TEV-TricC spezifisch detektiert werden (Abb. 8, Spuren 1 und 2), da die im Antiserum vorliegenden α -Tricellulin Antikörper nicht durch GST gebunden wurden. Im Gegensatz dazu kann mit den mit GST-TricC inkubierten Antiseren des Meerschweinchens und des Kaninchen 2 kein rekombinantes Tricellulin mehr nachgewiesen werden (Abb. 8, Spuren 3, 4, 7 und 8). Allerdings scheint die Inkubation mit GST-TricC die α -Tricellulin Antikörper nicht vollständig aus dem Antiserum des Kaninchen 1 entfernt zu haben. Mit diesem Antiserum konnten schwache Signale von GST-TricC und MBP-TEV-TricC detektiert werden (Abb. 8, Spuren 11 und 12).

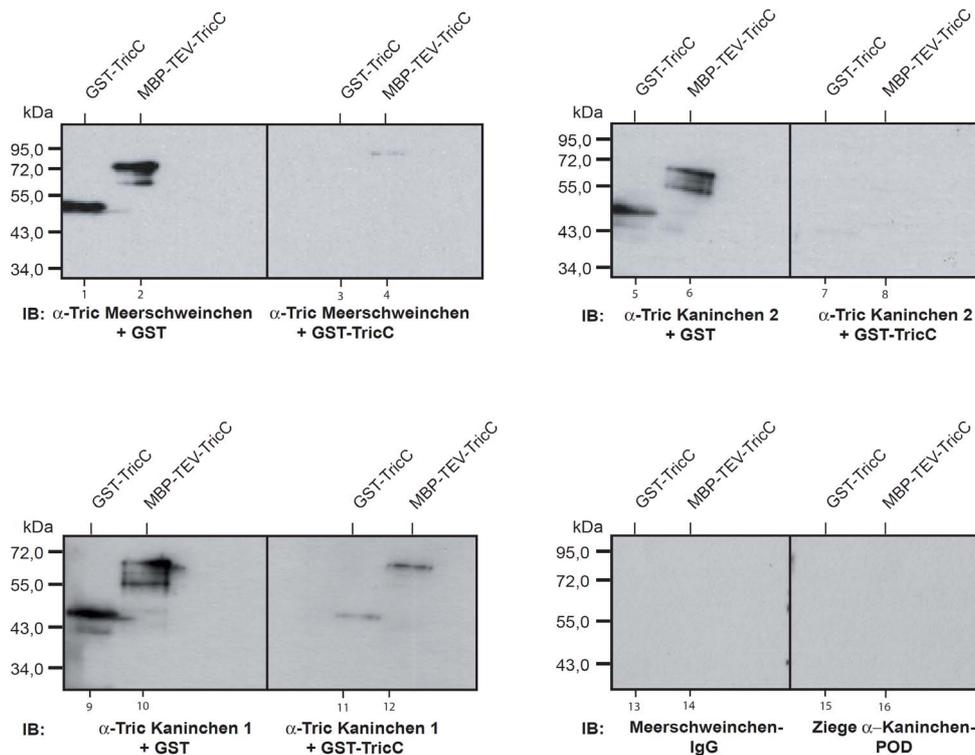


Abb. 8: Test der Spezifität der α -Tricellulin Antiseren nach Vorinkubation mit rekombinanten Proteinen.

Western Blots zur Detektion von GST-TricC, bzw. MBP-TEV-TricC. Für die Analyse wurden jeweils 0,05 μ g rekombinantes Protein aufgetrennt. In den Spuren 1, 2, 5, 6, 9 und 10 ist jeweils die Immundetektion mit dem mit GST-Protein (50 μ g) vorinkubiertem Antiserum dargestellt. Zur Detektion der Proteine in den Spuren 3, 4, 7, 8, 11 und 12 wurden die Immunsereen verwendet, die mit GST-TricC (50 μ g) vorinkubiert worden waren. α -Tric Antiserum aus Meerschweinchen wurde in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt, α -Tric Antiserum aus Kaninchen wurde 1:5.000 verdünnt. Die Spuren 13 – 16 zeigen zur Kontrolle die Inkubation nur mit dem jeweils entsprechenden sekundären Antikörper.

Der Nachweis der Spezifität der α -Tricellulin Antiseren in Bezug auf rekombinante Proteine ergab, dass diese mit dem α -Tricellulin Antiserum aus dem Meerschweinchen spezifisch

detektiert werden konnten und nur sehr geringe unspezifischen Signale auftraten. Daher wurde dieses Antiserum in den folgenden Experimenten für die Analyse der endogenen Tricellulin-Expression in verschiedenen Zelllinien eingesetzt.

3.2.1.2 Detektion von endogenem Tricellulin in Zell-Lysaten

Im nächsten Schritt sollte endogenes Tricellulin in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden. Dafür wurden konfluent gewachsene Zellen lysiert, 30 µg Gesamtprotein in einer SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Die Immundetektion erfolgte mit dem α -Tricellulin Antiserum aus Meerschweinchen in einer Verdünnung von 1:500, wobei in allen untersuchten Zelllinien endogenes Tricellulin detektiert werden konnte (Abb. 9). Die Zelllinien MDCK C7 (hochohmige Hunde-Nierenzellen) und MDCK C11 (niederohmige Hunde-Nierenzellen) wiesen vergleichbare Tricellulin-Mengen auf (Spuren 1 und 2). Dagegen konnte in H184A1-Zellen (humane Brustzelllinie) eine etwas stärkere Tricellulin-Expression detektiert werden (Spur 4). Noch größere Tricellulin Mengen konnten in HT29/B6-Zellen (humane Kolonkarzinomzelllinie) nachgewiesen werden (Spur 3). NRC-Zellen (Normale Ratten-Cholangiocyten) wiesen nur eine sehr schwache Tricellulin-Expression auf (Spur 5).

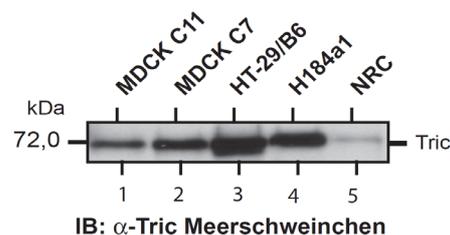


Abb. 9: Detektion von endogenem Tricellulin in Lysaten verschiedener Zelllinien. Analysiert wurden 30 µg Gesamtprotein von Zell-Lysaten der angegebenen Zelllinien. Zur Detektion wurde α -Tricellulin Antiserum aus Meerschweinchen in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt.

3.3 Lokalisation und Funktion von Tricellulin und Tricellulin-Mutanten

Um Einblicke in den Mechanismus der bevorzugten Lokalisation an Dreizellkontakten von Tricellulin zu bekommen, wurde untersucht ob der N- und der C-Terminus die Lokalisation und Funktion von Tricellulin beeinflussen. Dafür wurde die cDNA von humanem Tricellulin, sowie von N- bzw. C-terminal deletierten Tricellulin-Konstrukten in eukaryontische Expressionsvektoren (p3 \times FLAG-CMV14) kloniert. Mittels dieser Plasmide wurden stabile MDCK C11-Klone generiert, die entweder mit dem Leervektor p3 \times FLAG-CMV14 transfiziert waren, oder Tricellulin-FLAG₃, Δ NTricellulin-FLAG₃ oder Tricellulin Δ C-FLAG₃ exprimieren. Diese Klone wurden in den folgenden Versuchen bezüglich der oben genannten Fragestellung charakterisiert.

3.3.1 Einfluss der N- und C-terminalen cytoplasmatischen Domänen auf die Lokalisation von Tricellulin

Zur Charakterisierung der beschriebenen, stabil transfizierten MDCK C11-Klone wurde zunächst die Expression der FLAG₃-getaggtten Tricellulin-Konstrukte, sowie die der Tight Junction-Proteine ZO-1, Tricellulin (endogen) und Occludin im Western Blot analysiert. Konfluent gewachsene Zellen wurden dafür lysiert, die Lysate elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und die Immundetektion mit den entsprechenden Antikörpern durchgeführt.

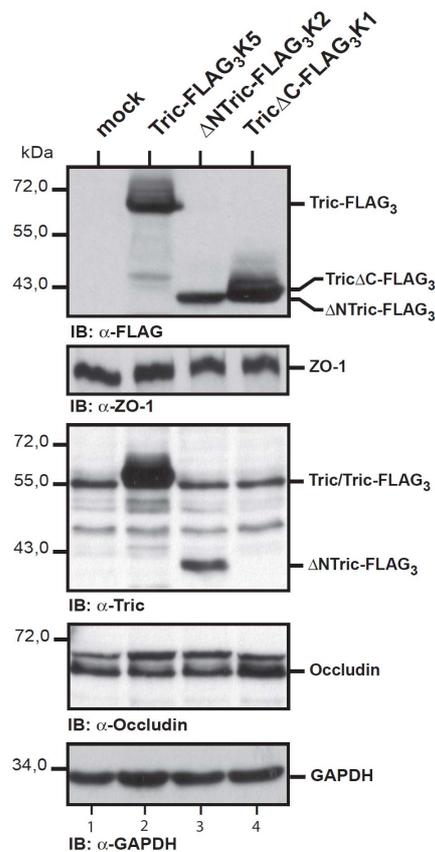


Abb. 10: Analyse der Protein-Expression in stabil mit Tricellulin-Konstrukten transfizierten MDCK C11-Klonen. Die Expression der FLAG₃-getaggtten Tricellulin-Konstrukte wurde im Western Blot mit anti-FLAG-M2 monoklonalem Antikörper nachgewiesen. Die zellulären Proteine ZO-1, Tricellulin und Occludin wurden mit den entsprechenden Antikörpern detektiert. Es wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein aufgetragen, GAPDH diente als Ladekontrolle.

Wie in Abb. 10 erkennbar, exprimieren die untersuchten stabil transfizierten MDCK C11-Zellen die FLAG₃-getaggtten Tricellulin-Konstrukte (Spuren 2, 3 und 4). Das Lysat mock-transfizierter Klone dagegen zeigte, wie erwartet, kein FLAG-Signal (Spur 1). Der Nachweis der Tight Junction-Proteine ZO-1, Tricellulin und Occludin in den Lysaten mit Tricellulin-Konstrukten transfizierter Klone zeigt im Vergleich zur Leervektorkontrolle, dass die Überexpression von FLAG₃-getaggtten Tricellulin-Konstrukten keinen signifikanten Einfluss

auf die Expressionslevel dieser Tight Junction-Komponenten ausübt. Die Vergleichbarkeit der aufgetragenen Proteinmengen ist an den vergleichbaren GAPDH-Signalen zu erkennen.

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob die cytoplasmatischen Domänen von Tricellulin einen Einfluss auf die zelluläre Lokalisation dieses Tight Junction-Proteins haben.

Dazu wurden die oben beschriebenen stabilen MDCK C11-Klone auf mit Kollagen A beschichteten Deckgläschen ausgesät. Die konfluent gewachsenen Zellen wurden nach 24 h entweder mit Methanol (Abb. 11) oder mit Formaldehyd (Abb. 12A) fixiert. In der anschließenden Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen mit anti-FLAG-M2 und anti-ZO-1 Antikörper angefärbt, wobei letzterer als Tight Junction-Marker diente. Auf diese Weise wurde die Verteilung der Tricellulin-FLAG₃-Konstrukte in den Zellen festgestellt und ermittelt, ob eine Co-Lokalisation mit ZO-1 an den Tight Junctions zu beobachten war. Die Analyse der gefärbten Zellen erfolgte an einem konfokalen Mikroskop LSM 510 (Zeiss).

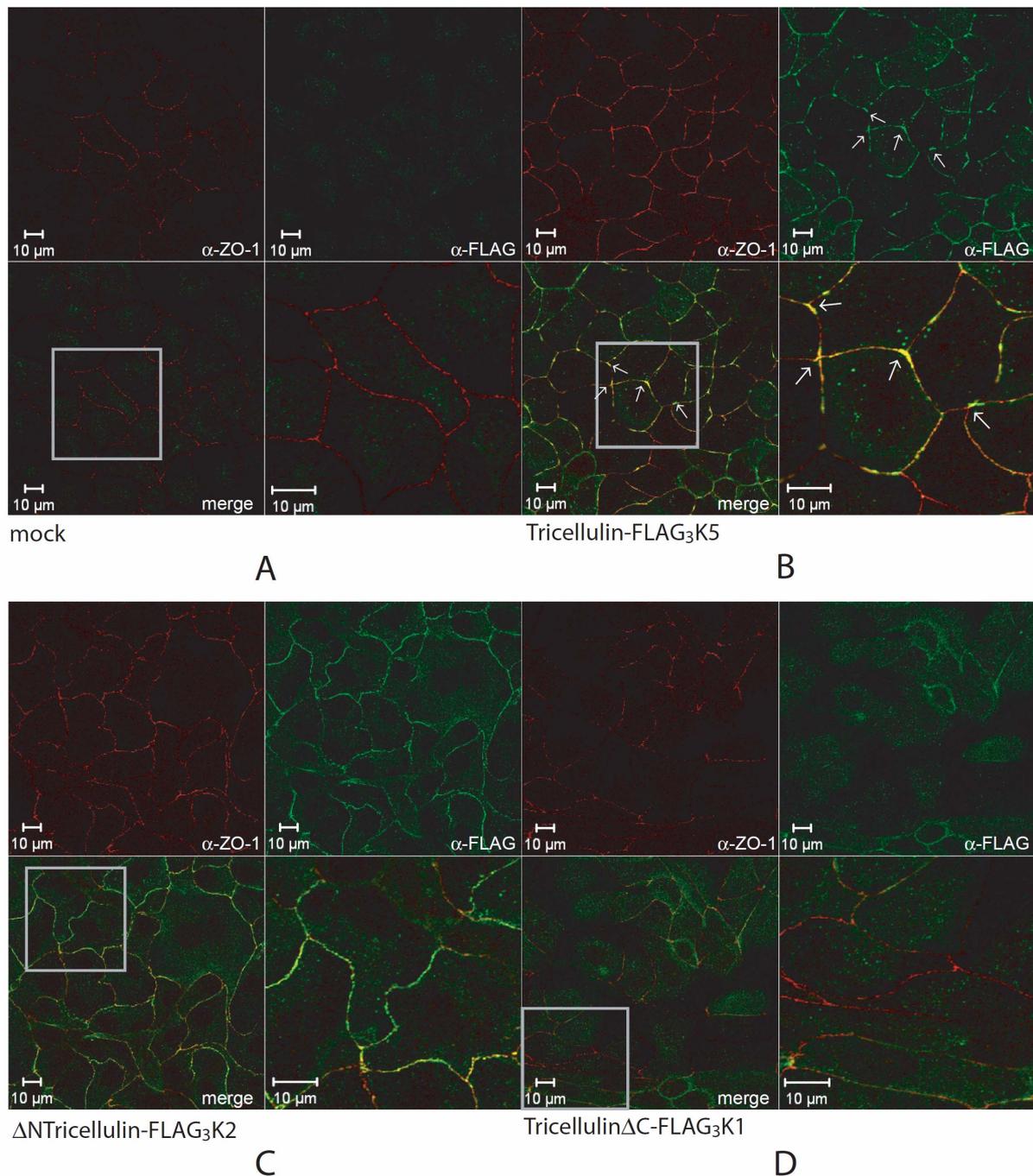


Abb. 11: Der Einfluss der cytoplasmatischen Domänen von Tricellulin auf dessen Lokalisation in der Zelle. Die stabil transfizierte MDCK C11-Zellen wurden mit Methanol fixiert. Die anschließende immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Lokalisation der FLAG₃-getaggten Tricellulin-Konstrukte erfolgte mit anti-FLAG-M2 Antikörper und ist in grün dargestellt. Die zelluläre Verteilung von ZO-1 wurde mit einem anti-ZO-1 Antikörper nachgewiesen (rot). Die überlagerten Darstellungen zeigen jeweils eine Co-Lokalisation der Tricellulin-FLAG₃-Konstrukte mit ZO-1 an den Tight Junctions. **(A)** Mock-transfizierte MDCK C11-Zellen. **(B)** Diskontinuierliche Verteilung von Vollängen-Tricellulin-FLAG₃ an Zell-Zell-Kontakten. **(C)** Gleichmäßige Verteilung von Δ NTricellulin-FLAG₃ über die gesamte Membran. **(D)** Tricellulin Δ C-FLAG₃ wird nur in sehr geringen Mengen an die Cytoplasmamembran transportiert. Maßstabsbalken 10 μ m. Das jeweils rechte untere Bild ist eine Vergrößerung des Ausschnitts der merge-Darstellung.

Die zelluläre Verteilung stabil exprimierter FLAG₃-getaggter Tricellulin-Konstrukte in MDCK C11-Zellen ist zunächst in Abb. 11 dargestellt. Wie erwartet ist in den mock-

transfizierten Zellen keine FLAG-Färbung an den Zell-Zell-Kontakten detektierbar (Abb. 11A). Die Membranlokalisation von ZO-1 ist dagegen deutlich zu erkennen (rot). Die Lokalisation von stark überexprimiertem Tricellulin-FLAG₃ ist in Abb. 11 in grün abgebildet. Diese weist eine ungleichmäßige Verteilung des Proteins an der Membran auf, mit Aggregationen an trizellulären Kontakten. Darüber hinaus sind „Cluster“ des Proteins an bizellulären Tight Junctions detektierbar. Die Verteilung von ZO-1 an der Membran ist in rot dargestellt und in der Überlagerung beider Kanäle ist eine Co-Lokalisation von Tricellulin-FLAG₃ und dem Tight Junction-Marker zu erkennen. Interessant ist die Beobachtung, dass schwächere Tricellulin-Überexpression dagegen zu einer Detektion ausschließlich an den tTJ führt (Tricellulin-FLAG₃K13, Abb. 12A). Die Unterschiede in der Expression von Tricellulin-FLAG₃ zeigt der Western Blot in Abb. 12B, Spuren 7 und 8.

N-Terminal deletiertes Tricellulin (Δ NTric-FLAG₃) zeigt dagegen eine gleichmäßige Membranlokalisation an bizellulären und trizellulären Tight Junctions. Es sind keine Proteinanhäufungen zu beobachten. Dagegen weist Tric Δ C-FLAG₃ eine sehr viel schwächere Membranlokalisation auf. Dieses Protein wird nur in sehr geringem Maße an die Membran transportiert, obwohl es in ähnlichen Mengen wie die anderen Tricellulin-Konstrukte exprimiert wird (Abb. 10).

Weder Δ NTric-FLAG₃ noch Tric Δ C-FLAG₃ zeigen spezifische Akkumulationen an trizellulären Tight Junctions oder Aggregationen an bizellulären Tight Junctions, sie co-lokalisieren jedoch mit ZO-1 an den Tight Junctions.

Um die vorherigen Ergebnisse zu verifizieren und auszuschließen, dass es sich bei den beobachteten Effekten um klonale Artefakte handelt, wurden weitere MDCK C11-Klone analysiert. In diesen Experimenten wurden die ausgesäten und konfluent gewachsenen stabil transfizierten MDCK C11-Klone mit Formaldehyd fixiert. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mit dem Antikörper anti-FLAG-M2. Mit dieser Fixierungsmethode kann die in Abb. 11 gezeigte zelluläre Anordnung der Tricellulin-FLAG₃ Konstrukte bestätigt werden (Abb. 12A).

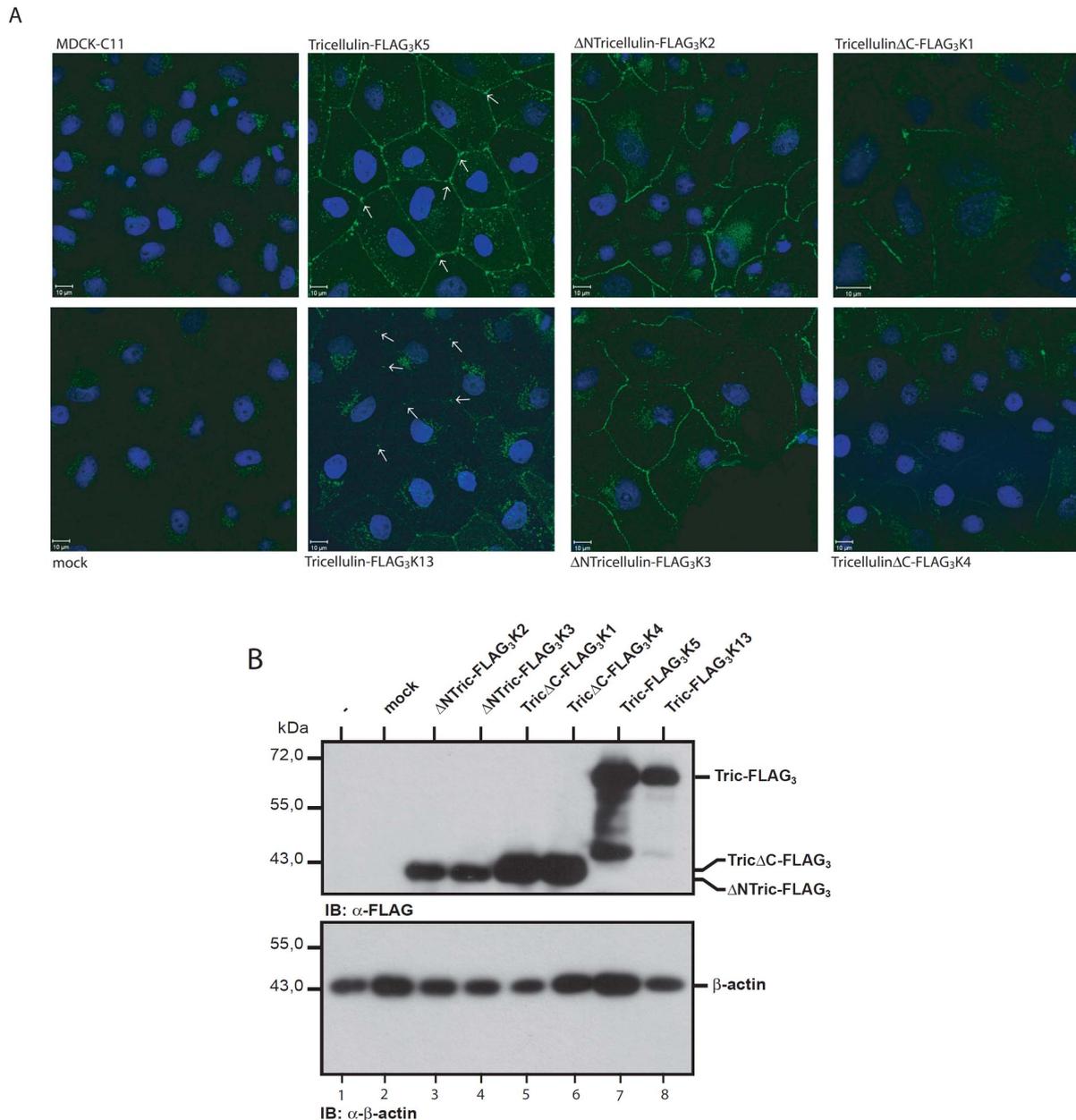


Abb. 12: Lokalisation und Expression von FLAG₃-getaggten Tricellulin-Konstrukten in stabil transfizierten MDCK C11-Klonen. (A) Die MDCK C11-Klone wurden mit Formaldehyd fixiert und Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt, wobei die Tricellulin-FLAG₃-Konstrukte mit anti-FLAG-M2 Antikörper (grün) und die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt wurden. Maßstabsbalken 10 μm. (B) Western Blot der Lysate der beschriebenen Klone zur Analyse der Expression der FLAG₃-getaggten Tricellulin-Konstrukte. β-Actin diene als Ladekontrolle.

Alle weiteren Versuche wurden mit den Klonen Tricellulin-FLAG₃K5, ΔNTricellulin-FLAG₃K2 und TricellulinΔC-FLAG₃K1 durchgeführt.

3.3.2 Expression von Tricellulin-Konstrukten in HEK293-Zellen

Zur Prüfung der Lokalisation von FLAG₃-Tricellulin, FLAG₃-ΔNTricellulin, FLAG₃-TricellulinΔC und FLAG₃-ΔNTricellulinΔC in HEK293-Zellen, wurden diese zunächst mit den entsprechenden Vektoren transient transfiziert, mit Methanol fixiert und mit anti-FLAG-M2 Antikörper immungefärbt.

Die Analyse der Zellen erfolgte am konfokalen Mikroskop. Es zeigte sich, dass die mit einem N-terminal FLAG₃-Peptid versehenen Konstrukte Tricellulin und ΔNTricellulin gleichmäßig an der Membran lokalisiert sind. Daneben sind große Mengen an Protein im Cytosol detektierbar. TricellulinΔC zeigt eine schwächere Färbung der Membran, aber ebenfalls starke intrazelluläre Proteinakkumulationen. Im Unterschied dazu verbleibt FLAG₃-ΔNTricellulinΔC, das an beiden cytoplasmatischen Domänen deletiert ist, fast vollständig im Cytoplasma und zeigt nur eine äußerst geringe Membranlokalisation (Abb. 13).

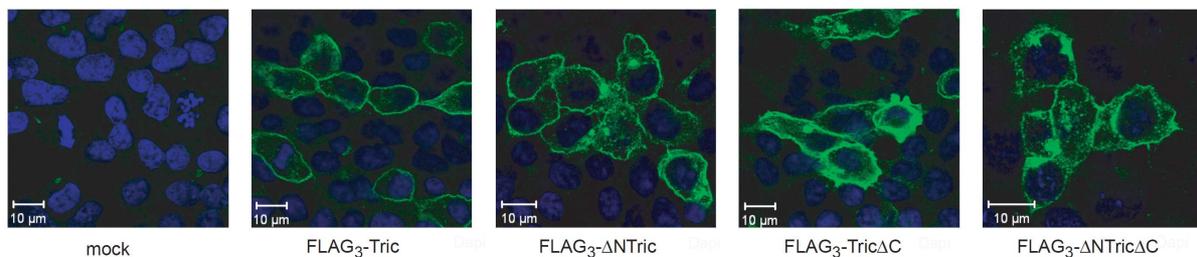


Abb. 13: Lokalisation N-terminal FLAG₃-getaggtter Tricellulin-Konstrukte in transient transfizierten HEK293-Zellen. Die transfizierten Zellen wurden mit Methanol fixiert. Anschließend wurden die FLAG₃-getaggtten Tricellulin-Konstrukte mit anti-FLAG-M2 Antikörper und Ziege-anti-Maus-AlexaFluor488 detektiert. Sie sind in der Abbildung in grün dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau).

Über die Lokalisation von Vollängen-Tricellulin und der Tricellulin-Deletionskonstrukte innerhalb verschiedener Zelllinien hinaus, war es interessant, in weiteren Experimenten die Funktion von Tricellulin im Hinblick auf die Barrierefunktion sowie die Assemblierung von Tight Junctions zu untersuchen.

3.3.3 Funktionelle Analyse von Tricellulin und Tricellulin-Deletionsmutanten

Für funktionelle Untersuchungen an Tricellulin und den Tricellulin-Deletionsmutanten wurden die oben beschriebenen stabil transfizierten MDCK C11-Klone in Zusammenarbeit mit Dr. Susanne M. Krug (Institut für klinische Physiologie, Charité – Universitätsmedizin, Berlin) analysiert. Zum einen wurde untersucht, ob die cytoplasmatischen Domänen von Tricellulin einen Einfluss auf dessen Barrierefunktion haben. Dafür wurde der transepitheliale Widerstand von jeweils zwei Klonen gemessen, die das entsprechende Tricellulin-Konstrukt

exprimierten. Zum anderen wurde die Durchlässigkeit für Na^+ und Cl^- bestimmt, um herauszufinden, ob die Deletion des N-, oder des C-Terminus von Tricellulin einen Einfluss auf die Ionen-Permeabilität eines Epithels hat.

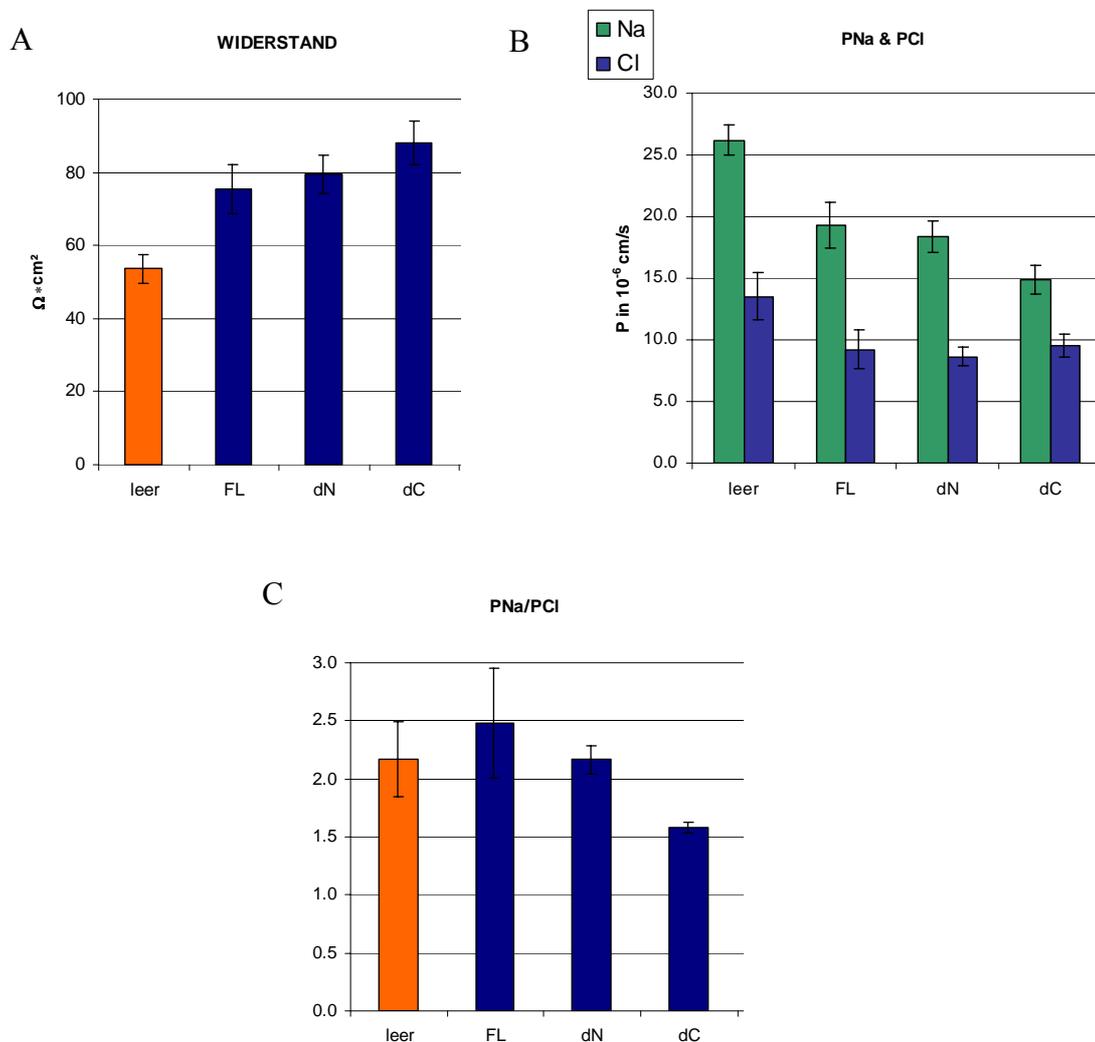


Abb. 14: Messung des transepithelialen Widerstandes und der Ionenpermeabilität von stabil mit Tricellulin-Konstrukten transfizierten MDCK C11-Klonen. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte der Messungen für die verschiedenen Klone. (A) Bestimmt wurde der transepitheliale Widerstand von Klonen, die entweder mock-transfiziert sind oder eines der folgenden Tricellulin-Konstrukte exprimieren: Tricellulin-FLAG₃, Δ NTricellulin-FLAG₃ oder Tricellulin Δ C-FLAG₃. Es wurden jeweils zwei entsprechende Klone untersucht. (B) Angezeigt sind die Permeabilitäten für Natrium-Ionen (P_{Na}), bzw. Chlorid-Ionen (P_{Cl}), die sich aus Messungen mit den beschriebenen Klonen ergeben. (C) Dargestellt ist das Verhältnis der Permeabilität von Kationen (P_{Na}) zu Anionen (P_{Cl}).

Die Experimente erfolgten in Ussing-Kammern. Hierfür wurden die MDCK C11-Klone, die stabil FLAG₃-getaggte Tricellulin-Konstrukte exprimieren auf Filtern ausgesät und die Messungen durchgeführt, sobald die Zellen eine konfluente Zellschicht ausgebildet hatten.

Abb. 14A zeigt den Einfluss der Tricellulin-Konstrukte auf die Barriereeigenschaft des Zelllayers. Im Vergleich zur mock-transfizierten Kontrolle ($53,6 \pm 10,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$) zeigten die mit Tricellulin-Konstrukten transfizierten Klone einen erhöhten Widerstand. Dabei wiesen die Zellen, die das N-, ($79,4 \pm 16,5 \Omega \cdot \text{cm}^2$) bzw. C-terminal ($87,9 \pm 16,8 \Omega \cdot \text{cm}^2$) deletierte Tricellulin-Konstrukt exprimieren, ähnliche TER-Werte auf wie die Zellen, die mit FLAG₃-getagtem Volllänge Tricellulin ($75,4 \pm 17,5 \Omega \cdot \text{cm}^2$) transfiziert worden waren.

Die Überexpression von Tricellulin oder Tricellulin-Deletionskonstrukten resultiert daher in einer verminderten Ionen-Permeabilität, was zur Bildung eines Epithels mit gesteigerter Dichte führt. Demzufolge hat Tricellulin einen abdichteten Effekt auf die Barriereeigenschaft eines Epithels, die cytoplasmatischen Domänen sind dafür aber nicht verantwortlich.

Die gezeigte Veränderung des transepithelialen Widerstandes ließ die Frage aufkommen, ob die Überexpression von Tricellulin, bzw. Tricellulin-Mutanten die Durchlässigkeit des Epithels für verschieden geladene Ionen fördert oder reprimiert. Die Bestimmung der Permeabilitäten erfolgte mittels Dilutionspotential Messungen.

Die ermittelten Werte für die Na⁺ bzw. Cl⁻-Permeabilitäten im Detail zeigen, dass alle Tricellulin-Klone gegenüber der Leervektorkontrolle eine Abdichtung gegen Natrium-Ionen und Chlorid-Ionen aufwiesen (Abb. 14B, Tab. 7), wobei die Durchlässigkeit für Kationen bei allen Klonen größer ist als die für Anionen. Diese Ergebnisse zeigten, dass stark überexprimiertes Tricellulin, das an den bizellulären Tight Junctions lokalisiert ist, die Permeabilität für Ionen herabsetzt. Die cytoplasmatischen Termini von Tricellulin scheinen keine Funktion bezüglich der Ionen-Permeabilität eines Epithels zu haben.

Tab. 7: Gemessene Werte der Ionenpermeabilitäten der analysierten MDCK C11-Klone.

Konstrukt	P _{Na} [cm/s]	P _{Cl} [cm/s]
Leervektorkontrolle	$26,6 \pm 3,3 \cdot 10^{-6}$	$13,5 \pm 5,0 \cdot 10^{-6}$
Tricellulin-FLAG ₃	$19,3 \pm 4,9 \cdot 10^{-6}$	$9,2 \pm 4,1 \cdot 10^{-6}$
Δ NTricellulin-FLAG ₃	$18,4 \pm 3,9 \cdot 10^{-6}$	$8,7 \pm 2,3 \cdot 10^{-6}$
Tricellulin Δ C-FLAG ₃	$14,9 \pm 3,3 \cdot 10^{-6}$	$9,5 \pm 2,7 \cdot 10^{-6}$

Die Verhältnisse von Kationen- zu Anionen-Permeabilität bei den Kontrollzellen ($2,2 \pm 0,8$) im Vergleich zu allen anderen gemessenen Klonen sind ähnlich (Abb. 14C), wobei der Wert der Messungen der Klone, die Tricellulin Δ C-FLAG₃ ($1,6 \pm 0,1$) exprimieren etwas niedriger ist als die Werte jener Klone, die Tricellulin-FLAG₃ ($2,5 \pm 1,2$) oder Δ NTricellulin-FLAG₃ ($2,2 \pm 0,4$) exprimieren. Der Unterschied ist allerdings nicht signifikant. Dies deutet darauf hin, dass sich die Ladungspräferenz weder durch Überexpression von Tricellulin-FLAG₃ noch von Tricellulin-Deletionskonstrukten verschiebt und die cytoplasmatischen Domänen von Tricellulin keinen Einfluss auf die Ladungselektivität haben.

3.3.4 Einfluss der N- und C-terminalen Deletionen von Tricellulin auf die Assemblierung von Tight Junctions

Mit den folgenden Versuchen, die in Zusammenarbeit mit Max Dörfel durchgeführt wurden, wurde untersucht, ob die Deletion der cytoplasmatischen Domänen von Tricellulin einen Einfluss auf die Assemblierung der Tight Junctions hat. Dafür wurden die oben beschriebenen MDCK C11-Klone auf Deckgläschen ausgesät und in Medium mit normalem Calcium-Gehalt (NC) bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert (24 h). Dann wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 90 min in Medium mit geringem Calcium-Gehalt (LC) inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach dem Wechsel des Mediums wurden die Zellen mit Methanol fixiert und mit anti-FLAG-M2 und anti-ZO-1 Antikörper immungefärbt. In Abb. 15A (T= 0 min) ist die Lokalisation von Tricellulin-FLAG₃ vor dem Calcium-Entzug dargestellt. Nach 30 min (t= 30 min) Inkubation in LC-Medium sind die Tight Junctions vollständig aufgelöst, weder ZO-1 noch Tricellulin-FLAG₃ können an der Membran detektiert werden. Nach Zugabe von Calcium-haltigen Medium konnte die Ausgangssituation wieder hergestellt werden, ZO-1 und Tricellulin-FLAG₃ sind an der Membran lokalisiert. Die Tricellulin-Deletionskonstrukte zeigen ein ähnliches Verhalten (Abb. 15B). Auch in den Klonen, die Δ NTricellulin-FLAG₃ oder Tricellulin Δ C-FLAG₃ exprimieren, sind die Tight Junctions nach 30-minütigem Calcium-Entzug vollständig aufgelöst. Die Tight Junctions wurden durch die Zugabe von Calcium wieder ausgebildet. Allerdings scheint die vollständige Wiederanordnung von Δ NTricellulin-FLAG₃ an der Membran im Vergleich zu Tricellulin-FLAG₃ etwas verzögert zu sein. (Abb. 15B, t*= 120 min). Welcher Mechanismus diesem minimalen Effekt zu Grunde liegt ist bisher jedoch nicht bekannt.

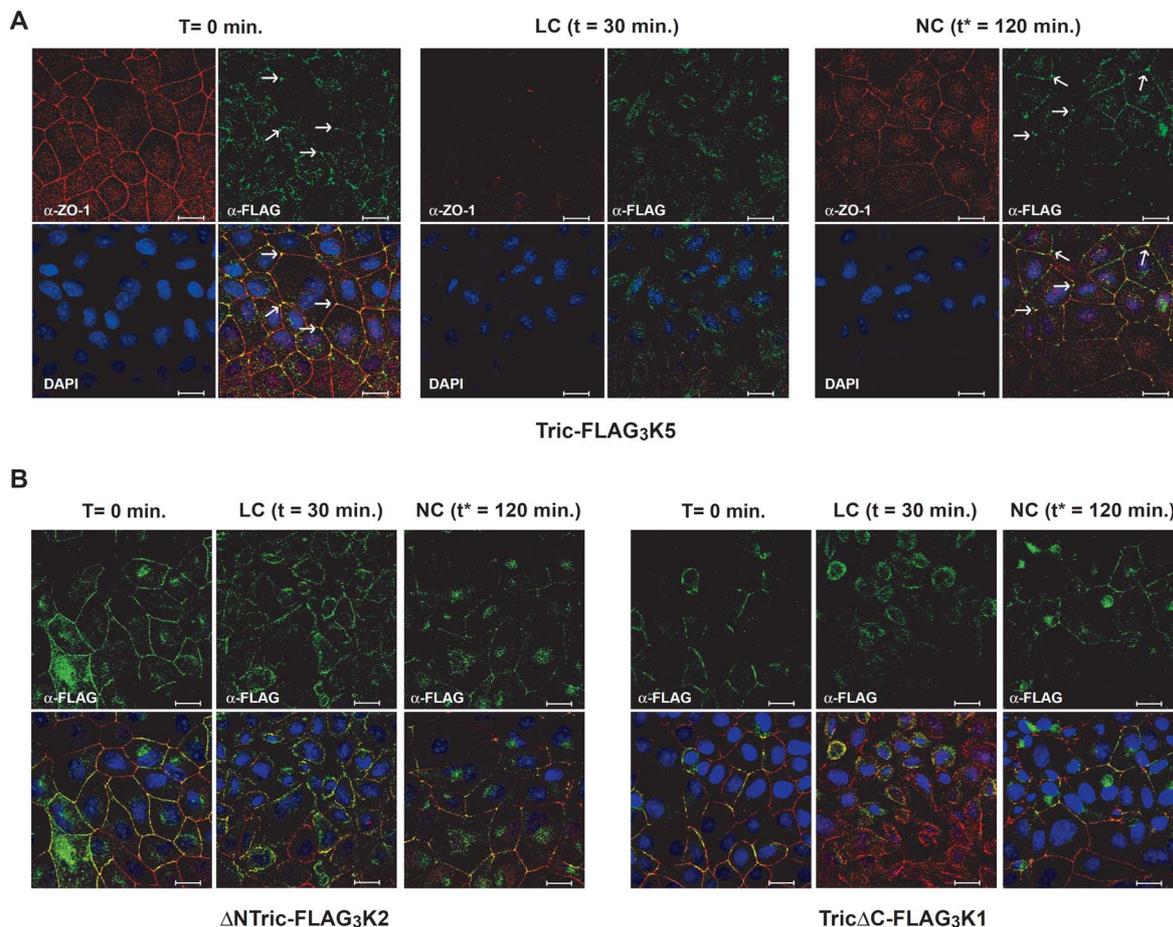


Abb. 15: Calcium-Switch Experimente mit stabil Tricellulin-FLAG₃, Δ NTricellulin-FLAG₃ oder Tricellulin Δ C-FLAG₃ exprimierenden MDCK C11-Klonen. Die Zellen wurden bis zur vollständigen Konfluenz in Medium mit normalem Calcium-Gehalt (NC) kultiviert. Nach 24 h wurde zu Medium mit geringem Calcium-Gehalt (LC) gewechselt. Nach 90 min Inkubation wurde wieder zu Medium mit normalem Calcium-Gehalt (NC) gewechselt. Zu den angezeigten Zeitpunkten wurden die Zellen mit Methanol fixiert und mit anti-FLAG-M2 (grün) und anti-ZO-1 Antikörper (rot) immungefärbt, die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. **(A)** Tricellulin-FLAG₃ exprimierender MDCK C11-Klon. **(B)** MDCK C11-Zellen, die stabil Δ NTricellulin-FLAG₃ oder Tricellulin Δ C-FLAG₃ exprimieren. Maßstabsbalken 20 μ m.

3.4 Untersuchungen zur Komplexbildung von Tricellulin

In der kurzen Zeit, seit der Tricellulin bekannt ist, wurden nur wenige Studien hinsichtlich der Interaktionseigenschaften von Tricellulin durchgeführt. Aufgrund der Tatsache, dass Tricellulin an den Tight Junctions eine relativ basale Lokalisation aufweist, (Ikenouchi *et al.*, 2005) sollte der Hypothese nachgegangen werden, dass Tricellulin in der Lage ist homophile Interaktionen einzugehen. Weiterhin lässt auch die Homologie der Aminosäuresequenz der C-Termini von Tricellulin und Occludin vermuten, dass Tricellulin ebenso wie Occludin in der Lage ist, homomere Komplexe auszubilden. Um eine derartige Protein-Protein-Wechselwirkung nachzuweisen, wurden Co-Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt.

3.4.1 Nachweis von homomeren Tricellulin-Tricellulin-Interaktionen

Zur Identifikation von potenziellen Tricellulin-Tricellulin-Wechselwirkungen wurden HEK293-Zellen transient mit HA-getagtem Vollängen-Tricellulin und in verschiedenen Kombinationen mit FLAG₃-getagkten Tricellulin-Konstrukten (FLAG₃-Tricellulin, FLAG₃-ΔNTricellulin, FLAG₃-TricellulinΔC und FLAG₃-ΔNTricellulinΔC) transfiziert. Nach der Lyse der Zellen wurden die FLAG₃-getagkten Tricellulin-Proteine über das 3×FLAG-Tag mit anti-FLAG-M2 Antikörper an Protein A-Sepharose gebunden und durch Zentrifugation sedimentiert. Die co-präzipitierten Proteine wurden über SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Abb. 16A zeigt, dass Co-Immünpräzipitate nachweisbar waren, wenn HA-getagktes Tricellulin in Kombination mit FLAG₃-Tricellulin transfiziert wurde (Spur 3).

Aus früheren Studien war bekannt, dass die Homodimerisierung von Occludin über dessen C-terminale cytoplasmatische Domäne vermittelt wird (Blasig *et al.*, 2006). Daher sollte herausgefunden werden, ob in Analogie zu Occludin der C-Terminus von Tricellulin an der beobachteten Komplexbildung beteiligt ist. Um dies zu überprüfen, wurden FLAG₃-ΔNTricellulin oder FLAG₃-TricellulinΔC mit HA-Tricellulin co-transfiziert und Co-Immünpräzipitationsexperimente wie oben beschrieben durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass sowohl FLAG₃-ΔNTricellulin (Spur 6) als auch FLAG₃-TricellulinΔC (Spur 9) mit Volllänge HA-Tricellulin in einem Komplex vorliegen.

Dieser Befund kann derart interpretiert werden, dass möglicherweise eine der cytoplasmatischen Domänen ausreicht, um die Interaktion zu vermitteln, oder dass keine der cytoplasmatischen Termini für die Bildung von Tricellulin-Homomeren notwendig ist.

Die letztere Vermutung wurde bestätigt, da HA-Tricellulin auch mit FLAG₃-ΔNTricellulinΔC assoziiert (Spur 12). Bei diesem Konstrukt wurden beide cytoplasmatischen Domänen deletiert. In den Kontrollansätzen, bei denen jeweils nur eines der verwendeten Konstrukte transfiziert wurde (Spuren 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 und 11), ist keine Protein-Protein-Interaktion nachweisbar.

In weiteren Versuchen erwies sich, dass HA-TricellulinΔC mit allen verwendeten FLAG₃-Tricellulin-Konstrukten homomere Komplexe ausbildet (Abb. 16B, Spuren 3, 6, 9 und 12). Dies festigte die Theorie, dass die gezeigte Selbstassoziation nicht über die cytoplasmatischen Termini vermittelt wird.

Die Beobachtung, dass die Homomerisierung von Tricellulin nicht von dessen C-cytoplasmatischen Domäne abhängig ist, konnte in einem weiteren Versuchsansatz bestätigt werden. In *in vitro*-Assoziationsassays konnten keine Interaktionen zwischen der GST-getagkten C-terminalen cytoplasmatischen Domäne von Occludin und MBP-TEV-TricC nachgewiesen werden. Auch bei der Inkubation von MBP-OccC mit der GST-getagkten C-terminalen cytoplasmatischen Domäne von Tricellulin konnte keine Bindung der beiden rekombinanten Fusionsproteine detektiert werden.

Um eine Beteiligung der N- oder der C-terminalen cytoplasmatischen Domänen an der Tricellulin-Tricellulin-Interaktion vollständig auszuschließen, wurden verschieden getaggte Tricellulin-Konstrukte kloniert, die N- und C-terminal deletiert waren. Mit diesen wurden HEK293-Zellen transient transfiziert und Co-Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt, bei denen FLAG₃- Δ NTricellulin Δ C über anti-FLAG-M2 Antikörper präzipitiert wurde. In diesen Experimenten war es möglich, myc₆-getaggtetes Δ NTricellulin Δ C zu co-präzipitieren und im Western Blot zu detektieren (Abb. 16C).

Die in diesem Ansatz verwendeten Tricellulin-Mutanten bestehen nur aus den Transmembrandomänen und den Loops. Sie sind in der Lage, Komplexe zu formen. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Selbstassoziation von Tricellulin entweder über dessen Transmembrandomänen oder über die extrazellulären Loops vermittelt wird.

Die Expression der entsprechenden FLAG₃-, HA- oder myc₆-getaggten Konstrukte in den Zell-Lysaten wurde anhand von Transfektionskontrollen überprüft und die Vergleichbarkeit der für die Co-Immunpräzipitationen eingesetzten Proteinmengen kann durch den β -Actin-Blot bestätigt werden (Abb. 16).

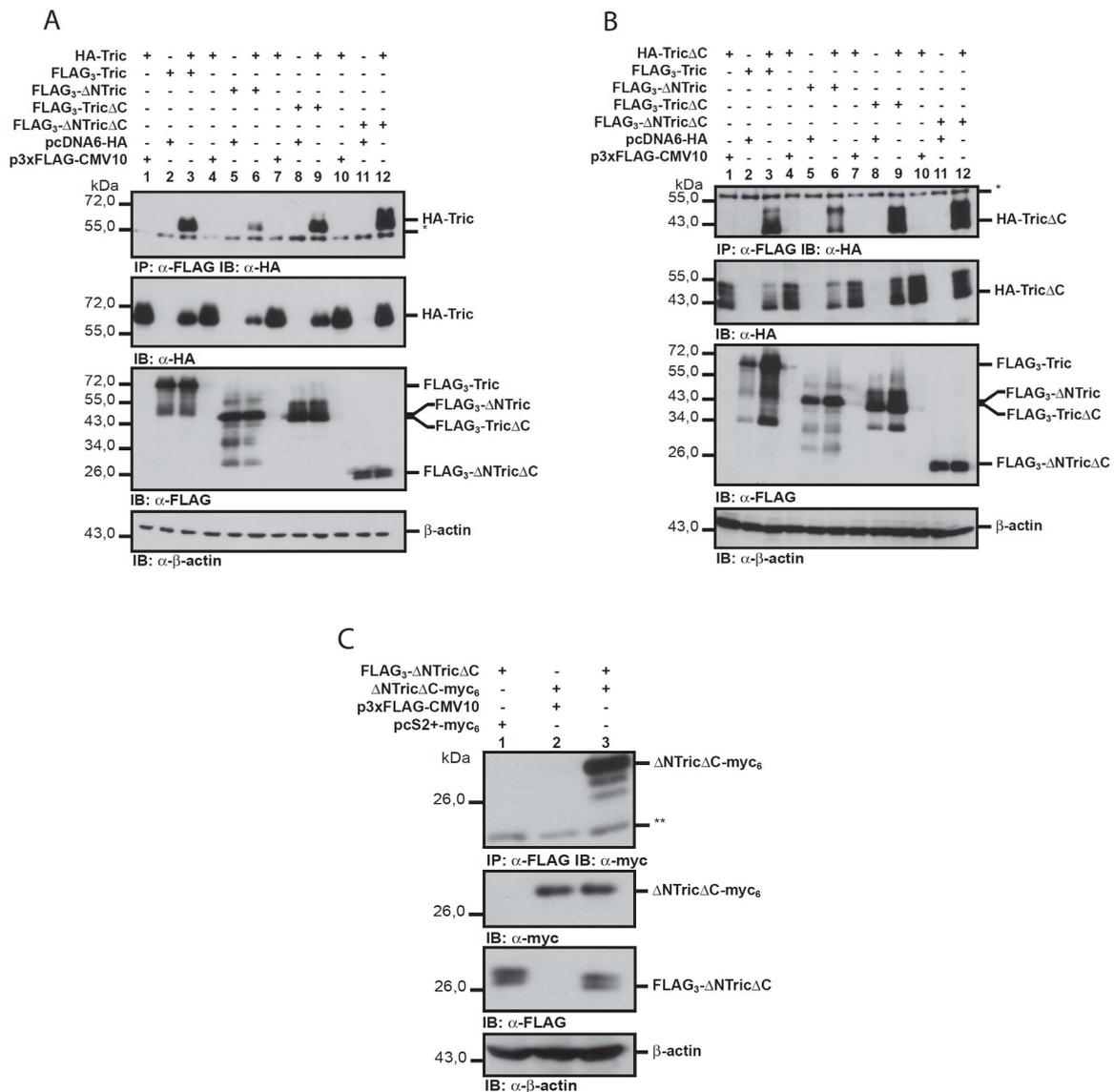


Abb. 16: Tricellulin und Tricellulin-Deletionskonstrukte bilden homomere Protein-Komplexe aus. HEK293-Zellen wurden mit HA-Tricellulin (A) oder HA-TricellulinΔC (B) in verschiedenen Kombinationen mit FLAG₃-getaggten Tricellulin, ΔNTricellulin, TricellulinΔC oder ΔNTricellulinΔC transient transfiziert (jeweils 2 μg Plasmid). Die Immunpräzipitation der FLAG₃-getaggten Tricellulin-Konstrukte erfolgte mit anti-FLAG-M2 Antikörper (2 μg). Co-präzipitiertes HA-Tricellulin (A, Spur 3, 6, 9 und 12) oder HA-TricellulinΔC (B, Spur 3, 6, 9 und 12) wurde mit anti-HA-6E2 Antikörper detektiert. (C) Die Interaktion von Tricellulin-Konstrukten mit N- und C-terminal deletierten cytoplasmatischen Domänen wurde mittels Co-Immunpräzipitation transient transfizierter HEK293-Lysate gezeigt. Die IP wurde mit anti-FLAG-M2 Antikörper (2 μg) durchgeführt und die Detektion erfolgte mit dem Antikörper anti-myc (9E2). *schwere und **leichte Ketten der Antikörper

Die Interaktion zwischen Tricellulin-Molekülen, die in Co-Immunpräzipitationsexperimenten gezeigt werden konnte, sollte im Folgenden in einem alternativen Versuchsansatz analysiert werden.

3.4.2 Bestätigung der homomeren Komplexbildung durch Fluorescence resonance energy transfer (FRET)-Experimente

Für die in Kooperation mit der AG Blasig (FMP Berlin-Buch) durchgeführten FRET-Messungen wurden konfluent gewachsene MDCK II-Zellen (eine niederohmige Hund-Nierenzelllinie) transient mit YFP-Tricellulin und CFP-Tricellulin oder YFP-Tricellulin und Tricellulin-CFP co-transfiziert. Die Membran-Lokalisation der Fusionsproteine kann mit Hilfe des Zellmembranmarkers Trypan Blau (rot) gezeigt werden (Abb. 17A), YFP-Tricellulin (grün) und Tricellulin-CFP (blau) co-lokalisieren über die gesamte Membran verteilt an den Zell-Zell-Kontakten. Die FRET-Effizienz zwischen zwei transfizierten Zellen wurde bestimmt. Dazu wurden die CFP-Fluoreszenzsignale vor und nach Akzeptor (YFP) Photo-Bleaching verglichen.

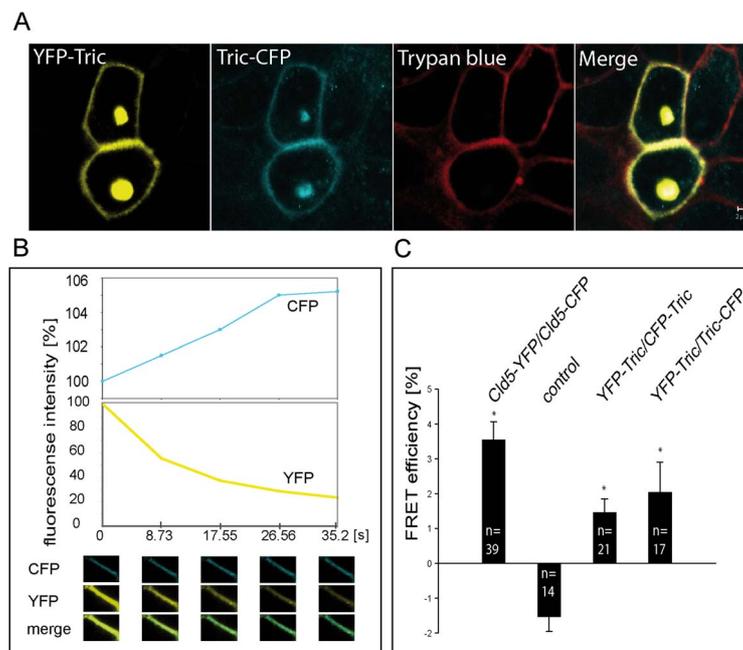


Abb. 17: Lokalisation und homophile Interaktionen von transient transfiziertem Tricellulin in MDCK II-Zellen. (A) Fluoreszenz-Darstellung lebender MDCK II-Zellen, die mit YFP-Tricellulin (gelb) und Tricellulin-CFP (blau) co-transfiziert wurden. Die Plasmamembran wurde mit Trypan Blau angefärbt (rot). Die Fusionsproteine weisen Membranlokalisation auf und co-lokalisieren (Merge). Die Fusionsproteine scheinen an den Kontaktstellen zwischen zwei Zellen angereichert zu sein. Maßstabsbalken 2 μ m. (B) FRET mit Hilfe von Akzeptor Photo-Bleaching. Im Bereich von Zell-Zell-Kontakten wurde die CFP Fluoreszenz vor und nach YFP-Photo-Bleaching bestimmt. Eine repräsentative Zeitreihe ist im unteren Teil der Abbildung dargestellt und die Fluoreszenzintensitäten sind im oberen Bereich der Abbildung zu sehen. (C) Die FRET-Effizienz von MDCK II-Zellen, die Cld-5-YFP/Cld-5-CFP exprimieren diente als Positivkontrolle. Die FRET-Effizienz von MDCK II-Zellen, die YFP-Tricellulin und CFP-Tricellulin oder YFP-Tricellulin und Tricellulin-CFP exprimieren war signifikant höher als die FRET-Effizienz der Negativkontrolle.

In früheren Studien konnte eine Selbstassoziation von Claudin-5 gezeigt werden (Blasig *et al.*, 2006; Piontek *et al.*, 2008). Daher war es möglich, das FRET-Signal ($3,56 \pm 0,5 \%$) von Zellen, die mit Cld-5-YFP und Cld-5-CFP co-transfiziert wurden, als Positivkontrolle zu nutzen. Als Negativkontrolle wurden die zusammengefassten FRET-Signale ($-1,5 \pm 0,4 \%$) von Zellen, die mit CRFR-1-YFP und CFP-Tricellulin oder CRFR-1-YFP und Tricellulin-CFP transfiziert waren herangezogen. Bei CRFR handelt es sich um den Corticotropin-Releasing Factor Receptor. MDCK II-Zellen, die CFP-Tricellulin und YFP-Tricellulin ($1,5 \pm 0,4 \%$) oder Tricellulin-CFP und YFP-Tricellulin ($2,0 \pm 0,9 \%$) exprimieren zeigen eine signifikant höhere FRET-Effizienz als die Negativkontrolle (Abb. 17B).

Diese Daten bestätigen das in den biochemischen Untersuchungen beobachtete Vorliegen von Proteinkomplexen zwischen Tricellulin-Molekülen. Bei den in den FRET-Experimenten nachgewiesenen Komplexen handelt es sich folglich um laterale cis-Komplexe.

Für weitere Analysen wurden MDCK C11-Zellen, die entweder Tricellulin-FLAG₃ oder HA-Tricellulin exprimieren gemischt und Co-Immunpräzipitationen durchgeführt. Dabei konnten keine trans-Interaktionen zwischen Tricellulin-Molekülen nachgewiesen werden, was ein weiterer Hinweis für die aufgrund der FRET-Experimente vorgeschlagene cis-Interaktion ist.

3.5 Heteromerisierung von Tricellulin und Occludin

Neben der strukturellen Analogie von Tricellulin und Occludin ist beschrieben, dass der Knock-Down von Tricellulin die Organisation trizellulärer Tight Junctions ebenso beeinflusst wie die Lokalisation von Occludin an bizellulären Tight Junctions (Ikenouchi *et al.*, 2005). Umgekehrt verhindert das Fehlen von Occludin die spezifische Lokalisierung von Tricellulin an trizellulären Kontakten und fördert dessen Lokalisation an bTJ (Ikenouchi *et al.*, 2008). Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass die Proteine sich gegenseitig funktionell beeinflussen. Die sequenzielle Homologie von Tricellulin und Occludin lässt zusätzlich vermuten, dass Tricellulin in der Lage ist, mit Occludin Protein-Protein-Wechselwirkungen auszubilden. Ob dies der Fall ist, wurde in den nachfolgend beschriebenen Versuchen untersucht.

3.5.1 Tricellulin bildet heteromere Komplexe mit Occludin

Zum Nachweis der vermuteten heteromeren Proteinkomplexe wurden HEK293-Zellen transient mit HA-getagtem Occludin und den verschiedenen FLAG₃-getagten Tricellulin-Konstrukten transfiziert. Die Lyse erfolgte nach 48 h mit RIPA-Puffer. In Co-Immunpräzipitationsexperimenten mit anti-FLAG-M2 Antikörper konnten die Tricellulin-Konstrukte über Protein A-Sepharose-Beads Protein-Komplexe sedimentiert und über SDS-PAGE und Western Blot Analyse nachgewiesen werden. Dabei konnten Protein-Komplexe aus HA-Occludin und FLAG₃-Tricellulin (Spur 3), FLAG₃- Δ NTricellulin (Spur 6), FLAG₃-Tricellulin Δ C (Spur 9) oder FLAG₃- Δ NTricellulin Δ C (Spur 12) detektiert werden (Abb. 18).

In Kontrollansätzen, in denen nur jeweils eines der verwendeten Konstrukte transfiziert worden war, konnten keine Interaktionen detektiert werden, wie in den Spuren 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 und 11 zu sehen ist. Die unteren drei Blots zeigen die Lysatkontrollen, wobei β -Actin als Ladekontrolle diente.

Die Co-Präzipitation von Occludin und Tricellulin bestätigte die Annahme, dass diese beiden Tight Junction-Proteine miteinander interagieren. Da auch N-, oder C-terminal deletierte Tricellulin-Proteine mit Vollängen-Occludin assoziierten, kann man schlussfolgern, dass die cytoplasmatischen Domänen, in Analogie zu der homomeren Tricellulin-Tricellulin-Assoziation, nicht an der Wechselwirkung zwischen Occludin und Tricellulin beteiligt sind.

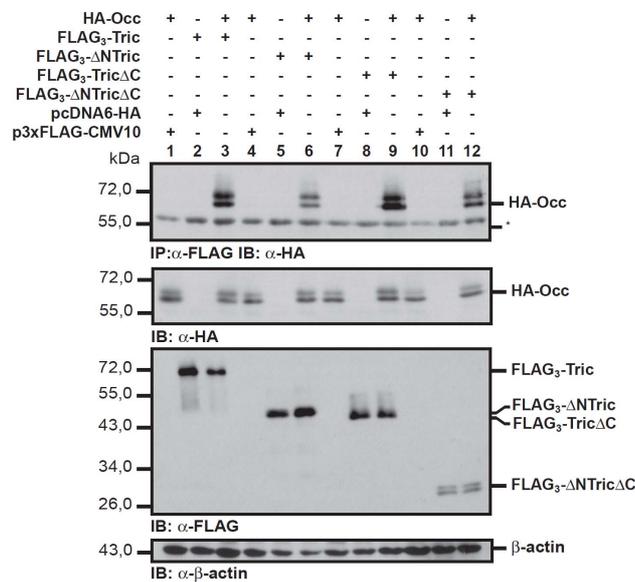


Abb. 18: Tricellulin bildet heteromere Komplexe mit Occludin. HEK293-Zellen wurden transient mit den angezeigten Kombinationen aus HA-getaggttem Occludin und FLAG₃-getaggtten Tricellulin-Konstrukten transfiziert (jeweils 2 μ g Plasmid). Die FLAG₃-getaggtten Tricellulin-Konstrukte wurden über das 3 \times FLAG-Tag mittels anti-FLAG-M2 Antikörper präzipitiert und die Proteinkomplexe im Western Blot analysiert. Co-präzipitiertes HA-Occludin wurde mit anti-HA-62E Antikörper detektiert. Die Lysate wurden auf Expression der Konstrukte im Western Blot untersucht, wobei β -Actin als Ladekontrolle dient. *schwere Ketten der Antikörper

In den durchgeführten Versuchen konnte Occludin als Bindungspartner von Tricellulin identifiziert werden. Diese in transient transfizierten HEK293-Zellen nachgewiesene Interaktion sollte weiterhin in MDCK C11-Zellen bestätigt werden. In diesem Modellsystem sind die Bedingungen vergleichbarer mit einem nativen Epithel.

3.5.2 Interaktionen zwischen FLAG₃-getaggten Tricellulin-Konstrukten und endogenem Occludin

Im nächsten Schritt wurde versucht, mit den in Abschnitt 3.3 charakterisierten MDCK C11-Klonen, die stabil Tricellulin-FLAG₃, Δ NTricellulin-FLAG₃ oder Tricellulin Δ C-FLAG₃ exprimieren, eine Komplexbildung mit endogenem Occludin nachzuweisen. Die Expression der FLAG₃-getaggten Tricellulin-Konstrukte ist in Abb. 19 in den Spuren 1, 4 und 7 dargestellt. In den Lysaten enthaltenes endogenes Occludin wurde mit einem α -Occludin Antikörper immunpräzipitiert. Dabei zeigte sich, dass endogenes Occludin mit Volllängen-Tricellulin (Spur 3) ebenso interagiert wie mit den Deletionsmutanten (Abb. 19, Spuren 6 und 9). In Kontroll-IPs, die mit Kaninchen IgG durchgeführt wurden, konnten nur schwache unspezifische Interaktionen detektiert werden (Spuren 2, 5 und 8).

Damit wurde die Bildung von heteromeren Tricellulin-Occludin-Komplexen in einem divergenten experimentellen Ansatz bestätigt. Eine Bindung zwischen Occludin und Tricellulin-Mutanten, die N- oder C-terminal deletiert waren, ließ sich ebenfalls reproduzieren.

Dadurch kann auch zu den heteromeren Komplexen die Aussage gemacht werden, dass die gezeigten Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen Tricellulin und Occludin über die Transmembrandomänen oder die extrazellulären Loops von Tricellulin ohne die Beteiligung der cytoplasmatischen Domänen vermittelt werden.

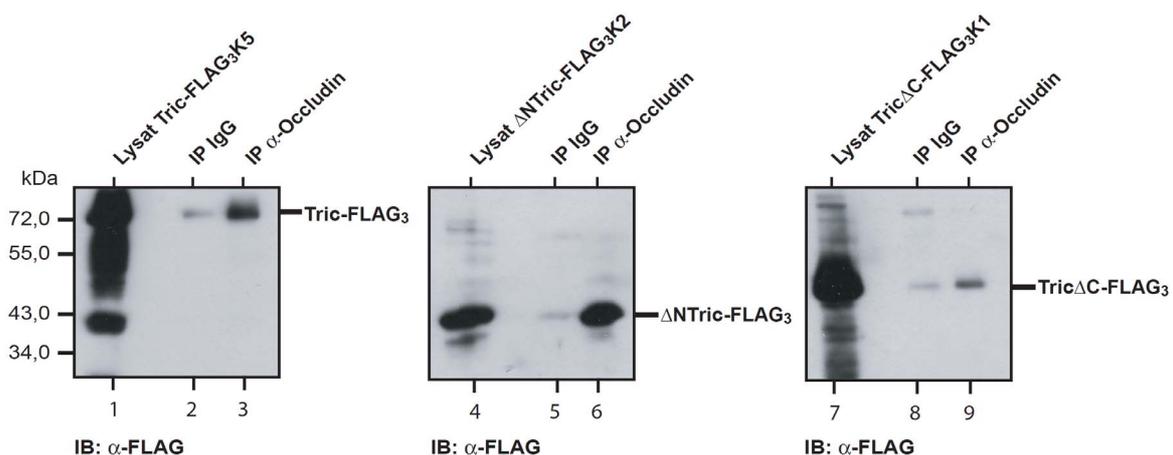


Abb. 19: Endogenes Occludin interagiert mit überexprimierten FLAG₃-getaggten Tricellulin-Konstrukten. Immunpräzipitation von endogenem Occludin aus Lysaten von MDCK C11-Zellen, die stabil die angezeigten 3×FLAG-getaggten Tricellulin-Konstrukte exprimieren. Die IP wurde mit anti-Occludin Antikörper durchgeführt und die co-präzipitierten FLAG₃-getaggten Tricellulin-Konstrukte mit anti-FLAG-M2 Antikörper detektiert. In Kontrollansätzen, die statt des Antikörpers Kaninchen-IgG enthielten, konnten nur schwache unspezifische Bindungen nachgewiesen werden.

3.5.3 Interaktion von Tricellulin mit Occludin-Deletionskonstrukten

Das Ergebnis des Experiments aus Abschnitt 3.5.1 zeigte, dass HA-getaggtetes Occludin heteromere Komplexe mit FLAG₃-getaggttem Tricellulin, ΔNTricellulin, TricellulinΔC und ΔNTricellulinΔC ausbildet. Des Weiteren können Interaktionen zwischen endogenem Occludin und Tricellulin-FLAG₃, ΔNTricellulin-FLAG₃ und TricellulinΔC-FLAG₃ in MDCK-C11 Klonen nachgewiesen werden (3.5.2). Dies belegt, dass die cytoplasmatischen Domänen von Tricellulin an der Interaktion nicht beteiligt sind. Um zu überprüfen, ob die cytoplasmatischen Domänen von Occludin an der Bindung beteiligt sind, wurde eine weitere Co-Immunpräzipitation durchgeführt.

Hierfür wurden HEK293-Zellen transient transfiziert, sodass sie in verschiedenen Kombinationen HA-Tricellulin und FLAG₃-getaggttes Occludin, ΔNOccludin oder OccludinΔC exprimierten. Abb. 20 stellt dar, dass HA-Tricellulin Komplexe sowohl mit FLAG₃-Occludin (Spur 3), als auch mit N-terminal deletiertem Occludin (Spur 6) und C-terminal deletiertem Occludin (Spur 9) ausbildet. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass die cytoplasmatischen Domänen von Occludin ebenso, wie diejenigen von Tricellulin, nicht an der Bildung heteromerer Proteinkomplexe zwischen Tricellulin und Occludin beteiligt sind. Dadurch wird die Hypothese gestützt, dass die Bindung über die Transmembrandomänen oder die extazellulären Loops beider Proteine vermittelt wird.

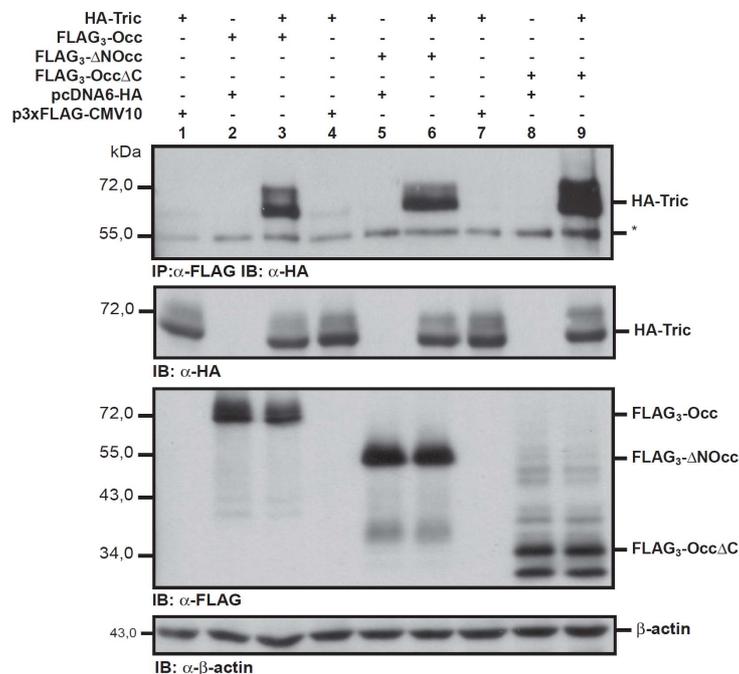


Abb. 20: Tricellulin bildet Protein-Komplexe mit N-, bzw. C-terminal deletiertem Occludin aus. Mit Lysaten von transient transfizierten HEK293-Zellen wurden Co-Immunpräzipitationen durchgeführt. Transfiziert wurden verschiedene Kombinationen von HA-getaggttem Tricellulin und FLAG₃-Occludin, FLAG₃-ΔNOccludin und FLAG₃-OccludinΔC. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit RIPA-Puffer lysiert und Co-Immunpräzipitationen mit anti-FLAG-M2 Antikörper durchgeführt. Die präzipitierten Proteinkomplexe wurden im Western Blot analysiert. Die drei unteren Blots repräsentieren die Lysatkontrollen. Sie zeigen, dass die getaggtten Proteine in vergleichbaren Mengen exprimiert werden. *schwere Ketten der Antikörper

3.6 Posttranslationale Modifikationen von Tricellulin

Bisher ist über posttranslationale Modifikationen von Tricellulin wenig bekannt. Die Beobachtungen von Ikenouchi *et al.* lassen erwarten, dass dieses Protein, ähnlich wie Occludin phosphoryliert wird (Ikenouchi *et al.*, 2005). Es ist jedoch bislang weder bekannt, welche Kinasen diese Phosphorylierung vermitteln, noch, welche Rolle und physiologische Bedeutung diese Modifikationen für die Funktion von Tricellulin haben.

Da Phosphorylierungen einen starken Einfluss auf die Regulation von Proteinen haben, könnten genauere Kenntnisse hierüber weitere Einblicke in zelluläre Signalwege geben, die an der Regulation von Tricellulin beteiligt sind.

3.6.1 Phosphorylierung von Tricellulin

In Phosphorylierungsassays wurde in Zusammenarbeit mit Max Dörfel untersucht, ob die C-terminale cytoplasmatische Domäne von Tricellulin phosphoryliert wird. Darüber hinaus wurden die Phosphorylierungsmuster der C-terminalen cytoplasmatischen Domäne von Tricellulin und Occludin verglichen. Dafür wurden rekombinant exprimierte und gereinigte GST-getaggte Fusionsproteine der C-terminalen Domänen von Occludin und Tricellulin *in vitro* mit gereinigten Kinasen (CK1, CK2, PKA und GSK-3 β) in Gegenwart von γ -[³²P]-ATP inkubiert. Die Fusionsproteine wurden über GSH-Beads isoliert und über SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert (Abb. 21). Als Ergebnis zeigte sich, dass der C-Terminus von Tricellulin im Gegensatz zu dem von Occludin nicht von CK1 und CK2 phosphoryliert wird (Abb. 21A und B). Von PKA wurden beide Fusionsproteine phosphoryliert (Abb. 21C). Allerdings konnte im *in-vitro*-Assoziationsassay keine direkte Interaktion von GST-C-cyto-Tricellulin und PKA festgestellt werden. GSK3 β zeigte keine Phosphorylierungsaktivität in Bezug auf Occludin und Tricellulin (Abb. 21D).

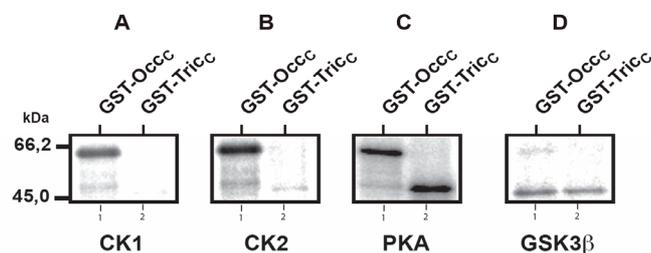


Abb. 21: Vergleich der Phosphorylierung von GST-OcclC und GST-TricC mit verschiedenen Kinasen. Die GST-getagkten cytoplasmatischen Domänen von Occludin und Tricellulin wurden mit den angezeigten Kinasen und radioaktiv markiertem ATP inkubiert, Phosphorylierungen lassen sich im Autoradiogramm als schwarze Bande detektieren.

3.6.2 Ubiquitinierung von Tricellulin

Um zu untersuchen, ob Tricellulin posttranslational durch Ubiquitin modifiziert wird, wurden MDCK C11-Klone, die entweder mock-transfiziert waren, oder stabil Tricellulin-FLAG₃, ΔNTricellulin-FLAG₃ oder TricellulinΔC-FLAG₃ exprimieren, zusätzlich transient mit einem Expressionsplasmid für HA-getaggttes Ubiquitin transfiziert. Kontrollansätze wurden transient nur mit dem Leervektor pcDNA3 transfiziert. Nach der Lyse der Zellen wurden Co-Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt und mit Hilfe des anti-FLAG-M2 Antikörpers wurden die entsprechenden FLAG₃-getaggtten Tricellulin-Konstrukte präzipitiert.

In Abb. 22A ist in der Western Blot Analyse zu sehen, dass Tricellulin kovalent mit HA-getaggttem Ubiquitin modifiziert wurde. Im Gegensatz dazu konnten die FLAG₃-getaggtten Tricellulin-Deletionskonstrukte zwar präzipitiert werden (Abb. 22B), aber eine Modifikation durch HA-Ubiquitin war nicht nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass beide cytoplasmatischen Domänen von Tricellulin für eine korrekte posttranslationale Modifikation durch Ubiquitin essenziell sind.

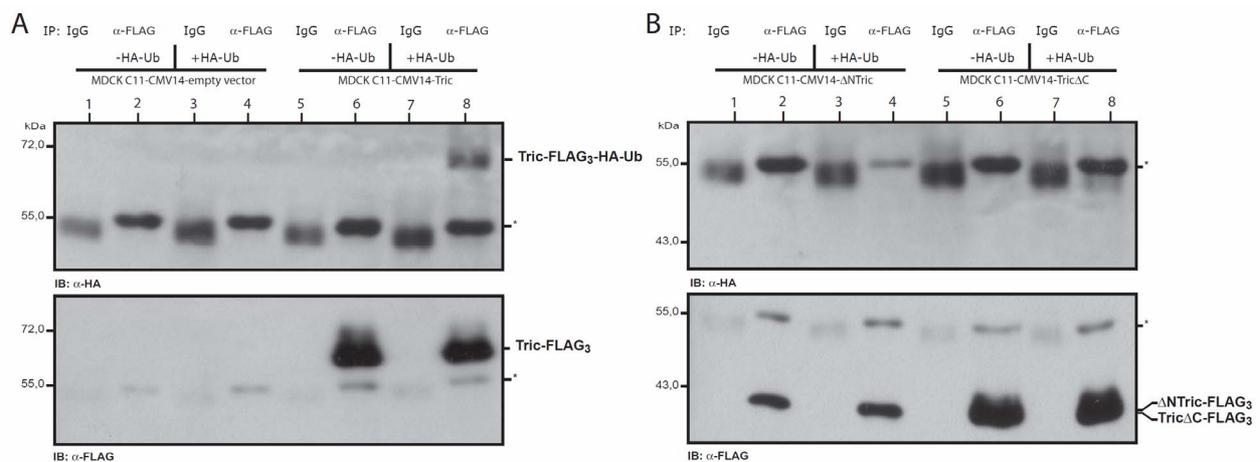


Abb. 22: Vollängen-Tricellulin wird durch HA-getaggttes Ubiquitin modifiziert. MDCK C11-Zellen, die stabil FLAG₃-getaggtte Tricellulin-Konstrukte exprimieren wurden zusätzlich transient mit HA-Ubiquitin transfiziert. Nach Lyse der Zellen wurden Co-Immunpräzipitationsexperimente mit anti-FLAG-M2 Antikörper durchgeführt. **(A)** Nachweis kovalent mit HA-Ubiquitin modifizierten FLAG₃-Tricellulin. **(B)** ΔNTricellulin-FLAG₃ und TricellulinΔC-FLAG₃ werden nicht durch HA-Ubiquitin modifiziert. *schwere Ketten der Antikörper

3.6.2.1 Untersuchungen zum proteasomalem Abbau von ubiquitiniertem Tricellulin

In den vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass Tricellulin ubiquitiniert wird. Im Folgenden sollte geklärt werden, wie sich diese posttranskriptionale Modifikation auf die Stabilität des Proteins auswirkt.

Die distinkte Bande in Abb. 22A (Spur 8), sowie deren molekulare Masse weisen darauf hin, dass Tricellulin mono-ubiquitiniert vorliegt. Dies wäre ein Hinweis darauf, dass diese Modifikation nicht, wie es unter anderem für Occludin beschrieben ist (Traweger *et al.*, 2002), dem proteasomalen Abbau dient, sondern möglicherweise eine Markierung für Endocytose und nachfolgenden lysosomalen Abbau ist. Letzteres konnte für verschiedene Claudine beobachtet werden (Matsuda *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2009).

In diesem Zusammenhang wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob durch die Behandlung mit dem Proteasomen-Inhibitor MG132 der Abbau des ubiquitinierten Tricellulins verhindert und damit eine Akkumulation des modifizierten Proteins zu beobachten ist. Hierfür wurden die beschriebenen MDCK C11-Klone zusätzlich transient mit HA-getagtem Ubiquitin transfiziert. Dabei wurde jeweils ein Ansatz der Zellen 24 h nach der Transfektion mit 50 μ M MG132 für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Lyse der Zellen wurden mit den Lysaten Co-Immunpräzipitationen durchgeführt und Tricellulin-FLAG₃ mittels anti-FLAG-M2 Antikörper präzipitiert (Abb. 23B, Spuren 8, 10 und 12). Dieser experimentelle Ansatz zeigte, dass die Inhibierung des Proteasoms zu keiner Steigerung der Menge an ubiquitiniertem Tricellulin in der Zelle führt (Abb. 23A, Spuren 10 und 12).

Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Ubiquitinierung von Tricellulin nicht mit einem Abbau durch das Proteasom in Verbindung steht, sondern wahrscheinlich eine Markierung für die Endocytose des Proteins und anschließende Degradation durch Lysosomen darstellt. In weiteren Versuchen sollte daher analysiert werden, ob Tricellulin endocytotisch internalisiert werden kann.

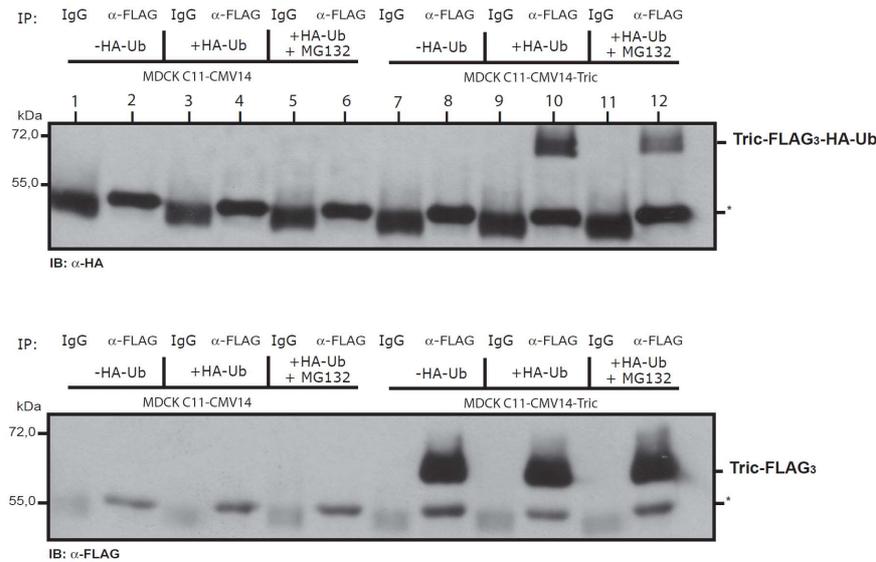


Abb. 23: Die Ubiquitinierung von Tricellulin steht nicht in Verbindung mit dem proteasomalen Abbau. Mit Hilfe von Lysaten stabil transfizierter MDCK C11-Klone, die Tricellulin-FLAG₃ exprimieren, konnte gezeigt werden, dass Tricellulin ubiquitiniert wird und dass eine Inkubation mit dem Proteasomen-Inhibitor MG132 keinen Einfluss auf den Abbau des Proteins hat. *schwere Ketten der Antikörper

3.6.2.2 Endocytose von Tricellulin

Die unter 3.6.2.1 beobachtete Ubiquitinierung von Tricellulin deutete darauf hin, dass das Protein auf diese Weise markiert wird, um dem endocytotischen Abbau- oder Recycling-Weg zugeführt zu werden. Daher wurde mittels eines Zelloberflächen-Biotinylierungs-Assays (Nishimura & Sasaki, 2008) untersucht, ob Tricellulin-FLAG₃ endocytiert wird.

Für das Experiment wurden mock-transfizierte MDCK C11-Zellen und Klone, die stabil Tricellulin-FLAG₃ exprimieren zusätzlich transient mit HA-Ubiquitin (Abb. 24, Spuren 2, 4 und 5) oder zur Kontrolle mit dem Leervektor pcDNA3 (Abb. 24, Spuren 1 und 3) transfiziert. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit Sulfo-NHS-SS-Biotin inkubiert (Abb. 24, Spuren 1 bis 4), sodass alle Zelloberflächenproteine biotinyliert wurden. Für einen Kontrollansatz wurde PBS statt Sulfo-NHS-SS-Biotin eingesetzt (Abb. 24, Spur 5). Ungebundenes Sulfo-NHS-SS-Biotin wurde von der Zelloberfläche entfernt und nach Zugabe von vorgewärmtem Medium wurde für 1 h bei 37°C Endocytose induziert. Nach dem Stoppen der Endocytose bei 4 °C wurde Biotin, das noch an Zelloberflächenproteine gebunden war durch die Zugabe von reduzierender MESNA (2-mercaptoethane sulfonic acid) entfernt. Anschließend wurden die Zellen lysiert. Die Lysatkontrollen (Abb. 24, Spuren 1-5) zeigten zum einen, dass Tricellulin-FLAG₃ exprimiert wurde (Abb. 24A, Spuren 3, 4 und 5) und zum anderen, dass durch das transfizierte HA-Ubiquitin modifizierte Proteine detektiert werden konnten (Abb. 24B, Spuren 2, 4 und 5). In Abb. 24C ist zu erkennen, dass der Transferrin Rezeptor (TfR) exprimiert wurde (Abb. 24C, Spuren 1 bis 5). Er diente im nächsten Schritt als Positivkontrolle.

Endocytisierte biotinylierte Proteine wurden anschließend an NeutrAvidin-Beads gebunden und durch Zentrifugation sedimentiert. In einer Western Blot Analyse dieser Proteine konnte FLAG₃-getaggtetes Tricellulin mit anti-FLAG-M2 Antikörper detektiert werden (Abb. 24A, Spuren 8 und 9), was bedeutet, dass an der Zelloberfläche biotinyliertes Tricellulin durch Endocytose internalisiert wurde. Des Weiteren war kein Unterschied zwischen untransfizierten Zellen (Abb. 24, Spur 8) und mit HA-Ubiquitin transfizierten Zellen (Abb. 24, Spur 9) nachweisbar. In Abb. 24C konnte TfR nur in den Spuren 6 bis 9 detektiert werden, was bestätigt, dass in der PBS-Kontrolle keine Proteine biotinyliert wurden und folglich auch nicht durch die NeutrAvidin-Beads präzipitiert werden konnten. Dies bestätigt, dass es sich bei dem präzipitierten Tricellulin-FLAG₃ in den Spuren 8 und 9 (Abb. 24A) biotinyliertes endocytisiertes Tricellulin handelte.

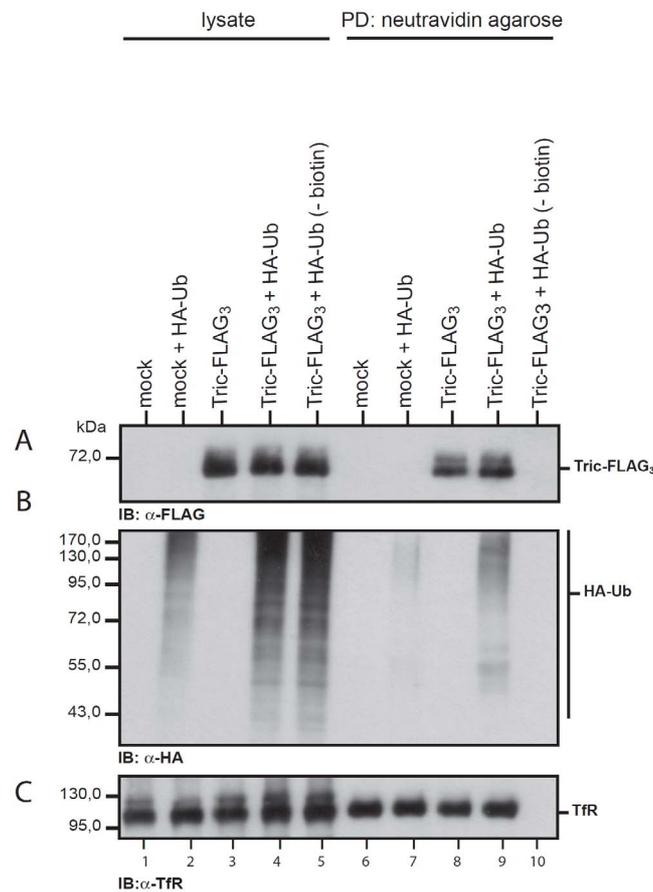


Abb. 24: Nachweis der Endocytose von Tricellulin durch Zelloberflächen-Biotinylierung. MDCK C11-Zellen, die stabil entweder mit p3×FLAG-CMV14 oder mit p3×FLAG-CMV14-Tricellulin transfiziert worden waren, wurden zusätzlich transient mit HA-Ubiquitin (Spuren 2,4 und 5) oder als Kontrolle mit pcDNA3 (Spuren 1 und 3) transfiziert und mit Sulfo-NHS-SS-Biotin (Spuren 1 bis 4) oder als Kontrolle mit PBS (Spur 5) inkubiert. Die Spuren 1-5 zeigen die entsprechenden Zell-Lysate mit denen ein Pull-Down mit NeutrAvidin-Beads durchgeführt wurde (Spuren 6-10). In den Spuren 8 und 9 in (A) ist zu erkennen, dass biotinyliertes Tricellulin-FLAG₃ endocytisiert wird. (B) Detektion von HA-ubiquitinierten Proteinen mit α-HA Antikörper. (C) Expression und Endocytose des Transferrin Rezeptors.

4 Diskussion

4.1 Rolle der cytoplasmatischen Domänen für die Lokalisation von Tricellulin

Tight Junctions sind Zell-Zell-Verbindungen, die im apikalen Bereich epithelialer und endothelialer Zellschichten angeordnet sind. Ihre Funktionen sind die Aufrechterhaltung der Zellpolarität sowie die Kontrolle des parazellulären Transports. Seit der Identifizierung der Tight Junctions wurden verschiedene Tetraspanin-Transmembranproteine als Hauptbestandteile dieser Zellkontakte charakterisiert wie Occludin (Furuse *et al.*, 1993) und die Mitglieder der Claudin-Familie (Furuse *et al.*, 1998). Daneben sind JAM, CAR und ESAM als glykosylierte integrale Membranproteine bekannt (Bergelson *et al.*, 1997; Hirata *et al.*, 2001; Martin-Padura *et al.*, 1998). Kürzlich konnte Tricellulin als ein neues Tetraspanin-Transmembranprotein in Tight Junctions detektiert werden, das bevorzugt an Kontaktstellen zwischen drei benachbarten Zellen lokalisiert ist (Ikenouchi *et al.*, 2005). Der Mechanismus, der zu dieser trizellulären Anordnung führt, ist bisher jedoch weitgehend unverstanden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in stabil exprimierenden MDCK C11-Klonen FLAG₃-getaggtetes Tricellulin Volllängen-Protein an trizellulären Tight Junctions und, abhängig vom Expressionslevel, auch in diskontinuierlichen Zusammenballungen an bizellulären Tight Junctions nachweisbar ist. Dies wurde durch weitere Arbeiten bestätigt (Krug *et al.*, 2009).

Vorherige Studien zeigten, dass durch den Knock-Down von Tricellulin sowohl die Organisation trizellulärer Tight Junctions als auch die Lokalisation von Occludin an den bizellulären Tight Junctions beeinflusst wird (Ikenouchi *et al.*, 2005). Vice versa wurde nachgewiesen, dass die Inhibierung der Occludin-Expression die trizelluläre Anordnung von Tricellulin verhindert (Ikenouchi *et al.*, 2008). Die Überexpression von FLAG₃-getaggteten Tricellulin-Konstrukten hat dagegen keinen Einfluss auf den Expressionslevel oder die Lokalisation von Occludin, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

Im Gegensatz zum vollständigen Protein war eine Tricellulin-Mutante mit deletiertem cytoplasmatischen C-Terminus in ihrem Transport zur Zellmembran beeinträchtigt. In den meisten stabil exprimierenden Zellen konnte nur eine reduzierte Membranfärbung detektiert werden, die häufig mit einer intrazellulären Akkumulation von Tricellulin Δ C-FLAG₃ einherging. Δ NTricellulin-FLAG₃ (ein Tricellulin-Protein mit deletierter cytoplasmatischer N-terminaler Domäne) wurde indessen effizient an die Membran transportiert und zeigte eine gleichmäßige Verteilung an bizellulären Tight Junctions, ohne spezifisch an trizellulären Tight Junctions konzentriert zu werden.

Abweichend von dieser Beobachtung zeigten Ikenouchi *et al.* in L-Fibroblasten, dass sowohl N- als auch C-terminal deletierte Tricellulin-Mutanten mit Claudin-1 an Zellmembranen colokalisieren (Ikenouchi *et al.*, 2008). Dass die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse diese Beobachtung nicht eindeutig bestätigen können, ist möglicherweise auf unterschiedliche Versuchsbedingungen zurückzuführen. Die von Ikenouchi *et al.* verwendeten L-Fibroblasten exprimieren keine endogenen Tight Junction-Proteine. Eine zusätzliche Transfektion von Claudinen war notwendig, um Tricellulin an die Zell-Zell-Kontakte zu translozieren. Die in dieser Arbeit verwendeten MDCK C11-Zellen bilden dagegen Tight Junctions aus und weisen eine polarisierte Morphologie auf. Dadurch sind die Bedingungen in dieser Zelllinie vergleichbarer zu den Bedingungen, die in einem nativen Epithel vorliegen.

Im Gegensatz zu den stabil transfizierten MDCK C11-Klonen waren sowohl FLAG₃-Tricellulin als auch FLAG₃- Δ NTricellulin in HEK293-Zellen gleichmäßig an der Membran lokalisiert. Daneben war aber auch eine nicht unerhebliche Proteinmenge im Cytosol detektierbar. FLAG₃-Tricellulin Δ C zeigte eine schwächere Membranfärbung und ebenfalls starke intrazelluläre Proteinakkumulationen. Dies kann durch die relativ hohen Proteinmengen bei der transienten Überexpression der FLAG₃-getaggten Tricellulin-Konstrukte in HEK293-Zellen erklärt werden. Zudem bilden HEK293-Zellen keine Tight Junctions aus. Somit fehlen möglicherweise Interaktionspartner oder Signalproteine, die für eine korrekte trizelluläre Anordnung von Tricellulin notwendig sind.

Übereinstimmend mit Studien von Ikenouchi *et al.* (Ikenouchi *et al.*, 2008) zeigen die dargestellten Ergebnisse, dass Tricellulin-Proteine, die an beiden cytoplasmatischen Termini deletiert sind, nicht an die Zelloberfläche transportiert werden, sondern hauptsächlich in intrazellulären Aggregaten akkumulieren, was auf einen beeinträchtigten Transport dieses Tricellulin-Konstrukts schließen lässt.

Auf Grund dieser Daten kann vermutet werden, dass die C-terminale cytoplasmatische Domäne von Tricellulin für den Transport an die Zelloberfläche notwendig ist. Die Ergebnisse früherer Untersuchungen, nach denen der C-Terminus von Occludin den Transport an die Membran vermittelt, stimmt mit diesem Befund überein (Chen *et al.*, 1997; Matter and Balda, 1998). Aufgrund der beschriebenen Homologie der C-terminalen cytoplasmatischen Domänen beider Proteine spricht dies für eine funktionelle Ähnlichkeit der C-Termini beider Proteine.

Dass dennoch geringe Mengen des deletierten Tricellulin-Proteins in den Tight Junctions detektierbar waren, kann jedoch dadurch erklärt werden, dass das transfizierte verkürzte Protein mit endogenem Tricellulin oder Occludin oligomerisiert und so in Assoziation mit dem endogenen Protein an die Zelloberfläche transportiert wird. Übereinstimmend damit konnte eine Interaktion von Tricellulin Δ C-FLAG₃ mit Volllänge Tricellulin oder Occludin in dieser Arbeit gezeigt werden. Ein ähnlicher Mechanismus wurde in früheren Studien für Occludin postuliert (Balda *et al.*, 1996; Matter and Balda, 1998).

Der N-Terminus von Tricellulin scheint dagegen eine wichtige Rolle bei der Verteilung von Tricellulin an trizelluläre Tight Junctions zu spielen. Um den Mechanismus der trizellulären Lokalisation von Tricellulin und die Funktion der cytoplasmatischen Domänen im Detail aufzuklären ist es notwendig, weitere Studien durchzuführen.

4.2 Barrierefunktion von Tricellulin an trizellulären Tight Junctions

In früheren Studien wurde gezeigt, dass der Knock-Down von Tricellulin in Eph4 Zellen eine Reduktion der transepithelialen Widerstands (TER)-Werte zur Folge hat (Ikenouchi *et al.*, 2005). In weiteren Arbeiten wurde dokumentiert, dass Tricellulin bei starker Überexpression auch an den bizellulären Tight Junctions lokalisiert ist und dort die Permeabilität für große bis mittlere Ionen mindert. Bei schwacher Überexpression war Tricellulin ausschließlich trizellulär lokalisiert, was die Permeabilität für Makromoleküle mit einer Größe von 4-10 kDa minderte (Krug *et al.*, 2009).

Die Analyse des Einflusses von Tricellulin und Tricellulin-Deletionsmutanten auf die Barrierefunktion eines Epithels zeigte einen erhöhten transepithelialen Widerstand bei einer starken Überexpression von Volllänge Tricellulin. C- bzw. N-terminal deletierte Tricellulin-Mutanten wiesen im Vergleich zum vollständigen Protein keinen signifikanten Unterschied in den TER-Werte auf. Dies lässt darauf schließen, dass auch bei Tricellulin die Barrierefunktion ähnlich wie bei Claudinen (Colegio *et al.*, 2002) durch die extrazellulären Loops reguliert wird und die cytoplasmatischen Domänen in diesem Zusammenhang keine Funktion ausüben. Mit Hilfe von Dilutionspotential Messungen wurde die Auswirkung von überexprimierten Tricellulin-Konstrukten auf die Permeabilität epithelialer Zellen ermittelt. Dabei zeigte sich, dass durch die Überexpression von Tricellulin und Tricellulin-Deletionskonstrukten die Durchlässigkeit sowohl für Natrium- als auch für Chloridionen gemindert wird, was in einer Abdichtung des Epithels resultiert. Weiterhin zeigten diese Werte, dass die beschriebene Kationenselektivität von MDCK C11-Zellen (Gekle *et al.*, 1994) nicht beeinflusst wurde.

Zusammenfassend zeigte sich, dass überexprimiertes Tricellulin, das an bizellulären Tight Junctions lokalisiert ist, die Permeabilität für Ionen herabsetzt (Krug *et al.*, 2009). Die cytoplasmatische Domänen von Tricellulin scheinen keinen Einfluss auf die Abdichtung des Epithels zu haben. Daher ist anzunehmen, dass die Regulation der Ionenpermeabilität und die Ladungspräferenz durch einen oder beide extrazelluläre Loops von Tricellulin reguliert wird, wie es auch für Claudine bekannt ist (Van Itallie *et al.*, 2003).

Überraschenderweise wiesen auch die Klone, die Tricellulin Δ C-FLAG₃ exprimieren, einen erhöhten transepithelialen Widerstand sowie eine Abdichtung gegen Natrium- und Chloridionen gegenüber der Leervektorkontrolle auf, obwohl dieses Konstrukt nur in sehr geringem Maße an der Zelloberfläche lokalisiert ist. Eine mögliche Deregulierung von bestimmten Claudin-Proteinen kann in diesem Zusammenhang bisher nicht sicher ausgeschlossen werden. Daher besteht die Möglichkeit, dass es durch die Überexpression des

Tricellulin-Konstrukts zu einer veränderten Expression oder zellulären Verteilung von Tight Junction-Komponenten kommt. Dies könnte sich auf die Barriereeigenschaft der Epithelzellen auswirken.

4.3 Einfluss der Tricellulin-Konstrukte auf die Dissoziation und Re-Assoziation von Tight Junctions

Die Deletion des C-Terminus von Tricellulin beeinflusst weder die Dissoziation noch die Re-Assemblierung von Tight Junctions. Im Gegensatz dazu ist die Wiederanordnung von Δ NTricellulin-FLAG₃ in den Tight Junctions im Vergleich zum Volllängen-Tricellulin etwas verzögert. Die Re-Assoziation von ZO-1 in den Tight Junctions ist jedoch nicht beeinträchtigt. Das legt den Schluss nahe, dass die cytoplasmatischen Termini von Tricellulin keine offensichtlichen Aufgaben beim Aufbau von Tight Junctions und beim Vermitteln der Assoziation benachbarter Zellen haben.

Der Mechanismus der Regulierung der Tight Junction-Assemblierung ist bisher im Allgemeinen nicht gut verstanden. Die Anordnung von Claudinen in den Tight Junctions wird durch ein komplexes Zusammenspiel zwischen verschiedenen Claudinen, anderen Membranproteinen und Gerüstproteinen sowie posttranslationalen Modifikationen reguliert (Findley and Koval, 2009). Des Weiteren sind intrazelluläre Signalwege an der Regulation dieses Prozesses beteiligt. So konnte für Occludin gezeigt werden, dass Tyrosin-Phosphorylierung die Wiederherstellung der Membranpermeabilität in Calcium-Switch-Experimenten beeinflusst (Sallee and Burrige, 2009) und dass Serin/Threonin-Phosphorylierungen an der Bildung der Tight Junctions beteiligt sind (Sakakibara *et al.*, 1997). Daher sind weiterführende Untersuchungen notwendig, um weitere Einblicke in die Regulierung von Tricellulin bezüglich des Aufbaus von trizellulären Tight Junctions zu bekommen.

4.4 Nachweis von Tricellulin/Tricellulin- und Tricellulin/Occludin-Komplexen

Occludin bildet in bizellulären Tight Junctions Dimere aus (Blasig *et al.*, 2006). Die Aminosäuresequenz-Homologie zu Occludin sowie die bevorzugte Anordnung von Tricellulin an trizellulären Tight Junctions und die dortige erweiterte Lokalisation in basalen Membranregionen im Vergleich zu Occludin und Claudinen (Ikenouchi *et al.*, 2005) waren starke Hinweise darauf, dass Tricellulin in der Lage ist, homomere Komplexe auszubilden. Durch Co-Immunpräzipitationsexperimente ließen sich homomere Tricellulin-Tricellulin cis-Komplexe in Zell-Lysaten transient transfizierter HEK293-Zellen nachweisen. Diese Interaktion konnte in FRET-Analysen bestätigt werden.

Die Dimerisierung von Occludin wird über ein coiled-coil Motiv in seinem C-Terminus vermittelt (Blasig *et al.*, 2006; Muller *et al.*, 2005). Basierend auf der Homologie der C-Termini von Occludin und Tricellulin (Chiba *et al.*, 2008), lag die Vermutung nahe, dass die Deletion des C-Terminus von Tricellulin dessen Komplexbildung beeinträchtigt. Entgegen dieser Annahme zeigte sich in den in dieser Arbeit durchgeführten Co-Immunpräzipitationsexperimenten, dass Tricellulin Δ C immer noch Komplexe mit Vollängen-Tricellulin ausbildet. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Selbstassoziation von Tricellulin möglicherweise über den N-Terminus vermittelt wird. Allerdings interagierte Vollängen-Tricellulin auch mit Δ NTricellulin und sogar mit Δ NTricellulin Δ C, einer Tricellulin-Mutante, die an beiden cytoplasmatischen Domänen deletiert war.

Unter Berücksichtigung der Beobachtung, dass Δ NTricellulin Δ C nicht an die Zelloberfläche transportiert wird, spricht dies dafür, dass die homomere Interaktion bereits während des Transports von Tricellulin an die Membran entweder im ER oder im Golgi-Apparat erfolgt.

Als Folgerung aus den beschriebenen Ergebnissen ergibt sich die Frage, durch welche Domäne von Tricellulin die Bildung der Homomere vermittelt wird. In Experimenten, in denen Zellen gemischt wurden, die entweder HA-Tricellulin oder Tricellulin-FLAG₃ exprimierten, und dann Co-Immunpräzipitationen durchgeführt wurden, konnten keine Proteinkomplexe nachgewiesen werden. Auch nach Verwendung verschiedener Cross-Linker konnte keine trans-Interaktion nachgewiesen werden, wie es zum Beispiel für die Interaktion zwischen Claudin-4 und MUPP1 gezeigt werden konnte (Lanaspa *et al.*, 2008). Daher handelt es sich bei der Tricellulin-Selbstassoziation anscheinend nicht um trans-Interaktionen, die über die extrazellulären Loops vermittelt werden, sondern um laterale cis-Interaktionen. Dies wird auch durch die FRET-Experimente bestätigt. Wahrscheinlicher ist eine Bindung der Tricellulin-Proteine über die Transmembrandomänen. Es konnte aber bisher nicht geklärt werden, ob die cis-Interaktionen durch die Transmembrandomänen und/oder die extrazellulären Loops vermittelt werden. Um diese Fragestellung im Detail zu untersuchen, sind weitere Experimente notwendig.

In den vergangenen Jahren haben verschiedene Untersuchungen gezeigt, dass eine gegenseitige Beeinflussung von Occludin und Tricellulin vorliegt. Dabei führte die Inhibierung der Tricellulin-Expression durch RNAi zu einer deregulierten Lokalisation von Occludin an den bTJ (Ikenouchi *et al.*, 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Knock-Down von Occludin verhindert, dass Tricellulin an den tTJ angeordnet wird (Ikenouchi *et al.*, 2008). Dies, sowie die strukturelle Ähnlichkeit der Proteine, ließ vermuten, dass diese beiden Tight Junction-Proteine heteromere Komplexe ausbilden können.

Diese Hypothese unterstützend konnten in dieser Arbeit heteromere Tricellulin-Occludin-Komplexe nachgewiesen werden. Darüber hinaus beeinflusste in Co-Immunpräzipitationsexperimenten aus Zell-Lysaten transient transfizierter HEK293-Zellen weder die Deletion des N-, noch des C-Terminus die Bindung von Tricellulin an Vollängen-Occludin. Diese Beobachtung kann durch den Nachweis von Komplexen aus FLAG₃-

getaggten Tricellulin-Konstrukten und endogenem Occludin in MDCK C11-Zell-Lysaten bestätigt werden. Um zu analysieren, ob die cytoplasmatischen Domänen von Occludin an der Assoziation beteiligt sind, wurden N- oder C-terminal deletierte Occludin-Konstrukte in Co-Immunpräzipitationen auf die Bindung an Tricellulin untersucht. Dabei interagieren neben Vollängen-Occludin sowohl Δ NOccludin als auch Occludin Δ C mit Vollängen-Tricellulin. Es ist daher anzunehmen, dass die Heteromerisierung vergleichbar zu den homomeren Tricellulin-Komplexen durch die extrazellulären Loops oder über die Transmembrandomänen beider Proteine vermittelt wird. In Co-Immunpräzipitationsexperimenten mit einem Gemisch an Zellen, die entweder HA-Tricellulin oder Occludin-FLAG₃ exprimierten konnten erneut keine trans-Komplexe nachgewiesen werden.

Eine trans-Assoziation ist für verschiedene Claudine beschrieben (Blasig *et al.*, 2006; Krause *et al.*, 2008). Diese Ergebnisse weisen folglich darauf hin, dass die durch Tricellulin gebildeten tTJ in ihrem Aufbau von den bTJ unterscheiden. Ein Fehlen von direkten trans-Interaktionen zwischen Tricellulin-Molekülen auf den Oberflächen von benachbarten Zellen an trizellulären Kontakten lässt vermuten, dass dort der Abstand zwischen den Membranen der benachbarten Zellen größer ist. Dies stimmt überein mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen, aus denen hervorgeht, dass sich das Netzwerk der bizellulären Tight Junctions an trizellulären Tight Junctions basolateral ausdehnt, wodurch eine zentrale Pore mit einem Durchmesser von etwa 10 nm gebildet wird (Stahelin, 1973; Walker *et al.*, 1994). Vorstellbarer ist eine cis-Interaktion über die Transmembrandomänen von Tricellulin und Occludin. In früheren Studien wurde gezeigt, dass laterale Dimerisierung über Transmembrandomänen von Zelloberflächenproteinen, wie zum Beispiel von E-Cadherin (Huber *et al.*, 1999), APP (Munter *et al.*, 2007) oder dem Erythropoietin Rezeptor (Kubatzky *et al.*, 2001) von funktioneller Bedeutung sind.

In einer Arbeit von Ikenouchi *et al.*, wird ein Mechanismus diskutiert, nach dem der trizellulären Anordnung von Tricellulin eine Lokalisation von Tricellulin an den Enden wachsender bTJs vorhergeht (Ikenouchi *et al.*, 2008).

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse erweitern dieses Modell um die Annahme, dass Occludin und Tricellulin durch einen gemeinsamen Transportweg zu den wachsenden Tight Junctions transportiert werden. Auf ihrem Weg an die Zelloberfläche und in der initialen Assoziationsphase der Tight Junctions, könnten Occludin und Tricellulin Komplexe formen, die dissoziieren, wenn die trizellulären Tight Junctions angelegt werden. Dies würde eine starke Regulierung der Tricellulin-Occludin-Interaktion, zum Beispiel durch Phosphorylierung, erfordern. Ein ähnlicher Mechanismus ist für verschiedene Claudine, zum Beispiel Claudin-16 und Claudin-19, beschrieben. Dabei assoziieren die Proteine vor dem Transport an die Tight Junctions miteinander und die Oligomerisierung ist für die Translokation an die Zelloberfläche notwendig (Blasig *et al.*, 2006; Hou *et al.*, 2009; Piontek *et al.*, 2008). Darüber hinaus konnte schon in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass integrale

Membranproteine generell im endoplasmatischen Reticulum (Hurtley and Helenius, 1989) oder Golgi-Apparat (Musil and Goodenough, 1993) oligomerisieren, um für den intrazellulären Transport befähigt zu sein.

4.5 Posttranslationale Modifikationen

In epithelialen und endothelialen Zellschichten ist die Aufrechterhaltung der Tight Junction-Struktur für die Barriere-Funktion und Polarität von zentraler Bedeutung. Verschiedenen Krankheiten wie chronisch entzündlichen Darm- oder Nierenerkrankungen sowie Schädigungen der Blut-Hirn-Schranke gehen häufig mit einer beeinträchtigten Tight Junction-Funktion einher. Die Struktur, Stabilität und Lokalisation und damit die Funktion von Proteinen wird auf vielfältige Art und Weise durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst. Diese Modifikationen spielen demzufolge auch für die Regulation der Tight Junction-Struktur und -Funktion eine wichtige Rolle. Daher ist die Kenntnis der Regulation und Modifikation von Tight Junction-Proteinen ein entscheidender Schritt zum Verständnis und im Endeffekt zur Diagnostik und Therapie von Krankheiten, die durch Störungen der Organbarrieren verursacht werden.

4.5.1 Phosphorylierung von Tricellulin

In einer Vielzahl von Untersuchungen wurde beobachtet, dass für die Assemblierung und Funktion von Tight Junctions die Phosphorylierung der Tight Junction-Proteine von großer Bedeutung ist (Fujibe *et al.*, 2004; Ikari *et al.*, 2006; Ishizaki *et al.*, 2003; Sakakibara *et al.*, 1997; Sallee and Burridge, 2009; Soma *et al.*, 2004). Verschiedene Kinasen sind inzwischen bekannt, durch deren Aktivität die Bildung und Stabilität von Tight Junctions reguliert und in Konsequenz die Barrierefunktion und Permeabilitätseigenschaften eines Epithels moduliert werden (Feldman *et al.*, 2005; Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2008). Daher könnte eine fehlregulierte Phosphorylierung von Tight Junction-Komponenten ursächlich für verschiedenen Krankheiten wie zum Beispiel chronisch entzündliche Darmerkrankungen und Karzinogenese sein.

Der C-Terminus von Occludin beinhaltet eine Reihe von potenziellen Phosphorylierungsstellen für verschiedene Kinasen. Bisher konnten zum Beispiel Protein Kinase C (PKC), Protein Kinase A (PKA) und Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) als phosphorylierende Enzyme identifiziert werden (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2008). Aufgrund der Homologie der C-terminalen cytoplasmatischen Domänen von Occludin und Tricellulin lässt sich vermuten, dass Tricellulin ähnlich wie Occludin phosphoryliert wird. Computeranalysen ergaben verschiedene mögliche Phosphorylierungsstellen in der Sequenz der C-terminalen Domäne von Tricellulin.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in *in vitro* Phosphorylierungsassays gezeigt werden, dass der GST-getaggte C-Terminus von Tricellulin von PKA modifiziert wird, im Gegensatz zu Occludin jedoch nicht von CK1 und CK2 (Doerfel *et al.*, 2009). Durch GSK3 β konnte für keines der beiden Proteine eine Phosphorylierung detektiert werden. Diese Beobachtungen zeigen, dass sich Tricellulin und Occludin neben ihrer unterschiedlichen Lokalisation auch hinsichtlich ihrer posttranslationalen Modifikationen unterscheiden. Eine Assoziation zwischen der C-terminalen Domäne von Tricellulin und PKA konnte allerdings in Pull-down-Experimenten bisher nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise handelt es sich dabei um eine niederaffine Interaktion zwischen den beiden Proteinen, die für eine Detektion in dem experimentellen Untersuchungsansatz nicht stabil genug ist. Eine andere Erklärung könnte sein, dass die Kinase mit dem N-Terminus von Tricellulin interagiert, aber den C-Terminus als Substrat nutzt.

Für das besser charakterisierte Occludin ist in diesem Zusammenhang zum Beispiel bekannt, dass die Phosphorylierung durch verschiedene Isoenzyme der Proteinkinasefamilie die Assemblierung der Tight Junctions beeinflusst (Andreeva *et al.*, 2006).

Dies lässt vermuten, dass der Phosphorylierungsstatus der Tight Junction-Proteine auf die Integrität des Tight Junction-Komplexes einwirken kann. Daher sind weitere Studien nötig, um Aussagen über die funktionellen Konsequenzen der Phosphorylierung des C-Terminus von Tricellulin in Bezug auf Tight Junction-Assemblierung und Barrierefunktion machen zu können.

4.5.2 Ubiquitinierung und Endocytose von Tricellulin

Ubiquitin ist ein kleines Protein mit einer molekularen Masse von 8,5 kDa, das in allen eukaryontischen Zellen vorkommt. Es verändert die Eigenschaften anderer Proteine, indem es als posttranslationale Modifikation in unterschiedlicher Form und Anzahl reversibel an Zielproteine gebunden wird. Dies dient der Regulation der Stabilität, Funktion und der Lokalisation der entsprechend modifizierten Proteine. Eine fehlerhafte Ubiquitinierung kann ursächlich für verschiedene Krankheiten sein.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass HA-getaggtetes Ubiquitin kovalent an Volllängen-Tricellulin bindet und dieses dadurch posttranslational modifiziert. Eine Modifikation von Δ NTricellulin und Tricellulin Δ C konnte dagegen nicht beobachtet werden. Dies legt nahe, dass beide cytoplasmatische Domänen von Tricellulin in den Prozess der Ubiquitinierung involviert sind. Für Occludin ist beschrieben, dass die Ubiquitin Ligase Itch an dessen N-Terminus bindet. Eine erfolgreiche Ubiquitinierung ist jedoch nur nach zusätzlicher Phosphorylierung des Ser-490 im C-Terminus nachzuweisen (Murakami *et al.*, 2009). Möglicherweise wird die Ubiquitinierung von Tricellulin in ähnlicher Weise reguliert.

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich die Frage nach den funktionellen Konsequenzen der Ubiquitinierung von Tricellulin. Das ubiquitinierte Tricellulin wies in der SDS-PAGE kein wesentlich unterschiedliches Laufverhalten im Vergleich zu nicht modifiziertem Tricellulin auf. Dies ließ vermuten, dass Tricellulin mono-ubiquitiniert wird.

Diese Beobachtung ist von besonderem Interesse im Zusammenhang damit, dass Mono-Ubiquitinierung eine zentrale Rolle bei der Endocytose, dem intrazellulären Trafficking und dem Abbau von Zelloberflächenproteinen spielt (Hicke, 2001; Ikeda and Dikic, 2008). So konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass Claudine nach der Ubiquitinierung endocytotisch internalisiert und dem lysosomalen Abbauweg zugeführt werden (Matsuda *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu wird Occludin durch poly-Ubiquitinierung des N-Terminus für den Abbau durch das Proteasom markiert (Murakami *et al.*, 2009; Traweger *et al.*, 2002). In Experimenten mit dem Proteasomen-Inhibitor MG132 konnte keine Stabilisierung von Tricellulin festgestellt werden. Dies zeigt, dass die Ubiquitinierung von Tricellulin keinen Effekt auf die Regulation des proteasomalen Abbaus von Tricellulin hat. Vielmehr bestärkt dieses Ergebnis neben dem beobachteten Molekulargewicht des modifizierten Tricellulins die Vermutung, dass Tricellulin nur mit einzelnen Ubiquitin-Molekülen kovalent verknüpft wird und dies möglicherweise eine Markierung zur Endocytose darstellt.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Tricellulin durch Ubiquitin posttranslational modifiziert wird und dass die N- und C-terminalen Domänen für diese Modifikation wichtig sind. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um Aussagen darüber machen zu können, welche Aminosäuren des Tricellulin-Proteins modifiziert werden. In den zuvor erwähnten Studien von Matsuda *et al.* wurde mono-Ubiquitinierung als Markierung für die Internalisierung von Claudinen durch Endocytose beschrieben. In diesem Zusammenhang konnte in dieser Arbeit über Zelloberflächen-Biotinylierung mit EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin gezeigt werden, dass Tricellulin endocytotiert wird. Dabei führt die Transfektion mit HA-Ubiquitin allerdings nicht - wie man erwarten würde - zu einer erhöhten Endocytose-Rate. Dies könnte jedoch mit zu geringen Transfektionsraten in den durchgeführten Experimenten erklärt werden.

Aus der Literatur ist bekannt, dass verschiedene Signale die Endocytose von Occludin auslösen können und dass ein Recycling des Proteins an die Zelloberfläche vorliegen kann (Morimoto *et al.*, 2005; Terai *et al.*, 2006). Ob endocytotisch internalisiertes Tricellulin möglicherweise ebenfalls recycelt wird, ist bisher nicht bekannt.

Zur detaillierten Aufklärung der funktionellen Auswirkungen der Ubiquitinierung von Tricellulin sind weiterführende Studien notwendig. Neben der Regulation des Abbaus von Tricellulin könnte die Translokation des Proteins innerhalb der Zelle dadurch beeinflusst werden, allerdings ist über die intrazelluläre Funktion von Tricellulin bisher nichts bekannt.

Für Occludin wurde kürzlich herausgefunden, dass einer durch VEGF induzierten Ubiquitinierung von Occludin eine Phosphorylierung von Serin-490 vorausgeht (Murakami *et al.*, 2009). Durch diese Modifikationen wird Occludin von der Zelloberfläche in Endosomen verlagert, wodurch die Integrität der Tight Junctions beeinträchtigt und die parazelluläre Permeabilität erhöht wird. Daher kann postuliert werden, dass für Tricellulin ähnlich komplexe Regulationsmechanismen vorliegen, die zu diesem Zeitpunkt allerdings noch nicht aufgeklärt sind.

5 Zusammenfassung

Die Abdichtung des Interzellularspalts durch die Tight Junctions ist für Epithelien und Endothelien von zentraler Bedeutung, um als effektive Barriere den parazellulären Transport zwischen den Zellen hindurch zu kontrollieren. Als Hauptkomponenten der Tight Junctions wurden Occludin und die Familie der Claudine beschrieben. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte Tricellulin als weiteres integrales Membranprotein identifiziert werden, das hauptsächlich an Kontaktstellen von drei benachbarten Zellen lokalisiert ist.

Das spezielle Interesse dieser Arbeit lag darin, Tricellulin funktionell zu charakterisieren. Dabei konnte durch immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen gezeigt werden, dass die C-terminale cytoplasmatische Domäne von Tricellulin für die Membranlokalisation wichtig ist. Der N-Terminus ist an der bevorzugten Lokalisation in trizellulären Tight Junctions beteiligt.

In funktionellen Untersuchungen an stabil transfizierten MDCK C11-Klonen konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die cytoplasmatischen Domänen von Tricellulin jedoch auf den transepithelialen Widerstand sowie die Permeabilitätseigenschaften eines Epithels keinen Einfluss haben. Diese Parameter werden vermutlich durch die extrazellulären Loops reguliert.

Mit weiterführenden Analysen konnte anhand von Co-Immunpräzipitationsexperimenten gezeigt werden, dass Tricellulin homomere Komplexe ausbildet. Ferner lassen die Ergebnisse dieser Arbeit vermuten, dass diese Tricellulin-Tricellulin-Assoziation durch die Transmembrandomänen oder die extrazellulären Domänen des Proteins vermittelt wird. Zudem wurde nachgewiesen, dass Tricellulin und Occludin heteromere Proteinkomplexe ausbilden. Diese Interaktion erfolgt ebenfalls über die Transmembrandomänen oder die extrazellulären Loops. Die physiologische Bedeutung dieser Komplexe ist bisher jedoch noch nicht im Detail geklärt.

Untersuchungen zu posttranslationalen Modifikationen von Tricellulin ergaben, dass sich Tricellulin und Occludin hinsichtlich der Kinasen, die beide Proteine modifizieren, unterscheiden. So wird der C-Terminus von Occludin durch CK1 und CK2 phosphoryliert, wohingegen für den C-Terminus von Tricellulin keine Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte. Es konnten jedoch Hinweise für eine Phosphorylierung von Tricellulin durch PKA erarbeitet werden.

Als weitere posttranslationale Modifikation konnte eine Ubiquitinierung von Tricellulin nachgewiesen werden. Die beobachtete Mono-Ubiquitinierung ist möglicherweise an der Regulation der Endocytose von Tricellulin beteiligt, die durch Zelloberflächen-Biotinylierungsexperimente nachgewiesen werden konnte.

Summary

Sealing the intercellular space by tight junctions is essential for endothelial and epithelial cell-sheets for controlling paracellular transport. As the main components of tight junctions occludin and the family of the claudins were identified. A recently published study presented tricellulin as a new integral membrane protein located predominantly at contact-sites between three neighbouring cells.

The special interest of this work was the functional characterization of tricellulin. Immunofluorescence microscopic analyses depicted a role of the C-terminal cytoplasmic domain for cell surface localisation of tricellulin. In contrast the N-terminus is involved in the preferred assembly in tricellular tight junctions.

Functional analyses with stable transfected MDCK C11-clones revealed, that the cytoplasmic domains of tricellulin do not affect the paracellular resistance or the barrier properties of an epithelial cell-layer. These parameter are presumably regulated by the extracellular loops.

Co-immunoprecipitation experiments indicated the existence of homomeric Tricellulin complexes. Furthermore, the results of this study suggest that the tricellulin-tricellulin association is mediated by the transmembrane domains or the extracellular loops of the protein. Furthermore, it was demonstrated, that tricellulin and occludin accumulate in heteromeric complexes. This interaction similary appears to be mediated by the transmembrane domains or the extracellular loops of both proteins. So far, the physiological role of these complexes is not known in detail.

Assays concerning posttranscriptional modifications displayed, that tricellulin and occludin are phosphorylated by different kinases. The C-terminus of Occludin is modified by CK1 and CK2 whereas these kinases do not phosphorylate the C-terminus of Tricellulin. However, there is evidence for a phosphorylation of tricellulin by PKA.

Moreover modification of tricellulin by ubiquitin was shown in this work for the first time. The observed mono-ubiquitination is potentially involved in the regulation of endocytotic internalisation of tricellulin. Endocytosis of tricellulin was confirmed by cell-surface-biotinylation-experiments.

6 Literaturverzeichnis

- Abe, K., and M. Takeichi. 2008. EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:13-9.
- Anderson, J.M. 2001. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol Sci*. 16:126-30.
- Anderson, J.M., C.M. Van Itallie, and A.S. Fanning. 2004. Setting up a selective barrier at the apical junction complex. *Curr Opin Cell Biol*. 16:140-5.
- Ando-Akatsuka, Y., M. Saitou, T. Hirase, M. Kishi, A. Sakakibara, M. Itoh, S. Yonemura, M. Furuse, and S. Tsukita. 1996. Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. *J Cell Biol*. 133:43-7.
- Andreeva, A.Y., J. Piontek, I.E. Blasig, and D.I. Utepsbergenov. 2006. Assembly of tight junction is regulated by the antagonism of conventional and novel protein kinase C isoforms. *Int J Biochem Cell Biol*. 38:222-33.
- Balda, M.S., L. Gonzalez-Mariscal, K. Matter, M. Cereijido, and J.M. Anderson. 1993. Assembly of the tight junction: the role of diacylglycerol. *J Cell Biol*. 123:293-302.
- Balda, M.S., J.A. Whitney, C. Flores, S. Gonzalez, M. Cereijido, and K. Matter. 1996. Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol*. 134:1031-49.
- Bazzoni, G. 2006. Endothelial tight junctions: permeable barriers of the vessel wall. *Thromb Haemost*. 95:36-42.
- Bazzoni, G., O.M. Martinez-Estrada, F. Mueller, P. Nelboeck, G. Schmid, T. Bartfai, E. Dejana, and M. Brockhaus. 2000a. Homophilic interaction of junctional adhesion molecule. *J Biol Chem*. 275:30970-6.
- Bazzoni, G., O.M. Martinez-Estrada, F. Orsenigo, M. Cordenonsi, S. Citi, and E. Dejana. 2000b. Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem*. 275:20520-6.
- Bergelson, J.M., J.A. Cunningham, G. Droguett, E.A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J.S. Hong, M.S. Horwitz, R.L. Crowell, and R.W. Finberg. 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*. 275:1320-3.
- Blasig, I.E., L. Winkler, B. Lassowski, S.L. Mueller, N. Zuleger, E. Krause, G. Krause, K. Gast, M. Kolbe, and J. Piontek. 2006. On the self-association potential of transmembrane tight junction proteins. *Cell Mol Life Sci*. 63:505-14.
- Buxton, R.S., P. Cowin, W.W. Franke, D.R. Garrod, K.J. Green, I.A. King, P.J. Koch, A.I. Magee, D.A. Rees, J.R. Stanley, and et al. 1993. Nomenclature of the desmosomal cadherins. *J Cell Biol*. 121:481-3.
- Cereijido, M., J. Valdes, L. Shoshani, and R.G. Contreras. 1998. Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity. *Annu Rev Physiol*. 60:161-77.
- Chen, Y., C. Merzdorf, D.L. Paul, and D.A. Goodenough. 1997. COOH terminus of occludin is required for tight junction barrier function in early *Xenopus* embryos. *J Cell Biol*. 138:891-9.
- Chiba, H., M. Osanai, M. Murata, T. Kojima, and N. Sawada. 2008. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim Biophys Acta*. 1778:588-600.
- Chishti, M.S., A. Bhatti, S. Tamim, K. Lee, M.L. McDonald, S.M. Leal, and W. Ahmad. 2008. Splice-site mutations in the TRIC gene underlie autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment in Pakistani families. *J Hum Genet*. 53:101-5.

- Citi, S., S. Paschoud, P. Pulimeno, F. Timolati, F. De Robertis, L. Jond, and L. Guillemot. 2009. The tight junction protein cingulin regulates gene expression and RhoA signaling. *Ann N Y Acad Sci.* 1165:88-98.
- Citi, S., H. Sabanay, R. Jakes, B. Geiger, and J. Kendrick-Jones. 1988. Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. *Nature.* 333:272-6.
- Cohen, C.J., J.T. Shieh, R.J. Pickles, T. Okegawa, J.T. Hsieh, and J.M. Bergelson. 2001. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:15191-6.
- Colegio, O.R., C.M. Van Itallie, H.J. McCrea, C. Rahner, and J.M. Anderson. 2002. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283:C142-7.
- Conacci-Sorrell, M., J. Zhurinsky, and A. Ben-Ze'ev. 2002. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest.* 109:987-91.
- Cordenonsi, M., F. Turco, F. D'Atri, E. Hammar, G. Martinucci, F. Meggio, and S. Citi. 1999. Xenopus laevis occludin. Identification of in vitro phosphorylation sites by protein kinase CK2 and association with cingulin. *Eur J Biochem.* 264:374-84.
- D'Atri, F., and S. Citi. 2001. Cingulin interacts with F-actin in vitro. *FEBS Lett.* 507:21-4.
- Dobrosotskaya, I., R.K. Guy, and G.L. James. 1997. MAGI-1, a membrane-associated guanylate kinase with a unique arrangement of protein-protein interaction domains. *J Biol Chem.* 272:31589-97.
- Doerfel, M.J., J.K. Westphal, and O. Huber. 2009. Differential phosphorylation of occludin and tricellulin by CK2 and CK1. *Ann N Y Acad Sci.* 1165:69-73.
- Ebnet, K., M. Aurrand-Lions, A. Kuhn, F. Kiefer, S. Butz, K. Zander, M.K. Meyer zu Brickwedde, A. Suzuki, B.A. Imhof, and D. Vestweber. 2003. The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. *J Cell Sci.* 116:3879-91.
- Ebnet, K., C.U. Schulz, M.K. Meyer Zu Brickwedde, G.G. Pendl, and D. Vestweber. 2000. Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. *J Biol Chem.* 275:27979-88.
- Ebnet, K., A. Suzuki, Y. Horikoshi, T. Hirose, M.K. Meyer Zu Brickwedde, S. Ohno, and D. Vestweber. 2001. The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM). *Embo J.* 20:3738-48.
- Enck, A.H., U.V. Berger, and A.S. Yu. 2001. Claudin-2 is selectively expressed in proximal nephron in mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 281:F966-74.
- Fanning, A.S., B.J. Jameson, L.A. Jesaitis, and J.M. Anderson. 1998. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 273:29745-53.
- Farquhar, M.G., and G.E. Palade. 1963. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol.* 17:375-412.
- Feldman, G.J., J.M. Mullin, and M.P. Ryan. 2005. Occludin: structure, function and regulation. *Adv Drug Deliv Rev.* 57:883-917.
- Findley, M.K., and M. Koval. 2009. Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. *IUBMB Life.* 61:431-7.
- Fujibe, M., H. Chiba, T. Kojima, T. Soma, T. Wada, T. Yamashita, and N. Sawada. 2004. Thr203 of claudin-1, a putative phosphorylation site for MAP kinase, is required to promote the barrier function of tight junctions. *Exp Cell Res.* 295:36-47.
- Furuse, M., K. Fujita, T. Hiragi, K. Fujimoto, and S. Tsukita. 1998. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol.* 141:1539-50.

- Furuse, M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura, and S. Tsukita. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol.* 123:1777-88.
- Furuse, M., M. Itoh, T. Hirase, A. Nagafuchi, S. Yonemura, and S. Tsukita. 1994. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol.* 127:1617-26.
- Furuse, M., and S. Tsukita. 2006. Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol.* 16:181-8.
- Gekle, M., S. Wunsch, H. Oberleithner, and S. Silbernagl. 1994. Characterization of two MDCK-cell subtypes as a model system to study principal cell and intercalated cell properties. *Pflugers Arch.* 428:157-62.
- Gonzalez-Mariscal, L., A. Betanzos, P. Nava, and B.E. Jaramillo. 2003. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol.* 81:1-44.
- Gonzalez-Mariscal, L., R. Tapia, and D. Chamorro. 2008. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta.* 1778:729-56.
- Grindstaff, K.K., C. Yeaman, N. Anandasabapathy, S.C. Hsu, E. Rodriguez-Boulan, R.H. Scheller, and W.J. Nelson. 1998. Sec6/8 complex is recruited to cell-cell contacts and specifies transport vesicle delivery to the basal-lateral membrane in epithelial cells. *Cell.* 93:731-40.
- Guillemot, L., S. Paschoud, P. Pulimeno, A. Foglia, and S. Citi. 2008. The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center. *Biochim Biophys Acta.* 1778:601-13.
- Gumbiner, B., T. Lowenkopf, and D. Apatira. 1991. Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:3460-4.
- Gumbiner, B.M. 1993. Breaking through the tight junction barrier. *J Cell Biol.* 123:1631-3.
- Haskins, J., L. Gu, E.S. Wittchen, J. Hibbard, and B.R. Stevenson. 1998. ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol.* 141:199-208.
- Hicke, L. 2001. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:195-201.
- Hirase, T., J.M. Staddon, M. Saitou, Y. Ando-Akatsuka, M. Itoh, M. Furuse, K. Fujimoto, S. Tsukita, and L.L. Rubin. 1997. Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci.* 110 (Pt 14):1603-13.
- Hirata, K., T. Ishida, K. Penta, M. Rezaee, E. Yang, J. Wohlgemuth, and T. Quertermous. 2001. Cloning of an immunoglobulin family adhesion molecule selectively expressed by endothelial cells. *J Biol Chem.* 276:16223-31.
- Honda, T., H. Saitoh, M. Masuko, T. Katagiri-Abe, K. Tominaga, I. Kozakai, K. Kobayashi, T. Kumanishi, Y.G. Watanabe, S. Odani, and R. Kuwano. 2000. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein as a cell adhesion molecule in the developing mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 77:19-28.
- Hou, J., A. Renigunta, A.S. Gomes, M. Hou, D.L. Paul, S. Waldegger, and D.A. Goodenough. 2009. Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *Proc Natl Acad Sci U S A.*
- Huber, O., R. Kemler, and D. Langosch. 1999. Mutations affecting transmembrane segment interactions impair adhesiveness of E-cadherin. *J Cell Sci.* 112 (Pt 23):4415-23.
- Hülsken, J., W. Birchmeier, and J. Behrens. 1994. E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol.* 127:2061-9.
- Hurtley, S.M., and A. Helenius. 1989. Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol.* 5:277-307.
- Ide, N., Y. Hata, H. Nishioka, K. Hirao, I. Yao, M. Deguchi, A. Mizoguchi, H. Nishimori, T. Tokino, Y. Nakamura, and Y. Takai. 1999. Localization of membrane-associated

- guanylate kinase (MAGI)-1/BAI-associated protein (BAP) 1 at tight junctions of epithelial cells. *Oncogene*. 18:7810-5.
- Ikari, A., S. Matsumoto, H. Harada, K. Takagi, H. Hayashi, Y. Suzuki, M. Degawa, and M. Miwa. 2006. Phosphorylation of paracellin-1 at Ser217 by protein kinase A is essential for localization in tight junctions. *J Cell Sci*. 119:1781-9.
- Ikeda, F., and I. Dikic. 2008. Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series. *EMBO Rep*. 9:536-42.
- Ikenouchi, J., M. Furuse, K. Furuse, H. Sasaki, and S. Tsukita. 2005. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol*. 171:939-45.
- Ikenouchi, J., M. Matsuda, M. Furuse, and S. Tsukita. 2003. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci*. 116:1959-67.
- Ikenouchi, J., H. Sasaki, S. Tsukita, and M. Furuse. 2008. Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. *Mol Biol Cell*. 19:4687-93.
- Ishizaki, T., H. Chiba, T. Kojima, M. Fujibe, T. Soma, H. Miyajima, K. Nagasawa, I. Wada, and N. Sawada. 2003. Cyclic AMP induces phosphorylation of claudin-5 immunoprecipitates and expression of claudin-5 gene in blood-brain-barrier endothelial cells via protein kinase A-dependent and -independent pathways. *Exp Cell Res*. 290:275-88.
- Itoh, M., M. Furuse, K. Morita, K. Kubota, M. Saitou, and S. Tsukita. 1999a. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol*. 147:1351-63.
- Itoh, M., K. Morita, and S. Tsukita. 1999b. Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. *J Biol Chem*. 274:5981-6.
- Itoh, M., A. Nagafuchi, S. Moroi, and S. Tsukita. 1997. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol*. 138:181-92.
- Itoh, M., A. Nagafuchi, S. Yonemura, T. Kitani-Yasuda, and S. Tsukita. 1993. The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. *J Cell Biol*. 121:491-502.
- Itoh, M., H. Sasaki, M. Furuse, H. Ozaki, T. Kita, and S. Tsukita. 2001. Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J Cell Biol*. 154:491-7.
- Jamora, C., and E. Fuchs. 2002. Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol*. 4:E101-8.
- Jesaitis, L.A., and D.A. Goodenough. 1994. Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *J Cell Biol*. 124:949-61.
- Joberty, G., C. Petersen, L. Gao, and I.G. Macara. 2000. The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol*. 2:531-9.
- Jou, T.S., E.E. Schneeberger, and W.J. Nelson. 1998. Structural and functional regulation of tight junctions by RhoA and Rac1 small GTPases. *J Cell Biol*. 142:101-15.
- Kamimura, Y., H. Chiba, H. Utsumi, T. Gotoh, H. Tobioka, and N. Sawada. 2002. Barrier function of microvessels and roles of glial cell line-derived neurotrophic factor in the rat testis. *Med Electron Microsc*. 35:139-45.
- Kiuchi-Saishin, Y., S. Gotoh, M. Furuse, A. Takasuga, Y. Tano, and S. Tsukita. 2002. Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol*. 13:875-86.

- Knudsen, K.A., A.P. Soler, K.R. Johnson, and M.J. Wheelock. 1995. Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *J Cell Biol.* 130:67-77.
- Krause, G., L. Winkler, S.L. Mueller, R.F. Haseloff, J. Piontek, and I.E. Blasig. 2008. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta.* 1778:631-45.
- Krug, S.M., S. Amasheh, J.F. Richter, S. Milatz, D. Gunzel, J.K. Westphal, O. Huber, J.D. Schulzke, and M. Fromm. 2009. Tricellulin Forms a Barrier to Macromolecules in Tricellular Tight Junctions without Affecting Ion Permeability. *Mol Biol Cell.*
- Kubatzky, K.F., W. Ruan, R. Gurezka, J. Cohen, R. Ketteler, S.S. Watowich, D. Neumann, D. Langosch, and U. Klingmuller. 2001. Self assembly of the transmembrane domain promotes signal transduction through the erythropoietin receptor. *Curr Biol.* 11:110-5.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.
- Lanaspa, M.A., A. Andres-Hernando, C.J. Rivard, Y. Dai, and T. Berl. 2008. Hypertonic stress increases claudin-4 expression and tight junction integrity in association with MUPP1 in IMCD3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:15797-802.
- Lee, S.S., B. Glaunsinger, F. Mantovani, L. Banks, and R.T. Javier. 2000. Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J Virol.* 74:9680-93.
- Liu, Y., A. Nusrat, F.J. Schnell, T.A. Reaves, S. Walsh, M. Pochet, and C.A. Parkos. 2000. Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci.* 113 (Pt 13):2363-74.
- Martinez-Estrada, O.M., A. Villa, F. Breviario, F. Orsenigo, E. Dejana, and G. Bazzoni. 2001. Association of junctional adhesion molecule with calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (CASK/LIN-2) in human epithelial caco-2 cells. *J Biol Chem.* 276:9291-6.
- Martin-Padura, I., S. Lostaglio, M. Schneemann, L. Williams, M. Romano, P. Fruscella, C. Panzeri, A. Stoppacciaro, L. Ruco, A. Villa, D. Simmons, and E. Dejana. 1998. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol.* 142:117-27.
- Matsuda, M., A. Kubo, M. Furuse, and S. Tsukita. 2004. A peculiar internalization of claudins, tight junction-specific adhesion molecules, during the intercellular movement of epithelial cells. *J Cell Sci.* 117:1247-57.
- Matter, K., and M.S. Balda. 1998. Biogenesis of tight junctions: the C-terminal domain of occludin mediates basolateral targeting. *J Cell Sci.* 111 (Pt 4):511-9.
- Matter, K., and M.S. Balda. 2003. Functional analysis of tight junctions. *Methods.* 30:228-34.
- Morimoto, S., N. Nishimura, T. Terai, S. Manabe, Y. Yamamoto, W. Shinahara, H. Miyake, S. Tashiro, M. Shimada, and T. Sasaki. 2005. Rab13 mediates the continuous endocytic recycling of occludin to the cell surface. *J Biol Chem.* 280:2220-8.
- Morita, K., M. Furuse, K. Fujimoto, and S. Tsukita. 1999. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:511-6.
- Morita, K., M. Furuse, Y. Yoshida, M. Itoh, H. Sasaki, S. Tsukita, and Y. Miyachi. 2002. Molecular architecture of tight junctions of periderm differs from that of the maculae occludentes of epidermis. *J Invest Dermatol.* 118:1073-9.
- Morita, K., H. Sasaki, K. Furuse, M. Furuse, S. Tsukita, and Y. Miyachi. 2003. Expression of claudin-5 in dermal vascular endothelia. *Exp Dermatol.* 12:289-95.
- Moroi, S., M. Saitou, K. Fujimoto, A. Sakakibara, M. Furuse, O. Yoshida, and S. Tsukita. 1998. Occludin is concentrated at tight junctions of mouse/rat but not human/guinea pig Sertoli cells in testes. *Am J Physiol.* 274:C1708-17.

- Muller, S.L., M. Portwich, A. Schmidt, D.I. Utepbergenov, O. Huber, I.E. Blasig, and G. Krause. 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.
- Mullin, J.M. 2004. Epithelial barriers, compartmentation, and cancer. *Sci STKE.* 2004:pe2.
- Mullin, J.M., N. Agostino, E. Rendon-Huerta, and J.J. Thornton. 2005. Keynote review: epithelial and endothelial barriers in human disease. *Drug Discov Today.* 10:395-408.
- Munter, L.M., P. Voigt, A. Harmeier, D. Kaden, K.E. Gottschalk, C. Weise, R. Pipkorn, M. Schaefer, D. Langosch, and G. Multhaup. 2007. GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42. *Embo J.* 26:1702-12.
- Murakami, T., E.A. Felinski, and D.A. Antonetti. 2009. Occludin Phosphorylation and Ubiquitination Regulate Tight Junction Trafficking and Vascular Endothelial Growth Factor-induced Permeability. *J Biol Chem.* 284:21036-46.
- Musil, L.S., and D.A. Goodenough. 1990. Gap junctional intercellular communication and the regulation of connexin expression and function. *Curr Opin Cell Biol.* 2:875-80.
- Musil, L.S., and D.A. Goodenough. 1993. Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell.* 74:1065-77.
- Nagafuchi, A., and M. Takeichi. 1988. Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *Embo J.* 7:3679-84.
- Nasdala, I., K. Wolburg-Buchholz, H. Wolburg, A. Kuhn, K. Ebnet, G. Brachtendorf, U. Samulowitz, B. Kuster, B. Engelhardt, D. Vestweber, and S. Butz. 2002. A transmembrane tight junction protein selectively expressed on endothelial cells and platelets. *J Biol Chem.* 277:16294-303.
- Nishimura, N., and T. Sasaki. 2008. Cell-surface biotinylation to study endocytosis and recycling of occludin. *Methods Mol Biol.* 440:89-96.
- Nitta, T., M. Hata, S. Gotoh, Y. Seo, H. Sasaki, N. Hashimoto, M. Furuse, and S. Tsukita. 2003. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol.* 161:653-60.
- Palmeri, D., A. van Zante, C.C. Huang, S. Hemmerich, and S.D. Rosen. 2000. Vascular endothelial junction-associated molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily, is localized to intercellular boundaries of endothelial cells. *J Biol Chem.* 275:19139-45.
- Piontek, J., L. Winkler, H. Wolburg, S.L. Muller, N. Zuleger, C. Piehl, B. Wiesner, G. Krause, and I.E. Blasig. 2008. Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *Faseb J.* 22:146-58.
- Pokutta, S., and W.I. Weis. 2000. Structure of the dimerization and beta-catenin-binding region of alpha-catenin. *Mol Cell.* 5:533-43.
- Powell, D.W. 1981. Barrier function of epithelia. *Am J Physiol.* 241:G275-88.
- Qiu, R.G., A. Abo, and G. Steven Martin. 2000. A human homolog of the *C. elegans* polarity determinant Par-6 links Rac and Cdc42 to PKCzeta signaling and cell transformation. *Curr Biol.* 10:697-707.
- Rahner, C., L.L. Mitic, and J.M. Anderson. 2001. Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology.* 120:411-22.
- Riazuddin, S., Z.M. Ahmed, A.S. Fanning, A. Lagziel, S. Kitajiri, K. Ramzan, S.N. Khan, P. Chattaraj, P.L. Friedman, J.M. Anderson, I.A. Belyantseva, A. Forge, and T.B. Friedman. 2006. Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. *Am J Hum Genet.* 79:1040-51.

- Roelvink, P.W., A. Lizonova, J.G. Lee, Y. Li, J.M. Bergelson, R.W. Finberg, D.E. Brough, I. Kovesdi, and T.J. Wickham. 1998. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol.* 72:7909-15.
- Roh, M.H., C.J. Liu, S. Laurinec, and B. Margolis. 2002. The carboxyl terminus of zona occludens-3 binds and recruits a mammalian homologue of discs lost to tight junctions. *J Biol Chem.* 277:27501-9.
- Ruffer, C., and V. Gerke. 2004. The C-terminal cytoplasmic tail of claudins 1 and 5 but not its PDZ-binding motif is required for apical localization at epithelial and endothelial tight junctions. *Eur J Cell Biol.* 83:135-44.
- Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230:1350-4.
- Saitou, M., K. Fujimoto, Y. Doi, M. Itoh, T. Fujimoto, M. Furuse, H. Takano, T. Noda, and S. Tsukita. 1998. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol.* 141:397-408.
- Saitou, M., M. Furuse, H. Sasaki, J.D. Schulzke, M. Fromm, H. Takano, T. Noda, and S. Tsukita. 2000. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell.* 11:4131-42.
- Sakakibara, A., M. Furuse, M. Saitou, Y. Ando-Akatsuka, and S. Tsukita. 1997. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol.* 137:1393-401.
- Sallee, J.L., and K. Burridge. 2009. Density-enhanced phosphatase 1 regulates phosphorylation of tight junction proteins and enhances barrier function of epithelial cells. *J Biol Chem.* 284:14997-5006.
- Schlueter, H., I. Moll, H. Wolburg, and W.W. Franke. 2007. The different structures containing tight junction proteins in epidermal and other stratified epithelial cells, including squamous cell metaplasia. *Eur J Cell Biol.* 86:645-55.
- Schneeberger, E.E., and R.D. Lynch. 1992. Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am J Physiol.* 262:L647-61.
- Schneeberger, E.E., and R.D. Lynch. 2004. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286:C1213-28.
- Schulte, J., U. Tepass, and V.J. Auld. 2003. Gliotactin, a novel marker of tricellular junctions, is necessary for septate junction development in *Drosophila*. *J Cell Biol.* 161:991-1000.
- Simpson, E.H., R. Suffolk, and I.J. Jackson. 1999. Identification, sequence, and mapping of the mouse multiple PDZ domain protein gene, *Mpdz*. *Genomics.* 59:102-4.
- Soma, T., H. Chiba, Y. Kato-Mori, T. Wada, T. Yamashita, T. Kojima, and N. Sawada. 2004. Thr(207) of claudin-5 is involved in size-selective loosening of the endothelial barrier by cyclic AMP. *Exp Cell Res.* 300:202-12.
- Staehelin, L.A. 1973. Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J Cell Sci.* 13:763-86.
- Staehelin, L.A., T.M. Mukherjee, and A.W. Williams. 1969. Fine structure of frozen-etched tight junctions. *Naturwissenschaften.* 56:142.
- Stevenson, B.R., J.M. Anderson, D.A. Goodenough, and M.S. Mooseker. 1988. Tight junction structure and ZO-1 content are identical in two strains of Madin-Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance. *J Cell Biol.* 107:2401-8.
- Stevenson, B.R., J.D. Siliciano, M.S. Mooseker, and D.A. Goodenough. 1986. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol.* 103:755-66.

- Takahashi, S., N. Iwamoto, H. Sasaki, M. Ohashi, Y. Oda, S. Tsukita, and M. Furuse. 2009. The E3 ubiquitin ligase LNX1p80 promotes the removal of claudins from tight junctions in MDCK cells. *J Cell Sci.* 122:985-94.
- Takeichi, M. 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science.* 251:1451-5.
- Terai, T., N. Nishimura, I. Kanda, N. Yasui, and T. Sasaki. 2006. JRAB/MICAL-L2 is a junctional Rab13-binding protein mediating the endocytic recycling of occludin. *Mol Biol Cell.* 17:2465-75.
- Traweger, A., D. Fang, Y.C. Liu, W. Stelzhammer, I.A. Krizbai, F. Fresser, H.C. Bauer, and H. Bauer. 2002. The tight junction-specific protein occludin is a functional target of the E3 ubiquitin-protein ligase itch. *J Biol Chem.* 277:10201-8.
- Tsukita, S., and M. Furuse. 2000. Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol.* 149:13-6.
- Tsukita, S., M. Furuse, and M. Itoh. 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:285-93.
- Tsukita, S., A. Nagafuchi, and S. Yonemura. 1992. Molecular linkage between cadherins and actin filaments in cell-cell adherens junctions. *Curr Opin Cell Biol.* 4:834-9.
- Turksen, K., and T.C. Troy. 2004. Barriers built on claudins. *J Cell Sci.* 117:2435-47.
- Ullmer, C., K. Schmuck, A. Figge, and H. Lubbert. 1998. Cloning and characterization of MUPP1, a novel PDZ domain protein. *FEBS Lett.* 424:63-8.
- Van Itallie, C.M., and J.M. Anderson. 2006. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol.* 68:403-29.
- Van Itallie, C.M., A.S. Fanning, and J.M. Anderson. 2003. Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *Am J Physiol Renal Physiol.* 285:F1078-84.
- van Raaij, M.J., E. Chouin, H. van der Zandt, J.M. Bergelson, and S. Cusack. 2000. Dimeric structure of the coxsackievirus and adenovirus receptor D1 domain at 1.7 Å resolution. *Structure.* 8:1147-55.
- Wade, J.B., and M.J. Karnovsky. 1974. The structure of the zonula occludens. A single fibril model based on freeze-fracture. *J Cell Biol.* 60:168-80.
- Walker, D.C., A. MacKenzie, and S. Hosford. 1994. The structure of the tricellular region of endothelial tight junctions of pulmonary capillaries analyzed by freeze-fracture. *Microvasc Res.* 48:259-81.
- Watabe-Uchida, M., N. Uchida, Y. Imamura, A. Nagafuchi, K. Fujimoto, T. Uemura, S. Vermeulen, F. van Roy, E.D. Adamson, and M. Takeichi. 1998. alpha-Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells. *J Cell Biol.* 142:847-57.
- Weber, E., G. Berta, A. Tousson, P. St John, M.W. Green, U. Gopalokrishnan, T. Jilling, E.J. Sorscher, T.S. Elton, D.R. Abrahamson, and et al. 1994. Expression and polarized targeting of a rab3 isoform in epithelial cells. *J Cell Biol.* 125:583-94.
- Weiss, E.E., M. Kroemker, A.H. Rudiger, B.M. Jockusch, and M. Rudiger. 1998. Vinculin is part of the cadherin-catenin junctional complex: complex formation between alpha-catenin and vinculin. *J Cell Biol.* 141:755-64.
- Wong, V., and B.M. Gumbiner. 1997. A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. *J Cell Biol.* 136:399-409.
- Wu, X., K. Hepner, S. Castelino-Prabhu, D. Do, M.B. Kaye, X.J. Yuan, J. Wood, C. Ross, C.L. Sawyers, and Y.E. Whang. 2000a. Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:4233-8.

- Wu, Y., D. Dowbenko, S. Spencer, R. Laura, J. Lee, Q. Gu, and L.A. Lasky. 2000b. Interaction of the tumor suppressor PTEN/MMAC with a PDZ domain of MAGI3, a novel membrane-associated guanylate kinase. *J Biol Chem.* 275:21477-85.
- Yamamoto, T., N. Harada, K. Kano, S. Taya, E. Canaani, Y. Matsuura, A. Mizoguchi, C. Ide, and K. Kaibuchi. 1997. The Ras target AF-6 interacts with ZO-1 and serves as a peripheral component of tight junctions in epithelial cells. *J Cell Biol.* 139:785-95.
- Zahraoui, A., G. Joberty, M. Arpin, J.J. Fontaine, R. Hellio, A. Tavitian, and D. Louvard. 1994. A small rab GTPase is distributed in cytoplasmic vesicles in non polarized cells but colocalizes with the tight junction marker ZO-1 in polarized epithelial cells. *J Cell Biol.* 124:101-15.

7 Anhang

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

Publikationen

- F, Krug SM, Amasheh S, Richter JMilatz S, Günzel D, **Westphal JK**, Huber O, Schulzke JD, Fromm M "*Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability.*" (Mol Biol Cell. 2009; 20:3713-3724.)
- Dörfel MJ, **Westphal JK**, Huber O "*Differential phosphorylation of occludin and tricellulin by CK2 and CK1.*" (Ann N Y Acad Sci. 2009; 1165:69-73.)
- **Julie K. Westphal**, Max J. Dörfel, Susanne M. Krug, Jimmi D. Cording, Jörg Piontek, Ingolf E. Blasig, Rudolf Tauber, Michael Fromm, Otmar Huber "*Tricellulin forms homomeric and heteromeric complexes in tight junctions.*" akzeptiert bei Cellular and Molecular Life Sciences (08.02.2010)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mich während meiner Dissertationszeit begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Otmar Huber für die Bereitstellung des interessanten Themas und die engagierte fachliche Betreuung auch in den schwierigen Zeiten des Umbruchs.

Ich danke ebenfalls Herrn Prof. Dr. Rudolf Tauber für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Institut unter hervorragenden Bedingungen sowohl wissenschaftlicher als auch menschlicher Art anzufertigen.

Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel danke ich, dass er sich als zweiter Gutachter meiner Dissertation zur Verfügung gestellt hat.

Weiterhin danke ich der gesamten DFG Forschergruppe 721 und im Besonderen Prof. Dr. Michael Fromm und Dr. Susanne M. Krug für die Unterstützung bei den funktionellen Analysen. Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Ingolf E. Blasig, Dr. Jörg Piontek und Jimmi D. Cording für die gelungene Zusammenarbeit. Diese Kooperationen haben wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Ein sehr herzlicher Dank geht an alle Kollegen des ZLP für das sehr gute Arbeitsklima, für ihren Beistand bei allen anfallenden Problemen der Arbeit und für eine ereignisreiche Zeit auch außerhalb des Labors. Besonders hervorheben möchte ich hier Dr. Jörg Weiske und mich für die Einführung in selbständiges wissenschaftliches Arbeiten bedanken. Kai Albring danke ich für seine Fähigkeit, für alles eine Erklärung zu haben und Sonnhild Mittag für die Erschaffung der Üdersee-Tradition. Darüber hinaus bedanke ich mich bei Luise Kosel für die Rettung der Laborstimmung trotz Mitarbeiter-Dezimierung und für jegliche Unterstützung im Laboralltag. Mein allergrößter Dank gilt meinem „tighten“ Mitstreiter Max Dörfel für sehr nützliche Tipps und Tricks, die sich nicht nur beruflich sondern auch im Privaten als sehr hilfreich erwiesen haben.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern für ihre immerwährende Unterstützung, ohne die meine Ausbildung niemals möglich gewesen wäre. Darüber hinaus bedanke ich mich beim Rest meiner Familie und meinen Freunden, auf die ich immer zählen kann.

Ein besonders herzlicher Dank gebührt Simon Rikus – für alles, was uns verbindet.