

**Molekulare Analyse der Interaktion zwischen  
*Clostridium perfringens* Enterotoxin  
und Claudinen**

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  
Jonas Protze  
aus Erbach i. Odw

Berlin, 2014

---

Die vorliegende Arbeit wurde am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie unter der Leitung von Herrn Dr. Gerd Krause und Herrn Dr. Jörg Piontek im Zeitraum von Februar 2010 bis Juni 2014 angefertigt.

1. Gutachter: Dr. Gerd Krause

2. Gutachter: Prof. Dr. Hartmut Oschkinat

Disputation am 13.01.2015

---

*“Remember kids, the only difference between screwing around and science is writing it down!”*

Adam W. Savage

## Danksagung

Herrn Dr. Gerd Krause und Herrn Dr. Jörg Piontek danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit in ihren Arbeitsgruppen durchzuführen, für das sehr interessante und fordernde Thema sowie die geduldige, freundliche und kompetente Begleitung der Arbeit.

Bei Prof. Dr. Hartmut Oschkinat möchte ich mich herzlich für die Übernahme des zweiten Gutachtens bedanken.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Krause und Piontek danke ich für die schöne Zeit und angenehme Arbeitsatmosphäre, sowie die vielen hilfreichen Tipps und die nützlichen Diskussionen. Besonders hervorheben möchte ich hier vor allem Anna Piontek, Miriam Eichner und Jan Rossa, die immer ein offenes Ohr für mich und die Probleme des Laboralltags hatten, danke an Euch für die schönen Stunden! Vielen Dank auch an Stefan Dinter, für die gute Zusammenarbeit während seiner Masterarbeit.

Annika, Anita, Franziska, Gunnar, Katrin und Marcel vielen Danke für die gute Arbeitsatmosphäre im Büro und die abwechslungsreiche Zeit.

Weiterhin vielen dank an Arthur, Christian, Inna, Jimmy, Lars, Giovanna, Tarek und Wolfgang für die lustigen und interessanten fachlichen und nicht fachlichen Diskussionen, die immer für Unterhaltung und die manchmal nötige Ablenkung sorgten.

Ein herzliches Dankeschön auch an Sarah Ambrosi für das gute und schnelle Korrekturlesen.

Meinen Freunden Johannes, Annika, Sabine, Florian, und Julien danke ich für die langjährige Freundschaft, die mir sehr viel bedeutet, ohne Euch wäre ich nicht der, der ich bin!

Besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich während des Studium und der Doktorarbeit immer unterstützte. Daher Danke an meine Eltern Annedore und Edmund und an meinen Großvater Karlheinz, für die Unterstützung und die Motivation.

Ein riesengroßer Dank an Anna, für ihre Unterstützung sowie ihr Verständnis und ihre Geduld, vor allem gegen Ende dieser Arbeit.

<b>I</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>9</b>
<b>II</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>11</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>13</b>
<b>1.1</b>	<b><i>Clostridium perfringens</i></b>	<b>13</b>
<b>1.2</b>	<b><i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin</b>	<b>14</b>
1.2.1	Wirkungsweise von CPE	14
1.2.2	Die Struktur von CPE	15
<b>1.3</b>	<b>CPE-Rezeptoren: Claudine</b>	<b>18</b>
1.3.1	Topologie und Struktur der Claudine	18
1.3.2	Claudine: essentieller Bestandteil der “ <i>Tight Junctions</i> ”	19
1.3.3	Claudine und Krankheiten	21
<b>1.4</b>	<b>Die Interaktion von (c)CPE mit Claudinen</b>	<b>23</b>
1.4.1	Nicht alle Claudine sind CPE-Rezeptoren	23
1.4.2	Das CPE-Bindemotiv von Claudinen	24
1.4.3	Die Claudin-Bindungstasche von CPE	25
<b>1.5</b>	<b>Mögliche Nutzung von cCPE</b>	<b>26</b>
1.5.1	cCPE als TJ-Modulator	26
1.5.2	(c)CPE zur Behandlung oder Detektion von Tumoren	27
1.5.3	Limitierung der Nutzung von (c)CPE	28
<b>1.6</b>	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>29</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>31</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialien</b>	<b>31</b>
2.1.1	Chemikalien	31
2.1.2	Verbrauchsmaterialien und Geräte	32
2.1.3	Enzyme	33
2.1.4	Puffer und Lösungen	34
2.1.5	Medien und Zellen	35
2.1.6	Antikörper	36
2.1.7	Vektoren	36
2.1.8	Oligonukleotide	37
<b>2.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>39</b>
2.2.1	Plasmid-DNA-Präparation	39
2.2.2	Transformation von Bakterien	39
2.2.3	Agarose Gelelektrophorese	39
2.2.4	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	39
2.2.5	Sequenzierung	41
<b>2.3</b>	<b>Biochemische Methoden</b>	<b>42</b>
2.3.1	Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	42
2.3.2	Proteingehaltsbestimmung	43
2.3.3	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	43
2.3.4	<i>Semi-dry</i> Western Blot	44
2.3.5	Kovalente Modifikation von Proteinen	44
2.3.6	Größenausschlusschromatographie	45
<b>2.4</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>46</b>
2.4.1	Standardbedingungen bei der Arbeit mit Zellkulturen	46
2.4.2	Kultivieren von Zellen	46

2.4.3	Kryokonservierung und Auftauen von eukaryotischen Zellen	46
2.4.4	Ernten von eukaryotischen Zellen	47
2.4.5	Transiente Transfektion von HEK293-Zellen	47
2.4.6	Generierung von stabil transfizierten HEK293-Zelllinien	48
2.4.7	Zellulärer Bindungsassay	48
2.4.8	Bestimmung der Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) von cCPE im zellulären Bindungsassay	50
2.4.9	Lebendzellfärbung	50
2.4.10	Zelloberflächenbiotinylierung	51
<b>2.5</b>	<b>Bioinformatische Methoden</b>	<b>52</b>
2.5.1	Verwendete Sekundärstruktur- und Topologievorhersagen	52
2.5.2	Homologiemodellierung von Proteinen	53
2.5.3	Generierung des TMH-Modells von Cld5	54
2.5.4	Berechnung der Positionierung von Proteinen in einer Membran	55
2.5.5	Manuelle Dockingstudien	55
2.5.6	Visualisierung	56
<b>2.6</b>	<b>Statistik</b>	<b>56</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>57</b>
<b>3.1</b>	<b>Etablierung einer neuen Quantifizierungsmethode für den zellulären Bindungsassay</b>	<b>57</b>
3.1.1	Bestimmung der Antikörperverdünnung	57
3.1.2	Auch mit der neuen Quantifizierungsmethode zeigt sich eine klare Konzentrationsabhängigkeit der GST-cCPE-Bindung an Claudine	58
<b>3.2</b>	<b>Interaktion von cCPE mit Claudin-3 und Claudin-4</b>	<b>59</b>
3.2.1	<i>In-silico</i> -Analyse der cCPE-Kristallstruktur: Identifizierung einer putativen Claudin-Bindungstasche	59
3.2.2	cCPE zeigt Unterschiede im Bindungsverhalten an Cld3 und Cld4	60
3.2.3	Sequenzunterschiede in der EZS2 von Cld3 und Cld4 haben einen Einfluss auf die Bindung von cCPE	63
3.2.4	Erstellung der Homologiemodelle der EZS2 von Cld3 und Cld4	65
3.2.5	Orientierung der EZS2 von Cld3 und Cld4 in der Claudin-Bindungstasche von cCPE	66
3.2.6	Einfluss geladener Aminosäuren der EZS2 von Cld3 auf die Bindung von cCPE	70
<b>3.3</b>	<b>Interaktion von cCPE mit Claudin-1 und Claudin-5</b>	<b>72</b>
3.3.1	Cld3 nachahmende Mutanten von Cld1 und Cld5 erhöhen die Bindung von cCPE	73
3.3.2	<i>In-silico</i> -Identifikation von Resten in cCPE, die die Bindung an Cld1 und Cld5 steigern	77
3.3.3	Einfluss der Einführung einer positiv geladenen Aminosäure am Rand der Tripel-Tyr-Tasche auf die Bindung von cCPE an Cld1 und Cld5	79
3.3.4	Einzelne Aminosäuresubstitutionen des cCPE <sub>S305P/S307R/S313H</sub> -Konstruktes zeigen unterschiedliche Effekte auf Cld1 und Cld5	80
3.3.5	Einzelne Aminosäuresubstitutionen an der Tripel-Tyr-Tasche führen zu keiner gesteigerten Bindung von cCPE an Cld5	85
3.3.6	Kombination von Aminosäuresubstitutionen an der Tripel-Tyr-Tasche mit S313H	86
3.3.7	Präferierte Selektivität von cCPE <sub>Y306W/S313H</sub> für Bindung an Claudin-5	87
3.3.8	cCPE <sub>Y306W/S313H</sub> zeigt eine deutliche Bindung an Zellen mit endogenem Cld5	90
3.3.9	cCPE <sub>Y306W/S313H</sub> bindet mit nanomolarer Affinität an Claudin-5	91
<b>3.4</b>	<b>Interaktion von cCPE mit Claudin-6 bis Claudin-9</b>	<b>92</b>
3.4.1	Erstellung der Claudin-YFP-Konstrukte und Generierung von stabil transfizierten Zelllinien	92
3.4.2	Bindungsstudien von cCPE an Claudin-6 bis -9	92
<b>3.5</b>	<b>Erweiterung der EZS2: Modellierung der Transmembranhelices von Claudin-3 und Claudin-5</b>	<b>95</b>
3.5.1	Sekundärstruktur und Topologie von Claudin-3 und Claudin-5	96
3.5.2	Identifizierung von Heptaden-Motiven und Erstellung eines <i>coiled-coil</i> Templates	97
3.5.3	Vergleich der Transmembranhelix-Modelle von Cld3 und Cld5	98
3.5.4	<i>Ab-initio</i> -Modelle des TMH3-TMH4-Interfaces von Claudin-5	99

3.5.5	Bioinformatische Analyse evolutionär verknüpfter Kontakte in Claudin-5	101
3.5.6	<i>Ab-initio</i> -Modell von Claudin-5	102
<b>3.6</b>	<b>Markierung von cCPE</b>	<b>104</b>
3.6.1	Herstellung eines mit Fluorophoren gekoppelten cCPE-Konstrukts	104
3.6.2	Generierung eines mit Cryptophan A gekoppelten cCPE-Konstrukts	106
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>111</b>
<b>4.1</b>	<b>Vergleich unterschiedlicher Methoden zur Analyse der cCPE-Claudin-Interaktion</b>	<b>111</b>
<b>4.2</b>	<b>Neue Quantifizierungsmethode des zellulären Bindungsassays beschleunigt Screening von cCPE- und Claudin-Konstrukten</b>	<b>112</b>
<b>4.3</b>	<b>Die Claudin-Bindungstasche von CPE</b>	<b>113</b>
4.3.1	Die Orientierung der EZS2 in der Bindungstasche von cCPE	113
4.3.2	Die Interaktion von cCPE mit Claudin-3 und Claudin-4 wird hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen beeinflusst.	116
<b>4.4</b>	<b>Claudin-suptypspezifische Unterschiede in der Struktur der EZS2 von Cld3 und Cld4</b>	<b>118</b>
<b>4.5</b>	<b>Claudin-3 und -4 zeigen einen teilweise unterschiedlichen Bindungsmodus an CPE</b>	<b>118</b>
<b>4.6</b>	<b>Warum interagiert CPE nur schwach mit Claudin-1 und überhaupt nicht mit Claudin-5?</b>	<b>121</b>
4.6.1	Modifikationen an cCPE: R <sub>307</sub> (cCPE <sub>S307R</sub> & cCPE <sub>S305P/S307R/S313H</sub> ) interagiert nicht mit D <sup>(P-1)</sup> von Cld1 und Cld5	123
4.6.2	Modifikationen an cCPE: cCPE <sub>S305P/S307R/S313H</sub> zeigt eine gesteigerte Bindung an Cld1 und Cld5, ist allerdings ein Breitband-Claudin-Binder	124
4.6.3	Modifikationen an cCPE: Der Beitrag der Substitution S305P in cCPE <sub>S305P/S307R/S313H</sub> ZUR Bindungssteigerung an Cld1 und Cld5 ist unklar	124
4.6.4	Modifikationen an cCPE: Die Substitution S313H in CPE ändert die Form der Claudin-Bindungstasche	125
<b>4.7</b>	<b>Unterschiede der EZS2 von Cld1 und Cld5 zu Cld3 und Cld4</b>	<b>126</b>
<b>4.8</b>	<b>Die Bindung von cCPE an Claudin-1 und Claudin-5 wird von D<sup>(P-1)</sup> indirekt gestört</b>	<b>127</b>
<b>4.9</b>	<b>Die rational konzipierte Doppelmutante cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> ist ein wichtiger Schritt zu einem spezifischen Claudin-5-Binder</b>	<b>129</b>
4.9.1	Die Tripel-Tyr-Tasche von cCPE <sub>Y306W/S313H</sub> wurde durch die Substitution von Y <sub>306</sub> zu Tryptophan verkleinert	130
4.9.2	cCPE <sub>Y306W/S313H</sub> als Ausgangspunkt für die Entwicklung eines spezifischen Claudin-5-Binders	132
<b>4.10</b>	<b>Sind CPE-Varianten möglich, die gezielt mit einem Claudin-Subtyp interagieren?</b>	<b>134</b>
<b>4.11</b>	<b>Wie kann die Spezifität von cCPE für einzelne Claudin-Subtypen gesteigert werden?</b>	<b>135</b>
<b>4.12</b>	<b>cCPE als Biosensor zur Detektion von Claudin überexprimierenden Tumoren</b>	<b>137</b>
<b>4.13</b>	<b>Erweiterung der Strukturmodelle von Claudinen</b>	<b>139</b>
4.13.1	Welches TMH3-EZS2-TMH4-Modell von Claudin-5 ist am wahrscheinlichsten?	140
4.13.2	Überlegungen zu den möglichen Anordnungen der 4 Transmembranhelices in Claudinen	142
4.13.3	Modell R-1 ist das erste vollständige und durch experimentelle Daten bestätigte Claudin-5-Modell	143
<b>4.14</b>	<b>Vergleich der modifizierten Cld2-Peptid-CPE-Struktur mit den EZS2-Modellen und den Interaktionsmodellen von cCPE und Claudinen</b>	<b>144</b>

<b>4.15</b>	<b>Fazit und Ausblick</b>	<b>147</b>
<b>5</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>150</b>
<b>6</b>	<b>PUBLIKATIONSVERZEICHNIS</b>	<b>165</b>
<b>7</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>167</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b>	<b>168</b>
<b>8.1</b>	<b>Interaktion von cCPE mit unterschiedlichen Claudinen</b>	<b>168</b>
<b>8.2</b>	<b>Zelloberflächenbiotinylierung</b>	<b>173</b>
<b>8.3</b>	<b>Alignment der Sequenz des Helix-Caps aus 1W5C mit Cld3</b>	<b>174</b>
<b>8.4</b>	<b>Sekundärstruktur- und Topologievorhersage</b>	<b>174</b>
<b>8.5</b>	<b>Experimentelle Daten zum Modeling von Claudin-5</b>	<b>176</b>
<b>8.6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>178</b>
<b>8.7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>180</b>
<b>8.8</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>183</b>

## I Zusammenfassung

Claudine (Cld) sind essentielle Bestandteile der “*Tight Junctions*” (TJs) und verantwortlich für die Aufrechterhaltung dieser Zell-Zell-Kontakte. Die Bindung der C-terminalen Domäne von *Clostridium perfringens* Enterotoxin (cCPE) an die extrazelluläre Schleife 2 (EZS2) der Claudine, insbesondere von Cld3, Cld4 und Cld6–Cld9, verursacht eine reversible Öffnung der TJs. Eine Struktur-Funktionsanalyse des Systems ist daher für biomedizinische Anwendungen relevant, da cCPE im Prinzip zur Steigerung der parazellulären Wirkstoffaufnahme eingesetzt werden kann. Außerdem könnte cCPE oder CPE zur Diagnostik bzw. zur Behandlung von Cld3 oder Cld4 überexprimierenden Karzinomen verwendet werden. Es wäre auch wünschenswert, wenn cCPE an Cld5 binden würde um so die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für Cytostatika im Falle von Hirntumoren zu erhöhen. Dazu muss die Spezifität von cCPE jedoch umprogrammiert werden. Die Determinanten der cCPE-Cld-Interaktion und insbesondere der Spezifität der cCPE-Bindung an bestimmte Cld-Subtypen waren bisher jedoch unklar, da keine strukturellen Informationen zu Claudinen verfügbar sind.

Daher wurden im Zuge dieser Arbeit durch Kombination von strukturbioinformatischen Ansätzen und experimentellen molekularbiologischen Methoden detaillierte Strukturmodelle der Interaktion von cCPE mit den EZS2 von Cld3 und Cld4 ausgearbeitet. Diese wurden für das Design einer cCPE-Variante mit Cld5-Subtypspezifität verwendet. In einem weiteren Projektteil wurde cCPE durch Ankopplung eines Fluorophors sowie eines Käfigmoleküls für Xenon chemisch modifiziert und somit die ersten Schritte zur Verwendung als diagnostische Sonde zur Detektion einer Überexpression bestimmter Claudin-Subtypen unternommen.

Im Einzelnen wurde anhand der Kristallstruktur von cCPE sowie aufgrund der Ergebnisse zellulärer Bindungsstudien eine vollständige Kartierung und Charakterisierung der Claudin-Bindungstasche durchgeführt. Daraufhin wurden Homologiemodelle der EZS2 von Cld3 und Cld4 erstellt und cCPE-Cld-Interaktionsmodelle zwischen der Kristallstruktur von cCPE und der EZS2 von Claudin generiert. Durch gezielte Aminosäuresubstitutionen sowohl auf Claudin- als auch auf cCPE-Seite konnte eine Schlüsselinteraktion der Bindung identifiziert werden. Die hydrophobe Seitenkette von L<sub>150/151</sub> (Cld3/Cld4) interagiert mit einer stark hydrophoben Vertiefung in der Cld-Bindungstasche von cCPE, welche durch Y<sub>306</sub>, Y<sub>310</sub> und Y<sub>312</sub> (Tripel-Tyr-Tasche) gebildet wird. So konnte die Orientierung der EZS2 in der Cld-Bindungstasche festgelegt werden.

Durch Übertragung der Erkenntnisse aus den Untersuchungen zur Bindung von cCPE an Cld3 und Cld4 auf Cld1 und Cld5, Sequenzvergleiche der EZS2 von klassischen Claudinen sowie daran anschließende Bindungsstudien wurden je zwei Aminosäuren in der EZS2 von Cld1 (D<sub>150</sub>, T<sub>153</sub>) und Cld5 (D<sub>149</sub>, T<sub>151</sub>) identifiziert, welche die cCPE-Bindung schwächen

(Cld1) bzw. verhindern (Cld5). Unter Verwendung der Interaktionsmodelle konnten nun Varianten von cCPE mit veränderter Cld-Bindungstasche designed werden, die an Cld5 binden können. Durch Substitution eines Tyrosins (Y<sub>306</sub>) zu Tryptophan wurde die Tripel-Tyr-Tasche von cCPE verkleinert. Diese Verkleinerung in Kombination mit einem, die Cld-Bindungstasche verengenden, Austausch eines Serins (S<sub>313</sub>) zu Histidin ergab eine cCPE-Variante mit nanomolarer Affinität für Cld5 bei gleichzeitig schlechterer Bindung an die klassischen CPE-Rezeptor-Claudine (Cld3, Cld4, Cld6–Cld9).

Neben der Charakterisierung der cCPE-Cld-Interaktion wurde im Zuge dieser Arbeit auch ein vollständiges Modell von Cld5 anhand der von Jan Rossa experimentell ermittelten Daten in Verbindung mit evolutionären Kontakten generiert. Dieses Modell liefert erste Einblicke in die räumliche Orientierung der 4 Transmembranhelices von Claudinen zueinander und kann zur Entschlüsselung der komplexen *cis*- und *trans*-Interaktionen der Claudine beitragen, welche eine entscheidende Rolle bei der Funktion und Organisation der “*Tight Junctions*” spielen.

Das Hauptergebnis dieser Arbeit ist eine gezielte Veränderung des Bindungsverhaltens von cCPE, welches nativ nicht an Cld5 bindet. Durch rational gewählte Doppelsubstitutionen in cCPE (Y306W/S313H) wurde eine Bindung mit nanomolarer Affinität an Cld5 erreicht. Diese neue cCPE-Variante (cCPE<sub>Y306W/S313H</sub>) bietet eine Grundlage zur Entwicklung eines Cld5-spezifischen Binders und ist ein prinzipieller Nachweis dafür, dass auf Basis von cCPE auch cCPE-Varianten mit starker Bindung an nicht-CPE-Rezeptor-Claudine generiert werden können. Zusätzlich wurden in dieser Arbeit auch cCPE-Varianten mit verbesserter Spezifität für Cld3 (cCPE<sub>L223A/D225A/R227A</sub>) und Cld4 (cCPE<sub>L254A/S256A/I258A/D284A</sub>) erstellt. Somit ist es zum ersten Mal möglich, mit cCPE-Varianten bestimmte Cld-Subtypen gezielt zu binden bzw. von der Bindung auszuschließen – ein wichtiger Schritt zur Entwicklung von cCPE als TJ-Modulator, “*Drug Delivery*”-System oder zur Detektion bzw. Behandlung von Cld überexprimierenden Krebszellen. Darüber hinaus liefern die weiteren Ergebnisse der Arbeit detaillierte Einblicke in die molekulare Struktur und Funktionsweise der Claudine bzw. der cCPE-Claudin-Interaktion, die neue Möglichkeiten für die pharmakologische Entwicklung cCPE- oder CPE-basierender Cld-subtypspezifischer Claudin-Binder eröffnen. Das mit experimentellen Daten verifizierte vollständige Modell von Cld5 ist außerdem eine gute Grundlage für weiterführende Studien, die mittels gezielter Aminosäuresubstitutionen die Oligomerisierung und Organisation von Claudinen in “*Tight Junctions*” untersuchen.

## II Summary

Claudins are essential constituents of Tight Junctions (TJs) and responsible for maintenance of these cell-cell contacts. Binding of *Clostridium perfringens* Enterotoxin's C-terminal domain (cCPE) to the extracellular loop 2 (EZS2) of claudins, especially Cld3, Cld4 and Cld6-Cld9 causes a reversible opening of TJs. Thus, a structure-function analysis of this system is relevant for biomedical application, since cCPE could be used to enhance paracellular drug uptake. Furthermore cCPE respectively CPE could be used for detection or treatment of Cld3 or Cld4 overexpressing carcinomas. Particularly a Cld5 binding cCPE-variant would be of interest to enhance the permeability of the blood-brain barrier for cytostatics in cases of brain-tumours. However, this needs reprogramming of cCPE's specificity. Determinants of the cCPE-claudin interaction and cCPE's specificity for certain Cld-subtypes remained unclear, since no structural information is available for claudins.

Therefore, in the course of this work, detailed structural models of cCPE with the EZS2 of Cld3 and Cld4 were created by combining structural bioinformatics and methods of molecular biology in an iterative process. Subsequently, these Models were used to obtain a rational designed cCPE-variant with shifted Cld-subtype specificity towards Cld5. Furthermore, first steps towards a usage of cCPE as a diagnostic probe to detect overexpression of certain Cld-subtypes were taken by chemical modification of cCPE with fluorophores as well as a cage compound for Xenon.

In detail, utilizing cCPE's crystal structure and the results of cellular binding studies a full mapping and characterisation of cCPE's Cld-binding pocket was carried out and homology models of the EZS2 of Cld3 and Cld4, as well as cCPE-Cld interaction models, were created. Moreover, by directed substitution of residues in cCPE and claudins, one of the key interactions of cCPE-Cld binding was identified, and the orientation of the EZS2 in cCPE's Cld-binding pocket was determined. L<sub>150/151</sub> (Cld3/4) interacts with a deep and strongly hydrophobic pit within the Cld-binding pocket, which is formed by Y<sub>306</sub>, Y<sub>310</sub> and Y<sub>312</sub> (triple-Tyr pit).

Transfer of the knowledge gained by studying cCPE's binding to Cld3 and Cld4 to Cld1 and Cld5, sequence comparison of the EZS2 of classic claudins, as well as following binding studies, resulted in the identification of two residues each within the EZS2 of Cld1 and Cld5, which weaken (Cld1) or block (Cld5) the interaction with cCPE. Consequently, the interaction models were utilized to design cCPE-variants with a changed Cld-binding pocket, allowing binding to Cld5. By downsizing the triple-Tyr pit of cCPE with a substitution of tyrosine (Y<sub>306</sub>) to tryptophan, in combination with a substitution of serine (S<sub>313</sub>) to histidine, which narrows the Cld-binding pocket, a cCPE-variant with nanomolar affinity for Cld5 was created. This

new cCPE-variant (cCPE<sub>Y306W/S313H</sub>) also shows decreased binding to classic CPE-receptor claudins (Cld3, Cld4, Cld6-Cld9).

Apart from characterizing the cCPE-Cld interaction, a full model of Cld5 was established. This model is based on experimental data, determined by Jan Rossa as well as evolutionary contacts. It provides first insights into the arrangement of the 4 transmembrane helices of claudins and is also useful to unravel the complex *cis*- and *trans*-interactions of claudins, which have a crucial role in organisation and function of tight junctions.

The main result of this study is that two rational chosen substitutions (Y306W/S313H) change cCPE's binding behaviour to bind Cld5 with a nanomolar affinity. This new cCPE-Variant (cCPE<sub>Y306W/S313H</sub>) provides a good basis for development of a Cld5-specific binder and is a proof of principle that cCPE can be used to design variants targeting non-CPE-receptor claudins. Additionally, two cCPE-variants with improved specificity for Cld3 (cCPE<sub>L223A/D225A/R227A</sub>) and Cld4 (cCPE<sub>L254A/S256A/I258A/D284A</sub>) were generated in the course of this work. Thus, it is now for the first time possible to selectively target distinct Cld-subtypes with cCPE-variants, an important step for the development of cCPE as TJ-modulator, drug delivery system or tool for detection and treatment of claudin overexpressing tumours. In sum, the results provide detailed insights into the molecular structure and function of claudins and the cCPE-claudin interaction, which on the one hand contribute to new possibilities for the pharmacological development of subtype specific Cld-binders based on CPE and cCPE. On the other hand, the experimentally verified full model of Cld5 now allows to study oligomerisation and organisation of claudins in tight junctions by targeted substitutions.

# 1 Einleitung

## 1.1 *Clostridium perfringens*

*Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) ist ein gram-positives, stäbchenförmiges, obligat anaerobes und sporenbildendes Bakterium, wie alle Angehörigen der Gattung *Clostridium*. Das eigentliche Habitat von *Clostridien* sind anoxische Taschen im Boden. Einige *Clostridien*, darunter auch *C. perfringens*, sind allerdings auch Bestandteil der normalen Darmflora von Mammalia (Titball *et al.*, 1999; Madigan *et al.*, 2009, pp. 450–453). Neben den nicht pathogenen gibt es auch einige pathogene *Clostridien* wie z. B.: *C. botulinum* und *C. tetani*. Auch von *C. perfringens* existieren verschiedene pathogene Subspezies (Serotypen A–E), welche sich durch unterschiedliche Expression der  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\epsilon$ -,  $\iota$ -Toxine unterscheiden lassen. Insgesamt ist *C. perfringens* in der Lage, mindestens 12–14 unterschiedliche Toxine zu produzieren (McDonel, 1980a; Popoff & Bouvet, 2013). Es ist einer der Hauptverursacher des Gasbrands (Gasgangräs), ausgelöst durch das  $\alpha$ -Toxin (Awad *et al.*, 2001), sowie einer der häufigsten Verursacher von Lebensmittelvergiftungen in den USA und Europa (Olsen *et al.*, 2000; McClane, 2007; Scallan *et al.*, 2011).

Eine Korrelation zwischen *C. perfringens* und Lebensmittelvergiftungen wurde zwischen 1940 und 1950 entdeckt, und nach der Entwicklung des Ileal-Schleifen-Modells konnte dies 1968 am Kaninchen bewiesen werden (Duncan *et al.*, 1968). Letztlich wurde 1971 am Menschen gezeigt, dass bestimmte Stämme von *C. perfringens* für die Symptome der Lebensmittelvergiftung, einschließlich Diarrhö, verantwortlich sind (Strong *et al.*, 1971). In darauffolgenden Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Symptome der von *C. perfringens* ausgelösten Lebensmittelvergiftung durch aufgereinigtes *Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPE) ausgelöst werden (Niilo, 1973; Skjelkvåle & Uemura, 1977). Durch Inaktivierung des CPE codierenden Gens in *C. perfringens*-Stämmen – aus Menschen mit *C. perfringens*-vermittelten gastrointestinalen Krankheiten – wurde schließlich erwiesen, dass CPE ein essentieller Faktor für die Entstehung der intestinalen Pathologie von *C. perfringens* Typ A ist. Zudem wird vermutet, dass CPE zur durch Antibiotika ausgelösten Diarrhö beiträgt (Carman, 1997; Sarker *et al.*, 1999).

Die klassische Lebensmittelvergiftung durch *C. perfringens* erfolgt durch ungenügend erhitzte oder sterilisierte Nahrung. Nach Aufnahme von *C. perfringens* bzw. *C. perfringens*-Sporen über die Nahrung erfolgt eine Vermehrung der Bakterien im Dünndarm mit anschließender Sporulation. Während der Sporulation werden große Mengen CPE in der Mutterzelle gebildet und in parakristallinen "*Inclusion Bodies*" gelagert. Durch Lyse der Mutterzelle am Ende der Sporulation werden CPE und Sporen in das Darmlumen entlassen (Labbe, 1980, 1989).

## 1.2 *Clostridium perfringens* Enterotoxin

*Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPE) ist ein aus 319 Aminosäuren bestehendes Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 35 kDa. Es zeigt keine signifikante Homologie zu anderen bisher bekannten bakteriellen Toxinen auf Protein- oder DNA-Ebene (Czeczulin *et al.*, 1993). Einzig der nicht toxische Hämagglutinin-Bestandteil des Typ-C-Progenitortoxins aus *C. botulinum* weist 27% Identität und 46% Ähnlichkeit mit CPE auf (Fujinaga *et al.*, 1994). Zudem zeigte sich anhand der in 2011 gelösten Struktur, dass CPE eine Strukturhomologie mit den  $\beta$ -Poren bildenden Toxinen *C. perfringens*- $\epsilon$ -Toxin, Aerolysin und dem porenformenden hämolytischen Lectin aus *Laetiporus sulphureus* besitzt (PDB ID: 2XH6; Briggs *et al.*, 2011; PDB ID: 3AM2; Kitadokoro *et al.*, 2011). Schon vor Auflösung der vollständigen Struktur von CPE ergaben Strukturfunktionsanalysen, dass CPE aus zwei unterschiedlichen funktionellen Domänen besteht. Die N-terminale Domäne ist verantwortlich für die Zytotoxizität – hier wurde schon 2007 eine strukturelle Ähnlichkeit zu  $\beta$ -Poren formenden Toxinen vermutet (Smedley *et al.*, 2007). Die C-terminale Domäne (CPE<sub>194-319</sub> oder cCPE), deren Struktur 2008 gelöst wurde (cCPE, PDB ID: 2QUO; Van Itallie *et al.*, 2008), ist verantwortlich für die Bindung an Claudine (Hanna *et al.*, 1991; Kokai-Kun & McClane, 1997).

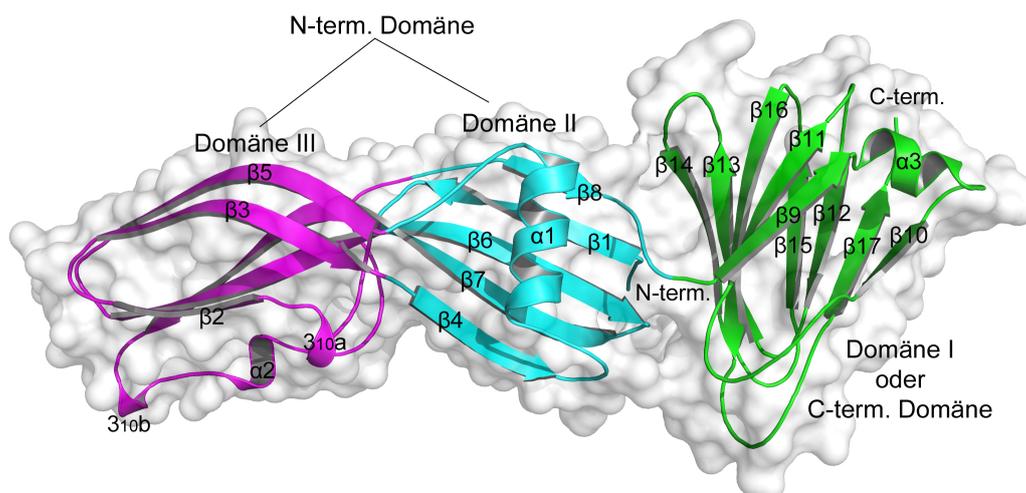
### 1.2.1 Wirkungsweise von CPE

Die Intoxikation mit CPE bewirkt zunächst eine Inhibierung der Aufnahme von Flüssigkeit und Ionen durch intestinale Epithelzellen mit nachfolgendem Zelltod, wodurch Flüssigkeit in das Darmlumen sekretiert wird (Sherman *et al.*, 1994). In *In-vitro*-Zellkultursystemen konnte gezeigt werden, dass CPE Epithelzellen von Darm, Leber und Niere unterschiedlicher Tierarten lysiert (Matsuda & Sugimoto, 1979; McClane & McDonel, 1979; McDonel, 1980b; Tolleshaug *et al.*, 1982). Nach Freisetzung von CPE in das Darmlumen erfolgt zuerst die Bindung an Rezeptoren an der Oberfläche von CPE-sensitiven Zellen. Hierbei fungieren Claudine (Cld), insbesondere die Subtypen Cld3 und Cld4, als Rezeptoren (Sonoda *et al.*, 1999; Fujita *et al.*, 2000; Kimura *et al.*, 2010). Daraufhin beginnt die CPE-induzierte Porenbildung. Als erstes bildet sich ein ca. 90 kDa großer SDS-sensitiver Komplex („kleiner Komplex“), zusammengesetzt aus CPE und Claudinen (Wieckowski *et al.*, 1994; Robertson *et al.*, 2007). Durch weitere Oligomerisierung entsteht aus ~6 dieser „kleinen Komplexe“ ein etwa 450 kDa großer SDS-resistenter „großer Komplex“ (CPE-Hexamer 1: CH-1). Die Bildung dieses „großen Komplexes“ führt zu einem Anstieg der Membranpermeabilität für Moleküle <200 Da. Dies wird vermutlich durch Insertion von CH-1 in die Plasmamembran und die hierdurch gebildete aktive Pore verursacht (Wieckowski *et al.*, 1998; Smedley *et al.*, 2007). Durch diese Membranpore kommt es zu einem Einstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen in die Zelle, welcher abhängig von der CPE-Konzentration ist und zu Apoptose (niedriger Ca<sup>2+</sup>-Influx) oder

onkotischer (hoher  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx) Nekrose führt (Chakrabarti *et al.*, 2003; Chakrabarti & McClane, 2005). Durch diese Zellschädigungen wird die basolaterale Membran der Zellen zugänglich, und es bildet sich ein weiterer größerer Komplex von 650 kDa, vermutlich bestehend aus 6 CPE, 12 Claudinen und Occludin (CPE-Hexamere 2: CH-2). Hierdurch wird eine Internalisierung von Occludin und Cld ausgelöst, was die parazelluläre Permeabilität erhöht und so zusätzlich zu der von CPE ausgelösten Diarrhö beitragen könnte (Singh *et al.*, 2001; Chakrabarti & McClane, 2005).

## 1.2.2 Die Struktur von CPE

Nach Aufklärung der CPE-Struktur (Abb. 1.1) zeigte sich, dass die 2 funktionellen Domänen von CPE insgesamt aus 3 Domänen aufgebaut sind. Domäne II und III (Kitadokoro *et al.*, 2011) sind Subdomänen der zytotoxischen N-terminalen Domäne (nCPE) von CPE (Briggs *et al.*, 2011), wohingegen die C-terminale Domäne (Briggs *et al.*, 2011) oder Domäne I (Kitadokoro *et al.*, 2011) für die Bindung an Claudine verantwortlich ist und cCPE (Van Itallie *et al.*, 2008) entspricht.



**Abb. 1.1: Kristallstruktur eines CPE-Monomers (PDB ID: 3AM2, Kitadokoro *et al.*, 2011), dargestellt als vereinfachter Cartoon mit Oberfläche (weiß). CPE besteht aus zwei funktionellen Domänen, die zytotoxische N-terminale Domäne setzt sich aus den Subdomänen Domäne II (Türkis) und Domäne III zusammen (Magenta). Domäne I entspricht der C-terminalen Domäne und cCPE (Van Itallie *et al.*, 2008) und enthält die Claudin-Bindungsstelle.**

Insgesamt setzt sich die Struktur von CPE aus 17 meist antiparallel verlaufenden  $\beta$ -Strängen, 3  $\alpha$ -Helices und zwei kurzen  $3_{10}$ -Helices zusammen (Abb. 1.1). Bei beiden Strukturen wurde nachgewiesen, dass die ersten N-terminalen 34 bzw. 35 Aminosäuren vorhanden sind, allerdings zeigten diese keine verwertbare Elektronendichte. Hieraus wurde geschlossen, dass dieser Bereich von CPE unstrukturiert ist (Briggs *et al.*, 2011; Kitadokoro *et al.*, 2011). In beiden Studien wurde auch gezeigt, dass CPE als Trimer kristallisiert. Die Autoren schließen daran allerdings die Vermutung an, dass der Trimerkomplex kein Präporen-

komplex bzw. nicht die eigentliche Porenstruktur ist (Briggs *et al.*, 2011; Kitadokoro *et al.*, 2011), sondern eher in der Spore vor Lyse oder als Zwischenschritt der Oligomerisierung vorkommt (Briggs *et al.*, 2011).

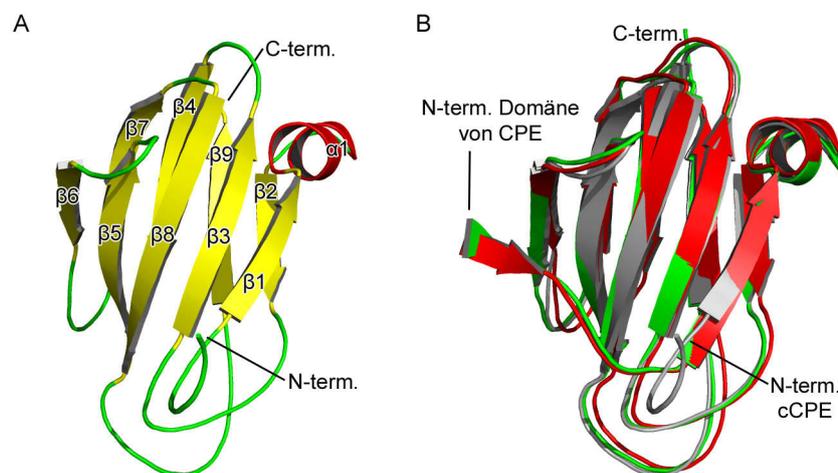
### 1.2.2.1 Die zytotoxische Domäne von CPE (nCPE)

Die N-terminale Domäne von CPE setzt sich (nach Briggs *et al.*, 2011) aus zwei Subdomänen zusammen, die (von Kitadokoro *et al.*, 2011) als Domäne II und Domäne III bezeichnet wurden. Sie zeigt eine ähnliche Topologie wie HA3a oder Domäne I von HA3b des Typ-C-Progenitor-Toxins aus *C. botulinum*, zu dem eine entfernte Verwandtschaft besteht (Fujinaga *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 2009). Domäne II setzt sich aus den  $\beta$ -Strängen  $\beta 1$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 6$ ,  $\beta 7$  und  $\beta 8$  zusammen, die sich in einer  $\beta$ -grasp-ähnlichen antiparallelen Topologie um eine  $\alpha$ -Helix arrangieren. Domäne III entspricht einem 5-strängigen antiparallelen  $\beta$ -Sandwich, gebildet aus  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 6$  und  $\beta 7$ , wobei sich  $\beta 6$  und  $\beta 7$  durch beide Subdomänen strecken (Abb. 1.1) und eine Art Stamm der Domäne (nCPE) bilden (Briggs *et al.*, 2011; Kitadokoro *et al.*, 2011).

Trotz der Struktur von CPE ist nur wenig über die Mechanismen der Oligomerisierung und Porenbildung bekannt. Der unstrukturierte N-terminale Bereich bis Position 37 von CPE spielt offenbar keine Rolle bei der Oligomerisierung oder der Zytotoxizität, da eine Abspaltung dieser Aminosäuren sogar zu einer Steigerung der Toxizität führt (Kokai-Kun & McClane, 1997). Dies wird vermutlich durch eine bessere Zugänglichkeit der Aminosäuren der Region 45–53, bzw. an Position 48 (Aspartat) und 51 (Isoleucin), am Übergang zwischen Domäne II und III verursacht. Von diesen Positionen wurde in unterschiedlichen Studien gezeigt, dass sie essentiell für die Oligomerisierung zum CH1-Komplex von CPE sind (Kokai-Kun & McClane, 1997; Smedley & McClane, 2004). Durch Deletion der Aminosäuren 81–106 entsteht eine CPE-Variante, die zwar zur Bildung des CH1-Komplexes fähig ist, allerdings keine Zytotoxizität besitzt (Smedley *et al.*, 2007). In der Struktur von CPE zeigt sich, dass diese amphipatische Sequenz eine für  $\beta$ -Poren formende Toxine typische Helix-turn- $\beta$ -sheet-Struktur bildet (Briggs *et al.*, 2011; Kitadokoro *et al.*, 2011). Daher wird angenommen, dass CPE ein  $\beta$ -Poren formendes Toxin ist, und die Porenbildung – und somit der toxische Effekt von CPE – durch Insertion der amphipatischen Helix-turn- $\beta$ -sheet-Region in die Zellmembran verursacht wird. Kitadokoro *et al.* vermuten, dass die Insertion dieser Helix-turn- $\beta$ -sheet-Region in die Membran durch ein Umklappen der langen antiparallelen  $\beta$ -Stränge  $\beta 6$  und  $\beta 7$  ermöglicht wird, da durch dieses eine räumliche Nähe der Positionen 81–106 zur Membran zustande kommen könnte (Kitadokoro *et al.*, 2011).

### 1.2.2.2 Die Claudin-Bindungsdomäne (cCPE)

Die C-terminale Domäne enthält die Claudin-Bindungsstelle. Die Struktur dieser Domäne ist in beiden CPE-Strukturen quasi identisch zu der 2008 publizierten Struktur von CPE<sub>194-319</sub> (Abb. 1.2, cCPE, PDB ID: 2QUO, Van Itallie *et al.*, 2008; Briggs *et al.*, 2011; Kitadokoro *et al.*, 2011). Der einzige deutliche Unterschied besteht in der Orientierung der N-terminalen Aminosäuren 194–203 in cCPE im Vergleich zu CPE, die einer Hinge-Region zwischen der N-terminalen Domäne und der C-terminalen Domäne zuzuordnen sind (Abb. 1.2 B). Die Topologie der C-terminalen Domäne entspricht einem 9-strängigen  $\beta$ -Sandwich mit einer kurzen Helix zwischen  $\beta 1$  und  $\beta 2$  (nach cCPE-Nomenklatur) bzw.  $\beta 9$  und  $\beta 10$  (nach CPE-Nomenklatur). Da in der vorliegenden Arbeit mit cCPE-Konstrukten gearbeitet wurde, die strukturell CPE<sub>194-319</sub> entsprechen, wird im Weiteren die Nomenklatur für cCPE bei der Benennung der Strukturelemente der C-terminalen Domäne verwendet (Abb. 1.2 A).



**Abb. 1.2: Topologie von cCPE und Vergleich mit den Strukturen von CPE.** (A) Vereinfachte Cartoondarstellung der Struktur von cCPE (PDB ID: 2QUO, Van Itallie *et al.*, 2008), gefärbt nach Sekundärstruktur ( $\alpha$ -Helices: rot,  $\beta$ -Faltblätter: gelb, Loop-Bereiche: grün). (B) Vergleich der Strukturen von CPE (grün: PDB ID: 3AM2, Kitadokoro *et al.*, 2011, rot: PDB ID: 2XH6, Briggs *et al.*, 2011) und cCPE (weiß) als Überlagerung. Die größte Abweichung zwischen den CPE-Strukturen und der Struktur von cCPE zeigt der N-Terminus von cCPE im Vergleich zum Übergang zur N-terminalen Domäne der CPE-Strukturen.

Alle nebeneinanderliegenden  $\beta$ -Stränge, mit Ausnahme von  $\beta 1$  und  $\beta 3$ , sind antiparallel angeordnet (Van Itallie *et al.*, 2008). Topologisch zeigt cCPE somit eine überraschende Ähnlichkeit zu anderen rezeptorbindenden Domänen bakterieller Toxine wie ColG aus *C. histolyticum* (PDB ID: 1NQJ & 1NQD, Wilson *et al.*, 2003) und Cry4Ba aus *Bacillus thuringiensis* (PDB ID: 1W99, Boonserm *et al.*, 2005), wobei jedoch keine Sequenzhomologie zu erkennen ist (Van Itallie *et al.*, 2008).

Eine Deletion der 30 C-terminalen Aminosäuren (290–319), die die Stränge  $\beta 8$  und  $\beta 9$  und den dazwischenliegenden Loop bilden, führt zu einem kompletten Verlust der Bindung von CPE bzw. cCPE an Claudine. Zudem zeigen das C-terminale Fragment CPE<sub>290-319</sub> bzw. korrespondierende Peptide eine Bindung an Claudine, woraus geschlossen wurde, dass diese

Stränge die Kernbindungsregion für Claudine bilden (Hanna *et al.*, 1991; Kokai-Kun & McClane, 1997; Van Itallie *et al.*, 2008; Briggs *et al.*, 2011; Kitadokoro *et al.*, 2011). In anderen Studien wurde allerdings dargelegt, dass längere Fragmente eine deutlich bessere Interaktion mit Claudinen zeigen (Winkler *et al.*, 2009), was darauf schließen lässt, dass CPE<sub>290-319</sub> nicht die volle Claudin-Bindungsdomäne umfasst und weitere Bereiche involviert sind.

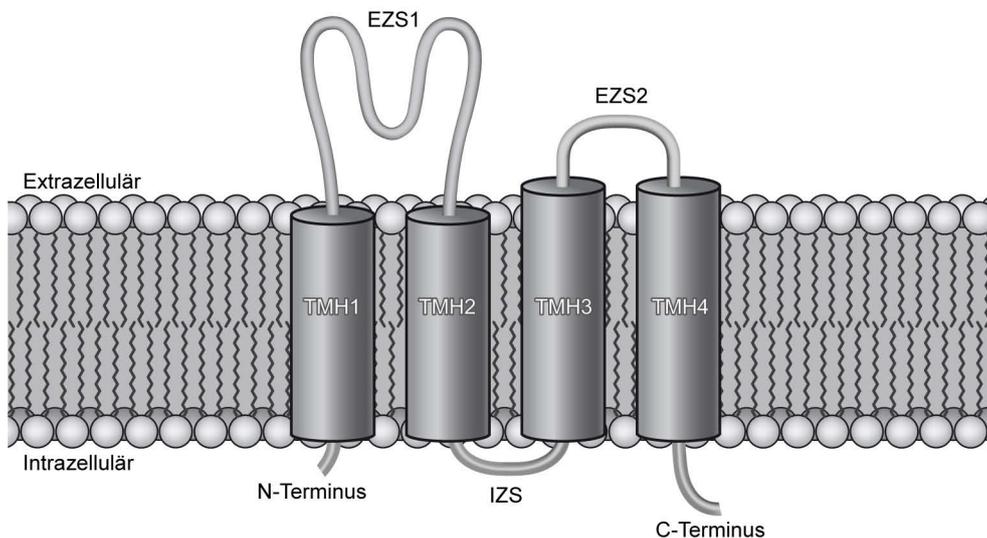
### 1.3 CPE-Rezeptoren: Claudine

Zuerst wurden zwei Proteine als CPE-Rezeptoren in 1997 beschrieben. Als erster CPE-Rezeptor wurde ein bis dahin unbekanntes Protein aus CPE-sensitiven Vero-Zellen beschrieben und als CPE-R klassifiziert (Katahira *et al.*, 1997a). Über weitere Sequenzanalysen und Screenings wurde daraufhin das als "*rat androgen withdrawal apoptosis protein*" beschriebene RVP1 (Briehl & Miesfeld, 1991) als strukturell verwandt erkannt und als weiterer CPE-Rezeptor (CPE-R2) klassifiziert (Katahira *et al.*, 1997b). Erst im Nachhinein wurden diese der damals neu entdeckten Proteinfamilie der Claudine (Cld) als Claudin-3 (Cld3) und Claudin-4 (Cld4) zugeordnet (Morita *et al.*, 1999). Seitdem wurden in Vertebraten über 50 Mitglieder der Claudin-Familie entdeckt (Baltzegar *et al.*, 2013) und 27 Mitglieder in Mammalia beschrieben (Mineta *et al.*, 2011). Anhand der Aminosäuresequenzen lassen sich Claudine in 2 Gruppen einteilen, die klassischen Claudine und die nicht-klassischen Claudine, wobei erstere eine größere Ähnlichkeit zueinander haben als letztere. Zu den klassischen Claudinen gehören Cld1–Cld10, Cld14, Cld15, Cld17 und Cld19. Cld11, Cld12, Cld13, Cld16, Cld18 sowie Cld20–Cld24 werden zu den nicht-klassischen gerechnet (Krause *et al.*, 2008). Zum Zeitpunkt der Klassifizierung waren Cld25–Cld27 noch nicht bekannt, da sie im Vergleich zu den klassischen Claudinen allerdings unterschiedliche Längen in den Sequenzen der extrazellulären Schleifen (EZS) zeigen, ist davon auszugehen, dass sie zu den nicht-klassischen Claudinen gehören (Krause *et al.*, 2008; Mineta *et al.*, 2011). Bisher ist die Phylogenie und Benennung der Claudine allerdings noch nicht zufriedenstellend gelöst, z. B. bestehen deutliche Unterschiede in der Benennung zwischen Claudinen aus Fischen und solchen aus Mammalia (Baltzegar *et al.*, 2013).

#### 1.3.1 Topologie und Struktur der Claudine

Claudine sind Transmembranproteine mit einem Molekulargewicht von 20 bis 27 kDa. Anhand von Hydropathie-Plots wurden 4 konservierte  $\alpha$ -helikale Transmembransegmente (TMH) identifiziert (Kyte & Doolittle, 1982; Hua *et al.*, 2003). Der sehr kurze N-, sowie der – das PDZ-Bindemotiv tragende – C-Terminus von Claudinen befinden sich intrazellulär.

TMH1 und TMH2 sowie TMH3 und TMH4 sind über die erste extrazelluläre Schleife (EZS1) bzw. die kurze zweite extrazelluläre Schleife (EZS2) miteinander verbunden (Abb. 1.3, Furuse *et al.*, 1998a, 1998b).



**Abb. 1.3: Schematische Skizze der Claudin-Topologie.** EZS: Extrazelluläre Schleife, IZS: Intrazelluläre Schleife, TMH: Transmembranhelix.

Bisher ist keine Kristallstruktur von Claudinen bekannt, allerdings wurde für die EZS2 von klassischen Claudinen eine Helix-Turn-Helix-Struktur vorhergesagt (Krause *et al.*, 2008). Für Cld5 konnte, durch Kombination von bioinformatischen Methoden und Mutagenese-Studien, ein Homologiemodell der EZS2 erstellt werden (Krause *et al.*, 2008, 2009; Piontek *et al.*, 2008; Winkler *et al.*, 2009). Basierend auf einer Sequenzhomologie der EZS2 von Cld5 zu einem Bereich aus dem Protein BB2244 aus *Bordetella bronchiseptica* (PDB ID: 2BDV, Forouhar *et al.*, 2005) wurde ein Helix-Turn-Helix-Modell der EZS2 von Cld5 entwickelt, das experimentelle Daten zur Faltung und Funktion der EZS2 erklären konnte (Piontek *et al.*, 2008).

### 1.3.2 Claudine: essentieller Bestandteil der “Tight Junctions”

Claudine formen das Rückgrat der “Tight Junctions” (TJs) (Krause *et al.*, 2008), also der Zell-Zell-Kontakte an der apikalen Seite der lateralen Plasmamembran von Epi- und Endothelzellen. TJs umschließen diese Zellen ringförmig, versiegeln den parazellulären Spalt zwischen den Zellen und halten die Zellpolarität aufrecht (Cereijido *et al.*, 2000; Tsukita *et al.*, 2001). Im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) erscheinen sie als Verschmelzungen der Plasmamembran zweier Zellen (Farquhar & Palade, 1963). Durch Anwendung von Gefrierbruchtechnik zur Trennung der Lipidschichten der Membran lassen sich TJs auch als Netzwerk von Transmembranproteinsträngen darstellen (Staehein, 1973). TJs bestehen,

abgesehen von Claudinen, aus einer Vielzahl von weiteren Tetraspan-Transmembranproteinen, wie Occludin, Tricellulin, und MarvelD3 sowie aus der Familie der *Junctional Adhesion Molecules* (JAM) (Furuse *et al.*, 1993; Martin-Padura *et al.*, 1998; Aurrand-Lions *et al.*, 2001; Ikenouchi *et al.*, 2005; Steed *et al.*, 2009). Zum TJ-Komplex gehören auch assoziierte zytoplasmatische Proteine, wie Zonula Occludens-1 bis -3 (ZO), die die TJs mit dem Zytoskelett verknüpfen und regulatorisch auf ihre Zusammensetzung bzw. Zersetzung wirken (Gumbiner *et al.*, 1991; Itoh *et al.*, 1991, 1999; Haskins *et al.*, 1998; Fanning *et al.*, 2002; González-Mariscal *et al.*, 2003; Umeda *et al.*, 2006). Weitere regulatorische Proteine, wie z. B.: der Transkriptionsfaktor “ZO-1-associated nucleic acid binding protein” (ZONAB), und Signalproteine, wie die GTPasen “Ras related in brain 13” und “Ras related in brain 3b” (Rab13 und Rab3b), wurden ebenfalls als Bestandteile des TJ-Komplexes beschrieben (Harder & Margolis, 2008).

Neben der Aufrechterhaltung der Polarität von Zellen (“fence“-Funktion) durch zellumfassende TJ-Stränge, die eine Diffusion von Lipiden und Membranproteinen zwischen der apikalen und basolateralen Plasmamembran von Zellen verhindern, tragen TJs einen entscheidenden Teil zur Aufrechterhaltung des inneren Milieus von Organen gegenüber der Umgebung bei, da sie die parazelluläre Diffusion verhindern bzw. kontrollieren (“gate“-Funktion, Diamond, 1977). Eine wichtige Rolle hierbei spielen die Claudine, da die Anwesenheit unterschiedlicher Cld-Subtypen die Dichtigkeit bzw. Permeabilität der TJs stark beeinflusst (Krause *et al.*, 2008). Claudine dichten den parazellulären Spalt größen- und ladungsselektiv ab und werden funktionell in zwei verschiedene Gruppen eingeordnet: barrierebildende Claudine wie z. B. Cld1, -3, -4 und -5 (Van Itallie *et al.*, 2001; Furuse *et al.*, 2002; Wen *et al.*, 2004; D’Souza *et al.*, 2005) und porenformende Claudine wie Cld2, -7, -10 und -16 (Amasheh, 2002; Alexandre *et al.*, 2005; Hou *et al.*, 2005; Van Itallie *et al.*, 2006). Abhängig vom Expressionsmuster der Cld-Subtypen unterscheidet sich somit die Dichtigkeit der TJs unterschiedlicher Organe (Krause *et al.*, 2008). Entscheidend über die Fähigkeit von Claudinen, Poren zu bilden – bzw. über die Ionenselektivität der Poren –, sind Aminosäuren der EZS1 (Yu *et al.*, 2009).

Claudine copolymerisieren über homophile (zwischen gleichem Cld-Subtyp) und heterophile Interaktion (zwischen unterschiedlichen Cld-Subtypen) zu Heteropolymeren (Furuse *et al.*, 1999), wobei zusätzlich zwischen *cis*-Interaktion (zwischen Molekülen innerhalb einer Zellmembran) und *trans*-Interaktion (zwischen Molekülen in gegenüberliegenden Zellmembranen) unterschieden wird, die zur Ausbildung der polymeren TJ-Stränge innerhalb der Zellmembran führen (Krause *et al.*, 2008; Piontek *et al.*, 2008). Die Nomenklatur der Cld-Interaktion wurde von den Cadherin-Interaktionen der “Adherens Junctions” übernommen (Ahrens *et al.*, 2002). Die Mechanismen der Oligomerisierung von Claudinen – und die

Gründe bzw. Bedingungen der Kompatibilität bestimmter Cld-Subtypen zueinander – sind allerdings nur bruchstückhaft bekannt (Daugherty *et al.*, 2007; Piontek *et al.*, 2008).

Die EZS2 von Claudinen spielt eine wichtige Rolle bei der *trans*-Interaktion und scheint eher unwichtig für die *cis*-Interaktion zu sein. Für Cld5 konnte z. B. gezeigt werden, dass Mutationen in der EZS2 zur Störung der *trans*-Interaktion führen können, wodurch wiederum die Formierung von polymeren TJ-Strängen gestört wurde (Krause *et al.*, 2008; Piontek *et al.*, 2008). Neben dieser essentiellen Funktion für die Organisation der TJ-Stränge fungiert die EZS2 auch als Bindungsstelle für CPE (Fujita *et al.*, 2000; Winkler *et al.*, 2009).

### 1.3.3 Claudine und Krankheiten

Aufgrund der wichtigen Funktion der Claudine in den TJs ist es nicht verwunderlich, dass einige mit Claudinen assoziierte Krankheiten existieren. Viele Krankheiten lösen eine veränderte Barrierenfunktion der TJs aus oder gehen mit dieser einher; Hierzu zählen Nierenerkrankungen, inflammatorische Darmerkrankungen, bakterielle oder virale Infektionen und Krebserkrankungen (Sawada *et al.*, 2003; Mullin *et al.*, 2005).

Die rezessiv vererbte Nierenerkrankung "*familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis*" wird durch Mutationen in Cld16 verursacht, wodurch die parazelluläre Magnesium- und Calcium-Resorption im Tubulus der Henleschen Schleife gestört wird (Simon, 1999; Weber *et al.*, 2001; Kausalya *et al.*, 2006). Bei Mutationen in Cld19 konnte eine ähnliche Erkrankung gezeigt werden (Konrad *et al.*, 2006). Eine Form der autosomal-rezessiv vererbten Taubheit wird durch Mutationen in Cld14 verursacht (Wilcox *et al.*, 2001; Wattenhofer *et al.*, 2005).

Bei Morbus Crohn, einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung, zeigen Patienten häufig eine Barrierefehlfunktion der TJs im *Colon sigmoideum* (Sigmadarm). Diese wird durch herunterregulierte Expression von Cld5 und Cld8 bei gleichzeitig hochregulierter Expression von Cld2 verursacht (Zeissig *et al.*, 2007).

Durch Entzündungen ausgelöste Ödeme im Gehirn können zum Verlust der Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranken-TJs führen. Des Weiteren konnte ein selektiver Verlust von Cld3 aus den TJs der Blut-Hirn-Schranke, in Gewebe von Patienten mit *Glioblastoma multiforme*, sowie für die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) im Mausmodell nachgewiesen werden (Wolburg *et al.*, 2003).

Akute Infektionen mit bestimmten Bakterienarten können ebenso zum Zusammenbruch bzw. zur Änderung der Barrierefunktion von TJs führen, wie z. B. Infektionen mit *Shigella flexneri*, *Campylobacter jejuni*, enteropathogenen *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* oder *C. perfringens* (McClane, 2001; Sakaguchi *et al.*, 2002; Muza-Moons *et al.*, 2004; Fedwick *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006). Bei einer Infektion mit *Helicobacter pylori* wird die epitheliale

Barriere des Magenepithels durch eine Aktivierung der “*Myosin light chain*”-Kinase geöffnet (Verlust von Cld4, Cld5 und Occludin aus den TJ-Strängen, Fedwick *et al.*, 2005).

Claudine können ebenso eine Rolle bei viralen Infektionen spielen. So wurde z. B. gezeigt, dass das Hepatitis-C-Virus (HCV) in einer späten Phase des Eintritts in die Wirtszelle Cld1 als Korezeptor benötigt, und dass eine Blockierung der EZS1 von Cld1 durch Antikörper eine Infektion der Zellen verhindern kann (Evans *et al.*, 2007).

Eine Dysregulation von TJ-Proteinen, insbesondere von Claudinen, findet man auch häufig bei Tumoren (Morin, 2005; Swisshelm *et al.*, 2005). So konnte eine Herunterregulierung von Cld1 bei einigen Brust- und Colontumoren, bei *Glioblastoma multiforme*, Prostata-Adenokarzinomen, sowie spinozellulären Karzinomen gezeigt werden (Krämer *et al.*, 2000; Liebner *et al.*, 2000; Morita *et al.*, 2004; Resnick *et al.*, 2005; Tokés *et al.*, 2005; Sheehan *et al.*, 2007). Für Cld2 konnte ebenfalls eine Herunterregulierung bei Brust- und Prostatatumoren gezeigt werden (Soini, 2005). Öfter jedoch wurde eine Überexpression von Claudinen in den bisher veröffentlichten Studien festgestellt. Für kolorektale Karzinome wurde z. B. eine Überexpression von Cld1 nachgewiesen (Miwa *et al.*, 2001; de Oliveira *et al.*, 2005), und für Cld3, Cld4 und Cld7 konnte in tumorösen Geweben aus Brust, Colon, Eierstöcken, Eileitern, Harnblase, Magen, Pankreas, Prostata, Schilddrüse und Uterus eine Überexpression gezeigt werden (Hough *et al.*, 2000; Long *et al.*, 2001; Michl *et al.*, 2001; Rangel *et al.*, 2003; Kominsky *et al.*, 2004; Nichols *et al.*, 2004; de Oliveira *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2005; Hewitt *et al.*, 2006). Die Herunterregulierung von Claudinen bzw. TJ-Proteinen stimmt überein mit der allgemein anerkannten Idee eines Einhergehens der Tumorgenese mit (teilweisem) Verlust der Barrierefunktion von TJs, welcher für die Dedifferenzierung und Invasivität von Krebszellen relevant sein könnte. Wohingegen relativ unklar ist, welche Rolle eine Überexpression von Claudinen in Krebs spielen könnte – überexprimierte Claudine müssen jedoch nicht in TJs vorliegen. Bei kolorektalen Karzinomen z. B., die Cld1, Cld3 und Cld4 überexprimieren, konnte gezeigt werden, dass die Claudine in desorganisierten, nicht-funktionellen TJ-Strängen vorliegen, und dass das Gewebe im Vergleich zu normalem kolorektalem Gewebe eine erhöhte Permeabilität aufweist (de Oliveira *et al.*, 2005). Eine Überexpression von Cld3 und Cld4 hat auch deutlichen Einfluss auf die Invasivität von Krebszellen. Bei Eierstockkarzinomzellen führte die Überexpression von Cld3 und Cld4 zu einer gesteigerten Invasivität, wohingegen die Überexpression von Cld4 in Pankreaskrebszellen zu einer verminderten Invasivität und Metastasenbildung führte (Michl *et al.*, 2003; Agarwal *et al.*, 2005). Aufgrund der tumorspezifischen Expressionsmuster von Claudinen könnten diese als Markerproteine in der Tumordiagnostik und Bildgebung verwendet werden (Morin, 2005; Hewitt *et al.*, 2006; Neesse *et al.*, 2013).

## 1.4 Die Interaktion von (c)CPE mit Claudinen

### 1.4.1 Nicht alle Claudine sind CPE-Rezeptoren

Wie schon unter 1.3 dargestellt, wurden Cld3 und Cld4 zunächst als CPE-Rezeptoren beschrieben und erst im Nachhinein der Claudin-Familie zugeordnet (Katahira *et al.*, 1997b; Morita *et al.*, 1999; Sonoda *et al.*, 1999). Kurz darauf wurde eine Bindung von CPE an Cld6, Cld7, Cld8 und Cld14 nachgewiesen (Fujita *et al.*, 2000). L-Fibroblasten, die diese Claudine exprimierten, zeigten eine deutliche Bindung von I<sup>125</sup>-markiertem CPE, und die Behandlung mit Vollängen-CPE ergab einen zytotoxischen Effekt auf diese Zellen (Fujita *et al.*, 2000; Kimura *et al.*, 2010). Eine Übersicht über die bisher bestimmten Assoziationskonstanten von CPE für unterschiedliche Cld-Subtypen gibt Tab. 1.1.

**Tab. 1.1:** Assoziationskonstanten von CPE für unterschiedliche Cld-Subtypen

Cld-Subtyp	Assoziationskonstante (K <sub>a</sub> )	CPE-Konstrukt	Referenz
Intestinale Epithelzellen (Kaninchen)	5,66 x 10 <sup>7</sup> M <sup>-1</sup> ("high affinity site") 8,22 x 10 <sup>6</sup> M <sup>-1</sup> ("low affinity site")	I <sup>125</sup> -CPE	McDonel, 1980b
Cld3	8,40 x 10 <sup>7</sup> M <sup>-1</sup>	I <sup>125</sup> -CPE	Sonoda <i>et al.</i> , 1999
Cld3	4,60 x 10 <sup>7</sup> M <sup>-1</sup>	I <sup>125</sup> -CPE	Katahira <i>et al.</i> , 1997b
Cld4	1,10 x 10 <sup>8</sup> M <sup>-1</sup>	I <sup>125</sup> -CPE	Sonoda <i>et al.</i> , 1999
Cld4	7,94 x 10 <sup>7</sup> M <sup>-1</sup>	I <sup>125</sup> -CPE	Katahira <i>et al.</i> , 1997b
Cld6	9,70 x 10 <sup>7</sup> M <sup>-1</sup>	I <sup>125</sup> -CPE	Fujita <i>et al.</i> , 2000
Cld7	8,80 x 10 <sup>7</sup> M <sup>-1</sup>	I <sup>125</sup> -CPE	Fujita <i>et al.</i> , 2000
Cld8	1,00 x 10 <sup>6</sup> M <sup>-1</sup>	I <sup>125</sup> -CPE	Fujita <i>et al.</i> , 2000
Cld14	3,60 x 10 <sup>6</sup> M <sup>-1</sup>	I <sup>125</sup> -CPE	Fujita <i>et al.</i> , 2000
GST-Cld3 <sub>141-160</sub>	1,00 x 10 <sup>8</sup> M <sup>-1</sup>	His <sub>10</sub> -CPE <sub>184-319</sub>	Fujita <i>et al.</i> , 2000

Zunächst wurden Cld1 und Cld2 als nicht-CPE-bindend beschrieben, da die Inkubation mit CPE keine zytotoxischen Effekte auf Cld1 oder Cld2 exprimierende L-Fibroblasten hatte (Sonoda *et al.*, 1999; Fujita *et al.*, 2000). Jedoch wurde später ein leichter zytotoxischer Effekt von Vollängen-CPE auf Cld1 oder Cld2 exprimierende HEK293-Zellen und L-Fibroblasten gezeigt (Kimura *et al.*, 2010).

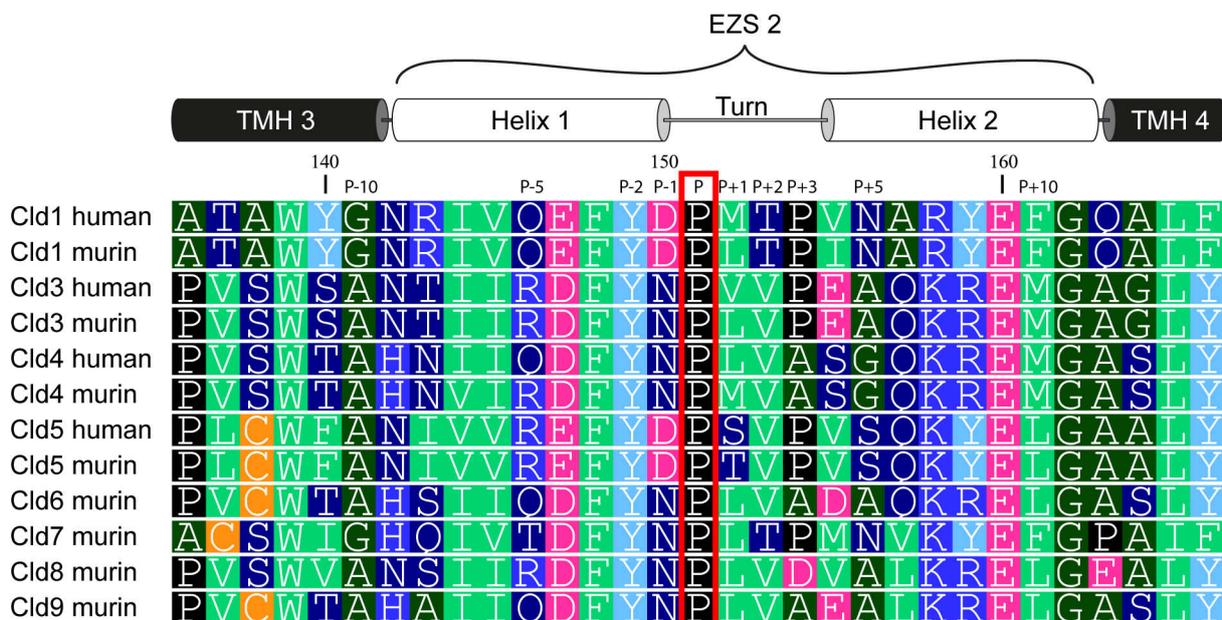
Durch Identifizierung der EZS2 von Claudinen als CPE-Bindungstelle (Fujita *et al.*, 2000) wurde es möglich, die CPE-Claudin-Interaktion mit Peptid-Arrays zu untersuchen (Winkler *et al.*, 2009). Hierbei wurden 15–20 Aminosäuren lange, immobilisierte Cld-EZS2-Peptide mit GST-CPE<sub>116-319</sub> inkubiert. Dadurch wurde Cld9 als weiteres CPE-bindendes Claudin identifiziert, die anderen vorher noch nicht auf CPE-Bindung untersuchten Claudine (Cld10–Cld13, Cld15, Cld16, Cld18–Cld20 & Cld22) zeigten keine eine Bindung von CPE (Winkler *et al.*, 2009). Interessanterweise zeigte sich in den Peptid-Arrays jedoch auch keine Bindung von CPE an Cld4 und Cld8, was vermutlich daran liegt, dass diese Peptide nicht in der richtigen Konformation für eine CPE-Bindung vorlagen, da sich die Peptid-Konformation von der Konformation des vollständigen Claudins unterscheidet (Winkler *et al.*, 2009). Zudem ergab diese Studie, dass GST-cCPE<sub>116-319</sub> in zellulären Bindungsassays – im Gegensatz zu

Volllängen-CPE und GST-cCPE<sub>194-319</sub> – eine schwache Bindung an Cld5 zeigt, wobei der Grund für diesen Effekt unklar ist (Winkler *et al.*, 2009). Des Weiteren wurde mittels Substitutionsmapping von Cld3-EZS2-Peptiden das Motiv <sub>148</sub>NPLVP<sub>152</sub> als essentiell für die Cld3-cCPE-Interaktion identifiziert (Winkler *et al.*, 2009). Eine Übersicht der Ergebnisse der unterschiedlichen Studien findet sich in tabellarischer Form im Anhang (Tab. 8.1).

Zwar sind die Ergebnisse teilweise widersprüchlich, und der Vergleich der verschiedenen Methoden zur Messung der Cld-CPE-Interaktion ist aufgrund ihrer unterschiedlichen Sensitivität bzw. wegen Unterschieden in den verwendeten CPE-Konstrukten schwierig; Trotzdem ist es möglich, Claudine in drei Kategorien bezüglich der CPE-Bindung/Affinität einzuteilen. Hohe Affinität für CPE zeigen Cld3, Cld4, Cld6, Cld7, Cld8 und Cld9, schwache bis mittlere Affinität für CPE zeigen Cld1, Cld2 und Cld14. Cld5, Cld10–Cld13, Cld15, Cld16, Cld18 und Cld20–Cld22 zeigen keine Bindung von CPE.

### 1.4.2 Das CPE-Bindemotiv von Claudinen

*Anmerkung:* Um das Verständnis der positionsabhängigen Analyse der Interaktion von CPE mit unterschiedlichen Claudinen und Cld-Mutanten in dieser Arbeit zu erleichtern, werden hier die Aminosäurepositionen der zweiten extrazellulären Schleife (EZS2) neben der individuellen, vom Claudin-Subtyp abhängigen Nummerierung mit einer relativen Nummerierung gekennzeichnet (Abb. 1.4), die sich auf ein stark konserviertes Prolin (P<sub>151</sub> in Cld1) in der Turn-Region der EZS2 (Krause *et al.*, 2008, 2009; Baltzegar *et al.*, 2013), bezieht.



**Abb. 1.4: Sequenzalignment der EZS2 von humanem und murinem Cld1, Cld3–Cld9 mit schematischer Darstellung der EZS2.** Grün: große hydrophobe, dunkelgrün: kleine hydrophobe, dunkelblau: polar ungeladene, blau: basische und magenta: saure Aminosäuren, türkis: Tyr, schwarz: Pro und orange: Cys. Nummerierungen: obere Reihe: Sequenznummerierung nach Cld1, untere Reihe: relative Positionsnummerierung nach dem hoch konservierten Prolin (roter Kasten, P<sub>151</sub> in Cld1).

Durch diese relative Nummerierung analog zur Nomenklatur von konservierten Aminosäuren in den Transmembranhelices von GPCRs (Ballesteros & Weinstein, 1995) ist im Text einfacher erkenntlich, welche Aminosäuren an korrespondierenden (z. B. D<sub>150</sub><sup>(P-1)</sup> in Cld1 und N<sub>148</sub><sup>(P-1)</sup> in Cld3) bzw. nicht an korrespondierenden Positionen der EZS2 sitzen (T<sub>153</sub><sup>(P+2)</sup> in Cld1 und T<sub>151</sub><sup>(P+1)</sup> in Cld5).

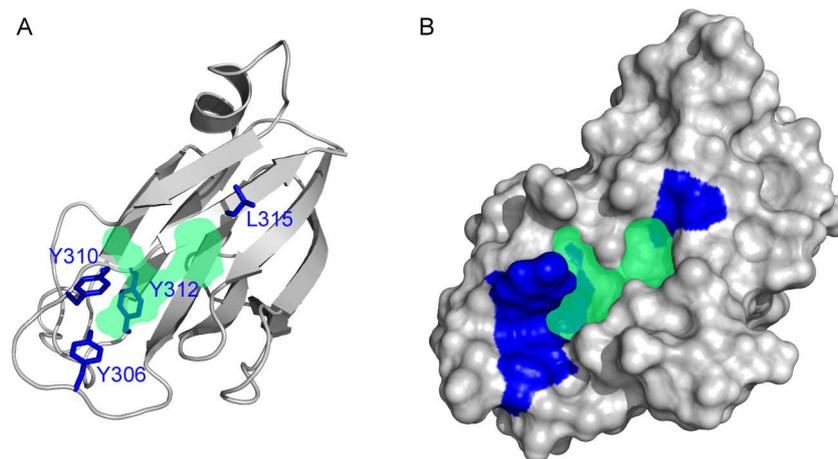
Bei allen bisher bekannten CPE bindenden Claudinen handelt es sich um klassische Claudine (Krause *et al.*, 2008). Ein Vergleich des Bindemotivs von Cld3 (<sub>148</sub>NPLVP<sub>152</sub>) mit den korrespondierenden Sequenzen der EZS2 anderer CPE bindender Claudine ergab die Konsensus-Sequenz N<sup>(P-1)</sup> P<sup>(P)</sup> L/M<sup>(P+1)</sup> V/L/T<sup>(P+2)</sup> P/A<sup>(P+3)</sup>, welche in der Turn-Region des vorhergesagten Helix-Turn-Helix-Motivs der EZS2 klassischer Claudine liegt (Krause *et al.*, 2008; Piontek *et al.*, 2008; Winkler *et al.*, 2009; Veshnyakova *et al.*, 2010). Das Vorhandensein dieses Helix-Turn-Helix-Motivs scheint unerlässlich für eine Bindung von CPE (Winkler *et al.*, 2009; Veshnyakova *et al.*, 2010). N<sup>(P-1)</sup> und L/M<sup>(P+1)</sup> scheinen eine sehr wichtige Rolle für die Bindung von CPE an Claudine zu spielen, da sie bei allen stark CPE bindenden, nicht aber bei nicht CPE bindenden Claudinen zu finden sind. Bei Substitutionsmapping-Analysen von Cld3-EZS2-Peptiden wurden auf diesen Positionen ausschließlich die nativen Aminosäuren (N<sup>(P-1)</sup> & L<sup>(P+1)</sup>) akzeptiert, und die Substitution von N<sup>(P-1)</sup> zu D in Cld4 führte zu einem deutlichen Bindungsverlust von CPE (Winkler *et al.*, 2009; Robertson *et al.*, 2010). Umgekehrt führte die Substitution von D<sup>(P-1)</sup> in Cld1 bzw. S<sup>(P-1)</sup> in Cld2 zu N zu einer Bindungssteigerung von CPE an diese Cld-Mutanten (Robertson *et al.*, 2010).

### 1.4.3 Die Claudin-Bindungstasche von CPE

Wie schon unter 1.2.2.2 angesprochen, wurde die Bindungsregion für Claudine in cCPE auf den letzten 30 C-terminalen Aminosäuren ( $\beta$ 8-loop- $\beta$ 9-Region) lokalisiert (Hanna *et al.*, 1991; Kokai-Kun & McClane, 1997). Eine Beteiligung dieser Region von CPE an der Bindung an Claudine wurde in verschiedenen Studien gezeigt (Kokai-Kun *et al.*, 1999; Ebihara *et al.*, 2006, 2007; Harada *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2008), wobei drei Aminosäuren (Y<sub>306</sub>, Y<sub>310</sub> & Y<sub>312</sub>) als besonders wichtig für die Cld-CPE-Interaktion identifiziert werden konnten. Die Substitution Y310C führte zu einer reduzierten Bindung von CPE an intestinale Epithelzellen im Kaninchen (Kokai-Kun *et al.*, 1999). Die Substitutionen Y306A, Y310A oder Y312A führten in Wettbewerbsassays zum Verlust der Bindung und der Zytotoxizität von cCPE-PSIF, einem Fusionsprotein aus cCPE und dem "protein synthesis inhibition factor" (PSIF) aus *Pseudomonas-aeruginosa*-Exotoxin-A (Ebihara *et al.*, 2006; Harada *et al.*, 2007). In Pull-down-Assays wurde gezeigt, dass die Einzelsubstitutionen Y306A, Y310A und Y312A und die Doppelsubstitution Y310A/Y312A zu einer Reduktion der Bindung von Cld4 führten (Harada *et al.*, 2007). Die Doppelsubstitutionen Y306A/Y310A und Y306A/Y312A sowie die

Dreifachsubstitution Y306A/Y310A/Y312A führten sogar zu einem Kompletterlust der Bindung von CPE an Cld4. Zudem zeigte sich, dass diese multiplen Y-Mutanten die Fähigkeit der TJ-Modulation (Barriere-Öffnung) verloren hatten (Harada *et al.*, 2007). In einer weiteren Studie konnte dargelegt werden, dass der aromatische Ring von Y<sub>306</sub> und nicht die Hydroxylgruppe entscheidend für eine Bindung von CPE an Cld4 ist, da die Substitution Y306K, nicht aber Y306F in CPE eine Bindung von CPE an Cld4 inhibierten (Ebihara *et al.*, 2007). Neben den 3 Tyrosinen wurde über einen Alanin-Screen der letzten 16 C-terminalen Aminosäuren L<sub>315</sub> als wichtig für die Bindung von CPE an Cld4 identifiziert. Die Substitution L315A führte wie die Substitutionen der Tyrosine in CPE zu einem Verlust der Bindung der TJ-Modulation und zu einem Verlust der CPE-induzierten Verstärkung der jejunalen Absorption (Takahashi *et al.*, 2008).

Die Kristallstruktur von cCPE (PDB ID: 2QUO, Van Itallie *et al.*, 2008) zeigte, dass Y<sub>306</sub>, Y<sub>310</sub> und Y<sub>312</sub> zusammen mit L<sub>315</sub> eine hydrophobe Tasche bilden, bei der es sich vermutlich um die Cld-Bindungstasche von cCPE handelt (Abb. 1.5; Winkler *et al.*, 2009).



**Abb. 1.5: Lage der putativen Claudin-Bindungstasche in der Struktur von cCPE.** (A) Darstellung der Struktur von cCPE (PDB ID: 2QUO, Van Itallie *et al.*, 2008) als Cartoon. Aminosäuren, bei denen eine Substitution zu Alanin zu einem Verlust der Bindung an Cld4 führte, sind hervorgehoben (Sticks in blau), wie auch die Lage der putativen Cld-Bindungstasche (grüner Bereich). (B) Oberfläche von cCPE; Die für die Bindung an Cld4 relevanten Aminosäuren (blau) umgeben eine Vertiefung, bei der es sich um die Claudin-Bindungstasche handeln könnte (grüner Bereich).

## 1.5 Mögliche Nutzung von cCPE

### 1.5.1 cCPE als TJ-Modulator

Die Interaktion von cCPE mit Cld führt zu einer Abschwächung des parazellulären trans-epithelialen Widerstandes (TEER) und zur Erhöhung der parazellulären Permeabilität. Viele vielversprechende Wirkstoffe haben eine unzureichende Pharmakokinetik und können, da

sie nicht durch Gewebebarrieren dringen, nicht zur Behandlung von Krankheiten eingesetzt werden. Unterschiedliche Versuche wurden bisher unternommen, um die transzelluläre Wirkstoffaufnahme zu erhöhen, wie z. B. die Nutzung von Influx-Transportern, die Blockierung der Aktivität von Efflux-Transportern oder rezeptor-medierte Transzytose (Mizuno *et al.*, 2003). Ein alternativer Ansatz zur Erhöhung der Wirkstoffaufnahme ist die Verstärkung der parazellulären Permeation durch transiente Öffnung der TJs über “*drug enhancers*” (Aungst, 2000; Salama *et al.*, 2006). Hierfür müsste der Wirkstoff selbst nicht modifiziert werden, und ein “*drug enhancer*” würde die Aufnahme von strukturell unterschiedlichen Wirkstoffen gleichermaßen erhöhen. Die meisten der bisher beschriebenen TJ-Modulatoren haben allerdings surfactant- oder chelator-ähnliche Eigenschaften, sind daher wenig gewebspezifisch und haben häufig schwere Nebenwirkungen (z. B. durch Exfoliation der Zellen irreversibel gestörte Barrierefunktion, Hochman & Artursson, 1994; Yamamoto *et al.*, 1996). Über eine spezifischere Modulation von einzelnen TJ-Komponenten (z. B. Claudine) könnten diese Nebenwirkungen verringert werden (Kondoh *et al.*, 2006). Da cCPE mit hoher Affinität an spezifische Cld-Subtypen bindet – wodurch die Aktivität auf Gewebe, die diese Subtypen exprimieren, beschränkt wird – und es die parazelluläre Permeabilität dosisabhängig und reversibel erhöht, wäre es ein geeigneter Kandidat für einen “*drug enhancer*“. In ersten Experimenten hierzu zeigten sich schon vielversprechende Ergebnisse. So erhöhte cCPE die Wirkstoffaufnahme im Ratten-Jejunum 400-fach im Vergleich zu Caprat (welches im klinischen Gebrauch ist) und ermöglichte zudem die Aufnahme von biologisch aktiven Peptiden über die Mukosa (Kondoh *et al.*, 2005; Uchida *et al.*, 2010; Krug *et al.*, 2013). Im Mausmodell konnte außerdem eine erfolgreiche Immunisierung über nasale Vakzination mit cCPE-Fusionsproteinen erreicht werden (Suzuki *et al.*, 2010).

Aufgrund seiner intrinsischen TJ-Modulatorfunktion wäre es auch denkbar, cCPE zur transepidermalen “*drug delivery*” oder zur Wirkstoffaufnahme über die Blut-Hirn-Schranke (BBB) zu verwenden. Da sich in den TJs der Epidermis und der BBB jedoch hauptsächlich Cld1 und Cld5 befinden, mit denen cCPE nicht oder nur sehr schwach interagiert, muss die Affinität von cCPE für diese Cld-Subtypen zunächst gesteigert werden (Fujita *et al.*, 2000; Furuse *et al.*, 2002; Nitta *et al.*, 2003).

### 1.5.2 (c)CPE zur Behandlung oder Detektion von Tumoren

Eine weitere Möglichkeit der pharmakologischen Nutzung von CPE bzw. cCPE wäre die Detektion bzw. Behandlung von Tumorzellen. Wie unter 1.3.3 beschrieben, ist bei vielen Krebsarten eine Überexpression von bestimmten Cld-Subtypen zu beobachten. Die CPE-Rezeptoren Cld3 und Cld4 sind z. B. häufig in Pankreas-, ovarialen, Brust- und Uteruskrebsarten überexprimiert, und der Einsatz von CPE als Chemotherapeutikum wurde daher schon in vielen Studien vorgeschlagen (Morin, 2005, 2007; Kominsky *et al.*, 2007; Santin *et al.*, 2007).

Zudem erzielten initiale Studien zum Einsatz von CPE bzw. cCPE in der Tumorbehandlung durchaus vielversprechende Ergebnisse. So führte die Injektion von CPE in Pankreastumore in Mäusen zu einer Tumornekrose und einer Reduzierung des Tumorwachstums; Ebenso konnten in Mäuse transplantierte Ovarialtumorzellen durch CPE-Injektion erfolgreich bekämpft werden (Michl *et al.*, 2001; Santin *et al.*, 2005). Durch intrakranielle Verabreichung von CPE bei Mäusen wurde das Wachstum von Brustkrebsmetastasen im Hirn verlangsamt und die Überlebensrate gesteigert (Kominsky *et al.*, 2007). Auch die Arbeit mit cCPE-Fusionsprotein-Konstrukten erbrachte erfolgversprechende Ergebnisse. Mit einem Diphtherie-Toxin-Fragment-A-cCPE-Fusionsprotein konnten Cld4 überexprimierende Tumorzellen gezielt erreicht werden, und ein Tumornekrosefaktor-cCPE-(cCPE<sub>290-319</sub>)-Fusionsprotein hatte einen deutlichen zytotoxischen Effekt auf Ovarialtumorzellen (Yuan *et al.*, 2009; Kakutani *et al.*, 2010). Eine andere Strategie zur Behandlung von Cld3 und/oder Cld4 überexprimierenden Tumorzellen basiert auf einer gentherapeutischen Nutzung von CPE. Hierbei werden diese Tumorzellen mit einem für die Expression in humanen Zellen optimierten CPE (optCPE) transfiziert – sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigte diese Strategie einen Effekt auf Cld3 und Cld4 überexprimierende Tumorzelllinien (Walther *et al.*, 2012).

Neben der Nutzung als Chemotherapeutikum kann cCPE auch zur Detektion von Claudin überexprimierenden Tumorzellen verwendet werden, indem es kovalent mit Fluorophoren oder andersartig detektierbaren Verbindungen (z. B. Kontrastmittel zur Detektion mittels Magnetresonanztomographie oder Computertomographie) gekoppelt wird. So konnten mit Hilfe von Cy5.5-gekoppeltem cCPE *in vitro* und *in vivo* (Mausmodell) Cld4 überexprimierende Pankreaskrebszellen und Pankreaskrebs-Precursorzellen detektiert werden (Neesse *et al.*, 2013).

### 1.5.3 Limitierung der Nutzung von (c)CPE

Aufgrund der intrinsischen TJ-Modulation ist cCPE interessant für eine Anwendung als “*drug enhancer*”, da es TJs, die Cld3 und/oder Cld4 enthalten, kurzzeitig und reversibel öffnet und hierdurch die parazelluläre Permeabilität erhöht. Im Gegensatz zu anderen “*drug enhancern*” wie Chitosan oder Caprat (Hsu *et al.*, 2012; Krug *et al.*, 2013) wirkt cCPE spezifisch auf diese cCPE-Rezeptor-Claudine (Cld3 und Cld4), wobei allerdings die Faktoren der Spezifität der Cld-cCPE-Interaktion bisher unklar waren und Cld-subtypspezifische cCPE-Varianten nicht beschrieben worden sind. Auch zur Entwicklung von cCPE als “*drug enhancer*” zur Überwindung der BBB fehlten bislang die Grundlagen, da cCPE nicht mit Cld5, dem integralen Claudin der BBB-TJs interagiert. Ein Zuschneiden von cCPE-Varianten zu Cld-subtypspezifischen Bindern wäre ebenso für die Krebsdiagnostik bzw. -behandlung von Interesse. cCPE- bzw. CPE-Varianten mit der entsprechenden Cld-Subtypspezifität für den überexprimierten Cld-Subtyp in Tumoren könnten zum Beispiel die Nebenwirkungen einer cCPE- bzw.

CPE-Behandlung senken. Um dies zu erreichen, mussten jedoch zunächst die Interaktion zwischen CPE und Claudinen besser verstanden und die exakten Determinanten der Spezifität der Cld-CPE-Interaktion identifiziert werden.

## 1.6 Ziel der Arbeit

Claudine sind wichtig für die Barrierefunktion der „*Tight Junctions*“ – Zell-Zell-Kontakten in Epi- und Endothelien – die eine parazelluläre Diffusion von Wirkstoffen verhindern. Daher sind sie vielversprechende Zielproteine zur Entwicklung von Wirkstoffen, welche eine kurzzeitige Öffnung der TJs verursachen und somit die parazelluläre Medikamentenaufnahme verbessern. So könnte zum Beispiel ein spezifisch an Cld5 bindendes Molekül dazu beitragen, Wirkstoffe über die Blut-Hirn-Schranke zu transportieren. Auch wegen der Überexpression von bestimmten Cld-Subtypen in verschiedenen Krebsarten, z. B. Cld1, Cld3 und Cld4 in kolorektalen Karzinomen, sind sie ein lohnendes Ziel für die Entwicklung von neuen diagnostischen Methoden und Wirkstoffen. Durch die hochaffine Bindung an bestimmte Claudine (Cld3, Cld4 und Cld6–9) und die anschließende reversible Öffnung der TJs zeigen CPE bzw. cCPE vielversprechende Eigenschaften für eine Verwendung in diesen Bereichen. Bisher war allerdings über die Interaktion von cCPE mit Claudinen nur bekannt, dass die letzten 30 C-terminalen Aminosäuren von cCPE in die Bindung an die EZS2 von Claudinen involviert sind, und dass die Reste Y306, Y310, Y312 und L315, die eine putative Cld-Bindungstasche in der cCPE-Struktur ergeben, besonders wichtig für die Bindung an Cld4 sind.

Die primäre Zielstellung der vorliegenden Arbeit war daher die funktionelle Charakterisierung der Interaktion von CPE bzw. cCPE mit Claudinen, wobei strukturelle Informationen aus Interaktionsmodellen zwischen cCPE und der EZS2 von Claudinen einfließen sollten. Ein zentrales Ziel war weiterhin, anhand der Erkenntnisse der Interaktionsmodelle und der Ergebnisse der zellulären Bindungsstudien von cCPE an Cld3 und Cld4 rational konzipierte cCPE-Varianten mit veränderter Cld-Subtypspezifität zu erhalten. Hierbei wurde das Hauptaugenmerk auf eine Cld5-bindende cCPE-Variante gelegt.

Um diese Ziele zu erreichen, sollten zunächst *in silico* anhand der bekannten Struktur von cCPE (PDB ID: 2QUO) und der in Vorarbeiten beschriebenen putativen Cld-Bindungstasche von cCPE weitere in die Bindung an Claudine involvierte Aminosäuren identifiziert werden. Die Beteiligung dieser Aminosäuren an der Bindung von cCPE an Cld3 und Cld4 sollte daraufhin mittels zellulären Bindungsassays im Labor überprüft werden, um eine detaillierte Beschreibung der Cld-Bindungstasche von cCPE zu erzielen. Mit den Bindungsdaten von

cCPE<sub>wt</sub> und unterschiedlichen cCPE-Varianten sollte des Weiteren ein strukturelles Modell der cCPE-Claudin-Interaktion erstellt werden.

Da bisher keine Kristallstrukturen von Claudinen bekannt sind, mussten hierzu zunächst Homologiemodelle der EZS2 von Cld3 und Cld4 erstellt werden, um die Orientierung der EZS2 innerhalb der Cld-Bindungstasche von cCPE aufzuklären. Dieses cCPE-Cld-Interaktionsmodell sollte darüber hinaus auf andere Claudine – wie das schwach mit cCPE interagierende Cld1 und das nicht mit cCPE interagierende Cld5 – ausgeweitet werden, um die Ursachen für die differierenden Interaktionen zu verstehen. Im Verlauf der Arbeit sollten diese cCPE-Cld-Interaktionsmodelle und die Homologiemodelle der EZS2 der unterschiedlichen Claudine durch im Labor generierte cCPE-Cld-Bindungsdaten iterativ verbessert werden.

Zur Generierung von cCPE-Varianten mit einer Änderung der Claudin-Subtypspezifität – insbesondere einer an Cld5 bindenden cCPE-Variante – sollten mithilfe der cCPE-Cld-Interaktionsmodelle gezielt Positionen in cCPE identifiziert werden, an denen durch Aminosäuresubstitution eine präferenzielle Bindung an Cld5 erreicht und somit die Claudin-Subtypspezifität geändert werden könnte.

Aufgrund der Vielzahl der zu messenden und miteinander zu vergleichenden cCPE-Varianten und Cld-Konstrukte war das erste Ziel die Etablierung einer neuen Quantifizierungsmethode für zelluläre Bindungsassays, da Pulldown-Assays und zelluläre Bindungsassays über Western Blot starke Limitierungen in der Anzahl der gleichzeitig zu behandelnden Proben haben.

Da cCPE bzw. Cld-subtypspezifische cCPE-Varianten interessante Anwendungsmöglichkeiten als Biomarker hätten, war es ein weiteres Ziel der Arbeit, zu untersuchen, inwiefern eine kovalente Markierung von cCPE Einfluss auf die Interaktion mit Claudinen hat. Hierzu sollte cCPE kovalent mit einem Fluorophor (Alexa647) oder Cryptophan A gekoppelt und anschließend die Bindung an Claudine getestet werden.

Zudem sollte das Homologiemodell der Cld-EZS2 auf die Transmembranbereiche von Cld3 und Cld5 erweitert bzw. ein erstes vollständiges Claudin-Transmembranhelix-Modell erstellt werden. Zur Einschätzung der Wahrscheinlichkeit dieser Topologiemodelle wurden Daten über *cis/trans*-Interaktion und Membranlokalisation von Claudinen verwendet, welche von Jan Rossa generiert wurden (Tab. 8.14). Weiterhin sollten bioinformatische Analysen zur Konservierung von Aminosäuren und von evolutionär verknüpften Aminosäuren in den Transmembranbereichen zur Erstellung und Evaluation der Modelle verwendet werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
1,4 Dithiothreitol (DTT)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Acrylamid / Bisacrylamid (37,5:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Agarose	SERVA GmbH, Heidelberg, DE
Alexa Fluor®647 Protein Labeling Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Ampicillin	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
BCA™ Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Bio-Gel P-30 Gel	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
Bovines Serumalbumin (BSA)	SERVA GmbH, Heidelberg, DE
Bromphenolblau	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Coomassie G-250	SERVA GmbH, Heidelberg, DE
Cryptophan-A-PEG	Leif Schröder und Michael Beyermann, FMP
Dichlormethan	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Dikaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO), Zellkulturqualität	Biochrome AG, Berlin, DE
DNA-Clean&Concentrator™-5 Kit	Zymo Research, Orange, CA, USA
DNA-Ladepuffer (6 x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DNA-Marker Quick-Load (1 kb)	BioLabs Inc., Frankfurt, DE
dNTP Mix (10 mM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Dulbecco's Phosphate buffered saline (PBS)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Dulbecco's Phosphate buffered saline mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> (PBS Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> )	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Essigsäure (Eisessig)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ethanol (EtOH)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
EZ-link-NHS-SS-Biotin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Fötales Rinderserum (FBS), GIBCO®	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
Geneticin® (G418)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
GelGreen™	Biotium Inc., Hayward, CA, USA
Glutamin, GIBCO®	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
Glutathion-Agarose	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Glutathion-Sepharose-4B	GE Healthcare, Freiburg, DE
Glycerol	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Glycin	SERVA GmbH, Heidelberg, DE
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS- -), GIBCO®	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Kanamycin	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
L-Glutathion (reduziert)	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Lipofectamin™ 2000	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
Lumi-Light Western Blot Detektionsreagenz	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Magermilchpulver	Reformhaus

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Methanol (MeOH)	J.T. Baker, Deventer, NL
Micro-BCA™ Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Natriumacetat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natriumazid	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	SERVA GmbH, Heidelberg, DE
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Natriumhydroxid (NaOH)	J.T. Baker, Deventer, NL
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, DE
N-Hydroxysuccinimid	Merck KGaA, Darmstadt, DE
N,N'-Diisopropylcarbodiimid	Merck KGaA, Darmstadt, DE
PageRuler™ Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Prestained Protein Ladder (#SM1811)	
PageRuler™ Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Prestained Protein Ladder (#SM26619)	
Para-Formaldehyd	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences GmbH, Eppelheim, DE
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Polyoxyethylen(20)-Sorbitan-Monolaureat (Tween 20)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Ponceau S	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Proteaseinhibitor-Cocktail (bakteriell)	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Proteaseinhibitor-Cocktail (eukaryotisch)	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
<i>Complete</i> , EDTA free, Tabletten	
QIAGEN Plasmid Plus Midiprep Kit	Zymo Research, Orange, CA, USA
Salzsäure (HCl)	J.T. Baker, Deventer, NL
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Tris/HCl Trizma®	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Triton X-100	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Trypanblau	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%) in PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	Merck KGaA, Darmstadt, DE
NeutrAvidin™ Plus UltraLink Resin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Xylencyanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
ZR Plasmid Miniprep™ - Classic	Zymo Research, Orange, CA, USA

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Geräte

<b>Verbrauchsmaterialien und Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Amicon®Ultra	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Chromatographiesäule, <i>Econo-Pac</i> , 20 ml	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Deckgläschen, 30 mm	Menzel GmbH, Braunschweig, DE
Dialysemembran, <i>ZelluTrans</i> , MWCO 12000-14000	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Dosierpumpe, <i>Masterflex</i>	Bachofer, Reutlingen, DE
Einmal-Kanüle, <i>Sterican</i> Ø 0,45 x 25 mm	Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Einmal-Kanüle, <i>Sterican</i> Ø 0,60 x 60 mm	Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Einmal-Küvetten aus PMMA, 2,5 ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Elektrophoresekammer (Agarose-Gele), <i>PerfectBlue Gelsystem Mini</i>	PeQLab, Erlangen, DE

**Verbrauchsmaterialien und Geräte****Hersteller**

Elektrophoresekammer (SDS-Gele), <i>SE 250 Mighty Small II</i>	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, DE
Elektroporationsküvetten, 1 mm Elektrodenabstand	PeQLab, Erlangen, DE
Elektroporator, <i>Easyject Prima</i>	Equibio GmbH, Willstätt, DE
Filterpapier (Western Blot), 15 x 20 cm, 30 mm	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Fluoreszenzimager, <i>Fuji FLA-5000</i>	Fujifilm, Düsseldorf, DE
Gewebekulturflaschen, <i>Cellstar</i> , 75 cm <sup>2</sup> und 25 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Kryobox, <i>Nalgene® "Mr. Frosty"</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kryoröhrchen, 1,2 ml	Corning Incorporated, Corning, CA, USA
Laser-Scanning-Mikroskop, <i>LSM 510 META-UV</i>	Carl Zeiss GmbH, Jena, DE
Lichtmikroskop, <i>IMT-2</i>	OLYMPUS Europa GmbH, Hamburg, DE
Magnetrührer, <i>IKAMA® RCT</i>	IKA®-Labortechnik, Staufen, DE
Mikro-Dialysierkapsel, <i>QuixSep</i> , 1 ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Mikroplattenleser, <i>Safire</i>	Tecan Switzerland AG, Männedorf, CH
Minisäulen, <i>MobiSpin Column „F“</i> , mit Filtern (10 µm Porengröße)	MoBiTec GmbH, Göttingen, DE
<i>NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Netzgerät, <i>El. Phor. - Powerpack P24</i>	Biometra GmbH, Göttingen, DE
Nitrocellulosemembran, <i>Hybond-ECL</i>	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, DE
PCR-Gerät, DNA-Engine PTC-200	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
pH-Meter, <i>Portamess® 913</i>	Knick GmbH & Co. KG, Berlin, DE
Rotator, <i>Blood Tube Rotator SB1</i>	Stuart Scientific, Stone Staffordshire, UK
Scanner, <i>Mirage II</i>	UMAX Systems GmbH, Willich, DE
Schüttelinkubator, <i>TH15</i>	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, DE
Schüttler, <i>HS 250 basic</i>	IKA®-Labortechnik, Staufen, DE
Semi-dry Elektrolot Einheit, <i>V20-SDB</i>	SCIE-PLAS, Cambridge, UK
Sonifikator, <i>Vibracell 72434</i>	Bioblock Scientific AG, Frenkendorf, DE
Spektrophotometer, <i>DU 640 Spectrophotometer</i>	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE
Sterilwerkbank, <i>S-1200</i>	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen, DE
Thermomixer, <i>5436 und 5350</i>	Eppendorf, Hamburg, DE
Tischzentrifuge, <i>5417C</i>	Eppendorf, Hamburg, DE
Tischzentrifuge (mit Kühlung), <i>5145R, 5804R und 5810R</i>	Eppendorf, Hamburg, DE
Trans-Blot® SD Semi-dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Transluminator, <i>Lumi-Imager™ F1</i>	Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim, DE
Zellinkubator, <i>CB210</i>	Binder GmbH, Tüftlingen, DE
Zellinkubator (Mikroorganismen)	Hareus Instruments, Hanau, DE
Zellkulturtestplatten, 24- und 6-well	TPP, Trasadingen, CH
Zellschaber	TPP, Trasadingen, CH
Zellsortierung, FACSVantage SE System	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA

**2.1.3 Enzyme****Name****Hersteller**

<i>Advantage™ 2 Polymerase / Advantage™ 2 PCR Puffer (10x)</i>	Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA
AccuPOL DNA Polymerase / AccuPOL Key Puffer (10x)	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
<i>Fast Dpnl / Fast Puffer (10x)</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

## 2.1.4 Puffer und Lösungen

### Allgemeine Puffer und Lösungen

100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -NaOH pH 7,4:	50 ml NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (100 mM), 39,1 ml NaOH (100 mM), add 100 ml ddH <sub>2</sub> O
1 M KPi-Puffer, pH 8,0:	960 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 M), 40 ml K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1M)
50 mM Tris/HCl:	6,06 g Tris, add 1 l ddH <sub>2</sub> O mit HCl auf gewünschten pH einstellen

### Agarose Gelelektrophorese

20 x TAE:	1,6 M Tris, 22,8 ml/l Essigsäure, 74,4 g/l EDTA in in 18,2 Ω H <sub>2</sub> O
10 x DNA-Ladepuffer:	250 mg Bromphenolblau, 250 mg Xylencyanol, 33 ml 150 mM Tris/HCl, pH 7,6, 60 ml Glycerol, 7 ml H <sub>2</sub> O

### Aufreinigung von GST-cCPE-Konstrukten

Lysepuffer:	1% (v/v) Triton X 100, 0,4 mM PMSF, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 1 x PIC B, in PBS
Elutionspuffer:	50 mM Tris/HCl pH 8,5, 10 mM reduziertes L-Glutathion, 1 x PIC B in 18,2Ω H <sub>2</sub> O

### Markierung von GST-cCPE

0,1 M Bicarbonatpuffer:	100 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 500 mM NaCl in 18,2Ω H <sub>2</sub> O Auf gewünschten pH einstellen mit: 100 mM NaHCO <sub>3</sub> , 500 mM NaCl in 18,2Ω H <sub>2</sub> O
-------------------------	---

### Pulldown-Assay

Lysepuffer 1:	1% (v/v) Triton X 100, 1 x PIC B, 0,4 μM PMSF, 5 mM DTT, 1 mM EDTA in PBS
Lysepuffer 2:	1% (v/v) Triton X 100, 1 x PIC B, 1 x PIC E in PBS
Waschpuffer 1:	1% (v/v) Triton X 100, 5 mM DTT in PBS
Waschpuffer 2:	1% (v/v) Triton X 100, 0,5 mM DTT in PBS
Waschpuffer 3:	0,1% (v/v) Triton X 100, 0,5 mM DTT in PBS
Elutionspuffer:	1 x SDS-Probenpuffer, 90 mM DTT in 18,2 Ω H <sub>2</sub> O

### Semi-dry Western Blot

Transferpuffer (1x):	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10% (v/v) Methanol in 18,2 Ω H <sub>2</sub> O
TBST (10x)	100 mM Tris/HCl (pH 7,4), 1,5 M NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20 in 18,2 Ω H <sub>2</sub> O
Ponceau-Rot:	0,2% (w/v) Ponceau S, 1% (v/v) konz. Essigsäure in 18,2 Ω H <sub>2</sub> O
Blockpuffer:	2% (w/v) Magermilchpulver, 0,05% (v/v) Tween20 in TBST
“Strip”-Puffer	62,5 mM Tris/HCl (pH 6,7), 100 mM 2-Mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS in 18,2 Ω H <sub>2</sub> O

**Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

SDS-Laufpuffer (10x):	250 mM Tris, 1,92 M Glycin, 1% (w/v) SDS in 18,2 Ω H <sub>2</sub> O
SDS-Probenpuffer (5x):	225 mM Tris/HCl, 5% (w/v) SDS, 0,05% Bromphenolblau, 50% (w/v) Glycerol, 250 mM Dithiothreitol in 18,2 Ω H <sub>2</sub> O
Sammelgel:	5% Acrylamid / Bisacrylamid (37,5:1), 125 mM Tris/HCl pH 6,8, 1% (v/v) SDS, 0,1% (v/v) TEMED, 0,1% (w/v) APS in 18,2 Ω H <sub>2</sub> O
Trenngel (12- 15%):	12-15% Acrylamid / Bisacrylamid (37,5:1), 375 mM Tris/HCl pH 8,8, 0,1% (v/v) SDS, 0,05% (v/v) TEMED, 0,1% (w/v) APS in 18,2 Ω H <sub>2</sub> O
Coomassie-Lösung:	0,25% (w/v) Coomassie G250, 45,5% (v/v) Methanol, 9% (v/v) konz. Essigsäure in 18,2 Ω H <sub>2</sub> O

**Zelloberflächenbiotinylierung**

Biotinylierungslösung:	0,4 mg/ml EZ-link-NHS-SS-Biotin in PBS Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>
RIPA-Puffer:	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1,0% (v/v) NP-40, 0,5% (w/v) Natriumdesoxycholat, 0,1% (w/v) SDS in 18,2 Ω H <sub>2</sub> O

**Zellulärer Bindungsassay**

Fixierungspuffer:	3,7% Para-Formaldehyd in PBS
Quenchpuffer:	0.1 M Glycin in PBS
Puffer B:	1% (w/v) BSA, 0,05% (v/v) Tween 20 in PBS

**2.1.5 Medien und Zellen****2.1.5.1 Medien für die Bakterienanzucht**

LB-Medium (*Lennox*) und LB-Agar (*Lennox*) wurden von der *Carl Roth GmbH* bezogen und gemäß den Herstellerangaben zubereitet. Antibiotika wurden entsprechend der Antibiotikaresistenz der Bakterien bzw. der verwendeten Konstrukte in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugegeben.

**2.1.5.2 Zellkulturmedien**

Alle Zellkulturmedien (Marke *GIBCO*<sup>®</sup>) wurden von der Firma *Life Technologies GmbH* bezogen. Für die Kultivierung von Zellen wurden 10% (v/v) fötales Rinderserum (FCS) sowie 1 mg/ml Penicilin/Streptomycin zugegeben.

DMEM	4 mM L-Glutamin, 1 g/L-Glucose, 1 mM Na-Pyruvat, mit Phenolrot
OptiMEM	mit Phenolrot und L-Glutamin
DMEM ohne Phenolrot	1 g/L-Glucose, 1 mM Na-Pyruvat

### 2.1.5.3 Zellen

#### Prokaryotische Zellen

Stamm	Genotyp	Referenz
E. coli BL21	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene1 ind1 sam7 nin5])	Studier <i>et al.</i> , 1990

#### Eukaryotische Zellen

Zelllinie	Herkunftsgewebe	Referenz
HEK293	humane embryonale Nierenzellen	Graham <i>et al.</i> , 1977
cEND	murine mikrovaskuläre Endothelzellen	Förster <i>et al.</i> , 2005

### 2.1.6 Antikörper

#### Primärantikörper

α-Cld1		
α-Cld3		
α-Cld4	aus Kaninchen	Invitrogen
α-Cld5		
α-Cld7		
α-GFP		
α-GST	aus Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
α-GST, Phycolink <sup>®</sup> , R-Phycoerythrin-Konjugat	-	Europa Bioproducts Ltd.

#### Sekundärantikörper

α-Kaninchen IgG, HRP-Konjugat	aus Ziege	Invitrogen
α-Maus IgG, HRP-Konjugat		

### 2.1.7 Vektoren

Name	Merkmale	Referenz
pGEX-4T1-cCPE_wt	5,9 kb; Amp <sup>R</sup> , pBR322 ori, P <sub>tac</sub> , lacI <sub>q</sub> , Glutathione-S-Transferase (GST) N-terminal, CPE194-319	Winkler <i>et al.</i> , 2009
pEYFP-N1-Cld1_WT	5,4 kb; Kan <sup>R</sup> /Neo <sup>R</sup> ; murine-Cld1-cDNA im	Piontek <i>et al.</i> , 2011
pEYFP-N1-Cld3_WT	pEGFP-N1-Vektor; SV40 ori; pUC ori; P <sub>CMV</sub> ;	Winkler <i>et al.</i> , 2009
pEYFP-N1-Cld5_WT	EYFP(Reporter C-terminal)	Piontek <i>et al.</i> , 2008
pEGFP-C1-Cld4_WT	5,4 kb; Kan <sup>R</sup> /Neo <sup>R</sup> ; humane-Cld4-cDNA im pEGFP-C1-Vektor; SV40 ori; pUC ori; P <sub>CMV</sub> ;	Walter Hunziker
pCMV6-Kan/Neo-mCld6	6,4 kb; Kan <sup>R</sup> /Neo <sup>R</sup> ; murine-Cld6-cDNA im pCMV6-Kann/Neo-Vektor; SV40 ori; f1 ori; ColE1 ori; P <sub>CMV</sub>	OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD, USA

Name	Merkmale	Referenz
PCMV6-Kan/Neo-mCld7	6,1 kb; Kan <sup>R</sup> /Neo <sup>R</sup> ; murine-Cld7-cDNA im pCMV6-Kann/Neo-Vektor; SV40 ori; f1 ori; ColE1 ori; P <sub>CMV</sub>	
PCMV6-Kan/Neo-mCld8	7,2 kb; Kan <sup>R</sup> /Neo <sup>R</sup> ; murine-Cld8-cDNA im pCMV6-Kann/Neo-Vektor; SV40 ori; f1 ori; ColE1 ori; P <sub>CMV</sub>	OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD, USA
PCMV6-Kan/Neo-mCld9	6,3 kb; Kan <sup>R</sup> /Neo <sup>R</sup> ; murine-Cld9-cDNA im pCMV6-Kann/Neo-Vektor; SV40 ori; f1 ori; ColE1 ori; P <sub>CMV</sub>	

cCPE: CPE<sub>194-319</sub>; EYFP: *Enhanced yellow fluorescent protein gene*; EGFP: *Enhanced green fluorescent protein gene*; P<sub>CMV</sub>: *Human cytomegalovirus Promotor*; P<sub>tac</sub>: induzierbarer „tac“-Promotor; Neo<sup>R</sup>/Kan<sup>R</sup>: Neomycin/Kanamycin Resistenzgen; Amp<sup>R</sup>: Ampicillin Resistenzgen.

## 2.1.8 Oligonukleotide

Name	Sequenz 3' - 5'
<b>Claudine</b>	
Cld1_D150N_for	CGTTCAAGAATTCTATaACCCTATGACCCCAGTC
Cld1_D150N_rev	GACTGGGGTCATAGGGTtATAGAATTCTTGAACG
Cld1_T153V_for	GAATTCTATGACCCTATGgtCCCAGTCAATGCCAGGTAC
Cld1_T153V_rev	GTACCTGGCATTGACTGGGacCATAGGGTCATAGAATTC
Cld1_D150N,T153V_for	CGTTCAAGAATTCTATaACCCTATGgtCCCAGTCAATGCC
Cld1_D150N,T153V_rev	GGCATTGACTGGGacCATAGGGTtATAGAATTCTTGAACG
Cld3_L150F_for	GATTTCTATAACCCGTTcGTGCCCGAGGC
Cld3_L150F_rev	GCCTCGGGCACgAACGGGTTATAGAAATC
Cld4_L151F_for	CAAGACTTCTACAATCCGttcGTGGCCTCCGGGCAGAAG
Cld4_L151F_rev	CTTCTGCCCCGAGGCCACgaaCGGATTGTAGAAGTCTTG
Cld4_A153P/S154E/G155A_for	CTACAATCCGCTGGTGcCCgagGcGCAGAAGCGGGAGATG
Cld4_A153P/S154E/G155A_rev	CATCTCCCCTTCTGCgCctcGGgCACCAGCGGATTGTAG
Cld5_T151L_for	GAGTTCTATGATCCGttGGTGCCGGTGTACAGAAG
Cld5_T151L_rev	CTTCTGTGACACCGGCACCaaCGGATCATAGAATTC
mCld6_YFP_1	<u>CGAGCTCAAGCTTTCGAATTCATGGCCTCTACTGGTCTGC</u>
mCld6_YFP_2	<u>CATGGTGGCGACCGGTGGATCCACATAATTCTTGGTGGG</u>
mCld7_YFP_1	<u>CGAGCTCAAGCTTTCGAATTCATGGCCAACCTCGGGCCTGC</u>
mCld7_YFP_2	<u>CATGGTGGCGACCGGTGGATCCACGTATTCCTTGGAGGAA</u>
mCld8_YFP_1	<u>CGAGCTCAAGCTTTCGAATTCATGGCAACCTACGCTCTTC</u>
mCld8_YFP_2	<u>CATGGTGGCGACCGGTGGATCCACATACTGACTTTTGGAG</u>
mCld9_YFP_1	<u>CGAGCTCAAGCTTTCGAATTCATGGCTTCCACTGGCCTTG</u>
mCld9_YFP_2	<u>CATGGTGGCGACCGGTGGATCCACATAGTCCCTCTTATCC</u>

### cCPE

cCPE_L223A_for	CTCAAATCCAGCTGGTAATgcATATGATTGGCGTTCTTC
cCPE_L223A_rev	GAAGAACGCCAATCATATgcATTACCAGCTGGATTTGAG
cCPE_D225A_for	CAGCTGGTAATTTATATGcTTGGCGTTCTTCTAACTC
cCPE_D225A_rev	GAGTTAGAAGAACGCCAAgCATATAAATTACCAGCTG
cCPE_R227A_for	CTGGTAATTTATATGATTGGgcTTCTTCTAACTCATACCC
cCPE_R227A_rev	GGGTATGAGTTAGAAGAAgcCCAATCATATAAATTACCAG
cCPE_L223A/D225A/R227A_for	CATTAACTCAAATCCAGCTGGTAATgcATATGcTTGGgcTTCTTCTAACTC
cCPE_L223A/D225A/R227A_rev	GAGTTAGAAGAAgcCCAAGCATATgcATTACCAGCTGGATTTGAGTTTAAATG
cCPE_L238F_for	CATACCCTTGGACTCAAAGtTTAATTTACTTAACTTAACT
cCPE_L238F_rev	GTTAAGTGTAAATTAaCTTTTGGAGTCCAAGGGTATG

Kleingeschriebene Basen stehen für vom Wildtyp abweichende Basen, unterstrichene Bereiche stehen für die mit dem jeweiligen Cld übereinstimmende Sequenz der RF-Primer (siehe 2.2.4.2).

Name	Sequenz 3' - 5'
cCPE_L254A_for	GGACAAAAATATAGAATCgcAGCTAGCAAAATTGTTG
cCPE_L254A_rev	CAACAATTTTGTCTAGCTgcGATTCTATATTTTTGTCC
cCPE_S256A_for	TATAGAATCTTAGCTgcCAAAATTGTTGAT
cCPE_S256A_rev	ATCAACAATTTTGGcAGCTAAGATTCTATA
cCPE_K257A_for	GAATCTTAGCTAGCgcAATTGTTGATTTTAATATTTATTC
cCPE_K257A_rev	GAATAAATATTTAAAATCAACAATTgcGCTAGCTAAGATTC
cCPE_I258A_for	CTTAGCTAGCAAAgcAGTTGATTTTAATATTTATTC
cCPE_I258A_rev	GAATAAATATTTAAAATCAACTgcTTTGTCTAGCTAAG
cCPE_I258K_fwd	CTTAGCTAGCAAAAaaGTTGATTTTAATATTTATTC
cCPE_I258K_rev	GAATAAATATTTAAAATCAACTtTTTTGTCTAGCTAAG
cCPE_L254A/S256A/I258A_for	GGACAAAAATATAGAATCgcAGCTgcCAAAgcTGTGATTTTAATATTTATTC
cCPE_L254A/S256A/I258A_rev	GAATAAATATTTAAAATCAACAgcTTTTGgcAGCTgcGATTCTATATTTTTGTCC
cCPE_V259M_for	GAATCTTAGCTAGCAAAATTaTgGATTTTAATATTTATTC
cCPE_V259M_rev	GAATAAATATTTAAAATCcAtAATTTTGTCTAGCTAAGATTC
cCPE_V259F_for	GAATCTTAGCTAGCAAAATTTtTTGATTTTAATATTTATTC
cCPE_V259F_rev	GAATAAATATTTAAAATCAAAaAATTTTGTCTAGCTAAGATTC
cCPE_V259Y_for	GAATCTTAGCTAGCAAAATTTaTGATTTTAATATTTATTC
cCPE_V259Y_rev	GAATAAATATTTAAAATCAtaAATTTTGTCTAGCTAAGATTC
cCPE_D284A_for	CTTAGGTGATGGAGTAAAAGcTCATTATGTTGATATAAGC
cCPE_D284A_rev	GCTTATATCAACATAATGAgCTTTTACTCCATCACCTAAG
cCPE_D284N_for	CTTAGGTGATGGAGTAAAAaATCATTATGTTGATATAAGC
cCPE_D284N_rev	GCTTATATCAACATAATGATtTTTTACTCCATCACCTAAG
cCPE_A302M_fwd	GTTCTTGTAATGAAAatgAATTCATCATATAGTGG
cCPE_A302M_rev	CCACTATATGATGAATTcatTTTCATTACAAGAAC
cCPE_A302Y_for	CAATATGTTCTTGTAATGAAAtataAATTCATCATATAGTG
cCPE_A302Y_rev	CACTATATGATGAATTataTTTCATTACAAGAACATATTG
cCPE_S305P_for	GTAATGAAAGCTAATTCaCCATATAGTGGAAATTACCC
cCPE_S305P_rev	GGGTAATTTCCACTATATggTGAATTAGCTTTTCATTAC
cCPE_Y306A_for	TGAAAGCTAATTCATCAgcTAGTGGAAATTACCCTTA
cCPE_Y306A_rev	TAAGGGTAATTTCCACTAgcTGATGAATTAGCTTTCA
cCPE_Y306W_for	TGAAAGCTAATTCATCatGgAGTGGAAATTACCCTTA
cCPE_Y306W_rev	TAAGGGTAATTTCCACTcCaTGATGAATTAGCTTTCA
cCPE_S307R_fwd	GCTAATTCATCATATAGgGGAAATTACCCTTATTC
cCPE_S307R_rev	GAATAAGGGTAATTTCCcCTATATGATGAATTAGC
cCPE_Y310F_for	CATCATATAGTGGAAATTTcCCTTATTCAATATTATTTTC
cCPE_Y310F_rev	GAAATAATATTGAATAAGGGGaAATTTCCACTATATGATG
cCPE_Y310H_fwd	CATCATATAGTGGAAATcACCCTTATTCAATATTATTTTC
cCPE_Y310H_rev	GAAATAATATTGAATAAGGGTgATTTCCACTATATGATG
cCPE_Y310K_fwd	CATCATATAGTGGAAATaAgCCTTATTCAATATTATTTTC
cCPE_Y310K_rev	GAAATAATATTGAATAAGGcTtATTTCCACTATATGATG
cCPE_S305P+S307R For	GTAATGAAAGCTAATTCaCCATATAGgGGAAATTACCC
cCPE_S305P+S307R Rev	GGGTAATTTCCcCTATATggTGAATTAGCTTTTCATTAC
cCPE_S313H 2nd For	gGGGAAATTACCCTTATcacATATTATTTCAAAAATT
cCPE_S313H 2nd Rev	AATTTTTGAAATAATATgtgATAAGGGTAATTTCCCc
cCPE_S313H_for	GTGGAAATTACCCTTATcacATATTATTTCAAAAATT
cCPE_S313H_rev	AATTTTTGAAATAATATgtgATAAGGGTAATTTCCAC
<b>Sequenzierung</b>	
MCS-1_for	GGTTTAGTGAACCGTCAGATCC
YFP_rev	GCTGAACTTGTGGCCGTTTACG
pGEX3	CCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGG

Kleingeschriebene Basen stehen für vom Wildtyp abweichende Basen, unterstrichene Bereiche stehen für die mit dem jeweiligen Cld übereinstimmende Sequenz der RF-Primer (siehe 2.2.4.2).

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Plasmid-DNA-Präparation

Plasmid-DNA wurde unter Verwendung von unterschiedlichen kommerziell erhältlichen Kits isoliert. Kleine Mengen an Plasmid-DNA wurden mit dem *ZR Plasmid Miniprep Kit™- classic* (Zymo Research) entsprechend Herstellerangaben isoliert. Zur Isolation von größeren Mengen wurde das *QIAGEN Plasmid Plus Midiprep Kit* (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte bei beiden Kits mit einem 1:2-Gemisch aus Elutionspuffer und HPLC-reinem Wasser. DNA-Konzentration und -Reinheit wurden anschließend photometrisch am *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific) bestimmt.

### 2.2.2 Transformation von Bakterien

Die Transformation von Plasmiden in elektrokompetente *E. coli* erfolgte mittels Elektroporation. 50 µl elektrokompetente *E. coli* BL21 wurden mit 0,5–1,5 µl DNA versetzt und nach 5 min Inkubation auf Eis in vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 1800 V im Elektroporator *Easyject Prima* (Equibio GmbH), daraufhin wurden sofort 350 µl LB-Medium (37 °C) zugegeben und die Bakterien bei 37 °C für 1 h auf einem Heizblock schüttelnd inkubiert. Abschließend wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.3 Agarose Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1% TAE-Agarosegel (1% (w/v) Agarose in 0,4 M Tris-Base, 0,01 M EDTA, 0,2 M Essigsäure, pH 8,5 mit 1:10000 *GelGreen™*, Biotium Inc.) genutzt. Die Proben wurden mit 6 x (oder 10 x) DNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Es wurde eine konstante Spannung von 5 V/cm angelegt. Zur Visualisierung der Fragmente wurde das *GelGreen™* (Biotium Inc.)-Signal im Fluoreszenzimager *Fuji FLA-5000* (Fujifilm) detektiert. Die Länge der Fragmente wurde im Verhältnis zu einem mitgeführten DNA-Größenstandard ermittelt.

### 2.2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

#### 2.2.4.1 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerechte Mutagenese-PCR ist ein Verfahren zum gezielten Nukleotidaustausch in einem Gen. Zunächst wird ein komplementäres Primerpaar synthetisiert, dessen Oligo-

nukleotidsequenz die gewünschte Mutation enthält (Thermo Fisher Scientific). Durch Anlagerung der Primer an die Matrizen-DNA erzeugt eine DNA-Polymerase mit *proofreading*-Funktion eine Kopie, die nur an der zu mutierenden Position von der Matrize abweicht. Durch den zweigeteilten Reaktionsansatz sowie das PCR-Programm (Tab. 2.1) wird gewährleistet, dass im ersten Schritt eine ausreichende Menge an DNA amplifiziert wird und sich die Primerpaare nicht zusammenlagern. Zunächst wurden die komplementären Primer in 15 µl Einzelreaktionsansätzen (Tab. 2.1) fünf Zyklen lang getrennt eingesetzt (Syntheseschritt 1), danach wurden die Ansätze vereint, weitere 0,75 U DNA-Polymerase hinzugegeben und eine zweite PCR durchgeführt (Syntheseschritt 2); Hierbei wurde die Annealingtemperatur variiert (*“low”/“high”*). Zur Überprüfung der Amplifikation, und um festzustellen, ob eine unspezifische Oligonukleotidbindung nachweisbar ist, wurden je 5 µl des PCR-Produktes neben 500–650 ng des als Matrize dienenden Plasmides in einem Agarosegel aufgetrennt (2.2.3). Das Amplifikat ist im Unterschied zum Matrizen-Plasmid linear, kann also aufgrund des unterschiedlichen Laufverhaltens im Gel identifiziert werden. Produkte unspezifischer Oligonukleotidbindung ergeben einen „Schleier“ oder distinkte Banden mit weniger Kilobasen als das gewünschte Amplifikat.

**Tab. 2.1:** PCR-Ansatz und Programme der ortsgerichteten Mutagenesen

<i>Einzelreaktionsansatz</i>		<i>PCR-Programm</i>		
		Zyklen	Zeit	Temperatur
Plasmid-DNA	400–650 ng	<i>Syntheseschritt 1</i>		
Oligonukleotid (for bzw. rev.)	1,20 µM	Denaturierung	1	120 s 95 °C
<i>AccuPOL</i> DNA Polymerase	0,75 U	Denaturierung	5	30 s 95 °C
<i>AccuPOL</i> Key Puffer	1 x	Annealing		45 s 65 °C
dNTPs	0,2 mM	Elongation		10 min 68 °C
H <sub>2</sub> O (HPLC rein)	Add 15 µl			
		<i>Syntheseschritt 2</i>		
		Denaturierung	1	30 s 95 °C
		Denaturierung	17	30 s 95 °C
		Annealing ( <i>“low”/“high”</i> )		60 s 62,5 °C/ 68 °C
		Elongation		10 min 68 °C
		finale Elongation	1	20 min 68 °C

### ***DpnI*-Verdau**

Um das Amplifikat der Mutagenese-PCR zu reinigen und das als Matrize eingesetzte Plasmid aus dem fertigen PCR-Ansatz zu entfernen, erfolgte ein Verdau des PCR-Produktes mit der Restriktionsendonuklease *DpnI*. *DpnI* spaltet spezifisch methylierte DNA (Vovis & Lacks, 1977), nicht jedoch das neu synthetisierte, unmethylierte Produkt der Mutagenese-PCR.

7 µl des PCR-Produktes wurden mit 6 U *DpnI* bei 37 °C für 5 h verdaut. Anschließend erfolgte die Transformation von *E. coli* BL21-Zellen mit 0,5 bis 1 µl des *DpnI*-Verdau (2.2.2).

### 2.2.4.2 Restriktionsfreie Klonierung

Die RF-Klonierung (van den Ent & Löwe, 2006) wurde zur Klonierung der murinen Claudin-DNA aus den pCMV6-Kan/Neo in pEYFP-N1 verwendet. Bei dieser Methode wird in einer PCR (Tab. 2.2) zunächst das gewünschte Gen (hier mCld6–mCld9 aus pCMV6-Kan/Neo, 2.1.7) amplifiziert – wobei Oligonukleotide verwendet werden, die lange passende Überhänge zum Ziel-Vektor (hier pEYFP-N1) besitzen (2.1.8). Zur Kontrolle der PCR wurden je 5 µl des PCR-Produktes in einem Agarosegel aufgetrennt (2.2.3).

**Tab. 2.2:** PCR-Ansatz und Programm der restriktionsfreien Klonierung

<i>Reaktionsansatz</i>		<i>PCR-Programm</i>			
			Zyklen	Zeit	Temperatur
pCMV6-Kan/Neo-mCld	200 ng	Denaturierung	1	120 s	95 °C
Oligonukleotide je	50 pmol	Denaturierung	30	60 s	95 °C
<i>AccuPOL</i> DNA Polymerase	3,125 U	Annealing		60 s	60 °C
<i>AccuPOL</i> Key Puffer	1 x	Elongation		80 s	72 °C
dNTPs	25 pmol	finale Elongation	1	10 min	72 °C
H <sub>2</sub> O (HPLC rein)	add 100 µl				

Nach Aufreinigung mit dem DNA-Clean&Concentrator™-5 Kit (Zymo Research) nach Herstellerangaben wurde das PCR-Produkt in einer linearen Amplifikationsreaktion (Tab. 2.3) mit dem Ziel-Vektor vereint, wobei es als Oligonukleotid-Paar fungierte. Zur Kontrolle der linearen Amplifikationsreaktion wurden je 5 µl des Produktes in einem Agarosegel aufgetrennt (2.2.3). Daraufhin erfolgte ein *DpnI*-Verdau wie unter 2.2.4.1 beschrieben, um das Amplifikat der linearen Amplifikationsreaktion von der Ziel-Vektor-DNA zu reinigen. Abschließend erfolgte die Transformation von *E. coli* BL21-Zellen mit 1 bis 2 µl des *DpnI*-Verdau.

**Tab. 2.3:** Ansatz und Programm der linearen Amplifikationsreaktion für die RF-Klonierung

<i>Reaktionsansatz</i>		<i>PCR-Programm</i>			
			Zyklen	Zeit	Temperatur
Ziel-Vektor (pEYFP-N1)	25 ng	Denaturierung	1	120 s	95 °C
PCR-Produkt	200 ng	Denaturierung	35	60 s	95 °C
<i>AccuPOL</i> DNA Polymerase	2,5 U	Annealing		60 s	55 °C
<i>AccuPOL</i> Key Puffer	1 x	Elongation		9 min*	72 °C
dNTPs	25 pmol	finale Elongation	1	10 min	72 °C
H <sub>2</sub> O (HPLC rein)	add 25 µl				

\* für die Elongation sollten 2 min/kb veranschlagt werden

### 2.2.5 Sequenzierung

Zu Beginn der Arbeit wurde die Sequenzierung durch das Sequenzierungslabor am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) durchgeführt. Hierzu wurde vorbereitend das

BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit (Life Technologies GmbH) verwendet. Für die Sequenzierungs-PCR wurden ~200 ng Plasmid-DNA, 5 pmol/µl Sequenzierungsprimer, 1 µl BigDye Reaction Mix, 2 µl Reaktionspuffer (5x) mit H<sub>2</sub>O, HPLC rein auf 10 µl aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte im PCR-Thermocycler (Bio-Rad) nach Herstellerangaben. Die DNA des PCR-Ansatzes wurde anschließend mit 40 µl Fällungsreagenz (112,5 mM Na-Acetat; 76% (v/v) Ethanol in H<sub>2</sub>O, HPLC rein) für 15 min bei RT ausgefällt und bei 20000xg für 20 min zentrifugiert. Nach Trocknung des DNA-Pellets im Heizblock wurde die DNA durch das Sequenzierungslabor aufbereitet und sequenziert.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden Sequenzierungen von *Source BioScience LifeSciences* (Berlin-Buch, Deutschland) ausgeführt. Für die Sequenzierung der cCPE-Konstrukte wurde pGEX3 als Oligonukleotid verwendet. Die verschiedenen Cld-Konstrukte wurden mittels MCS\_for oder YFP\_rev sequenziert (siehe 2.1.8).

## 2.3 Biochemische Methoden

### 2.3.1 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

#### 2.3.1.1 Heterologe Genexpression in *E. coli* BL21

Eine 5 ml ÜNK wurde bei 37 °C in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angezogen. Zur heterologen Genexpression wurden 50 ml LB-Medium mit 3 ml dieser Vorkultur angeimpft und bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Das Wachstum der Bakterien wurde photometrisch verfolgt. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6–0,7 erfolgte die Induktion der heterologen Genexpression durch Zugabe von 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG). Nach 3 h erfolgte die Zellernte (30 min, 4000xg, 4 °C). Die Zellsedimente wurden bei -80 °C bis zur Proteinaufreinigung gelagert. Zur Kontrolle der heterologen Genexpression wurden vor Induktion und zur Zellernte jeweils Proben (2 ml) entnommen, sedimentiert, die Zellen in SDS-Auftragspuffer aufgenommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

#### 2.3.1.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Das Zellsediment einer 50 ml-Kultur wurde in 1,5 ml Lysepuffer resuspendiert und 15 mal 1 s bei 20 kHz sonifiziert. Nach Zugabe von 6 µl PMSF (0,2 M in EtOH) mit nachfolgendem vortexen, wurde die Zelldebris durch Zentrifugation (20000xg, 30 min, 4 °C) entfernt. Zeitgleich wurden Minisäulen (MobiSpin Column „F“) für die Affinitätschromatographie vorbereitet. 400 µl der (50% v/v) Pierce Glutathione Agarose (Thermo Fisher Scientific) wurden in die Säulen gegeben, sedimentiert (500xg, 5 min) und 3 mal mit je 2,5 Säulenvolumen

(CV, entspricht 500 µl) PBS gewaschen (500xg, 2 min). Anschließend wurden pro Säule 700 µl (3,5 CV) des Zelllysats aufgetragen und für 2 h bei 4 °C auf einem Rotator inkubiert. Der Durchfluss wurde gesammelt (500xg, 5 min, 4 °C) und die Säulen 3 mal mit 600 µl (3 CV) 1% (v/v) Triton X 100 in PBS sowie 1 mal mit 600 µl (3 CV) PBS gewaschen (500xg, 2 min, 4 °C). Um die GST-Fusionsproteine zu eluieren, wurden je 500 µl (2,5 CV) frischer Elutionspuffer in die Säulen gegeben, für 30 min bei 4 °C rotierend inkubiert (Blood Tube Rotator SB1, Stuart Scientific) und anschließend zentrifugiert (500xg, 5 min, 4 °C). Das Eluat wurde über Nacht bei 4 °C gegen PBS dialysiert, anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt und eine SDS-Page zur Kontrolle der Reinheit durchgeführt. Bei Bedarf wurden die aufgereinigten Proteine mit Amicon®Ultra Konzentratoren (Merck KGaA) aufkonzentriert oder umgepuffert.

### 2.3.2 Proteingehaltsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mittels Biuret-Reaktion mit anschließender Komplexierung der Cu<sup>1+</sup>-Ionen durch 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (Bicinchoninsäure, BCA) und abschließender photometrischer Messung der Absorption bei 562 nm (Smith *et al.*, 1985). Je nach erwartetem Proteingehalt wurden entweder das Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), bei 5 µg/ml – 2 mg/ml Protein, oder das Pierce® Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), bei 0,5 µg/ml – 20 µg/ml, nach Herstellerangaben verwendet.

Als weitere Methode zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde die spektrophotometrische Messung bei 280 nm genutzt (Gill & von Hippel, 1989).

### 2.3.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die SDS-Page trennt Proteine im elektrischen Feld nach ihrer Größe auf. Das anionische SDS lagert sich an die Polypeptidkette an und maskiert so die Eigenladung des Proteins. Durch Denaturierung und die Anwesenheit von reduzierenden Agenzien liegen die Proteine linearisiert vor, und die Menge des angelagerten SDS ist proportional zum Molekulargewicht des Proteins. Hierdurch wird die Geschwindigkeit, mit der sich die Proteine im elektrischen Feld bewegen, abhängig vom Molekulargewicht und ermöglicht somit dessen näherungsweise Bestimmung.

Proteinproben wurden mit 6 x SDS-Probenpuffer und 0,1 M DTT gemischt und 10 min bei 95 °C denaturiert. Zur Auftrennung von Claudinen wurden 15%ige, zur Auftrennung von GST-cCPE-Fusionsproteinen 12%ige Gele verwendet. Bis zum Einlaufen der Bromphenolblaufront in das Trenngel erfolgte der Gel-Lauf bei 80–100 V (ca. 30 min), anschließend bei 100–120 V für etwa 1,5 h. Die Gele wurden danach entweder in

Coomassie-Lösung gefärbt – und der Hintergrund durch mehrmaliges kurzes Aufkochen in Wasser in der Mikrowelle entfärbt – oder direkt für Western Blots weiterverwendet.

### 2.3.4 *Semi-dry* Western Blot

Um Proteine spezifisch im Western Blot nachzuweisen, werden sie zunächst elektrophoretisch aus einem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend mittels spezifischer Antikörper detektiert.

Der Transfer erfolgte im *Semi-dry*-Verfahren. Die SDS-Gele wurden zunächst 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Der Reihe nach wurden von der Anode der Elektroblot-Einheit aus 2 Filterpapiere, eine Nitrozellulosemembran (Hybond-ECL, GE Healthcare), das SDS-Gel und 2 weitere Filterpapiere luftblasenfrei übereinandergelegt. Der Transfer der Proteine erfolgte für 1 h bei 1,6 mA/cm<sup>2</sup> und wurde durch reversible Färbung mit Ponceau-Rot überprüft. Anschließend wurden die Membranen 1 h mit 3% (w/v) Magermilchpulver in TBST bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht bei 4 °C mit 1% (w/v) Magermilchpulver in TBST blockiert, 3 mal 10 min mit TBST gewaschen und danach bei 4 °C über Nacht oder bei RT für mindestens 1,5 h mit dem Primärantikörper (Verdünnung 1:1000 in TBST) inkubiert. Nach erneutem Waschen (3 mal 10 min mit TBST) erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Horse-Radish-Peroxidase (HRP) gekoppelten Sekundärantikörper (1:3000 in TBST mit 1% (w/v) Magermilchpulver) für 45 min. Nach dem abschließenden Waschen (3 mal 10 min mit TBST) erfolgte die Detektion mit Lumi-Light Western Blot Detektionsreagenz (Roche Diagnostics) nach Angaben des Herstellers. Die Quantifizierung und Dokumentation der Blots erfolgte am Lumi-Imager™ F1 (Boehringer-Mannheim GmbH). Gegebenenfalls erfolgte eine Detektion von weiteren Proteinen mit einem weiteren Primärantikörper. Hierzu wurden die Membranen durch 1 h Inkubation bei 60 °C in "Strip"-Puffer von bereits gebundenen Antikörpern befreit, gewaschen (5 mal 5 min mit TBST), und das Protokoll ab dem Blockieren wiederholt.

### 2.3.5 Kovalente Modifikation von Proteinen

#### 2.3.5.1 Markierung von cCPE mit einem Fluorophor

Die Markierung von GST-cCPE wurde mittels des Alexa Fluor®647 Protein Labeling Kit (Life Technologies GmbH) nach Herstellerangaben durchgeführt. 0,5 ml GST-cCPE<sub>K257A</sub> (2 mg/ml, entspricht ~24 nmol) wurden mit 50 µl 1 M Bicarbonat-Lösung vermischt, um auf einen pH-Wert von 7,5–8,5 einzustellen. Der Ansatz wurde in das im Kit enthaltene Reaktionsgefäß mit Alexa Fluor®647 (eine Stoffmengenangabe ist hier nicht möglich, da diese Information nicht vom Hersteller angegeben wird) überführt und für 1 h bei RT rührend inkubiert.

Daraufhin erfolgte die Aufreinigung des markierten Proteins über eine Größenausschlusschromatographie (2.3.6).

### 2.3.5.2 Markierung von cCPE mit Cryptophan A

Die Markierung von GST-cCPE mit Cryptophan-A-PEG wurde von Michael Beyermann (FMP, Berlin) durchgeführt. Zunächst erfolgte die Umsetzung von 4,4 mg Cryptophan-A-PEG ( $\sim 4 \mu\text{mol}$ ) mit 0,6 mg N-Hydroxysuccinimid ( $\sim 5 \mu\text{mol}$ ) und 0,7  $\mu\text{l}$  N,N'-Diisopropylcarbodiimid in 100  $\mu\text{l}$  Dichlormethan (15 min, RT) zu aktiviertem Cryptophan-A-PEG-N-Hydroxysuccinimid. Nach Verblasen des Dichlormethans (auf 20  $\mu\text{l}$ ) wurden 50  $\mu\text{l}$  DMSO zu dem Ansatz hinzugegeben, dieser mit 5,47 mg GST-cCPE<sub>K257A</sub> ( $\sim 137 \text{ nmol}$ ) in 1 ml 0,1M Bicarbonatpuffer pH 9 vermischt und für 20 h bei 4 °C rührend inkubiert. Im Anschluss wurde die Markierung mittels analytischer Reversed-Phase-Chromatographie kontrolliert. Das nicht mit cCPE gekoppelte Cryptophan-A-PEG wurde durch Zentrifugation der Probe in Amicon®Ultra Konzentratoren (Merck KGaA) mit einer molekularen Ausschlussgrenze ("cut-off") von 10 kDa von dem markierten Cryptophan-cCPE abgetrennt.

### 2.3.6 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie (auch Gelfiltration genannt) ist ein säulenbasiertes Trennverfahren, das Moleküle anhand von Größenunterschieden (Stokes Radius) voneinander separiert. Das Säulenmaterial ist eine poröse Matrix aus sphärischen Partikeln, deren Porengröße einen definierten Bereich umspannt. Bei einem Gemisch aus Molekülen unterschiedlicher Größe eluieren diejenigen Moleküle im Ausschlussvolumen ( $V_0$ ), die die Porengröße der Matrix überschreiten. Diese Moleküle passieren die Säule mit der gleichen Geschwindigkeit wie der Fluss des Puffers. Moleküle mit partiellem Zugang zur Matrix eluieren – antiproportional zur Molekülgröße – bei einem definierten Elutionsvolumen ( $V_e$ ) von der Säule. Moleküle, die aufgrund der Größe in jede Pore diffundieren können, eluieren nahe des Totalvolumens der Säule ( $V_t$ ). Zunächst wurde die Säule mit 2 CV PBS äquilibriert, daraufhin wurde 1 ml des zu reinigenden und mit Alexa Fluor®647 markierten Proteins aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 1 CV PBS und konnte aufgrund der starken Färbung des Proteins optisch verfolgt werden.

## 2.4 Zellbiologische Methoden

### 2.4.1 Standardbedingungen bei der Arbeit mit Zellkulturen

Die Arbeiten erfolgten bei sterilen Bedingungen unter einer Sterilwerkbank (S-1200, BDK Luft- und Reinraumtechnik). Die Kultivierung von Zellen erfolgte in CO<sub>2</sub>-begasten Inkubatoren (CB210, Binder GmbH) bei 10% (v/v) CO<sub>2</sub>, 37 °C und 95% Luftfeuchtigkeit.

### 2.4.2 Kultivieren von Zellen

Die Kultivierung von Zellen erfolgte in 75 bzw. 25 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH). Passagiert wurde beim Erreichen einer Konfluenz von 70–90%. Zunächst wurde das Medium abgenommen, und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Zum proteolytischen Ablösen wurden die adhären Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung überschichtet und 3–15 min bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Kulturmedium aufgenommen und durch auf- und abpipettieren vereinzelt. Zur Subkultivierung wurden die Zellen in einer 1:3 bis 1:8-Verdünnung in neue Gewebekulturflaschen überführt. Alle 3–5 Tage erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums.

#### 2.4.2.1 Kultivierung von cEND-Zellen

cEND-Zellen wurden von Kinga Blecharz (Charité), wie von Kleinschnitz *et al.* (2011) beschrieben, kultiviert und bereitgestellt. Für die Durchführung von zellulären Bindungsassays mit cCPE-Varianten wurden cEND-Zellen in gelatinebeschichtete 24-well-Platten ausgesät. Bei 80% Konfluenz wurde von Vollmedium (DMEM) auf serumreduziertes DMEM mit 2% (v/v) FCS (mit Dextran-umantelter Aktivkohle behandelt) gewechselt. Nach 24 h erfolgten dann die zellulären Bindungsassays wie unter 2.4.7.2 dargelegt.

### 2.4.3 Kryokonservierung und Auftauen von eukaryotischen Zellen

Längerfristige Lagerung von Zellen bzw. Zelllinien erfolgte in flüssigem Stickstoff. Hierzu wurden die Zellen einer 75 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflasche wie beschrieben trypsiniert (2.4.2), in Kulturmedium aufgenommen und pelletiert (5 min, 1200 upm, 4 °C). Das Medium wurde abgenommen und das Zellpellet in 3 ml Gefriermedium (50% (v/v) FBS, 10% (v/v) DMSO, 1 mg/ml Penicillin/Streptomycin in DMEM) resuspendiert. Je 1 ml wurde in Kryoröhrchen (Corning Incorporated) aliquotiert. Die Kryoröhrchen wurden in einen bei 4 °C vorgekühlten Kryo-Kontainer (Nalgene® "Mr. Frosty", Thermo Fisher Scientific) überführt, und dieser in den -80 °C-Gefrierschrank zum weiteren Herunterkühlen gebracht. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Kultivierung von kryokonservierten Zellen wurden diese unmittelbar nach Auftauen in Kulturmedium aufgenommen und in mit Poly-L-Lysin (PLL) beschichtete Gewebekulturflaschen (1 h Inkubation mit 25 µg/ml PLL in PBS) überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt.

#### 2.4.4 Ernten von eukaryotischen Zellen

Das Ernten von Zellen wurde bei 70–100% Konfluenz durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen einmal mit PBS  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  gewaschen. Der Zellrasen wurde mit einem Zellschaber vom Boden der Gewebekulturflasche in einem Volumen von 3 ml PBS  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  abgeschabt und in ein neues Gefäß überführt. Restliche in der Gewebekulturflasche verbliebene Zellen wurden durch zweimaliges Spülen mit je 5 ml PBS  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  möglichst vollständig gesammelt. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (10 min, 300xg, 4 °C) und das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Zellpellets erfolgte bei -80 °C.

#### 2.4.5 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen

Die transiente Transfektion von HEK293-Zellen mit Plasmiden erfolgte entweder mit Lipofectamin®2000 (Life Technologies GmbH, Zellen für zelluläre Bindungsassays) oder mit Polyethylenimin (PEI, Polysciences GmbH, Zellen für die Lebend-Zell-Mikroskopie).

24 h vor Transfektion wurden die Zellen mit einer Konfluenz von 60% auf PLL-beschichtete (1 h Inkubation mit 25 µg/ml PLL in PBS) 24-well-Platten (zelluläre Bindungsassays) bzw. auf 30 mm Deckgläschen in 6-well-Platten (Lebend-Zell-Mikroskopie) ausgesät. Vor der Transfektion wurde das Kulturmedium durch 500 µl Transfektionsmedium (DMEM, 5% (v/v) FBS, kein Antibiotika) ersetzt. Die DNA und das Transfektionsreagenz wurden für die Transfektion zunächst jeweils in serumfreien OptiMEM verdünnt und nach 5 min bei RT vereinigt. Nach weiteren 20 min Inkubation bei RT wurde der Transfektionsansatz zu den Zellen pipettiert. Nach 12–16 h erfolgte ein Mediumwechsel zu HEK-Standardmedium. Volumina und DNA-Mengen für den Transfektionsansatz sind Tab. 2.4 zu entnehmen. Alle Experimente mit transient transfizierten Zellen wurden ein oder zwei Tage nach Transfektion durchgeführt, da in diesem Zeitraum die transiente Expression am höchsten ist.

**Tab. 2.4:** Zusammensetzung der Transfektionsansätze (jeweils 1x)

Zellkulturtestplatte	cm <sup>2</sup> /well	Kulturmedium µl	OptiMEM µl	Lipofectamin®2000 µl	PEI µl	DNA µg
24-well	2	500	2x50	2	-	0,8
6-well	10	2000	2x250	-	10	4

## 2.4.6 Generierung von stabil transfizierten HEK293-Zelllinien

Um klonale Variationen zu minimieren, wurden keine Einzelklone sondern Mischzelllinien präpariert, in denen die Zellen verschiedene Expressionsniveaus des jeweiligen Cld-YFP-Konstruktes aufwiesen. Hierzu wurden HEK293-Zellen in PLL-beschichtete (1 h Inkubation mit 25 µg/ml PLL in PBS) 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH) ausgesät, im HEK-Standardmedium bis zu einer Zelldichte von ~90% kultiviert und mit dem entsprechenden Cld-Konstrukt transfiziert (2.4.5). Die transfizierten HEK293-Zellen wurden in HEK-Standardmedium mit 0,5 mg/ml G418 (Life Technologies GmbH) zur Selektion kultiviert. Nach ~2 Wochen setzte massives Zellsterben ein. In dieser Phase wurden, je nach Bedarf, das Kulturmedium gewechselt, die Zellen in kleinere Kulturgefäße replattiert und zwischenzeitlich in HEK-Standardmedium ohne Antibiotika kultiviert. Zwei bis drei Wochen nachdem keine Zellen mehr abstarben wurden G418-resistente Zellen vereint. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (*FACSVantage SE System*, BD Biosciences) wurden Zellen ausselektiert, die kein YFP exprimierten. – Hierdurch konnte eine Anreicherung auf 60–95% YFP exprimierende Zellen erzielt werden. Die Durchflusszytometrie wurde von Hans-Peter Rahn (Max-Delbrück-Centrum, Berlin) durchgeführt.

## 2.4.7 Zellulärer Bindungsassay

### 2.4.7.1 Zellulärer Bindungsassay mit Quantifizierung mittels Western Blots

HEK293-Zellen wurden mit einer Zelldichte von 70% in PLL-beschichtete (25 µg/ml, 30 min, 37 °C) 24-well-Platten ausgesät und in Kulturmedium kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit den entsprechenden Cld-Konstrukten transfiziert (siehe 2.4.5) und für weitere zwei Tage kultiviert. Danach wurden die HEK293-Zellen für 30 min bei 37 °C mit 0,5 µg/ml GST-cCPE in 500 µl Kulturmedium inkubiert. Anschließend wurde die 24-well-Platte auf Eis gestellt und viermal mit eiskaltem PBS Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> gewaschen, durch Abspülen vom Kulturgefäßboden mit 1 ml eiskaltem PBS Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurden die Zellen pelletiert (500xg, 5 min, 4 °C), bis zur weiteren Verwendung im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Quantifizierung der CPE-Bindung an die transfizierten Zellen wurden die Zellpellets in 30 µl RIPA-Puffer mit 1:25 Proteaseinhibitor-Cocktail (Herstellerangaben, Sigma-Aldrich Co. LLC.) für 10 min auf Eis lysiert und anschließend bei 10.000xg für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit SDS-Auftragspuffer und 1,5 µl 1 M DTT gemischt und 5 min bei 60 °C inkubiert. Die Hälfte des Volumens der Proben wurde auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, die Proteine wurden aufgetrennt (2.3.3) und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (2.3.4).

Die Biolumineszenz der immunreaktiven Banden der  $\alpha$ GST- bzw.  $\alpha$ Cld-Färbungen (entweder über Cld-Antikörper oder über GFP-Antikörper) wurde in Form von BLU-Werten mit Hilfe des LumiAnalyst™-Programms (Boehringer-Mannheim GmbH) quantifiziert. Für die Quantifikation von GST-cCPE (CPE-Bindung;  $BLU_{CPE}$ ) und der Cld-Konstrukte (Cld-Expressionsniveau;  $BLU_{Cld}$ ) wurden die Banden bei monomerem Molekulargewicht verwendet, da sie zugleich auch die prominentesten Signale aufwiesen. Die einzelnen BLU-Werte wurden – jeweils auf die Werte für Cld<sub>wt</sub>-YFP exprimierende HEK293-Zellen ( $BLU_{Cldwt}$ ), die mit GST-cCPE inkubiert wurden ( $BLU_{Cldwt/CPE}$ ) – als interner Standard relativiert. Die relative CPE-Bindung wurde anschließend auf das relative Cld-Expressionsniveau normalisiert:

$$\text{relative CPE-Bindung} = (BLU_{CPE} / BLU_{Cldwt/CPE}) / (BLU_{Cld} / BLU_{Cldwt}).$$

#### 2.4.7.2 Zellulärer Bindungsassay mit Quantifizierung mittels primärem Fluorophor-gekoppeltem Antikörper

Einen Tag nach Aussaat (in PLL-beschichtete 24-well-Platten) von stabil Cld exprimierenden oder zwei Tage nach transienter Transfektion von Cld-Konstrukten in HEK293-Zellen, wurden die Zellen mit GST-cCPE-Konstrukten inkubiert. Die gebundenen GST-cCPE-Konstrukte wurden anschließend mit dem Phycoerythrin-gekoppelten anti-GST-Antikörper ( $\alpha$ -GST Phycolink®, Europa Bioproducts Ltd.) detektiert. Die Quantifizierung der Cld-Expression wurde durch Verwendung von “*enhanced green fluorescent protein*” (EGFP-) bzw. “*enhanced yellow fluorescent protein*” (EYFP-) Claudin-Fusionsproteinen ermöglicht. Zur Quantifizierung der Zellzahl erfolgte zusätzlich eine Kernfärbung mit Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific). Detektion und Quantifizierung der Fluorophore erfolgten durch Messung der emittierten Fluoreszenzintensitäten nach Anregung (Wellenlängen siehe Tab. 2.5) an einem Mikroplattenleser (Safire, Tecan Switzerland AG).

**Tab. 2.5:** Extinktions- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluorophore

	<i>EYFP</i>	<i>EGFP</i>	<i>R-Phycoerythrin</i>	<i>Hoechst 33342</i>
$\lambda_{exc.}$ nm	503–509	485–491	539–551	359–371
$\lambda_{em.}$ nm	522–528	507–513	572–584	474–486

Zunächst wurde eine cCPE-Stammlösung (das 4-Fache der gewünschten cCPE-Konzentration) durch Verdünnung der GST-cCPE-Konstrukte in PBS hergestellt und die Proteinkonzentration mit dem Micro-BCA™ Assay (Thermo Fisher Scientific) überprüft. Zur Inkubation der Zellen mit den GST-cCPE-Konstrukten wurden die Stammlösungen in Zellkulturmedium auf die gewünschte Endkonzentration (0,5  $\mu$ g/ml GST-cCPE) verdünnt. Das alte Medium wurde von den Zellen abgenommen und durch 500  $\mu$ l der cCPE-Verdünnung pro Well ausgetauscht. Nach Inkubation (30 min, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) wurden die Zellen gewaschen (2 x, 500  $\mu$ l PBS Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>, eiskalt), mit 250  $\mu$ l Paraformaldehyd-Lösung (10 min, Fixierungspuffer)

fixiert, mit 500  $\mu$ l PBS gewaschen, restliches Paraformaldehyd *gequencht* (20 min, 250  $\mu$ l Quenchpuffer), erneut mit 500  $\mu$ l PBS gewaschen, blockiert (10 min Puffer B) und eine Stunde mit dem Antikörper inkubiert (1:250  $\alpha$ -GST, 2  $\mu$ M Hoechst 33342 in Puffer B). Nach der Antikörperinkubation wurde dreimal mit 500  $\mu$ l PBS gewaschen, nach dem dritten Waschschrift wurde das PBS nicht abgenommen. Die Messung erfolgte entweder sofort oder am darauffolgenden Tag. Die Aufbewahrung der Platten über Nacht erfolgte bei 4 °C.

#### 2.4.8 Bestimmung der Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) von cCPE im zellulären Bindungsassay

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante von cCPE wurden zelluläre Bindungsassays wie unter 2.4.7.2 beschrieben mit unterschiedlichen Konzentrationen von cCPE (1–4600 nM) durchgeführt. Abweichend vom Standardprotokoll wurden die Zellen ohne Waschen direkt nach der cCPE-Inkubation fixiert. Die auf die Zellzahl normalisierten Fluoreszenzintensitäten wurden gegen die cCPE-Konzentration aufgetragen. Die unspezifische Bindung wurde durch Inkubation von nicht-transfizierten HEK293-Zellen mit cCPE (1–4600 nM) gemessen, und das Signal von dem Signal der spezifischen Bindung abgezogen. Anschließend wurde die  $K_d$  unter Verwendung einer nichtlinearen Regressionsanalyse für spezifische Bindung an einer Bindungsstelle (*“one site, specific binding”*) mittels GraphPad Prism Version 5.0 (GraphPad) berechnet.

#### 2.4.9 Lebendzellfärbung

HEK293-Zellen wurden in 6-well-Platten auf PLL-beschichtete Deckgläschen (30 mm) ausgesät und wie unter 2.4.5 beschrieben mit Cld-Konstrukten transfiziert. Alternativ wurden stabil Cld exprimierende Zelllinien ausgesät. Zwei Tage nach Transfektion oder einen Tag nach Aussaat der stabilen Linien erfolgte die Analyse am Laser-Scanning-Mikroskop (LSM, Axiovert 135 mit Plan-Neofluar 100x/1.3 Objektiv). Dazu wurden die Deckgläschen in einen Deckgläschenhalter eingespannt und die Zellen mit 1 ml HBSS<sup>++</sup> überschichtet. Zur Beobachtung der Bindung von cCPE wurden 2  $\mu$ g/ml Alexa647-cCPE zu den Zellen gegeben. Je nach Bedarf wurden die Plasmamembranen durch Zugabe von 15  $\mu$ l Trypanblau (0,05% (w/v) in PBS) gefärbt. Die Detektion von EGFP bzw. EYFP erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{exc.}$  488 nm und bei  $\lambda_{em.}$  zwischen 500 bis 550 nm. Trypanblau wurde bei  $\lambda_{exc.}$  543 nm angeregt und bei einer  $\lambda_{em.}$  >590 nm detektiert. Alexa Fluor<sup>®</sup>647 wurde bei  $\lambda_{exc.}$  633 angeregt, die Detektion erfolgte bei  $\lambda_{em.}$  zwischen 650 bis 710 nm. Die Schichtdicke betrug <0,9  $\mu$ m.

#### 2.4.9.1 Mikroskopische Bestimmung der für Claudin anreicherungspositiven Zell-Zell-Kontakte

Zur Bestimmung der für Claudine anreicherungspositiven Zell-Zell-Kontakte wurden Zellen wie unter 2.4.9 beschrieben für die Mikroskopie vorbereitet.

Für jedes mit PEI transfizierte Cld-Konstrukt wurden Aufnahmen ( $\geq 10$  Replikate) mit zwei Einstellungsprofilen erstellt. Anschließend wurden die Zell-Zell-Kontakte (mindestens 30% der gemeinsamen Kontaktfläche) mit Cld-Anreicherung ausgezählt und ein prozentuales Verhältnis (zwischen Anreicherung und Nicht-Anreicherung) ermittelt. So wurde eine Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Cld-Konstrukte erreicht.

#### 2.4.10 Zelloberflächenbiotinylierung

HEK293-Zellen wurden mit einer Zelldichte von ca. 70% in 10 cm<sup>2</sup> PLL-beschichteten Gewebekulturschalen (Greiner Bio-One GmbH) ausgesät und nach 24 Stunden mit Cld-Konstrukten transfiziert (2.4.5). Alternativ wurden stabil transfizierte, Cld exprimierende HEK293-Zellen ausplattiert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen im Eiswasserbad abgekühlt und 2 mal mit eiskaltem PBS Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> gewaschen. Alle nachfolgenden Schritte wurden mit 4 °C kalten Lösungen und auf Eis durchgeführt. Die Biotinylierung der Zellen erfolgte mit 0,4 mg/ml EZ-link-NHS-SS-Biotin (Thermo Fisher Scientific) in 1,3 ml PBS Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> unter ständigem sanften Schwenken (40 upm) für 60 min. Daraufhin wurde 2 mal mit PBS Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> gewaschen, die Biotinylierungsreaktion gestoppt (15 min, 5 ml 50 mM Glycin in PBS Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) und die Zellen erneut gewaschen (3 x, PBS Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>). Abschließend wurden die Zellen abgeschabt (in PBS Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>), pelletiert (300xg, 2 min, 4 °C), die Pellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Zellpellets wurden in 200 µl RIPA-Puffer mit PIC E (1:25 nach Herstellerangaben, Roche Diagnostics) für 10 min auf Eis lysiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden abzentrifugiert (10.000xg, 5 min und 4 °C). Währenddessen wurden die Minisäulen (MoBiTec) mit 40 µl (50% Suspension) NeutrAvidin™ Plus UltraLink Resin (Thermo Fisher Scientific) befüllt und 2 mal mit 500 µl RIPA-Puffer gewaschen (2 min, 300xg, 4 °C). Die Säulen wurden mit den Lysatüberständen gefüllt und verschlossen, und der Ansatz wurde für 2 h bei 4 °C im Rotator (Stuart Scientific) inkubiert. Die gebundenen biotinylierten Proteine wurden durch Zentrifugation (2 min bei 300xg und 4 °C) von den ungebundenen Lysatbestandteilen getrennt, der Durchfluss wurde aufgefangen und gekühlt aufbewahrt. Die Säulen wurden 4 mal mit 500 µl RIPA-Puffer mit PIC E (1:25 nach Herstellerangaben, Roche Diagnostics) gewaschen. Die Elution der biotinylierten Proteine erfolgte durch Inkubation mit 40 µl SDS-Probenpuffer mit 40 mM DTT (15 min, RT, schüttelnd) und nachfolgender Zentrifugation (2 min, 300xg, 4 °C). Die Elutionsfraktionen (Zelloberflächenfraktion) und 10% der

Lysatfraktion (Zentrifugationsüberstand) wurden auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, aufgetrennt (2.3.3) und auf eine Nitrozellulosemembran (2.3.4) transferiert.

Die Detektion der Claudine erfolgte mit M $\alpha$ GFP als primärem und G $\alpha$ M-HRP als sekundärem AB. Die Intensität der Chemilumineszenz wurde mit dem Lumi-Imager F1TM (Boehringer-Mannheim GmbH) in BLU-Werten bestimmt. Für jedes Konstrukt wurden die BLU-Gesamtintensitäten der Banden in einer Spur quantifiziert – sowohl für die Lysatfraktion als auch für die Zelloberflächenfraktion. Diese Gesamtintensitäten wurden auf die Gesamtintensitäten der Cld<sub>wt</sub>-Spuren von Lysat- und Zelloberflächenfraktion normalisiert (interner Standard). Anschließend wurde aus den normalisierten Intensitätsniveaus der Zelloberflächenfraktionen und der Lysatfraktionen der Quotient gebildet, die Zelloberflächenbiotinylierungsrate. Diese liegt für den jeweiligen Cld<sub>wt</sub> bei 1,0. Für jedes Konstrukt wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt.

## 2.5 Bioinformatische Methoden

### 2.5.1 Verwendete Sekundärstruktur- und Topologievorhersagen

Zur Vorhersage von Sekundärstrukturen bzw. zur Topologievorhersage von Proteinen wurden verschiedene Web-Server verwendet und eine Konsensusvorhersage aus deren Ergebnissen gebildet (Mittelwert), wobei stark von anderen Ergebnissen abweichende Vorhersagen nicht in die Konsensusvorhersage einbezogen wurden.

Zur Sekundärstrukturvorhersagen wurden die folgenden Server verwendet:

Jpred (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/> Kombination von Jnet, JHMM & JPSSM, Cole *et al.*, 2008)

Porter (<http://distill.ucd.ie/porter/>; Pollastri & McLysaght, 2005)

Psipred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>; Jones, 1999; Buchan *et al.*, 2013)

Die Topologievorhersagen erfolgten mit den folgenden Servern:

TMPred ([http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED\\_form.html](http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html); Hofmann & Stoffel, 1993)

TopPred (<http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred>; von Heijne, 1992; Claros & von Heijne, 1994)

HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/html/submit.html>; Tusnady & Simon, 1998, 2001)

PredictProtein (<https://www.predictprotein.org/>; Rost *et al.*, 2004)

DAS (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>; Cserzo *et al.*, 1997)

MemSat-SVM (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/?memsatsvm=1>; Nugent & Jones, 2009)

Sosui ([http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui\\_submit.html](http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html); Hirokawa *et al.*, 1998; Mitaku & Hirokawa, 1999; Mitaku *et al.*, 2002)

TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>; Sonnhammer *et al.*, 1998; Krogh *et al.*, 2001)

TOPCONS (<http://topcons.cbr.su.se/>; Bernsel *et al.*, 2009)

## 2.5.2 Homologiemodellierung von Proteinen

Die Homologiemodellierung von Proteinen basiert auf der Annahme, dass ähnliche Aminosäuresequenzen eine ähnliche Tertiärstruktur besitzen. Durch Sequenzabgleich der Ziel-Aminosäuresequenz mit den, in der "Protein Data Bank" (PDB) hinterlegten (Berman *et al.*, 2000), Sequenzen von Proteinen mit bekannter Kristallstruktur ist es möglich, homologe Proteine zu identifizieren. Von diesen sogenannten Template-Strukturen wird dann das Backbone als Gerüst für die Modellierung des Zielproteins verwendet. Hierbei werden einzelne Aminosäuren des Template-Proteins gegen die entsprechenden Aminosäuren des Zielproteins ausgetauscht, wobei das Backbone gleich bleibt. Anschließend erfolgte eine Energieminimierung des Modells. Abschließend wurde die Qualität des Modells mittels Procheck getestet. Die Qualität des Modells hängt bei diesem Ansatz stark von der Qualität des Template-Proteins und der Sequenzidentität zwischen Ziel- und Template-Protein ab. So sollten die Auflösung der verwendeten Kristallstruktur  $< 3,0 \text{ \AA}$  und die Sequenzidentität  $> 30\%$  sein. Zusätzlich sollten die Aminosäuren Cystein und Prolin aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften in Template- und Zielprotein an derselben Position liegen.

### 2.5.2.1 Modellierung der EZS2 von Claudinen

Die Modellierung der EZS2 von Cld1, Cld3, Cld4 sowie Cld6–Cld9 erfolgte basierend auf dem Modell der EZS2 von Cld5 (Krause *et al.*, 2008; Piontek *et al.*, 2008) bzw. auf der zugrunde liegenden Template-Struktur PDB ID: 2BDV (Forouhar *et al.*, 2005), da trotz intensiver Suche nach weiteren homologen Template-Proteinen in der PDB keine Templates mit höherer Sequenzhomologie und besserer Auflösung gefunden werden konnten.

Eine Ausnahme ergab sich für das Modell der EZS2 von Cld3, hier wurde in der PDB ein N-terminales Helix-Cap aus PDB ID: 1W5C (Biesiadka *et al.*, 2004) mit 100% Sequenzidentität zu dem N-terminalen Helix-Cap der C-terminalen Helix der EZS2 von Cld3 gefunden und in das Modell integriert.

Der manuelle Austausch der Aminosäuren der Template-Struktur zu den Aminosäuren der jeweiligen Claudine sowie die Energieminimierung erfolgten in SybylX2.0 (Tripos Inc.). Im Fall von sterischen Problemen in der Seitenkettenausrichtung wurde die Seitenkettenorientierung entsprechend den Rotamer-Bibliotheken von Dunbrack bzw. Lovell angepasst

(Dunbrack & Karplus, 1993; Bower *et al.*, 1997; Dunbrack & Cohen, 1997; Lovell *et al.*, 2000; Shapovalov & Dunbrack, 2011). Die Energieminimierungen der Modelle erfolgten mit dem *AMBER7 F99* Kraftfeld (Cornell *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2000) konvergierend auf  $\Delta_E < 0,1$  kcal/(mol x Å).

### 2.5.3 Generierung des TMH-Modells von Cld5

#### 2.5.3.1 Template-Generierung

Das Template zur Erstellung des ersten Modells von Cld5 (Modell S-1) wurde nach der Methode von Seigneuret (Seigneuret, 2006) erstellt. Wie in der Veröffentlichung beschrieben, wurden zunächst die Aminosäuren 128–256 aus PDB ID: 2OCC (bovine heart cytochrome c oxidase, Yoshikawa *et al.*, 1998) isoliert und aus dieser Kernstruktur ein quasiideales antisymmetrisches *coiled-coil* Bündel zusammengesetzt. Hierzu wurden Kopien der Kernstruktur (Aminosäuren 135–142, 167–174, 205–212 und 241–248) in einer "Head-to-tails"-Weise kovalent miteinander verknüpft, bis die gewünschte Helixlänge erreicht war. Daraufhin wurden alle Aminosäuren gegen Alanin getauscht und das Backbone kontrolliert. Anschließend wurden Helix 4 und Helix 1 mit dem Modell der EZS2 von Cld5 verknüpft und die Aminosäuren der Helices einzeln gegen die entsprechenden Aminosäuren von Cld5 substituiert. Abschließend wurde eine Energieminimierung wie unter 2.5.2.1 beschrieben durchgeführt.

#### 2.5.3.2 Identifizierung von evolutionären Kontakten zwischen Aminosäuren von Cld5

Evolutionäre Kontakte (ECs) zwischen Aminosäuren in Cld5 wurden mittels *EVfold\_membrane* ([www.evcold.org](http://www.evcold.org); Marks *et al.*, 2011, 2012; Hopf *et al.*, 2012) ermittelt. Mit dieser Methode können in der 3D-Struktur in Kontakt stehende Aminosäuren anhand von korrelierenden Mutationen in der Sequenz von homologen Proteinen identifiziert werden. Die zugrundeliegende Theorie hierzu ist, dass evolutionärer Druck wichtige (struktur- oder funktionsgebende) physikalische Interaktionen von Aminosäuren in einem Protein erhält, während diese interagierenden Aminosäuren einer Kovarianz unterliegen. Die kovarianten Aminosäuren können über Sequenzalignments identifiziert werden.

Da Claudine stark oligomerisierende Proteine sind und zusätzlich mit Claudinen der Nachbarmembran *trans*-interagieren, ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass auch *cis*- oder *trans*-Interaktions-Kontakte in den evolutionären Kontakten vorhanden sind. Daher wurden die von EVfold ermittelten Kontakte der Transmembranregion zusätzlich analysiert und manuell gefiltert. Hierzu wurden die ECs auf den Template-Helices des quasiidealen 4-TMH *coiled-coil* Bündels kartiert und Helix-Interfaces zugeordnet.

### 2.5.3.3 *Ab-initio*-Modellierung mit I-TASSER

Für die Erstellung von *Ab-initio*-Modellen wurde unter anderem der auf *Threading* und multiplen Templates basierende I-TASSER-Server (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>; Zhang, 2008; Roy *et al.*, 2010) verwendet. Für die Modellierung der TMH3 und TMH4 wurden zusätzlich zum Standardprotokoll die experimentell ermittelten Aminosäurekontakte als Kontakt-*Restrains* definiert.

### 2.5.3.4 *Ab-initio*-Modellierung von Cld5 mit Rosetta

Zur Modellierung der vollständigen Cld5-Struktur wurde die "*Rosetta membrane ab initio modeling application*" Version 3.3 verwendet (Yarov-Yarovoy *et al.*, 2006; Barth *et al.*, 2007, 2009). Abweichend vom Standardprotokoll wurde jedoch nicht allein die Topologievorhersage des Octopus-Server (<http://octopus.cbr.su.se/>; Viklund & Elofsson, 2008) verwendet, sondern eine Konsensusvorhersage aller Topologievorhersagen, die unter 2.5.1 gelistet sind. Als Kontakteinschränkungen wurden die experimentell ermittelten Aminosäurekontakte zwischen TMH3 und TMH4 sowie die 18 besten ECs innerhalb der TM-Segmente aus der EVfold-Analyse (2.5.3.2) verwendet. Es wurden 12000 Strukturen pro Lauf berechnet. Als bestes Modell wurde die Struktur mit der niedrigsten Energie (Rosetta Scores) und der höchsten Anzahl an erfüllten Einschränkungen gewertet.

## 2.5.4 Berechnung der Positionierung von Proteinen in einer Membran

Um die Positionierung von Modellen bzw. Proteinstrukturen in einer Membran zu berechnen, wurde der PPM-Server (<http://opm.phar.umich.edu/server.php>; Lomize *et al.*, 2012) genutzt. Der Server verwendet die Methode PPM 2.0, welche ein anisotropes Lösungsmittelmodell der Doppellipidschicht zur Simulation der Membran benutzt (Lomize *et al.*, 2011).

## 2.5.5 Manuelle Dockingstudien

Manuellen Dockingstudien der Cld-EZS2-Modelle mit cCPE (PDB ID: 2QUO; Van Itallie *et al.*, 2008) wurden in SybylX2.0 durchgeführt. Hierzu wurden die Strukturen (cCPE- und EZS2-Modell) zunächst in unterschiedliche „Molekulare-Ebenen“ geladen und die EZS2 der Claudine in die Cld-Bindungstasche von cCPE bewegt, wobei darauf geachtet wurde, dass keine sterischen Kollisionen zwischen den EZS2-Modellen und cCPE entstanden. Anschließend wurden die unterschiedlichen Ebenen zusammengeführt ("*merge*") und eine Energieminimierung wie unter 2.5.2.1 beschrieben durchgeführt.

### 2.5.6 Visualisierung

Die in dieser Arbeit gezeigten Darstellungen von Proteinen wurden entweder mit SybylX2.0 (Tripos) oder mit PyMol Version 1.5.0.4 (Schrödinger LLC) erstellt. Die gezeigten Alignments wurden mit Geneious Pro Version 5.4.4 (Biomatters) bearbeitet und für Abbildungen vorbereitet. Zur Finalisierung von Abbildungen und der Erstellung von schematischen Abbildungen wurden entweder Adobe Photoshop CS5 oder Adobe Illustrator CS5 (Adobe Systems Incorporated) verwendet.

## 2.6 Statistik

Statistische Analysen wurden mit GraphPad *Prism* 5.0 (GraphPad) oder *Excel2003 bzw. 2010* (Microsoft) durchgeführt. Messwerte sind, falls nicht anders angegeben, als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) dargestellt. Für alle Daten mit  $n \geq 4$  wurde auf Normalverteilung nach Kolmogorow – Smirnov getestet. Bei normalverteilten Daten wurde abschließend ein Einstichproben-*t-test* auf Signifikanz durchgeführt;  $p < 0,05$  wurde als signifikant gewertet. Bei nicht normalverteilten Daten wurde mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test die Signifikanz beurteilt;  $p < 0,05$  wurde als signifikant gewertet.

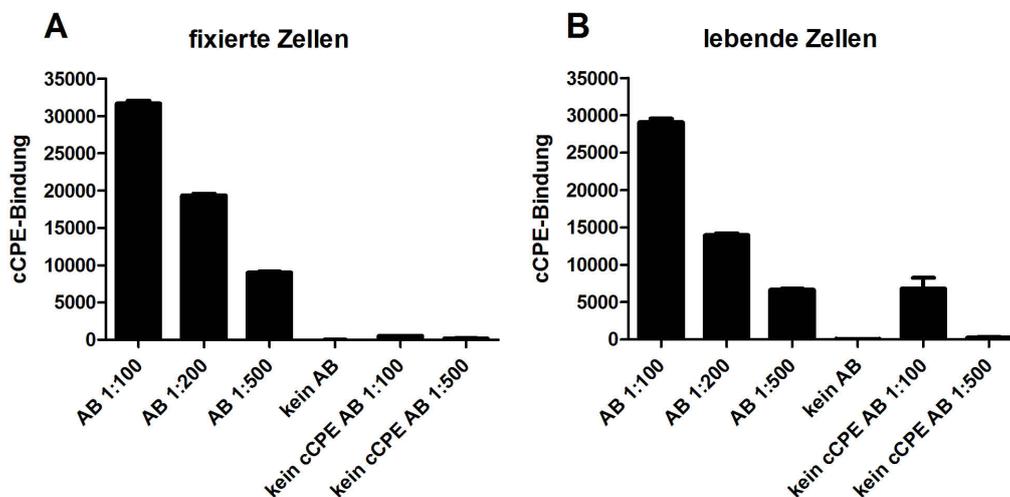
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Etablierung einer neuen Quantifizierungsmethode für den zellulären Bindungsassay

Zu Beginn der Arbeit wurde die cCPE-Claudin-Interaktion in Pulldown-Assays und zellulären Bindungsassays mit nachfolgender Quantifizierung über Western Blots gemessen. Bei beiden Methoden besteht eine starke Limitierung der gleichzeitig durchführbaren Messung von verschiedenen Konstrukten. Daher wurde nach einer weiteren Quantifizierungsmethode gesucht, die die gleichzeitige Messung einer größeren Anzahl unterschiedlicher Konstrukte ermöglicht.

#### 3.1.1 Bestimmung der Antikörperverdünnung

Zur Bestimmung der zur Interaktionsmessung von Claudinen und GST-cCPE verwendbaren Phycoerythrin-anti-GST-Antikörper-Verdünnung wurden stabile Cld3-EYFP exprimierende HEK293-Zellen wie unter 2.4.7 beschrieben ausgesät. Abweichend von 2.4.7.2 erfolgte eine Inkubation mit 1  $\mu\text{g}$  GST-cCPE<sub>wt</sub>, und es wurden unterschiedliche Antikörperverdünnungen eingesetzt. Zusätzlich wurde getestet, ob die Quantifizierung der cCPE-Claudin-Interaktion mit dem Mikroplattenleser *Safire* (Tecan Switzerland AG) auch bei lebenden Zellen möglich ist. Für alle getesteten AB-Verdünnungen konnten sowohl bei fixierten HEK293-Zellen als auch bei lebenden HEK293-Zellen, die mit cCPE inkubiert wurden, stärkere Signale als für den Hintergrund (HEK293-Zellen ohne cCPE) gemessen werden (Abb. 3.1).

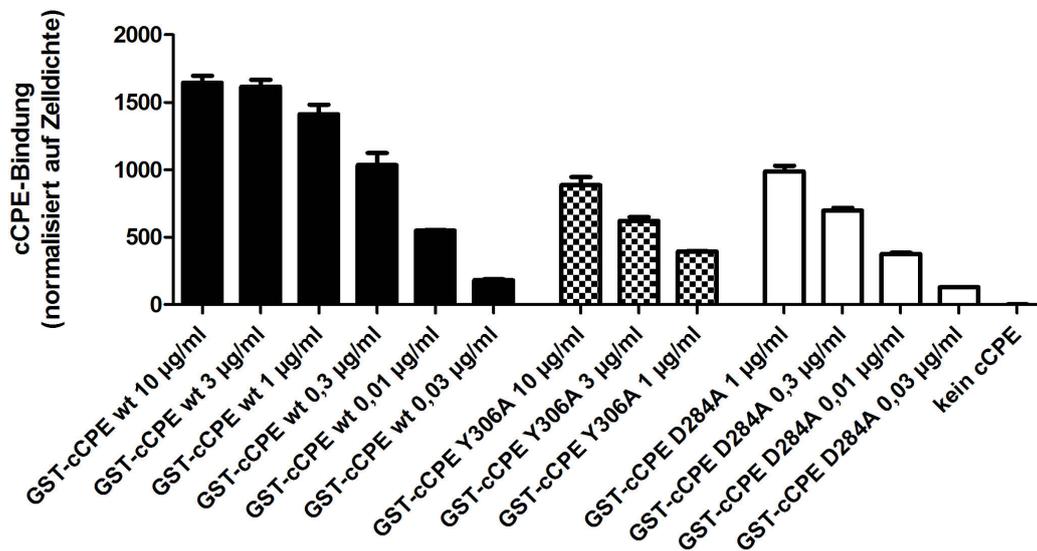


**Abb. 3.1: Abhängigkeit des gemessenen Signals (Anregungswellenlänge 545 nm) von der eingesetzten Antikörperverdünnung.** Quantifizierung von fixierten (A) und lebenden (B) HEK293-Zellen.  $n = 3$ , dargestellte Ergebnisse sind der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

Im Verhältnis zum Hintergrund lag das Signal bei fixierten HEK293-Zellen bei  $60 \pm 2$  (AB 1:100) bzw. bei  $45 \pm 2$  (AB 1:500). Bei lebenden HEK293-Zellen betrug es  $4 \pm 1$  (AB 1:100) bzw.  $29 \pm 9$  (AB 1:500). Zusätzlich wurde die optimale Anregungswellenlänge für Phycoerythrin bestimmt, da Phycoerythrin zwei Anregungsmaxima besitzt. Bei einer Anregungswellenlänge von 545 nm ergab sich im Schnitt ein  $2,30 \pm 0,02$ -fach höheres Signal als bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm bei vergleichbaren Signal-zu-Hintergrund-Verhältnissen. Somit sind Verdünnungen des Antikörpers zwischen 1:100 und 1:500 in PBS problemlos verwendbar.

### 3.1.2 Auch mit der neuen Quantifizierungsmethode zeigt sich eine klare Konzentrationsabhängigkeit der GST-cCPE-Bindung an Claudine

Der zelluläre Bindungsassay wurde, wie unter 2.4.7.2 beschrieben, mit stabil Cld3-EYFP exprimierenden HEK293-Zellen durchgeführt, jedoch wurden unterschiedliche Konzentrationen von GST-cCPE<sub>wt</sub>, GST-cCPE<sub>D284A</sub> und GST-cCPE<sub>Y306A</sub> eingesetzt. Wie Abb. 3.2 zeigt, ergibt sich für alle getesteten GST-cCPE-Konstrukte eine Abhängigkeit des im Mikroplattenleser gemessenen Signals von der im zellulären Bindungsassay eingesetzten cCPE-Konzentration.

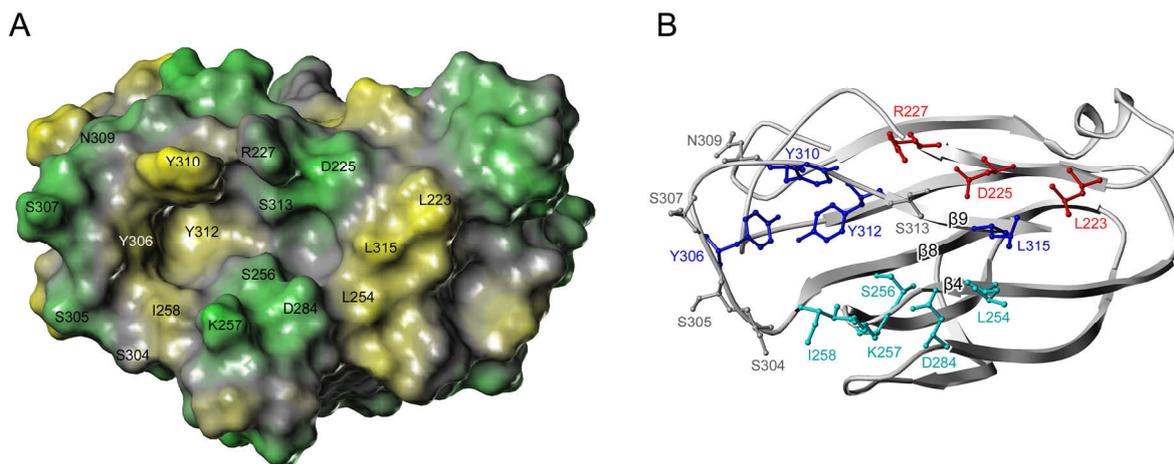


**Abb. 3.2: Abhängigkeit des gemessenen Signals von der eingesetzten cCPE-Konzentration im zellulären Bindungsassay.** n = 3, dargestellte Ergebnisse sind der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

## 3.2 Interaktion von cCPE mit Claudin-3 und Claudin-4

### 3.2.1 *In-silico*-Analyse der cCPE-Kristallstruktur: Identifizierung einer putativen Claudin-Bindungstasche

Eine genaue Inspektion der Kristallstruktur von cCPE ergab eine Tasche mit zwei Vertiefungen. Diese ist von Aminosäureresten umgeben, die als wichtig für die cCPE-Cld4-Interaktion beschrieben wurden (1.4.3). Der obere Rand der potentiellen Bindungstasche wird von L<sub>223</sub>, D<sub>225</sub>, R<sub>227</sub> und S<sub>313</sub> gesäumt, den unteren Rand formen L<sub>254</sub>, S<sub>256</sub>, K<sub>257</sub>, I<sub>258</sub> und D<sub>284</sub>. Die zwei Vertiefungen in der potentiellen Bindungstasche zeigten einen deutlichen Unterschied im kalkulierten hydrophoben Potential (Abb. 3.3). Eine ist tiefer und stärker hydrophob und wird von Y<sub>306</sub>, Y<sub>310</sub> und Y<sub>312</sub> (Tripel-Tyr-Tasche, gelb Abb. 3.3 A) gebildet. Die andere Vertiefung hingegen wird aus einem  $\beta$ -Faltblatt zwischen  $\beta$ 4 und  $\beta$ 9 gebildet, ist flacher und unpolare und wird von L<sub>223</sub>, L<sub>254</sub> und L<sub>315</sub> (Tripel-Leu-Tasche, grau Abb. 3.3 A) begrenzt.



**Abb. 3.3: Kristallstruktur von cCPE (2QUO) mit putativer Claudin-Bindungstasche.** (A) Das hydrophobe Potential – berechnet für die Oberfläche – zeigt polare (grün), unpolare (grau) und hydrophobe Bereiche (gelb). (B) Cartoondarstellung von cCPE (weiß). Hervorgehoben sind die die putative Bindungstasche umgebenden Aminosäuren (Kugel-Stab-Darstellung), Aminosäuren des „oberen Randes“ (rot) und des „unteren Randes“ (türkis) der putativen Bindungstasche. Blau: Reste, bei denen durch Substitution zu anderen Aminosäuren (meist Alanin) eine Inhibierung der Cld4-Bindung beschrieben wurde.

Basierend auf dieser Analyse wurden gezielt Aminosäuren am Rand der Bindungstasche ausgewählt. Durch ortsgerichtete Mutagenese (2.2.4.1) wurden die in Tab. 3.1 angegebenen GST-cCPE-Konstrukte erstellt und mittels GST-Affinitätschromatographie (2.3.1) aufgereinigt, um im Folgenden die Bindung bzw. den Effekt auf die Bindung an Cld3 und Cld4 zu untersuchen.

**Tab. 3.1:** Aufstellung der GST-cCPE-Konstrukte für Bindungsstudien mit Cld3 und Cld4

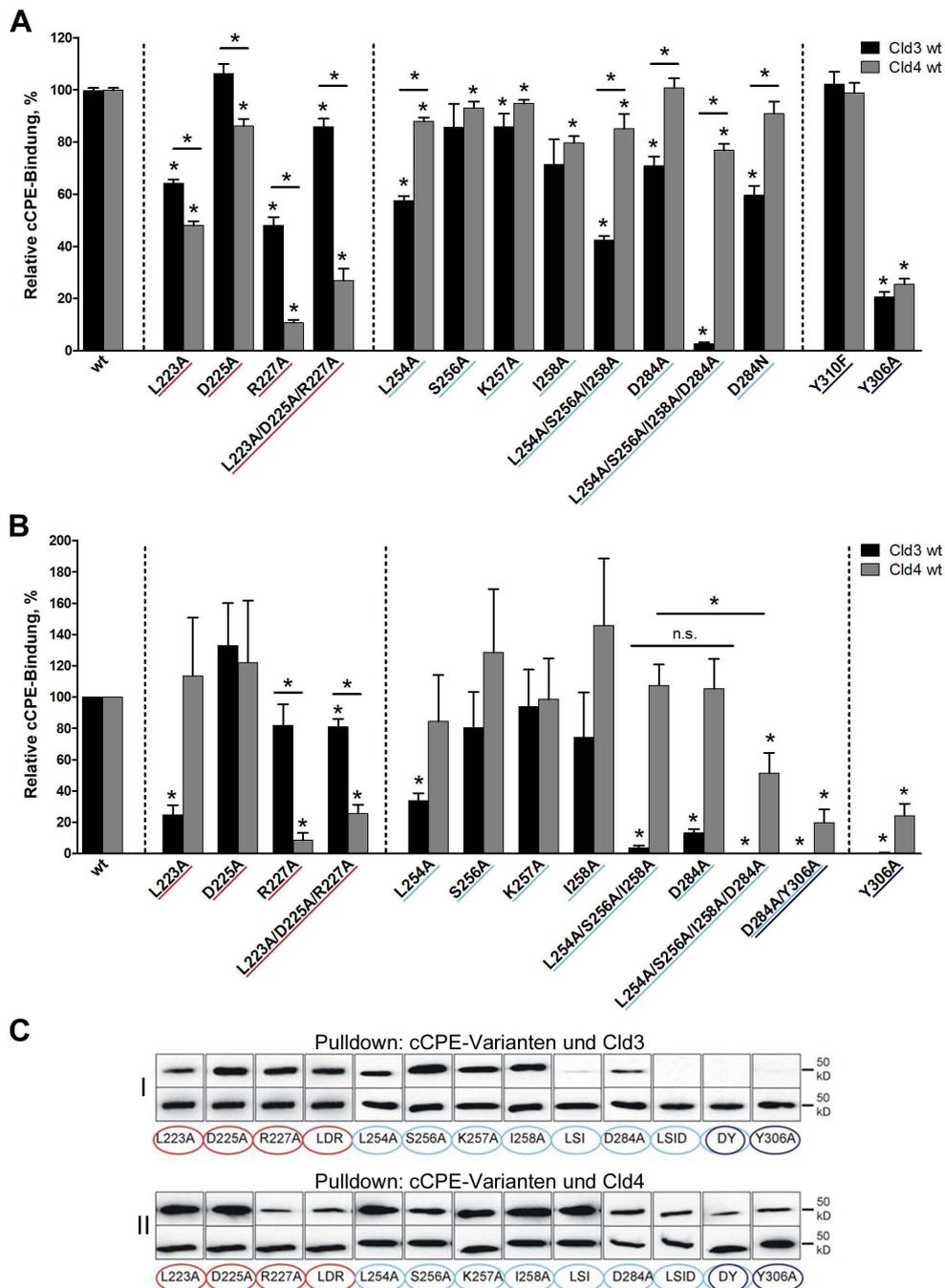
Lage der Mutation	Konstrukt
Wildtyp	GST-cCPE <sub>wt</sub>
Oberer Rand der Cld-Bindungstasche (rot in Abb. 3.3)	GST-cCPE <sub>L223A</sub>
	GST-cCPE <sub>D225A</sub>
	GST-cCPE <sub>R227A</sub>
	GST-cCPE <sub>L223A/D225A/R227A</sub>
Unterer Rand der Cld-Bindungstasche (cyan in Abb. 3.3)	GST-cCPE <sub>L254A</sub>
	GST-cCPE <sub>S256A</sub>
	GST-cCPE <sub>K257A</sub>
	GST-cCPE <sub>I258A</sub>
	GST-cCPE <sub>L254A/S256A/I258A</sub>
	GST-cCPE <sub>D284A</sub>
	GST-cCPE <sub>D284N</sub>
	GST-cCPE <sub>L254A/S256A/I258A/D284A</sub>
	GST-cCPE <sub>L254A/D284A</sub>
	GST-cCPE <sub>D284A/Y306A</sub>
Veränderung an der Tripel-Tyr-Tasche (blau in Abb. 3.3)	GST-cCPE <sub>Y306A</sub>
	GST-cCPE <sub>Y310F</sub>

### 3.2.2 cCPE zeigt Unterschiede im Bindungsverhalten an Cld3 und Cld4

Um herauszufinden, ob die putative Claudin-Bindungstasche tatsächlich in die Bindung von cCPE an Claudine involviert ist, wurden zelluläre Bindungsassays mit stabil Cld3<sub>wt</sub>-EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) und EGFP-Cld4<sub>wt</sub> (*enhanced green fluorescent protein*) exprimierenden HEK293-Zelllinien, sowie Pulldown-Assays mit Lysaten dieser HEK293-Zelllinien, mit den in Tab. 3.1 gezeigten GST-cCPE-Konstrukten durchgeführt. Da für die Substitution Y306A in cCPE ein deutlich inhibierender Effekt auf die Bindung an Cld4 beschrieben wurde (Ebihara *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2008), wurde GST-cCPE<sub>Y306A</sub> als Kontrolle verwendet. Das Bindungsverhalten der unterschiedlichen GST-cCPE-Konstrukte im Vergleich zur Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> an Cld3<sub>wt</sub> und Cld4<sub>wt</sub> wird in Abb. 3.4 dargestellt.

Zunächst wurde der Effekt von Substitutionen des oberen Rands der Bindungstasche (rot, Abb. 3.3 B) von cCPE auf die Bindung an Cld3 in zellulärer Bindungsassays getestet. Die Substitution L223A senkte die Bindung von cCPE deutlich, wohingegen die Substitution D225A keinen Effekt hatte. Den stärksten inhibierenden Effekt auf die Bindung an Cld3<sub>wt</sub> zeigte die Substitution R227A. Auch die Kombination der Substitutionen L223A/D225A/R227A in cCPE<sub>L223A/D225A/R227A</sub> senkte die Bindung an Cld3<sub>wt</sub>, allerdings zeigte

sich kein additiver Effekt, sondern die Bindung an Cld3<sub>wt</sub> war deutlich stärker als die Bindung der Einzelsubstitutionen L223A und R227A.



**Abb. 3.4: Die Bindung von cCPE an Cld3 und Cld4 wird von Aminosäuresubstitutionen in cCPE unterschiedlich beeinflusst. (A)** Quantifizierung von zellulären Bindungsassays. Stabil Cld3<sub>wt</sub>-EYFP oder EGFP-Cld4<sub>wt</sub> exprimierende HEK293-Zellen wurden mit 0,5 µg/ml GST-cCPE<sub>wt</sub> oder anderen GST-cCPE-Varianten inkubiert. Gebundenes GST-cCPE wurde mittels Phycoerythrin-gekoppeltem α-GST-Antikörper im Mikroplattenleser gemessen und auf EGFP (Cld4) bzw. EYFP (Cld3) normalisiert (Phycoerythrin-/ EYFP- bzw. EGFP-Signal). Gezeigt ist die Bindung der GST-cCPE-Varianten, normalisiert auf die jeweilige GST-cCPE<sub>wt</sub>-Cld<sub>wt</sub> Bindung (Relative cCPE-Bindung, %). **(B)** Quantifizierung von Pull-down-Assays, bei denen Lysate von stabil Cld3<sub>wt</sub>-EYFP oder EGFP-Cld4<sub>wt</sub> exprimierenden HEK293-Zellen eingesetzt wurden, um die Bindung an immobilisierte GST-cCPE-Varianten zu messen. **(C)** Exemplarische Western Blots für Cld3<sub>wt</sub> (I) und Cld4<sub>wt</sub> (II). Jeweilige obere Reihe: an GST-cCPE-Variante gebundenes Cld<sub>wt</sub>, untere Reihe: an GST-cCPE<sub>wt</sub> gebundenes Cld<sub>wt</sub> (interner Standard).

Bei Cld4<sub>wt</sub> zeigte sich ein ähnliches Bild, wobei hier die durch Substitutionen in cCPE verursachte Abnahme der Bindung generell stärker war. Auch bei Cld4<sub>wt</sub> zeigte die Kombination der Substitutionen von L223A/D225A/R227A in cCPE keinen additiven Effekt auf die Bindung, allerdings war diese hier nur leicht stärker als die Bindung von cCPE<sub>R227A</sub> an Cld4<sub>wt</sub>.

Der Effekt von Substitutionen am unteren Rand der Bindungstasche von cCPE (türkis, Abb. 3.3 B) auf die Bindung an Cld3<sub>wt</sub> wurde ebenso untersucht. Die Substitution L254A in cCPE senkte die Bindung an Cld3<sub>wt</sub> deutlich, wohingegen die Substitution S256A keinen Effekt hatte. Die Substitution K257A verursachte eine schwache aber signifikante Abnahme der Bindung von cCPE an Cld3<sub>wt</sub>, wohingegen Substitution I258A keine signifikante Abnahme zeigte.

Die Kombination der Substitutionen L254A/S256A/I258A hingegen führte zu einer deutlichen Senkung der Bindung an Cld3<sub>wt</sub>. Die Substitution D284A alleine zeigte eine geringe Abnahme der Bindung, in der Kombination der Substitutionen L254A/S256A/I258A/D284A zeigte sich allerdings die deutlichste Bindungsabnahme aller getesteten GST-cCPE-Varianten mit nur  $2,6 \pm 0,6$  % der Bindung von cCPE<sub>wt</sub> and Cld3<sub>wt</sub>. Der Austausch des geladenen D<sub>284</sub> zu einem polaren Asparagin in cCPE<sub>D284N</sub> hatte interessanterweise einen stärker negativen Effekt auf die Bindung an Cld3<sub>wt</sub> als die Substitution D284A.

Im Gegensatz zu den Effekten der Substitutionen des oberen Rands der Bindungstasche zeigten Substitutionen des unteren Rands schwächere Effekte auf die Bindung an Cld4<sub>wt</sub> als auf die Bindung an Cld3<sub>wt</sub>. Die Substitutionen L254A und I258A in cCPE führten zu einer leichten Abnahme der Bindung an Cld4<sub>wt</sub>. Die Substitutionen S256A, K257A und D284A hingegen zeigten eine nahezu cCPE<sub>wt</sub>-ähnliche Bindung (> 90 %), und auch der Austausch des geladenen D<sub>284</sub> zum polaren Asparagin hatte nur eine sehr geringe Auswirkung auf die Bindung an Cld4<sub>wt</sub>.

Die Kombinationen L254A/S256A/I258A und L254A/S256A/I258A/D284A zeigten ebenfalls nur eine schwache Abnahme der Bindung an Cld4<sub>wt</sub>, wobei L254A/S256A/I258A/D284A eine etwas schwächere Bindung als L254A/S256A/I258A zeigte.

Die Wegnahme der funktionellen Hydroxylgruppe von Y<sub>310</sub> in cCPE durch Substitution zu Phenylalanin hatte sowohl auf die Bindung an Cld3<sub>wt</sub> als auch an Cld4<sub>wt</sub> keinen signifikanten Effekt im Vergleich zur Bindung von cCPE<sub>wt</sub> an das jeweilige Claudin. Wie erwartet, bewirkte die Substitution Y306A einen deutlichen negativen Effekt auf die Bindung von cCPE an Cld3<sub>wt</sub> und Cld4<sub>wt</sub>.

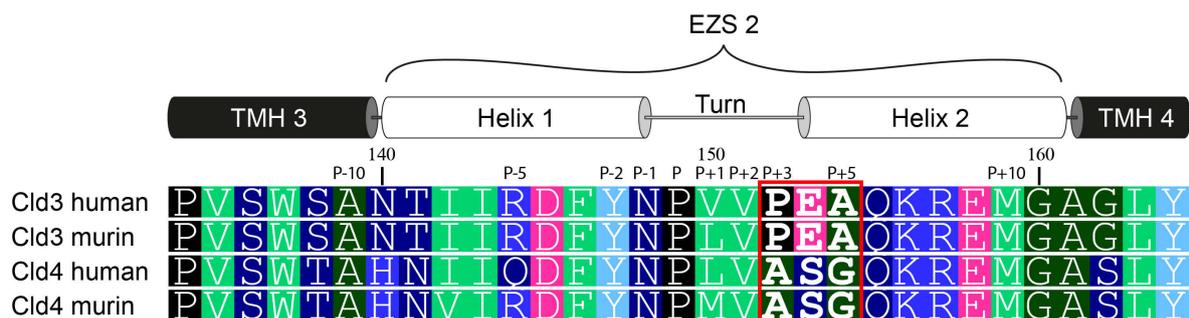
Die Daten lassen sich wie folgt zusammenfassen: Substitutionen am oberen Rand der Claudin-Bindungstasche haben einen stark negativen Einfluss auf die Bindung an Cld4<sub>wt</sub> und einen vergleichsweise schwachen Einfluss auf die Bindung an Cld3<sub>wt</sub>, wohingegen Substi-

tutionen am unteren Rand der Bindungstasche einen deutlich stärkeren negativen Einfluss auf die Bindung an Cld3<sub>wt</sub> haben als auf die Bindung an Cld4<sub>wt</sub>. Dies sieht man am deutlichsten anhand der Bindungswerte der jeweiligen dreifachen bzw. vierfachen Substitutionen in cCPE<sub>L223A/D225A/R227A</sub> (oberer Rand der Bindungstasche; 85,8 ± 3,1 % Bindung an Cld3<sub>wt</sub>; 26,9 ± 4,5 % Bindung an Cld4<sub>wt</sub>) und cCPE<sub>L254A/S256A/I258A</sub> (unterer Rand; 42,3 ± 1,6 % Bindung an Cld3<sub>wt</sub>; 85,1 ± 5,6 % Bindung an Cld4<sub>wt</sub>) bzw. cCPE<sub>L254A/S256A/I258A/D284A</sub> (2,6 ± 0,6 % Bindung an Cld3<sub>wt</sub>; 76,7 ± 2,6 % Bindung an Cld4<sub>wt</sub>).

Die Ergebnisse der, von Anna Piontek durchgeführten, Pulldown-Assays bestätigten zum größten Teil die Ergebnisse der zellulären Bindungsassays (Abb. 3.4 B & C), wobei Effekte auf die Bindung seltener eine Signifikanz erreichten. Interessanterweise zeigte die Substitution L223A in cCPE in Pulldown-Assays einen umgekehrten Effekt auf die Bindung an Cld3<sub>wt</sub> und Cld4<sub>wt</sub> als in den zellulären Bindungsassays.

### 3.2.3 Sequenzunterschiede in der EZS2 von Cld3 und Cld4 haben einen Einfluss auf die Bindung von cCPE

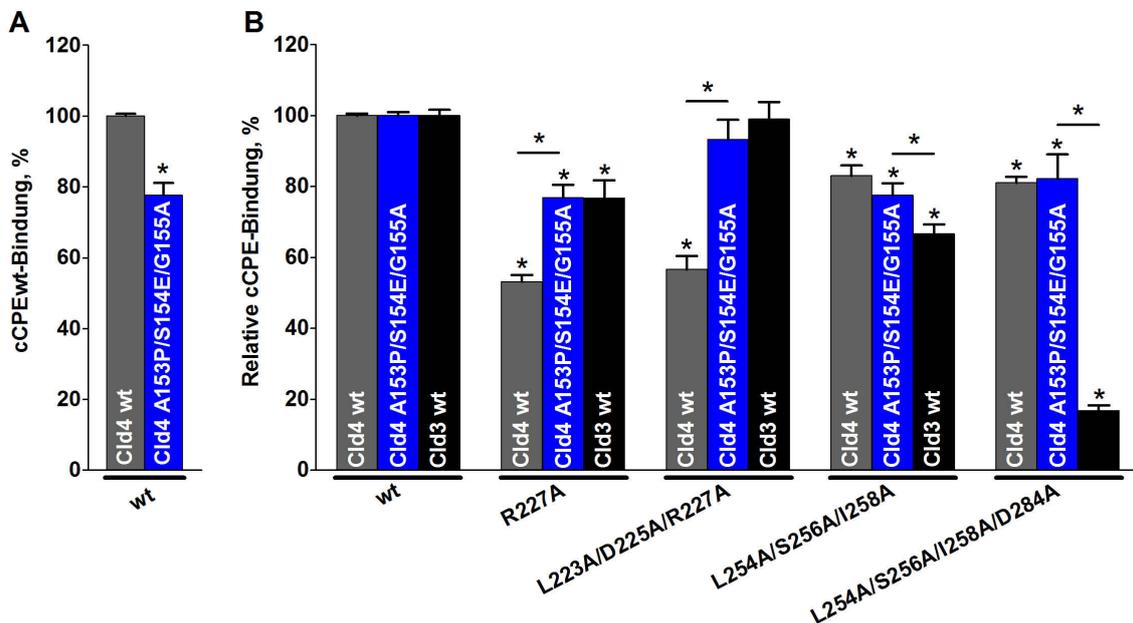
Da cCPE unterschiedliches Bindungsverhalten an Cld3<sub>wt</sub> und Cld4<sub>wt</sub> in zellulären Bindungsassays und Pulldown-Assays zeigte, wurde versucht, die Ursache hierfür zu finden. Beim Vergleich der Sequenzen der EZS2 von humanem und murinem Cld3<sub>wt</sub> und Cld4<sub>wt</sub> fiel auf, dass sie deutliche Sequenzunterschiede im Übergangsbereich des Turns zur zweiten Helix des vorhergesagten Helix-Turn-Helix-Motivs besitzen (Abb. 3.5; roter Kasten). Die Sequenz von Cld3 lautet <sub>152</sub>PEA<sub>154</sub>, wohingegen <sub>153</sub>ASG<sub>155</sub> die korrespondierende Sequenz von Cld4 ist.



**Abb. 3.5: Sequenzalignment der EZS2 von humanem und murinem Cld3 und Cld4 mit schematischer Darstellung der EZS2.** Erkennbar sind starke Sequenzunterschiede im Bereich des N-terminalen Helix-Cap von Helix 2 (roter Kasten). Grün: große hydrophobe, dunkelgrün: kleine hydrophobe, dunkelblau: polar ungeladene, blau: basische und magenta: saure Aminosäuren, türkis: Tyr, schwarz: Pro und orange: Cys. Nummerierungen: obere Reihe: Sequenznummerierung nach Cld3, untere Reihe: relative Positionsnummerierung nach dem hoch konservierten Prolin (P<sub>149</sub> in Cld3).

Um den Einfluss dieses Sequenzbereichs auf die Bindung von cCPE zu analysieren, wurde diese Sequenz in Cld4 (<sub>153</sub>ASG<sub>155</sub>) gegen die korrespondierende Cld3-Sequenz (PEA) per ortsgerechter Mutagenese (2.2.4.1) getauscht. Mit dem so erstellten Konstrukt

EGFP-Cld4<sub>A153P/S154E/G155A</sub> wurden HEK293-Zellen transient transfiziert (2.4.5), und die Bindung von verschiedenen GST-cCPE-Varianten an Cld4<sub>A153P/S154E/G155A</sub> im Vergleich zur Bindung an Cld4<sub>wt</sub> und Cld3<sub>wt</sub> mittels zellulären Bindungsassays analysiert (Abb. 3.6).



**Abb. 3.6: Die Cld3-ähnliche Mutante Cld4<sub>A153P/S154E/G155A</sub> zeigt eine stärkere Bindung von GST-cCPE<sub>R227A</sub> und GST-cCPE<sub>L223A/D225A/R227A</sub> als Cld4<sub>wt</sub>.** Transient transfizierte HEK293-Zellen, die Cld4<sub>wt</sub> (grau) bzw. Cld4<sub>A153P/S154E/G155A</sub> (blau) als EGFP-Fusionsproteine oder Cld3<sub>wt</sub> (schwarz) als EYFP-Fusionsprotein exprimierten, wurden mit 0,5 µg/ml GST-cCPE<sub>wt</sub> oder anderen GST-cCPE-Varianten inkubiert. Gebundenes GST-cCPE wurde mittels Phycoerythrin-gekoppeltem α-GST-Antikörper im Mikroplattenleser gemessen und auf EGFP (Cld4) bzw. EYFP (Cld3) normalisiert. (A) Bindung von GST-cCPE an Cld4<sub>wt</sub> oder Cld4<sub>A153P/S154E/G155A</sub>, normalisiert auf die Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> an Cld4<sub>wt</sub> (cCPE<sub>wt</sub>-Bindung, %). (B) Bindung der unterschiedlichen GST-cCPE-Varianten an Cld4<sub>wt</sub>, Cld4<sub>A153P/S154E/G155A</sub> oder Cld3<sub>wt</sub>, normalisiert auf die Bindung von cCPE<sub>wt</sub> an das jeweilige Cld-Konstrukt (Relative cCPE-Bindung, %).

cCPE<sub>wt</sub> zeigte eine schlechtere Bindung an Cld4<sub>A153P/S154E/G155A</sub> ( $77,7 \pm 3,4$  %) im Vergleich zu Cld4<sub>wt</sub> (Abb. 3.6 A).

Im Vergleich zur Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> an das jeweilige Cld-Konstrukt (Abb. 3.6 B) zeigte sich, dass cCPE<sub>R227A</sub> schlechter an Cld4<sub>wt</sub> bindet als an Cld4<sub>A153P/S154E/G155A</sub> oder Cld3<sub>wt</sub>. Dasselbe Bild zeigte sich für cCPE<sub>L223A/D225A/R227A</sub>, allerdings mit einer deutlich schwächeren relativen Bindung an Cld4<sub>wt</sub> als an Cld4<sub>A153P/S154E/G155A</sub> oder an Cld3<sub>wt</sub>. Interessanterweise war die relative Bindung dieser beiden cCPE-Konstrukte (cCPE<sub>R227A</sub> & cCPE<sub>L223A/D225A/R227A</sub>) an Cld4<sub>A153P/S154E/G155A</sub> der relativen Bindung an Cld3<sub>wt</sub> ähnlich und signifikant stärker als die relative Bindung an Cld4<sub>wt</sub>.

Die relative Bindung von cCPE<sub>L254A/S256A/I258A</sub> an Cld4<sub>wt</sub> hingegen war vergleichbar mit der Bindung an Cld4<sub>A153P/S154E/G155A</sub> und stärker als die Bindung an Cld3<sub>wt</sub>. cCPE<sub>L254A/S256A/I258A/D284A</sub> zeigte ebenfalls eine vergleichbare relative Bindung an Cld4<sub>wt</sub> und an Cld4<sub>A153P/S154E/G155A</sub>, allerdings eine deutlich schwächere Bindung an Cld3<sub>wt</sub>. Hier verhielt sich die relative Bindung der beiden cCPE-Varianten (cCPE<sub>L254A/S256A/I258A</sub> und

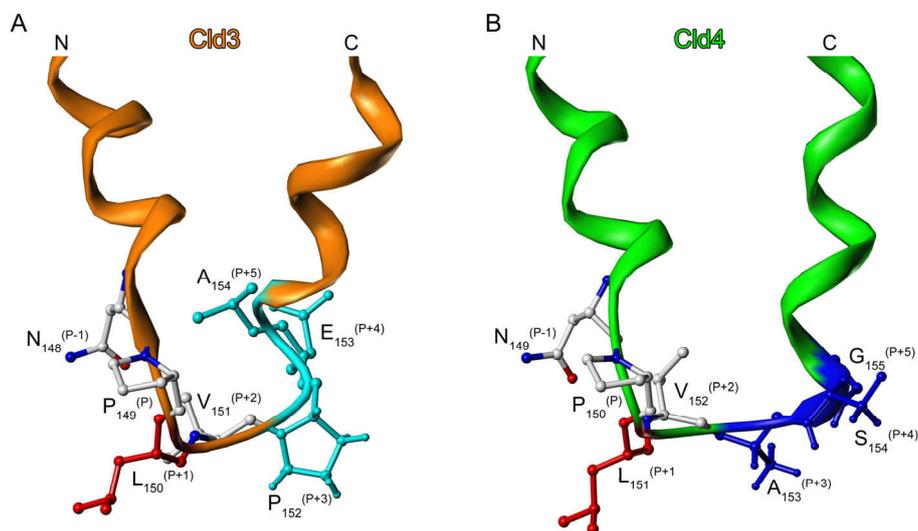
cCPE<sub>L254A/S256A/I258A/D284A</sub>) an Cld4<sub>A153P/S154E/G155A</sub> eher ähnlich zur Bindung an Cld4<sub>wt</sub> und zeigten einen signifikanten Unterschied zur Bindung an Cld3<sub>wt</sub>.

### 3.2.4 Erstellung der Homologiemodelle der EZS2 von Cld3 und Cld4

Basierend auf dem publizierten Homologiemodell für die EZS2 von Cld5 (Piontek *et al.*, 2008) wurden Modelle für die EZS2 von Cld3 und Cld4 erstellt (2.5.2.1).

Aufgrund der Unterschiede im Bindungsverhalten von cCPE an Cld3<sub>wt</sub> und Cld4<sub>wt</sub>, die von der unterschiedlichen Sequenz –<sub>152</sub>PEA<sub>154</sub> (Cld3) und <sub>153</sub>ASG<sub>155</sub> (Cld4) – im N-terminalen Helix-Cap der zweiten Helix der EZS2 verursacht werden (vgl. 3.2.3), wurde eine weitere extensive Template-Suche durchgeführt. Hierzu wurden mittels FASTA Sequenzhomologiesuchen in der PDB-Datenbank (<http://www.rcsb.org/pdb/>; Berman *et al.*, 2000) durchgeführt. Für die EZS2 von Cld3 wurde ein Template für das N-terminale Helix-Cap gefunden. Ein N-terminales Helix-Cap aus der Kristallstruktur des Photosystem II aus *Thermosynechococcus elongatus* (PDB ID: 1W5C; Biesiadka *et al.*, 2004) besaß die exakte Sequenz des N-terminalen Helix-Cap der zweiten Helix der EZS2 von murinem Cld3 und wurde in das bestehende Modell der EZS2 von Cld3 eingefügt.

Da für die EZS2 von Cld4 kein besseres Template identifiziert werden konnte, wurde das Modell nicht weiter modifiziert. Die Homologiemodelle der EZS2 von Cld3 und Cld4 sind in Abb. 3.7 dargestellt.

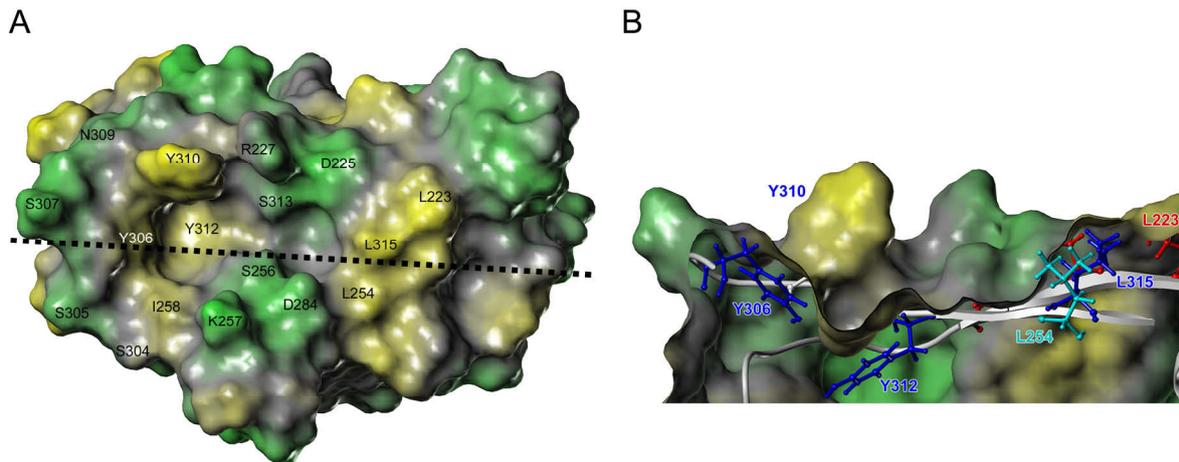


**Abb. 3.7: Homologiemodelle der EZS2 von (A) Cld3 und (B) Cld4.** EZS2 zeigt als Cartoon mit detaillierter Darstellung der Aminosäuren der Turn-Region (Kugel-Stab-Darstellung). Hervorgehoben sind das den Turn N-terminal begrenzende L<sub>150</sub>/L<sub>151</sub><sup>(P+1)</sup> (rot) und die unterschiedliche N-terminale Helix-Cap-Konformation der C-terminalen Helix von Cld3 (türkis; basiert auf PDB ID: 1W5C, Biesiadka *et al.*, 2004) und Cld4 (blau; PDB ID: 2BDV, Forouhar *et al.*, 2005).

Das Einfügen des Helix-Caps aus PDB ID: 1W5C in das Homologiemodell der EZS2 von Cld3 (Abb. 3.7, türkis) führte zu unterschiedlichem Abknicken der zweiten Helix der EZS2 von Cld3 im Vergleich zu Cld4 (Abb. 3.7, blau).

### 3.2.5 Orientierung der EZS2 von Cld3 und Cld4 in der Claudin-Bindungstasche von cCPE

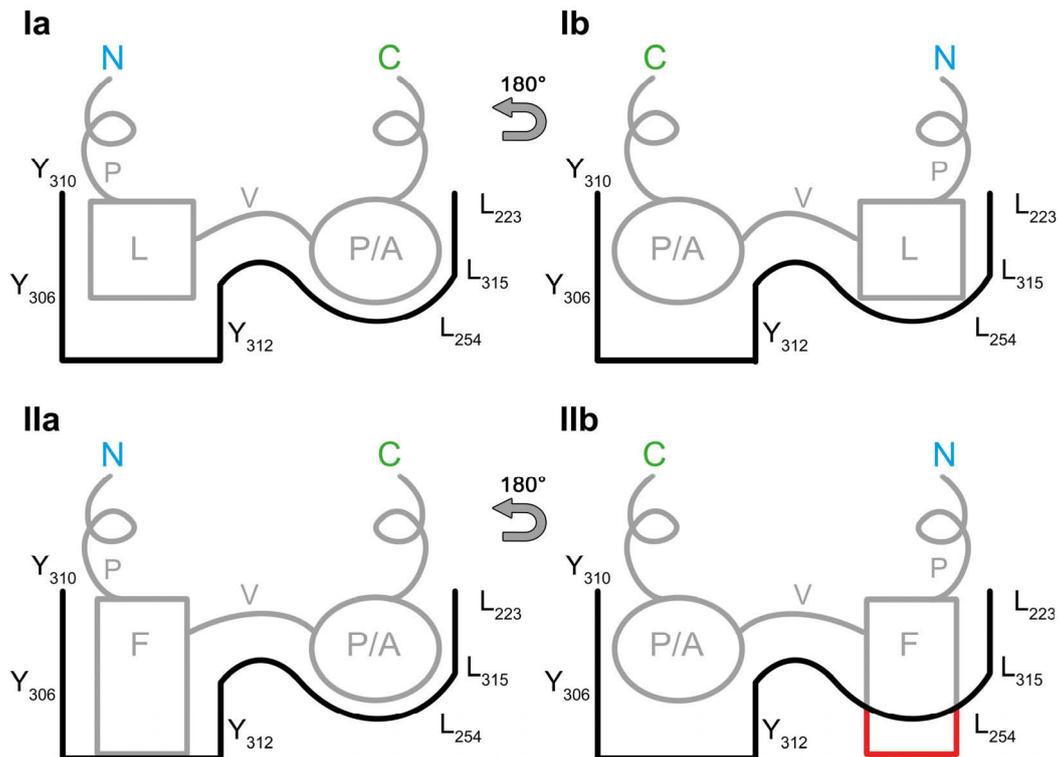
Mit den Homologiemodellen der EZS2 von Cld3<sub>wt</sub> und Cld4<sub>wt</sub> wurden nun manuelle Dockings der EZS2 in die Bindungstasche von cCPE durchgeführt (2.5.5). Hierbei stellte sich heraus, dass das den Turn begrenzende L<sub>150</sub><sup>(P+1)</sup> von Cld3 oder das korrespondierende L<sub>151</sub><sup>(P+1)</sup> von Cld4 sowohl in die tiefere Tripel-Tyr-Tasche als auch in die flache Tripel-Leu-Tasche von cCPE passen könnte (Abb. 3.8 B & Abb. 3.9 Ia & Ib).



**Abb. 3.8: Kristallstruktur von cCPE (2QUO) mit Claudin-Bindungstasche.** (A) Das hydrophobe Potential, berechnet für die Oberfläche, zeigt polare (grün), unpolare (grau) und hydrophobe Bereiche (gelb). Gestrichelte Linie: Schnittebene. (B) Schnitt durch die Claudin-Bindungstasche von cCPE (Oberfläche mit hydrophobem Potential, Backbone als Cartoon: weiß), mit den taschenformenden Aminosäuren in Kugel-Stab-Darstellung (blau: als wichtig für Cld4-Bindung beschrieben; rot: „oberer Rand“ der Bindungstasche; türkis: „unterer Rand“ der Bindungstasche).

Eine nähere Betrachtung der Cld-Bindungstasche zeigte, dass der Boden der Tripel-Tyr-Tasche hauptsächlich von den Seitenketten von Y<sub>306</sub> und Y<sub>312</sub> gebildet wird, und dass das Backbone von cCPE hier eine Loop-Struktur besitzt. Der Boden der Tripel-Leu-Tasche hingegen wird direkt von einem  $\beta$ -Faltblatt, gebildet von  $\beta$ 4 und  $\beta$ 9, geformt (Abb. 3.8 B). Daraus lässt sich schließen, dass die Tripel-Tyr-Tasche flexibler ist als die Tripel-Leu-Tasche und eher eine größere hydrophobe Aminosäure aufnehmen könnte.

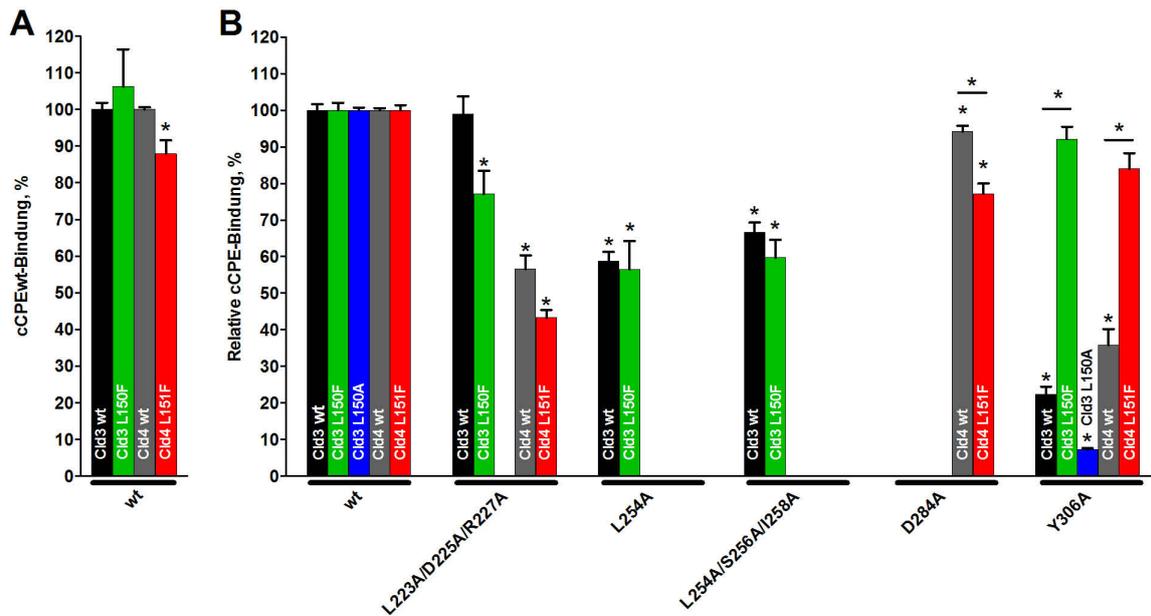
Aufgrund der Eigenschaften der Cld-Bindungstasche von cCPE wurde die folgende Hypothese aufgestellt: Wenn das den Turn begrenzende L<sub>150/151</sub><sup>(P+1)</sup> von Cld3/4 gegen ein größeres Phenylalanin ausgetauscht wird, kann dieses F<sup>(P+1)</sup> nur in die Tripel-Tyr-Tasche passen (Abb. 3.9 Ia & Ib). Bindet cCPE an dieses Cld-Konstrukt, müsste eine Orientierung der EZS2 entsprechend Abb. 3.9 Ia & IIa vorliegen.



**Abb. 3.9: Schematische Darstellung der Claudin-Bindungstasche von cCPE (schwarz) mit den unterschiedlichen Orientierungsmöglichkeiten der EZS2 von Cld3 oder Cld 4 (grau).** Wie in Ia und Ib gezeigt, passen die die Turn-Region begrenzenden Aminosäuren L<sub>150/151</sub><sup>(P+1)</sup> (L) und P<sub>152/A153</sub><sup>(P+3)</sup> (P/A) von Cld3 oder Cld4 sowohl in die tiefere, von Y<sub>306</sub>, Y<sub>310</sub> und Y<sub>312</sub> gebildete, als auch in die flachere, von L<sub>223</sub>, L<sub>254</sub> und L<sub>315</sub> umgebene, Vertiefung. Bei Claudinen bei denen L<sub>150/151</sub><sup>(P+1)</sup> mit einem größeren hydrophoben F substituiert wurde, passt nur Orientierung IIa. N, C: N-/C-Terminus.

Um diese Hypothese zur Orientierung der EZS2 zu überprüfen, wurde sowohl bei Cld3 als auch bei Cld4 das den Turn begrenzende L<sup>(P+1)</sup> (Position 150 in Cld3, Position 151 in Cld4) mittels ortsgerichteter Mutagenese gegen Phenylalanin (2.2.4.1) substituiert. Mit den Konstrukten Cld3<sub>L150F</sub>-EYFP und EGFP-Cld4<sub>L151F</sub> wurden HEK293-Zellen transient transfiziert, und die Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> an Cld3<sub>L150F</sub><sup>(P+1)</sup> bzw. Cld4<sub>L151F</sub><sup>(P+1)</sup> im Vergleich zur Bindung an Cld3<sub>wt</sub> und Cld4<sub>wt</sub> wurde in zellulären Bindungsassays analysiert (Abb. 3.10 A, folgende Seite).

Wie Abb. 3.10 A zeigt, ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> an Cld3<sub>L150F</sub><sup>(P+1)</sup> (106,3 ± 10,2 %) und nur eine leichte Reduktion der Bindung an Cld4<sub>L151F</sub><sup>(P+1)</sup> (87,9 ± 3,7 %) im Vergleich zur Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> an den jeweiligen Cld<sub>wt</sub>. Es war also kein Verlust der Bindung von cCPE<sub>wt</sub> an Cld3<sub>L150F</sub><sup>(P+1)</sup> oder Cld4<sub>L151F</sub><sup>(P+1)</sup> festzustellen, und somit lag ein erster Hinweis auf eine Interaktion von cCPE mit der EZS2 in Orientierung Ia (Abb. 3.9) vor.



**Abb. 3.10: Bindung von cCPE an Cld3<sub>L150F</sub><sup>(P+1)</sup> und Cld4<sub>L151F</sub><sup>(P+1)</sup>.** Transient transfizierte HEK293-Zellen, die Cld3<sub>wt</sub> (schwarz), Cld3<sub>L150F</sub><sup>(P+1)</sup> (grün), Cld3<sub>L150A</sub><sup>(P+1)</sup> (blau), Cld4<sub>wt</sub> (grau) oder Cld4<sub>L151F</sub><sup>(P+1)</sup> (rot) als EYFP-Fusionsproteine (Cld3) bzw. EGFP-Fusionsproteine (Cld4) exprimierten, wurden mit 0,5 µg/ml GST-cCPE<sub>wt</sub> oder anderen GST-cCPE-Varianten inkubiert. Gebundenes GST-cCPE wurde mittels Phycoerythrin-gekoppeltem α-GST-Antikörper im Mikroplattenleser gemessen und auf EYFP (Cld3) bzw. EGFP (Cld4) normalisiert. **(A)** Bindung von GST-cCPE an Cld3<sub>wt</sub>, Cld3<sub>L150F</sub><sup>(P+1)</sup>, Cld4<sub>wt</sub> oder Cld4<sub>L151F</sub><sup>(P+1)</sup> normalisiert auf die Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> an Cld3<sub>wt</sub> bzw. Cld4<sub>wt</sub> (cCPEwt-Bindung, %). **(B)** Bindung der unterschiedlichen GST-cCPE-Varianten an Cld3<sub>wt</sub>, Cld3<sub>L150F</sub><sup>(P+1)</sup>, Cld4<sub>wt</sub> und Cld4<sub>L151F</sub><sup>(P+1)</sup> normalisiert auf die Bindung von cCPE<sub>wt</sub> an das jeweilige Cld-Konstrukt (Relative cCPE-Bindung, %).

Um weitere Hinweise auf die EZS2-Orientierung zu erhalten, wurde nun das Bindungsverhalten unterschiedlicher GST-cCPE-Varianten an Cld3<sub>L150F</sub><sup>(P+1)</sup> oder Cld4<sub>L151F</sub><sup>(P+1)</sup> untersucht. Hierzu wurden HEK293-Zellen transient mit Cld3<sub>L150F</sub>-EYFP oder EGFP-Cld4<sub>L151F</sub> transfiziert und die Bindung von verschiedenen GST-cCPE-Varianten an Cld3<sub>L150F</sub><sup>(P+1)</sup> bzw. Cld4<sub>L151F</sub><sup>(P+1)</sup> im Vergleich zur Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> an das jeweilige Cld-Konstrukt mittels zellulären Bindungsassays analysiert (Abb. 3.10 B).

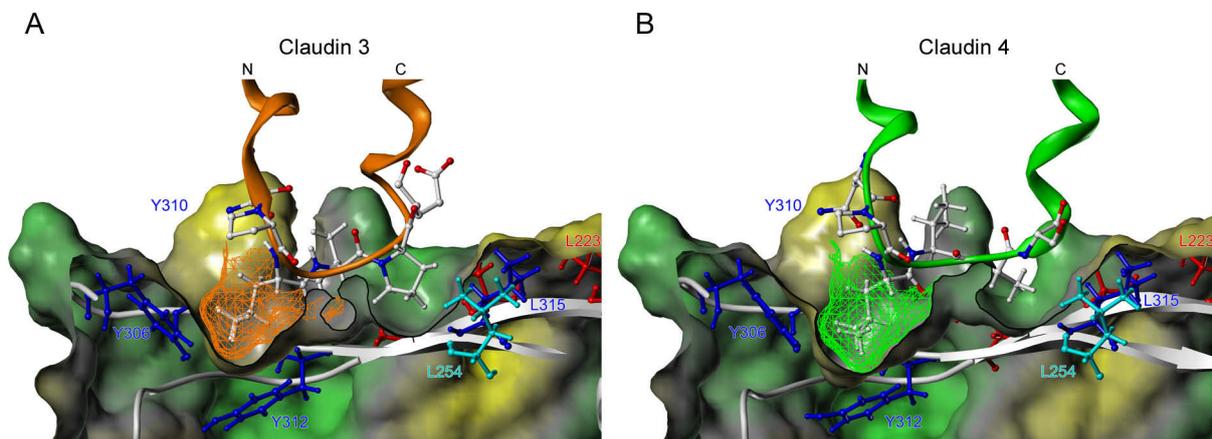
Die relative Bindung von cCPE<sub>L223A/D225A/R227A</sub> an Cld3<sub>L150F</sub><sup>(P+1)</sup> und Cld4<sub>L151F</sub><sup>(P+1)</sup> war in beiden Fällen etwas schwächer als die Bindung an den jeweiligen Cld<sub>wt</sub>. cCPE<sub>L254A</sub> und cCPE<sub>L254A/S256A/I258A</sub> zeigten keine signifikanten Unterschiede in der relativen Bindung an Cld3<sub>L150F</sub><sup>(P+1)</sup> gegenüber der Bindung an Cld3<sub>wt</sub>. Die relative Bindung von cCPE<sub>D284A</sub> an Cld4<sub>L151F</sub><sup>(P+1)</sup> war leicht schwächer als an Cld4<sub>wt</sub>. Die drei cCPE-Varianten zeigten also keine deutlich unterschiedliche Bindung an Cld3<sub>L150F</sub><sup>(P+1)</sup> bzw. Cld4<sub>L151F</sub><sup>(P+1)</sup> als an den jeweiligen Cld<sub>wt</sub>.

Ein anderes Bild zeigte sich für cCPE<sub>Y306A</sub>, eine cCPE-Variante, die bisher nur eine sehr schwache Bindung an alle getesteten Claudine aufwies. Die relative Bindung von cCPE<sub>Y306A</sub> an Cld3<sub>wt</sub> lag bei  $22,4 \pm 2,1$  %, und an Cld3<sub>L150A</sub><sup>(P+1)</sup> band es mit  $7,2 \pm 0,4$  % noch schwächer als an Cld3<sub>wt</sub>, wohingegen die relative Bindung an Cld3<sub>L150F</sub><sup>(P+1)</sup> mit  $92,1 \pm 3,4$  % fast das Level der Bindung von cCPE<sub>wt</sub> an Cld3<sub>L150F</sub><sup>(P+1)</sup> erreichte. Auch bei Cld4<sub>L151F</sub><sup>(P+1)</sup> lag die

relative Bindung mit  $83,9 \pm 4,3$  % wesentlich höher als an Cld4<sub>wt</sub> mit  $35,8 \pm 4,4$  %. Die Substitution von L<sup>(P+1)</sup> zu F in Cld3 und Cld4 führte also zu einer Wiederherstellung der Bindung des nicht bzw. nur sehr schwach bindenden cCPE<sub>Y306A</sub>.

Dies ist ein eindeutiges Anzeichen für eine Interaktion von cCPE<sub>Y306A</sub> mit der EZS2 in Orientierung IIa (Abb. 3.9), und somit ein zweiter Hinweis auf eine Interaktion der EZS2 mit der Bindungstasche von cCPE in Orientierung Ia (Abb. 3.9). Sprich: L<sup>(P+1)</sup> von Cld3 oder Cld4 interagiert mit der Tripel-Tyr-Tasche von cCPE, wohingegen P<sub>152</sub><sup>(P+3)</sup> von Cld3 und das korrespondierende A<sub>153</sub><sup>(P+3)</sup> von Cld4 in der Tripel-Leu-Tasche von cCPE zu liegen kommen.

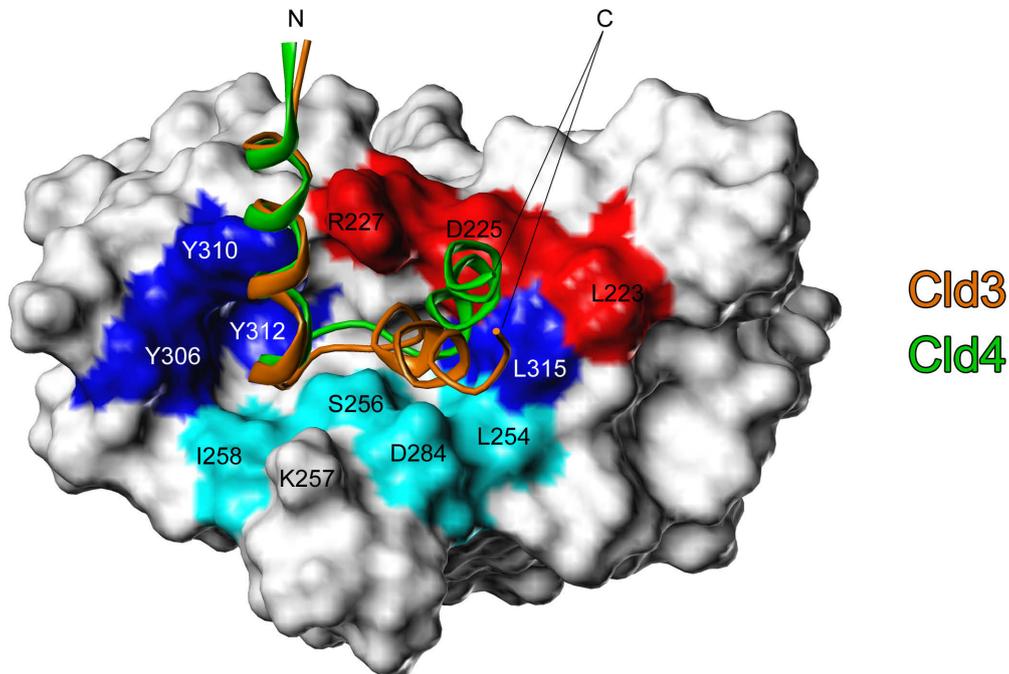
Aufgrund dieser Anhaltspunkte wurde nun ein manuelles Docking der EZS2 von Cld3 und Cld4 in Orientierung Ia (Abb. 3.9) in die Claudin-Bindungstasche von cCPE mit anschließender Energieminimierung durchgeführt, wie unter (2.5.5) beschrieben (Abb. 3.11).



**Abb. 3.11: Detailliertes Interaktionsmodell der EZS2 von Cld3 (A, orange, Cartoon) und Cld4 (B, grün, Cartoon).** cCPE<sub>wt</sub> im Querschnitt, mit den Aminosäuren der Turn-Region in Kugel-Stab-Darstellung (weiß: C und H, blau: N, rot: O), sowie der Oberfläche von L<sub>150</sub><sup>(P+1)</sup> (A, Cld3, orange, Gitternetz) bzw. L<sub>151</sub><sup>(P+1)</sup> (B, Cld4, grün, Gitternetz). cCPE gezeigt als Cartoon (weiß), mit Oberfläche mit berechnetem hydrophobem Potential (gelb: hydrophob, grau: unpolar, grün: polar/geladen) und die Claudin-Bindungstasche definierenden Aminosäuren in Kugel-Stab-Darstellung (blau: als wichtig für Cld4-Bindung beschrieben; rot: „oberer Rand“ der Bindungstasche; türkis: „unterer Rand“ der Bindungstasche).

Wie das detaillierte Interaktionsmodell der EZS2 von Cld3 (Abb. 3.11 A) und Cld4 (Abb. 3.11 B) zeigt, sitzt das große hydrophobe L<sup>(P+1)</sup> von Cld3 und Cld4 perfekt in der Tripel-Tyr-Tasche und füllt den von Y<sub>306</sub>, Y<sub>310</sub> und Y<sub>312</sub> gebildeten stark hydrophoben Hohlraum nahezu vollständig aus. Die darauffolgenden Aminosäuren V<sup>(P+2)</sup>P/A<sup>(P+3)</sup> der Turn-Region (N<sup>(P-1)</sup>P<sup>(P)</sup>L<sup>(P+1)</sup>V<sup>(P+2)</sup>P/A<sup>(P+3)</sup>), die in früheren Studien als entscheidend für die Bindung von cCPE an die EZS2 von Cld3 identifiziert wurden (Winkler *et al.*, 2009), kommen entlang der Bindungskavität von cCPE zu liegen. Die weniger hydrophoben P<sub>152</sub><sup>(P+3)</sup> (Cld3) und A<sub>153</sub><sup>(P+3)</sup> (Cld4) sitzen in der schwach hydrophoben bis unpolaren Tripel-Leu-Tasche und füllen diese ebenfalls aus.

Wie ein Blick von oben auf das Interaktionsmodell der EZS2 von Cld3 und Cld4 mit der Bindungstasche von cCPE zeigt, ergibt sich eine ähnliche Bindung von Cld3 und Cld4, sie weist jedoch in bestimmten Bereichen Unterschiede auf (Abb. 3.12).



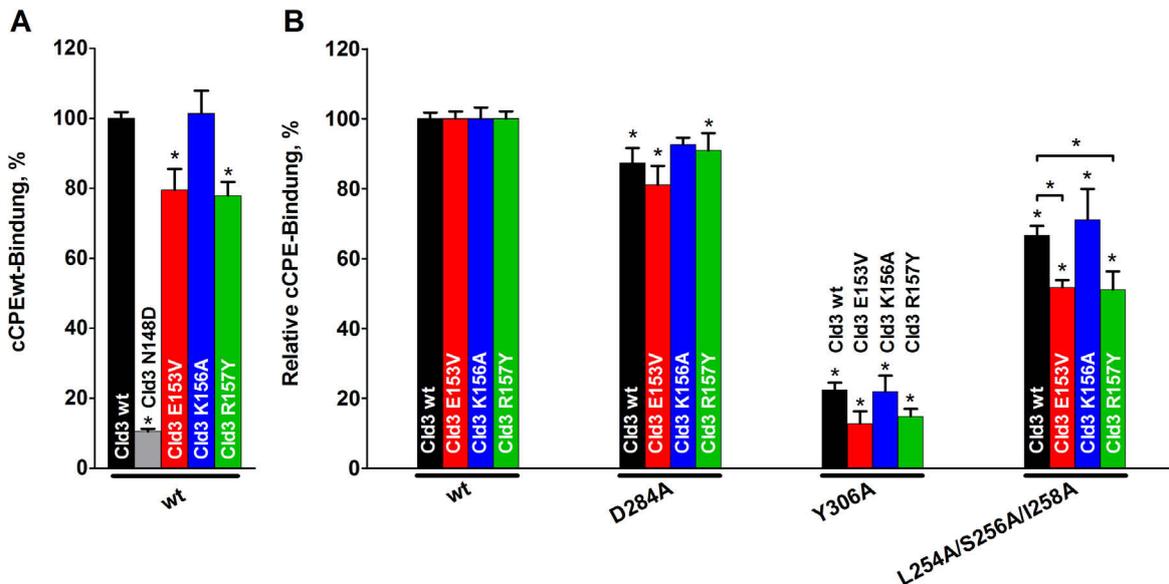
**Abb. 3.12: Überlagertes Interaktionsmodell der EZS2 von Cld3 (orange) und Cld4 (grün) mit cCPE (als Oberfläche, weiß).** Aminosäuren des „unteren Randes“ der Claudin-Bindungstasche (türkis; L254, S256, I258 und D284) sowie Aminosäuren des „oberen Randes“ der Claudin-Bindungstasche (rot; L223, D225 & R227) und Aminosäuren, die als wichtig für die Bindung an Cld4 beschrieben wurden, (blau; Y306, Y310, Y312 & L315) sind hervorgehoben. Die EZS2-Modelle von Cld3 und Cld4 zeigen eine ähnliche Positionierung der N-terminalen Helix, aber eine unterschiedliche Positionierung der C-terminalen Helix. Das unterschiedliche Abknicken der Helices wird durch die unterschiedlichen Helix-Capping-Motive verursacht.

Die N-terminalen Helices der EZS2 von Cld3 und Cld4 liegen in einer ähnlichen Position oberhalb der Tripel-Tyr-Tasche, wohingegen – ausgelöst durch das unterschiedliche Helix-Capping-Motiv – die C-terminalen Helices (vgl. 3.2.3 & 3.2.4) eine unterschiedliche Positionierung haben. Die C-terminale Helix der EZS2 von Cld3 neigt sich zum unteren Rand der Bindungstasche, während die C-terminale Helix der EZS2 von Cld4 zum oberen Rand geneigt ist.

### 3.2.6 Einfluss geladener Aminosäuren der EZS2 von Cld3 auf die Bindung von cCPE

Neben der Orientierung des Turns der EZS2 von Cld3 und Cld4, wurde auch untersucht, inwieweit elektrostatische Interaktionen zur Bindung von cCPE an die EZS2 beitragen – unter anderem, weil eine Theorie davon ausgeht, dass der isoelektrische Punkt (pI) der EZS2 von Claudinen zur Affinität der Bindung von cCPE beiträgt (Kimura *et al.*, 2010).

Um die Beiträge der einzelnen geladenen Aminosäuren der EZS2 von Cld3 zur Bindung von cCPE zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen transient mit Cld3<sub>wt</sub>, Cld3<sub>N148D</sub><sup>(P-1)</sup>, Cld3<sub>E153V</sub><sup>(P+4)</sup>, Cld3<sub>K156A</sub><sup>(P+7)</sup> oder Cld3<sub>R157Y</sub><sup>(P+8)</sup> transfiziert, und die Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> bzw. von GST-cCPE-Varianten an diese Cld3-Konstrukte in zellulären Bindungsassays analysiert (Abb. 3.13).



**Abb. 3.13: Bindung von cCPE an Cld-Konstrukte mit Ladungsänderung.** Transient transfizierte HEK293-Zellen, die Cld3<sub>wt</sub> (schwarz), Cld3<sub>N148D</sub><sup>(P-1)</sup> (grau), Cld3<sub>E153V</sub><sup>(P+4)</sup> (rot), Cld3<sub>K156A</sub><sup>(P+7)</sup> (blau) oder Cld3<sub>R157Y</sub><sup>(P+8)</sup> (grün) exprimierten, wurden mit 0,5 µg/ml GST-cCPE<sub>wt</sub> oder anderen GST-cCPE-Varianten inkubiert. Gebundenes GST-cCPE wurde mittels Phycoerythrin-gekoppeltem α-GST-Antikörper im Mikroplattenleser gemessen und auf die Zelldichte (Höchst) normalisiert. **(A)** Bindung von GST-cCPE an Cld3<sub>wt</sub>, Cld3<sub>N148D</sub><sup>(P-1)</sup>, Cld3<sub>E153V</sub><sup>(P+4)</sup>, Cld3<sub>K156A</sub><sup>(P+7)</sup> oder Cld3<sub>R157Y</sub><sup>(P+8)</sup> normalisiert auf die Bindung von cCPE<sub>wt</sub> an Cld3<sub>wt</sub> (cCPEwt-Bindung, %). **(B)** Bindung der unterschiedlichen GST-cCPE-Varianten an Cld3<sub>wt</sub>, Cld3<sub>E153V</sub><sup>(P+4)</sup>, Cld3<sub>K156A</sub><sup>(P+7)</sup> oder Cld3<sub>R157Y</sub><sup>(P+8)</sup> normalisiert auf die Bindung von cCPE<sub>wt</sub> an das jeweilige Cld-Konstrukt (Relative cCPE-Bindung, %).

Verglichen mit der Bindung von cCPE<sub>wt</sub> an Cld3<sub>wt</sub> führte die Substitution von N<sub>148</sub><sup>(P-1)</sup> zu D in Cld3<sub>N148D</sub><sup>(P-1)</sup> zu einer drastischen Abnahme der Bindung von cCPE<sub>wt</sub> (10,6 ± 0,7 %). Cld3<sub>E153V</sub><sup>(P+4)</sup> und Cld3<sub>R157Y</sub><sup>(P+8)</sup> zeigten eine signifikante, aber deutlich schwächere Abnahme der Bindung von cCPE<sub>wt</sub> als bei Cld3<sub>N148D</sub><sup>(P-1)</sup> im Vergleich zur Bindung an Cld3<sub>wt</sub>. Bei cCPE<sub>wt</sub> hingegen ließ sich keine Abnahme der Bindung an Cld3<sub>K156A</sub><sup>(P+7)</sup> im Vergleich zur Bindung an Cld3<sub>wt</sub> feststellen. (Abb. 3.13 A).

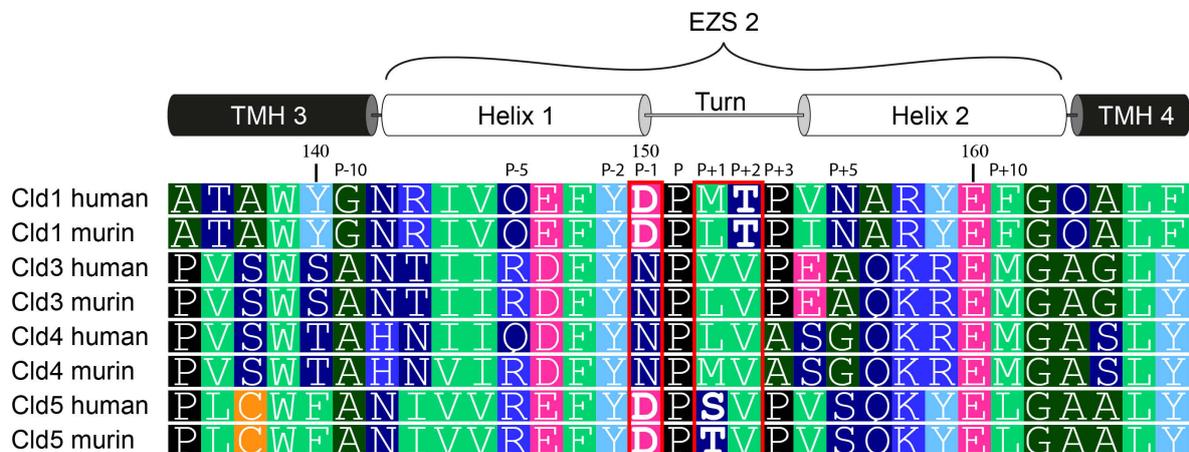
Im Vergleich zur Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> an die jeweiligen Cld3-Konstrukte zeigte cCPE<sub>D284A</sub> eine schwache aber signifikante Abnahme der Bindung an Cld3<sub>wt</sub>, Cld3<sub>E153V</sub><sup>(P+4)</sup>, und Cld3<sub>R157Y</sub><sup>(P+8)</sup>. Auch bei Cld3<sub>K156A</sub><sup>(P+7)</sup> war eine leichte Abnahme zu verzeichnen, allerdings erreichte dieser Effekt keine Signifikanz. Die relative Bindung von cCPE<sub>Y306A</sub> an Cld3<sub>wt</sub>, Cld3<sub>E153V</sub><sup>(P+4)</sup>, Cld3<sub>K156A</sub><sup>(P+7)</sup> und an Cld3<sub>R157Y</sub><sup>(P+8)</sup> war deutlich schwächer als die Bindung von cCPE<sub>wt</sub> an das jeweilige Cld3-Konstrukt. Die Bindung von cCPE<sub>Y306A</sub> an Cld3<sub>E153V</sub><sup>(P+4)</sup> und Cld3<sub>R157Y</sub><sup>(P+8)</sup> war etwas schwächer als jene an Cld3<sub>wt</sub> und Cld3<sub>K156A</sub><sup>(P+7)</sup>, allerdings erreichte

auch diese unterschiedliche Bindung keine Signifikanz. cCPE<sub>L254A/S256A/I258A</sub> zeigte ebenfalls eine deutliche Abnahme der Bindung an alle Cld3-Konstrukte, wobei hier die Bindung an Cld3<sub>E153V</sub><sup>(P+4)</sup> und Cld3<sub>R157Y</sub><sup>(P+8)</sup> signifikant schwächer war als die Bindung an Cld3<sub>wt</sub> und Cld3<sub>K156A</sub><sup>(P+7)</sup> (Abb. 3.13 B).

Zusammengefasst ergaben sich aus den in Abschnitt 3.2 vorgestellten Daten die vollständige Charakterisierung der Cld-Bindungstasche von cCPE (3.2.1-3.2.6) sowie die Orientierung der Claudin-EZS2 innerhalb der Cld-Bindungstasche (3.2.5). Zudem wurde eine der Schlüsselinteraktionen der Cld-cCPE-Bindung (L<sup>(P+1)</sup> in der Tripel-Tyr-Tasche von cCPE, 3.2.5) identifiziert, und Unterschiede im Bindungsverhalten von cCPE an Cld3 und Cld4 ausgemacht (3.2.2–3.2.5). Diese Ergebnisse sind in Veshnyakova *et al.*, 2012 veröffentlicht.

### 3.3 Interaktion von cCPE mit Claudin-1 und Claudin-5

Nachdem die Bindung von CPE an die EZS2 von Cld3 und Cld4 charakterisiert wurde (3.2), stellte sich nun die Frage, warum CPE nicht an Cld5 und nur sehr schwach an Cld1 bindet. Um die Ursachen dafür zu identifizieren, wurden zunächst die Sequenzen der EZS2 von humanem und murinem Cld1 und Cld5 mit denen von Cld3 und Cld4 verglichen (Abb. 3.14).



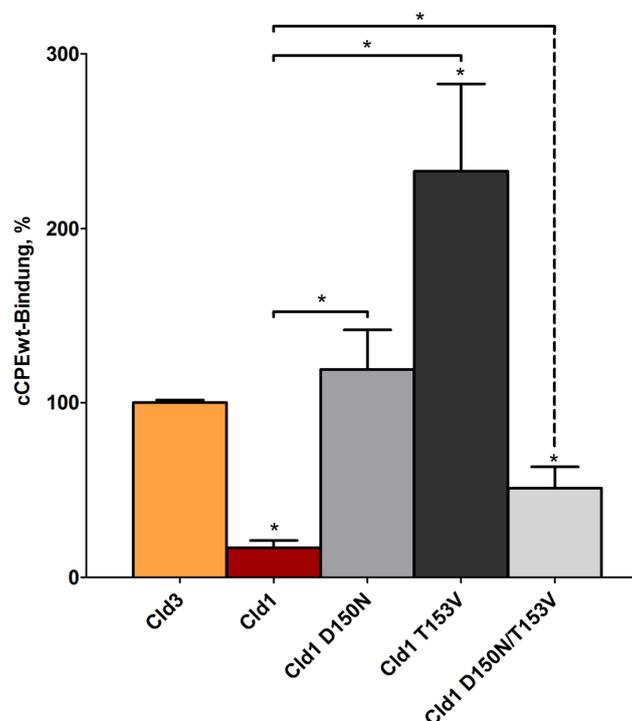
**Abb. 3.14: Sequenzalignment der EZS2 von humanem und murinem Cld1, Cld3–Cld5 mit schematischer Darstellung der EZS2** und deutlichen Sequenzunterschieden in der Turn-Region (rote Kästen). Grün: große hydrophobe, dunkelgrün: kleine hydrophobe, dunkelblau: polar ungeladene, blau: basische und magenta: saure Aminosäuren, türkis: Tyr, schwarz: Pro und orange: Cys. Nummerierungen: obere Reihe: Sequenznummerierung nach Cld1, untere Reihe: relative Positionsnummerierung nach dem hoch konservierten Prolin (P<sub>151</sub> in Cld1).

Auf den ersten Blick fiel auf, dass sowohl Cld1 als auch Cld5 ein Aspartat anstelle des korrespondierenden N<sup>(P-1)</sup> von Cld3 und Cld4 besitzen. Bei Cld3 führt die Substitution dieses N<sub>148</sub><sup>(P-1)</sup> zu D zu einem drastischen Bindungsverlust von cCPE<sub>wt</sub> (vgl. Abb. 3.13 A). Zusätzlich fiel auf, dass Cld1 und Cld5 jeweils eine polare anstelle einer hydrophoben Aminosäure in der Turn-Region besitzen – bei Cld1 ein T<sub>153</sub><sup>(P+2)</sup> anstelle des korrespondierenden V<sub>153</sub><sup>(P+2)</sup>

von Cld3, und bei murinem Cld5 ein T<sub>151</sub><sup>(P+1)</sup> anstelle des korrespondierenden L<sub>150</sub><sup>(P+1)</sup> von Cld3. Bei Cld3 führt eine Substitution dieses L<sub>150</sub><sup>(P+1)</sup> zu A ebenfalls zu einem deutlichen Bindungsverlust von cCPE (Winkler *et al.*, 2009), zudem konnte eine direkte Interaktion der Tripel-Tyr-Tasche mit diesem L<sup>(P+1)</sup> nachgewiesen werden (3.2.5, Abb. 3.10 & Abb. 3.11).

### 3.3.1 Cld3 nachahmende Mutanten von Cld1 und Cld5 erhöhen die Bindung von cCPE

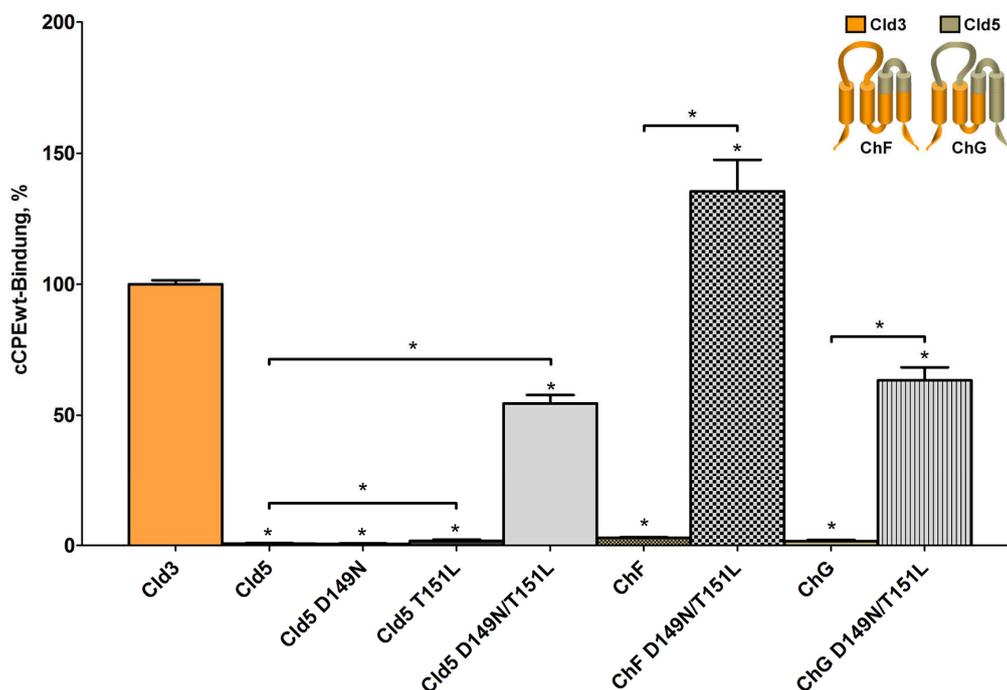
Um den Einfluss dieser unterschiedlichen Aminosäuren in der EZS2 von Cld1 und Cld5 im Vergleich zur EZS2 von Cld3 bzw. Cld4 auf die Bindung von cCPE zu untersuchen, wurden sowohl für Cld1 als auch für Cld5 Einzel- und Doppelsubstitutionen zu den korrespondierenden Aminosäuren von Cld3 mittels ortsgerichteter Mutagenese (2.2.4.1) durchgeführt. Die folgenden EYFP-Konstrukte wurden generiert: Cld1<sub>D150N</sub><sup>(P-1)</sup>, Cld1<sub>T153V</sub><sup>(P+2)</sup>, Cld1<sub>D150N/T153V</sub><sup>(P-1/P+2)</sup>, Cld5<sub>D149N</sub><sup>(P-1)</sup>, Cld5<sub>T151L</sub><sup>(P+1)</sup> und Cld5<sub>D149N/T151L</sub><sup>(P-1/P+1)</sup>. Zunächst wurde die Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> an die Cld1-Konstrukte im Vergleich zur Bindung an Cld3<sub>wt</sub> charakterisiert. Hierzu wurden HEK293-Zellen transient mit Cld3<sub>wt</sub>, Cld1<sub>wt</sub>, Cld1<sub>D150N</sub>, Cld1<sub>T153V</sub> und Cld1<sub>D150N/T153V</sub> transfiziert und die Bindung von cCPE<sub>wt</sub> mittels zellulärem Bindungsassay gemessen (Abb. 3.15).



**Abb. 3.15: Bindung von cCPE an Cld3 nachahmende Mutanten von Cld1.** Transient transfizierte HEK293-Zellen, die Cld3<sub>wt</sub> (orange), Cld1<sub>wt</sub> (rot), Cld1<sub>D150N</sub><sup>(P-1)</sup> (grau), Cld1<sub>T153V</sub><sup>(P+2)</sup> (dunkelgrau) oder Cld1<sub>D150N/T153V</sub><sup>(P-1/P+2)</sup> (hellgrau) als EYFP-Fusionsproteine exprimierten, wurden mit 0,5 µg/ml GST-cCPE<sub>wt</sub> inkubiert. Gebundenes GST-cCPE wurde mittels Phycoerythrin-gekoppeltem α-GST-Antikörper im Mikroplattenleser gemessen und auf EYFP normalisiert. Dargestellt ist die Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> an Cld3<sub>wt</sub> (orange), Cld1<sub>wt</sub> (rot), Cld1<sub>D150N</sub><sup>(P-1)</sup> (grau), Cld1<sub>T153V</sub><sup>(P+2)</sup> (dunkelgrau) oder Cld1<sub>D150N/T153V</sub><sup>(P-1/P+2)</sup> (hellgrau), normalisiert auf die Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> an Cld3<sub>wt</sub> (cCPEwt-Bindung, %).

Im Vergleich zur Bindung an Cld3<sub>wt</sub> zeigte cCPE<sub>wt</sub> eine sehr schwache Bindung an Cld1<sub>wt</sub>, eine leicht stärkere Bindung an Cld1<sub>D150N</sub><sup>(P-1)</sup>, eine deutlich stärkere Bindung an Cld1<sub>T153V</sub><sup>(P+2)</sup> und – überraschenderweise – eine schwächere Bindung an Cld1<sub>D150N/T153V</sub><sup>(P-1/P+2)</sup> als an die Einzelmutanten (Abb. 3.15).

Zur Charakterisierung der Bindung von cCPE<sub>wt</sub> an die Cld5-Konstrukte wurden mit Cld3<sub>wt</sub>, Cld5<sub>wt</sub>, Cld5<sub>D149N</sub>, Cld5<sub>T151L</sub>, Cld5<sub>D149N/T151L</sub>, bzw. mit den Cld3/Cld5 Chimären ChF, ChF<sub>D149N/T151L</sub>, ChG oder ChG<sub>D149N/T151L</sub> transient transfizierte HEK293-Zellen mit cCPE<sub>wt</sub> inkubiert und die Bindung mittels zellulärem Bindungsassay gemessen (Abb. 3.16).



**Abb. 3.16: Bindung von cCPE an Cld3 nachahmende Mutanten von Cld5.** Transient transfizierte HEK293-Zellen, die Cld3<sub>wt</sub> (orange), Cld5<sub>wt</sub> (beige), Cld5<sub>D149N</sub><sup>(P-1)</sup> (grau), Cld5<sub>T151L</sub><sup>(P+1)</sup> (dunkelgrau), Cld5<sub>D149N/T151L</sub><sup>(P-1/P+1)</sup> (hellgrau), ChF (beige, Schachbrett), ChF<sub>D149N/T151L</sub><sup>(P-1/P+1)</sup> (grau, Schachbrett), ChG (beige gestreift) oder ChG<sub>D149N/T151L</sub><sup>(P-1/P+1)</sup> (grau gestreift) als EYFP-Fusionsproteine exprimierten, wurden mit 0,5 µg/ml GST-cCPE<sub>wt</sub> inkubiert. Gebundenes GST-cCPE wurde mittels Phycoerythrin-gekoppeltem α-GST-Antikörper im Mikroplattenleser gemessen und auf EYFP normalisiert. Dargestellt ist die Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> an das jeweilige Cld-Konstrukt, normalisiert auf die Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> an Cld3<sub>wt</sub> (cCPE<sub>wt</sub>-Bindung, %). Rechts oben: Schema der Cld3/Cld5-Chimären mit dem Cld3-Anteil in orange und dem Anteil an Cld5 in beige.

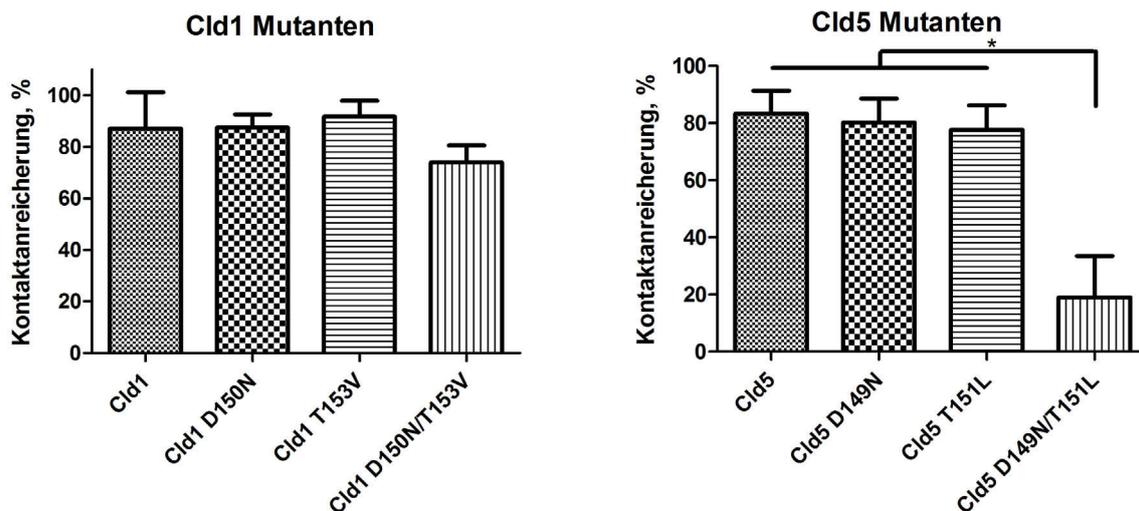
Im Vergleich zu Bindung an Cld3<sub>wt</sub> zeigte cCPE<sub>wt</sub> eine sehr schwache Bindung von 0,7 ± 0,2 % an Cld5<sub>wt</sub> und eine ebenfalls sehr schwache Bindung an Cld5<sub>D149N</sub><sup>(P-1)</sup> und Cld5<sub>T151L</sub><sup>(P+1)</sup>. Nur bei der Cld5-Doppelmutante Cld5<sub>D149N/T151L</sub><sup>(P-1/P+1)</sup> zeigte sich ein deutlicher Bindungsanstieg auf 54,5 ± 3,2 % im Vergleich zur Bindung an Cld3<sub>wt</sub>. An die beiden Cld3/Cld5-Chimären ChF und ChG zeigte cCPE<sub>wt</sub> eine sehr schwache Bindung, und auch hier führte die Substitution von D149N/T151L<sup>(P-1/P+1)</sup> zu einer deutlichen Bindungssteigerung

von  $cCPE_{wt}$  mit  $135,5 \pm 12,0 \%$  an  $ChF_{D149N/T151L}^{(P-1/P+1)}$  und mit  $63,3 \pm 4,9 \%$  an  $ChG_{D149N/T151L}^{(P-1/P+1)}$  im Vergleich zur Bindung an  $Cld3_{wt}$ .

### 3.3.1.1 Nur $Cld5_{D149N/T151L}^{(P-1/P+1)}$ zeigt eine verringerte Kontaktanreicherung

Um auszuschließen, dass die Steigerung der Bindung von  $cCPE_{wt}$  an  $Cld1_{D150N}^{(P-1)}$ ,  $Cld1_{T153V}^{(P+2)}$ ,  $Cld1_{D150N/T153V}^{(P-1/P+2)}$ ,  $Cld5_{D149N}^{(P-1)}$ ,  $Cld5_{T151L}^{(P+1)}$  oder  $Cld5_{D149N/T151L}^{(P-1/P+1)}$  durch eine verbesserte Zugänglichkeit der Konstrukte für  $cCPE$  bedingt ist, und umgekehrt zu zeigen, dass sie tatsächlich auf einer gesteigerten Affinität für  $cCPE$  basiert, wurden die Kontaktanreicherung und die Plasmamembranlokalisation der  $Cld1$ - und  $Cld5$ -Konstrukte mit dem jeweiligen  $Cld_{wt}$  verglichen.

Zunächst erfolgte eine Analyse der Kontaktanreicherung. Hierzu wurden HEK293-Zellen transient mit  $Cld1_{wt}$  oder den  $Cld1$ -Mutanten bzw.  $Cld5_{wt}$  oder den  $Cld5$ -Mutanten transfiziert und die Anzahl der anreicherungspositiven Zell-Zell-Kontakte wie unter 2.4.9.1 beschrieben bestimmt (Abb. 3.17).

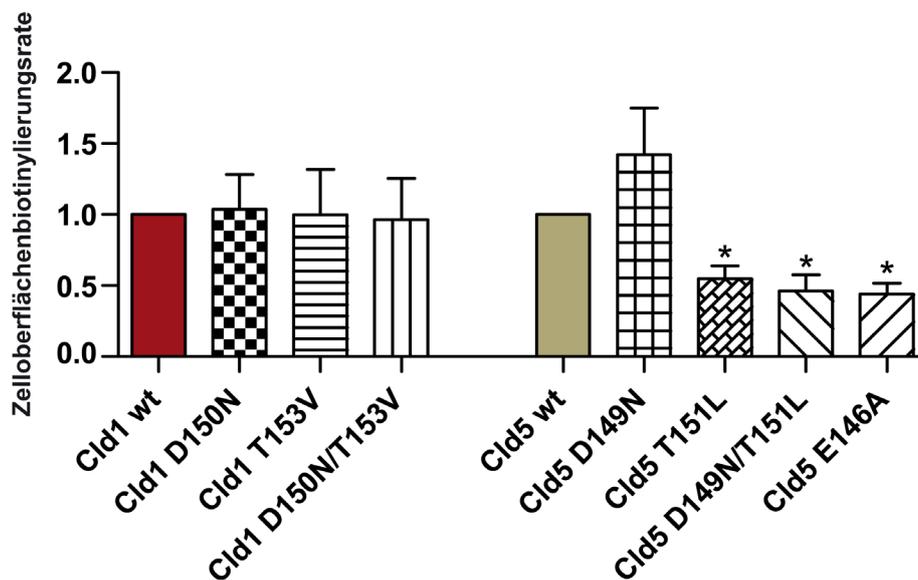


**Abb. 3.17:** Quantifizierung der anreicherungspositiven Zell-Zell-Kontakte für  $Cld1_{wt}$  (A) und  $Cld5_{wt}$  (B) und die  $Cld3$  imitierenden Mutanten von  $Cld1$  und  $Cld5$ .

Keine der  $Cld1$ -Mutanten zeigte eine signifikante Änderung der anreicherungspositiven Zell-Zell-Kontakte im Vergleich zu  $Cld1_{wt}$  (Abb. 3.17 A). Die Einzelmutanten  $Cld5_{D149N}^{(P-1)}$  und  $Cld5_{T151L}^{(P+1)}$  wiesen ebenfalls keine signifikante Änderung der anreicherungspositiven Zell-Zell-Kontakte auf. Dagegen ergab die Doppelmutante  $Cld5_{D149N/T151L}^{(P-1/P+1)}$  eine starke Reduzierung der anreicherungspositiven Zell-Zell-Kontakte auf 20% im Vergleich zu  $Cld5_{wt}$  (Abb. 3.17 B). Das legt die Schlussfolgerung nahe, dass mehr freies, nicht in *trans*-Interaktionen gebundenes  $Cld5_{D149N/T151L}^{(P-1/P+1)}$  für die Interaktion mit  $cCPE$  vorliegen könnte.

### 3.3.1.2 Cld5<sup>T151L</sup> oder Cld5<sup>D149N/T151L</sup> zeigen eine niedrigere Plasmamembranlokalisation im Vergleich zu Cld5<sub>wt</sub>

Um zusätzlich Aussagen über die Plasmamembranlokalisation der Cld1- und Cld5-Mutanten machen zu können, wurden HEK293-Zellen transient mit Cld1<sup>D150N</sup>(<sup>P-1</sup>), Cld1<sup>T153V</sup>(<sup>P+2</sup>), Cld1<sup>D150N/T153V</sup>(<sup>P-1/P+2</sup>), Cld5<sup>D149N</sup>(<sup>P-1</sup>), Cld5<sup>T151L</sup>(<sup>P+1</sup>) oder Cld5<sup>D149N/T151L</sup>(<sup>P-1/P+1</sup>) transfiziert und eine Zelloberflächenbiotinylierung wie in Abschnitt 2.4.10 beschrieben durchgeführt. Cld-Mutanten mit einer Oberflächenbiotinylierungsrate unter 0,5 wurden als „intrazellulärer Typ“ beschrieben (Winkler, 2007; Piontek *et al.*, 2008), eine Cld-Mutante des Typs Cld5<sup>E146A</sup>(<sup>P-4</sup>) wurde als Kontrolle mitgeführt (Abb. 3.18).



**Abb. 3.18: Analyse der Plasmamembranlokalisation von Cld3 imitierenden Mutanten von Cld1 (A) und Cld5 (B).** HEK293-Zellen wurden transient mit verschiedenen Cld1- oder Cld5-Mutanten transfiziert, biotinyliert und die biotinylierten Proteine mittels Pulldown-Assay aufgereinigt. 100% der gereinigten Proteine und 10% des Zelllysats wurden über Immunoblots mit M $\alpha$ YFP markiert und mit G $\alpha$ Mouse-HRP im Lumi-Imager detektiert. Dargestellt sind die BLU-Werte der Zelloberflächenfraktion relativ zu den BLU-Werten der Lysate, normalisiert auf den jeweiligen Cld<sub>wt</sub>. n  $\geq$  3; Ergebnisse sind der Mittelwert  $\pm$  SEM.

Keine der Cld1-Mutanten zeigte eine deutlich veränderte Biotinylierungsrate im Vergleich zu Cld1<sub>wt</sub> (Abb. 3.18).

Bei den Cld5-Mutanten wies Cld5<sup>D149N</sup>(<sup>P-1</sup>) eine deutlich höhere Biotinylierungsrate ( $1,4 \pm 0,5$ ) auf als Cld5<sub>wt</sub>, die Biotinylierungsraten von Cld5<sup>T151L</sup>(<sup>P+1</sup>) und Cld5<sup>D150N/T151L</sup>(<sup>P-1/P+1</sup>) lagen deutlich unter der von Cld5<sub>wt</sub>, wobei die von Cld5<sup>D150N/T151L</sup>(<sup>P-1/P+1</sup>) ( $0,46 \pm 0,11$ ) sogar unter 0,5 blieb und vergleichbar mit der des intrazellulären Typs Cld5<sup>E146A</sup>(<sup>P-4</sup>) war ( $0,44 \pm 0,13$ , Abb. 3.18).

Keine der Cld1-Mutanten zeigte in den anreicherungspositiven Kontakten und der Membranlokalisation ein deutlich anderes Verhalten als Cld1<sub>wt</sub>, somit konnte geschlossen werden,

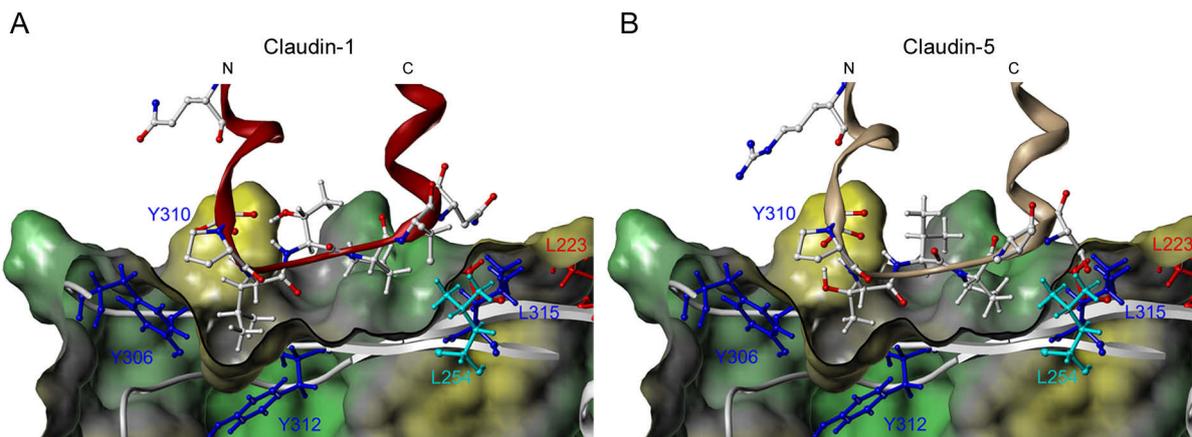
dass die erhöhte Bindung von  $cCPE_{wt}$  tatsächlich an einer höheren Affinität für diese Mutanten liegt.

Auch für die Cld5-Mutanten konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Bindung von  $cCPE_{wt}$  an  $Cld5_{D149N/T151L}^{(P-1/P+1)}$  an einer höheren Affinität von cCPE für dieses Konstrukt liegt. Zwar zeigt  $Cld5_{D149N/T151L}^{(P-1/P+1)}$  eine deutlich niedrigere Anzahl an anreicherungspositiven Kontakten als  $Cld5_{wt}$  – weshalb mehr freies Cld in der Zelloberfläche vorliegen könnte. Allerdings zeigt die Zelloberflächenbiotinylierung, dass  $Cld5_{D149N/T151L}^{(P-1/P+1)}$  deutlich weniger in der Zellmembran lokalisiert ist (vgl. Abb. 3.17 & Abb. 3.18).

### 3.3.2 *In-silico*-Identifikation von Resten in cCPE, die die Bindung an Cld1 und Cld5 steigern

Da sowohl für Cld1 als auch für Cld5 nachgewiesen werden konnte, dass die schwache Bindung von cCPE an Cld1 bzw. das Nicht-Binden an Cld5 durch die Unterschiede in der Sequenz der Turn-Region der EZS2 gegenüber der Sequenz von Cld3 verursacht werden (Cld3:  ${}_{148}N^{(P-1)}P^{(P)}L^{(P+1)}V^{(P+2)}P^{(P+3)}_{152}$ , Cld1:  ${}_{150}D^{(P-1)}P^{(P)}L^{(P+1)}T^{(P+2)}P^{(P+3)}_{154}$ , Cld5:  ${}_{149}D^{(P-1)}P^{(P)}T^{(P+1)}V^{(P+2)}P^{(P+3)}_{153}$ ), wurde nun die Claudin-Bindungstasche von cCPE auf Positionen untersucht, an denen Substitutionen eingeführt werden könnten, die diese Sequenzunterschiede kompensieren und somit eine Bindung an Cld5 bzw. eine Steigerung der Bindung an Cld1 ermöglichen würden.

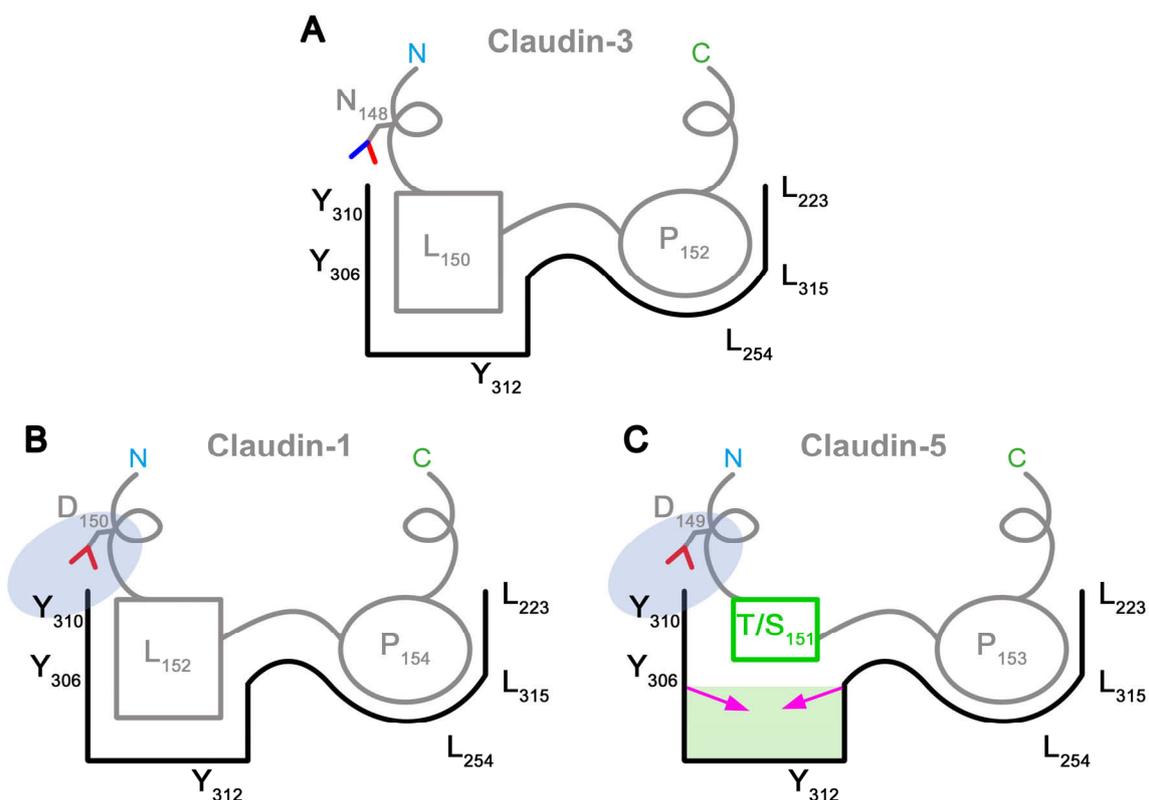
Hierzu wurden auf Basis der der Interaktionsmodelle der EZS2 von Cld3 und Cld4 „virtuelle Interaktionsmodelle“ der EZS2 von Cld1 und Cld5 erstellt, um diese Positionen zu identifizieren (Abb. 3.19).



**Abb. 3.19:** „Virtuelle Interaktionsmodelle“ der EZS2 von Cld1 (A, rot, Cartoon) und Cld5 (B, grün, Cartoon). Querschnitt mit den Aminosäuren der Turn-Region in Kugel-Stab-Darstellung (weiß: C und H, blau: N, rot: O). cCPE gezeigt als Cartoon (weiß), mit Oberfläche mit berechnetem hydrophobem Potential (gelb: hydrophob, grau: unpolar, grün: polar/geladen) und den die Bindungstasche definierenden Aminosäuren in Kugel-Stab-Darstellung (blau: als wichtig für Cld4-Bindung beschrieben; rot: „oberer Rand“ der Bindungstasche; türkis: „unterer Rand“ der Bindungstasche).

Die „virtuellen Interaktionsmodelle“ zeigten, dass sowohl bei Cld1 als auch bei Cld5 das negativ geladene  $D_{150/149}^{(P-1)}$  des Turns oberhalb der stark hydrophoben Tripel-Tyr-Tasche von cCPE zu liegen kommt. Wie bereits dargelegt, hat dieses  $D^{(P-1)}$  einen eindeutig negativen Einfluss auf die Bindung von cCPE an Cld1 und Cld5, und auch bei Cld3 verursacht die Substitution von  $N_{148}^{(P-1)}$  zu D eine deutlich schwächere Bindung von cCPE (3.2.6, Abb. 3.13). Allerdings war fraglich, inwieweit die von  $D^{(P-1)}$  verursachte Störung der cCPE-Bindung an der negativen Ladung an sich oder an einem veränderten Helix-Capping der N-terminalen Helix liegt. Zusätzlich zeigte sich, dass  $T_{151}^{(P+1)}$  von Cld5 die Tripel-Tyr-Tasche im Gegensatz zu  $L^{(P+1)}$  von Cld1, Cld3 und Cld4 nicht ausfüllen kann (Abb. 3.19 B).

Dies führte zu den Schlussfolgerungen, dass eine positiv geladene Aminosäure am Rand der Tripel-Tyr-Tasche eingeführt werden sollte, um die negative Ladung von  $D^{(P-1)}$  der EZS2 von Cld1 und Cld5 zu kompensieren, und dass, um eine Bindung von Cld5 zu ermöglichen, die Tripel-Tyr-Tasche von cCPE durch Substitutionen verkleinert werden müsste, damit  $T_{151}^{(P+1)}$  diese ausfüllen kann (Abb. 3.20).



**Abb. 3.20: Schematische Darstellung der Interaktion von cCPE mit Cld3, Cld1 und Cld5.** (A) Interaktion der EZS2 (grau) von Cld3 mit der Claudin-Bindungstasche von cCPE (schwarz) im Vergleich zur EZS2 von Cld1 (B) und Cld5 (C). Auffallend ist die große Lücke (grün) zwischen  $T_{151}^{(P+1)}$  von Cld5 (grün) und der Tripel-Tyr-Tasche von cCPE. Diese Lücke muss durch Modifikationen der Tripel-Tyr-Tasche geschlossen werden (Pfeile, magenta), um eine Bindung von cCPE an Cld5 zu erreichen. Zusätzlich könnte eine durch Substitution eingeführte positive Aminosäure am Rand der Tripel-Tyr-Tasche (blauer Kreis) die negative Auswirkung von  $D_{150}^{(P-1)}$  in Cld1 und  $D_{149}^{(P-1)}$  in Cld5 auf die Bindung von cCPE durch eine elektrostatische Wechselwirkung ausgleichen.

In der Kristallstruktur von cCPE (PDB ID: 2QUO) wurden S<sub>307</sub> und T<sub>310</sub> als Positionen zur Einführung einer positiven Ladung am Rand der Tripel-Tyr-Tasche identifiziert. An beiden Positionen könnte ein durch Substitution eingeführtes Arginin, Lysin oder Histidin mit D<sup>(P-1)</sup> der EZS2 von Cld1 bzw. Cld5 interagieren.

Zur Verkleinerung der Tripel-Tyr-Tasche durch Einführen größerer Aminosäurereste („pit-filler-Mutationen“), die eine Bindung von Cld5 ermöglichen, wurden die folgenden Positionen ausgewählt: L<sub>238</sub>, I<sub>258</sub>, V<sub>259</sub>, A<sub>302</sub> und Y<sub>306</sub>.

Die in Tab. 3.2 angegebenen GST-cCPE-Varianten wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese (2.2.4.1) erstellt und per GST-Affinitätschromatographie (2.3.1) aufgereinigt, um im Folgenden die Bindung bzw. den Effekt auf die Bindung an Cld1<sub>wt</sub> und Cld5<sub>wt</sub> zu untersuchen.

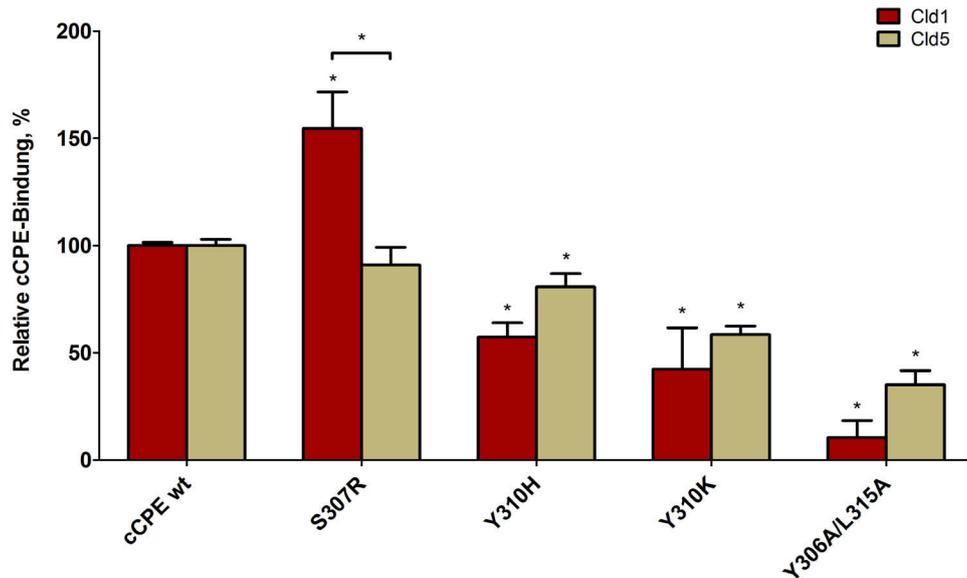
**Tab. 3.2:** Aufstellung der GST-cCPE-Konstrukte für Bindungsstudien mit Cld1 und Cld5

Lage der Mutation	Konstrukt
Wildtyp	GST-cCPE <sub>wt</sub>
Einführen einer positiven Ladung an den Rand der Tripel-Tyr-Tasche	GST-cCPE <sub>S307R</sub>
	GST-cCPE <sub>Y310H</sub>
	GST-cCPE <sub>Y310K</sub>
Verkleinerung der Tripel-Tyr-Tasche	GST-cCPE <sub>L238F</sub>
	GST-cCPE <sub>I258K</sub>
	GST-cCPE <sub>V259Y</sub>
	GST-cCPE <sub>A302M</sub>
	GST-cCPE <sub>A302Y</sub>
	GST-cCPE <sub>Y306W</sub>
	GST-cCPE <sub>D225A/I258K</sub> *
GST-cCPE <sub>A302Y/Y306S</sub> *	

\* Doppelmutationen sind durch natürliche zufällige Mutationen in *E. coli* entstanden.

### 3.3.3 Einfluss der Einführung einer positiv geladenen Aminosäure am Rand der Tripel-Tyr-Tasche auf die Bindung von cCPE an Cld1 und Cld5

Zunächst wurde untersucht, inwieweit die Einführung einer positiven Ladung am Rand der Tripel-Tyr-Tasche von cCPE einen positiven Einfluss auf die Bindung an Cld1<sub>wt</sub> oder Cld5<sub>wt</sub> hat. Hierzu wurden HEK293-Zellen transient mit Cld1<sub>wt</sub>-EYFP und Cld5<sub>wt</sub>-EYFP transfiziert, und die Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> bzw. von GST-cCPE<sub>S307R</sub>, GST-cCPE<sub>S310H</sub> und GST-cCPE<sub>S310K</sub> an die Claudin-Wildtypen mittels zellulären Bindungsassays analysiert. Als Negativkontrolle der Bindung wurde GST-cCPE<sub>Y306A/L315A</sub> eingesetzt, eine Variante von cCPE, die sehr schlecht an alle Claudine bindet (Abb. 3.21).



**Abb. 3.21: Einfluss von eingeführten positiven Ladungen am Rand der Tripel-Tyr-Tasche auf die Bindung von cCPE an Cld1 und Cld5.** Transient mit Cld1<sub>wt</sub>-EYFP (rot) oder Cld5<sub>wt</sub>-EYFP (beige) transfizierte HEK293-Zellen wurden mit 0,5 µg/ml GST-cCPE<sub>wt</sub> oder anderen GST-cCPE-Varianten inkubiert. Gebundenes GST-cCPE wurde mittels Phycoerythrin-gekoppeltem α-GST-Antikörper im Mikroplattenleser gemessen und auf EYFP normalisiert. Dargestellt ist die Bindung der GST-cCPE-Varianten an den jeweiligen Cld<sub>wt</sub>, normalisiert auf die Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> an den jeweiligen Cld<sub>wt</sub> (Relative cCPE-Bindung, %).

Weder cCPE<sub>Y310H</sub> noch cCPE<sub>Y310K</sub> zeigten eine Steigerung der Bindung an Cld1<sub>wt</sub> oder Cld5<sub>wt</sub> im Vergleich zur Bindung von cCPE<sub>wt</sub>.

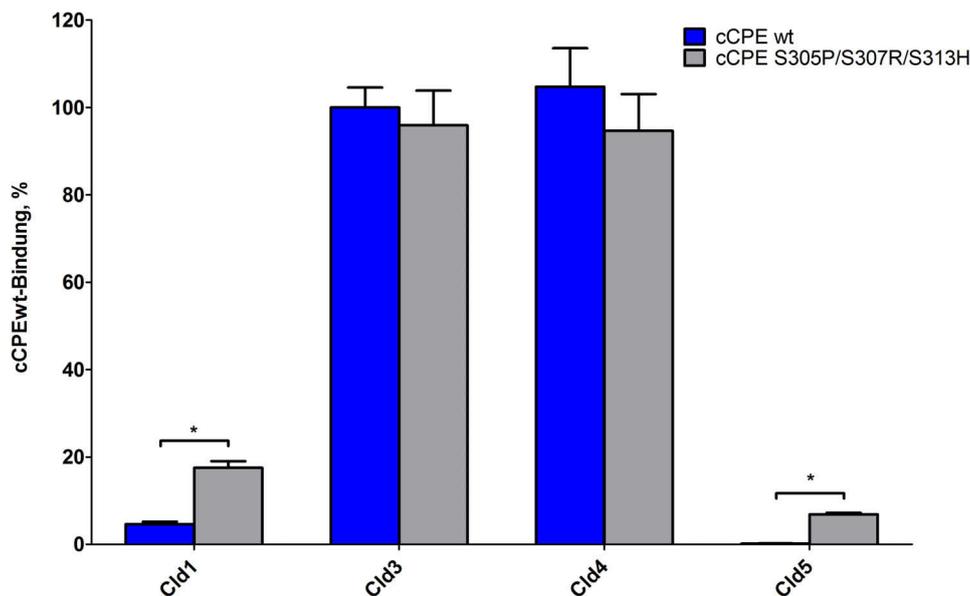
cCPE<sub>S307R</sub> hingegen zeigte eine deutlich stärkere Bindung an Cld1<sub>wt</sub> (155 ± 17 %) als cCPE<sub>wt</sub>, jedoch keine Änderung der Bindung an Cld5<sub>wt</sub>. Interessanterweise war die Substitution S307R auch Bestandteil einer cCPE-Variante (cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub>), die parallel von einer anderen Gruppe mittels *random mutagenesis* und *Phage-Display-Assays* entwickelt und beschrieben wurde (Takahashi *et al.*, 2012).

### 3.3.4 Einzelne Aminosäuresubstitutionen des cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub>-Konstrukt zeigen unterschiedliche Effekte auf Cld1 und Cld5

Um den Wirkmechanismus der Bindungssteigerung von cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> an Cld1 und Cld5 zu verstehen und diese Information in die Interaktionsmodelle von cCPE mit der EZS2 von Cld1 und Cld5 zu integrieren, wurden zunächst mittels ortsgerichteter Mutagenese (2.2.4.1) die folgenden Einzel- und Mehrfachsubstitutionen von cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> in GST-cCPE<sub>wt</sub> eingeführt: GST-cCPE<sub>S305P</sub>, GST-cCPE<sub>S313H</sub>, GST-cCPE<sub>S305P/S307R</sub> und GST-cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub>. Anschließend wurden diese per GST-Affinitätschromatographie (2.3.1) aufgereinigt und die Bindung bzw. der Effekt auf die Bindung an Cld1 und Cld5 untersucht.

### 3.3.4.1 Vergleich der Bindung von cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> an Cld1, Cld3, Cld4 und Cld5

Zunächst sollte die Bindung von cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> an Cld1, Cld3, Cld4 und Cld5 mit der Bindung von cCPE<sub>wt</sub> an diese Konstrukte verglichen werden. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit Cld1, Cld3, Cld4 und Cld5 transient transfiziert, und mittels zellulären Bindungsassays die Bindung von GST-cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> im Vergleich zu Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> an diese Claudine analysiert (Abb. 3.22).



**Abb. 3.22: Bindung von cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> an Cld1, Cld3, Cld4 und Cld5.** Transient mit Cld1<sub>wt</sub>-EYFP, Cld3<sub>wt</sub>-EYFP, EGFP-Cld4<sub>wt</sub> oder Cld5<sub>wt</sub>-EYFP transfizierte HEK293-Zellen wurden mit 0,5 µg/ml GST-cCPE<sub>wt</sub> (blau) oder GST-cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> (grau) inkubiert. Gebundenes GST-cCPE wurde mittels Phycoerythrin-gekoppeltem α-GST-Antikörper im Mikroplattenleser gemessen und auf EYFP normalisiert. Dargestellt ist die Bindung der GST-cCPE-Varianten an den jeweiligen Cld<sub>wt</sub>, normalisiert auf die Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> an Cld3<sub>wt</sub> (cCPEwt-Bindung, %).

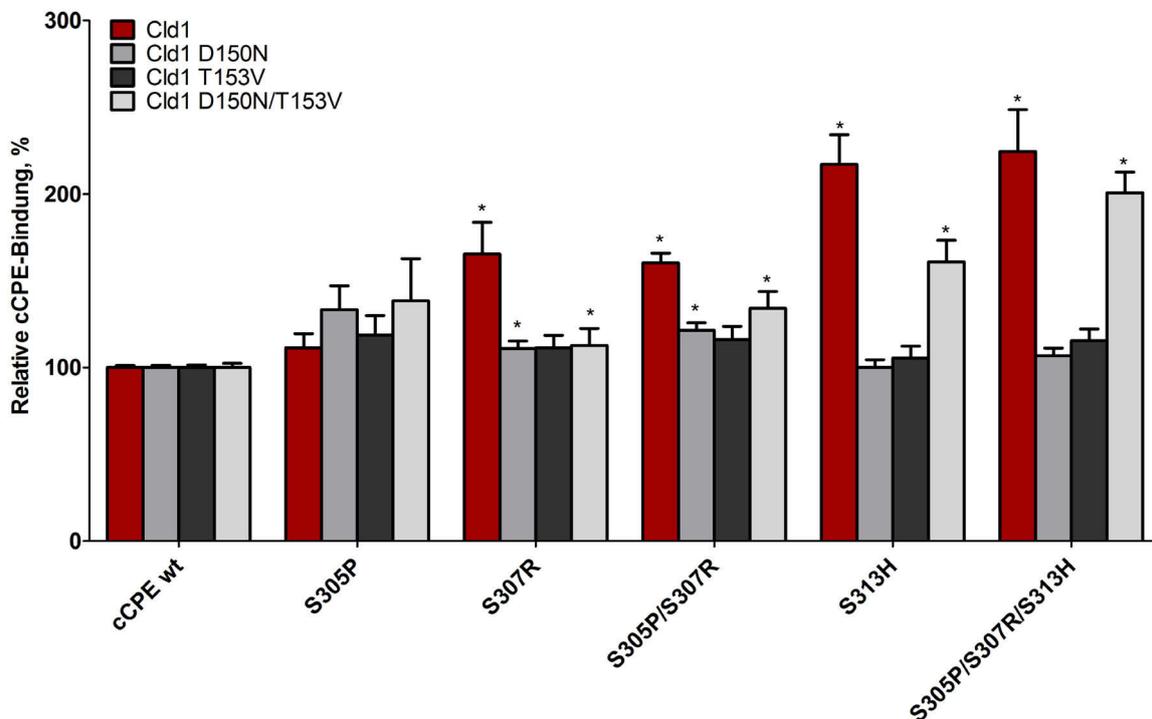
cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> zeigte eine deutliche Steigerung der Bindung an Cld1 und Cld5 im Vergleich zur Bindung von cCPE<sub>wt</sub> an Cld3. Allerdings liegt diese Steigerung noch weit unterhalb des Bindungsniveaus von cCPE<sub>wt</sub> an Cld3 oder Cld4. An Cld3 und Cld4 zeigte cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> keine signifikant unterschiedliche Bindung als cCPE<sub>wt</sub>.

Um die Einzelbeiträge der Substitutionen zur Bindungssteigerung von cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> an Cld1 und Cld5 zu analysieren, wurden nun die Bindung der Einzel- und Doppelsubstitutionen von GST-cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> an Cld1<sub>wt</sub> und die Cld3 imitierenden Mutanten von Cld1 (Abb. 3.23) sowie die Bindung an Cld5<sub>wt</sub> und die Cld3 imitierenden Mutanten von Cld5 (Abb. 3.24) getestet.

### 3.3.4.2 S307R und S313H steigern die Bindung von cCPE an Cld1

Zunächst wurde die relative Bindung von cCPE<sub>S305P</sub>, cCPE<sub>S307R</sub>, cCPE<sub>S305P/S307R</sub>, cCPE<sub>S313H</sub> und cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> an Cld1<sub>wt</sub>, Cld1<sub>D150N<sup>(P-1)</sup></sub>, Cld1<sub>T153V<sup>(P+2)</sup></sub> und Cld1<sub>D150N/T153V<sup>(P-1/P+2)</sup></sub> im

Vergleich mit der Bindung von cCPE<sub>wt</sub> mittels zellulären Bindungsassays analysiert (Abb. 3.23).

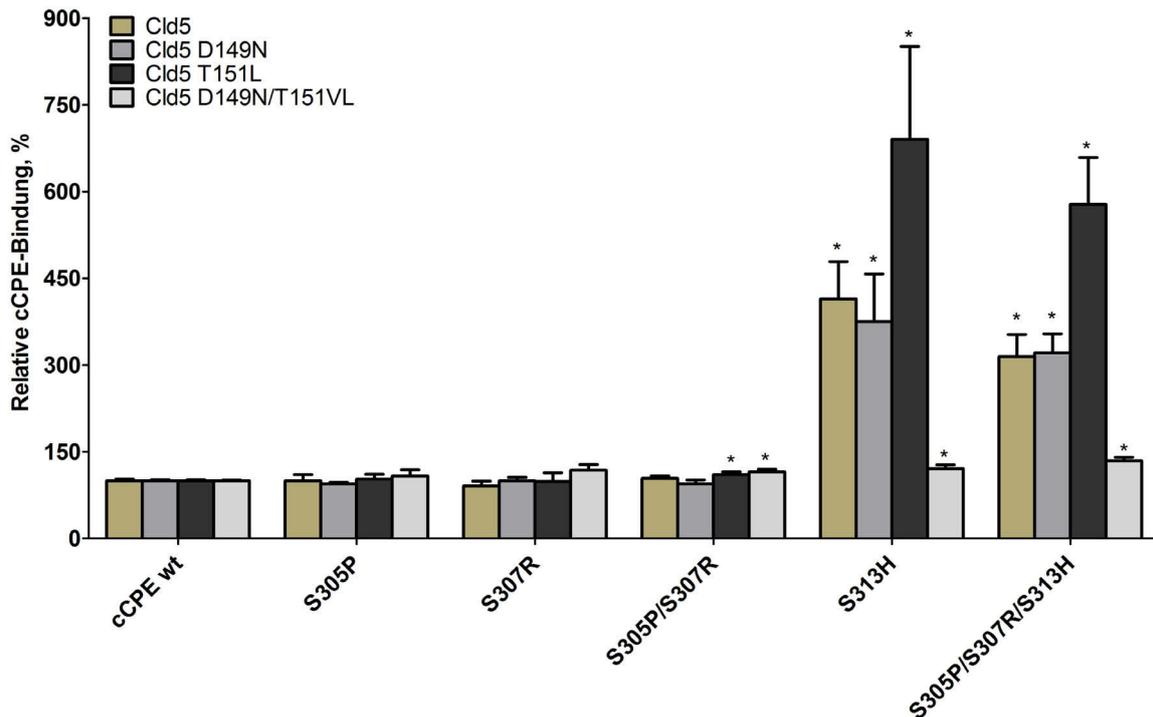


**Abb. 3.23: Einfluss der einzelnen Substitutionen von cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> auf die Bindung an Cld1 und die Cld3 imitierenden Mutanten von Cld1.** Transient transfizierte HEK293-Zellen, die Cld1<sub>wt</sub> (rot), Cld1<sub>D150N</sub> (grau), Cld1<sub>T153V</sub> (dunkelgrau), oder Cld1<sub>D150N/T153V</sub> (hellgrau) als EYFP-Fusionsproteine exprimierten, wurden mit 0,5 µg/ml GST-cCPE<sub>wt</sub> oder anderen GST-cCPE-Varianten inkubiert. Gebundenes GST-cCPE wurde mittels Phycoerythrin-gekoppeltem α-GST-Antikörper im Mikroplattenleser gemessen und auf EYFP normalisiert. Dargestellt ist die Bindung der jeweiligen GST-cCPE-Varianten an die unterschiedlichen Cld3 imitierenden Mutanten von Cld1, normalisiert auf die Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> an das jeweilige Cld1-Konstrukt (Relative cCPE-Bindung, %).

Im Vergleich zur Bindung von cCPE<sub>wt</sub> an das jeweilige Cld1-Konstrukt zeigten cCPE<sub>S313H</sub> und cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> eine signifikant stärkere Bindung an Cld1<sub>wt</sub> und Cld1<sub>D150N/T153V</sub><sup>(P-1/P+2)</sup> und keine signifikante Änderung der Bindung an Cld1<sub>D150N</sub><sup>(P-1)</sup> und Cld1<sub>T153V</sub><sup>(P+2)</sup>. Dagegen wiesen cCPE<sub>S307R</sub> und cCPE<sub>S305P/S307R</sub> einen schwächeren Anstieg der Bindung an Cld1<sub>wt</sub> und Cld1<sub>D150N/T153V</sub><sup>(P-1/P+2)</sup> auf, allerdings war bei beiden auch eine schwach, aber signifikant erhöhte Bindung an Cld1<sub>D150N</sub><sup>(P-1)</sup> festzustellen. cCPE<sub>S305P</sub> zeigte keine signifikant unterschiedliche Bindung an Cld1<sub>wt</sub> und die Cld3 imitierenden Mutanten.

### 3.3.4.3 Nur S313H steigert die Bindung von cCPE an Cld5

Nun wurde die relative Bindung von cCPE<sub>S305P</sub>, cCPE<sub>S307R</sub>, cCPE<sub>S305P/S307R</sub>, cCPE<sub>S313H</sub> und cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> an Cld5<sub>wt</sub>, Cld5<sub>D149N</sub><sup>(P-1)</sup>, Cld5<sub>T151L</sub><sup>(P+1)</sup> und Cld5<sub>D149N/T151L</sub><sup>(P-1/P+1)</sup> im Vergleich mit der Bindung von cCPE<sub>wt</sub> mittels zellulären Bindungsassays analysiert (Abb. 3.24).



**Abb. 3.24: Einfluss der einzelnen Substitutionen von cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> auf die Bindung an Cld5 und die Cld3 imitierenden Mutanten von Cld5.** Transient transfizierte HEK293-Zellen, die Cld5<sub>wt</sub> (beige), Cld5<sub>D149N</sub> (grau), Cld5<sub>T151L</sub> (dunkelgrau), oder Cld5<sub>D149N/T151L</sub> (hellgrau) als EYFP-Fusionsproteine exprimierten, wurden mit 0,5 µg/ml GST-cCPE<sub>wt</sub> oder anderen GST-cCPE-Varianten inkubiert. Gebundenes GST-cCPE wurde mittels Phycoerythrin-gekoppeltem α-GST-Antikörper im Mikroplattenleser gemessen und auf EYFP normalisiert. Dargestellt ist die Bindung der jeweiligen GST-cCPE-Varianten an die unterschiedlichen Cld3 imitierenden Mutanten von Cld5, normalisiert auf die Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> an das jeweilige Cld5-Konstrukt (Relative cCPE-Bindung, %).

cCPE<sub>S313H</sub> und cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> zeigten einen starken Anstieg der Bindung an Cld5<sub>T151L</sub><sup>(P+1)</sup>, einen weniger starken Anstieg der Bindung an Cld5<sub>wt</sub> und Cld5<sub>D149N</sub><sup>(P-1)</sup> und eine schwache, aber signifikante Steigerung der Bindung an Cld5<sub>D149N/T151L</sub><sup>(P-1/P+1)</sup> im Vergleich zur Bindung von cCPE<sub>wt</sub> an das jeweilige Cld5-Konstrukt.

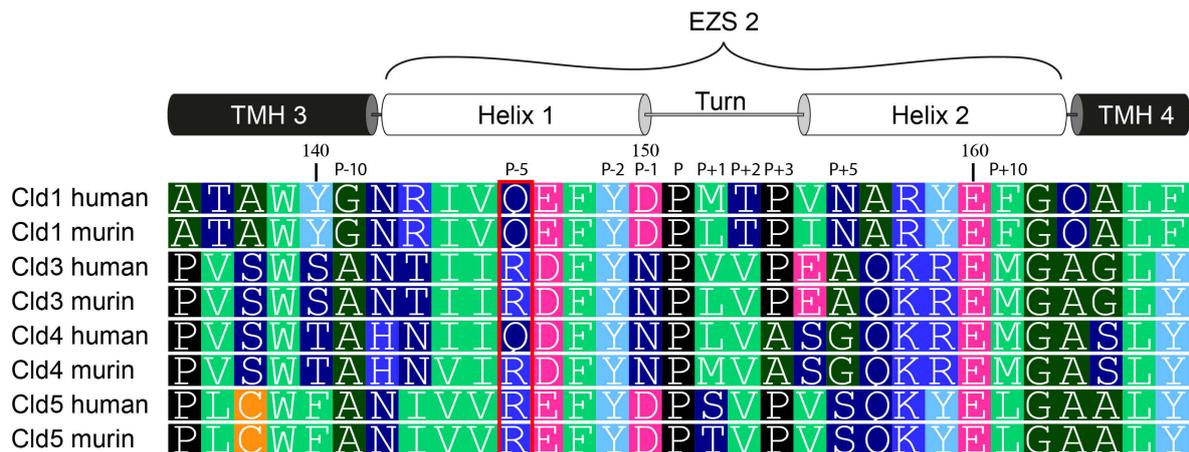
Interessanterweise zeigten cCPE<sub>S313H</sub> und cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> ein nahezu identisches Bindungsverhalten, wobei die Bindung von cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> an die Cld5-Konstrukte generell etwas schwächer war als die von cCPE<sub>S313H</sub>. cCPE<sub>S305P/S307R</sub> wies eine sehr schwache, aber signifikante Steigerung der Bindung an Cld5<sub>T151L</sub><sup>(P+1)</sup> und Cld5<sub>D149N/T151L</sub><sup>(P-1/P+1)</sup> auf, wohingegen bei cCPE<sub>S305P</sub> und cCPE<sub>S307R</sub> kein signifikanter Anstieg der Bindung an eines der Cld5-Konstrukte zu beobachten war.

### 3.3.4.4 Mit welchen Claudin-Resten interagiert R<sub>307</sub> von cCPE<sub>S307R</sub> bzw.

#### cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub>?

Da cCPE<sub>S307R</sub> eine stärkere Bindung an Cld1<sub>wt</sub>, nicht jedoch an Cld5<sub>wt</sub> im Vergleich zu cCPE<sub>wt</sub> zeigte, und zudem eine leichte Steigerung der Bindung an Cld1<sub>D150N</sub><sup>(P-1)</sup> im Vergleich zu cCPE<sub>wt</sub>, stellte sich die Frage, mit welchem Rest der EZS2 R<sub>307</sub> (cCPE) interagiert.

Ein Vergleich der Sequenzen der EZS2 von Cld1 und Cld5 ergab, dass außer  $D^{(P-1)}$  im Bereich der N-terminalen Helix nur noch zwei weitere geladene bzw. polare Aminosäuren – an Position P-4 und P-5 – in der Nähe des Turns liegen. An Position P-4 befindet sich aber sowohl bei Cld1 als auch Cld5 ein Glutamat, nur an Position P-5 unterscheidet sich die Sequenz der EZS2 hinsichtlich der Ladung/Polarität mit  $Q_{146}^{(P-5)}$  bei Cld1 und  $R_{145}^{(P-5)}$  bei Cld5 (Abb. 3.25).



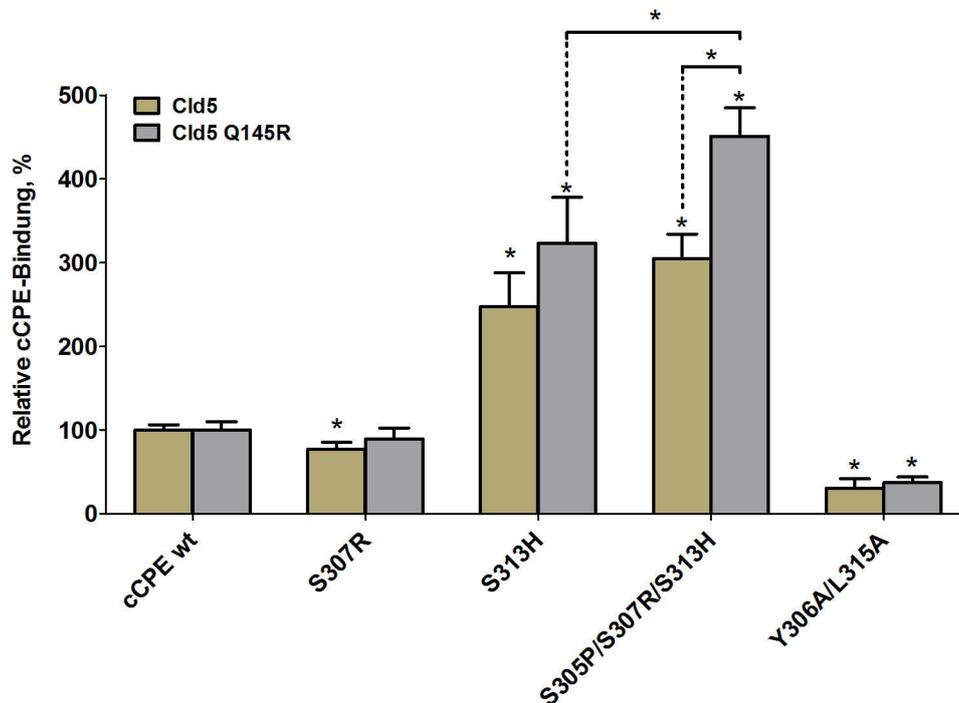
**Abb. 3.25: Sequenzalignment der EZS2 von humanem und murinem Cld1, Cld3–Cld5 mit schematischer Darstellung der EZS2.** Roter Kasten: Unterschied zwischen Cld1 (polare Aminosäure) und Cld5 (basische Aminosäure). Grün: große hydrophobe, dunkelgrün: kleine hydrophobe, dunkelblau: polar ungeladene, blau: basische und magenta: saure Aminosäuren, türkis: Tyr, schwarz: Pro und orange: Cys. Nummerierungen: obere Reihe: Sequenznummerierung nach Cld1, untere Reihe: relative Positionsnummerierung nach dem hoch konservierten Prolin ( $P_{151}$  in Cld1).

Um herauszufinden, ob eine Interaktion zwischen  $R_{307}$  (cCPE) und  $Q_{146}^{(P-5)}$  (Cld1) die Bindungssteigerung von  $cCPE_{S307R}$  an  $Cld1_{wt}$  verursacht, wurde  $Cld5_{R145Q}^{(P-5)}$  verwendet. Bei dieser Cld5-Mutante wurde  $R_{145}^{(P-5)}$  gegen Q getauscht, der korrespondierenden Aminosäure aus Cld1 – hier sollte nun eine Interaktion mit  $R_{307}$  in  $cCPE_{S307R}$  bzw.  $cCPE_{S305P/S307R/S313H}$  möglich sein.

Es wurden zelluläre Bindungsassays mit transient mit  $Cld5_{wt}$  oder  $Cld5_{R145Q}^{(P-5)}$  transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt, und die Bindung von  $cCPE_{S307R}$ ,  $cCPE_{S313H}$  und  $cCPE_{S305P/S307R/S313H}$  wurde mit der Bindung von  $cCPE_{wt}$  an diese Cld5-Konstrukte verglichen.  $cCPE_{Y306A/L315A}$  wurde als Negativkontrolle eingesetzt (Abb. 3.26).

Im Vergleich zur Bindung von  $cCPE_{wt}$  zeigte  $cCPE_{S307R}$  keine gesteigerte relative Bindung an  $Cld5_{wt}$ , wider Erwarten jedoch auch nicht an  $Cld5_{R145Q}^{(P-5)}$ .  $cCPE_{S313H}$  zeigte eine vergleichbar gesteigerte Bindung an  $Cld5_{wt}$  und  $Cld5_{R145Q}^{(P-5)}$ . Auch bei  $cCPE_{S305P/S307R/S313H}$  ließ sich ein deutlicher Anstieg der relativen Bindung an  $Cld5_{wt}$  und  $Cld5_{R145Q}^{(P-5)}$  beobachten, wobei es, wie erwartet, eine signifikant stärkere Bindung an  $Cld5_{R145Q}^{(P-5)}$  im Vergleich zur Bindung an  $Cld5_{wt}$  zeigte. Zusätzlich zeigte  $cCPE_{S305P/S307R/S313H}$  eine signifikant stärkere Bindung an

Cld5<sub>R145Q</sub><sup>(P-5)</sup> im Vergleich zur Bindung von cCPE<sub>S313H</sub>, wohingegen kein signifikanter Unterschied zwischen der Bindung von cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> und cCPE<sub>S313H</sub> an Cld5<sub>wt</sub> festgestellt werden konnte.

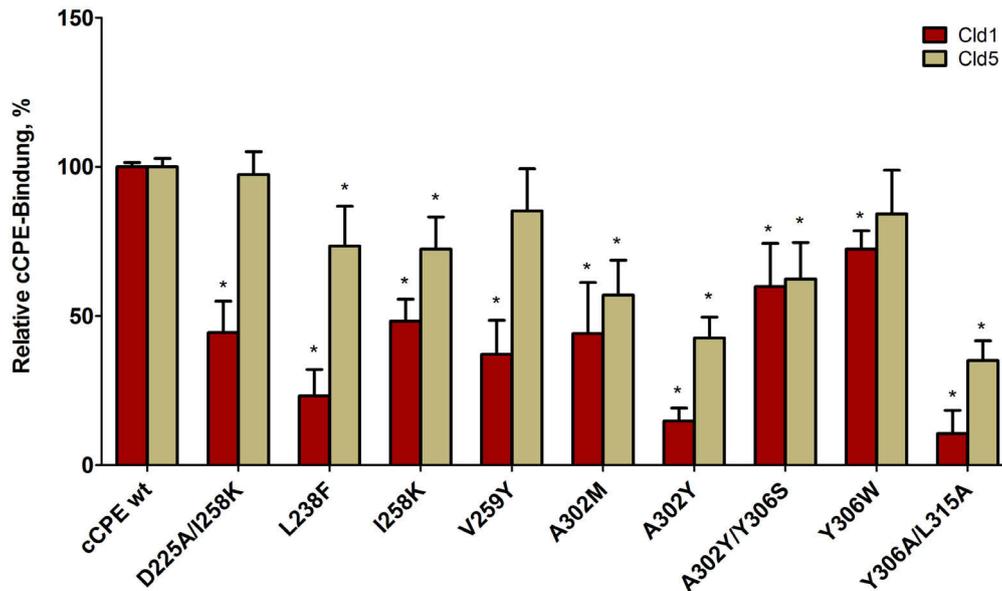


**Abb. 3.26: Einfluss der Aminosäure an Position P-5 auf die Bindung von cCPE an Cld5.** Transient transfizierte HEK293-Zellen, die Cld5<sub>wt</sub> (beige) oder Cld5<sub>Q145R</sub> (grau) als EYFP-Fusionsprotein exprimierten, wurden mit 0,5 µg/ml GST-cCPE<sub>wt</sub> oder anderen GST-cCPE-Varianten inkubiert. Gebundenes GST-cCPE wurde mittels Phycoerythrin-gekoppeltem α-GST-Antikörper im Mikroplattenleser gemessen und auf EYFP normalisiert. Bindung der unterschiedlichen GST-cCPE-Varianten an Cld5<sub>wt</sub> oder Cld5<sub>Q145R</sub>, normalisiert auf die Bindung von cCPE<sub>wt</sub> an das jeweilige Cld-Konstrukt (Relative cCPE-Bindung, %).

### 3.3.5 Einzelne Aminosäuresubstitutionen an der Tripel-Tyr-Tasche führen zu keiner gesteigerten Bindung von cCPE an Cld5

Nun wurde die Bindung der cCPE-Varianten mit Substitutionen um die Tripel-Tyr-Tasche an Cld1<sub>wt</sub> und Cld5<sub>wt</sub> charakterisiert. Der Hypothese nach sollten Mutationen, die die Tripel-Tyr-Tasche ausfüllen, eine stärkere Bindung als cCPE<sub>wt</sub> an Cld5<sub>wt</sub> bei gleichzeitiger schwächerer Bindung an Cld1<sub>wt</sub> zeigen.

Hierzu wurden HEK293-Zellen transient mit Cld1 und Cld5 transfiziert und mittels zellulären Bindungsassays die Bindung von cCPE-Konstrukten mit Substitutionen, die die Tripel-Tyr-Tasche modifizieren (vgl. Tab. 3.2), im Vergleich mit cCPE<sub>wt</sub> gemessen. Als Negativkontrolle der Bindung wurde cCPE<sub>Y306A/L315A</sub> eingesetzt (Abb. 3.27).



**Abb. 3.27: Einfluss von Substitutionen in der Tripel-Tyr-Tasche auf die Bindung von cCPE an Cld1 und Cld5.** Transient mit Cld1<sub>wt</sub>-EYFP (rot) oder Cld5<sub>wt</sub>-EYFP (beige) transfizierte HEK293-Zellen wurden mit 0,5 µg/ml GST-cCPE<sub>wt</sub> oder anderen GST-cCPE-Varianten inkubiert. Gebundenes GST-cCPE wurde mittels Phycoerythrin-gekoppeltem α-GST-Antikörper im Mikroplattenleser gemessen und auf EYFP normalisiert. Dargestellt ist die Bindung der GST-cCPE-Varianten an den jeweiligen Cld<sub>wt</sub>, normalisiert auf die Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> an den jeweiligen Cld<sub>wt</sub> (Relative cCPE-Bindung, %).

Keine der getesteten cCPE-Varianten mit Einzelsubstitutionen in der Tripel-Tyr-Tasche zeigte eine gesteigerte Bindung an Cld5. Bei allen cCPE-Varianten – mit Ausnahme von cCPE<sub>D225A/I258K</sub>, cCPE<sub>V259Y</sub> und cCPE<sub>Y306W</sub> – ließen sich sogar eine signifikant schwächere Bindung an Cld5 als cCPE<sub>wt</sub> und ein jeweils noch stärkerer Verlust der Bindung an Cld1 beobachten.

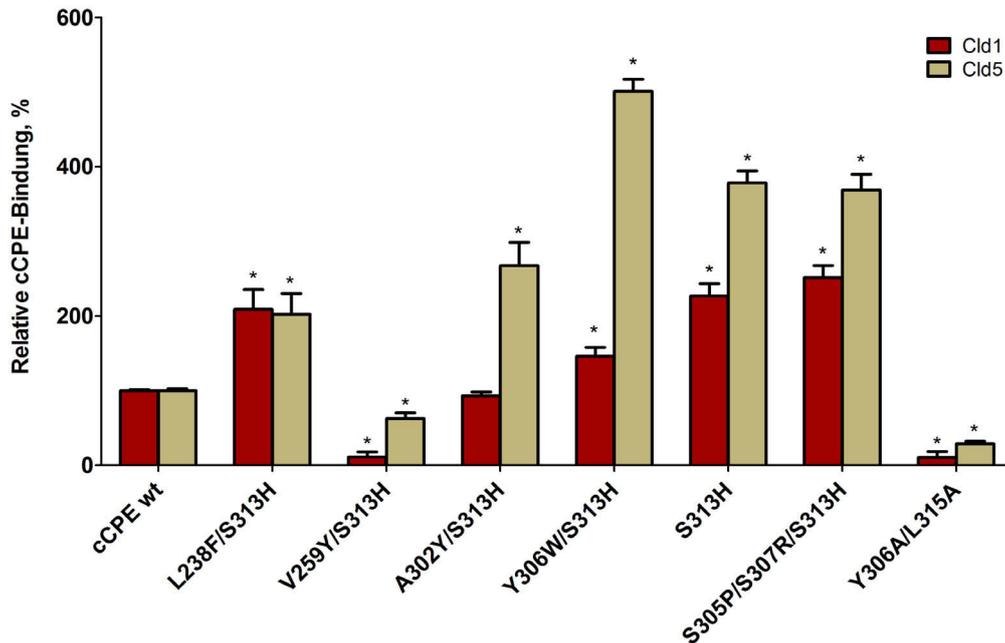
### 3.3.6 Kombination von Aminosäuresubstitutionen an der Tripel-Tyr-Tasche mit S313H

Da die einzelnen Substitutionen um die Tripel-Tyr-Tasche von cCPE zwar in Ansätzen eine verstärkte Diskriminierung zwischen Cld1<sub>wt</sub> und Cld5<sub>wt</sub> zeigten, allerdings aber keinen steigenden Effekt auf die Bindung an Cld5<sub>wt</sub> im Vergleich zu cCPE<sub>wt</sub> aufwiesen, wurden nun Tripel-Tyr-Taschen modifizierende Substitutionen mit der Substitution S313H kombiniert, da diese eine generelle Steigerung der Bindung an Cld1<sub>wt</sub> und Cld5<sub>wt</sub> verursacht.

Die folgenden cCPE-Varianten wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese (2.2.4.1) erstellt und per GST-Affinitätschromatographie (2.3.1) aufgereinigt: GST-cCPE<sub>L238F/S313H</sub>, GST-cCPE<sub>V259Y/S313H</sub>, GST-cCPE<sub>A302Y/S313H</sub> und GST-cCPE<sub>Y306W/S313H</sub>.

Der Einfluss der Substitutionen dieser cCPE-Konstrukte auf die Bindung an Cld1<sub>wt</sub> und Cld5<sub>wt</sub> wurde nun mittels zellulären Bindungsassays mit transient mit Cld1<sub>wt</sub> oder Cld5<sub>wt</sub> transfizierten HEK293-Zellen im Vergleich zur Bindung von cCPE<sub>wt</sub>, cCPE<sub>S313H</sub> und

cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> gemessen. Als Negativkontrolle wurde erneut cCPE<sub>Y306A/L315A</sub> verwendet (Abb. 3.28).



**Abb. 3.28: Einfluss von Substitutionen in der Tripel-Tyr-Tasche in Kombination mit der Substitution S313H auf die Bindung von cCPE an Cld1 und Cld5.** Transient mit Cld1<sub>wt</sub>-EYFP (rot) oder Cld5<sub>wt</sub>-EYFP (beige) transfizierte HEK293-Zellen wurden mit 0,5 µg/ml GST-cCPE<sub>wt</sub> oder anderen GST-cCPE-Varianten inkubiert. Gebundenes GST-cCPE wurde mittels Phycoerythrin-gekoppeltem α-GST-Antikörper im Mikroplattenleser gemessen und auf EYFP normalisiert. Dargestellt ist die Bindung der GST-cCPE-Varianten an den jeweiligen Cld<sub>wt</sub>, normalisiert auf die Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> an den jeweiligen Cld<sub>wt</sub> (Relative cCPE-Bindung, %).

cCPE<sub>L238F/S313H</sub> zeigte eine stärkere Bindung als cCPE<sub>wt</sub> an Cld1<sub>wt</sub> und Cld5<sub>wt</sub>, wobei die Bindung an Cld1<sub>wt</sub> mit der von cCPE<sub>S313H</sub> vergleichbar war, und die Bindung an Cld5<sub>wt</sub> deutlich schwächer ausfiel als die von cCPE<sub>S313H</sub>. cCPE<sub>V259Y/S313H</sub> zeigte eine deutlich schwächere Bindung an Cld1<sub>wt</sub> und Cld5<sub>wt</sub> als cCPE<sub>wt</sub> und nur unwesentlich mehr Bindung als cCPE<sub>Y306A/L315A</sub>. cCPE<sub>A302Y/S313H</sub> zeigte eine deutlich stärkere Bindung an Cld5<sub>wt</sub>, wobei diese weniger stark war als die Bindung von cCPE<sub>S313H</sub> an Cld5<sub>wt</sub>. Die Bindung an Cld1 war mit der von cCPE<sub>wt</sub> vergleichbar.

cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> hingegen zeigte eine deutlich stärkere Bindung an Cld5<sub>wt</sub>, sie war sogar stärker als bei cCPE<sub>S313H</sub>. Gleichzeitig ergab sich für cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> – verglichen mit cCPE<sub>S313H</sub> – eine deutlich schwächere Bindung an Cld1<sub>wt</sub>. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Substitution des W<sub>306</sub> zum größeren Tryptophan die Tripel-Tyr-Tasche verkleinert.

### 3.3.7 Präferierte Selektivität von cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> für Bindung an Claudin-5

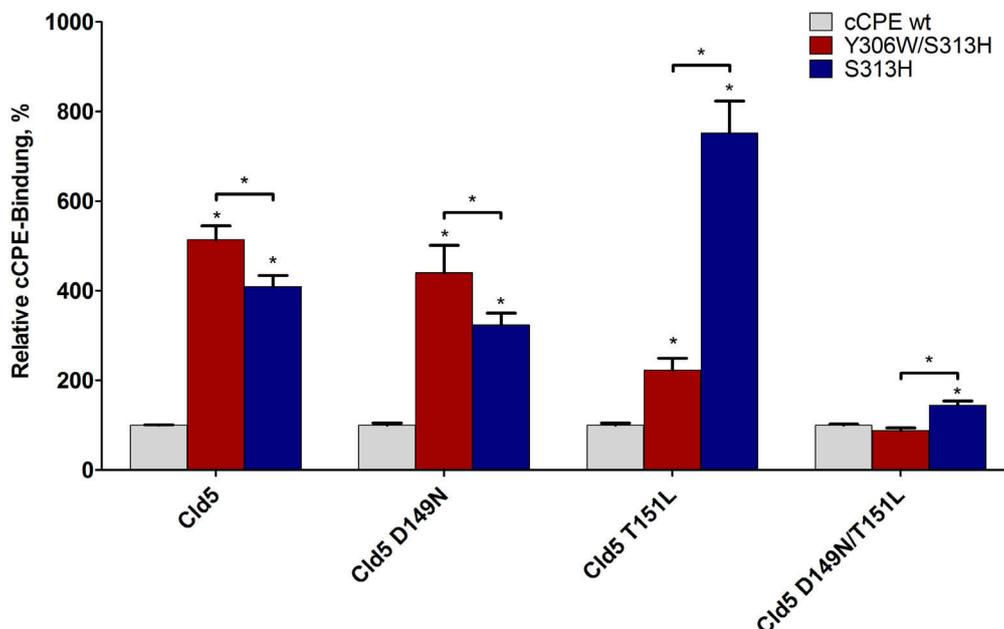
In den vorausgegangenen Untersuchungen ließ sich beobachten, dass cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> stärker an Cld5<sub>wt</sub> und schwächer an Cld1<sub>wt</sub> bindet, als cCPE<sub>S313H</sub> alleine. Da eine Verkleinerung der Tripel-Tyr-Tasche genau dies verursachen sollte, wurden nun weitere Messungen

mit cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> durchgeführt. Zunächst wurde die Bindung dieses Konstrukts an die Cld3 imitierenden Mutanten von Cld5 gemessen. Anschließend wurde die Bindung an verschiedene Cld-Subtypen charakterisiert.

### 3.3.7.1 cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> zeigt eine deutlich verringerte Bindung an Cld5<sub>T151L</sub>

Mit der Charakterisierung der Bindung von cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> an die Cld3 imitierenden Mutanten von Cld5 wurde untersucht, inwieweit der bindungssteigernde Effekt der Substitutionen tatsächlich durch die Verkleinerung der Tripel-Tyr-Tasche verursacht wurde. Wäre dies der Fall, sollte sich keine deutliche Änderung in der relativen Bindung von cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> an Cld5<sub>D149N</sub><sup>(P-1)</sup> im Vergleich zur Bindung an Cld5<sub>wt</sub> ergeben. Zusätzlich sollte die Bindung von cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> an Cld5<sub>D149N</sub><sup>(P-1)</sup> wie an Cld5<sub>wt</sub> eine leichte Steigerung im Vergleich zur Bindung von cCPE<sub>S313H</sub> an Cld5<sub>wt</sub> und Cld5<sub>D149N</sub><sup>(P-1)</sup> zeigen. Erst durch die Substitution des kleinen T<sub>151</sub><sup>(P+1)</sup> zu einem L in Cld5<sub>T151L</sub><sup>(P+1)</sup> bzw. in Cld5<sub>D149N/T151L</sub><sup>(P-1/P+1)</sup> sollte es zu einer deutlich schwächeren relativen Bindung von cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> an diese beiden Konstrukte im Vergleich zur Bindung von cCPE<sub>S313H</sub> kommen.

Um den Einfluss der Cld3 imitierenden Mutanten auf die Bindung von cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> aufzuklären, wurden transient mit Cld5<sub>wt</sub>, Cld5<sub>D149N</sub>, Cld5<sub>T151L</sub> und Cld5<sub>D149N/T151L</sub> transfizierte HEK293-Zellen mit cCPE<sub>wt</sub>, cCPE<sub>S313H/Y306W</sub> und cCPE<sub>S313H</sub> inkubiert. Die Bindung der cCPE-Konstrukte wurde mittels zellulären Bindungsassays gemessen (Abb. 3.29).



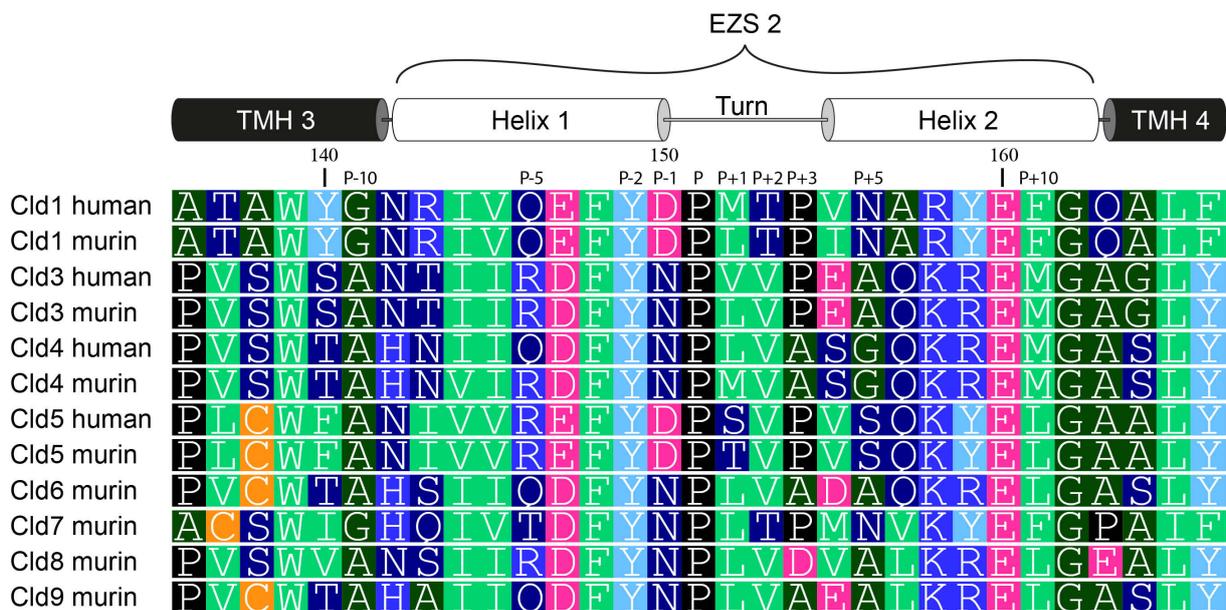
**Abb. 3.29: Bindung von cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> an Cld5 und die Cld3 imitierenden Mutanten von Cld5.** Transient transfizierte HEK293-Zellen, die Cld5<sub>wt</sub>, Cld5<sub>D149N</sub>, Cld5<sub>T151L</sub>, oder Cld5<sub>D149N/T151L</sub> als EYFP-Fusionsproteine exprimierten, wurden mit 0,5 µg/ml GST-cCPE<sub>wt</sub> (grau), GST-cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> (rot) oder GST-cCPE<sub>S313H</sub> (blau) inkubiert. Gebundenes GST-cCPE wurde mittels Phycoerythrin-gekoppeltem α-GST-Antikörper im Mikroplattenleser gemessen und auf EYFP normalisiert. Dargestellt ist die Bindung der jeweiligen GST-cCPE-Varianten an die unterschiedlichen Cld3 imitierenden Mutanten von Cld5, normalisiert auf die Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> an das jeweilige Cld5-Konstrukt (Relative cCPE-Bindung, %).

Verglichen mit der Bindung von cCPE<sub>wt</sub> zeigte cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> eine deutlich stärkere Bindung an Cld5<sub>wt</sub> und Cld5<sub>D149N<sup>(P-1)</sup></sub>. In beiden Fällen war diese stärker als die Bindung von cCPE<sub>S313H</sub> an eben diese Cld5-Konstrukte. Dahingegen zeigte cCPE<sub>S313H</sub> die stärkste Bindung an Cld5<sub>T151L<sup>(P+1)</sup></sub>, sowie eine leicht stärkere Bindung an Cld5<sub>D149N/T151L<sup>(P-1/P+1)</sup></sub> im Vergleich zu cCPE<sub>wt</sub>. Sowohl bei Cld5<sub>T151L<sup>(P+1)</sup></sub> als auch bei Cld5<sub>D149N/T151L<sup>(P-1/P+1)</sup></sub> ergab sich wiederum eine deutlich schwächere Bindung von cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> als von cCPE<sub>S313H</sub>.

Diese Ergebnisse waren ein weiterer Hinweis darauf, dass die Substitution Y<sub>306</sub> zu dem größeren Tryptophan in cCPE die Tripel-Tyr-Tasche verkleinert.

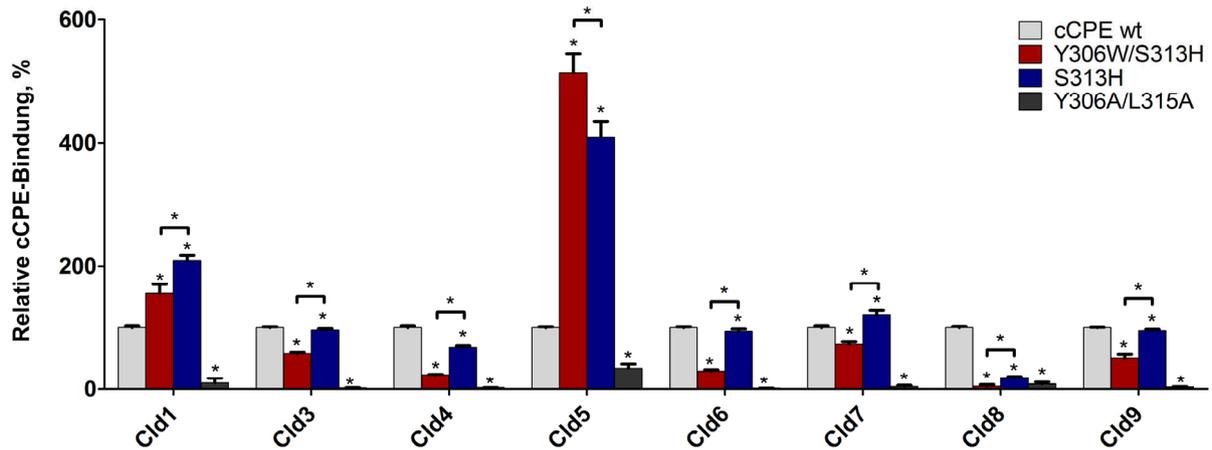
### 3.3.7.2 cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> zeigt eine deutlich limitierte Bindung an Cld1 und Cld3–Cld9

Nun wurde die Bindung von cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> an andere mit cCPE interagierende Claudine (Cld3, Cld4 & Cld6–Cld9) untersucht. Wie das Sequenzalignment der EZS2 dieser Claudine darstellt, besitzen alle außer Cld5 eine größere hydrophobe Aminosäure an Position P+1 des Turns (Abb. 3.30). cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> sollte also an Cld1, Cld3, Cld4 und Cld6–Cld9 schlechter binden als cCPE<sub>S313H</sub> und größtenteils auch schlechter als cCPE<sub>wt</sub>.



**Abb. 3.30: Sequenzalignment der EZS2 von humanem und murinem Cld1, Cld3–Cld9 mit schematischer Darstellung der EZS2.** Grün: große hydrophobe, dunkelgrün: kleine hydrophobe, dunkelblau: polar ungeladene, blau: basische und magenta: saure Aminosäuren, türkis: Tyr, schwarz: Pro und orange: Cys. Nummerierungen: obere Reihe: Sequenznummerierung nach Cld1, untere Reihe: relative Positionsnummerierung nach dem hoch konservierten Prolin (P<sub>151</sub> in Cld1).

Zur Charakterisierung der Bindung von cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> im Vergleich mit cCPE<sub>wt</sub> und cCPE<sub>S313H</sub> wurden zelluläre Bindungsassays mit Cld1<sub>wt</sub>, Cld3<sub>wt</sub>, Cld4<sub>wt</sub>, Cld5<sub>wt</sub>, Cld6<sub>wt</sub>, Cld7<sub>wt</sub>, Cld8<sub>wt</sub> oder Cld9<sub>wt</sub> exprimierenden HEK293-Zelllinien durchgeführt. Als Negativkontrolle der Bindung wurde cCPE<sub>Y306A/L315A</sub> verwendet (Abb. 3.31, folgende Seite).



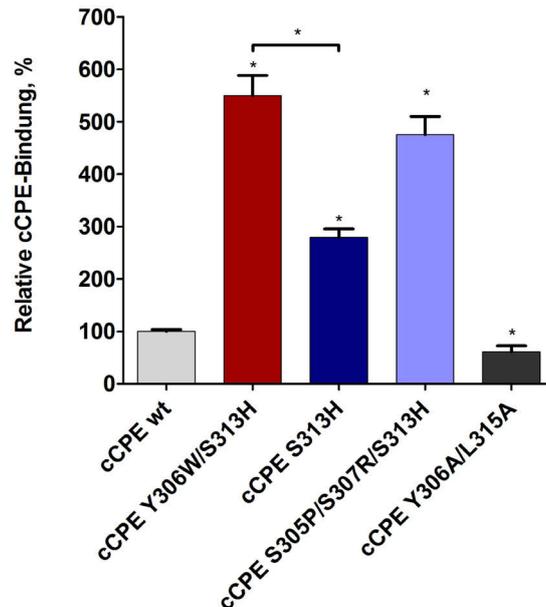
**Abb. 3.31: Bindung von cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> an Cld1 und Cld3–Cld9.** HEK293-Zellen, die Cld1<sub>wt</sub>, Cld3<sub>wt</sub>, Cld4<sub>wt</sub>, Cld5<sub>wt</sub>, Cld6<sub>wt</sub>, Cld7<sub>wt</sub>, Cld8<sub>wt</sub> oder Cld9<sub>wt</sub> als EYFP-Fusionsproteine exprimierten, wurden mit 0,5 µg/ml GST-cCPE<sub>wt</sub> (grau), GST-cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> (rot) oder GST-cCPE<sub>S313H</sub> (blau) inkubiert. Gebundenes GST-cCPE wurde mittels Phycoerythrin-gekoppeltem α-GST-Antikörper im Mikroplattenleser gemessen und auf EYFP normalisiert. Dargestellt ist die Bindung der jeweiligen GST-cCPE-Varianten an die unterschiedlichen Cld<sub>wt</sub>, normalisiert auf die Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> an den jeweiligen Cld<sub>wt</sub> (Relative cCPE-Bindung, %).

cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> zeigte eine deutlich stärkere Bindung an Cld5<sub>wt</sub> als cCPE<sub>S313H</sub> und eine stärkere Bindung als cCPE<sub>wt</sub> an Cld1<sub>wt</sub>, wobei die Bindung deutlich unterhalb der Bindung von cCPE<sub>S313H</sub> an Cld1 lag. An alle anderen getesteten Claudine zeigte cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> eine deutlich schwächere Bindung als cCPE<sub>wt</sub>.

### 3.3.8 cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> zeigt eine deutliche Bindung an Zellen mit endogenem Cld5

Um zu untersuchen, ob die erhöhte Bindung von cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> an Cld5 auch in einem Zellsystem beobachtet werden kann, das endogen hauptsächlich Cld5 exprimiert, wurden zelluläre Bindungsassays mit cEND-Zellen durchgeführt (Abb. 3.32). cEND-Zellen wurden für 30 min mit 5 µg/ml GST-cCPE-Varianten inkubiert, ansonsten erfolgten die zellulären Bindungsassays wie beschrieben (2.4.7.2).

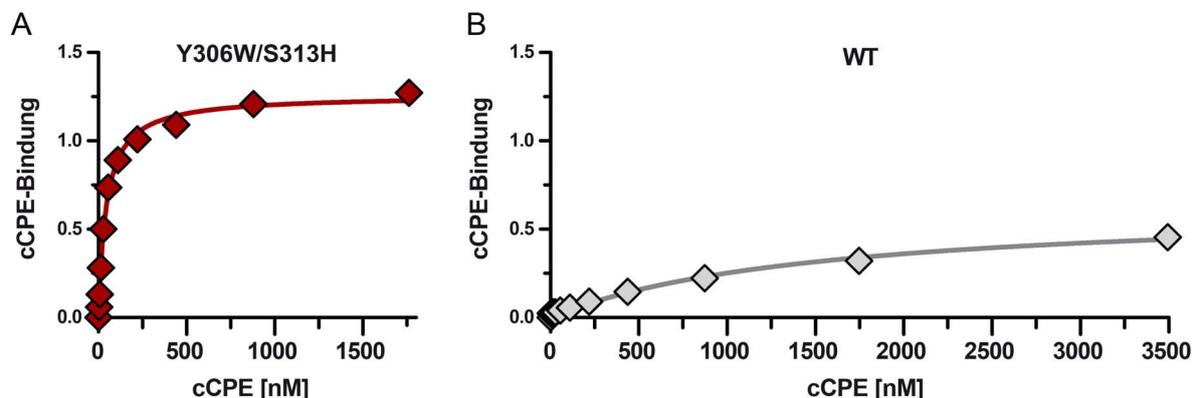
Von allen getesteten cCPE-Varianten zeigte cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> die stärkste Bindung an cEND-Zellen. Die Bindung war signifikant stärker als die Bindung von cCPE<sub>wt</sub> und cCPE<sub>S313H</sub>. Nur cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> zeigte eine vergleichbare, wenn auch tendenziell schwächere Bindung an die cEND-Zellen. Die Ergebnisse bestätigen die beobachtete verstärkte Bindung von cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> an Cld5 in einem Zellsystem, welches hauptsächlich endogenes Cld5 exprimiert. Überraschenderweise ist die unterschiedliche Bindung von cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> zu cCPE<sub>S313H</sub> hier sogar stärker ausgeprägt als im HEK293-Zellsystem.



**Abb. 3.32: Bindung von cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> an endogen Cld5 exprimierende cEND-Zellen.** cEND-Zellen wurden mit 5 µg/ml GST-cCPE<sub>wt</sub> (grau), GST-cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> (rot), GST-cCPE<sub>S313H</sub> (blau), GST-cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> (hellblau) oder GST-cCPE<sub>Y306A/L315A</sub> (dunkelgrau) inkubiert. Gebundenes GST-cCPE wurde mittels Phycoerythrin-gekoppeltem α-GST-Antikörper im Mikroplattenleser gemessen und auf Höchst normalisiert. Dargestellt ist die Bindung der jeweiligen GST-cCPE-Varianten, normalisiert auf die Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> (Relative cCPE-Bindung, %).

### 3.3.9 cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> bindet mit nanomolarer Affinität an Claudin-5

Um die Affinität der Bindung von cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> an Cld5 zu bestimmen, wurde die konzentrationsabhängige Bindung dieser cCPE-Variante an transient mit Cld5 transfizierte HEK293-Zellen wie unter 2.4.8 beschrieben in Zusammenarbeit mit Miriam Eichner gemessen (Abb. 3.33).



**Abb. 3.33: cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> bindet mit einer nanomolaren  $K_d$  and Cld5.** Konzentrationsabhängige Bindungskurven von (A) cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> und (B) cCPE<sub>wt</sub> an Cld5 exprimierende HEK293-Zellen. Die  $K_d$  wurde mit GraphPad Prism Version 5.0 unter Verwendung der "single-site, specific binding" nicht-linearen Regressionsanalyse berechnet.

Die  $K_d$  von cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> für Cld5 wurde mit  $33 \pm 10$  nM bestimmt (Abb. 3.33 A). Im Gegensatz hierzu ließ sich die  $K_d$  der Interaktion von cCPE<sub>wt</sub> und Cld5 nicht bestimmen, da die spezifische Bindung – selbst bei hohen cCPE-Konzentrationen (bis zu 4600 nM) – kein Plateau erreichte (Abb. 3.33 B). Hieraus lässt sich ableiten, dass die  $K_d$  von cCPE<sub>wt</sub> deutlich über 1  $\mu$ M liegt.

### 3.4 Interaktion von cCPE mit Claudin-6 bis Claudin-9

Bisher wurden in dieser Arbeit die Interaktion von unterschiedlichen cCPE-Varianten mit Cld3 und Cld4 und die Änderung der Cld-Subtypspezifität hin zu Cld1 und Cld5 untersucht. cCPE bindet allerdings neben Cld3 und Cld4 auch an weitere Cld-Subtypen mit hoher Affinität (Cld6–Cld9). Für eine Nutzung von cCPE ist eine Charakterisierung der Interaktion von cCPE mit Cld6–Cld9 allerdings unerlässlich, um die Bindung von CPE- bzw. cCPE-Varianten an Zellen mit Expression von unterschiedlichen Cld-Subtypen (z. B. unterschiedliche Tumore oder Gewebe) abschätzen zu können. Für initiale Bindungsstudien der unterschiedlichen in dieser Arbeit beschriebenen cCPE-Varianten mit Cld6–Cld9 wurden zunächst EYFP-Konstrukte von diesen Claudinen erstellt und stabil diese Cld-EYFP-Fusionsproteine exprimierende HEK293-Zelllinien generiert.

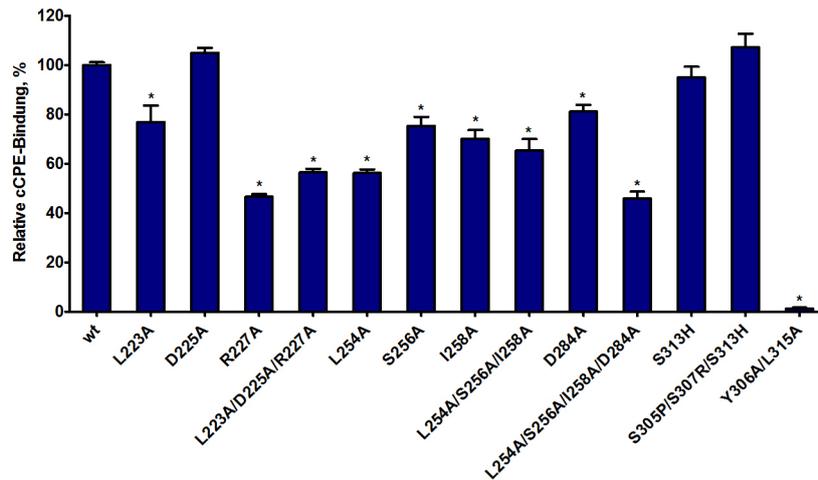
#### 3.4.1 Erstellung der Claudin-YFP-Konstrukte und Generierung von stabil transfizierten Zelllinien

Um die Bindung von cCPE bzw. unterschiedlichen cCPE-Varianten an Cld6–Cld9 zu charakterisieren, mussten zunächst EYFP-Konstrukte von diesen Claudinen mittels restriktionsfreier Klonierung (2.2.4.2) erstellt werden. Um eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Messungen der Bindung von cCPE an Cld6–Cld9 zu erreichen, wurden stabil Cld6-EYFP, Cld7-EYFP, Cld8-EYFP oder Cld9-EYFP exprimierende HEK293-Zelllinien wie unter 2.4.6 beschrieben generiert. Anschließend wurden die Zelllinien mittels Durchflusszytometrie (FACS) sortiert.

#### 3.4.2 Bindungsstudien von cCPE an Claudin-6 bis -9

##### 3.4.2.1 Bindung verschiedener cCPE-Varianten an Cld6

Um den Einfluss von Substitutionen in cCPE auf die Bindung an Cld6 zu charakterisieren, wurden zelluläre Bindungsassays mit stabil Cld6-EYFP exprimierenden HEK293-Zelllinien durchgeführt, als Negativkontrolle wurde GST-cCPE<sub>Y306A/L315A</sub> eingesetzt (Abb. 3.34).



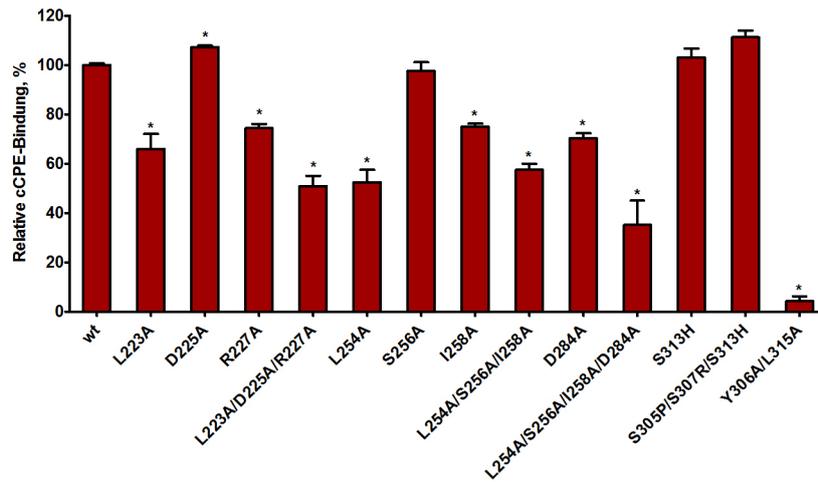
**Abb. 3.34: Die Bindung von cCPE an Cld6 wird unterschiedlich von Aminosäuresubstitutionen in cCPE beeinflusst.** Quantifizierung von zellulären Bindungsassays. Stabil Cld6<sub>wt</sub>-EYFP exprimierende HEK293-Zellen wurden mit 0,5 µg/ml GST-cCPE<sub>wt</sub> oder anderen GST-cCPE-Varianten inkubiert. Gebundenes GST-cCPE wurde mittels Phycoerythrin-gekoppeltem α-GST-Antikörper im Mikroplattenleser gemessen und auf EYFP (Claudin-Expression) normalisiert (Phycoerythrin-/ EYFP- bzw. EGFP-Signal). Gezeigt ist die Bindung der GST-cCPE-Varianten, normalisiert auf die Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> an Cld6<sub>wt</sub> (Relative cCPE-Bindung, %).

Die stärkste Reduktion der Bindung an Cld6, im Vergleich zur Bindung von cCPE<sub>wt</sub>, zeigten cCPE<sub>R227A</sub> und cCPE<sub>L254A/S256A/I258A/D284A</sub>. Auch cCPE<sub>L223A/D225A/R227A</sub> und cCPE<sub>L254A</sub> wiesen eine vergleichbare signifikante Reduktion der Bindung auf, wobei diese etwas schwächer war als die von cCPE<sub>R227A</sub> und cCPE<sub>L254A/S256A/I258A/D284A</sub>. cCPE<sub>L223A</sub>, GST-cCPE<sub>S256A</sub>, cCPE<sub>I258A</sub>, cCPE<sub>L254A/S256A/I258A</sub> und cCPE<sub>D284A</sub> zeigten einen vergleichbaren und wiederum schwächeren negativen Effekt auf die Bindung an Cld6, wohingegen cCPE<sub>D225A</sub>, cCPE<sub>S313H</sub> und cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> keinen signifikanten Effekt auf die Bindung an Cld6 zeigten.

### 3.4.2.2 Bindung verschiedener cCPE-Varianten an Cld7

Um den Einfluss von Substitutionen in cCPE auf die Bindung an Cld7 zu charakterisieren, wurden zelluläre Bindungsassays mit stabil Cld7-EYFP exprimierenden HEK293-Zelllinien durchgeführt, als Negativkontrolle wurde GST-cCPE<sub>Y306A/L315A</sub> eingesetzt (Abb. 3.35, folgende Seite).

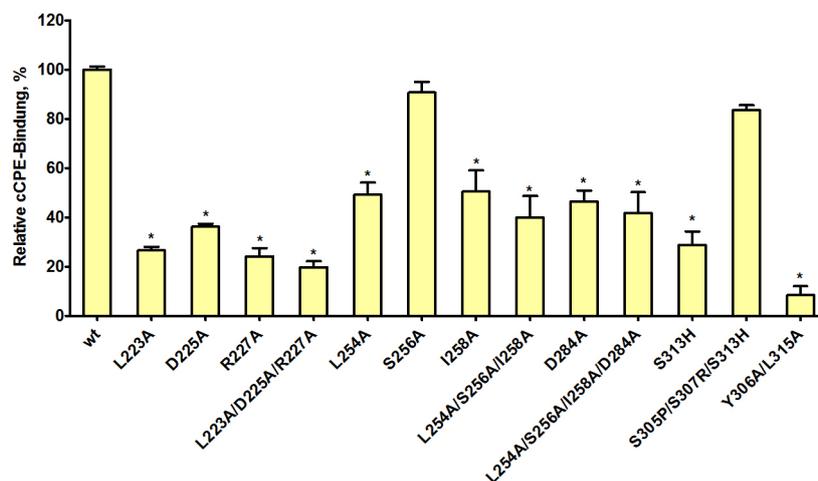
cCPE<sub>L254A/S256A/I258A/D284A</sub> zeigte den stärksten negativen Effekt auf die Bindung an Cld7 verglichen zur Bindung von cCPE<sub>wt</sub>. Ein etwas schwächerer negativer Effekt ließ sich bei den Substitutionen cCPE<sub>L223A/D225A/R227A</sub>, cCPE<sub>L254A</sub> und cCPE<sub>L254A/S256A/I258A</sub> beobachten. cCPE<sub>L223A</sub>, cCPE<sub>R227A</sub>, cCPE<sub>I258A</sub> und cCPE<sub>D284A</sub> zeigten ebenfalls eine deutliche Reduktion der Bindung, wobei diese wiederum etwas schwächer war. cCPE<sub>S256A</sub>, cCPE<sub>S313H</sub> und cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> hatten keinen signifikanten Effekt auf die Bindung, cCPE<sub>D225A</sub> hingegen war sogar schwach bindungssteigernd.



**Abb. 3.35: Die Bindung von cCPE an Cld7 wird unterschiedlich von Aminosäuresubstitutionen in cCPE beeinflusst.** Quantifizierung von zellulären Bindungsassays. Stabil Cld7<sub>wt</sub>-EYFP exprimierende HEK293-Zellen wurden mit 0,5 µg/ml GST-cCPE<sub>wt</sub> oder anderen GST-cCPE-Varianten inkubiert. Gebundenes GST-cCPE wurde mittels Phycoerythrin-gekoppeltem α-GST-Antikörper im Mikroplattenleser gemessen und auf EYFP (Claudin-Expression) normalisiert (Phycoerythrin-/ EYFP- bzw. EGFP-Signal). Gezeigt ist die Bindung der GST-cCPE-Varianten normalisiert auf die Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> an Cld7<sub>wt</sub> (Relative cCPE-Bindung, %).

### 3.4.2.3 Bindung verschiedener cCPE-Varianten an Cld8

Um den Einfluss von Substitutionen in cCPE auf die Bindung an Cld8 zu charakterisieren, wurden zelluläre Bindungsassays mit stabil Cld8-EYFP exprimierenden HEK293-Zelllinien durchgeführt, als Negativkontrolle wurde GST-cCPE<sub>Y306A/L315A</sub> eingesetzt (Abb. 3.36).



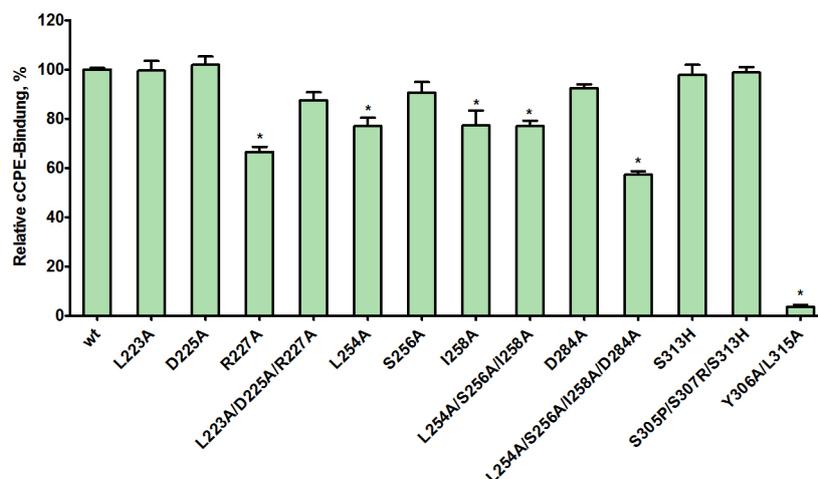
**Abb. 3.36: Die Bindung von cCPE an Cld8 wird unterschiedlich von Aminosäuresubstitutionen in cCPE beeinflusst.** Quantifizierung von zellulären Bindungsassays. Stabil Cld8<sub>wt</sub>-EYFP exprimierende HEK293-Zellen wurden mit 0,5 µg/ml GST-cCPE<sub>wt</sub> oder anderen GST-cCPE-Varianten inkubiert. Gebundenes GST-cCPE wurde mittels Phycoerythrin-gekoppeltem α-GST-Antikörper im Mikroplattenleser gemessen und auf EYFP (Claudin-Expression) normalisiert (Phycoerythrin-/ EYFP- bzw. EGFP-Signal). Gezeigt ist die Bindung der GST-cCPE-Varianten, normalisiert auf die Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> an Cld8<sub>wt</sub> (Relative cCPE-Bindung, %).

Nahezu alle getesteten cCPE-Konstrukte zeigten eine deutliche Reduktion der Bindung an Cld8 im Vergleich zur Bindung von cCPE<sub>wt</sub>, wobei cCPE<sub>L223A</sub>, cCPE<sub>R227A</sub> und cCPE<sub>L223A/D225A/R227A</sub> sich am stärksten negativ auswirkten. Auch cCPE<sub>D225A</sub> und cCPE<sub>S313H</sub>

zeigten eine ähnlich starke Reduktion der Bindung.  $cCPE_{L254A}$ ,  $cCPE_{I258A}$ ,  $cCPE_{L254A/S256A/I258A}$ ,  $cCPE_{D284A}$  und  $cCPE_{L254A/S256A/I258A/D284A}$  ließen eine untereinander vergleichbare, aber etwas schwächere Reduktion der Bindung beobachten. Nur bei  $cCPE_{S256A}$  und  $cCPE_{S305P/S307R/S313H}$  gab es keine signifikante Reduktion.

#### 3.4.2.4 Bindung verschiedener cCPE-Varianten an Cld9

Um den Einfluss von Substitutionen in cCPE auf die Bindung an Cld9 zu charakterisieren, wurden zelluläre Bindungsassays mit stabil Cld9-EYFP exprimierenden HEK293-Zelllinien durchgeführt, als Negativkontrolle wurde GST- $cCPE_{Y306A/L315A}$  eingesetzt (Abb. 3.37).



**Abb. 3.37: Die Bindung von cCPE an Cld9 wird unterschiedlich von Aminosäuresubstitutionen in cCPE beeinflusst.** Quantifizierung von zellulären Bindungsassays. Stabil Cld9<sub>wt</sub>-EYFP exprimierende HEK293-Zellen wurden mit 0,5 µg/ml GST- $cCPE_{wt}$  oder anderen GST- $cCPE$ -Varianten inkubiert. Gebundenes GST- $cCPE$  wurde mittels Phycoerythrin-gekoppeltem  $\alpha$ -GST-Antikörper im Mikropplattenleser gemessen und auf EYFP (Claudin-Expression) normalisiert (Phycoerythrin-/ EYFP- bzw. EGFP-Signal). Gezeigt ist die Bindung der GST- $cCPE$ -Varianten, normalisiert auf die Bindung von GST- $cCPE_{wt}$  an Cld9<sub>wt</sub> (Relative cCPE-Bindung, %).

$cCPE_{L254A/S256A/I258A/D284A}$  zeigte den stärksten negativen Effekt auf die Bindung an Cld9 verglichen zur Bindung von  $cCPE_{wt}$ . Eine etwas schwächere Reduktion der Bindung bewirkten die Substitutionen  $cCPE_{R227A}$ ,  $cCPE_{L254A}$ ,  $cCPE_{I258A}$  und  $cCPE_{L254A/S256A/I258A}$ . Alle anderen getesteten  $cCPE$ -Konstrukte zeigten keinen signifikanten Effekt auf die Bindung an Cld9.

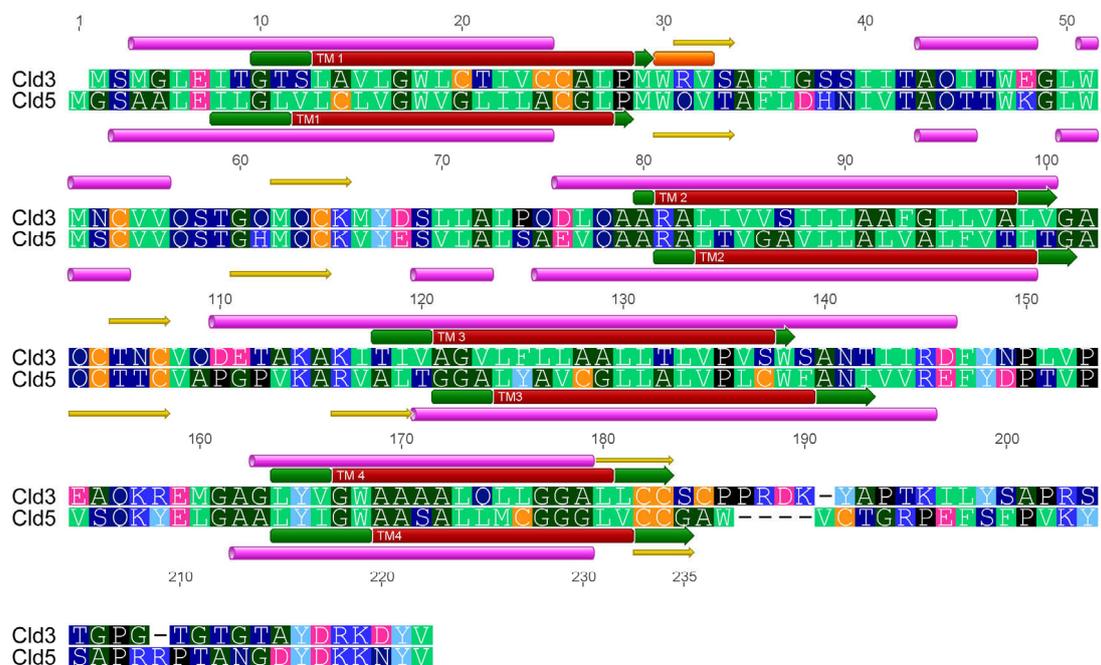
### 3.5 Erweiterung der EZS2: Modellierung der Transmembranhelices von Claudin-3 und Claudin-5

Bisher liegen keinerlei Informationen zur Tertiärstruktur von Claudinen vor. Daher wurden im Zuge der vorliegenden Arbeit Modelle der Transmembranregionen von Claudinen erstellt. Die experimentellen Daten hierfür wurden von Jan Rossa (Rossa *et al.*, 2014, Tab. 8.14) zur

Verfügung gestellt. Da diese Daten sich hauptsächlich auf TMH3 und TMH4 von Cld3 und Cld5 konzentrieren, wurde das Hauptaugenmerk auf die Modellierung eben dieser Transmembranregionen gelegt.

### 3.5.1 Sekundärstruktur und Topologie von Claudin-3 und Claudin-5

Zur Vorhersage der Sekundärstrukturen und der Topologie von Cld3 und Cld5 wurden unterschiedliche im Internet zugängliche Server und Vorhersagemethoden genutzt. Die verwendeten Server sind unter 2.5.1 aufgelistet. Abb. 3.38 zeigt ein Alignment von Cld3 und Cld5 mit Annotation der Sekundärstruktur- und Topologievorhersagen für beide Claudine. Eine detaillierte Aufstellung der Ergebnisse findet sich in tabellarischer Form im Anhang (Cld3: Tab. 8.10, Tab. 8.12 und Cld5: Tab. 8.11, Tab. 8.13).



**Abb. 3.38: Sequenzalignment von murinem Cld3 und Cld5** mit Annotation der Sekundärstruktur- (gelb:  $\beta$ -Faltblätter, pink: Helices, orange: widersprüchliche Vorhersagen) und Topologievorhersage (rot: Konsensusbereich der vorhergesagten Transmembranhelices, grün: Mittelwert). Grün: große hydrophobe, dunkelgrün: kleine hydrophobe, dunkelblau: polar ungeladene, blau: basische und magenta: saure Aminosäuren, türkis: Tyr, schwarz: Pro und orange: Cys.

Für Cld3 wurden 7 Helices und 4  $\beta$ -Faltblätter vorhergesagt, wobei nur 5 Helices eine Länge von 10 Aminosäuren überschritten und von allen 5 gewählten Methoden übereinstimmend vorhergesagt wurden (Tab. 8.10). Die vorhergesagten  $\beta$ -Faltblätter sind meist sehr kurz und wurden nie von mehr als 3 Servern erkannt. Zusätzlich ergaben sich widersprüchliche Vorhersagen an den Positionen 30–34, an denen zwei Server  $\beta$ -Faltblätter und 3 Server helikale Bereiche vorhergesagten. Wie erwartet, wurden 4 TMHs vorhergesagt (Tab. 8.12).

Für Cld5 wurden 7 Helices und 5  $\beta$ -Faltblätter vorhergesagt, wobei nur 4 Helices eine Länge von 10 Aminosäuren überschritten und von allen 5 gewählten Methoden übereinstimmend

vorhergesagt wurden (Tab. 8.11). Wie bei Cld3 sind die vorhergesagten  $\beta$ -Faltblätter relativ kurz und wurden nie von mehr als 3 der genutzten Server erkannt. Auch hier wurden, wie erwartet, 4 TMHs vorhergesagt (Tab. 8.13). Die Lage der vorhergesagten TMHs korrespondiert sehr gut mit denen von Cld3.

### 3.5.2 Identifizierung von Heptaden-Motiven und Erstellung eines *coiled-coil* Templates

Für die Erstellung von Modellen der Transmembranregionen von Cld3 und Cld5 wurde zunächst extensiv in der PDB nach möglichen Templates für eine Homologiemodellierung gesucht. Es ergaben sich allerdings keine Treffer mit genügend hoher Sequenzhomologie (weder für die Gesamtsequenz noch für die einzelnen Helices), um ein reguläres Homologiemodell für Cld3 oder Cld5 zu erstellen. Daher wurde zunächst versucht, anhand von *Helical wheels* und *straight*  $\alpha$ -Helices Rückschlüsse auf die Anordnung der 4 TMHs zu ziehen und die experimentellen Daten zu erklären. Dies führte jedoch nicht zu sinnvollen Ergebnissen. Eine genauere Untersuchung der TMH-Sequenzen ergab eine auffällige Häufung von alternierenden großen oder kleinen Aminosäuren in Heptaden-Positionen (a und d in Tab. 3.3), was für eine *coiled-coil*-ähnliche Struktur der TMHs spricht.

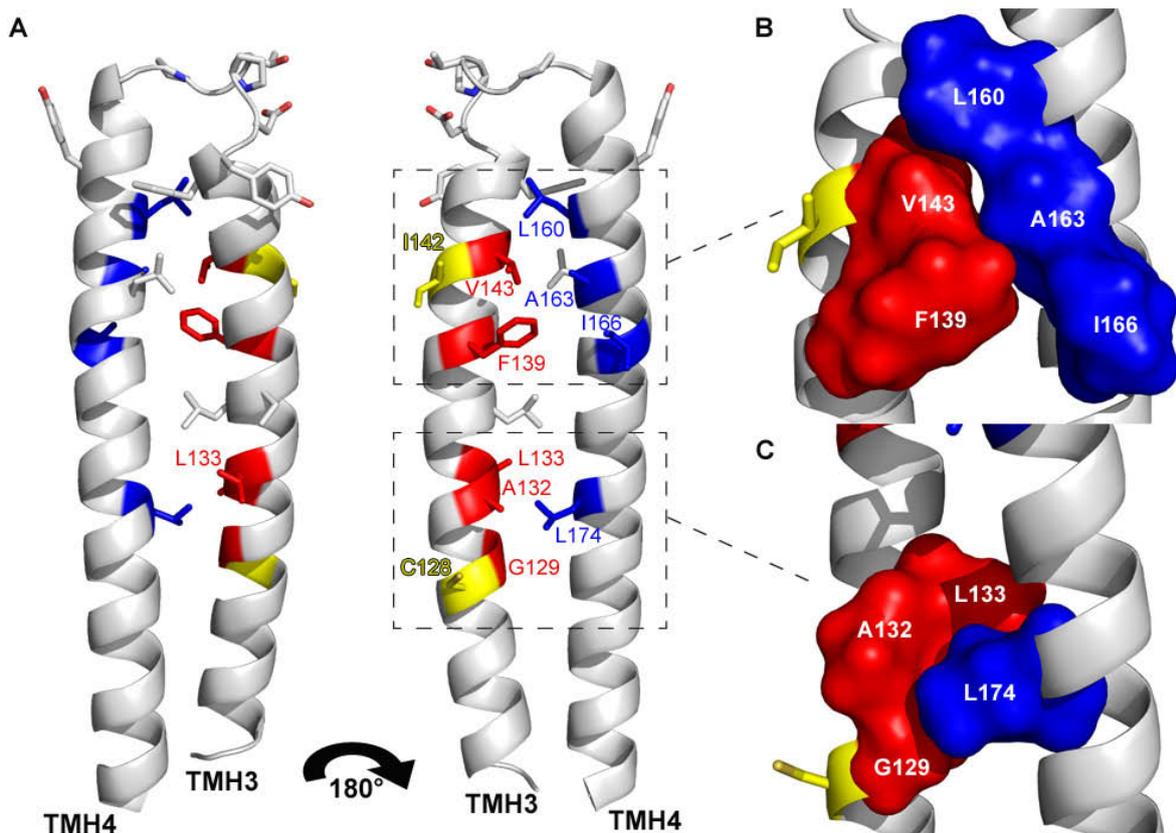
**Tab. 3.3:** Heptaden-Motive in den Transmembranhelices von Cld3 und Cld5 mit nahezu alternierenden großen und kleinen Aminosäuren in Heptaden-Positionen (a und d, schwarz).

		fg <b>abcd</b> efg <b>abcd</b> efg <b>abcd</b> efg
TMH1	Cld3:	ITGTSLAVLGWLCTIVCCALPMW
	Cld5:	ILGLVLCLVGWVGLILACGLPMW
		fg <b>abcd</b> efg <b>abcd</b> efg <b>abcd</b> efg
		g <b>abcd</b> efg <b>abcd</b> efg <b>abcd</b> efgab
TMH2	Cld3:	AARALIVVSILLAAFGLLVALVGA
	Cld5:	AARALTVGAVLLALVALFVTLTGA
		g <b>abcd</b> efg <b>abcd</b> efg <b>abcd</b> efgab
		c <b>defg</b> <b>abcd</b> efg <b>abcd</b> efg <b>abcd</b> efgab
TMH3	Cld3:	ITIVAGVLFLLAALLTLVPVSWANTII
	Cld5:	VALTGGALYAVCGLLALVPLCWANIVV
		c <b>defg</b> <b>abcd</b> efg <b>abcd</b> efg <b>abcd</b> efgab
		bc <b>defg</b> <b>abcd</b> efg <b>abcd</b> efgab
TMH4	Cld3:	GAGLYVGWAAAALQLLGGALLCC
	Cld5:	GAALYIGWAASALLMCGGGLVCC
		bc <b>defg</b> <b>abcd</b> efg <b>abcd</b> efgab

Aufgrund der Heptaden-Motive der TMHs wurde ein „quasiideales vollständig antisymmetrisches *coiled-coil* 4-Transmembranhelixbündel-Template“ erstellt, wie von Seigneuret (Seigneuret, 2006) beschrieben. Darauf basierend wurden Modelle der TMHs von Cld3 und Cld5 generiert und mit den Modellen der EZS2 verknüpft (2.5.3.1).

### 3.5.3 Vergleich der Transmembranhelix-Modelle von Cld3 und Cld5

Da die experimentellen Daten hauptsächlich auf die Interaktion zwischen TMH3 und -4 fokussiert waren (siehe Tab. 8.14), konnte zunächst nur ein erweitertes Modell des Helix-Turn-Helix-Motivs der EZS2 mit den flankierenden Transmembranhelices TMH3 und TMH4 erstellt werden. Das Modell zeigt für das TMH3-TMH4-Interface von Cld5 (Modell S-1, Abb. 3.39) einen hydrophoben Kern zwischen beiden Helices, der in typischer "knobs-into-holes"-Packung gebildet wird.



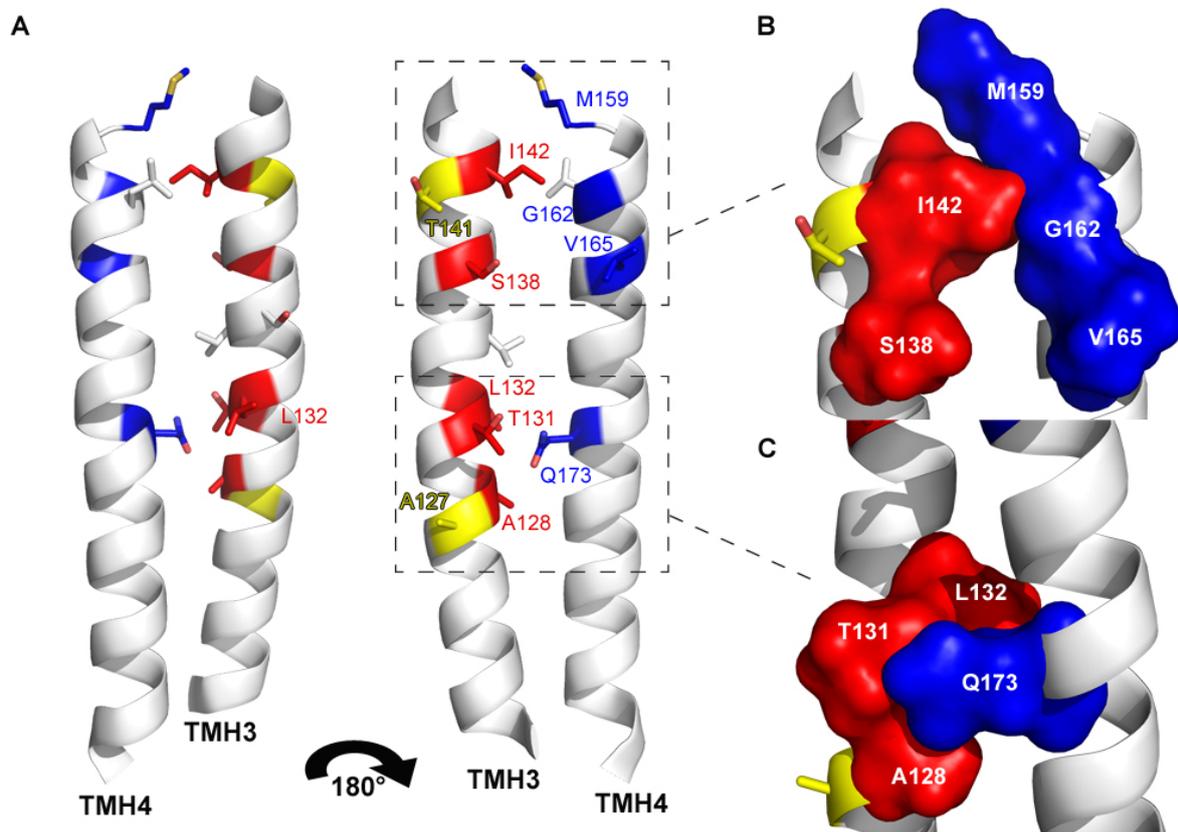
**Abb. 3.39: Homologiemodell der die EZS2 verlängernden TMH3 und TMH4 von Cld5 (Modell S-1) als Cartoondarstellung.** (A) Hervorgehoben sind Aminosäuren (Sticks), die an der Helix-Helix-Interaktion von TMH3 (rot) und TMH4 (blau) beteiligt sind. (B & C) Vergrößerte Ansicht von zwei "Knobs-into-holes"-Interaktionen (gestrichelte Kästen in A). Dargestellt sind die Oberflächen der beteiligten Aminosäuren von TMH3 (rot) und TMH4 (blau).

Die in Abb. 3.39 B & C gezeigte "knobs-into-holes"-Packung wird durch experimentelle Daten bestätigt. In Cld5 führt die Mutation von A<sub>163</sub> zu G zu einem Verlust der Plasmamembranlokalisation und der Kontaktenreicherung. Dieser Effekt konnte durch einen Austausch von V<sub>143</sub> zu I teilweise kompensiert werden. Zusätzlich war dieser Effekt unabhängig von TMH1 und TMH2, woraus auf eine direkte Interaktion dieser beiden Aminosäuren geschlossen werden kann.

Die Einführung der korrespondierenden polaren Aminosäure Glutamin aus Cld3 an Position 174 in Cld5 führte ebenfalls zu einem Verlust der Plasmamembranlokalisation und der Kontaktenreicherung, vermutlich weil das polare Q<sub>174</sub> nicht in die hydrophobe Tasche von TMH3

passt, die durch G<sub>129</sub>, A<sub>132</sub> und L<sub>133</sub> gebildet wird. Die korrespondierenden Aminosäuren der TMH3 von Cld3 sind A<sub>128</sub>, T<sub>131</sub> und L<sub>132</sub>, hier könnte Q<sub>173</sub> mit T<sub>131</sub> interagieren.

Für Cld3 ergab sich ein anderes Bild: Besonders im oberen Bereich des TMH3-TMH4-Interfaces ergaben sich Lücken im hydrophoben Kern der Helixpackung, was darauf schließen lässt, dass die Stellung der TMHs zueinander von der von Cld5 abweicht (Abb. 3.40).



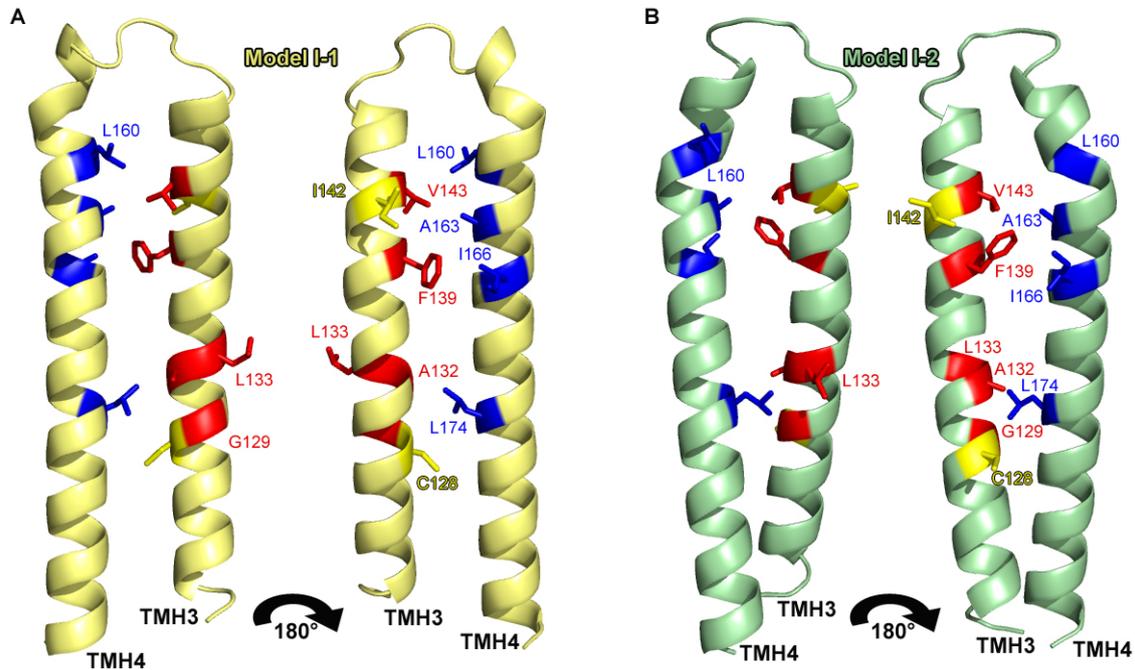
**Abb. 3.40: Homologiemodell der TMH3 und TMH4 von Cld3 als Cartoondarstellung.** (A) Hervorgehoben sind Aminosäuren (Sticks), die an der Helix-Helix-Interaktion von TMH3 (rot) und TMH4 (blau) beteiligt sind. (B & C) Vergrößerte Ansicht der Bereiche, die bei Cld5 "Knobs-into-holes"-Interaktionen zeigen (gestrichelte Kästen in A). Dargestellt sind die Oberflächen der beteiligten Aminosäuren von TMH3 (rot) und TMH4 (blau).

Die experimentellen Daten für Cld3 ließen keine Rückschlüsse auf direkte Interaktionen zwischen der TMH3 und TMH4 von Cld3 zu, weshalb keine Anpassung des Modells vorgenommen werden konnte.

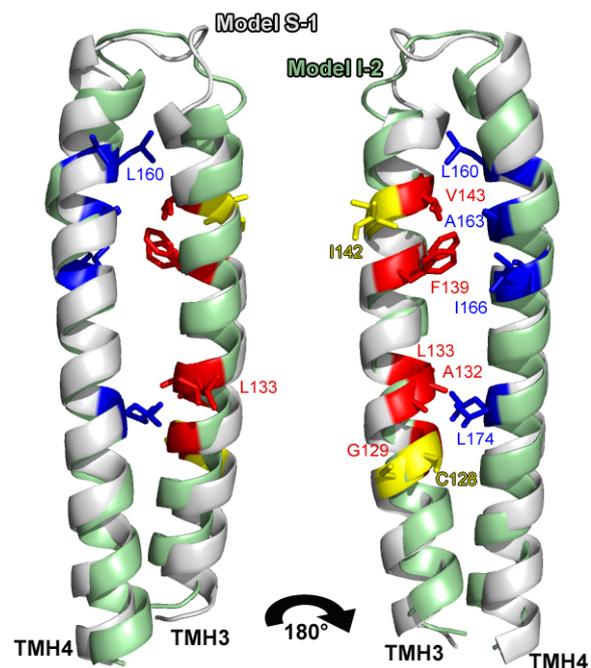
### 3.5.4 *Ab-initio*-Modelle des TMH3-TMH4-Interfaces von Claudin-5

Zusätzlich zu der in 3.5.3 angewandten Methode zur Generierung von Modellen von Cld5 und Cld3, welche template-basiert ist, wurde mit *I-TASSER* eine weitere Methode verwendet, um Modelle von Cld5 zu generieren. *I-TASSER* ist ein auf *Threading* und multiplen Templates basierender Modeling-Server. In zwei unabhängigen Läufen wurden Modelle der

TMH3-EZS2-TMH4-Region von Cld5 generiert, unter Verwendung von (I) dem experimentell bestimmten Kontakt zwischen  $V_{143}$  (TMH3) und  $A_{163}$  (TMH4) und (II) den Kontakten  $V_{143}$  und  $A_{163}$  sowie  $A_{132}$  (TMH3) und  $L_{174}$  (TMH4) als Kontakteinschränkungen (Modell I-1, Modell I-2, Abb. 3.41).



**Abb. 3.41:** *I*-TASSER-Modelle der TMH3 und TMH4 einschließlich der EZS2 von Cld5 als Cartoondarstellung. (A) Modell I-1 (gelb) und (B) Modell I-2. Hervorgehoben sind Aminosäuren (Sticks), die an der Helix-Helix-Interaktion von TMH3 (rot) und TMH4 (blau) beteiligt sind.



**Abb. 3.42:** Überlagerung des Modells I-2 (grün) mit dem auf “*comparative-modeling*“ basierenden Modell S-1 (weiß). Hervorgehoben sind Aminosäuren (Sticks), die an der Helix-Helix-Interaktion von TMH3 (rot) und TMH4 (blau) beteiligt sind. Bis auf  $L_{160}$  ist die Positionierung der gezeigten Aminosäureseitenketten nahezu identisch.

Die Modelle zeigten eine “*root-mean-square deviation*” (RMSD) von 2,61 Å (I-1) bzw. 1,96 Å (I-2) zu Modell S-1. Dies deutet auf eine hohe Ähnlichkeit des TMH3-TMH4-Interfaces zwischen den *I-TASSER*-Modellen und Modell S-1, hier dargestellt für Modell S-1 und Modell I-2 (Abb. 3.42).

Wie in Modell S-1 sind V<sub>143</sub> und A<sub>163</sub> in Modell I-1 und I-2 Bestandteil der “*knobs-into-holes*”-Packung zwischen TMH3 und TMH4, die durch F<sub>139</sub> und I<sub>166</sub> fortgesetzt wird. Allerdings zeigen sie in anderen Punkten deutliche Abweichungen von Modell S-1. So zeigt, im Gegensatz zu Modell S-1, C<sub>128</sub> (TMH3) von Modell I-1 zur TMH4, während G<sub>129</sub>, A<sub>132</sub> und L<sub>133</sub> (TMH3) von dem interhelikalen Interface weg zeigen. In Modell I-2 ist dieses Interface sehr ähnlich zu Modell S-1, aber anders als dort zeigt L<sub>160</sub> (TMH4) hier nicht zu TMH3 und ist nicht Bestandteil der “*knobs-into-holes*”-Packung.

### 3.5.5 Bioinformatische Analyse evolutionär verknüpfter Kontakte in Claudin-5

Zusätzlich zu den unterschiedlichen Modeling-Ansätzen für das TMH3-EZS2-TMH4-Interface von Cld5 wurde auch versucht, TMH-TMH-Kontakte mittels evolutionär korrelierenden Mutationen, sogenannten “*evolutionary couplings*” (ECs), zu ermitteln. Hierzu wurde der EVfold-Server verwendet. Insgesamt wurden 500 ECs mittels EVfold identifiziert. Eine Auswertung der 40 höchstgewerteten ECs ergab 18 ECs, die in der vorhergesagten TM-Region von Cld5 lagen (Tab. 3.4).

**Tab. 3.4:** Evolutionäre Kontakte im Bereich der TM-Region von Cld5

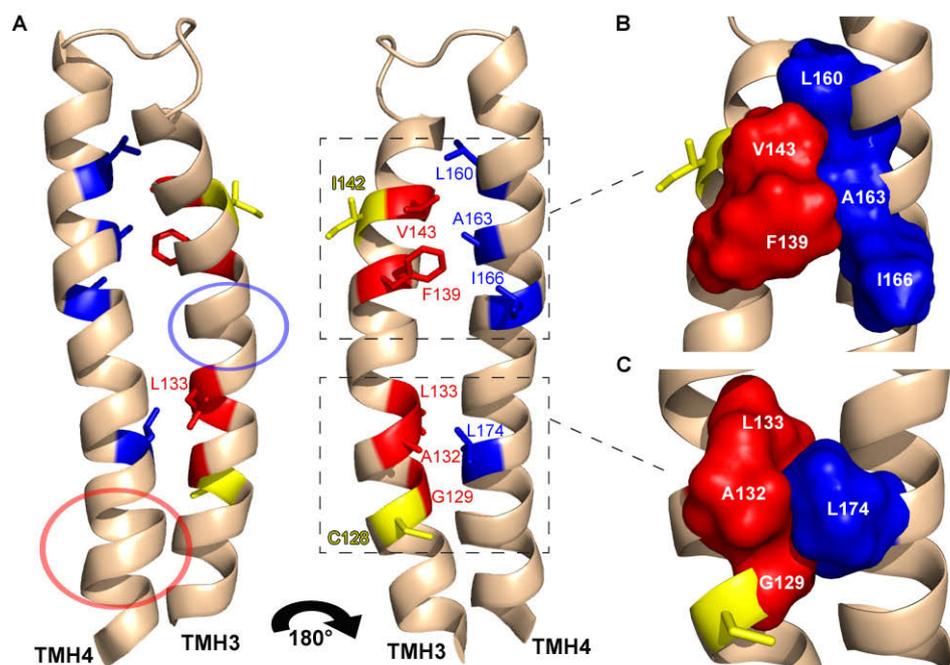
TMH1	TMH2	TMH2	TMH3
W <sub>18</sub>	A <sub>91</sub>	T <sub>98</sub>	G <sub>121</sub>
C <sub>25</sub>	T <sub>84</sub>	T <sub>84</sub>	A <sub>132</sub>
I <sub>22</sub>	V <sub>88</sub>	A <sub>87</sub>	A <sub>132</sub>
A <sub>24</sub>	T <sub>84</sub>		
V <sub>19</sub>	L <sub>95</sub>		
TMH1	TMH4	TMH3	TMH4
A <sub>24</sub>	A <sub>170</sub>	A <sub>132</sub>	A <sub>170</sub>
L <sub>27</sub>	A <sub>163</sub>	L <sub>136</sub>	G <sub>167</sub>
A <sub>24</sub>	A <sub>163</sub>	A <sub>126</sub>	G <sub>178</sub>
		G <sub>122</sub>	G <sub>178</sub>
		A <sub>140</sub>	W <sub>168</sub>
TMH1	TMH3	E <sub>146</sub>	Q <sub>156</sub>
C <sub>14</sub>	Y <sub>125</sub>		

Eine Kartierung dieser ECs auf Modell S-1 bzw. ein Rückgriff auf das zugrunde liegende “*optimal coiled-coil*” Template ergaben eine Häufung dieser ECs auf distinkten Seiten der Helices, wodurch sich eindeutig zuordenbare interhelicale Interfaces der einzelnen Helices ergaben. EVfold kann auch zur Strukturvorhersage mittels ECs genutzt werden, allerdings ergab die Vorhersage nur sehr unwahrscheinliche Modelle mit verknoteten TMHs und EZSs. Dies liegt vermutlich an einer hohen Anzahl von ECs, die nicht intramolekulare Kontakte,

sondern *cis*- oder *trans*-Interaktionsinterfaces abbilden, welche von der automatisierten Vorhersagemethode nicht unterschieden werden können.

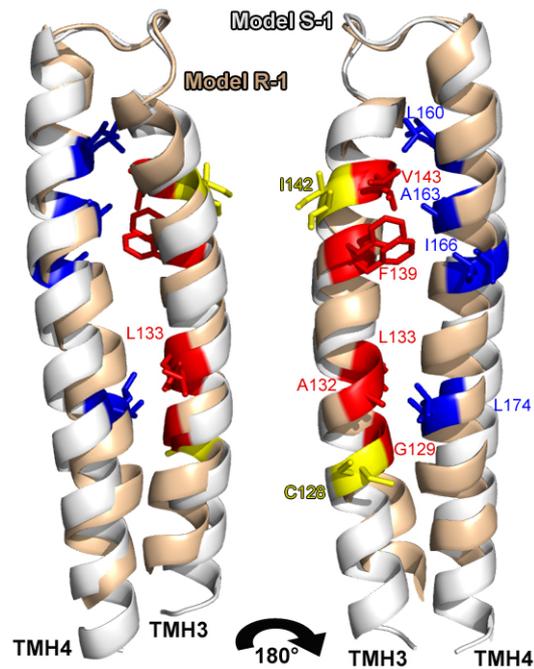
### 3.5.6 *Ab-initio*-Modell von Claudin-5

Da Modell S-1 auf einem „optimalen *coiled-coil*“ Helixbündel basiert und daher keine möglichen strukturellen Besonderheiten wie „*Glycine-Bulges*“ oder „*Proline-Kinks*“ mit einschließt, und um eine vollständige Modellierung der Struktur von Cld5 zu erhalten, wurde das „Rosetta membrane *ab-initio* protocol“ unter Verwendung der experimentell bestimmten Kontakte sowie den in Tab. 3.4 gelisteten ECs als Einschränkungen verwendet. Das Modell mit der niedrigsten Energie bei gleichzeitiger Erfüllung der meisten Einschränkungen wurde als bestes Modell gewählt (Modell R-1, Abb. 3.43).



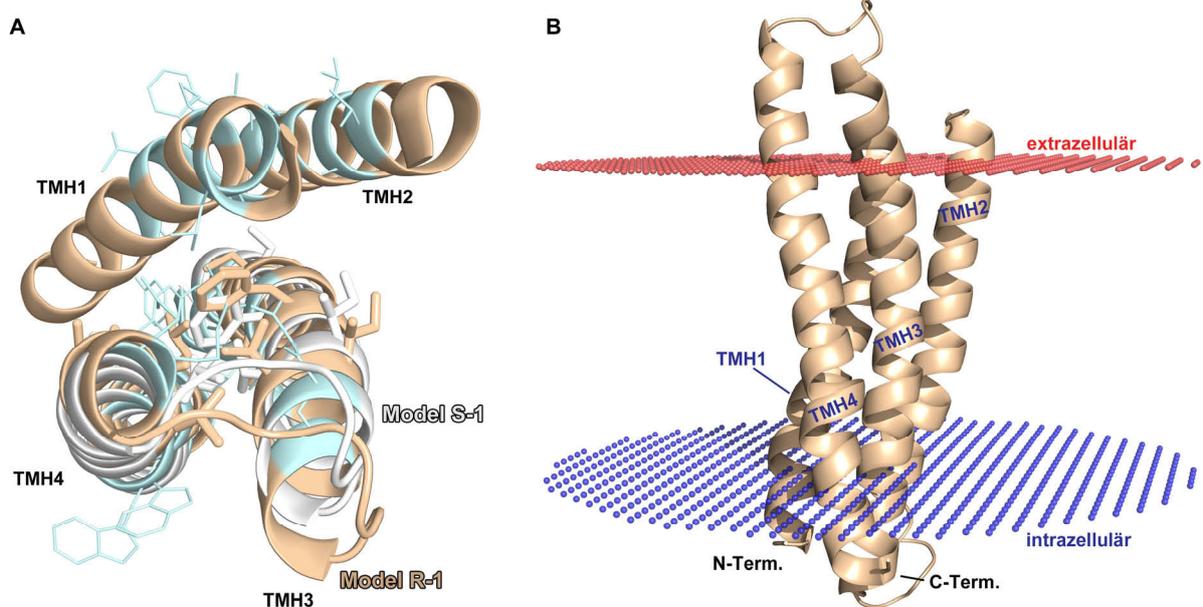
**Abb. 3.43: Ausschnitt aus dem Rosetta-Modell (Modell R-1), das die TMH3 und TMH4 einschließlich der EZS2 von Cld5 als Cartoondarstellung zeigt. (A)** Hervorgehoben sind Aminosäuren (Sticks), die an der Helix-Helix-Interaktion von TMH3 (rot) und TMH4 (blau) beteiligt sind. Durch farbige Kreise hervorgehoben sind die Positionen eines „*Glycine-Bulge*“ ( $_{177}\text{GGG}_{179}$ , rot) und eines „*Proline-Kink*“ ( $\text{P}_{135}$ , blau). **(B & C)** Vergrößerte Ansicht der Bereiche, die bei Cld5 „*Knobs-into-holes*“-Interaktionen zeigen (gestrichelte Kästen in A). Dargestellt sind die Oberflächen der beteiligten Aminosäuren von TMH3 (rot) und TMH4 (blau).

Modell R-1 besitzt eine RMSD von 2,17 Å zu Modell S-1 und zeigt einen „*Proline-Kink*“, ausgelöst durch  $\text{P}_{135}$ , und einen „*Glycine-Bulges*“, gebildet durch  $_{177}\text{GGG}_{179}$ . Somit besitzt es strukturelle Besonderheiten, die von Modell S-1 nicht abgebildet wurden (Abb. 3.43). Dennoch ist das Interface der experimentell bestimmten Kontakte von Modell R-1 und Modell S-1 nahezu identisch (RMSD 1,38 Å) und Modell R-1 zeigt eine sehr hohe Ähnlichkeit zu unserem vorherigen Modell der EZS2 von Cld5 (RMSD 1,18 Å, Abb. 3.44).



**Abb. 3.44:** Überlagerung des TMH3-EZS2-TMH4-Bereichs von Modell R-1 (beige) mit dem auf “comparative-modeling” basierenden Modell S-1 (weiß). Hervorgehoben sind Aminosäuren (Sticks), die an der Helix-Helix-Interaktion von TMH3 (rot) und TMH4 (blau) beteiligt sind. Die Positionierung der gezeigten Aminosäureseitenketten ist nahezu identisch, und auch die Turn-Region der EZS2 von Modell R-1 ist der von Modell S-1 bzw. der des eigentlichen EZS2-Modells sehr ähnlich.

Die TMHs sind im Uhrzeigersinn in einer 1-2-3-4-Anordnung rhombisch zueinander verschoben. Des Weiteren wurde die Positionierung von Modell R-1 in der Membran mittels des PPM-Servers berechnet (Abb. 3.45).



**Abb. 3.45:** Modell R-1 zeigt eine rhombische Anordnung der 4 Transmembranhelices. (A) Aufsicht auf Modell R-1 (Cartoon, beige) und S-1 (Cartoon, weiß) von der extrazellulären Seite. Die experimentell bestimmten Kontakte sind dargestellt als Sticks, und die ECs sind als Linien (türkis) gezeichnet. (B) Positionierung von Modell R-1 (Cartoon, beige) in einer berechneten Membran (rot, extrazelluläre Seite; blau intrazelluläre Seite). Die EZS1 sowie der intrazelluläre C-Terminus von Cld5 wurden hier der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.

Wie Abb. 3.45 zeigt, wurde Modell R-1 korrekt in die Membran eingelagert. Nach der Berechnung des PPM-Servers ergeben sich die folgenden Transmembranhelices: 6–30 (TMH1), 79–102 (TMH2), 121–141 (TMH3) und 161–186 (TMH4). Die vorhergesagte hydrophobe Dicke des Modells R-1 beträgt  $32 \pm 2 \text{ \AA}$  mit einer Neigung von  $15 \pm 6^\circ$ .

### 3.6 Markierung von cCPE

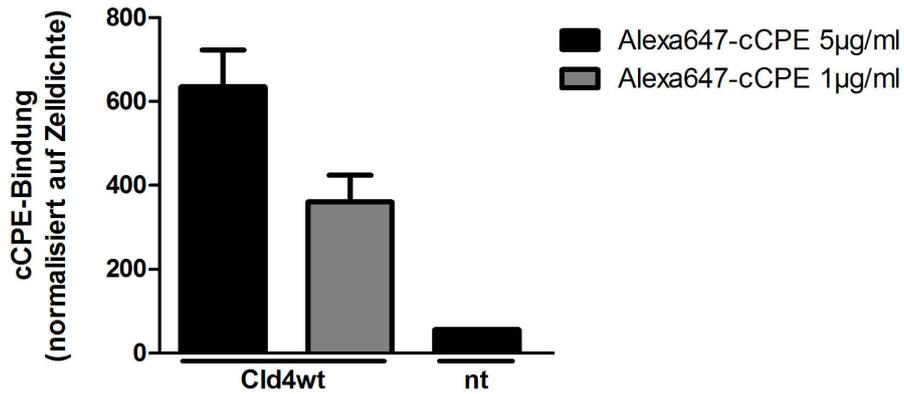
In verschiedenen Tumoren wurde eine Überexpression von bestimmten Cld-Subtypen festgestellt. Aufgrund der Lage auf der Zelloberfläche sind Claudine ein interessanter Biomarker in der Tumordiagnostik. Da cCPE hochspezifisch an bestimmte Claudine bindet, würden sich fluoreszenz- oder anderweitig markierte cCPE-Varianten zur Detektion von Claudinen in bildgebenden Verfahren eignen. Zunächst musste hierfür jedoch die prinzipielle Möglichkeit zur kovalenten Modifikation von cCPE mit Fluorophoren oder anderen Agenzien getestet werden. Um dies zu untersuchen, wurde im Zuge dieser Arbeit versucht, cCPE kovalent sowohl mit Fluorophoren als auch mit Cryptophan A zu koppeln. Cryptophan A ist eine käfigartige, ballförmige, supramolekulare organische Verbindung mit einem hydrophoben Hohlraum im Inneren. In diesen Hohlraum eingelagertes Xenon (Xe) zeigt eine deutlich veränderte Resonanzfrequenz des Kernspins im Vergleich zu freiem Xe. Zudem ist es möglich, eingelagertes Xe selektiv zu depolarisieren, was zu einem Verlust des NMR-Signals und somit zu einem Negativkontrast führt. Daher könnte mit Cryptophan A markiertes cCPE zur Bildgebung mittels MRT in der Tumordiagnostik eingesetzt werden.

Da cCPE keine zugänglichen Cysteine auf der Oberfläche aufweist, dafür aber einige Lysine, wurde eine Koppelung mittels NHS-Ester an primäre Amine ausgewählt. Da sich ein Lysin ( $K_{257}$ ) sehr nahe an der Claudin-Bindungstasche von cCPE befindet, wurde GST-cCPE $_{K257A}$  für die Koppelungen verwendet, um einen Verlust der Bindung von cCPE an Claudine durch Blockade der Bindungstasche bei kovalenten Modifikationen zu verhindern.

#### 3.6.1 Herstellung eines mit Fluorophoren gekoppelten cCPE-Konstrukts

Die kovalente Koppelung von GST-cCPE $_{K257A}$  mit Alexa Fluor<sup>®</sup>647-NHS-Ester wurde wie unter Abschnitt 2.3.5.1 beschrieben durchgeführt. Es wurden 1 mg GST-cCPE $_{K257A}$  eingesetzt und nach der Aufreinigung 0,9 mg Alexa647-cCPE gewonnen. 1 mol Alexa647-cCPE ist durchschnittlich mit 4,9 mol Alexa Fluor<sup>®</sup>647 gekoppelt.

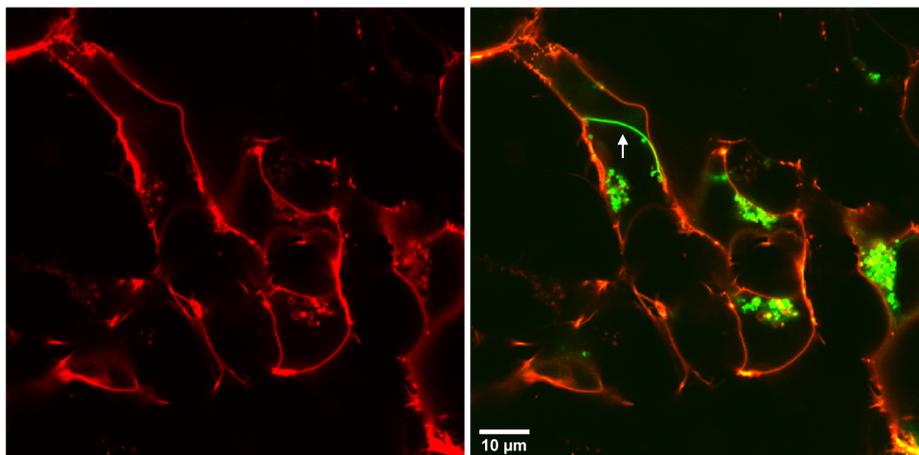
Nach erfolgreicher Koppelung von Alexa Fluor<sup>®</sup>647 mit cCPE $_{K257A}$  wurde die Bindungsfähigkeit von Alexa647-cCPE an Cld4 $_{wt}$  in zellulären Bindungsassays (Abb. 3.46), und an Cld3 $_{wt}$  (Abb. 3.47) sowie Cld5 $_{D149NT151L}$  und Cld5 $_{wt}$  mikroskopisch (Abb. 3.48) getestet.



**Abb. 3.46: Bindung von Alexa647-cCPE an Cld4 exprimierende HEK293-Zellen.** Als Kontrolle dienten untransfizierte HEK293-Zellen.  $n = 3$ , dargestellte Ergebnisse sind der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

Im zellulären Bindungsassay ergab sich eine klare konzentrationsabhängige Bindung von Alexa647-cCPE an Cld4<sub>wt</sub> mit einem Verhältnis des Signals zum Hintergrund (unspezifische Bindung von Alexa647-cCPE an untransfizierte HEK293-Zellen) von  $11,4 \pm 3,4$ .

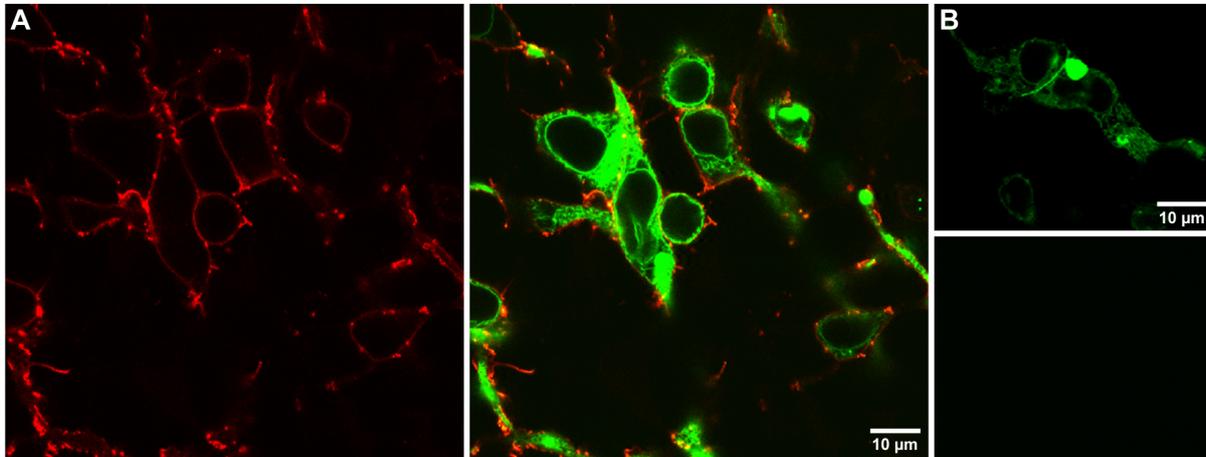
Die qualitative mikroskopische Analyse der Bindung von Alexa647-cCPE an Cld3<sub>wt</sub> (Abb. 3.47) und Cld5<sub>D149N/T151L</sub> bzw. Cld5<sub>wt</sub> (Abb. 3.48, folgende Seite) auf der Oberfläche von lebenden HEK293-Zellen erfolgte wie unter Abschnitt 2.4.9 beschrieben. Hierbei sollte sich eine deutliche Bindung von Alexa647-cCPE an Cld3<sub>wt</sub> und Cld5<sub>D149N/T151L</sub> zeigen, wohingegen keine Bindung an Cld5<sub>wt</sub> sichtbar sein sollte.



**Abb. 3.47: Bindung von Alexa Fluor<sup>®</sup>647-gekoppeltem GST-cCPE<sub>K257A</sub> (rot) an Cld3-EYFP (grün) auf der Oberfläche von lebenden HEK293-Zellen.** Weißer Pfeil: Zell-Zell-Kontakt von zwei Cld3 exprimierenden HEK293-Zellen.

Alexa647-cCPE zeigte eine deutliche Bindung an die Oberfläche von Cld3<sub>wt</sub>-EYFP exprimierenden HEK293-Zellen (Abb. 3.47, links). In der Überlagerung des Alexa647-cCPE-Signals mit dem Signal von Cld3<sub>wt</sub>-YFP (Abb. 3.47, rechts) zeigte sich, dass ein Bindung von

Alexa647-cCPE nur an Zellen erfolgte, die auch Cld3 exprimieren. Zusätzlich erwies sich, dass *trans*-interagierendes Cld3<sub>wt</sub> in Zell-Zell-Kontakten nicht für cCPE zugänglich ist (weißer Pfeil Abb. 3.47).



**Abb. 3.48:** (A) Bindung von Alexa Fluor<sup>®</sup>647-gekoppeltem GST-cCPEK257A (rot) an Cld5<sub>D149N/T151L</sub>-EYFP (grün) auf der Oberfläche von lebenden HEK293-Zellen. (B) Es wurde keine Bindung von Alexa Fluor<sup>®</sup>647-gekoppeltem GST-cCPE<sub>K257A</sub> (rot) an Cld5<sub>wt</sub> (grün) detektiert.

Wie erwartet, zeigte Alexa647-cCPE eine deutliche Bindung an die Oberfläche von Cld5<sub>D149N/T151L</sub>-EYFP exprimierenden HEK293-Zellen (Abb. 3.48 A, links). Die Überlagerung des Alexa647-cCPE-Signals mit dem Signal von Cld5<sub>D149N/T151L</sub>-YFP (Abb. 3.48 A, rechts) weist darauf hin, dass eine Bindung von Alexa647-cCPE nur an Zellen erfolgt, die auch Cld5<sub>D149N/T151L</sub>-EYFP exprimieren. Im Gegensatz zu Cld3<sub>wt</sub> konnte kaum EYFP-Signal in der Zellmembran detektiert werden.

Im Gegensatz zur Bindung an Cld5<sub>D149N/T151L</sub>-YFP zeigte Alexa647-cCPE wie erwartet keine Bindung an die Oberfläche von Cld5<sub>wt</sub>-YFP exprimierenden HEK293-Zellen (Abb. 3.48 B, oben YFP-Signal, unten Alexa647-Signal).

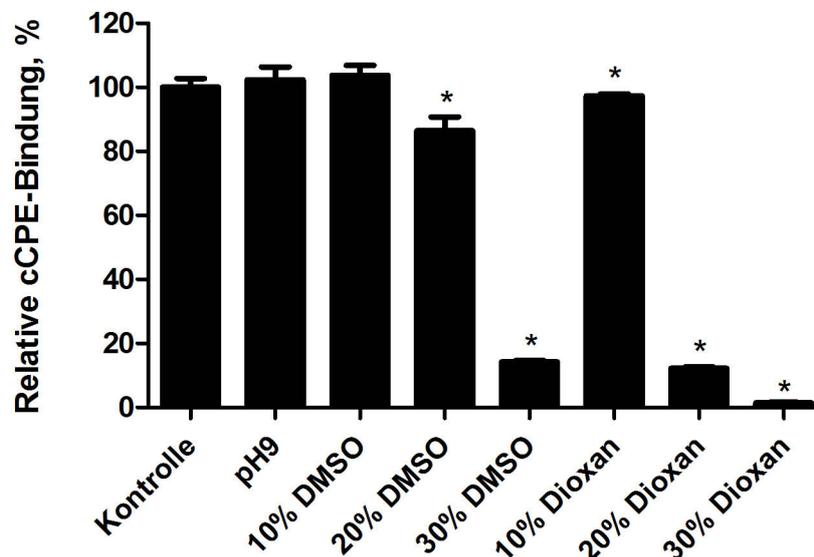
### 3.6.2 Generierung eines mit Cryptophan A gekoppelten cCPE-Konstrukts

#### 3.6.2.1 Chemische Stabilität von cCPE und Kontrolle des Einflusses von Cryptophan auf die Bindungsfähigkeit von cCPE

Da Cryptophan A schlecht in wässrigen Lösungsmitteln löslich ist, wurde zunächst der Einfluss von zwei unterschiedlichen Lösungsmitteln (DMSO & Dioxan) in unterschiedlichen Konzentrationen auf cCPE untersucht. NHS-Ester reagieren mit primären Aminen am effektivsten bei leicht alkalischen Bedingungen, daher wurde zusätzlich die pH-Stabilität von cCPE bei pH 9 getestet.

Hierzu wurde GST-cCPE<sub>wt</sub> zunächst für 2h in PBS mit 10%, 20% oder 30% (v/v) DMSO bzw. Dioxan- bzw. Bicarbonatpuffer pH 9,0 inkubiert. Anschließend erfolgte ein Pufferwechsel zu

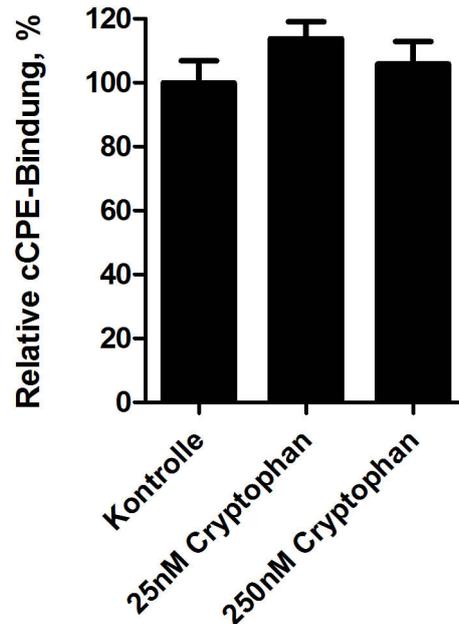
PBS wie unter Abschnitt 2.3.1.2 beschrieben. Mit den unterschiedlich behandelten GST-cCPE<sub>wt</sub>-Proben wurde abschließend ein zellulärer Bindungsassay mit EGFP-Cld4<sub>wt</sub> exprimierenden HEK293-Zellen durchgeführt, um die Bindungsfähigkeit an Cld4<sub>wt</sub> zu analysieren; als Kontrolle wurde unbehandeltes GST-cCPE<sub>wt</sub> verwendet (Abb. 3.49).



**Abb. 3.49: Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf die Bindungsfähigkeit von cCPE an Cld4 exprimierende HEK293-Zellen.** cCPE<sub>wt</sub> wurde 2h unter den aufgeführten Bedingungen inkubiert, anschließend auf PBS umgepuffert, und abschließend erfolgte ein zellulärer Bindungsassay zur Kontrolle der Bindung. Kontrolle = unbehandeltes cCPE<sub>wt</sub>.

Weder eine Inkubation bei leicht alkalischem pH noch in PBS mit 10% (v/v) DMSO hatte Einfluss auf die Bindung von GST-cCPE<sub>wt</sub> an Cld4. Erst nach einer Vorbehandlung mit PBS mit 20% (v/v) DMSO war eine leichte Reduktion der Bindung zu erkennen, und bei 30% (v/v) DMSO trat ein deutlicher Bindungsverlust auf. Bei den Proben, die mit Dioxan vorbehandelt wurden, trat schon bei 10% (v/v) Dioxan ein leichter Bindungsverlust von cCPE an Cld4 auf, und nach Behandlung mit 20% (v/v) sowie 30% (v/v) Dioxan band cCPE nur noch sehr schwach an Cld4.

Zusätzlich wurde untersucht, ob die Anwesenheit von Cryptophan A die Bindung von cCPE an Claudine beeinflusst, da sich Cryptophan in die Claudin-Bindungstasche von cCPE einlagern könnte und somit eine Bindung von cCPE an Claudine blockieren würde. Um dies zu überprüfen, wurde GST-cCPE<sub>K257A</sub> (25 nM) in einem 1:1 (25 nM) und 1:10 (250 nM) -fachen molaren Verhältnis mit Cryptophan A für 2h vorinkubiert, und anschließend wurde ein zellulärer Bindungsassay mit EGFP-Cld4 exprimierenden HEK293-Zellen durchgeführt. Als Kontrolle der cCPE-Bindung diente unbehandeltes GST-cCPE<sub>K257A</sub> (Abb. 3.50).



**Abb. 3.50: Einfluss von Cryptophan A auf die Bindung von cCPE<sub>wt</sub> an Cld4 exprimierende HEK293-Zellen.** 25 nM cCPE wurde für 30 min mit den angegebenen Konzentrationen von Cryptophan A inkubiert, anschließend erfolgte ein zellulärer Bindungsassay zur Kontrolle der Bindung. Kontrolle = unbehandeltes cCPE<sub>K257A</sub>. n = 3, dargestellte Ergebnisse sind der Mittelwert ± Standardabweichung.

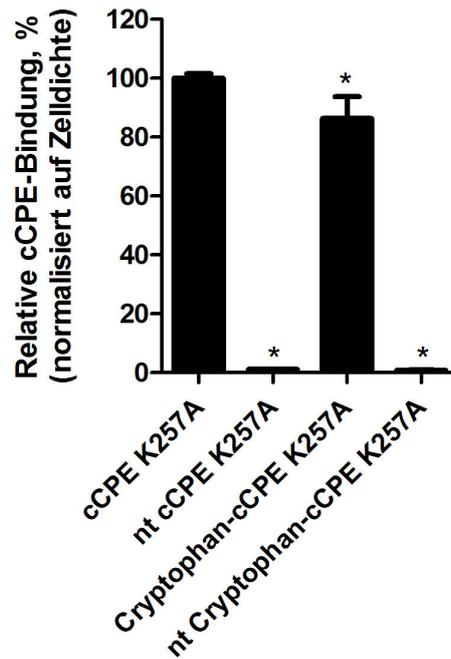
Beide getesteten Konzentrationen von Cryptophan zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Bindung von GST-cCPE<sub>K257A</sub> an GFP-Cld4 im Vergleich zur Kontrolle.

### 3.6.2.2 Cryptophan-cCPE<sub>K257A</sub> zeigt Bindung an Cld3 und Cld4, allerdings kein Signal im *multinuclear NMR microimaging system*

Die Koppelung von GST-cCPE<sub>K257A</sub> wurde wie unter Abschnitt 2.3.5.2 beschrieben durchgeführt. Es wurden 5,47 mg GST-cCPE<sub>K257A</sub> eingesetzt, und nach Aufreinigung wurden 3,66 mg Cryptophan-cCPE<sub>K257A</sub> gewonnen.

Zusätzlich wurde die Koppelung von Cryptophan A an das gewonnene Cryptophan-cCPE<sub>K257A</sub> von Christopher Witte (Ag Leif Schröder) im „*multinuclear NMR microimaging system*“ getestet, es ergab sich eine Cryptophan-A-Konzentration von ca. 8 µM in Cryptophan-cCPE<sub>K257A</sub>, somit lag die Koppelungseffizienz bei  $8 \mu\text{M} / 86,8 \mu\text{M} = 0,09$ . Das heißt: nur etwa jedes zehnte cCPE-Molekül wurde mit Cryptophan A markiert.

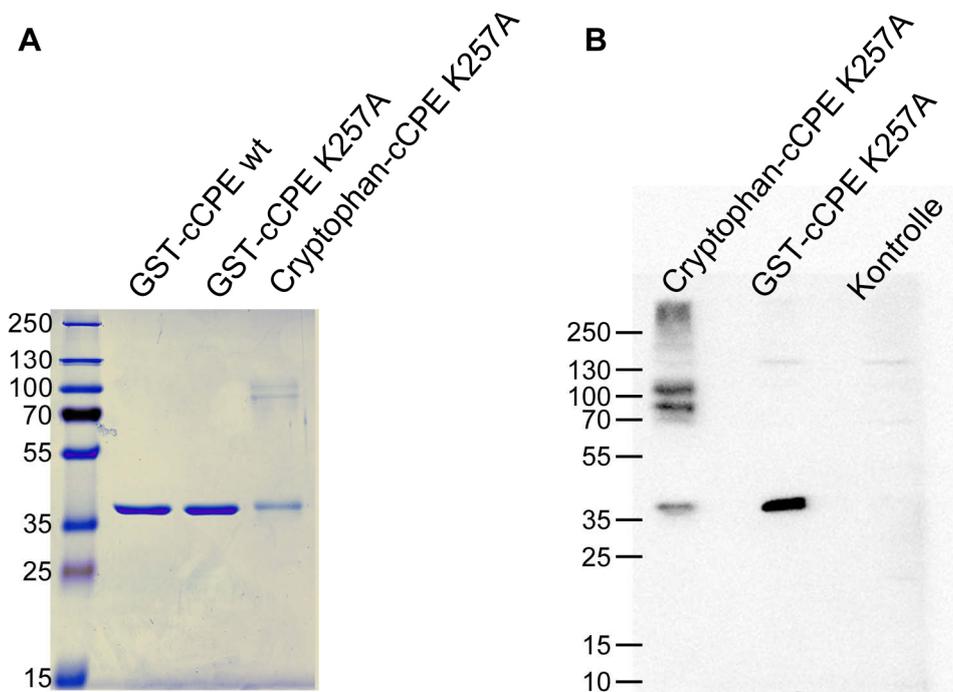
Um zu überprüfen, ob die Koppelung von Cryptophan A an cCPE die Bindungseigenschaften an Claudine im Vergleich zu GST-cCPE<sub>K257A</sub> beeinflusst, wurde ein zellulärer Bindungsassay mit EGFP-Cld4<sub>wt</sub> exprimierenden HEK293-Zellen durchgeführt. Als Negativkontrolle, und um die unspezifische Bindung zu kontrollieren, wurden untransfizierte HEK293-Zellen mit den cCPE-Konstrukten inkubiert (Abb. 3.51).



**Abb. 3.51: Bindung von Cryptophan-cCPE<sub>K257A</sub> an Cld4<sub>wt</sub> exprimierende HEK293-Zellen** im Vergleich zur Bindung von cCPE<sub>K257A</sub>, als Kontrolle dienten untransfizierte HEK293-Zellen.

Cryptophan-cCPE<sub>K257A</sub> zeigte eine leicht verringerte Bindung an Cld4<sub>wt</sub> im Vergleich zu GST-cCPE<sub>K257A</sub> bei ähnlicher unspezifischer Bindung an die Oberfläche von HEK293-Zellen.

Zur Kontrolle der Qualität der Cryptophan-cCPE<sub>K257A</sub>-Präparation wurden je 20µg von GST-cCPE<sub>wt</sub>, GST-cCPE<sub>K257A</sub> und Cryptophan-cCPE<sub>K257A</sub> auf ein 12% SDS-Gel aufgetragen (Abb. 3.52 A).



**Abb. 3.52: Cryptophan-cCPE zeigt hochmolekulare Banden im SDS-Gel und im Western Blot.** (A) Coomassie-gefärbtes SDS-Gel von GST-cCPE<sub>wt</sub>, GST-cCPE<sub>K257A</sub> und Cryptophan-cCPE<sub>K257A</sub>. (B) Western Blot zellulärer Bindungsassays von Cryptophan-cCPE<sub>K257A</sub> und GST-cCPE<sub>K257A</sub> mit Cld3<sub>wt</sub> exprimierenden HEK293-Zellen. Kontrolle: zellulärer Bindungsassay von Cryptophan-cCPE<sub>K257A</sub> mit untransfizierten HEK293-Zellen.

Cryptophan-cCPE<sub>K257A</sub> zeigte im Gegensatz zu GST-cCPE<sub>wt</sub> und GST-cCPE<sub>K257A</sub> zwei hochmolekulare Banden bei ca. 90 kDa und 100 kDa (Abb. 3.52 A). Hierbei handelte es sich vermutlich um SDS-resistente cCPE-Multimere (Dimere).

Um zu kontrollieren, ob diese Cryptophan-cCPE<sub>K257A</sub>-Multimere auch an Cld binden können, wurden zelluläre Bindungsassays mit HEK293-Zellen und anschließender Auswertung mittels Western Blot wie in Abschnitt 2.4.7.1 beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle der Bindung diente GST-cCPE<sub>K257A</sub>. Zur Kontrolle der Spezifität der Bindung wurden untransfizierte HEK293-Zellen mit Cryptophan-cCPE<sub>K257A</sub> inkubiert (Abb. 3.52 B). Die Multimere von Cryptophan-cCPE<sub>K257A</sub> zeigten eine deutliche Bindung an Cld3. Zusätzlich zu den beiden Banden bei ca. 90 kDa und 100 kDa konnten im Western Blot sogar noch Multimere mit einer molekularen Masse von über 250 kDa detektiert werden.

Nachdem die Bindung von Cryptophan-cCPE<sub>K257A</sub> an Cld3 und Cld4 in zellulären Bindungsassays nachgewiesen wurde, wurde nun versucht, an Claudin gebundenes Cryptophan-cCPE<sub>K257A</sub> im „*multinuclear NMR microimaging system*“ zu detektieren. Hierzu wurde ein modifizierter zellulärer Bindungsassay durchgeführt. Je 75 cm<sup>2</sup> eines konfluenten Monolayers einer stabil Cld3<sub>wt</sub> exprimierenden HEK293-Zelllinie sowie untransfizierte HEK293-Zellen wurden mit 1 µg/ml bzw. 10 µg/ml Cryptophan-cCPE<sub>K257A</sub> in DMEM (10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin) für 30 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, anschließend gewaschen, fixiert, gequenchet und mittels Zellschabern geerntet.

Die Zellpellets wurden in 0,5 ml ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und von Christopher Witte im „*multinuclear NMR microimaging system*“ analysiert. Leider ließ sich in keiner der Proben ein Signal detektieren. Zusätzlich wurde auch versucht, das ungebundene Cryptophan-cCPE<sub>K257A</sub> zu detektieren. Hierzu wurde je 1 ml der Cryptophan-cCPE<sub>K257A</sub> enthaltenden Medien nach Inkubation der Zellen aufkonzentriert, in 1 ml ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und – ebenfalls von Christopher Witte – im „*multinuclear NMR microimaging system*“ analysiert. Auch hier ließ sich kein Cryptophansignal detektieren.

## 4 Diskussion

### 4.1 Vergleich unterschiedlicher Methoden zur Analyse der cCPE-Claudin-Interaktion

Die in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete Methode zur Messung der Bindung von cCPE an Claudine, der zelluläre Bindungsassay (Abschnitt 2.4.7), erlaubt – im Gegensatz zu Pull-down-Assays oder Peptid-basierten Assays – die Untersuchung der Bindung von cCPE an nativ in der Zellmembran vorliegende Claudine. Hierin liegt der große Vorteil der zellulären Bindungsassays gegenüber Peptid-basierten Assays, da Peptide häufig nicht in der nativen Konformation vorliegen. So konnte zum Beispiel keine Bindung von CPE an Cld4<sub>wt</sub>-Peptide festgestellt werden (Winkler *et al.*, 2009), obwohl für cCPE die höchste Affinität zu Cld4 beschrieben wurde (Sonoda *et al.*, 1999).

Auch gegenüber Pulldown-Assays zur Untersuchung der Claudin-cCPE-Interaktion ist dies ein Vorteil, da bei diesen die Solubilisierung der Claudine mit Detergenzien nötig ist. Die Anwesenheit von Detergenzien kann die Konformation von Proteinen verändern (Rafferty *et al.*, 1977), wodurch es auch zu Änderungen der Interaktionseigenschaften kommen kann, wie das unterschiedliche Bindungsverhalten von GST-cCPE<sub>L223A</sub> an Cld3 und Cld4 in zellulären Bindungsassays und Pulldown-Assays zeigt (siehe 3.2.2, Abb. 3.4).

Ein Nachteil der zelluläreren Bindungsassays ist jedoch, dass die Bindung von CPE an Claudine durch die Anwesenheit von anderen TJ-Proteinen beeinflusst werden kann. Dies wird allerdings durch den Einsatz von Zellen ohne endogene TJ-Proteine wie z. B. L-Fibroblasten (Saitou *et al.*, 1997; Furuse *et al.*, 1998a), oder HEK293-Zellen (Winkler, 2007; Piontek *et al.*, 2008) umgangen. Dieses Problem gilt aber umso mehr für Pulldown-Assays mit Zelllysaten, da hier sogar cytoplasmatische Proteine Einfluss auf die Bindung haben können. Nur bei Peptid-basierten Assays kann der Einfluss von anderen Proteinen auf die Bindung ausgeschlossen werden, da hier aufgereinigte Proteine und chemisch hergestellte Peptide verwendet werden.

Allerdings sollte bedacht werden, dass die Bedingungen im zellulären Bindungsassay am ehesten den Bedingungen der CPE-Bindung *in vivo* entsprechen, vor allem bei Nutzung von Zellen mit endogener Claudin- und TJ-Protein-Expression (z. B.: cEND-, Caco2- oder MDCKI-Zellen). Dies ist ein großer Vorteil bezüglich einer späteren Verwendung von CPE bzw. cCPE als „*Biological*“, da diese Zellen physiologisch relevante zelluläre Barrieren ausbilden (Sonoda *et al.*, 1999; Kondoh *et al.*, 2006).

## 4.2 Neue Quantifizierungsmethode des zellulären Bindungsassays beschleunigt *Screening* von cCPE- und Claudin-Konstrukten

Da zur Untersuchung der cCPE-Claudin-Interaktion die Bindung einer Vielzahl von unterschiedlichen cCPE- und Claudin-Konstrukten aneinander charakterisiert werden musste, wurde zu Beginn der Arbeit eine neue Quantifizierungsmethode für zelluläre Bindungsassays von cCPE an Claudine entwickelt (Abschnitt 2.4.7.2). Je nach verwendeter Antikörperverdünnung ergab sich ein Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis von  $45 \pm 2$  bis  $60 \pm 2$  (siehe 3.1.1), und es ergab sich eine eindeutige Abhängigkeit des Signals von der eingesetzten cCPE-Konzentration (3.1.2, Abb. 3.2). Somit lässt sich schließen, dass die Untersuchung der cCPE-Claudin-Interaktion durch zelluläre Bindungsassays mit Quantifizierung mittels primärer Fluorophor-gekoppelter Antikörper möglich ist.

Im Vergleich zur Quantifizierung der zellulären Bindungsassays mittels SDS-Page und Western Blotting ist die Quantifizierung der Bindung von GST-cCPE an Claudine mittels primärer Fluorophor-gekoppelter Antikörper deutlich schneller. Für die Durchführung eines zellulären Bindungsassays mit Quantifizierung mittels Western Blot werden mindestens 10 h benötigt, wohingegen die Durchführung mit Quantifizierung mittels primärer Fluorophor-gekoppelter Antikörper maximal 4 h dauert (vergleiche Abschnitt 2.4.7.1 & 2.4.7.2).

Zusätzlich erlaubt diese Quantifizierungsmethode die gleichzeitige Messung von 12 (eine 24-well-Platte) unterschiedlichen GST-cCPE-Claudin-Kombinationen im Vergleich zu 5 (ein SDS-Gel mit 12 Taschen) bei Quantifizierung mittels Western Blot. Somit erlaubt die Quantifizierung der Bindung von cCPE an Claudine mittels primärer Fluorophor-gekoppelter Antikörper einen wesentlich höheren Durchsatz an Proben und ist daher besser für ein *Screening* der unterschiedlichen Konstrukte geeignet. Zudem kann mit einem angepassten Protokoll auch die Dissoziationskonstante der cCPE-Claudin-Interaktion bestimmt werden (siehe 2.4.8 und 3.3.9), was weder bei Pulldown-Assays noch im Western Blot möglich wäre. Ein weiterer Vorteil der Quantifizierung mittels primärer Fluorophor-gekoppelter Antikörper ist, dass die Detektion der Bindung von cCPE direkt an den Zellen erfolgt, und nicht erst nach Zellernte, SDS-Page und Western Blotting; In all diesen Schritten kann es zu einer Häufung von Fehlern kommen, die das Messergebnis verfälschen.

Der größte Nachteil der Quantifizierung mittels primärer Fluorophor-gekoppelter Antikörper gegenüber dem Western Blot ist, dass bei zellulären Bindungsassays mit Zelllinien, die endogen unterschiedliche Claudine exprimieren, nicht die Bindung von CPE an die einzelnen Claudine untersucht werden kann, sondern nur die totale Bindung an alle Claudine detektiert wird.

Im Gegensatz zur Quantifizierung mittels Western Blot kann man die Bindung von cCPE an Claudine im zellulären Bindungsassay mit Quantifizierung mittels primärer Fluorophor-gekoppelter Antikörper auch auf lebenden Zellen verfolgen – allerdings ergab sich hier ein deutlich

schlechteres Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis im Vergleich zu fixierten Zellen (vgl. 3.1.1, Abb. 3.1 A & B). Dies liegt vermutlich an einer Internalisierung des cCPEs wie der Antikörper.

### 4.3 Die Claudin-Bindungstasche von CPE

Als die vorliegende Arbeit begonnen wurde, war nur relativ wenig über die in die Cld-Bindung involvierten Reste von cCPE bekannt. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass eine Deletion der letzten 16 bzw. 29 Aminosäuren (290–319, bzw. 304–319) zu einem Verlust der Cld-Bindung führt (Kondoh *et al.*, 2006), und dass 4 Aminosäuren (Y<sub>306</sub>, Y<sub>310</sub>, Y<sub>312</sub> & L<sub>315</sub>) aus diesem Bereich besonders wichtig für die Bindung an Cld4 sind: Ein Austausch dieser Aminosäuren zu Alanin führt zu einem drastischen Bindungsverlust (Ebihara *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2008). Die Kombination der Ergebnisse dieser Studien mit der Kristallstruktur der C-terminalen Domäne von CPE (PDB: 2QUO; Van Itallie *et al.*, 2008) ermöglichte es nun, weitere Aminosäuren (L<sub>223</sub>, D<sub>225</sub>, R<sub>227</sub>, L<sub>254</sub>, S<sub>256</sub>, K<sub>257</sub>, I<sub>258</sub> & D<sub>284</sub>) zu identifizieren, die mit den vorher beschriebenen Aminosäuren eine putative Cld-Bindungstasche formen und möglicherweise an der Cld-Bindung beteiligt sind (siehe 3.2.1).

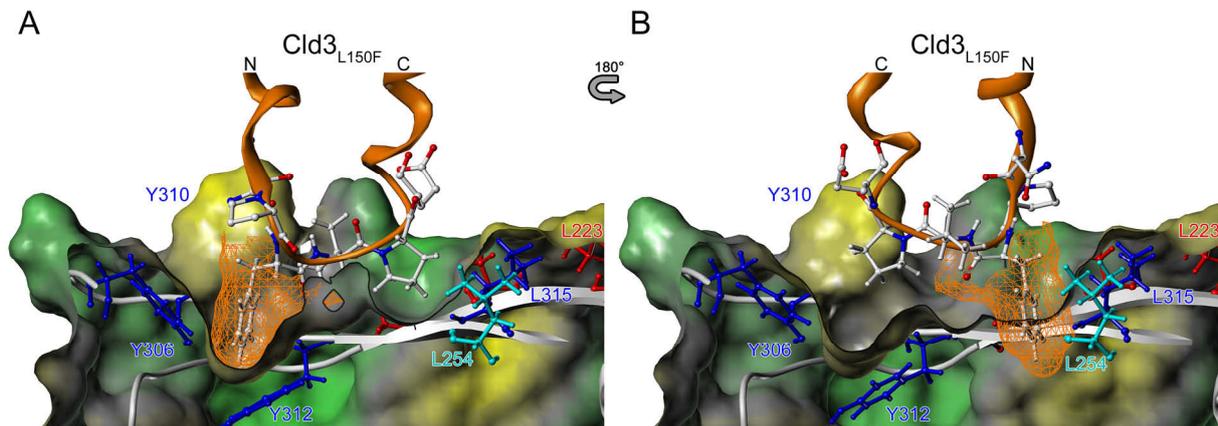
Durch Bindungsstudien der mit Alanin substituierten cCPE-Konstrukte dieser Positionen an Cld3 und Cld4 konnte eine eindeutige Beteiligung der Aminosäuren L<sub>223</sub>, R<sub>227</sub>, L<sub>254</sub>, I<sub>258</sub> (oder S<sub>256</sub>) und D<sub>284</sub> nachgewiesen werden (siehe 3.2.2, Abb. 3.4). Somit wurde gezeigt, dass die Bindung von CPE an Claudine nicht nur von den letzten 29 C-terminalen Aminosäuren von CPE abhängt, und dass die putative Bindungstasche die tatsächliche Cld-Bindungstasche von CPE ist.

#### 4.3.1 Die Orientierung der EZS2 in der Bindungstasche von cCPE

Ebenso war es zu Beginn der Arbeit unklar, in welcher Orientierung die EZS2 von Cld3 oder Cld4 in der Bindungstasche von cCPE sitzt. Prinzipiell waren zwei Orientierungen möglich. In einer Orientierung würde L<sub>150</sub><sup>(P+1)</sup> (Cld3) bzw. L<sub>151</sub><sup>(P+1)</sup> (Cld4) in der Tripel-Tyr-Tasche von CPE zu liegen kommen (3.2.5, Abb. 3.9, Ia), in der anderen (3.2.5, Abb. 3.9, Ib) würden es in der Tripel-Leu-Tasche sitzen.

Um die Orientierung der EZS2 in der Bindungstasche von CPE zu untersuchen, wurden L<sub>150</sub><sup>(P+1)</sup> von Cld3 und L<sub>151</sub><sup>(P+1)</sup> von Cld4 jeweils gegen Phenylalanin ausgetauscht, da nach genauerer Betrachtung der Claudin-Bindungstasche von cCPE<sub>wt</sub> die Hypothese aufgestellt wurde, dass F<sub>150</sub><sup>(P+1)</sup> (Cld3<sub>L150F</sub>) bzw. F<sub>151</sub><sup>(P+1)</sup> (Cld4<sub>L151F</sub>) nur in die Tripel-Tyr-Tasche und nicht in die Tripel-Leu-Tasche von cCPE passt (3.2.5, Abb. 3.9 IIa & IIb).

Wie die Ergebnisse der zellulären Bindungsassays zeigen, ist die Bindung von cCPE<sub>wt</sub> an Cld3<sub>L150F</sub> und Cld4<sub>L151F</sub> vergleichbar mit der Bindung von cCPE<sub>wt</sub> an den jeweiligen Claudin-Wildtyp (3.2.5, Abb. 3.10 A). Der Hypothese nach muss die EZS2 von Cld3<sub>L150F</sub> bzw. Cld4<sub>L151F</sub> also in Orientierung IIa von cCPE gebunden werden, da cCPE nicht in Orientierung IIb an Cld3<sub>L150F</sub> bzw. Cld4<sub>L151F</sub> binden kann. In Abbildung Abb. 4.1 sind diese beiden Orientierungen als detaillierte Interaktionsmodelle der EZS2 von Cld3<sub>L150F</sub> mit cCPE<sub>wt</sub> dargestellt.



**Abb. 4.1: Detailliertes Interaktionsmodell der EZS2 von Cld3<sub>L150F</sub> (orange, Cartoon) mit cCPE<sub>wt</sub> im Querschnitt, mit den Aminosäuren der Turn-Region in Kugel-Stab-Darstellung (weiß: C und H, blau: N, rot: O) sowie der Oberfläche von F<sub>150</sub><sup>(P+1)</sup> (orange, Gitternetz). cCPE gezeigt als Cartoon (weiß), mit Oberfläche mit berechnetem hydrophobem Potential (gelb: hydrophob, grau: unpolar, grün: polar/geladen) und den die Bindungstasche definierenden Aminosäuren in Kugel-Stab-Darstellung (blau: als wichtig für Cld4-Bindung beschrieben; rot: „oberer Rand“ der Bindungstasche; türkis: „unterer Rand“ der Bindungstasche). (A) F<sub>150</sub><sup>(P+1)</sup> passt sterisch gut in die Tripel-Tyr-Tasche, wohingegen (B) die Tripel-Leu-Tasche zu flach ist, um F<sub>150</sub><sup>(P+1)</sup> aufzunehmen; In dieser Orientierung kann cCPE nicht an Cld3<sub>L150F</sub> binden.**

In Orientierung IIa (Abb. 4.1 A) liegt F<sub>150</sub><sup>(P+1)</sup> von Cld3<sub>L150F</sub> in der Tripel-Tyr-Tasche von cCPE und kann mit Y<sub>306</sub> und Y<sub>312</sub>  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen ausbilden, wohingegen in Orientierung IIb (Abb. 4.1 B) eine sterische Kollision von F<sub>150</sub><sup>(P+1)</sup> mit dem  $\beta$ -Faltblatt – gebildet durch  $\beta$ 4 und  $\beta$ 9 – vorliegt, und somit keine Bindung stattfinden kann. Die Bindung von cCPE<sub>wt</sub> an Cld3<sub>L150F</sub> bzw. Cld4<sub>L151F</sub> kann also nur in Orientierung IIa stattfinden.

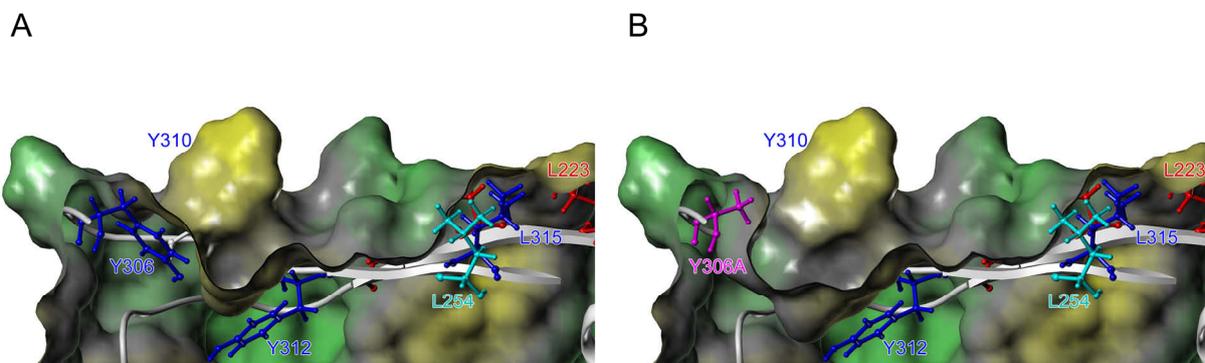
Dies wird durch die Wiederherstellung der Bindung von cCPE<sub>Y306A</sub> an Cld3<sub>L150F</sub> bzw. Cld4<sub>L151F</sub> gestützt, da hierdurch eine direkte Interaktion von F<sub>150</sub><sup>(P+1)</sup> (Cld3) bzw. F<sub>151</sub><sup>(P+1)</sup> (Cld4) mit der Tripel-Tyr-Tasche von cCPE nachgewiesen wurde (siehe, 3.2.5 Abb. 3.10 B; vgl. auch 4.3.1.1). Zusätzlich ergaben sich keine starken Unterschiede in der relativen Bindung der anderen getesteten cCPE-Varianten an Cld3<sub>L150F</sub> und Cld4<sub>L151F</sub> im Vergleich zum jeweiligen Cld<sub>wt</sub> (3.2.5, Abb. 3.10 B). Hieraus kann geschlossen werden, dass sich die Orientierung der EZS2 von Cld3<sub>wt</sub> und Cld4<sub>wt</sub> in der Bindungstasche von cCPE nicht von der Orientierung der EZS2 von Cld3<sub>L150F</sub> und Cld4<sub>L151F</sub> unterscheidet.

Hierzu passt auch der Befund von Anna Piontek, dass keine Interaktion von  $N_{148}^{(P-1)}$  (Cld3) mit  $D_{284}$  (cCPE) nachgewiesen werden konnte (Veshnyakova *et al.*, 2012), eine Interaktion dieser Aminosäuren wäre nur in Orientierung Ib möglich.

Die Tripel-Tyr-Tasche interagiert also mit größeren hydrophoben Aminosäuren ( $L_{150}^{(P+1)}/L_{151}^{(P+1)}$  in murinem und humanem Cld3 sowie in humanem Cld4;  $M_{151}^{(P+1)}$  in murinem Cld4) – dies ist eine Schlüsselinteraktion der cCPE-Claudin-Bindung. Die kleineren hydrophoben Aminosäuren ( $P_{153}^{(P+3)}$  von Cld3 und  $A_{154}^{(P+3)}$  von Cld4) hingegen kommen in der Tripel-Leu-Tasche zu liegen. Somit wurde die Lage der gesamten Turn-Region ( $N^{(P-1)}P^{(P)}L^{(P+1)}V^{(P+2)}P/A^{(P+3)}$ ), die in einer vorherigen Studie als wichtig für die cCPE-Cld Interaktion identifiziert wurde (Winkler *et al.*, 2009), in der Cld-Bindungstasche von cCPE bestimmt.

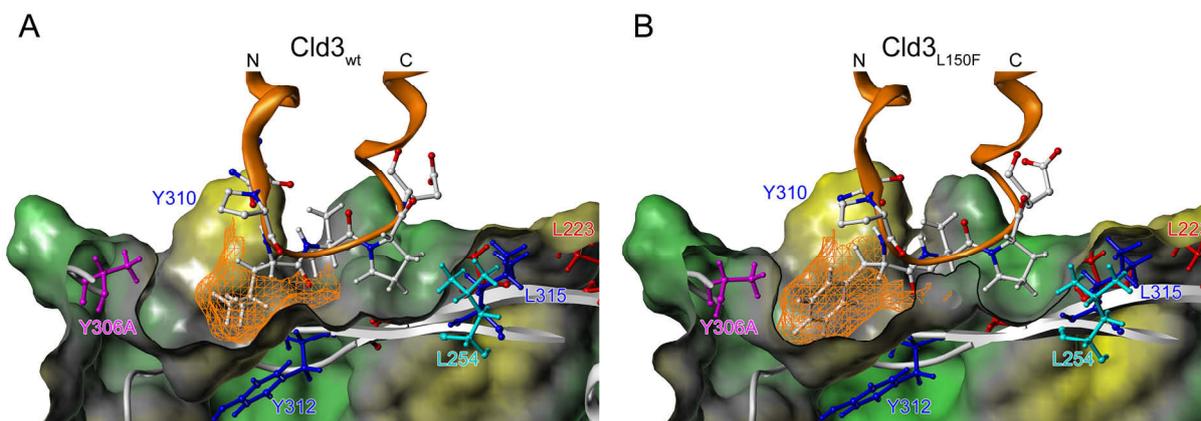
#### 4.3.1.1 Wie rettet die Substitution L150F in Cld3 die Bindung von cCPE<sub>Y306A</sub>?

Die Substitution von  $Y_{306}$  zu A in cCPE<sub>Y306A</sub> führte zu einem deutlichen Bindungsverlust an Cld3<sub>wt</sub> und Cld4<sub>wt</sub> (3.2.2, Abb. 3.4; sowie Ebihara *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2008). Ein Blick auf die Cld-Bindungstasche von cCPE<sub>wt</sub> und cCPE<sub>Y306A</sub> macht deutlich, dass durch die Substitution von  $Y_{306}$  zu A die Tripel-Tyr-Tasche merklich vergrößert wird, bzw. dass die „Tasche“ als lochförmige Vertiefung in der Oberfläche von cCPE verloren geht (Abb. 4.2).



**Abb. 4.2: Querschnitt der Claudin-Bindungstasche von (A) cCPE<sub>wt</sub> (PDB ID: 2QUO) und (B) cCPE<sub>Y306A</sub> (Modell basierend auf 2QUO) als Cartoon (weiß). Oberfläche mit berechnetem hydrophobem Potential (gelb: hydrophob, grau: unpolar, grün: polar/geladen) und den die Bindungstasche definierenden Aminosäuren in Kugel-Stab-Darstellung (blau: als wichtig für Cld4-Bindung beschrieben; rot: „oberer Rand“ der Bindungstasche“; türkis: „unterer Rand“ der Bindungstasche; magenta: substituierte Aminosäuren).**

Im Vergleich der Interaktionsmodelle von Cld3<sub>wt</sub> bzw. Cld4<sub>wt</sub> mit cCPE<sub>wt</sub> (3.2.5, Abb. 3.11) sowie Cld3<sub>wt</sub> und cCPE<sub>Y306A</sub> (Abb. 4.3 A, folgende Seite) fällt auf, dass die Seitenkette von  $L_{150}^{(P+1)}$  nicht vollständig von der Tripel-Tyr-Tasche von cCPE<sub>Y306A</sub> umfasst wird. Hierdurch entsteht eine Lücke, die – aufgrund der Einlagerung von Wassermolekülen bzw. dem Wegfall der Van-der-Waals-Interaktionen zwischen  $L_{150/151}^{(P+1)}$  (Cld3/4) und  $Y_{306}$  (cCPE<sub>wt</sub>) – energetisch ungünstig für die Cld-cCPE-Interaktion ist.



**Abb. 4.3: Detailliertes Interaktionsmodell der EZS2 (orange, Cartoon) von (A) Cld3<sub>wt</sub> bzw. (B) Cld3<sub>L150F</sub> mit cCPE<sub>Y306A</sub> (Modell basierend auf 2QUO) im Querschnitt, mit den Aminosäuren der Turn-Region in Kugel-Stab-Darstellung (weiß: C und H, blau: N, rot: O) sowie der Oberfläche von L<sub>150</sub> bzw. F<sub>150</sub> (orange, Gitternetz). cCPE gezeigt als Cartoon (weiß), mit Oberfläche mit berechnetem hydrophobem Potential (gelb: hydrophob, grau: unpolar, grün: polar/geladen) und den die Bindungstasche definierenden Aminosäuren in Kugel-Stab-Darstellung (blau: als wichtig für Cld4-Bindung beschrieben; rot: „oberer Rand“ der Bindungstasche; türkis: „unterer Rand“ der Bindungstasche; magenta: substituierte Aminosäuren). (A) L<sub>150</sub> von Cld3<sub>wt</sub> kann die durch den Austausch von Y<sub>306</sub> zu A entstandene Lücke in der Bindungstasche von cCPE<sub>Y306A</sub> nicht füllen, (B) wohingegen F<sub>150</sub> von Cld3<sub>L150F</sub> dem aromatischen Ring von Y<sub>306</sub> (cCPE) ähnelt und den hydrophoben Kern der Tripel-Tyr-Tasche wiederherstellt.**

Dahingegen füllt F<sub>150</sub><sup>(P+1)</sup> von Cld3<sub>L150F</sub> die durch die Substitution von Y<sub>306</sub> zu A in cCPE<sub>Y306A</sub> entstandene Lücke besser aus, wodurch der hydrophobe Kern der Tripel-Tyr-Tasche wiederhergestellt und die Einlagerung von Wassermolekülen verhindert wird (Abb. 4.3 B). Zudem scheint F<sub>150</sub><sup>(P+1)</sup> (Cld3<sub>L150F</sub>) eine  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung mit Y<sub>312</sub> auszubilden, und auch Van-der-Waals-Interaktionen mit A<sub>306</sub> könnten diese Bindung stabilisieren. Dies ist eine plausible Erklärung dafür, dass Cld3<sub>L150F</sub> und Cld4<sub>L151F</sub> eine Bindung von cCPE<sub>Y306A</sub> zeigen, die mit der Interaktion von Cld3<sub>wt</sub> und Cld4<sub>wt</sub> mit cCPE<sub>wt</sub> vergleichbar ist.

#### 4.3.2 Die Interaktion von cCPE mit Claudin-3 und Claudin-4 wird hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen beeinflusst.

Eine Theorie zur Interaktion von CPE mit Claudinen geht davon aus, dass diese hauptsächlich von elektrostatischer Anziehungskraft bedingt wird (Kimura *et al.*, 2010). Die Autoren behaupten, dass die positiven Ladungen in der EZS2 von Claudinen mit negativen Ladungen in cCPE interagieren, da einerseits die CPE-sensitiven Claudine einen höheren isoelektrischen Punkt (pI) haben als die CPE-insensitiven Claudine, und andererseits die Bindungstasche von CPE – nach ihren Angaben – negativ geladen ist. Substitutionen der positiv geladenen Aminosäuren in der EZS2 von Cld3 (K156A<sup>(P+7)</sup> und R157Y<sup>(P+8)</sup>) zeigten allerdings keinen deutlichen Effekt auf die Bindung von cCPE<sub>wt</sub>. Zwar ergaben die zellulären Bindungsassays von Cld3<sub>R157Y</sub> mit cCPE<sub>wt</sub> eine signifikant schwächere Bindung als an Cld3<sub>wt</sub> (3.2.6, Abb. 3.13 A), in den von Anna Piontek durchgeführten Pulldown-Assays zeigte sich allerdings eine mit

Cld3<sub>wt</sub>-cCPE<sub>wt</sub> vergleichbare Bindung von cCPE<sub>wt</sub> an Cld3<sub>R157A</sub> (Veshnyakova *et al.*, 2012). Zudem zeigten die Substitutionen der negativ geladenen Aminosäuren in cCPE (D225A, D284A und D284N) auch keinen generellen Einfluss auf die Bindung an Cld3 und Cld4 (3.2.2, Abb. 3.4). Die Substitution D225A senkt zwar die Bindung an Cld4 – nicht jedoch jene an Cld3. Die Substitutionen D284A und D284N hingegen schwächen die Bindung an Cld3 kaum, haben aber einen deutlich negativen Einfluss auf die Bindung an Cld4. Weiterhin hat die Substitution des positiven R<sub>227</sub> zu A in cCPE einen wesentlich stärkeren negativen Effekt auf die Bindung an Cld3 und Cld4 als die Substitutionen der negativ geladenen Aminosäuren (3.2.2, Abb. 3.4 A).

Generell konnten kaum Anhaltspunkte für direkte elektrostatische Interaktionen zwischen der EZS2 von Cld3 oder Cld4 und cCPE gefunden werden, da die Substitutionen der geladenen oder polaren Aminosäuren S<sub>256</sub> und K<sub>257</sub> zu A, bzw. die Entfernung der polaren Hydroxylgruppe von Y<sub>310</sub> durch Substitution zu Phenylalanin in cCPE, kaum oder keinen Einfluss auf die Bindung von cCPE an Cld3 und Cld4 nahmen (vgl. 3.2.2, Abb. 3.4; 3.2.6, Abb. 3.13).

Einer der wenigen Hinweise auf eine Störung der Cld-cCPE-Interaktion durch Änderung der Ladung der EZS2 ist, dass die Substitution von N<sub>148</sub><sup>(P-1)</sup> zu D in Cld3<sub>N148D</sub> zu einem deutlichen Bindungsverlust von cCPE<sub>wt</sub> führt (3.2.6, Abb. 3.13 A). Die Ergebnisse der Bindungsanalysen von Cld1 und Cld5, die beide Aspartat an der korrespondierenden Position zeigen (3.3, Abb. 3.14), deuten aber eher auf eine sekundäre, durch Änderung der Konformation der EZS2 und nicht durch elektrostatische Abstoßung verursachte Schwächung der Bindung von cCPE<sub>wt</sub> hin (vgl. 3.3.1, Abb. 3.15 und Abb. 3.16; sowie 3.3.4, Abb. 3.23 und Abb. 3.24; sowie Abschnitt 4.7).

Generell scheinen hydrophobe Wechselwirkungen die treibende Kraft in der cCPE-Cld-Interaktion zu sein. Dies wird zum einen durch die Ergebnisse gestützt, die die Untersuchung der Orientierung der EZS2 erbrachten: die Interaktion von L<sup>(P+1)</sup> (Cld3 & Cld4) mit der Tripel-Tyr-Tasche von CPE wurde als eine Schlüsselinteraktion identifiziert (vgl. 3.2.5; 4.3.1). Zum anderen zeigen die Ergebnisse von Takahashi *et al.*, dass Substitutionen der polaren Aminosäuren S<sub>304</sub>, S<sub>305</sub>, S<sub>307</sub>, N<sub>309</sub> und S<sub>313</sub> zu A in cCPE jeweils zu einer Bindungssteigerung an Cld4 führten (Takahashi *et al.*, 2008).

Zusätzlich ergaben die zellulären Bindungsassays, dass Verkürzungen von hydrophoben Aminosäuren – wie die Substitutionen von L<sub>223</sub>, L<sub>254</sub> oder Y<sub>306</sub> in cCPE (3.2.2, Abb. 3.4) oder L<sub>150</sub><sup>(P+1)</sup> in Cld3 zu Alanin (3.2.5, Abb. 3.10; Winkler *et al.*, 2009) – die CPE-Cld-Interaktion deutlich schwächten. Auch die Ergebnisse der Substitutionen von Y<sub>306</sub>, Y<sub>310</sub>, Y<sub>312</sub> sowie L<sub>315</sub> zu Alanin bzw. die Kombinationen einzelner Y–A Substitutionen mit der Substitution L<sub>315</sub> zu A (Takahashi *et al.*, 2008) bestätigen die These der hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen getriebenen cCPE-Claudin-Interaktion. Diese wird durch die Ergebnisse der Untersuchung der Interaktion von Cld5 mit cCPE zusätzlich bestätigt (3.3, 4.7).

#### 4.4 Claudin-suptypspezifische Unterschiede in der Struktur der EZS2 von Cld3 und Cld4

Bisher wurden keine Kristallstrukturen von Claudinen beschrieben, jedoch ermöglichte die Kombination von Mutagenese-Studien mit molekularem Modeling gewisse Einblicke in die Struktur der Claudine. Basierend auf dem durch experimentelle Daten gestützten Homologiemodell der EZS2 von Cld5 (Piontek *et al.*, 2008), wurden Homologiemodelle der EZS2 von Cld3 und Cld4 erstellt, die mit molekularem Docking an cCPE kontrolliert wurden.

Eines der großen Probleme für das Modeling der EZS2 von Cld3 und Cld4 war, dass keine zufriedenstellenden Templates für die Gesamtsequenz der EZS2 gefunden wurden. Weder für die EZS2 von Cld3 noch von Cld4 ergaben die Suchen in der PDB ein Template mit mehr als 30% Sequenzidentität. Daher wurden neben der klassischen Homologiemodellierung auch verschiedene *Ab-initio*- und/oder *Threading*-Server zur Modellerstellung verwendet: *I-TASSER* (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>; Zhang, 2008; Roy *et al.*, 2010) und *Phyre2* (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>; Kelley & Sternberg, 2009). Allerdings zeigten sich kaum Unterschiede in den Modellen der Server zu den auf dem Modell der EZS2 von Cld5 basierenden Modellen von Cld3 und Cld4. Da das Modell der EZS2 von Cld5 jedoch durch experimentelle Daten validiert wurde (Krause *et al.*, 2008; Piontek *et al.*, 2008), wurden im Weiteren die darauf basierenden Modelle der EZS2 von Cld3 und Cld4 verwendet (3.2.4, Abb. 3.7).

Trotz der vorhergesagten ähnlichen Konformation der EZS2 von Cld3–5 (Krause *et al.*, 2008; Piontek *et al.*, 2008; Winkler *et al.*, 2009) zeigten sich allerdings deutliche Unterschiede – in der Sequenz des N-terminalen Helix-Cap der C-terminalen Helix der EZS2 – zwischen Cld3 und Cld4 (3.2.3), die auch zu unterschiedlichem Bindungsverhalten von cCPE an Cld3 und Cld4 führten. Bei einer Template-Suche in der PDB für das Helix-Cap der EZS2 wurde ein Helix-Cap aus PDB ID: 1W5C gefunden, das eine Sequenzidentität von 60% zum Helix-Cap von Cld3 aufwies (siehe 8.3). Das Homologiemodell der EZS2 wurde mit diesem Helix-Cap modifiziert, wodurch sich ein anderes Abknicken der C-terminalen Helix im Vergleich zur EZS2 von Cld4 ergab (3.2.4, Abb. 3.7).

#### 4.5 Claudin-3 und -4 zeigen einen teilweise unterschiedlichen Bindungsmodus an CPE

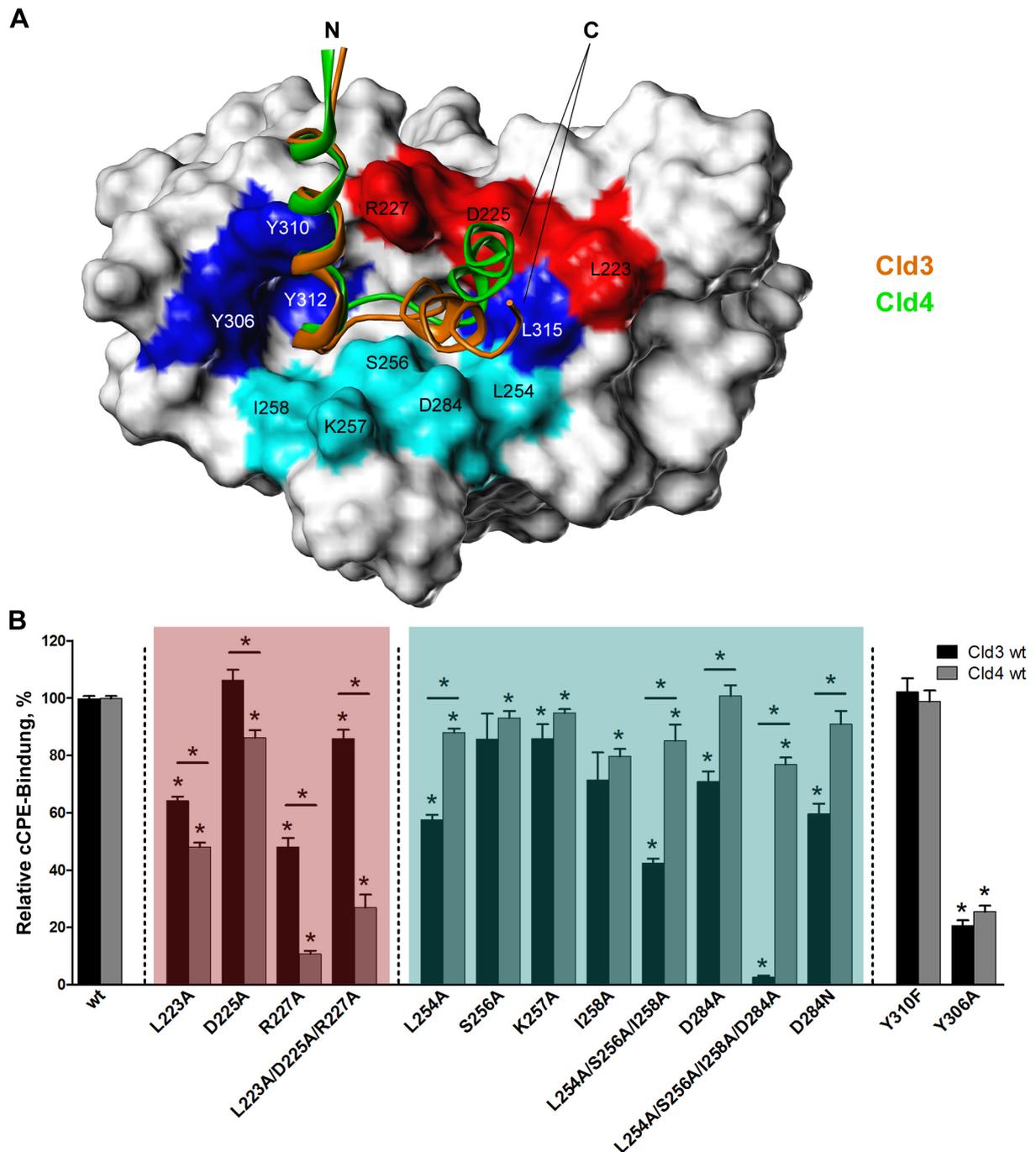
Die Sequenz der EZS2 von Cld3 unterscheidet sich im N-terminalen Helix-Cap der C-terminalen Helix der EZS2 deutlich von der von Cld4 (3.2.3, Abb. 3.5). Dieser Sequenzunterschied führt zu einem unterschiedlichen Bindungsverhalten von cCPE an die beiden Clau-

dine, wie die Ergebnisse der zellulären Bindungsassays mit der Cld3-ähnlichen Mutante von Cld4, Cld4<sub>A153P/S154E/G155A</sub> zeigen. Die Substitution des Helix-Caps von Cld4 durch das von Cld3 führte zu Cld3-ähnlichem Bindungsverhalten von cCPE<sub>R227A</sub> und cCPE<sub>L223A/D225A/R227A</sub> an diese Cld4-Mutante (3.2.3, Abb. 3.6). Der Einfluss des Helix-Caps wird durch die Ergebnisse von Peptid-basierenden Untersuchungen der Claudin-cCPE-Interaktion bestätigt. Bei den Peptid-Assays führte die Substitution von A<sub>153</sub><sup>(P+3)</sup> zu P (in Kombination mit M<sub>150</sub><sup>(P+1)</sup> zu L) in Cld4-Peptiden zu einer Bindung von cCPE, wohingegen das Cld4<sub>wt</sub>-Peptid nicht von cCPE gebunden wurde (Winkler *et al.*, 2009).

Diese Ergebnisse bestätigen nicht nur die leichten Unterschiede in den EZS2-Modellen von Cld3 und Cld4 (3.2.4, Abb. 3.7), sondern auch die unterschiedlichen Bindungsmodi von cCPE an Cld3 und Cld4 (vgl. 3.2.5; Abb. 4.4, folgende Seite). Während die N-terminale Helix der EZS2 von Cld3 und Cld4 identisch über der Tripel-Tyr-Tasche von cCPE positioniert ist, knicken die C-terminalen Helices von Cld3 und Cld4 zu unterschiedlichen Seiten der cCPE Bindungstasche hin ab. Die C-terminale Helix der EZS2 von Cld3 ist zum unteren Rand der Bindungstasche geneigt, während die C-terminale Helix der EZS2 von Cld4 zum oberen Rand geneigt ist (Abb. 4.4 A).

Die unterschiedliche Konformation der EZS2 von Cld3 und Cld4 und die daraus resultierende unterschiedliche Interaktion mit cCPE sind eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Bindungsverhalten der verschiedenen cCPE-Konstrukte an Cld3 und Cld4. Sie erläutern, warum Substitutionen am oberen Rand der Cld-Bindungstasche (rot; Abb. 4.4 A) einen stärkeren Einfluss auf die Bindung an Cld4 haben, und Substitutionen am unteren Rand (türkis; Abb. 4.4 A) einen stärkeren Einfluss auf die Bindung an Cld3 (Abb. 4.4 B).

Zudem ermöglichen es die unterschiedlichen Bindungsmodi von cCPE an Cld3 und Cld4, cCPE-Varianten zu erstellen, die gezielt an Cld3, aber nicht an Cld4 binden und umgekehrt. Als "*Proof-of-principle*" hierfür dienen cCPE<sub>L254A/S256A/I258A/D284A</sub>, das eine starke Bindung an Cld4, nicht jedoch an Cld3 zeigt, und cCPE<sub>L223A/D225A/R227A</sub>, welches eine nahezu wildtyp-ähnliche Bindung an Cld3 zeigt, während die Bindung an Cld4 deutlich inhibiert ist (Abb. 4.4 B).



**Abb. 4.4: Unterschiedliche Bindungsmodi von cCPE an Cld3 und Cld4 werden durch Interaktionsdaten bestätigt. (A)** Überlagertes Interaktionsmodell der EZS2 von Cld3 (orange) und Cld4 (grün) mit cCPE (als Oberfläche, weiß). Die für die Bindung an Cld4 relevanten Aminosäuren sind in rot (oberer Rand; L223, D225 & R227), die für die Bindung von Cld3 relevanten sind in türkis (unterer Rand; L254, S256, I258 und D284) hervorgehoben. Die EZS2-Modelle von Cld3 und Cld4 zeigen eine ähnliche Positionierung der N-terminalen, aber eine unterschiedliche Positionierung der C-terminalen Helix. Das unterschiedliche Abknicken der Helices wird durch die unterschiedlichen Helix-Capping-Motive verursacht. **(B)** Ergebnisse der zellulären Bindungsassays von Cld3 und Cld4 mit unterschiedlichen GST-cCPE-Varianten. Hervorgehoben in rot: Substitutionen am oberen Rand der Claudin-Bindungstasche von CPE, die wichtig für die Bindung an Cld4 sind; Hervorgehoben in türkis: Substitutionen am unteren Rand der Claudin-Bindungstasche von CPE, die wichtig für die Bindung an Cld3 sind.

## 4.6 Warum interagiert CPE nur schwach mit Claudin-1 und überhaupt nicht mit Claudin-5?

Anders als an Cld3 und Cld4 bindet CPE nur schwach an Cld1 und überhaupt nicht an Cld5 – wobei auch Cld1 zunächst als nicht CPE bindend beschrieben wurde (Sonoda *et al.*, 1999; Fujita *et al.*, 2000; Saeki *et al.*, 2009; Kimura *et al.*, 2010; Robertson *et al.*, 2010). Für cCPE<sub>116-319</sub> wurde über eine schwache Interaktion mit Cld5 berichtet, wobei es sich als recht instabil erwies und hochmolekulare Oligomere bildete; zudem ist über die Struktur von cCPE<sub>116-319</sub> nichts bekannt. Daher wurden darauf basierende Konstrukte nicht weiter verfolgt (Winkler, 2007; Winkler *et al.*, 2009, mündliche Kommunikation Jörg Piontek).

Durch Sequenzvergleiche der EZS2 von Cld1 (<sub>150</sub>D<sup>(P-1)</sup>P<sup>(P)</sup>L/M<sup>(P+1)</sup>T<sup>(P+2)</sup>P<sub>154</sub><sup>(P+3)</sup>) und Cld5 (<sub>149</sub>D<sup>(P-1)</sup>P<sup>(P)</sup>T/S<sup>(P+1)</sup>V<sup>(P+2)</sup>P<sub>153</sub><sup>(P+3)</sup>) mit Cld3 (<sub>148</sub>N<sup>(P-1)</sup>P<sup>(P)</sup>L<sup>(P+1)</sup>V<sup>(P+2)</sup>P<sub>152</sub><sup>(P+3)</sup>) und Cld4 (<sub>149</sub>N<sup>(P-1)</sup>P<sup>(P)</sup>L/M<sup>(P+1)</sup>V<sup>(P+2)</sup>P<sub>153</sub><sup>(P+3)</sup>) wurden je zwei Aminosäuren in der Kernbindungsregion von CPE in Cld1 (D<sub>150</sub><sup>(P-1)</sup> & T<sub>153</sub><sup>(P+2)</sup>) und Cld5 (D<sub>149</sub><sup>(P-1)</sup> & T/S<sub>151</sub><sup>(P+1)</sup>) identifiziert, die die Bindung stören (3.3, Abb. 3.14). Durch zelluläre Bindungsassays mit Cld1- und Cld5-Mutanten, bei denen die korrespondierenden Aminosäuren von Cld3 (N<sub>148</sub><sup>(P-1)</sup>; L<sub>150</sub><sup>(P+1)</sup> & V<sub>151</sub><sup>(P+2)</sup>) eingefügt wurden, konnte der negative Einfluss dieser Aminosäuren auf die Bindung von CPE an die nativ in der Zellmembran vorliegenden Claudine bestätigt werden (3.3.1, Abb. 3.15 und Abb. 3.16).

Interessanterweise zeigte cCPE unterschiedliches Bindungsverhalten an die Cld3 imitierenden Mutanten von Cld1 und Cld5. Während in Cld1 jeweils der Austausch von D<sub>150</sub><sup>(P-1)</sup> oder T<sub>153</sub><sup>(P+2)</sup> zu den korrespondierenden Aminosäuren in Cld3 (N<sub>148</sub><sup>(P-1)</sup> bzw. V<sub>151</sub><sup>(P+2)</sup>) genügte, um eine deutliche Steigerung der Bindung von cCPE zu erreichen, konnte eine Bindungssteigerung an Cld5 nur durch Doppelsubstitution von D<sub>149</sub><sup>(P-1)</sup> & T<sub>151</sub><sup>(P+1)</sup> zu den korrespondierenden Aminosäuren von Cld3 (N<sub>148</sub><sup>(P-1)</sup> & L<sub>150</sub><sup>(P+1)</sup>) erzielt werden. Dies ist jedoch nicht sonderlich überraschend, da in Cld5 nach Substitution von D<sub>149</sub><sup>(P-1)</sup> zu N immer noch das polare T<sub>151</sub><sup>(P+1)</sup> anstelle des größeren hydrophoben L<sup>(P+1)</sup> (in Cld3) vorhanden ist. T<sub>151</sub><sup>(P+1)</sup> kann die Tripel-Tyr-Tasche von cCPE nicht ausfüllen. Erst durch Einführung des L<sup>(P+1)</sup> anstelle von T<sub>151</sub><sup>(P+1)</sup> wurde eine Bindung von CPE ermöglicht (vgl. 3.2.5, Abb. 3.11; 3.3.2, Abb. 3.19 B und Abb. 3.20).

Demgegenüber verhielten sich die Cld1-Mutanten auffällig: die Einzelsubstitutionen D<sub>150</sub><sup>(P-1)</sup> zu N oder T<sub>153</sub><sup>(P+2)</sup> zu V wurden jeweils besser von cCPE gebunden als die Doppelsubstitution D<sub>150</sub><sup>(P-1)</sup> zu N & T<sub>153</sub><sup>(P+2)</sup> zu V (3.3.1, Abb. 3.15), obwohl für die Substitution von T<sub>153</sub><sup>(P+2)</sup> zu V nicht so ein starker positiver Effekt auf die Bindung von cCPE erwartet wurde.

Die Relevanz der Aminosäuren an Position P-1 und P+1 in der EZS2 für die Interaktion von CPE mit Claudinen wurde auch in anderen Studien nachgewiesen. So führen ein Austausch von N<sub>148</sub><sup>(P-1)</sup> in Cld3 bzw. N<sub>149</sub><sup>(P-1)</sup> in Cld4 zu D sowie die Substitution von L<sub>150</sub><sup>(P+1)</sup> zu A oder T in Cld3 zu einem deutlichen Bindungsverlust von CPE (3.2.6, Abb. 3.13; Winkler *et al.*, 2009;

Robertson *et al.*, 2010). Der Austausch von D<sub>150</sub><sup>(P-1)</sup> in Cld1 bzw. D<sub>149</sub><sup>(P-1)</sup> in Cld5 zu N (in Cld5 nur in Kombination entweder mit T<sub>151</sub><sup>(P+1)</sup> zu L, oder Y<sub>158</sub><sup>(P+8)</sup> zu R) führte zu einer gesteigerten Bindung an CPE (Winkler *et al.*, 2009; Kimura *et al.*, 2010; Robertson *et al.*, 2010). Die Kombination der Substitutionen D<sub>149</sub><sup>(P-1)</sup> zu N mit Y<sub>158</sub><sup>(P+8)</sup> zu R in Cld5 führt vermutlich zu einer höheren Zugänglichkeit dieses Cld5-Konstrukts für CPE, da die Substitution Y<sub>158</sub><sup>(P+8)</sup> zu A eine schwächere *trans*-Interaktion von Cld5 zur Folge hat (Krause *et al.*, 2008; Piontek *et al.*, 2008). Hierdurch ist vermehrt „freies“ Claudin in der Zellmembran vorhanden, das mit CPE interagieren kann – was eine stärkere Bindung erklären könnte (Winkler *et al.*, 2009; Veshnyakova *et al.*, 2010).

Cld5<sub>D149N/T151L</sub><sup>(P-1/P+1)</sup> hingegen zeigt zwar eine schwächere Kontaktanreicherung als Cld5<sub>wt</sub> – was auf eine schwächere *trans*-Interaktion hindeutet (3.3.1.1, Abb. 3.17) –, allerdings zeigen die Ergebnisse der Zelloberflächenbiotinylierung, dass bedeutend weniger Cld5<sub>D149N/T151L</sub><sup>(P-1/P+1)</sup> in der Zellmembran vorhanden ist (3.3.1.2, Abb. 3.18), bzw. dass Cld5<sub>D149N/T151L</sub><sup>(P-1/P+1)</sup> fast nur intrazellulär vorliegt. Es zeigt eine ähnliche Biotinylierungsrate wie Cld5<sub>E146A</sub>, ein Cld5-Konstrukt, das als intrazellulärer Typ beschrieben wurde (Piontek *et al.*, 2008). In mikroskopischen Untersuchungen ließ sich auch kein Cld5<sub>D149N/T151L</sub>-YFP in der Zellmembran erkennen (3.6.1, Abb. 3.48 A; Rossa *et al.*, 2014).

Somit besitzt Cld5<sub>D149N/T151L</sub><sup>(P-1/P+1)</sup> keine bessere Zugänglichkeit für CPE, und die Bindungssteigerung von cCPE an dieses Konstrukt beruht tatsächlich auf einer höheren Affinität. Da alle anderen Cld3 imitierenden Mutanten von Cld1 und Cld5 keine signifikanten Unterschiede in der Kontaktanreicherung und der Membranlokalisation in Vergleich zu Cld1<sub>wt</sub> oder Cld5<sub>wt</sub> zeigten (vgl. 3.3.1, Abb. 3.17 und Abb. 3.18), kann auch hier ausgeschlossen werden, dass eine höhere Zugänglichkeit für CPE die Bindungssteigerungen auslöst.

Folglich lässt sich festhalten, dass D<sup>(P-1)</sup> (Cld1 und Cld5), T<sup>(P+1)</sup> (Cld5) und T<sup>(P+2)</sup> (Cld1) die Interaktion von CPE mit den jeweiligen Claudinen stören. Der Grund, weshalb CPE nicht an Cld5 bindet, ist das polare T an Position P+1: die Schlüsselinteraktion zwischen einer großen hydrophoben Aminosäure an Position P+1 und der Tripel-Tyr-Tasche von CPE ist nicht vorhanden, die CPE-Cld-Bindung ist nicht möglich. Im Gegensatz hierzu bindet Cld1 nur schwach, da zwar ein L (murin) oder M (human) an Position P+1 vorhanden ist, was generell eine Bindung ermöglicht – die negative Ladung an P-1 und die polare Gruppe an P+2 stören die Interaktion von CPE mit Cld1 allerdings deutlich.

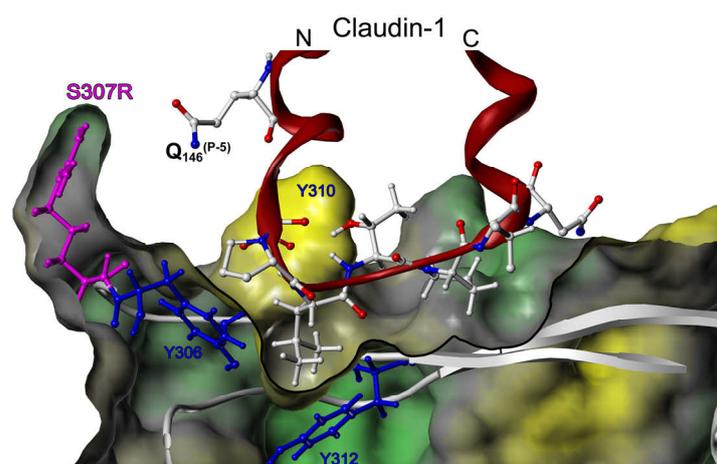
Um eine Bindung von cCPE an diese Claudine zu erreichen, muss cCPE also entsprechend so modifiziert werden, dass die Unterschiede von Cld1 oder Cld5 im Vergleich zu Cld3 und Cld4 an den Positionen P-1 und P+2 für Cld1 und P-1 und P+1 für Cld5 kompensiert werden können.

#### 4.6.1 Modifikationen an cCPE: R<sub>307</sub> (cCPE<sub>S307R</sub> & cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub>) interagiert nicht mit D<sup>(P-1)</sup> von Cld1 und Cld5

Cld1 und Cld5 besitzen, im Gegensatz zu N<sup>(P-1)</sup> bei Cld3 und Cld4, beide ein negativ geladenes D an Position P-1 der EZS2. Um diese negative Ladung zu kompensieren und eine Bindung von CPE an Cld1 und Cld5 zu ermöglichen, wurden anhand „virtueller Interaktionsmodelle“ von cCPE mit Cld1 und Cld5 (3.3.2, Abb. 3.19) Positionen am Rand der Tripel-Tyr-Tasche identifiziert, die durch Substitution positiv geladener Aminosäuren mit D<sup>(P-1)</sup> von Cld1 und Cld5 interagieren könnten (3.3.2, Tab. 3.2). cCPE<sub>Y310H</sub> und cCPE<sub>Y310K</sub> zeigten keinen positiven Effekt auf die Bindung an Cld1 oder Cld5, wohingegen cCPE<sub>S307R</sub> eine signifikante Steigerung der Bindung an Cld1, nicht aber an Cld5 aufwies (3.3.3, Abb. 3.21).

Hieraus könnte nun gefolgert werden, dass bei der Bindung von cCPE<sub>S307R</sub> an Cld1 eine Interaktion zwischen R<sub>307</sub> und D<sub>150</sub><sup>(P-1)</sup> erfolgt, welche mit D<sub>149</sub><sup>(P-1)</sup> von Cld5 nicht etabliert werden kann. Dagegen sprechen allerdings die Ergebnisse der Bindungsstudien mit den Cld3 imitierenden Mutanten von Cld1 und Cld5: cCPE<sub>S307R</sub> und cCPE<sub>S305P/S307R</sub> zeigten hier jeweils schwache, aber signifikante Bindungssteigerungen an Cld1<sub>D150N</sub><sup>(P-1)</sup> und Cld1<sub>D150N/T153V</sub><sup>(P-1/P+2)</sup>, und cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> zeigte eine deutliche Bindungssteigerung an Cld1<sub>D150N/T153V</sub> (3.3.4.2, Abb. 3.23). Auf die Bindung an Cld5<sub>T151L</sub><sup>(P+1)</sup> hatte die Einführung von R anstelle von S<sub>307</sub> in cCPE sogar einen leicht negativen Effekt, cCPE<sub>S313H</sub> bindet stärker an Cld5<sub>T151L</sub><sup>(P+1)</sup> als cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> (3.3.4.3, Abb. 3.24).

R<sub>307</sub> (cCPE<sub>S307R</sub>; cCPE<sub>S305P/S307R</sub> & cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub>) scheint also vielmehr eine Interaktion mit Q<sub>146</sub><sup>(P-5)</sup> (Cld1) einzugehen, darauf deuten zumindest die Ergebnisse der zellulären Bindungsassays von Cld5<sub>R145Q</sub><sup>(P-5)</sup> mit cCPE<sub>S307R</sub> bzw. cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> hin (siehe 3.3.4.4 und Abb. 4.5).



**Abb. 4.5: Interaktionsmodell der EZS2 von Cld1 (rot, Cartoon) mit cCPE<sub>S307R</sub> (Modell basierend auf 2QUO) im Querschnitt**, mit den Aminosäuren der Turn-Region in Kugel-Stab-Darstellung (weiß: C und H, blau: N, rot: O). cCPE gezeigt als Cartoon (weiß), mit Oberfläche mit berechnetem hydrophobem Potential (gelb: hydrophob, grau: unpolar, grün: polar/geladen) und den die Tripel-Tyr-Tasche definierenden Aminosäuren (blau) sowie der Substitution S307R (magenta) in Kugel-Stab-Darstellung. Q<sub>146</sub><sup>(P-5)</sup> befindet sich in räumlicher Nähe (< 5 Å) zu S307R, sodass entweder eine gebrückte Wasserstoffbrückenbindung oder eine direkte Interaktion (unter Berücksichtigung der Flexibilität dieser Loop-Region von cCPE) möglich ist.

Wie in Abb. 4.5 gezeigt, ist eine Interaktion von S307R von cCPE<sub>S307R</sub> mit Q<sub>146</sub><sup>(P-5)</sup> von Cld1 denkbar. Bei Cld5 befindet sich an der korrespondierenden Position R<sub>145</sub><sup>(P-5)</sup>. Der Austausch von R<sub>145</sub><sup>(P-5)</sup> zu Q in Cld5 führte zu einer deutlichen Bindungssteigerung von cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> im Vergleich zur Bindung an Cld5<sub>wt</sub> und der Bindung von cCPE<sub>S313H</sub> an Cld5<sub>R145Q</sub><sup>(P-5)</sup> (3.3.4.4, Abb. 3.26). Dass dieser Effekt bei cCPE<sub>S307R</sub> alleine nicht sonderlich ausgeprägt ist, liegt vermutlich an der äußerst schlechten Bindung von cCPE an Cld5, bedingt durch das Fehlen der großen hydrophoben Aminosäure an P+1 in Cld5.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keine Anhaltspunkte für eine Interaktion von R<sub>307</sub> mit D<sup>(P-1)</sup> gefunden werden konnten. D<sup>(P-1)</sup> in Cld1 und Cld5 stört die Bindung von cCPE nicht durch elektrostatische Abstoßung bzw. Unverträglichkeit mit der Tripel-Tyr-Tasche von cCPE. Vielmehr scheint es, dass D<sup>(P-1)</sup> einen indirekten Einfluss auf die Bindung hat. In Absatz 4.8 wird dies genauer diskutiert.

#### **4.6.2 Modifikationen an cCPE: cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> zeigt eine gesteigerte Bindung an Cld1 und Cld5, ist allerdings ein Breitband-Claudin-Binder**

Die Substitution von S<sub>307</sub> zu R ist auch in den von Takahashi und Kollegen beschriebenen cCPE-Varianten cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> bzw. m19 (cCPE<sub>S304A/S305P/S307R/N309H/S313H</sub>) enthalten. m19 zeigte eine gesteigerte Bindung an Cld1, Cld2 und Cld5 bei weiterhin starker Bindung an Cld3. Auch die in der Studie identifizierten Kernmodifikationen an cCPE (cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub>) zeigten eine gesteigerte Bindung an Cld1 (Takahashi *et al.*, 2012).

Um ein besseres Verständnis der Wirkweise dieser Modifikationen an cCPE auf die Bindung an Claudine zu erhalten, wurde zunächst die Bindung von cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> an Cld1 sowie an Cld3–Cld9 in zellulären Bindungsassays untersucht. Hierbei zeigte cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> eine gesteigerte Bindung an Cld1 und Cld5 und eine mit cCPE<sub>wt</sub> vergleichbare Bindung an Cld3 und Cld4 (3.3.4.1, Abb. 3.22), Cld6 (3.4.2.1, Abb. 3.34), Cld7 (3.4.2.2, Abb. 3.35), Cld8 (3.3.4.3, Abb. 3.36) und Cld9 (3.4.2.4, Abb. 3.37). Somit ist cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> wie m19 ein Breitband-Claudin-Binder.

Die Wirkung der Aminosäuresubstitutionen S305P und S313H von cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> auf die Bindung an Cld1 und Cld5 werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

#### **4.6.3 Modifikationen an cCPE: Der Beitrag der Substitution S305P in cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> zur Bindungssteigerung an Cld1 und Cld5 ist unklar**

Die Substitution von S<sub>305</sub> zu P hat keinen eindeutigen Effekt auf die Bindung an Cld1 oder Cld5. Zwar zeigt cCPE<sub>S305P</sub> eine tendenziell bessere Bindung an Cld1 und die Cld3 imitierenden Mutanten von Cld1, allerdings erreichen diese Unterschiede keine Signifikanz (3.3.4.2, Abb. 3.23). Auf die Bindung von Cld5 und die Cld3 imitierenden Mutanten von Cld5 hat

cCPE<sub>S305P</sub> keinen bindungssteigernden Effekt (3.3.4.3, Abb. 3.24). Allerdings ergab sich in der Studie von Takahashi und Kollegen eine auffällige Häufung der Substitution von S<sub>305</sub> zu P in Kombination mit einem Arginin an Position 307 bei den als Cld1-Binder identifizierten cCPE-Varianten (Takahashi *et al.*, 2012; Table 2: Cl1-binding phage clones). Daher ist anzunehmen, dass die Substitution S<sub>305</sub> zu P einen an R<sub>307</sub> gekoppelten Effekt hat. Da Prolin deutliche Einschränkungen hinsichtlich seiner Rotamere und der Flexibilität des Backbones aufweist (Ramachandran *et al.*, 1963; Balasubramanian *et al.*, 1971), ist zu vermuten, dass die Substitution von S<sub>305</sub> zu P die Loop-Struktur von CPE an der Tripel-Tyr-Tasche versteift/stabilisiert und hierdurch die Ausrichtung von R<sub>307</sub> hinsichtlich einer Interaktion mit Q<sub>145</sub><sup>(P-5)</sup> von Cld1 verbessert. Dies würde auch erklären, warum die Substitution von S<sub>305</sub> zu P weder alleine noch in cCPE<sub>S305P/S307R</sub> oder cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> einen positiven, sondern eher sogar einen negativen Effekt auf die Bindung an Cld5 hat (vgl. Bindung von cCPE<sub>S313H</sub> und cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> in 3.3.4.3, Abb. 3.24).

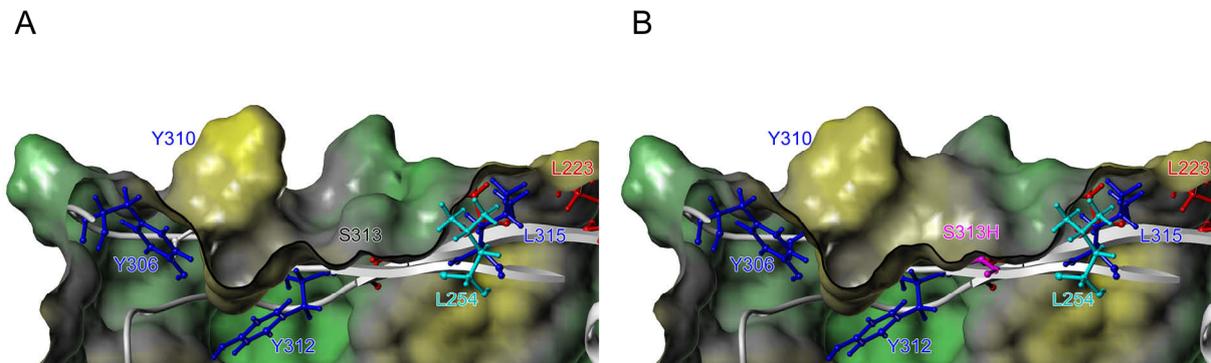
#### 4.6.4 Modifikationen an cCPE: Die Substitution S313H in CPE ändert die Form der Claudin-Bindungstasche

Die Substitution von S<sub>313</sub> zu H in cCPE führte zu einer gesteigerten Bindung von cCPE<sub>S313H</sub> an Cld1 und Cld5 in zellulären Bindungsassays. Sie hat den größten Beitrag an der Bindungssteigerung von cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub>, wie die Ergebnisse der Bindungsstudien an den Cld3 imitierenden Mutanten von Cld1 und Cld5 zeigten (3.3.4.2, Abb. 3.23 und 3.3.4.3, Abb. 3.24). Bei Cld5 ist die Substitution S<sub>313</sub> zu H sogar allein für die Bindungssteigerung verantwortlich, da cCPE<sub>S313H</sub> eine gleich starke oder sogar bessere Bindung an Cld5 aufwies als cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub>.

H<sub>313</sub> in cCPE<sub>S313H</sub> scheint jedoch nicht in eine direkte elektrostatische Interaktion mit Cld1 oder Cld5 eingebunden zu sein. Zwar spricht das Fehlen einer Bindungssteigerung von cCPE<sub>S313H</sub> und cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> an Cld1<sub>D150N</sub><sup>(P-1)</sup> und Cld1<sub>T153V</sub><sup>(P+2)</sup> für eine Interaktion von D<sup>(P-1)</sup> und/oder T<sup>(P+2)</sup> mit H<sub>313</sub>; Dagegen spricht allerdings, dass cCPE<sub>S313H</sub> und cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> eine deutliche Bindungssteigerung an Cld1<sub>D150N/T153V</sub><sup>(P-1/P+2)</sup> sowie Cld5<sub>D149N</sub><sup>(P-1)</sup> und Cld5<sub>D149N/T151L</sub><sup>(P-1/P+1)</sup> zeigten (3.3.4.2, Abb. 3.23 und 3.3.4.3, Abb. 3.24). Auch das Fehlen einer deutlichen Bindungssteigerung an Cld7 spricht gegen eine direkte Interaktion von H<sub>313</sub> in cCPE<sub>S313H</sub> mit T<sup>(P+2)</sup> (3.3.7.2, Abb. 3.30 und 3.4.2.2, Abb. 3.35), wobei die Begünstigung einer polaren Aminosäure an Position P+2 der EZS2 durch die Substitution S313H nicht ausgeschlossen werden kann.

Vermutlich wird die Bindungssteigerung an Cld1 und Cld5 von cCPE<sub>S313H</sub> eher durch eine Verbesserung der Passform der Claudin-Bindungstasche durch die Substitution von S<sub>313</sub> zu H ausgelöst. Hierfür spricht zumindest ein Vergleich der Bindungstasche von cCPE<sub>wt</sub> mit

dem Modell von  $cCPE_{S313H}$  bzw. der von Takahashi und Kollegen gezeigten Struktur von m19 (Abb. 4.6).



**Abb. 4.6: Querschnitt der Claudin-Bindungstasche von (A)  $cCPE_{wt}$  (PDB ID: 2QUO) und (B)  $cCPE_{S313H}$  (Modell basierend auf 2QUO) als Cartoon (weiß). Oberfläche mit berechnetem hydrophobem Potential (gelb: hydrophob, grau: unpolar, grün: polar/geladen) und den die Bindungstasche definierenden Aminosäuren in Kugel-Stab-Darstellung (blau: als wichtig für Cld4-Bindung beschrieben; rot: „oberer Rand“ der Bindungstasche; türkis: „unterer Rand“ der Bindungstasche; magenta: substituierte Aminosäure).**

In der Struktur von  $cCPE_{wt}$  ist eine deutliche Lücke zwischen  $Y_{310}$  und  $R_{227}$  zu sehen, an deren unterem Rand  $S_{313}$  sitzt (Abb. 4.6 A). Durch die Substitution von  $S_{313}$  zu H wird diese Lücke geschlossen, was eine bessere Ausbildung von Van-der-Waals-Interaktionen zwischen der EZS2 von Cld1 oder Cld5 und cCPE ermöglichen könnte (Abb. 4.6 B).

Die Steigerung der Bindung von cCPE durch die Substitution von  $S_{313}$  zu H deutet somit auf eine leicht unterschiedliche Struktur/Konformation der Turn-Region der EZS2 von Cld1 und Cld5 im Vergleich zur EZS2 von Cld3 und Cld4 (vgl. 4.7).

## 4.7 Unterschiede der EZS2 von Cld1 und Cld5 zu Cld3 und Cld4

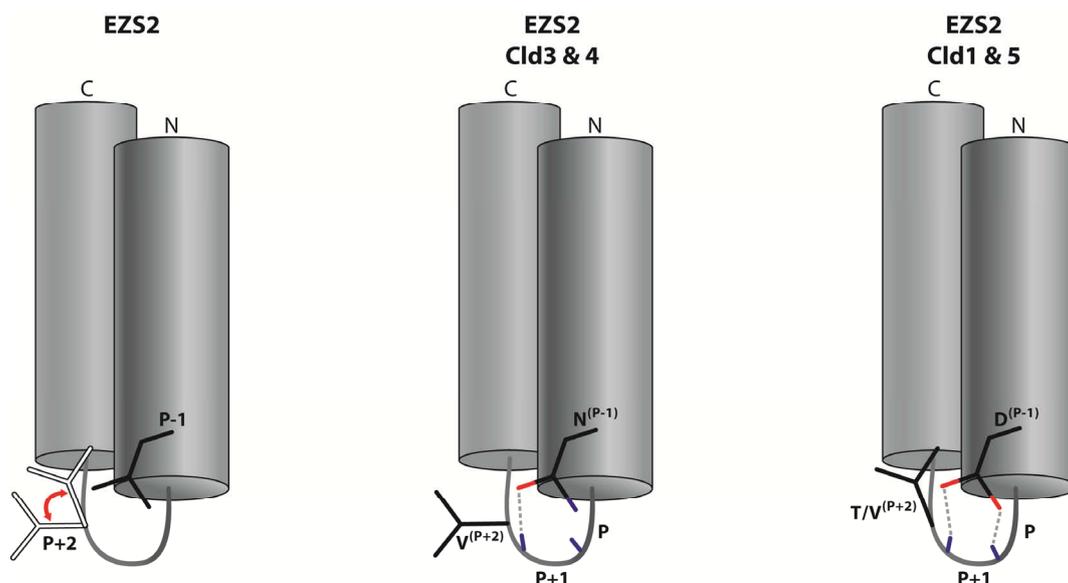
Wie schon in Absatz 4.6.4 angedeutet, scheinen bei Cld1 und Cld5 gegenüber Cld3 und Cld4 gewisse Unterschiede in der Struktur/Konformation der EZS2 zu bestehen. Bei Cld1 liegt der offensichtlichste Unterschied zu Cld3 und Cld4 darin, dass sich an Position P+2 ein Threonin anstelle eines Valins befindet. Durch diese kleinere und polare Aminosäure ist der Turn-Bereich von Cld1 schmaler, zudem kann sich  $T^{(P+2)}$  nicht gut in die Lücke zwischen  $Y_{310}$  und  $R_{227}$  in CPE einlagern. Das erklärt die deutlich stärkere Bindung von cCPE an Cld1<sub>T153V</sub> und die deutliche Bindungssteigerung von  $cCPE_{S313H}$  an Cld1<sub>wt</sub>.

Interessanterweise scheint auch die Turn-Region der EZS2 von Cld5 schmaler zu sein als die von Cld3 und Cld4, obwohl Cld5 an Position P+2 ein Valin besitzt. Dies würde zumindest die Steigerung der Bindung von  $cCPE_{S313H}$  an Cld5<sub>wt</sub> im Vergleich zur Bindung von  $cCPE_{wt}$  erklären. Der deutlichste Unterschied der EZS2 von Cld5 zu denen von Cld1, Cld3 und Cld4

besteht natürlich im Fehlen der den Turn begrenzenden großen hydrophoben Aminosäure an Position P+1. Ein weiterer großer Unterschied der EZS2 von Cld1 und Cld5 im Vergleich zu den EZS2 von Cld3 und Cld4 besteht in der negativ geladenen Aminosäure Aspartat an Position P-1. Der folgende Abschnitt wird darauf eingehen.

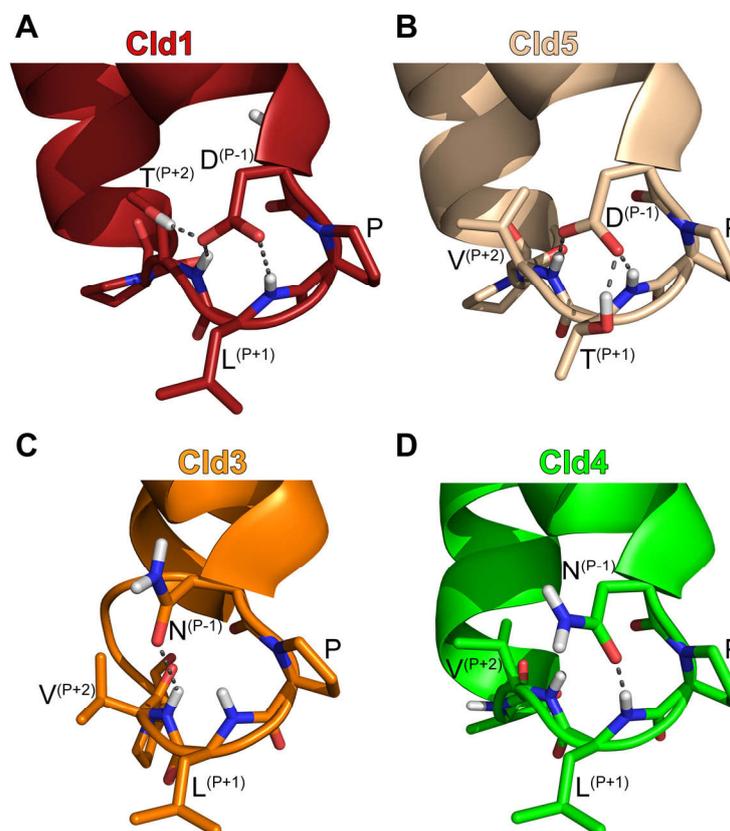
#### 4.8 Die Bindung von cCPE an Claudin-1 und Claudin-5 wird von $D^{(P-1)}$ indirekt gestört

Wie die Ergebnisse der Interaktionsstudien von cCPE mit den Cld3 imitierenden Mutanten von Cld1 und Cld5 zeigen, stört  $D^{(P-1)}$  eindeutig die Interaktion von cCPE mit Cld1 und Cld5. Zunächst wurde davon ausgegangen, dass dies ein direkter, durch elektrostatische Abstoßung verursachter Effekt ist (Kimura *et al.*, 2010; Veshnyakova *et al.*, 2012). Daher wurde versucht, durch Einführung von positiven Aminosäuren am Rand der Tripel-Tyr-Tasche von cCPE eine Interaktion mit  $D^{(P-1)}$  zu etablieren (3.3.3). Dies war jedoch nicht erfolgreich, da  $R_{307}$  in  $cCPE_{S307R}$ ,  $cCPE_{S305P/S307R}$  und  $cCPE_{S305P/S307R/S313H}$  nicht mit  $D^{(P-1)}$ , sondern höchstwahrscheinlich mit  $Q^{(P-5)}$  interagiert. Zudem war auch sonst kein direkt auf eine Interaktion mit  $D^{(P-1)}$  zurückführbarer bindungssteigernder Effekt der Substitutionen von  $cCPE_{S305P/S307R/S313H}$  zu beobachten. Somit wird deutlich, dass der negative Effekt von  $D^{(P-1)}$  auf die Bindung von cCPE nicht durch eine direkte Abstoßung, sondern aufgrund eines Effektes auf die Konformation der EZS2 von Cld1 und Cld5 verursacht werden muss (Abb. 4.7).



**Abb. 4.7: Einfluss der Aminosäure an Position P-1 auf die Struktur des Turns der EZS2.** (A) Schema der EZS2 von Claudinen mit den unterschiedlichen Positionierungsmöglichkeiten der Seitenkette der zentralen Turn-Aminosäure an Position P+2 in Abhängigkeit von der Aminosäure an Position P-1. (B) Befindet sich ein N an Position P-1, wie bei Cld3 und Cld4, ist die Seitenkette der Aminosäure an P+2 eher aus dem HTH-Motiv ausgeklappt. (C) Befindet sich ein D an Position P-1, wie bei Cld1 und Cld5, orientiert sich die Seitenkette der Aminosäure an P+2 eher in das HTH-Motiv.

Da  $D^{(P-1)}$  sich direkt am Übergang zwischen der N-terminalen Helix und der Turn-Region der EZS2 befindet, liegt die Annahme nahe, dass es einen Einfluss auf das Helix-Cap und somit auf die Struktur der Turn-Region hat. Wie in Abb. 4.7 A gezeigt, kann die Seitenkette der Aminosäure an Position P+2 in zwei unterschiedlichen Orientierungen vorliegen. Mediert durch  $D^{(P-1)}$ , scheint die Seitenkette der Aminosäure an Position P+2 (T Cld1 bzw. V Cld5) bei Cld1 und Cld5 eher in das HTH-Motiv der EZS2 gerichtet zu sein (Abb. 4.7 C), wohingegen bei Cld3 und Cld4 die Seitenkette der Aminosäure an Position P+2 eher seitlich aus dem Turn der EZS2 ragt (Abb. 4.7 B). Zudem ist anzunehmen, dass  $D^{(P-1)}$  die Turn-Region der EZS2 versteift, da in Cld1 und Cld5 je zwei Backbone-Amid-Wasserstoffe (von P+1 und P+2) und eine Hydroxylgruppe (P+1 in Cld5; P+2 in Cld1) zur Ausbildung eines Wasserstoffbrücken-Netzwerks mit  $D^{(P-1)}$  verfügbar sind.  $N^{(P-1)}$  in Cld3 und Cld4 hingegen kann nur eine Interaktion mit einem Backbone-Amid-Wasserstoff ausbilden (Abb. 4.8).



**Abb. 4.8: Mögliche Wasserstoffbrückenbindungen von  $N^{(P-1)}$  oder  $D^{(P-1)}$  in der EZS2 von Cld1, Cld3, Cld4 und Cld5.** In (A) Cld 1 (rot) und (B) Cld5 (beige) kann  $D^{(P-1)}$  mit drei unterschiedlichen Atomen Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, wohingegen  $N^{(P-1)}$  in (C) Cld3 (orange) und (D) Cld4 (grün) nur eine ausbilden kann.

Somit wäre die EZS2 von Cld1 und Cld5 schmäler und unflexibler als die von Cld3 und Cld4. Dies würde erklären, warum die Verengung der Claudin-Bindungstasche durch die Substitution von  $S_{313}$  zu H einen positiven Einfluss auf die Bindung von  $cCPE_{S_{313}H}$  an Cld1 und Cld5 hat (vgl. 4.6.4; 3.3.4.2, Abb. 3.23 und 3.3.4.3, Abb. 3.24).

Interessanterweise binden cCPE<sub>S313H</sub> bzw. cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> aber trotz der verengten Claudin-Bindungstasche nicht schlechter als cCPE<sub>wt</sub> an Cld3 und Cld4 (3.3.4.1, Abb. 3.22). Dies spricht dafür, dass der Turn der EZS2 von Cld3 und Cld4 flexibler ist, und die Seitenkette von V<sup>(P+2)</sup> auch in das HTH-Motiv der EZS2 orientiert sein kann. Eventuell ist diese Orientierung sogar der Normalzustand, und nur durch die Bindung von cCPE an die EZS2 von Cld3 oder Cld4 wird die Seitenkette von V<sup>(P+2)</sup> herausgebogen, analog zu dem von Koshland (1958) beschriebenen “*induced-fit*” von Substrat und Enzym, wohingegen dies bei Cld1 und Cld5 nicht passiert, da der Turn der EZS2 von D<sup>(P-1)</sup> zu stark fixiert wird. Zudem verändert D<sup>(P-1)</sup> – durch Interaktion mit dem Backbone-Amid-Wasserstoff der Seitenkette der Aminosäure an P+1 der EZS2 – vermutlich die Positionierung dieser Aminosäure ungünstig hinsichtlich der Interaktion mit der Tripel-Tyr-Tasche von cCPE, der Schlüsselinteraktion der cCPE-Claudin-Bindung (vgl. 4.3.1). Dies würde erklären, warum cCPE<sub>wt</sub> nicht oder nur schwach an Cld5<sub>T151L</sub> und Cld3<sub>N148D</sub> bindet (vgl. 3.2.6, Abb. 3.13 und 3.3.1, Abb. 3.16).

#### 4.9 Die rational konzipierte Doppelmutante cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> ist ein wichtiger Schritt zu einem spezifischen Claudin-5-Binder

Da Cld5 anstelle einer großen hydrophoben (L oder M) eine kleine polare Aminosäure (T, murines Cld5 oder S, humanes Cld5) an Position P+1 in der EZS2 besitzt, kann die Schlüsselinteraktion der cCPE-Claudin-Bindung mit der Tripel-Tyr-Tasche von cCPE nicht ausgebildet werden. Um eine Bindung an Cld5 zu erreichen bzw. zu verstärken, wurde versucht, die Tripel-Tyr-Tasche durch Substitutionen zu verkleinern und an die EZS2 von Cld5 anzupassen. Neben dem positiven Effekt auf eine Bindung an Cld5 wurde angenommen, dass die Verkleinerung der Tripel-Tyr-Tasche von cCPE zu einer Abnahme der Bindung an alle anderen als CPE bindend beschriebenen Claudine (Cld1–Cld4, Cld6–Cld9, Cld14; Sonoda *et al.*, 1999; Fujita *et al.*, 2000; Winkler *et al.*, 2009; Kimura *et al.*, 2010) führt, da diese eine große hydrophobe Aminosäure an Position P+1 besitzen.

Die durch *In-silico*-Analyse der cCPE-Struktur ausgewählten Einzelsubstitutionen bzw. zufällig entstandenen Doppelsubstitutionen in cCPE (3.3.2, Tab. 3.2) zeigten allerdings nicht die erhoffte Bindungssteigerung an Cld5 im Vergleich zur Bindung von cCPE<sub>wt</sub>. Drei cCPE-Varianten, cCPE<sub>D225A/I258K</sub>, cCPE<sub>V259Y</sub> und cCPE<sub>Y306W</sub>, wiesen jedoch eine mit cCPE<sub>wt</sub> vergleichbare Bindung an Cld5 bei gleichzeitiger Abnahme der Bindung an Cld1 auf (3.3.5, Abb. 3.27). Dies ist ein Hinweis darauf, dass bei den cCPE-Varianten cCPE<sub>V259Y</sub> und cCPE<sub>Y306W</sub> eine Verkleinerung der Tripel-Tyr-Tasche vorliegen könnte. Die mit cCPE<sub>wt</sub> vergleichbare Bindung von cCPE<sub>D225A/I258K</sub> an Cld5 deutet auf einen minimal negativen Einfluss von D<sub>225</sub> auf die Claudin-cCPE-Interaktion, da cCPE<sub>I258K</sub> schlechter an Cld5 bindet. Dieser leicht negative

Einfluss von D<sub>225</sub> in cCPE zeigt sich auch bei Cld3, Cld6, Cld7 und Cld9 (vgl. 3.2.2, Abb. 3.4 und 3.4.2, Abb. 3.34; Abb. 3.35 & Abb. 3.37), wobei die Unterschiede in der Bindung so gering sind, dass fraglich ist, ob es sich hier nicht nur um Hintergrundschwankungen handelt.

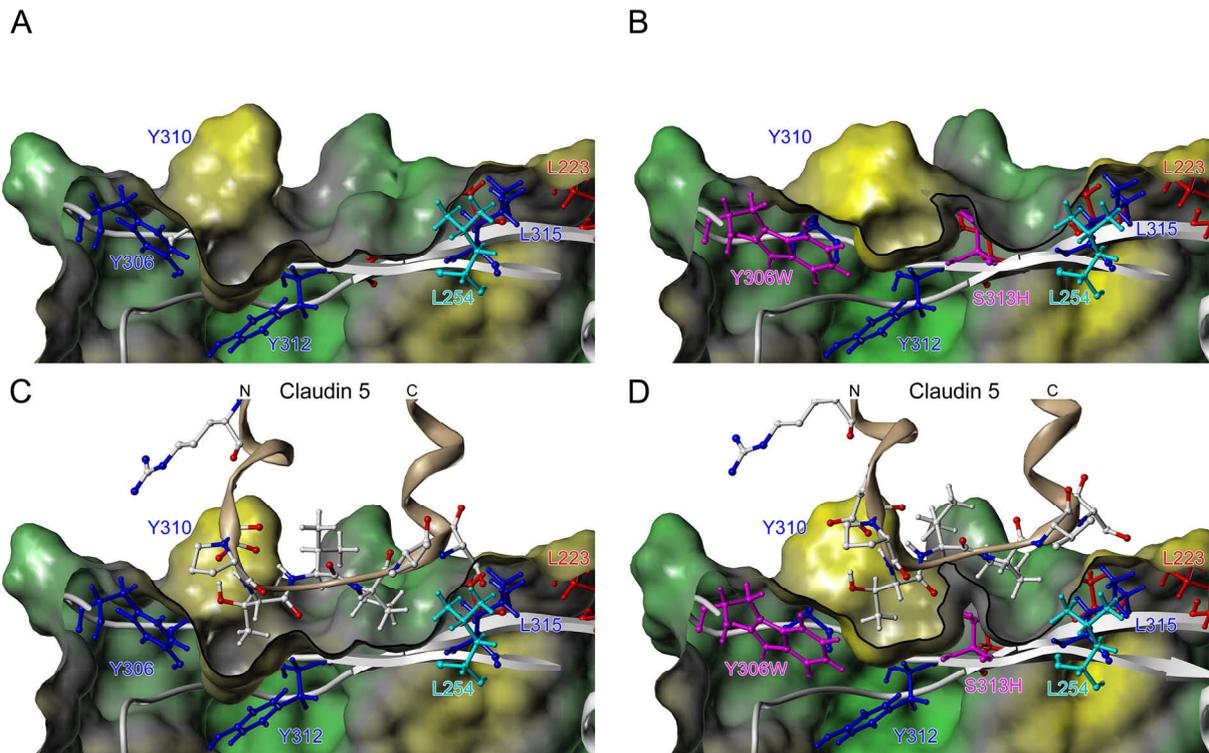
Aufgrund der vermuteten Unterschiede in der Turn-Konformation der EZS2 von Cld5 verglichen zur EZS2 von Cld3 und Cld4, ausgelöst durch D<sub>149</sub><sup>(P-1)</sup> (vgl. 4.8), ist es nicht sonderlich überraschend, dass Einzelsubstitutionen an der Tripel-Tyr-Tasche nicht zu einer Bindungssteigerung von cCPE an Cld5 führten. Daher wurden die Substitutionen an der Tripel-Tyr-Tasche, die eine deutlich stärkere Abnahme der Bindung an Cld1 als an Cld5 zeigten, mit der Substitution von S<sub>313</sub> zu H kombiniert, die die Claudin-Bindungstasche der Turn-Konformation der EZS2 von Cld1 und Cld5 anpasst (vgl. 3.3.4; 4.6.4 & 4.8).

Die Substitution V259Y in Kombination mit S313H blockierte die Bindung von cCPE<sub>V259Y/S313H</sub> an Cld1 und Cld5 nahezu vollständig (3.3.6, Abb. 3.28). Dies liegt vermutlich daran, dass Y<sub>259</sub> mit H<sub>313</sub> interagiert und hierdurch die Claudin-Bindungstasche von cCPE<sub>V259Y/S313H</sub> fast vollständig geschlossen wird.

Die anderen cCPE-Varianten – cCPE<sub>L238F/S313H</sub>, cCPE<sub>A302Y/S313H</sub> und cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> – zeigten in zellulären Bindungsassays eine stärkere Bindung an Cld1 und Cld5 als cCPE<sub>wt</sub>, wobei nur cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> eine stärkere Bindung an Cld5 einging als cCPE<sub>S313H</sub> (3.3.6, Abb. 3.28). Da cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> gleichzeitig eine Abnahme der Bindung an Cld1 im Vergleich zur Bindung von cCPE<sub>S313H</sub> zeigte, ist davon auszugehen, dass die Tripel-Tyr-Tasche durch die Substitution von Y306W verkleinert wurde (siehe 4.9.1).

#### **4.9.1 Die Tripel-Tyr-Tasche von cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> wurde durch die Substitution von Y<sub>306</sub> zu Tryptophan verkleinert**

Die Substitution von Y<sub>306</sub> zu Tryptophan in Kombination mit S313H zeigt einen positiven Effekt auf die Bindung von cCPE an Cld5, wohingegen die Bindung an Cld1 im Vergleich zu cCPE<sub>S313H</sub> geschwächt wird (3.3.6, Abb. 3.28). Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass durch die Substitution von Y<sub>306</sub> zu W die Tripel-Tyr-Tasche von cCPE verkleinert wird. Hierfür spricht auch, dass die Einführung einer großen hydrophoben Aminosäure an Position P+1 der EZS2 von Cld5 den bindungssteigernden Effekt von cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> im Vergleich zu cCPE<sub>S313H</sub> aufhebt bzw. sogar umkehrt (3.3.7, Abb. 3.29). Zudem zeigte cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> an Cld1, Cld3 und Cld4 sowie Cld6–Cld9, die alle eine große hydrophobe Aminosäure an Position P+1 der EZS2 besitzen (3.3.7, Abb. 3.30), eine schwächere Bindung als cCPE<sub>S313H</sub>, und an Cld3, Cld4 und Cld6–Cld9 sogar eine schwächere Bindung als cCPE<sub>wt</sub> (3.3.7, Abb. 3.31). Dies sind weitere Indizien dafür, dass die Tripel-Tyr-Tasche verkleinert wurde, wie es der Vergleich der Claudin-Bindungstasche von cCPE<sub>wt</sub> mit dem Modell der Bindungstasche von cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> bestätigt (Abb. 4.9).



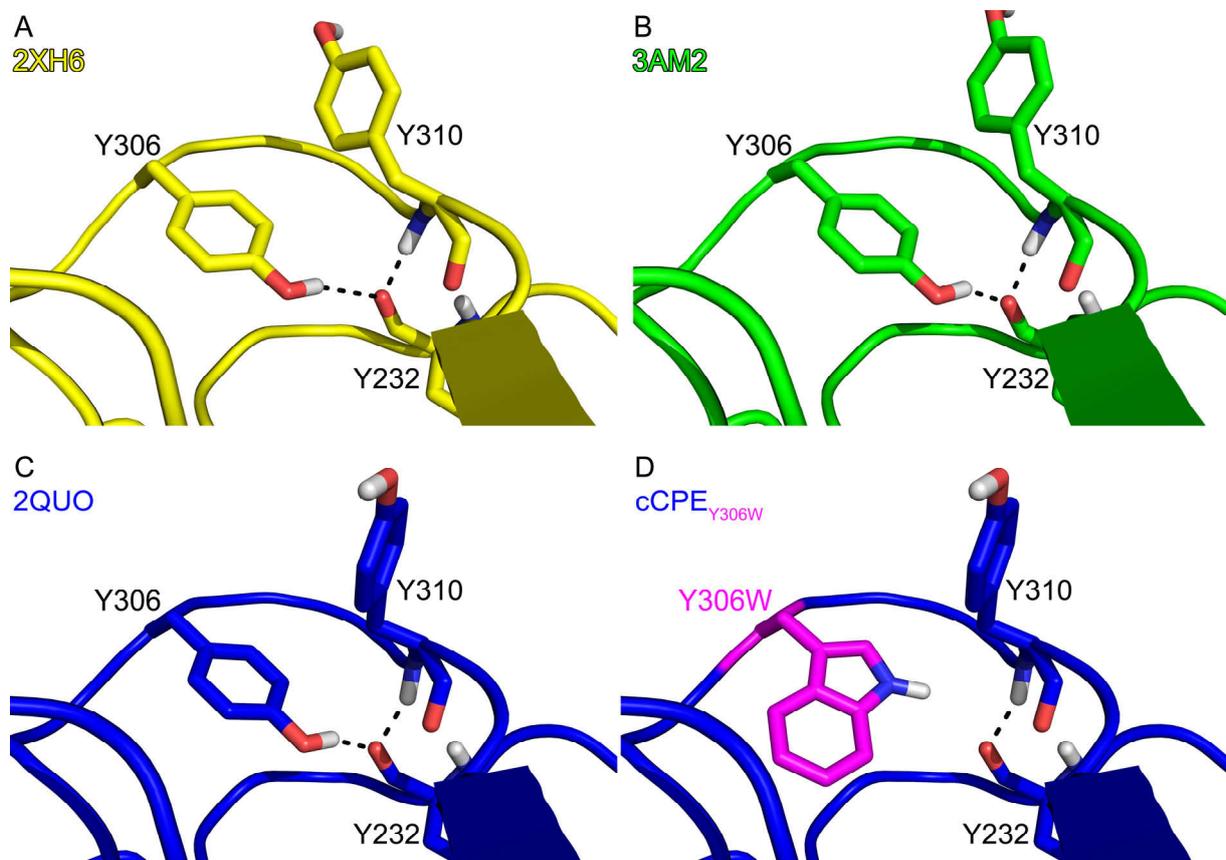
**Abb. 4.9: Querschnitt der Claudin-Bindungstasche von (A) cCPE<sub>wt</sub> (PDB ID: 2QUO) und (B) cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> (Modell basierend auf 2QUO) sowie detaillierte Interaktionsmodelle mit der EZS2 von Cld5 (beige). Aminosäuren der Turn-Region der EZS2 in Kugel-Stab-Darstellung (weiß: C und H, blau: N, rot: O) mit (C) cCPE<sub>wt</sub> und (D) cCPE<sub>Y306W/S313H</sub>. cCPE als Cartoon (weiß), Oberfläche mit berechnetem hydrophobem Potential (gelb: hydrophob, grau: unpolar, grün: polar/geladen), die die Bindungstasche definierenden Aminosäuren in Kugel-Stab-Darstellung (blau: als wichtig für Cld4-Bindung beschrieben; rot: „oberer Rand“ der Bindungstasche; türkis: „unterer Rand“ der Bindungstasche; magenta: Substituierte Aminosäure).**

Wie das Modell von cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> deutlich macht, wird durch die Substitution von Y<sub>306</sub> zu W die Vertiefung der Tripel-Tyr-Tasche merklich verringert. Dadurch wird die Claudin-Bindungstasche für eine Bindung an Cld5 geeigneter, was der Vergleich der Interaktionsmodelle von Cld5 mit cCPE<sub>wt</sub> und cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> darstellt (Abb. 4.9 C, D).

Der Grund, warum cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> trotz der Verkleinerung der Tripel-Tyr-Tasche immer noch an Claudine mit großer hydrophober Aminosäure an Position P+1 in der EZS2 bindet – wenn auch deutlich schlechter als cCPE<sub>wt</sub> – liegt wahrscheinlich darin, dass W<sub>306</sub> in einem flexiblen Loop-Bereich von cCPE lokalisiert ist und im Gegensatz zu Y<sub>306</sub> keine stabilisierende Wasserstoffbrücke mit Y<sub>232</sub> ausbilden kann (Abb. 4.10, folgende Seite).

Wie Abb. 4.10 zeigt, formt Y<sub>306</sub> in allen veröffentlichten Kristallstrukturen von CPE (PDB ID: 2XH6 (Briggs *et al.*, 2011); PDB ID: 3AM2 (Kitadokoro *et al.*, 2011)) und cCPE (PDB ID: 2QUO (Van Itallie *et al.*, 2008)) eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Backbone-Carbonyl-Sauerstoff von Y<sub>232</sub>, welches wiederum vom Backbone-Amid-Wasserstoff von Y<sub>310</sub> stabilisiert wird. W<sub>306</sub> in cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> kann diese stabilisierende Wasserstoffbrückenbindung nicht ausbilden. Vermutlich kann die Seitenkette daher weggebogen werden, wodurch

sich die Tripel-Tyr-Tasche wieder vergrößern würde, was eine Bindung von  $cCPE_{Y306W/S313H}$  an Claudine mit großer hydrophober Aminosäure an Position P+1 in der EZS2 ermöglicht.



**Abb. 4.10:**  $W_{306}$  in  $cCPE_{Y306W/S313H}$  bildet im Gegensatz zu  $Y_{306}$  in  $cCPE_{wt}$  keine Wasserstoffbrückenbindung zu  $Y_{232}$  aus. Vergleich der Positionierung der Aminosäure an Position 306 in den Kristallstrukturen von Vollängen-CPE (**A**, 2XH6, gelb & **B**, 3AM2, grün) und (**C**)  $cCPE$  (2QUO, blau), mit (**D**) der Orientierung im Modell von  $cCPE_{Y306W}$  (basierend auf 2QUO; blau, substituierte Aminosäure in magenta), dargestellt als Cartoon mit den Aminosäuren an den Positionen 232, 306 und 310 als Sticks (rot: Sauerstoff, blau: Stickstoff, weiß: Wasserstoff) und möglichen Wasserstoffbrücken (gestichelte schwarze Linien).

#### 4.9.2 $cCPE_{Y306W/S313H}$ als Ausgangspunkt für die Entwicklung eines spezifischen Claudin-5-Binders

Mit  $cCPE_{Y306W/S313H}$  ist es zum ersten Mal gelungen, eine  $cCPE$ -Variante zu erstellen, die eine deutlich geänderte Cld-Subtypspezifität zu einem normalerweise nicht bindenden Claudin hat. Zudem zeigt  $cCPE_{Y306W/S313H}$  eine nanomolare Affinität für Cld5 ( $33 \pm 10$  nM, siehe 3.3.9), was der Größenordnung der Affinität von  $cCPE_{wt}$  für die klassischen CPE-Rezeptoren Cld3 und Cld4 ( $\approx 10$  nM, Sonoda *et al.*, 1999; Fujita *et al.*, 2000) entspricht. Die Untersuchungen, die zur Identifizierung von  $cCPE_{Y306W/S313H}$  als Cld5-Binder geführt haben, wurden in HEK293-Zellen durchgeführt, die keine Expression von endogenen Claudinen (Winkler, 2007; Piontek *et al.*, 2008) und somit eine artifizielle Verfügbarkeit der jeweils

überexprimierten Claudine aufweisen. Daher war es wichtig, die gesteigerte Bindung von cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> im Vergleich zu cCPE<sub>wt</sub> und cCPE<sub>S313H</sub> auch an einem Zellsystem mit Expression von endogenen TJ-Proteinen – vor allem mit einer starken endogenen Cld5-Expression – zu zeigen. cEND-Zellen (*cerebral endothelial-cells*) zeigen eine Expression von endogenen TJ-Proteinen sowie BBB-Markern, z.B. Cld5, und wurden als ein Modellsystem für die BBB beschrieben (Förster *et al.*, 2005). Neben der starken Cld5-Expression wird auch über eine geringe Expression von Cld3 und Cld12 berichtet (Kleinschnitz *et al.*, 2011). Cld1 wurde bisher nur auf mRNA-Level nachgewiesen (Förster *et al.*, 2007).

Bei cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> ließ sich im Vergleich zu cCPE<sub>wt</sub> und cCPE<sub>S313H</sub> eine deutlich gesteigerte Bindung an cEND-Zellen beobachten (3.3.8). Dass es sich hierbei hauptsächlich um eine Bindung an Cld5 handelt, kann aus dem Bindungsverhalten der anderen getesteten cCPE-Varianten geschlossen werden. Eine Bindung an Cld3 scheidet aus, da cCPE<sub>wt</sub> nahezu keine Bindung zeigt und nur leicht stärker als cCPE<sub>Y306A/L313A</sub> (Negativkontrolle der cCPE-Bindung) bindet. Da Cld1 auf mRNA-Level in cEND-Zellen nachgewiesen werden konnte, wäre natürlich denkbar, dass die verstärkte Bindung aufgrund einer Interaktion mit Cld1 verursacht wird, auch wenn dieses bisher noch nicht als Protein in cEND-Zellen nachgewiesen wurde. Dagegen spricht allerdings die deutlich schwächere Bindung von cCPE<sub>S313H</sub>. Wie die zellulären Bindungsassays mit Cld1 ergaben (3.3.6, Abb. 3.28 und 3.3.7.2, Abb. 3.31), sollte cCPE<sub>S313H</sub> in diesem Fall eine stärkere Bindung an cEND-Zellen zeigen als cCPE<sub>Y306W/S313H</sub>. Cld12 wird als nicht-klassisches Cld klassifiziert und zeigt deutliche Sequenzunterschiede in der EZS2 (Cld12: K<sup>(P-1)</sup>F<sup>(P)</sup>E<sup>(P+1)</sup>P<sup>(P+2)</sup>V<sup>(P+3)</sup>F<sup>(P+4)</sup>T<sup>(P+5)</sup>; Cld3: N<sup>(P-1)</sup>P<sup>(P)</sup>L<sup>(P+1)</sup>V<sup>(P+2)</sup>P<sup>(P+3)</sup>E<sup>(P+4)</sup>A<sup>(P+5)</sup>); Krause *et al.*, 2008, 2009). Es weist also höchstwahrscheinlich eine andere EZS2-Struktur/Konformation auf, sodass eine Bindung von cCPE grundsätzlich auszuschließen ist.

Interessanterweise zeigt cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> eine nahezu mit cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> vergleichbare und deutlich bessere Bindung an cEND-Zellen als cCPE<sub>S313H</sub>. Dies ist insofern überraschend, da cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> in den zellulären Bindungsassays mit Cld5 exprimierenden HEK293-Zellen immer eine mit cCPE<sub>S313H</sub> vergleichbare Bindung an Cld5 zeigte (vgl. 3.3.4.3, Abb. 3.24 und 3.3.4.4, Abb. 3.26). Dieses Ergebnis könnte wiederum auf die Anwesenheit von Cld1 als Protein in cEND-Zellen hinweisen, wobei weitergehende Expressionsstudien notwendig sind, um hier eine endgültige Aussage treffen zu können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> eine deutliche Bindungssteigerung an cEND-Zellen zeigt, die ein BBB-Modellsystem repräsentieren und hauptsächlich Cld5 exprimieren. Hierdurch wird die Änderung der Spezifität dieser cCPE-Variante in einem physiologisch relevanteren Zellsystem bestätigt. Somit ist cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> eine gute Basis für die Entwicklung eines spezifischen Cld5-Binders.

## 4.10 Sind CPE-Varianten möglich, die gezielt mit einem Claudin-Subtyp interagieren?

CPE interagiert mit vielen verschiedenen Cld-Subtypen. Cld3 und Cld4 zeigen hierbei die stärkste cCPE-Bindung, allerdings interagieren Cld6 und Cld9 ähnlich gut, und für Cld1, Cld2, Cld7, Cld8 und Cld14 wurde ebenfalls über eine CPE-Bindung berichtet (Sonoda *et al.*, 1999; Fujita *et al.*, 2000; Winkler *et al.*, 2009; Kimura *et al.*, 2010). Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von cCPE mit verschiedenen Claudinen untersucht und versucht, Veränderungen in der Spezifität von cCPE zu erzielen. Mit cCPE<sub>L223A/D225A/R227A</sub> (zeigt Bindungsverlust an Cld4 aber nicht an Cld3) und cCPE<sub>L254A/S256A/I258A/D284A</sub> (zeigt kaum Bindung an Cld3 bei cCPE<sub>wt</sub>-ähnlicher Bindung an Cld4) sind zwei cCPE-Varianten identifiziert worden, die selektiv die Bindung an einen Cld-Subtypen verringern (3.2.2, Abb. 3.4). Bei beiden cCPE-Varianten sind allerdings immer noch deutliche Bindungen an Cld6, Cld7 und Cld9 zu beobachten (3.4.2, Abb. 3.34, Abb. 3.35, Abb. 3.37). Nur an Cld8 zeigt sich eine deutliche Inhibition der Bindung dieser cCPE-Varianten, allerdings ergibt sich hier bei nahezu allen getesteten cCPE-Varianten ein deutlicher Bindungsverlust (3.4.2, Abb. 3.36).

Folglich wird deutlich, dass mit den bisher bekannten cCPE-Varianten kein spezifisches *Targeting* von einzelnen Claudinen möglich ist. Allerdings können bestimmte Claudine durch die Wahl der cCPE-Varianten von einer Bindung ausgeschlossen werden. Zum Beispiel binden cCPE<sub>D225A</sub> oder cCPE<sub>S313H</sub> ähnlich zu cCPE<sub>wt</sub> an Cld3, Cld4, Cld6, Cld7 und Cld9, allerdings kaum an Cld8 (vgl. 3.2.2, Abb. 3.4 und 3.4.2, Abb. 3.31, Abb. 3.34, Abb. 3.35, Abb. 3.36, Abb. 3.37). Im Fall von cCPE<sub>S313H</sub> werden auch Cld1 und Cld5 in das Bindungsspektrum mit aufgenommen, da es eine deutliche Bindungssteigerung an diese Claudine zeigt (3.3.4.2, Abb. 3.23 und 3.3.4.3 Abb. 3.24).

Auch die 2012 von Takahashi und Kollegen publizierte cCPE-Variante m19 und die in dieser Arbeit getesteten Kernsubstitutionen cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> zeigen zwar eine erhöhte Bindung an Cld1 und Cld5, allerdings keine deutlich verbesserte Spezifität für einen Cld-Subtyp (Takahashi *et al.*, 2012; 3.3.4.1, Abb. 3.22; 3.4.2, Abb. 3.34, Abb. 3.35, Abb. 3.36 & Abb. 3.37).

Die größte Chance für eine verbesserte Spezifität liegt vermutlich in einer cCPE-Variante, die an einen typischerweise nicht mit cCPE interagierenden Cld-Subtyp bindet. Zum Beispiel sollte eine cCPE-Variante, die eine starke Bindung an Cld5 zeigt, kaum oder gar nicht mehr mit anderen Cld-Subtypen interagieren, da Cld5 im Gegensatz zu den Cld-Subtypen, die eine cCPE-Bindung zeigen, ein T<sup>(P+1)</sup> anstelle einer großen hydrophoben Aminosäure an Position P+1 in der EZS2 besitzt. Diese Vermutung wird durch cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> bestätigt: es zeigt eine deutliche Steigerung der Bindung an Cld5, bindet gleichzeitig schlechter als cCPE<sub>wt</sub> an Cld3, Cld4, Cld6, Cld7, Cld8 und Cld9 (3.3.7.2, Abb. 3.31), und das Einführen einer großen hydrophoben Aminosäure an Position P+1 der EZS2 in Cld5 (Cld5<sub>T151L</sub> &

Cld5<sub>D149N/T151L</sub>) führt zu einer Abschwächung der Bindung von cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> (3.3.7.1, Abb. 3.29). Allerdings zeigt cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> immer noch eine – wenn auch schwache – Bindung an alle anderen getesteten Cld-Subtypen. Somit wurden zwar eine deutliche Änderung in der Cld-Subtypspezifität dieser cCPE-Variante und eine mindestens 30-fache Verbesserung der  $K_d$  erzielt (siehe 3.3.9,  $K_d$  von cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> für Cld5:  $33 \pm 10$  nM gegenüber der  $K_d$  von cCPE<sub>wt</sub> für Cld5  $\gg 1$   $\mu$ M), aber es wurde keine ausschließliche Cld5-Spezifität erreicht (vgl. 4.9). Dennoch ist cCPE<sub>Y306W/S313H</sub> ein guter Ausgangspunkt für eine Cld5-spezifische cCPE-Variante.

#### 4.11 Wie kann die Spezifität von cCPE für einzelne Claudin-Subtypen gesteigert werden?

Aufgrund der hauptsächlich auf hydrophoben Wechselwirkungen basierenden Interaktion von cCPE mit Claudinen ist die Verbesserung der Spezifität schwierig. In den bisherigen Bindungsanalysen konnten kaum Anzeichen für elektrostatische Interaktionen bzw. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der EZS2 und cCPE gefunden werden (siehe. 4.3.2). Der deutlichste Hinweis auf eine mögliche elektrostatische Interaktion ergibt sich aus den Bindungsdaten von Cld1, Cld5 und Cld5<sub>R145Q</sub><sup>(P-5)</sup> mit cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> (3.3.4.4, Abb. 3.26). Q<sup>(P-5)</sup> in Cld1 und Cld5<sub>R145Q</sub><sup>(P-5)</sup> scheint eine Interaktion mit S307R von cCPE<sub>S305P/S307R/S313H</sub> bzw. cCPE<sub>S307R</sub> einzugehen, wodurch die Platzierung der N-terminalen Helix der EZS2 über der Tripel-Tyr-Tasche von cCPE, wie in den Interaktionsmodellen gezeigt, bestätigt wird. Allerdings weisen alle bisher untersuchten Claudine in der N-terminalen Helix der EZS2 eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit auf, sodass die C-terminale Helix der EZS2 vermutlich der bessere Angriffspunkt für die Generierung von Cld-spezifischen cCPE-Varianten ist. Hier weisen die verschiedenen Cld-Subtypen deutlich unterschiedlichere Sequenzen auf (3.3.7.2, Abb. 3.30). Allerdings ergeben sich aus allen bisherigen Bindungsdaten keine Hinweise auf elektrostatische Interaktionen oder Wasserstoffbrückenbindungen von cCPE mit der C-terminalen Helix der EZS2, woraus resultiert, dass nur wenig detaillierte strukturelle Informationen (Positionierung und Orientierung der Seitenketten) über diese Seite der cCPE-Claudin-Interaktionsmodelle vorhanden sind.

Erst durch genauere strukturelle Informationen wird es möglich werden, wirklich spezifische cCPE-Varianten zu generieren, da vermutlich die Bindungstasche ausschließlich auf den jeweiligen Subtyp zugeschnitten werden muss, und zusätzlich für den Cld-Subtyp spezifische elektrostatische Interaktionsmöglichkeiten in die cCPE-Variante eingeführt werden müssen. Zudem ist unklar, inwiefern die cCPE-Bindung durch die EZS1 beeinflusst wird. Zwar zeigten unterschiedliche Cld-Chimären, dass die EZS1 keinen Einfluss auf die Bindung von cCPE an

Claudine hat (Fujita *et al.*, 2000; Kimura *et al.*, 2010). Aufgrund der vorhergesagten Topologie von Claudinen ist allerdings anzunehmen, dass die EZS1 sehr nahe an der EZS2 liegt. Somit ist denkbar, dass periphere Interaktionen mit cCPE vorhanden sind, bzw. dass die EZS1 durch Interaktion mit der EZS2 die Zugänglichkeit der EZS2 für cCPE beeinflusst. Hierin besteht ebenfalls eine Chance zu Generierung von Cld-spezifischen cCPE-Varianten. Durch strukturelle Informationen über die EZS1 und deren Lage zur EZS2 könnten cCPE-Varianten mit auf die EZS1 des jeweiligen Cld optimierten peripheren Interaktionen erstellt werden, und dies könnte zu einer Steigerung der Spezifität beitragen.

Ein weiterer Ansatz zur Generierung von Cld-spezifischen cCPE-Varianten wäre über „*random-mutagenesis*“ mit einem nachfolgenden Screening auf Spezifität zu einem bestimmten Cld, wie es von Kakutani beschrieben wurde (Kakutani *et al.*, 2011). Dieses System wurde für die Generierung der von Takahashi beschriebenen cCPE-Varianten mit höherer Cld4-Affinität sowie die Herstellung des Breitband-Claudin-Binders genutzt (Takahashi *et al.*, 2011, 2012).

Auch der Einsatz des Prinzips der „*directed evolution*“ – mittels Phage-Display (Hawkins *et al.*, 1992; Roberts *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1999), Ribosomal-Display (Jermutus *et al.*, 2001) oder mRNA-Display (Roberts & Szostak, 1997; Seelig & Szostak, 2007) – könnte zur Generierung von Cld-subtypspezifischen cCPE-Varianten genutzt werden.

Der Nachteil dieser Methoden ist jedoch, dass durch die willkürlich eingeführten Mutationen Rückschlüsse über die Funktion der einzelnen Substitutionen in cCPE und die Struktur der EZS2 von Claudinen schwieriger werden. Die Effekte der einzelnen Substitutionen in cCPE auf die Bindung an Claudine können nur durch nachfolgende Erstellung der Einzelsubstitutionen und Analysen der Bindung charakterisiert werden. Zudem basieren der Ribosomal-Display und der mRNA-Display auf *In-vitro*-Expression der Proteine, was einen erheblich höheren experimentellen Aufwand verursacht als die heterologe Genexpression von rekombinanten Proteinen in *E. coli*. Ein Vorteil dieser Methoden hingegen ist, dass keinerlei Informationen zur Struktur der Cld-Subtypen nötig sind, und dass die peripheren Interaktionen sozusagen automatisch mit optimiert werden würden.

Für eine Cld5-spezifische Variante ergeben sich aus den Daten folgende Verbesserungsmöglichkeiten: Analog zur Substitution von S<sub>307</sub> zu R (positiver Effekt auf Bindung an Cld1 durch Interaktion mit Q<sub>146</sub><sup>(P-5)</sup>) sollte S<sub>307</sub> gegen eine lange, negativ geladene oder polare Aminosäure wie Glutamat oder Glutamin getauscht werden. Glutamat bzw. Glutamin an Position 307 von cCPE könnten eine Interaktion mit R<sub>145</sub><sup>(P-5)</sup> von Cld5 eingehen und somit die Bindung von cCPE an Cld5 stabilisieren oder erhöhen (Analog zu cCPE<sub>S307R</sub>, 4.6.1, Abb. 4.5). Zusätzlich sollte die Tripel-Tyr-Tasche weiter verkleinert bzw. weniger flexibel geschlossen werden. Dies könnte durch weitere Substitutionen an der Tasche oder durch die

Einführung von unnatürlichen Aminosäuren geschehen, auch eine chemische Modifikation der Tripel-Tyr-Tasche wäre eine Möglichkeit.

## 4.12 cCPE als Biosensor zur Detektion von Claudin überexprimierenden Tumoren

In unterschiedlichen Studien wurde eine Aufregulierung von bestimmten Claudinen in epithelialen Tumoren wie Darm-, Brust-, Pankreas-, Prostata-, Eierstock-, oder Endometrialkrebs gezeigt (Morita *et al.*, 1999; Long *et al.*, 2001; Rangel *et al.*, 2003; Hewitt *et al.*, 2006). Daher liegt es nahe, die Überexpression von bestimmten Claudinen als Biomarker in der Diagnostik einzusetzen. Da Claudine an der Zelloberfläche und somit auch an der Tumoroberfläche zugänglich sind, wären sie ein geeignetes Ziel für Liganden zur Markierung in bildgebenden Verfahren. Ein solcher Ligand ist cCPE, welches über kovalente Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen oder anderweitig detektierbaren Markierungen, wie zum Beispiel Cryptophan A (Brotin *et al.*, 2001), für die Bildgebung verwendet werden könnte. Daher wurden im Zuge dieser Arbeit grundlegende Versuche zur Markierbarkeit und Nutzbarkeit von cCPE durchgeführt (3.6).

Da zu Beginn der Arbeit nicht klar war, inwiefern eine chemische Modifizierung von cCPE dessen Bindungsfähigkeit an Claudine beeinflusst, und um cCPE in der Fluoreszenzmikroskopie zur Detektion von Claudinen verwenden zu können, wurde mit Alexa Fluor®647 markiertes cCPE (Alexa647-cCPE) hergestellt (3.6.1). Das gewonnene Alexa647-cCPE zeigte eine gute Markierung und eine sehr gute Fluoreszenzintensität im LSM (3.6.1, Abb. 3.47, Abb. 3.48). Zudem zeigte Alexa647-cCPE, wie unmodifiziertes cCPE, eine Bindung an Cld3, Cld4 und Cld5<sub>D149N/T151L</sub> (3.6.1, Abb. 3.46, Abb. 3.47 & Abb. 3.48). Somit ist es zur Detektion von Claudinen im LSM und zur Nutzung in bildgebenden Verfahren bei der Tumordiagnostik prinzipiell geeignet. Dies wurde durch eine Studie bestätigt, in der gezeigt werden konnte, dass bis zu 48h nach Injektion von mit Cy5.5 markiertem cCPE in Mäuse mit Cld4 überexprimierenden Pankreastumoren bzw. Tumor-Xenografts – und im Vergleich zu nicht Cld überexprimierenden Tumoren bzw. normalem Pankreasgewebe – eine signifikant erhöhte Anreicherung von Fluoreszenz an diese detektierbar war (Neesse *et al.*, 2013).

Da eine Detektion von Cld überexprimierenden Tumoren mittels Fluoreszenz allerdings auf oberflächliche bzw. oberflächennahe Tumore begrenzt ist, wurde zusätzlich versucht, durch die Koppelung von cCPE mit Cryptophan A einen Xenon-Biosensor zu erstellen.

Hierbei würde Cryptophan A über eine negative Kontrastverstärkung zur Bildgebung eingesetzt werden. Ein Xenon-Atom (<sup>129</sup>Xe) lagert sich in Cryptophan A ein, hierdurch zeigt es eine deutlich veränderte Resonanzfrequenz des Kernspins im Vergleich zu freiem Xe. Dies allein

ist allerdings noch nicht sensitiv genug, um den Unterschied zwischen freiem und gebundenem Xe in bildgebenden Verfahren darzustellen. Da das Cryptophan-gebundene Xe allerdings selektiv depolarisiert werden kann, wodurch das NMR-Signal verloren geht, und ein stetiger Austausch von in Cryptophan gebundenem und freiem Xe stattfindet, kommt es zu einer Anreicherung von depolarisiertem Xe in der direkten Umgebung von Cryptophan A. Somit kann die Position von Cryptophan A in einer Probe über einen negativen Kontrast vor und nach Depolarisation von Xe detektiert werden (Schröder *et al.*, 2006). Mittels eines cCPE-basierten Xenon-Biosensors wäre es möglich, Cld überexprimierende Tumore im MRT abzubilden, wodurch eine Detektion in tieferen Geweben möglich wäre.

Da Cryptophan A stark hydrophob ist und sich somit in die Cld-Bindungstasche von cCPE einlagern könnte, wurde zunächst der Einfluss von Cryptophan A auf die Bindung von cCPE an Claudine untersucht. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede in der Bindung von mit Cryptophan A vorinkubiertem zu unbehandeltem cCPE (3.6.2, Abb. 3.50). cCPE zeigte auch keine starke Anfälligkeit gegenüber der gewählten Lösungsmittelkonzentration für die chemische Koppelung mit Cryptophan (10% DMSO; Abb. 3.49). Dennoch erwiesen sich die ersten Markierungsversuche von cCPE mit Cryptophan A als nicht erfolgreich, da nur etwa jedes zehnte cCPE-Molekül mit einem Cryptophan A gekoppelt wurde, und somit die Markierungseffizienz äußerst gering war. Zudem ließ sich im „*multinuclear NMR micro-imaging system*“ keine Bindung von Cryptophan-cCPE<sub>K257A</sub> detektieren. Zwar zeigte Cryptophan-cCPE<sub>K257A</sub> eine deutliche Bindung an Cld3 und Cld4 in normalen zellulären Bindungsassays (3.6.2, Abb. 3.51 und Abb. 3.52 B), es ist allerdings möglich, dass der Anteil der markierten cCPE-Moleküle hier nicht gebunden hat, da Cryptophan-cCPE<sub>K257A</sub> eine ca. 10% schlechtere Bindung zeigte als unmarkiertes cCPE (3.6.2, Abb. 3.51). Zudem waren bei Cryptophan-cCPE<sub>K257A</sub> hochmolekulare SDS-resistente Banden auf einer SDS-Page zu beobachten, was auf eine Oligomerisierung und eventuell auf Probleme bei der chemischen Modifizierung (Crosslinking) hinweist. Diese hochmolekularen Banden zeigten allerdings ebenfalls eine Bindung an Cld3 (3.6.2, Abb. 3.52 A & B).

Dennoch sollte die Erstellung eines cCPE-basierten Xenon-Biosensors weiter versucht werden, da darin ein großes Potential für die medizinische Diagnostik liegt. Hierzu muss zunächst die Kopplungseffizienz erhöht werden. Da cCPE prinzipiell mittels NHS-Ester gut markierbar ist, wie die Versuche mit Alexa Fluor<sup>®</sup>647-NHS-Ester zeigten, liegt das Problem wahrscheinlich in der Hydrophobizität von Cryptophan A – bzw. des Cryptophan-A-PEG-Konstrukts, bei dem PEG als Linker diente. Der Einsatz eines hydrophileren Linkers – und somit einer besseren Löslichkeit des Cryptophan-A-Linker-Konstrukts – könnte die Markierungseffizienz vermutlich steigern. Parallel hierzu sollte allerdings auch die chemische Stabilität von cCPE bezüglich organischer Lösungsmittel getestet werden, um ein besseres Puffersystem für die Markierungsreaktion zu finden. Möglicherweise wäre auch eine Markierung

von cCPE über eigens auf der Oberfläche eingeführte Cysteine und ein entsprechendes Maleimid-Linker-Cryptophan-A-Molekül zielführend. Somit muss geschlossen werden, dass die kompletten Prozesse der Markierungsreaktion überdacht und optimiert werden müssen, um eine erfolgreiche Markierung mit Cryptophan zu erreichen.

#### 4.13 Erweiterung der Strukturmodelle von Claudinen

Bisher ist nur sehr wenig über die Struktur von Claudinen bekannt, und keine Struktur von Cld-verwandten Proteinen mit genügend Sequenzhomologie wurde bisher mit ausreichender Auflösung gelöst. Das verhindert bisher die Erstellung regulärer Homologiemodelle von Voll-längen-Claudinen. Zwar wurden kürzlich zwei Cld-Modelle – für Cld1 (Bhavaniprasad *et al.*, 2013a) und für Cld4 (Bhavaniprasad *et al.*, 2013b) – veröffentlicht, die mittels *I-TASSER* generiert wurden, allerdings widersprechen diese – vor allem in den EZS – den experimentellen Daten zu räumlicher Nähe von Aminosäuren in der EZS1 (Angelow & Yu, 2009) bzw. den Struktur funktionsanalysen und den darüber generierten Modellen der EZS2 (Krause *et al.*, 2008, 2009; Piontek *et al.*, 2008; Veshnyakova *et al.*, 2012). Zusätzlich unterscheiden sich die Modelle für Cld1 und Cld4 zu stark voneinander, sind diese doch relativ homologe Proteine (humanes Cld1/Cld4: 46% identische und 67% ähnliche Aminosäuren; murines Cld1/Cld4: 45% identische und 66% ähnliche Aminosäuren über die gesamte Sequenz).

Vor Kurzem wurde die Kristallstruktur von IP39 aus *Euglena gracilis* beschrieben. IP39 zeigt konservierte Sequenzmotive der PMP-22/EMP/MP20/Claudin-Superfamilie, und es wurden 4 Transmembranbereiche vorhergesagt. Allerdings zeigten die IP39-Kristalle nicht genügend Diffraktion in der Röntgenstrukturanalyse, und es konnten nur Kryo-EM-Dichtekarten erstellt werden, sodass lediglich eine Auflösung von ca. 10 Å erreicht wurde (Suzuki *et al.*, 2013). Mit der vorgestellten Struktur von IP39 wurden zwar neue Informationen zur Polymerisierung von 4-Helix-Transmembranproteinen gewonnen, es ist allerdings fraglich, ob IP39 – das in dem einzelligen Eukaryoten *E. gracilis* die Funktion eines Membranskelettkankers innehat (Rosiere *et al.*, 1990) – tatsächlich ähnlich zu Claudinen polymerisiert, welche zur Polymerbildung die *trans*-Interaktion mit Claudinen aus einer anderen Zelle benötigen.

Basierend auf den experimentellen Daten zu Faltung, *trans*- und *cis*-Interaktion von unterschiedlichen Cld3- und Cld5-Konstrukten bzw. Cld3/Cld5-Chimären, die im Zuge seiner Doktorarbeit von Jan Rossa generiert wurden (Tab. 8.14), gelang es, das EZS2-Modell von Cld5 zu verlängern bzw. ein Modell der intramolekularen Interfaces zwischen TMH3 und TMH4 von Cld5 zu erhalten (3.5.3, Abb. 3.39).

#### 4.13.1 Welches TMH3-EZS2-TMH4-Modell von Claudin-5 ist am wahrscheinlichsten?

Wegen des Mangels an ausreichend homologen Kristallstrukturen, die als Templates verwendet werden könnten, war es nicht möglich, eine reguläre Homologiemodellierung für Cld5 durchzuführen. Daher wurden 3 unterschiedliche Herangehensweisen für die Modellierung des TMH3-EZS2-TMH4-Interfaces gewählt: eine auf einem Template basierende Variante (Modell S-1; 3.5.3, Abb. 3.39), ein auf *Threading* und multiplen Templates basierender Ansatz (*I-TASSER*, Modell I-1, Modell I-2; 3.5.4, Abb. 3.41) und ein *Ab-initio*-Membranfaltungsansatz (Rosetta, Modell R-1; 3.5.6, Abb. 3.43, Abb. 3.45).

Für Modell S-1 wurde ein optimales *coiled-coil* Helixbündel generiert, wie von Seigneuret (2006) beschrieben. Diese Herangehensweise wurde wegen den (undeutlichen) Heptaden-Motiven in den TMH-Bereichen von Cld5 gewählt, welche auf eine zumindest teilweise *coiled-coil*-ähnliche Interaktion von TMH3 und TMH4 hindeuten. Aufgrund der Präparation des Templates für dieses Modell sind allerdings die Orientierungen der Seitenketten relativ ungenau und bedürfen weiterer Daten zur Optimierung, zudem sind strukturelle Besonderheiten wie *Glycin*- oder *Prolin-Bulges* oder *-Kinks* nicht in diesem Template enthalten.

Dennoch ergab sich eine schöne „*knobs-into-holes*“-Packung zwischen TMH3 und TMH4 von Cld5, und der Übergang des bisherigen kurzen Modells der EZS2 von Cld5 passte nahezu perfekt auf die Helices des *coiled-coil* TMH-Modells. Desweiteren ergaben die zwei mit *I-TASSER* durchgeführten Modellierungen der TMH3-EZS2-TMH4 sehr ähnliche TMH3-TMH4-Interfaces (3.5.4, Abb. 3.41, Abb. 3.42). Hieraus lässt sich schließen, dass die Zuordnung der Interfaces und die Anordnung der TMH3 und TMH4 von Cld5 zueinander mit einer hohen Wahrscheinlichkeit richtig sind. Auch das über Rosetta generierte Modell R-1 zeigt eine *coiled-coil*-ähnliche Interaktion von TMH3 mit TMH4 – mit einer sehr hohen Ähnlichkeit zu Modell S-1 vor allem in den experimentell bestimmten Kontakten und der EZS2.

Beide *I-TASSER*-Modelle weichen in einzelnen Punkten von den experimentellen Daten ab oder zeigen Modellierungsartefakte. In Modell I-1 z. B. zeigt C<sub>128</sub> (TMH3) zu TMH4. Dies steht im Widerspruch zu der Tatsache, dass C128S einen deutlichen Effekt auf die Proteinfaltung und/oder *cis*-Interaktion von Cld5 hat, die allerdings abhängig von TMH1 oder TMH2 ist. Bei Modell I-2 zeigt L<sub>160</sub> (TMH4) weder zu TMH3 noch ist es an der Stabilisierung der EZS2 beteiligt, dies steht im Widerspruch zu bereits veröffentlichten Daten über Cld5 bzw. M<sub>160</sub> von Cld4, die auf eine Beteiligung dieser Position an der Stabilisierung der EZS2 hinweisen (Piontek *et al.*, 2008; Veshnyakova *et al.*, 2010). Zudem basiert die Orientierung von L<sub>160</sub> in Modell I-2 auf einem Modellierungsartefakt, da das von *I-TASSER* verwendete Template an dieser Stelle einen *Prolin-Kink* einführt, obwohl in Cld5 hier kein Prolin vorhanden ist.

Somit stimmen Modell S-1 und Modell R-1 besser mit den Daten zur Interaktion der TMH3 und TMH4 sowie der EZS2 überein als die *I-TASSER*-Modelle.

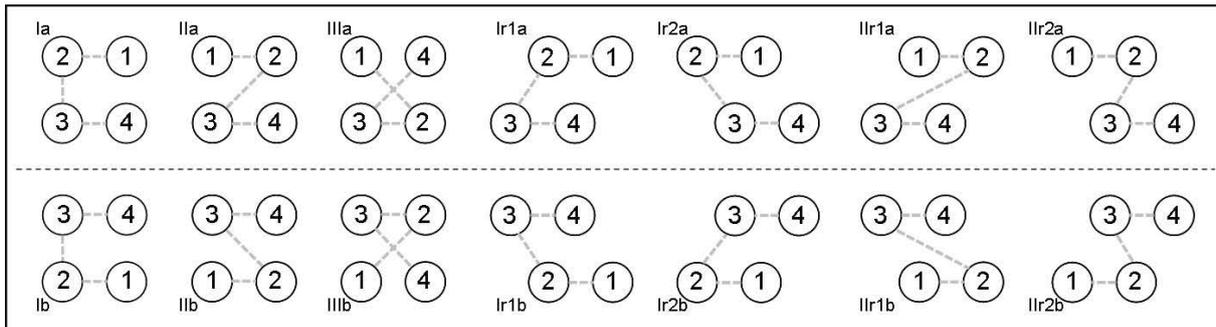
Anhand von Modell S-1 und Modell R-1 lässt sich erklären, warum eine Substitution von A<sub>163</sub> (TMH4) zu Glycin zu einem Verlust der Plasmamembranlokalisation führt. Durch die Verkürzung dieser Seitenkette um eine CH<sub>3</sub>-Gruppe wird die Interaktion mit V<sub>143</sub> (TMH3) gestört, der hydrophobe Kern des Helixbündels wird verändert. Mit Verlängerung der Seitenkette an Position 143 (TMH3) durch eine CH<sub>3</sub>-Gruppe – von Valin zu Isoleucin – wird der Kontakt zwischen den Aminosäuren 143 und 163 und somit auch der hydrophobe Kern wiederhergestellt. Dies erklärt die partielle Wiederherstellung der Plasmamembranlokalisation von Cld5<sub>V143/A163G</sub> und zeigt, dass die Aminosäuren an Position 143 und 163 miteinander interagieren. Zudem konnte durch Experimente mit unterschiedlichen Cld3/Cld5-Chimären, bei denen die einzelnen TMHs von Cld3 in Cld5 eingeführt wurden, gezeigt werden, dass der Effekt der Mutation A163G unabhängig von TMH1 und TMH2 ist.

Weiterhin liefern Modell S-1 sowie Modell R-1 eine Erklärung, warum die Substitution von L<sub>174</sub> gegen die korrespondierende Aminosäure von Cld3 (Glutamin) eine stark negative Auswirkung auf die Plasmamembranlokalisation hat. L<sub>174</sub> (TMH4) zeigt im Modell von Cld5 eine Interaktion mit G<sub>129</sub>, A<sub>132</sub> und L<sub>133</sub> (TMH3) und ist somit ebenfalls Teil des hydrophoben Kerns zwischen den beiden Helices. Durch Einführung des polaren Glutamins wird dieser gestört, und es kommt zu einer Fehlfaltung. Im Gegensatz hierzu kommt Q<sub>173</sub> in Cld3 in einer aus A<sub>128</sub>, T<sub>131</sub> und L<sub>132</sub> gebildeten Tasche zu liegen und könnte mit T<sub>131</sub> interagieren. Leider fehlt hier allerdings die experimentelle Bestätigung der direkten Interaktion durch Doppelmutation (Cld5<sub>A132T/L174Q</sub>), bei der sich – wenn die Vorhersage dieser Interaktion richtig ist – wie bei Cld5<sub>V143/A163G</sub> zumindest eine partielle Wiederherstellung der Plasmamembranlokalisation ergeben sollte. Ein weiterer Hinweis auf diese Interaktion wird jedoch durch die Mutante Cld3<sub>Q173L</sub> gegeben, da diese im Gegensatz zur korrespondierenden Mutante Cld5<sub>L174Q</sub> keine geschwächte Membranlokalisation aufweist und zeigt, dass L genauso gut mit T<sub>131</sub> (TMH3 Cld3) wie mit A<sub>132</sub> (TMH3 Cld5) interagieren kann.

Sowohl Modell S-1 als auch Modell R-1 können die experimentellen Daten also erklären. Das TMH3-EZS2-TMH4-Interface von Modell R-1 beinhaltet im Gegensatz zu Modell S-1 jedoch einen *Glycin-Bulge* (verursacht durch <sub>177</sub>GGG<sub>179</sub>, TMH4) und einen *Prolin-Kink* (verursacht durch P<sub>135</sub>, TMH3). Deshalb erscheint das TMH3-EZS2-TMH4-Interface von Modell R-1 plausibler als Modell S-1. Ohne Modell S-1 jedoch, das erst die Analyse der ECs (3.5.5) erlaubte, wäre die Erstellung von Modell R-1 nicht möglich gewesen.

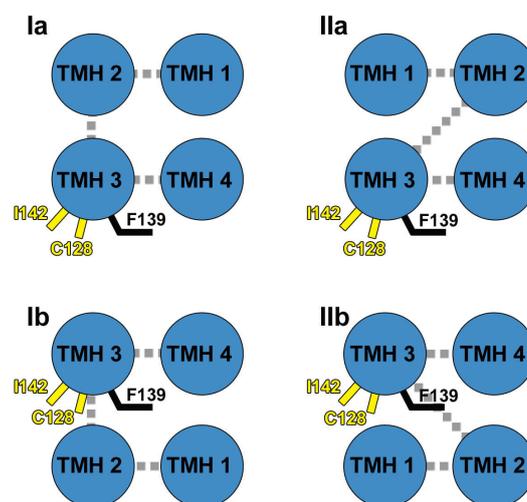
### 4.13.2 Überlegungen zu den möglichen Anordnungen der 4 Transmembranhelices in Claudinen

Die Helices in einem 4-Helixbündel können in 6 verschiedenen Basisarrangements zueinander angeordnet werden. Durch Verschiebung von Helixpaaren zueinander ergeben sich rhombische Variationen der ursprünglich quadratischen Anordnung (Abb. 4.11). Über eine rhombische Anordnung der Helices zueinander wurde auch bei IP39 berichtet, das zur PMP-22/EMP/MP20/Claudin-Superfamilie gehört (Suzuki *et al.*, 2013).



**Abb. 4.11: Mögliche Arrangements der Transmembranhelices in einem 4-Helixbündel.** Sicht auf die Bündel von der extrazellulären Seite der Membran. Der N- und der C-Terminus befinden sich auf der intrazellulären Seite.

Aufgrund der Kürze und der Zugänglichkeit der EZS2 für CPE können für Claudine 4-Helixbündel mit überkreuzten extrazellulären Schleifen ausgeschlossen werden (IIIa und b, Abb. 4.11). Unter Einbeziehung des TMH3-EZS2-TMH4-Interface-Modells (Modell S-1 und Modell R-1) ergeben sich die in Abb. 4.12 dargestellten vier basalen 4-Helixbündel.



**Abb. 4.12: Lage der Aminosäuren C128, F139 und I142 in den möglichen 4-Helixbündeln** unter Einbeziehung des TMH3-TMH4-Interface-Modells (Modell S-1 & Modell R-1).

Den experimentellen Ergebnissen zufolge sollte F<sub>139</sub> (TMH3) von Cld5 in das Zentrum des 4-Helixbündels zeigen, da S138F eine von TMH4 unabhängige Wiederherstellung der Strangformation der Cld3/Cld5-Chimären ChA (TMH1–TMH3: Cld3, TMH4: Cld5) und ChF

(TMH1–TMH4: Cld3) verursacht (Rossa *et al.*, 2014). Dies deutet auf eine Beteiligung von F<sub>139</sub> an einer Interaktion mit TMH1 oder TMH2 hin (möglich in Bündel Ib oder IIb).

Im Gegensatz hierzu sollten die Aminosäuren C<sub>128</sub> und I<sub>142</sub> (TMH3) von der TMH4 weg und zu TMH1 oder TMH2 hin zeigen, da die Substitutionen C128S und T142I einen starken von TMH1/TMH2 abhängigen Effekt auf die Proteinfaltung und/oder Assemblierung von Cld5 haben. Sie sollten also ein gemeinsames Interface von TMH3 zu TMH1 (Bündel IIb) oder aber zu TMH2 (Bündel Ib) beeinflussen. Interessanterweise haben die Substitutionen C128S, I142T (Cld5) und T141I (Cld3), nicht aber F139S (Cld5) oder S138F (Cld3), einen Effekt auf die *cis*-Dimerisierung der Claudin-Konstrukte, was darauf hindeutet, dass C<sub>128</sub> und I<sub>142</sub> an einem Interface mit einem benachbarten Claudin beteiligt sein können, wohingegen F<sub>139</sub> in das 4-Helixbündel zeigt (Bündel Ib oder IIb). Daher sprechen die experimentellen Daten für ein TMH-Arrangement wie in Bündel Ib oder IIb.

Unter Einbeziehung weiterer Daten aus der Literatur erscheint ein 4-Helixbündel wie Bündel Ib am wahrscheinlichsten.

(I) In Bündel Ib sind die Aminosäuren der EZS2, F<sub>147</sub>, Y<sub>148</sub> und Y<sub>158</sub>, die an der *trans*-Interaktion beteiligt sind (Piontek *et al.*, 2008), vom 4-Helixbündel weg gerichtet, wodurch sie für ein *trans*-interagierendes Molekül zugänglich sind.

(II) Ähnliche 4-Helixbündel wurden für Connexin-26 (PDB ID: 2ZW3, Maeda *et al.*, 2009) gezeigt und für CD81 (Modell, PDB ID: 2AVZ, Seigneuret, 2006) vorgeschlagen.

(III) Ein TMH2/TMH3-Interface auf einer Seite eines Cld-Monomers ist mit der experimentellen Beobachtung vereinbar, dass TMH3 in räumlicher Nähe zu zwei TMH2 an der *cis*-Dimerisierung von Cld2 beteiligt ist (Van Itallie *et al.*, 2011). Hierbei könnte TMH3 entweder direkt oder indirekt (durch Beeinflussung der TMH2) am *cis*-Interface beteiligt sein. Es wären zwei unterschiedliche Dimerisierungs-Interfaces denkbar.

Zusätzlich würde ein Dimerisierungs-Interface (TMH2/TMH1 + TMH1/TMH2, ) die Beteiligung der EZS1 an der *cis*-Dimerisierung zulassen, wie sie für Cld2 vorgeschlagen wurde (Li *et al.*, 2013). Außerdem wird eine Anordnung der vier TMHs wie in Bündel Ib stark sowohl durch die Ergebnisse der Analyse der evolutionären Kontakte in Cld5 (3.5.5, Tab. 3.4) als auch durch das vollständige Modell von Cld5 (Modell R-1, 3.5.6, Abb. 3.45) unterstützt.

### **4.13.3 Modell R-1 ist das erste vollständige und durch experimentelle Daten bestätigte Claudin-5-Modell**

Das mittels des „*Rosetta membran ab-initio protocol*“ erzeugte vollständige Cld5-Modell (Modell R-1) entspricht einer rhombischen Variation von Bündel Ib (vgl. Abb. 4.12 und 3.5.6, Abb. 3.45) und stimmt mit den von Jan Rossa experimentell ermittelten Daten (Tab. 8.14) sowie mit den Daten aus der Literatur überein. Zudem erfüllt es auch die mittels EVfold ermittelten ECs (3.5.5, Tab. 3.4). Es deutet somit vieles darauf hin, dass die Struktur bzw. der

Fold von Cld5 sehr ähnlich zu der/dem von Modell R-1 gezeigten ist. Es darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass Modell R-1 auf der Annahme beruht, die evolutionären Kontakte seien intramolekular und somit in die Faltung des Cld-Monomers involviert. Zumindest für das TMH3-EZS2-TMH4-Interface scheint dies der Fall zu sein, da hier die experimentell ermittelten und die evolutionären Kontakte ein eindeutiges interhelikales Interface ergeben, welches zudem sehr gut mit dem Modell der EZS2 von Cld5 vereinbar ist. Für die weiteren Helix-Helix-Interaktionen fehlen jedoch eindeutige experimentelle Daten. Darüber hinaus ergab das Modeling mit Rosetta zwei weitere Modelle mit ähnlichen Energiewerten wie Modell R-1, die nicht Bündel Ib entsprechen. Eines zeigt eine Helixanordnung wie Bündel Ia, und das andere entspricht Anordnung Bündel IIa (Abb. 4.12), beide erfüllen jedoch deutlich weniger experimentelle und evolutionäre Kontakte als Modell R-1 und passen nicht zu den Daten in der Literatur (4.13.2); Daher sind sie weniger wahrscheinlich. Sollten andererseits die evolutionären Kontakte intermolekulare Kontakte beinhalten, könnte eines dieser beiden Modelle richtig sein. Zudem könnten diese Modelle bei der Analyse der Cld-Cld-Interaktion hilfreich sein, da sie eventuell die Interaktionsfläche der *cis*-Oligomerisierung von Claudinen beinhalten.

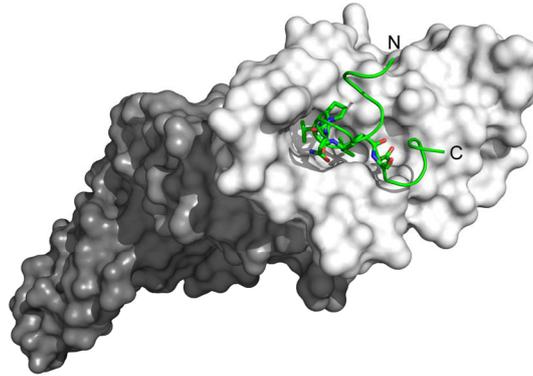
Ein weiterer Punkt, der an diesem Modell von Cld5 mit Sicherheit falsch ist, ist die EZS1, da hier keine Einschränkungen in der Berechnung mit Rosetta eingesetzt werden konnten. Der Grund hierfür ist, dass, mit Ausnahme einer Disulfidbrücke zwischen C<sub>54</sub> und C<sub>64</sub> (Li *et al.*, 2013; Li, J. *et al.*, 2014), weder bei experimentellen Daten noch bei ECs eine Unterscheidung zwischen *intra*- und *inter*-molekularen Kontakten vorgenommen werden konnte – zumal bei der EZS1 auch noch *cis*- oder *trans*-Interaktionskontakte vorliegen können. Jedoch kann Modell R-1 als Basis zur Modellierung der EZS1 verwendet werden, wenn – mittels Literatur Data-Mining, Analyse der evolutionären Kontakte innerhalb der EZS1 und daran anschließender Experimente – weitere intramolekulare Kontakte identifiziert werden können.

Daneben ist das vollständige Cld5-Modell auch sehr nützlich zur Planung und Ausführung weiterer Experimente bezüglich der *intra*- und *inter*-molekularen Kontakte, da nun gezielt mögliche Aminosäureinteraktionen ausgewählt und überprüft werden können. In diesem iterativen Prozess würde auch das Cld5-Modell verbessert.

#### **4.14 Vergleich der modifizierten Cld2-Peptid-CPE-Struktur mit den EZS2-Modellen und den Interaktionsmodellen von cCPE und Claudinen**

Vor Kurzem wurde eine Röntgenkristallstruktur von CPE mit gebundenem modifiziertem Peptid der EZS2 von Cld2 veröffentlicht (Abb. 4.13, PDB ID: 3ZJ3, Yelland *et al.*, 2014).

Diese Struktur hat eine Auflösung von 3,37 Å. Das gebundene Peptid basiert auf Cld2, welches als Wildtyp nicht bzw. nicht stark von CPE gebunden wird (Sonoda *et al.*, 1999; Fujita *et al.*, 2000; Kimura *et al.*, 2010). Um eine Bindung an CPE zu erreichen, wurde daher ein Cld3-ähnliches Peptid entsprechend den Ergebnissen der Peptid-Bindungsassays von Winkler *et al.* (2009) verwendet (Tab. 4.1).

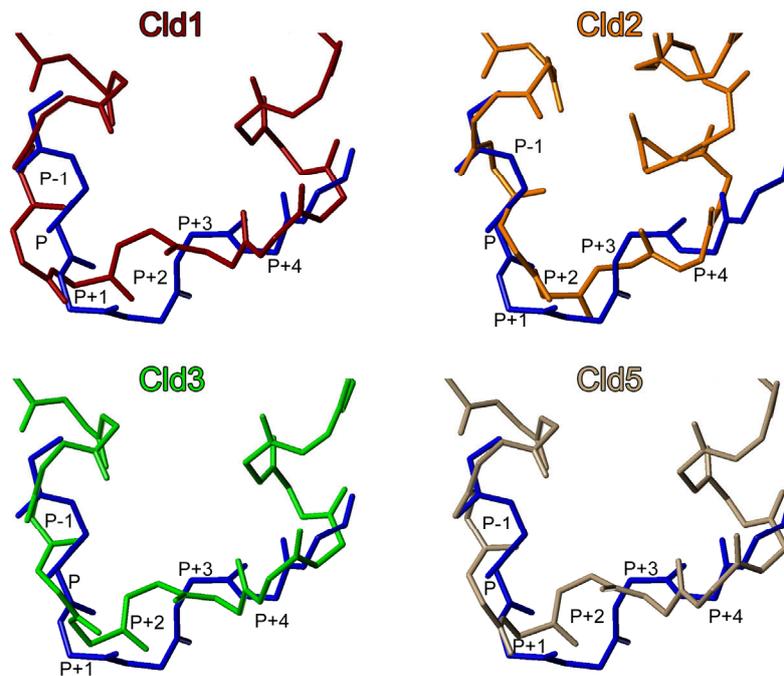


**Abb. 4.13: Kristallstruktur von CPE mit gebundenem modifiziertem Peptid der EZS2 von Cld2 (PDB ID: 3ZJ3).** CPE dargestellt als Oberfläche mit der Claudin bindenden C-terminalen Domäne (weiß) und der zytotoxischen N-terminalen Domäne (Domäne II & III, grau). Das modifizierte Peptid der EZS2 von Cld2 als Cartoon (grün) mit den mit CPE interagierenden Aminosäuren als Sticks.

**Tab. 4.1:** Sequenzvergleich zwischen Cld2 und dem modifizierten Cld2-Peptid sowie Cld3

Peptid	Sequenz
Cld2 <sub>wt</sub>	<u>141</u> HGILRDFYSPLVPDSMKFEI <u>160</u>
Cld2 <sub>mod</sub>	<u>141</u> HGILRDFY <u>N</u> PLVPD <u>A</u> MKF <u>I</u> I <u>160</u>
Cld3 <sub>wt</sub>	<u>140</u> NTIIRDFYNPLVPEAQKREM <u>159</u>

Ähnlich zu den Modellen der Cld-EZS2, zeigt das Cld2-Peptid eine Helix-like-Turn-Helix-like-Struktur. Die Kristallstruktur bestätigt die vorhergesagte, den Turn stabilisierende Interaktion der Aminosäureseitenkette an Position P-1 (hier Asparagin) mit dem Backbone der Aminosäure an Position P+1 und zeigt auch, dass die Seitenkette von P-1 wie erwartet nicht direkt mit CPE interagiert (siehe 4.8). Wie vorhergesagt, interagiert L<sup>(P+1)</sup> mit der Tripel-Tyr-Tasche von CPE (4.3.1, Abb. 4.1 A), und die generelle Lage der interagierenden Turn-Aminosäuren (NPLVPD) des modifizierten Cld2-Peptids in der Bindungstasche von CPE ist sehr ähnlich zu den Cld-cCPE-Interaktionsmodellen. Ein „Pair-Wise-Fit“ der Backbone-Atome des Cld2-Peptids mit den Cld-EZS2-Modellen ergab eine RMSD von ~2,10 Å (Abb. 4.14, Cld1: 2,16 Å, Cld3: 2,05 Å, Cld4: 2,07 Å und Cld5: 2,11 Å) und liegt somit deutlich unterhalb der Auflösung der Kristallstruktur (3,37 Å).



**Abb. 4.14:** Das von cCPE gebundene modifizierte Cld2-Peptid zeigt eine den Modellen der EZS2 ähnliche Struktur. Überlagerung des Backbones des Cld2-Peptids aus 3ZJ3 (blau) mit den Backbones der Modelle von Cld1 (rot), Cld3 (orange), Cld4 (grün) und Cld5 (beige).

Trotz der Gemeinsamkeiten der Struktur und der Modelle zeigen sich aber Unterschiede. So zeigt die Seitenkette von  $N/D^{(P-1)}$  in den Interaktionsmodellen auf die Seite der Bindungstasche von CPE, auf der  $Y_{310}$  und  $S_{313}$  liegen (3.2.1, Abb. 3.3). Diese Orientierung erklärt, warum die Substitution  $S_{313}H$  in cCPE die Bindung an Claudine mit  $D^{(P-1)}$  steigert (siehe 4.6.4 & 4.8). In der Kristallstruktur zeigt die Seitenkette von  $N^{(P-1)}$  auf die andere Seite der Bindungstasche von CPE. Desweiteren unterscheiden sich die Orientierungen der Seitenketten ( $P+2$ ) und ( $P+3$ ). In den Modellen der EZS2 zeigt die Seitenkette an Position  $P+2$  in die Helix-Turn-Helix-Struktur, während die Seitenkette an Position  $P+3$  aus der HTH-Struktur heraus gedreht ist. In der Kristallstruktur ragt die Seitenkette  $V^{(P+2)}$  tief in die Bindungstasche von CPE, und die Seitenkette von  $P^{(P+3)}$  zeigt in die HTH-Struktur. Daraus ergibt sich ein weiterer Unterschied zwischen der Kristallstruktur und den Interaktionsmodellen. In den Interaktionsmodellen kommt die Seitenkette an Position  $P+3$  in der Tripel-Leu-Tasche zu liegen, wohingegen die Seitenkette von  $D^{(P+4)}$  in der Kristallstruktur in dieser unpolaren/hydrophoben Tasche zu liegen kommt und eine Wasserstoffbrücke mit dem Backbone-NH von  $S_{256}$  in CPE bildet. Diese Orientierung der Seitenkette von  $D^{(P+4)}$  ist allerdings fraglich, da Wasserstoffbrückenbindungen bei einer Auflösung von 3,37 Å nicht erkannt werden können und es bei den CPE-bindenden Claudinen eine stärkere Variabilität der Aminosäuren an dieser Position gibt (Cld3: E, Cld4: S, Cld6: D, Cld7: M, Cld8: V und Cld9: E siehe 3.3.7.2, Abb. 3.30). Zudem zeigten Substitutionsanalysen an Peptiden, dass – mit Ausnahme von C (nicht getestet), P oder I – keine der normalen Aminosäuren die Bindung von CPE negativ beeinflusst (Winkler *et al.*, 2009).

In der Kristallstruktur zeigt sich weiterhin eine Interaktion von D<sub>284</sub> (CPE) mit den Backbone-NHs von A<sub>155</sub><sup>(P+5)</sup> und M<sub>156</sub><sup>(P+6)</sup> über Wasserstoffbrücken, die in den Interaktionsmodellen nicht vorhanden ist. Die Ergebnisse der zellulären Bindungsassays zeigen jedoch, dass D<sub>284</sub> wahrscheinlich nicht mit zwei Wasserstoffbrücken an der Bindung von nativ in der Membran vorliegenden Claudinen beteiligt ist, da eine Substitution dieses Aspartats zu Alanin einen zu geringen Einfluss auf die Bindung an Claudine hat. cCPE<sub>D284A</sub> wies noch min. 75–85% der Bindung von cCPE<sub>wt</sub> an Cld3, Cld4, Cld6, Cld7 und Cld9 auf (3.2.2, Abb. 3.4 A; 3.4.2, Abb. 3.34, Abb. 3.35 und Abb. 3.37); Nur bei Cld8 ergab sich eine Senkung auf ungefähr 50% der cCPE<sub>wt</sub>-Bindung (3.4.2, Abb. 3.36). Zudem war auch bei der Substitution D284N kein starker Einfluss auf die Bindung an Cld3 oder Cld4 zu beobachten (3.2.2, Abb. 3.4 A). Allein in Pull-down-Assays mit solubilisierten Claudinen war eine deutlich schwächere Bindung von Cld3, nicht jedoch von Cld4, an immobilisiertes cCPE<sub>D284A</sub> zu erkennen (3.2.2, Abb. 3.4 B). Diese Daten sprechen eher dafür, dass die in der Kristallstruktur sichtbare Wechselwirkung zwischen D<sub>284</sub> und den Backbone-NHs peptidspezifisch ist und bei der Bindung von CPE an native Claudine nicht vorkommt.

Zudem ist anzunehmen, dass die Bindung dieses modifizierten Cld2-Peptids an CPE zumindest teilweise artifiziell ist und nicht vollständig der Bindung von CPE an Claudine entspricht. Hierfür spricht, dass bisher keine Kristallstruktur von CPE mit Peptiden der stark bindenden Claudine Cld3 und Cld4 generiert werden konnte. Ebenso zeigten sich deutliche Unterschiede in der Bindungsstärke von Peptiden an CPE bzw. cCPE und bei der Interaktion von nativen Claudinen und CPE bzw. cCPE; Cld4 z. B. wurde als eines der am stärksten mit CPE interagierenden Claudine beschrieben, das Cld4-EZS2-Peptid wird jedoch nicht von cCPE gebunden, und ebenso zeigte cCPE keine Bindung an ein Cld8-EZS2-Peptid (Sonoda *et al.*, 1999; Winkler *et al.*, 2009).

#### 4.15 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die Claudin-Bindungstasche von CPE anhand von Bindungsstudien mit Cld3 und Cld4 charakterisiert und mittels Interaktionsmodellen die Orientierung der EZS2 von Claudinen in der Bindungstasche von CPE bzw. cCPE aufgeklärt. Als eine der Schlüsselinteraktionen der cCPE-Claudin-Bindung wurde die Interaktion eines den Turn begrenzenden Leucins der EZS2 von Cld3 oder Cld4 mit einer aus drei Tyrosinen gebildeten Vertiefung in der Bindungstasche von CPE identifiziert. Anhand der gewonnenen Einblicke in die Claudin-cCPE-Interaktion wurde daraufhin versucht, cCPE-Varianten zu generieren, die an das nicht mit cCPE<sub>wt</sub> interagierende Cld5 binden. Unter Zuhilfenahme von „virtuellen Interaktionsmodellen“ von cCPE mit Cld1 und Cld5, und durch Sequenzvergleiche

der EZS2 klassischer Claudine sowie nachfolgende cCPE-Bindungsstudien wurden je zwei Aminosäuren in Cld1 und Cld5 erkannt, welche die Interaktion von cCPE mit Cld1 deutlich schwächen und die Interaktion von cCPE mit Cld5 verhindern. Anhand der im Zuge dieser Arbeit erstellten Homologiemodelle der EZS2 von Cld1, Cld3, Cld4 und Cld5 und der cCPE-Claudin-Interaktionsmodelle wurde eine cCPE-Variante erstellt, die komplementär ist zu den Unterschieden in der EZS2 von Cld5 im Vergleich zu der EZS2 von Cld3 und Cld4. Diese cCPE-Variante, cCPE<sub>Y306W/S313H</sub>, zeigt im Vergleich zu cCPE<sub>wt</sub> eine deutliche Bindungssteigerung an Cld5 ( $K_d$   $33 \pm 10$  nM) bei gleichzeitig schlechterer Bindung an Cld3, Cld4, Cld6, Cld7, Cld8 und Cld9. Hiermit ist zum ersten Mal eine Änderung der Spezifität von cCPE hin zu einem normalerweise nicht mit cCPE interagierenden Claudin gelungen.

Diese Erkenntnisse eröffnen neue Möglichkeiten in der Entwicklung von auf cCPE oder CPE basierenden Cld-subtypspezifischen Claudin-Bindern zur Nutzung als gewebespezifisches „*drug-delivery*“-System und in der Detektion (cCPE) bzw. Behandlung (CPE) von Cld überexprimierenden Tumoren. Mit Cld-subtypspezifischen cCPE-Varianten könnten die Nebenwirkungen eines cCPE-Einsatzes, wie z. B. die für cCPE<sub>wt</sub> (als cCPE-PSIF-Fusionsprotein, siehe 1.4.3) berichtete leicht leberschädigende Wirkung (Li, X. *et al.*, 2014), verringert werden. Um wirklich Cld-subtypspezifische cCPE-Varianten zu erhalten, bedarf es jedoch noch weiterer Studien. Z. B. müssen die Interaktionen von cCPE mit weiteren cCPE bindenden (Cld6 – Cld9) und nicht bindenden Claudinen (Cld2, Cld17 und Cld19) detaillierter charakterisiert werden, um weitere Einblicke in den Bindungsmechanismus zu gewinnen. Zudem waren bei der Behandlung mit cCPE innerhalb von kurzer Zeit erhöhte cCPE-spezifische Serum-IgG-Werte in Mäusen zu beobachten (Suzuki *et al.*, 2010), daher muss auch die Entwicklung von weniger antigenen cCPE-Varianten vorangetrieben werden, um cCPE pharmazeutisch nutzbar zu machen.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit hatte das Ziel, anhand von vorliegenden experimentellen Daten ein Modell der Topologie und der interhelikalen Interfaces von Cld5 zu erstellen. Da bisher keine zu Claudin homologen Kristallstrukturen bekannt sind, wurde auf der Grundlage von Heptaden-Motiven in den Transmembransegmenten von Cld5 zunächst ein auf optimalen *coiled-coil* Helices basierendes Modell der TMH3-EZS2-TMH4 erstellt. Zusätzlich wurden mittels *I-TASSER* Modelle der TMH3-EZS2-TMH4 erstellt, welche die generelle Orientierung von TMH3 zu TMH4 bestätigten. Dank dieser TMH3-EZS2-TMH4-Modelle konnten desweiteren evolutionär verknüpfte Kontakte, die über EVfold erhalten wurden, analysiert und TMH-TMH-Interaktionen zugeordnet werden. Durch Nutzung experimenteller Daten (generiert von Jan Rossa) und der evolutionär verknüpften Kontakte im “Rosetta membrane *ab-initio* protocol” konnte abschließend ein vollständiges Modell von Cld5 entworfen werden. Dies ist das erste durch experimentelle Daten validierte Claudin-Modell. Allerdings beschrän-

ken sich die experimentellen Daten hauptsächlich auf das Interface zwischen TMH3 und TMH4, weshalb die Orientierung von TMH1 und TMH2 zueinander und zu TMH3 und TMH4 nicht abschließend geklärt werden konnte. Dennoch kann dieses Modell dazu beitragen, weitere Details der Claudin-Struktur aufzuklären, da nun in einem iterativen Prozess gezielte Aminosäuresubstitutionen in Cld5 vorgenommen werden können, und das Modell durch die gewonnenen Daten wiederum verbessert werden kann. Außerdem kann das Modell dazu beitragen, die intermolekulare *cis*-Interaktion von Claudinen und die TJ-Strangbildung durch Claudine zu verstehen und zu untersuchen. Zudem können nun zum ersten Mal Interaktionsmodelle von CPE mit einer vollständigen Claudin-Struktur erstellt werden, wodurch sowohl der Einfluss der EZS1 auf die Bindung von CPE als auch die generelle Organisation der CPE-induzierten Pore besser abgeschätzt werden können. Hierdurch wird ein besseres Verständnis der Wirkungsweise von CPE entwickelt werden.

## 5 Literatur

- Agarwal, R., D'Souza, T. & Morin, P. J. (2005).** Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity. *Cancer Res.* **65** (16): 7378–7385
- Ahrens, T., Pertz, O., Haussinger, D., Fauser, C., Schulthess, T. & Engel, J. (2002).** Analysis of heterophilic and homophilic interactions of cadherins using the c-Jun/c-Fos dimerization domains. *J. Biol. Chem.* **277** (22): 19455–19460
- Alexandre, M. D., Lu, Q. & Chen, Y.-H. (2005).** Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl<sup>-</sup> conductance and increases the paracellular Na<sup>+</sup> conductance in LLC-PK1 cells. *J. Cell Sci.* **118** (Pt 12): 2683–2693
- Amasheh, S. (2002).** Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J. Cell Sci.* **115** (24): 4969–4976
- Angelow, S. & Yu, A. S. L. (2009).** Structure-function studies of claudin extracellular domains by cysteine-scanning mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **284** (42): 29205–29217
- Aungst, B. J. (2000).** Intestinal permeation enhancers. *J. Pharm. Sci.* **89** (4): 429–442
- Aurrand-Lions, M., Duncan, L., Ballestrem, C. & Imhof, B. A. (2001).** JAM-2, a novel immunoglobulin superfamily molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells. *J. Biol. Chem.* **276** (4): 2733–2741
- Awad, M. M., Ellemor, D. M., Boyd, R. L., Emmins, J. J. & Rood, J. I. (2001).** Synergistic effects of alpha-toxin and perfringolysin O in *Clostridium perfringens*-mediated gas gangrene. *Infect. Immun.* **69** (12): 7904–7910
- Balasubramanian, R., Lakshminarayanan, A. V, Sabesan, M. N., Tegoni, G., Venkatesan, K. & Ramachandran, G. N. (1971).** Studies on the conformation of amino acids. VI. Conformation of the proline ring as observed in crystal structures of amino acids and peptides. *Int. J. Protein Res.* **3** (1): 25–33
- Ballesteros, J. A. & Weinstein, H. (1995).** Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. In *Methods in Neurosciences*, Volume 25., pp. 366–428. Edited by S. C. Sealton. San Diego, Academic Press
- Baltzegar, D. A., Reading, B. J., Brune, E. S. & Borski, R. J. (2013).** Phylogenetic revision of the claudin gene family. *Mar. Genomics* **11**: 17–26
- Barth, P., Schonbrun, J. & Baker, D. (2007).** Toward high-resolution prediction and design of transmembrane helical protein structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104** (40): 15682–15687
- Barth, P., Wallner, B. & Baker, D. (2009).** Prediction of membrane protein structures with complex topologies using limited constraints. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106** (5): 1409–1414
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. (2000).** The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28** (1): 235–242
- Bernsel, A., Viklund, H., Hennerdal, A. & Elofsson, A. (2009).** TOPCONS: consensus prediction of membrane protein topology. *Nucleic Acids Res.* **37** (Web Server issue): W465–W468
- Bhavaniprasad, V., Febin Prabhu Dass, J. & Jayanthi, S. (2013a).** Insilico modeling and molecular dynamic simulation of claudin-1 point mutations in HCV infection. *J. Biomol. Struct. Dyn.* (August 2013): 37–41

- Bhavaniprasad, V., Febin Prabhu Dass, J. & Jayanthi, S. (2013b).** Activation mechanism of claudin-4 by ephrin type-A receptor 2: a molecular dynamics approach. *Mol. Biosyst.* **9** (11): 2627–2634
- Biesiadka, J., Loll, B., Kern, J., Irrgang, K.-D. & Zouni, A. (2004).** Crystal structure of cyanobacterial photosystem II at 3.2 Å resolution: a closer look at the Mn-cluster. *Physi. Chem. Chem. Physi.* **6** (20): 4733–4736
- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D. J. & Li, J. (2005).** Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J. Mol. Biol.* **348** (2): 363–382
- Bower, M. J., Cohen, F. E. & Dunbrack, R. L. (1997).** Prediction of protein side-chain rotamers from a backbone-dependent rotamer library: a new homology modeling tool. *J. Mol. Biol.* **267** (5): 1268–1282
- Briehl, M. M. & Miesfeld, R. L. (1991).** Isolation and characterization of transcripts induced by androgen withdrawal and apoptotic cell death in the rat ventral prostate. *Mol. Endocrinol.* **5** (10): 1381–1388
- Briggs, D. C., Naylor, C. E., Smedley, J. G. 3rd, Lukoyanova, N., Robertson, S., Moss, D. S., McClane, B. A. & Basak, A. K. (2011).** Structure of the food-poisoning *Clostridium perfringens* enterotoxin reveals similarity to the aerolysin-like pore-forming toxins. *J. Mol. Biol.* **413** (1): 138–149
- Brotin, T., Devic, T., Lesage, A., Emsley, L. & Collet, A. (2001).** Synthesis of deuterium-labeled cryptophane-A and investigation of Xe@cryptophane complexation dynamics by 1D-EXSY-NMR experiments. *Chemistry* **7** (7): 1561–1573
- Buchan, D. W. A., Minneci, F., Nugent, T. C. O., Bryson, K. & Jones, D. T. (2013).** Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Res.* **41** (Web Server issue): W349–W357
- Carman, R. J. (1997).** *Clostridium perfringens* in spontaneous and antibiotic-associated diarrhoea of man and other animals. *Rev. Med. Microbiol.* **8**: S43–S45
- Cereijido, M., Shoshani, L. & Contreras, R. G. (2000).** Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **279** (3): G477–G482
- Chakrabarti, G., Zhou, X. & McClane, B. A. (2003).** Death pathways activated in CaCo-2 cells by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infect. Immun.* **71** (8): 4260–4270
- Chakrabarti, G. & McClane, B. A. (2005).** The importance of calcium influx, calpain and calmodulin for the activation of CaCo-2 cell death pathways by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Cell. Microbiol.* **7** (1): 129–146
- Chen, M. L., Ge, Z., Fox, J. G. & Schauer, D. B. (2006).** Disruption of tight junctions and induction of proinflammatory cytokine responses in colonic epithelial cells by *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* **74** (12): 6581–6589
- Chen, Y., Wiesmann, C., Fuh, G., Li, B., Christinger, H. W., McKay, P., de Vos, A. M. & Lowman, H. B. (1999).** Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen. *J. Mol. Biol.* **293** (4): 865–881
- Claros, M. G. & von Heijne, G. (1994).** TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *Computer applications in the biosciences: CABIOS* **10** (6): 685–686
- Cole, C., Barber, J. D. & Barton, G. J. (2008).** The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* **36** (Web Server issue): W197–W201

- Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, K. M., Ferguson, D. M., Spellmeyer, D. C., Fox, T., Caldwell, J. W. & Kollman, P. A. (1995).** A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **117** (19): 5179–5197
- Cserző, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G. & Elofsson, A. (1997).** Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng.* **10** (6): 673–676
- Czczulin, J. R., Hanna, P. C. & McClane, B. A. (1993).** Cloning, nucleotide sequencing, and expression of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **61** (8): 3429–3439
- D'Souza, T., Agarwal, R. & Morin, P. J. (2005).** Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *J. Biol. Chem.* **280** (28): 26233–26240
- Daugherty, B. L., Ward, C., Smith, T., Ritzenthaler, J. D. & Koval, M. (2007).** Regulation of heterotypic claudin compatibility. *J. Biol. Chem.* **282** (41): 30005–30013
- De Oliveira, S. S., de Oliveira, I. M., De Souza, W. & Morgado-Díaz, J. A. (2005).** Claudins upregulation in human colorectal cancer. *FEBS letters* **579** (27): 6179–6185
- Diamond, J. M. (1977).** Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence. *The Physiologist* **20** (1): 10–18
- Dunbrack, R. L. & Karplus, M. (1993).** Backbone-dependent rotamer library for proteins application to side-chain prediction. *J. Mol. Biol.* **230** (2): 543–547
- Dunbrack, R. L. & Cohen, F. E. (1997).** Bayesian statistical analysis of protein side-chain rotamer preferences. *Protein Sci.* **6** (8): 1661–1681
- Duncan, C. L., Sugiyama, H. & Strong, D. H. (1968).** Rabbit ileal loop response to strains of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* **95** (5): 1560–1566
- Ebihara, C., Kondoh, M., Hasuike, N., Harada, M., Mizuguchi, H., Horiguchi, Y., Fujii, M. & Watanabe, Y. (2006).** Preparation of a claudin-targeting molecule using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **316** (1): 255–260
- Ebihara, C., Kondoh, M., Harada, M., Fujii, M., Mizuguchi, H., Tsunoda, S.-I., Horiguchi, Y., Yagi, K. & Watanabe, Y. (2007).** Role of Tyr306 in the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin for modulation of tight junction. *Biochem. Pharmacol.* **73** (6): 824–830
- Evans, M. J., von Hahn, T., Tscherne, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wölk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J. a, Bieniasz, P. D. & Rice, C. M. (2007).** Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446** (7137): 801–805
- Fanning, A. S., Ma, T. Y. & Anderson, J. M. (2002).** Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1. *FASEB J.* **16** (13): 1835–1837
- Farquhar, M. G. & Palade, G. E. (1963).** Junctional complexes in various epithelia. *The Journal of cell biology* **17**: 375–412
- Fedwick, J. P., Lapointe, T. K., Meddings, J. B., Sherman, P. M. & Buret, A. G. (2005).** *Helicobacter pylori* activates myosin light-chain kinase to disrupt claudin-4 and claudin-5 and increase epithelial permeability. *Infect. Immun.* **73** (12): 7844–7852
- Forouhar, F., Abashidze, M., Benach, J., Jayaraman, S., Janjua, H., Cooper, B., Xiao, R., Acton, T. B., Montelione, G. T., Tong, L. & Hunt, J. F. (2005).** X-Ray Crystal Structure of Phage-related Protein BB2244 from *Bordetella bronchiseptica*. Northeast Structural Genomics Consortium Target BoR24. : PDB ID: 2BDV, DOI: 10.2210/pdb2bdv/pdb

- Förster, C., Silwedel, C., Golenhofen, N., Burek, M., Kietz, S., Mankertz, J. & Drenckhahn, D. (2005).** Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine in vitro system. *J. Physiol.* **565** (Pt 2): 475–486
- Förster, C., Kahles, T., Kietz, S. & Drenckhahn, D. (2007).** Dexamethasone induces the expression of metalloproteinase inhibitor TIMP-1 in the murine cerebral vascular endothelial cell line cEND. *J. Physiol.* **580** (Pt.3): 937–949
- Fujinaga, Y., Inoue, K., Shimazaki, S., Tomochika, K., Tsuzuki, K., Fujii, N., Watanabe, T., Ohyama, T. & Takeshi, K. (1994).** Molecular construction of Clostridium botulinum type C progenitor toxin and its gene organization. *Biochemical and biophysical research communications* **205** (2): 1291–1298
- Fujita, K., Katahira, J., Horiguchi, Y., Sonoda, N., Furuse, M. & Tsukita, S. (2000).** Clostridium perfringens enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein. *FEBS Lett.* **476** (3): 258–261
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S. & Tsukita, S. (1993).** Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* **123** (6 Pt 2): 1777–1788
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K. & Tsukita, S. (1998a).** Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.* **141** (7): 1539–1550
- Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K. & Tsukita, S. (1998b).** A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J. Cell Biol.* **143** (2): 391–401
- Furuse, M., Sasaki, H. & Tsukita, S. (1999).** Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J. Cell Biol.* **147** (4): 891–903
- Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A. & Tsukita, S. (2002).** Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J. Cell Biol.* **156** (6): 1099–1111
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H. (1989).** Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182** (2): 319–326
- González-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P. & Jaramillo, B. E. (2003).** Tight junction proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **81** (1): 1–44
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. (1977).** Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36** (1): 59–74
- Gumbiner, B., Lowenkopf, T. & Apatira, D. (1991).** Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** (8): 3460–3464
- Hanna, P. C., Mietzner, T. A., Schoolnik, G. K. & McClane, B. A. (1991).** Localization of the receptor-binding region of Clostridium perfringens enterotoxin utilizing cloned toxin fragments and synthetic peptides. The 30 C-terminal amino acids define a functional binding region. *J. Biol. Chem.* **266** (17): 11037–11043
- Harada, M., Kondoh, M., Ebihara, C., Takahashi, A., Komiya, E., Fujii, M., Mizuguchi, H., Tsunoda, S.-I., Horiguchi, Y., Yagi, K. & Watanabe, Y. (2007).** Role of tyrosine residues in modulation of claudin-4 by the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin. *Biochem. Pharmacol.* **73** (2): 206–214
- Harder, J. L. & Margolis, B. (2008).** SnapShot: tight and adherens junction signaling. *Cell* **133** (6): 1118, 1118.e1–2

- Haskins, J., Gu, L., Wittchen, E. S., Hibbard, J. & Stevenson, B. R. (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** (1): 199–208
- Hawkins, R. E., Russell, S. J. & Winter, G. (1992).** Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J. Mol. Biol.* **226** (3): 889–896
- Hewitt, K. J., Agarwal, R. & Morin, P. J. (2006).** The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC cancer* **6**: 186
- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S. & Mitaku, S. (1998).** SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* **14** (4): 378–379
- Hochman, J. & Artursson, P. (1994).** Mechanisms of absorption enhancement and tight junction regulation. *J. control. Release* **29** (93): 253–261
- Hofmann, K. & Stoffel, W. (1993).** TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* **347** (166)
- Hopf, T. a, Colwell, L. J., Sheridan, R., Rost, B., Sander, C. & Marks, D. S. (2012).** Three-dimensional structures of membrane proteins from genomic sequencing. *Cell* **149** (7): 1607–1621
- Hou, J., Paul, D. L. & Goodenough, D. A. (2005).** Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions. *J. Cell Sci.* **118** (Pt 21): 5109–5118
- Hough, C. D., Sherman-Baust, C. A., Pizer, E. S., Montz, F. J., Im, D. D., Rosenshein, N. B., Cho, K. R., Riggins, G. J. & Morin, P. J. (2000).** Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. *Cancer Res.* **60** (22): 6281–6287
- Hsu, L.-W., Lee, P.-L., Chen, C.-T., Mi, F.-L., Juang, J.-H., Hwang, S.-M., Ho, Y.-C. & Sung, H.-W. (2012).** Elucidating the signaling mechanism of an epithelial tight-junction opening induced by chitosan. *Biomaterials* **33** (26): 6254–6263
- Hua, V. B., Chang, A. B., Tchieu, J. H., Kumar, N. M., Nielsen, P. A. & Saier, M. H. (2003).** Sequence and phylogenetic analyses of 4 TMS junctional proteins of animals: connexins, innexins, claudins and occludins. *J. Membr. Biol.* **194** (1): 59–76
- Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S. & Tsukita, S. (2005).** Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J. Cell Biol.* **171** (6): 939–645
- Itoh, M., Yonemura, S., Nagafuchi, A. & Tsukita, S. (1991).** A 220-kD undercoat-constitutive protein: its specific localization at cadherin-based cell-cell adhesion sites. *J. Cell Biol.* **115** (5): 1449–1462
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M. & Tsukita, S. (1999).** 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** (6): 1351–1363
- Jermutus, L., Honegger, A., Schwesinger, F., Hanes, J. & Plückthun, A. (2001).** Tailoring in vitro evolution for protein affinity or stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** (1): 75–80
- Johnson, A. H., Frierson, H. F., Zaika, A., Powell, S. M., Roche, J., Crowe, S., Moskaluk, C. A. & El-Rifai, W. (2005).** Expression of tight-junction protein claudin-7 is an early event in gastric tumorigenesis. *Am. J. Pathol.* **167** (2): 577–584
- Jones, D. T. (1999).** Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* **292** (2): 195–202
- Kakutani, H., Kondoh, M., Saeki, R., Fujii, M., Watanabe, Y., Mizuguchi, H. & Yagi, K. (2010).** Claudin-4-targeting of diphtheria toxin fragment A using a C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **75** (2): 213–217

- Kakutani, H., Takahashi, A., Kondoh, M., Saito, Y., Yamaura, T., Sakihama, T., Hamakubo, T. & Yagi, K. (2011).** A novel screening system for claudin binder using baculoviral display. *PLoS one* **6** (2): e16611
- Katahira, J., Inoue, N., Horiguchi, Y., Matsuda, M. & Sugimoto, N. (1997a).** Molecular cloning and functional characterization of the receptor for Clostridium perfringens enterotoxin. *J. Cell Biol.* **136** (6): 1239–1247
- Katahira, J., Sugiyama, H., Inoue, N., Horiguchi, Y., Matsuda, M. & Sugimoto, N. (1997b).** Clostridium perfringens enterotoxin utilizes two structurally related membrane proteins as functional receptors in vivo. *J. Biol. Chem.* **272** (42): 26652–26658
- Kausalya, P. J., Amasheh, S., Günzel, D., Wurps, H., Müller, D., Fromm, M. & Hunziker, W. (2006).** Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg<sup>2+</sup> transport function of Claudin-16. *J. Clin. Invest.* **116** (4): 878–891
- Kelley, L. A. & Sternberg, M. J. E. (2009).** Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.* **4** (3): 363–371
- Kimura, J., Abe, H., Kamitani, S., Toshima, H., Fukui, A., Miyake, M., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y., Yamamoto, S. & Horiguchi, Y. (2010).** Clostridium perfringens enterotoxin interacts with claudins via electrostatic attraction. *J. Biol. Chem.* **285** (1): 401–408
- Kitadokoro, K., Nishimura, K., Kamitani, S., Fukui-Miyazaki, A., Toshima, H., Abe, H., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y., Yamamoto, S., Karatani, H. & Horiguchi, Y. (2011).** Crystal structure of Clostridium perfringens enterotoxin displays features of beta-pore-forming toxins. *J. Biol. Chem.* **286** (22): 19549–19555
- Kleinschnitz, C., Blecharz, K., Kahles, T., Schwarz, T., Kraft, P., Göbel, K., Meuth, S. G., Burek, M., Thum, T., Stoll, G. & Förster, C. (2011).** Glucocorticoid insensitivity at the hypoxic blood-brain barrier can be reversed by inhibition of the proteasome. *Stroke* **42** (4): 1081–1089
- Kokai-Kun, J. F. & McClane, B. A. (1997).** Deletion analysis of the Clostridium perfringens enterotoxin. *Infect. Immun.* **65** (3): 1014–1022
- Kokai-Kun, J. F., Benton, K., Wieckowski, E. U. & McClane, B. A. (1999).** Identification of a Clostridium perfringens enterotoxin region required for large complex formation and cytotoxicity by random mutagenesis. *Infect. Immun.* **67** (11): 5634–5641
- Kominsky, S. L., Vali, M., Korz, D., Gabig, T. G., Weitzman, S. A., Argani, P. & Sukumar, S. (2004).** Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am. J. Pathol.* **164** (5): 1627–1633
- Kominsky, S. L., Tyler, B., Sosnowski, J., Brady, K., Doucet, M., Nell, D., Smedley, J. G. 3rd, McClane, B., Brem, H. & Sukumar, S. (2007).** Clostridium perfringens enterotoxin as a novel-targeted therapeutic for brain metastasis. *Cancer Res.* **67** (17): 7977–7982
- Kondoh, M., Masuyama, A., Takahashi, A., Asano, N., Mizuguchi, H., Koizumi, N., Fujii, M., Hayakawa, T., Horiguchi, Y. & Watanabe, Y. (2005).** A novel strategy for the enhancement of drug absorption using a claudin modulator. *Mol. Pharmacol.* **67** (3): 749–756
- Kondoh, M., Takahashi, A., Fujii, M., Yagi, K. & Watanabe, Y. (2006).** A novel strategy for a drug delivery system using a claudin modulator. *Biol. Pharm. Bull.* **29** (9): 1783–1789
- Konrad, M., Schaller, A., Seelow, D., Pandey, A. V., Waldegger, S., Lesslauer, A., Vitzthum, H., Suzuki, Y., Luk, J. M., Becker, C., Schlingmann, K. P., Schmid, M., Rodriguez-Soriano, J., Ariceta, G., Cano, F., Enriquez, R., Juppner, H., Bakkaloglu, S. A., Hediger, M. A., Gallati, S., Neuhauss, S. C. F., Nurnberg, P. & Weber, S. (2006).** Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *Am. J. Hum. Genet.* **79** (5): 949–957

- Koshland, D. E. (1958).** Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **44** (2): 98–104
- Krämer, F., White, K., Kubbies, M., Swisshelm, K. & Weber, B. H. (2000).** Genomic organization of claudin-1 and its assessment in hereditary and sporadic breast cancer. *Hum. Genet.* **107** (3): 249–256
- Krause, G., Winkler, L., Mueller, S. L., Haseloff, R. F., Piontek, J. & Blasig, I. E. (2008).** Structure and function of claudins. *Biochim. Biophys. Acta* **1778** (3): 631–645
- Krause, G., Winkler, L., Piehl, C., Blasig, I., Piontek, J. & Müller, S. L. (2009).** Structure and function of extracellular claudin domains. *Ann. N Y Acad. Sci.* **1165** (1): 34–43
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. (2001).** Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305** (3): 567–580
- Krug, S. M., Amasheh, M., Dittmann, I., Christoffel, I., Fromm, M. & Amasheh, S. (2013).** Sodium caprate as an enhancer of macromolecule permeation across tricellular tight junctions of intestinal cells. *Biomaterials* **34** (1): 275–282
- Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982).** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157** (1): 105–132
- Labbe, R. G. (1980).** Relationship between sporulation and enterotoxin production in *Clostridium perfringens*. *Food Technology* **34**: 88–90
- Labbe, R. G. (1989).** *Clostridium perfringens*. In *Foodborne bacterial pathogens*, pp. 192–234. Edited by M. P. Doyle. New York, Marcel Dekker Press
- Li, J., Angelow, S., Linge, A., Zhuo, M. & Yu, A. S. L. (2013).** Claudin-2 pore function requires an intramolecular disulfide bond between two conserved extracellular cysteines. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **305** (2): C190–C196
- Li, J., Zhuo, M., Pei, L., Rajagopal, M. & Yu, A. S. L. (2014).** Comprehensive cysteine-scanning mutagenesis reveals Claudin-2 pore-lining residues with different intrapore locations. *J. Biol. Chem.* **289** (10): 6475–6484
- Li, X., Saeki, R., Watari, A., Yagi, K. & Kondoh, M. (2014).** Tissue distribution and safety evaluation of a claudin-targeting molecule, the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **52**: 132–137
- Liebner, S., Fischmann, A., Rascher, G., Duffner, F., Grote, E. H., Kalbacher, H. & Wolburg, H. (2000).** Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol.* **100** (3): 323–331
- Ling, J., Liao, H., Clark, R., Wong, M. S. M. & Lo, D. D. (2008).** Structural constraints for the binding of short peptides to claudin-4 revealed by surface plasmon resonance. *J. Biol. Chem.* **283** (45): 30585–30595
- Lomize, A. L., Pogozheva, I. D. & Mosberg, H. I. (2011).** Anisotropic solvent model of the lipid bilayer. 2. Energetics of insertion of small molecules, peptides, and proteins in membranes. *J. Chem. Inf. Model.* **51** (4): 930–946
- Lomize, M. A., Pogozheva, I. D., Joo, H., Mosberg, H. I. & Lomize, A. L. (2012).** OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Res.* **40** (Database issue): D370–D376
- Long, H., Crean, C. D., Lee, W. H., Cummings, O. W. & Gabig, T. G. (2001).** Expression of *Clostridium perfringens* enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium. *Cancer Res.* **61** (21): 7878–7881

- Lovell, S. C., Word, J. M., Richardson, J. S. & Richardson, D. C. (2000).** The penultimate rotamer library. *Proteins* **40** (3): 389–408
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V. & Clark, D. P. (2009).** *Brock Biology of Microorganisms*, 12th edn. (L. Berriman & G. Carlson, Eds.). San Francisco, Pearson Benjamin Cummings
- Maeda, S., Nakagawa, S., Suga, M., Yamashita, E., Oshima, A., Fujiyoshi, Y. & Tsukihara, T. (2009).** Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution. *Nature* **458** (7238): 597–602
- Marks, D. S., Colwell, L. J., Sheridan, R., Hopf, T. a, Pagnani, A., Zecchina, R. & Sander, C. (2011).** Protein 3D structure computed from evolutionary sequence variation. *PloS one* **6** (12): e28766
- Marks, D. S., Hopf, T. a & Sander, C. (2012).** Protein structure prediction from sequence variation. *Nat. Biotechnol.* **30** (11): 1072–1080
- Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., Simmons, D. & Dejana, E. (1998).** Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J. Cell Biol.* **142** (1): 117–127
- Matsuda, M. & Sugimoto, N. (1979).** Calcium-independent and dependent steps in action of Clostridium perfringens enterotoxin on HeLa and Vero cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91** (2): 629–636
- McClane, B. A. & McDonel, J. L. (1979).** The effects of Clostridium perfringens enterotoxin on morphology, viability, and macromolecular synthesis in Vero cells. *J. Cell. Physiol.* **99** (2): 191–200
- McClane, B. A. (2001).** The complex interactions between Clostridium perfringens enterotoxin and epithelial tight junctions. *Toxicon* **39** (11): 1781–1791
- McClane, B. A. (2007).** Clostridium perfringens. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 3rd edn., pp. 423–444. Edited by M. P. Doyle & L. R. Beuchat. Washington, DC, ASM Press
- McDonel, J. L. (1980a).** Clostridium perfringens toxins (type A, B, C, D, E). *Pharmacol. Ther.* **10** (3): 617–655
- McDonel, J. L. (1980b).** Binding of Clostridium perfringens [125I]enterotoxin to rabbit intestinal cells. *Biochemistry* **19** (21): 4801–4807
- Michl, P., Buchholz, M., Rolke, M., Kunsch, S., Löhr, M., McClane, B., Tsukita, S., Leder, G., Adler, G. & Gress, T. M. (2001).** Claudin-4: A new target for pancreatic cancer treatment using Clostridium perfringens enterotoxin. *Gastroenterology* **121** (3): 678–684
- Michl, P., Barth, C., Buchholz, M., Lerch, M. M., Rolke, M., Holzmann, K., Menke, A., Fensterer, H., Giehl, K., Löhr, M., Leder, G., Iwamura, T., Adler, G. & Gress, T. M. (2003).** Claudin-4 expression decreases invasiveness and metastatic potential of pancreatic cancer. *Cancer Res.* **63** (19): 6265–6271
- Mineta, K., Yamamoto, Y., Yamazaki, Y., Tanaka, H., Tada, Y., Saito, K., Tamura, A., Igarashi, M., Endo, T., Takeuchi, K. & Tsukita, S. (2011).** Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett.* **585** (4): 606–612
- Mitaku, S. & Hirokawa, T. (1999).** Physicochemical factors for discriminating between soluble and membrane proteins: hydrophobicity of helical segments and protein length. *Protein Eng.* **12** (11): 953–957
- Mitaku, S., Hirokawa, T. & Tsuji, T. (2002).** Amphiphilicity index of polar amino acids as an aid in the characterization of amino acid preference at membrane-water interfaces. *Bioinformatics* **18** (4): 608–616

- Miwa, N., Furuse, M., Tsukita, S., Niihara, N., Nakamura, Y. & Furukawa, Y. (2001).** Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncology research* **12** (11-12): 469–476
- Mizuno, N., Niwa, T., Yotsumoto, Y. & Sugiyama, Y. (2003).** Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol. Rev.* **55** (3): 425–461
- Morin, P. J. (2005).** Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res.* **65** (21): 9603–9606
- Morin, P. J. (2007).** Claudin proteins in ovarian cancer. *Dis. Markers* **23** (5-6): 453–457
- Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K. & Tsukita, S. (1999).** Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (2): 511–516
- Morita, K., Tsukita, S. & Miyachi, Y. (2004).** Tight junction-associated proteins (occludin, ZO-1, claudin-1, claudin-4) in squamous cell carcinoma and Bowen's disease. *Br. J. Dermatol.* **151** (2): 328–334
- Mullin, J. M., Agostino, N., Rendon-Huerta, E. & Thornton, J. J. (2005).** Keynote review: epithelial and endothelial barriers in human disease. *Drug Discov. Today* **10** (6): 395–408
- Muza-Moons, M. M., Schneeberger, E. E. & Hecht, G. A. (2004).** Enteropathogenic Escherichia coli infection leads to appearance of aberrant tight junctions strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **6** (8): 783–793
- Nakamura, T., Kotani, M., Tonozuka, T., Ide, A., Oguma, K. & Nishikawa, A. (2009).** Crystal structure of the HA3 subcomponent of Clostridium botulinum type C progenitor toxin. *J. Mol. Biol.* **385** (4): 1193–1206
- Neesse, A., Hahnenkamp, A., Griesmann, H., Buchholz, M., Hahn, S. A., Maghnouj, A., Fendrich, V., Ring, J., Sipos, B., Tuveson, D. A., Bremer, C., Gress, T. M. & Michl, P. (2013).** Claudin-4-targeted optical imaging detects pancreatic cancer and its precursor lesions. *Gut* **62** (7): 1034–1043
- Nichols, L. S., Ashfaq, R. & Iacobuzio-Donahue, C. A. (2004).** Claudin 4 Protein Expression in Primary and Metastatic Pancreatic Cancer Support for Use as a Therapeutic Target. *Am. J. Clin. Pathol.* **121** (2): 226–230
- Niilo, L. (1973).** Fluid secretory response of bovine Thiry jejunal fistula to enterotoxin of Clostridium perfringens. *Infect. Immun.* **7** (1): 1–4
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M. & Tsukita, S. (2003).** Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J. Cell Biol.* **161** (3): 653–660
- Nugent, T. & Jones, D. T. (2009).** Transmembrane protein topology prediction using support vector machines. *BMC bioinformatics* **10**: 159
- Olsen, S. J., MacKinnon, L. C., Goulding, J. S., Bean, N. H. & Slutsker, L. (2000).** Surveillance for foodborne-disease outbreaks--United States, 1993-1997. *MMWR. CDC Surveill. Summ.* **49** (1): 1–62
- Piontek, J., Winkler, L., Wolburg, H., Müller, S. L., Zuleger, N., Piehl, C., Wiesner, B., Krause, G. & Blasig, I. E. (2008).** Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J.* **22** (1): 146–158
- Piontek, J., Fritzsche, S., Cording, J., Richter, S., Hartwig, J., Walter, M., Yu, D., Turner, J. R., Gehring, C., Rahn, H.-P., Wolburg, H. & Blasig, I. E. (2011).** Elucidating the principles of the molecular organization of heteropolymeric tight junction strands. *Cell. Mol. Life Sci.* **68** (23): 3903–3918

- Pollastri, G. & McLysaght, A. (2005).** Porter: a new, accurate server for protein secondary structure prediction. *Bioinformatics* **21** (8): 1719–1720
- Popoff, M. R. & Bouvet, P. (2013).** Genetic characteristics of toxigenic clostridia and toxin gene evolution. *Toxicon* **75**: 63–89
- Rafferty, C. N., Cassim, J. Y. & McConnell, D. G. (1977).** Circular dichroism, optical rotatory dispersion, and absorption studies on the conformation of bovine rhodopsin in situ and solubilized with detergent. *Biophys. Struct. Mech.* **2** (4): 227–320
- Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C. & Sasisekharan, V. (1963).** Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.* **7** (1): 95–99
- Rangel, L. B. A., Agarwal, R., D'Souza, T., Pizer, E. S., Alò, P. L., Lancaster, W. D., Gregoire, L., Schwartz, D. R., Cho, K. R. & Morin, P. J. (2003).** Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. *Clin. Cancer Res.* **9** (7): 2567–2575
- Resnick, M. B., Konkin, T., Routhier, J., Sabo, E. & Pricolo, V. E. (2005).** Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. *Mod. Pathol.* **18** (4): 511–518
- Roberts, B. L., Markland, W., Ley, A. C., Kent, R. B., White, D. W., Guterman, S. K. & Ladner, R. C. (1992).** Directed evolution of a protein: selection of potent neutrophil elastase inhibitors displayed on M13 fusion phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** (6): 2429–2433
- Roberts, R. W. & Szostak, J. W. (1997).** RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** (23): 12297–12302
- Robertson, S. L., Smedley, J. G. 3rd, Singh, U., Chakrabarti, G., Van Itallie, C. M., Anderson, J. M. & McClane, B. A. (2007).** Compositional and stoichiometric analysis of Clostridium perfringens enterotoxin complexes in Caco-2 cells and claudin 4 fibroblast transfectants. *Cell. Microbiol.* **9** (11): 2734–2755
- Robertson, S. L., Smedley, J. G. 3rd & McClane, B. A. (2010).** Identification of a claudin-4 residue important for mediating the host cell binding and action of Clostridium perfringens enterotoxin. *Infect. Immun.* **78** (1): 505–517
- Rosiere, T. K., Marrs, J. A. & Bouck, G. B. (1990).** A 39-kD plasma membrane protein (IP39) is an anchor for the unusual membrane skeleton of Euglena gracilis. *J. Cell Biol.* **110** (4): 1077–1088
- Rossa, J., Ploeger, C., Vorreiter, F., Saleh, T., Protze, J., Günzel, D., Wolburg, H., Krause, G. & Piontek, J. (2014).** Claudin-3 and Claudin-5 Protein Folding and Assembly into the Tight Junction are Controlled by Non-conserved Residues in the Transmembrane 3 (TM3) and Extracellular Loop 2 (ECL2) Segments. *J. Biol. Chem.* **289** (11): 7641–7653
- Rost, B., Yachdav, G. & Liu, J. (2004).** The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res.* **32** (Web Server issue): W321–W326
- Roy, A., Kucukural, A. & Zhang, Y. (2010).** I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* **5** (4): 725–738
- Saeki, R., Kondoh, M., Kakutani, H., Tsunoda, S.-I., Mochizuki, Y., Hamakubo, T., Tsutsumi, Y., Horiguchi, Y. & Yagi, K. (2009).** A novel tumor-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule. *Mol. Pharmacol.* **76** (4): 918–926
- Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Itoh, M., Furuse, M., Inazawa, J., Fujimoto, K. & Tsukita, S. (1997).** Mammalian occludin in epithelial cells: its expression and subcellular distribution. *Eur. J. Cell Biol.* **73** (3): 222–231

- Sakaguchi, T., Köhler, H., Gu, X., McCormick, B. A. & Reinecker, H.-C. (2002).** Shigella flexneri regulates tight junction-associated proteins in human intestinal epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **4** (6): 367–681
- Salama, N. N., Eddington, N. D. & Fasano, A. (2006).** Tight junction modulation and its relationship to drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58** (1): 15–28
- Santin, A. D., Cané, S., Bellone, S., Palmieri, M., Siegel, E. R., Thomas, M., Roman, J. J., Burnett, A., Cannon, M. J. & Pecorelli, S. (2005).** Treatment of chemotherapy-resistant human ovarian cancer xenografts in C.B-17/SCID mice by intraperitoneal administration of Clostridium perfringens enterotoxin. *Cancer Res.* **65** (10): 4334–4342
- Santin, A. D., Bellone, S., Marizzoni, M., Palmieri, M., Siegel, E. R., McKenney, J. K., Hennings, L., Comper, F., Bandiera, E. & Pecorelli, S. (2007).** Overexpression of claudin-3 and claudin-4 receptors in uterine serous papillary carcinoma: novel targets for a type-specific therapy using Clostridium perfringens enterotoxin (CPE). *Cancer* **109** (7): 1312–1322
- Sarker, M. R., Carman, R. J. & McClane, B. A. (1999).** Inactivation of the gene (cpe) encoding Clostridium perfringens enterotoxin eliminates the ability of two cpe-positive C. perfringens type A human gastrointestinal disease isolates to affect rabbit ileal loops. *Mol. Microbiol.* **33** (5): 946–958
- Sawada, N., Murata, M., Kikuchi, K., Osanai, M., Tobioka, H., Kojima, T. & Chiba, H. (2003).** Tight junctions and human diseases. *Med. Electron Microsc.* **36** (3): 147–156
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M.-A., Roy, S. L., Jones, J. L. & Griffin, P. M. (2011).** Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* **17** (1): 7–15
- Schröder, L., Lowery, T. J., Hilty, C., Wemmer, D. E. & Pines, A. (2006).** Molecular imaging using a targeted magnetic resonance hyperpolarized biosensor. *Science* **314** (5798): 446–449
- Seelig, B. & Szostak, J. W. (2007).** Selection and evolution of enzymes from a partially randomized non-catalytic scaffold. *Nature* **448** (7155): 828–831
- Seigneuret, M. (2006).** Complete predicted three-dimensional structure of the facilitator transmembrane protein and hepatitis C virus receptor CD81: conserved and variable structural domains in the tetraspanin superfamily. *Biophys. J.* **90** (1): 212–227
- Shapovalov, M. V & Dunbrack, R. L. (2011).** A smoothed backbone-dependent rotamer library for proteins derived from adaptive kernel density estimates and regressions. *Structure* **19** (6): 844–858
- Sheehan, G. M., Kallakury, B. V. S., Sheehan, C. E., Fisher, H. A. G., Kaufman, R. P. & Ross, J. S. (2007).** Loss of claudins-1 and -7 and expression of claudins-3 and -4 correlate with prognostic variables in prostatic adenocarcinomas. *Hum. pathol.* **38** (4): 564–569
- Sherman, S., Klein, E. & McClane, B. A. (1994).** Clostridium perfringens type A enterotoxin induces tissue damage and fluid accumulation in rabbit ileum. *J. Diarrhoeal. Dis. Res.* **12** (3): 200–207
- Simon, D. B. (1999).** Paracellin-1, a Renal Tight Junction Protein Required for Paracellular Mg<sup>2+</sup> Resorption. *Science* **285** (5424): 103–106
- Singh, U., Mitic, L. L., Wieckowski, E. U., Anderson, J. M. & McClane, B. A. (2001).** Comparative biochemical and immunocytochemical studies reveal differences in the effects of Clostridium perfringens enterotoxin on polarized CaCo-2 cells versus Vero cells. *J. Biol. Chem.* **276** (36): 33402–33412
- Skjelkvåle, R. & Uemura, T. (1977).** Experimental Diarrhoea in human volunteers following oral administration of Clostridium perfringens enterotoxin. *J. Appl. Bacteriol.* **43** (2): 281–286
- Smedley, J. G. 3rd & McClane, B. A. (2004).** Fine mapping of the N-terminal cytotoxicity region of Clostridium perfringens enterotoxin by site-directed mutagenesis. *Infect. Immun.* **72** (12): 6914–2693

- Smedley, J. G. 3rd, Uzal, F. A. & McClane, B. A. (2007).** Identification of a prepore large-complex stage in the mechanism of action of Clostridium perfringens enterotoxin. *Infect. Immun.* **75** (5): 2381–2390
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. (1985).** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150** (1): 76–85 Erratum: *Anal. Biochem.* (1987). **163** (1): 279
- Soini, Y. (2005).** Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours. *Histopathology* **46** (5): 551–560
- Sonnhammer, E. L., von Heijne, G. & Krogh, A. (1998).** A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In J. Glasgow et al., eds.: *Proc. Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology*, pp. 175–182. AAAI Press
- Sonoda, N., Furuse, M., Sasaki, H., Yonemura, S., Katahira, J., Horiguchi, Y. & Tsukita, S. (1999).** Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J. Cell Biol.* **147** (1): 195–204
- StaeHELin, L. A. (1973).** Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J. Cell Sci.* **13** (3): 763–786
- Steed, E., Rodrigues, N. T. L., Balda, M. S. & Matter, K. (2009).** Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family. *BMC Cell Biol.* **10**: 95
- Strong, D. H., Duncan, C. L. & Perna, G. (1971).** Clostridium perfringens Type A Food Poisoning II. Response of the Rabbit Ileum as an Indication of Enteropathogenicity of Strains of Clostridium perfringens in Human Beings. *Infect. Immun.* **3** (1): 171–178
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W. (1990).** Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**: 60–89
- Suzuki, H., Kakutani, H., Kondoh, M., Watari, A. & Yagi, K. (2010).** The safety of a mucosal vaccine using the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin. *Pharmazie* **65** (10): 766–769
- Suzuki, H., Ito, Y., Yamazaki, Y., Mineta, K., Uji, M., Abe, K., Tani, K., Fujiyoshi, Y. & Tsukita, S. (2013).** The four-transmembrane protein IP39 of Euglena forms strands by a trimeric unit repeat. *Nat. Commun.* **4**: 1766
- Swisshelm, K., Macek, R. & Kubbies, M. (2005).** Role of claudins in tumorigenesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57** (6): 919–928
- Takahashi, A., Komiya, E., Kakutani, H., Yoshida, T., Fujii, M., Horiguchi, Y., Mizuguchi, H., Tsutsumi, Y., Tsunoda, S., Koizumi, N., Isoda, K., Yagi, K., Watanabe, Y. & Kondoh, M. (2008).** Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal region of C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin, by site-directed mutagenesis. *Biochem. Pharmacol.* **75** (8): 1639–1648
- Takahashi, A., Kondoh, M., Uchida, H., Kakamu, Y., Hamakubo, T. & Yagi, K. (2011).** Mutated C-terminal fragments of Clostridium perfringens enterotoxin have increased affinity to claudin-4 and reversibly modulate tight junctions in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **410** (3): 466–470
- Takahashi, A., Saito, Y., Kondoh, M., Matsushita, K., Krug, S. M., Suzuki, H., Tsujino, H., Li, X., Aoyama, H., Matsuhisa, K., Uno, T., Fromm, M., Hamakubo, T. & Yagi, K. (2012).** Creation and biochemical analysis of a broad-specific claudin binder. *Biomaterials* **33** (12): 3464–3474
- Titball, R. W., Naylor, C. E. & Basak, A. K. (1999).** The Clostridium perfringens alpha-toxin. *Anaerobe* **5** (2): 51–64

- Tokés, A.-M., Kulka, J., Paku, S., Szik, A., Páska, C., Novák, P. K., Szilák, L., Kiss, A., Bögi, K. & Schaff, Z. (2005).** Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res.* **7** (2): R296–R305
- Tolleshaug, H., Skjelkvåle, R. & Berg, T. (1982).** Quantitation of binding and subcellular distribution of Clostridium perfringens enterotoxin in rat liver cells. *Infect. Immun.* **37** (2): 486–491
- Tsukita, S., Furuse, M. & Itoh, M. (2001).** Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2** (4): 285–293
- Tusnányi, G. E. & Simon, I. (1998).** Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J. Mol. Biol.* **283** (2): 489–506
- Tusnányi, G. E. & Simon, I. (2001).** The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* **17** (9): 849–850
- Uchida, H., Kondoh, M., Hanada, T., Takahashi, A., Hamakubo, T. & Yagi, K. (2010).** A claudin-4 modulator enhances the mucosal absorption of a biologically active peptide. *Biochem. Pharmacol.* **79** (10): 1437–1444
- Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M. & Tsukita, S. (2006).** ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* **126** (4): 741–754
- Van den Ent, F. & Löwe, J. (2006).** RF cloning: a restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *J. Biochem. Biophys. Methods* **67** (1): 67–74
- Van Itallie, C. M., Rahner, C. & Anderson, J. M. (2001).** Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J. Clin. Invest.* **107** (10): 1319–1327
- Van Itallie, C. M., Rogan, S., Yu, A., Vidal, L. S., Holmes, J. & Anderson, J. M. (2006).** Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **291** (6): F1288–F1299
- Van Itallie, C. M., Betts, L., Smedley, J. G. 3rd, McClane, B. A. & Anderson, J. M. (2008).** Structure of the claudin-binding domain of Clostridium perfringens enterotoxin. *J. Biol. Chem.* **283** (1): 268–274
- Van Itallie, C. M., Mitic, L. L. & Anderson, J. M. (2011).** Claudin-2 forms homodimers and is a component of a high molecular weight protein complex. *J. Biol. Chem.* **286** (5): 3442–3450
- Veshnyakova, A., Protze, J., Rossa, J., Blasig, I. E., Krause, G. & Piontek, J. (2010).** On the Interaction of Clostridium perfringens Enterotoxin with Claudins. *Toxins (Basel)*. **2** (6): 1336–1356
- Veshnyakova, A., Piontek, J., Protze, J., Waziri, N., Heise, I. & Krause, G. (2012).** Mechanism of Clostridium perfringens enterotoxin interaction with claudin-3/4 protein suggests structural modifications of the toxin to target specific claudins. *J. Biol. Chem.* **287** (3): 1698–1708
- Viklund, H. & Elofsson, A. (2008).** OCTOPUS: improving topology prediction by two-track ANN-based preference scores and an extended topological grammar. *Bioinformatics* **24** (15): 1662–1668
- Von Heijne, G. (1992).** Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Mol. Biol.* **225** (2): 487–494
- Vovis, G. F. & Lacks, S. (1977).** Complementary action of restriction enzymes endo R-DpnI and Endo R-DpnII on bacteriophage f1 DNA. *J. Mol. Biol.* **115** (3): 525–538
- Walther, W., Petkov, S., Kuvardina, O. N., Aumann, J., Kobelt, D., Fichtner, I., Lemm, M., Piontek, J., Blasig, I. E., Stein, U. & Schlag, P. M. (2012).** Novel Clostridium perfringens enterotoxin suicide gene therapy for selective treatment of claudin-3- and -4-overexpressing tumors. *Gene therapy* **19** (5): 494–503

- Wang, J., Cieplak, P. & Kollman, P. A. (2000).** How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J. Comput. Chem.* **21** (12): 1049–1074
- Wattenhofer, M., Reymond, A., Falciola, V., Charollais, A., Caille, D., Borel, C., Lyle, R., Estivill, X., Petersen, M. B., Meda, P. & Antonarakis, S. E. (2005).** Different mechanisms preclude mutant CLDN14 proteins from forming tight junctions in vitro. *Hum. Mutat.* **25** (6): 543–549
- Weber, S., Schneider, L., Peters, M., Misselwitz, J., Rönnefarth, G., Böswald, M., Bonzel, K. E., Seeman, T., Suláková, T., Kuwertz-Bröking, E., Gregoric, A., Palcoux, J. B., Tasic, V., Manz, F., Schärer, K., Seyberth, H. W. & Konrad, M. (2001).** Novel paracellin-1 mutations in 25 families with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12** (9): 1872–1881
- Wen, H., Watry, D. D., Marcondes, M. C. G. & Fox, H. S. (2004).** Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: role of the first extracellular domain of claudin-5. *Mol. Cell. Biol.* **24** (19): 8408–8417
- Wieckowski, E. U., Wnek, A. P. & McClane, B. A. (1994).** Evidence that an approximately 50-kDa mammalian plasma membrane protein with receptor-like properties mediates the amphiphilicity of specifically bound *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J. Biol. Chem.* **269** (14): 10838–10848
- Wieckowski, E. U., Kokai-Kun, J. F. & McClane, B. A. (1998).** Characterization of membrane-associated *Clostridium perfringens* enterotoxin following pronase treatment. *Infect. Immun.* **66** (12): 5897–5905
- Wilcox, E. R., Burton, Q. L., Naz, S., Riazuddin, S., Smith, T. N., Ploplis, B., Belyantseva, I., Ben-Yosef, T., Liburd, N. A., Morell, R. J., Kachar, B., Wu, D. K., Griffith, A. J. & Friedman, T. B. (2001).** Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell* **104** (1): 165–172
- Wilson, J. J., Matsushita, O., Okabe, A. & Sakon, J. (2003).** A bacterial collagen-binding domain with novel calcium-binding motif controls domain orientation. *EMBO J.* **22** (8): 1743–1752
- Winkler, L. (2007).** *Die Bedeutung der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-3 und Claudin-5 für Claudin-Interaktionen und Tight junction-Strangbildung.* **Dissertation**, Freie Universität Berlin, Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
- Winkler, L., Gehring, C., Wenzel, A., Müller, S. L., Piehl, C., Krause, G., Blasig, I. E. & Piontek, J. (2009).** Molecular determinants of the interaction between *Clostridium perfringens* enterotoxin fragments and claudin-3. *J. Biol. Chem.* **284** (28): 18863–18872
- Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Kraus, J., Rascher-Eggstein, G., Liebner, S., Hamm, S., Duffner, F., Grote, E.-H., Risau, W. & Engelhardt, B. (2003).** Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol.* **105** (6): 586–592
- Yamamoto, A., Uchiyama, T., Nishikawa, R., Fujita, T. & Muranishi, S. (1996).** Effectiveness and toxicity screening of various absorption enhancers in the rat small intestine: effects of absorption enhancers on the intestinal absorption of phenol red and the release of protein and phospholipids from the intestinal membrane. *J. Pharm. Pharmacol.* **48** (12): 1285–1289
- Yarov-Yarovoy, V., Schonbrun, J. & Baker, D. (2006).** Multipass membrane protein structure prediction using Rosetta. *Proteins* **62** (4): 1010–1025
- Yelland, T. S., Naylor, C. E., Savva, C. G., Moss, D. S., McClane, B. A., Blasig, I. E., Popoff, M. & Basak, A. K. (2014).** Structure of *Clostridium perfringens* Enterotoxin with a peptide derived from a modified version of ECL-2 of Claudin 2 : PDB ID: 3ZJ3, DOI: 10.2210/pdb3zj3/pdb

Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., Yao, M., Fei, M. J., Libeu, C. P., Mizushima, T., Yamaguchi, H., Tomizaki, T. & Tsukihara, T. (1998). Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome c oxidase. *Science* **280** (5370): 1723–1729

Yu, A. S. L., Cheng, M. H., Angelow, S., Günzel, D., Kanzawa, S. A., Schneeberger, E. E., Fromm, M. & Coalson, R. D. (2009). Molecular basis for cation selectivity in claudin-2-based paracellular pores: identification of an electrostatic interaction site. *J. Gen. Physiol.* **133** (1): 111–127

Yuan, X., Lin, X., Manorek, G., Kanatani, I., Cheung, L. H., Rosenblum, M. G. & Howell, S. B. (2009). Recombinant CPE fused to tumor necrosis factor targets human ovarian cancer cells expressing the claudin-3 and claudin-4 receptors. *Mol. Cancer Ther.* **8** (7): 1906–1915

Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A. J., Zeitz, M., Fromm, M. & Schulzke, J.-D. (2007). Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* **56** (1): 61–72

Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC bioinformatics* **9**: 40

## 6 Publikationsverzeichnis

Teile dieser Dissertation sind in den folgenden Publikationen enthalten:

**Veshnyakova, A., Protze, J., Rossa, J., Blasig, I.E., Krause, G. & Piontek, J. (2010).** On the Interaction of *Clostridium perfringens* Enterotoxin with Claudins. *Toxins*. **2 (6)**: 1336–1356

**Veshnyakova, A., Piontek, J., Protze, J., Waziri, N., Heise, I. & Krause, G. (2012).** Mechanism of *Clostridium perfringens* Enterotoxin Interaction with Claudin-3/4 Protein Suggests Structural Modifications of the Toxin to Target Specific Claudins. *J. Biol. Chem.* **287 (3)**: 1698–1708

**Rossa, J., Plöger, C., Voreiter, F., Saleh, T., Protze, J., Günzel, D., Wolburg, H., Krause, G. & Piontek, J. (2014).** Claudin-3 and Claudin-5 Protein Folding and Assembly into the Tight Junction are Controlled by Non-conserved Residues in the Transmembrane 3 (TM3) and Extracellular Loop 2 (ECL2) Segments. *J. Biol. Chem.* **289 (11)**: 7641–7653

**Protze, J., Eichner, M., Piontek, A., Dinter, S., Rossa, J., Blecharz, K.G., Vajkoczy, P., Piontek, J. & Krause, G. (2014).** Directed structural modification of *Clostridium perfringens* enterotoxin to enhance binding to claudin-5. *Cell. Mol. Life Sci.* [epub ahead of print]

**Rossa, J.\*, Protze, J.\*, Kern, C., Günzel, D., Krause, G. & Piontek, J. (2014).** On molecular interfaces contributing to folding of claudin-5 and its assembly into tight junction strands. *Biochem. J.* **464 (1)**: 49–60

\* geteilte Erstautorenschaft

Weitere Publikationen:

**Veith, A., Urich, T., Seyfarth, K., Protze, J., Frazão, C. & Kletzin, A. (2011).** Substrate pathways and mechanisms of inhibition in the sulfur oxygenase reductase of *Acidianus ambivalens*. *Front. Microbiol.* **2**: 67

**Protze, J., Müller, F., Lauber, K., Naß, B., Mentele, R., Lottspeich, F. & Kletzin, A. (2011).** An extracellular tetrathionate hydrolase from the thermoacidophilic archaeon *Acidianus ambivalens* with an activity optimum at pH 1. *Front. Microbiol.* **2**: 68

**Veshnyakova, A., Krug, S.M., Mueller, S.L., Piontek, J., Protze, J., Fromm, M. & Krause, G. (2012).** Determinants contributing to claudin ion channel formation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1257 (1)**: 45–53

Konferenzbeiträge:

Protze, J. (2009)

**Talk:** “*The Tetrathionate Hydrolase of Acidianus ambivalens*“

11<sup>th</sup> Frankfurt meeting on genome function and gene regulation in Archaea, 21.–22. September 2009, Schmittchen, Deutschland

Piontek, A., Protze, J., Eichner, M., Dinter, S., Rossa, J., Piontek, J. & Krause, G. (2012)

**Poster:** “*cCPE as a potential tool to modulate claudins present in BBB*“

15<sup>th</sup> International Symposium Signal Transduction in the Blood-Brain Barriers, 13.–16. September 2012, Potsdam, Deutschland

Protze, J., Piontek, A., Krug, S.M., Müller, S.L., Piontek, J., Fromm, M. & Krause, G. (2012)

**Poster:** “*Determinants contributing to claudin barrier and ion channel formation*“

15<sup>th</sup> International Symposium Signal Transduction in the Blood-Brain Barriers, 13.–16. September 2012, Potsdam, Deutschland

Protze, J., Piontek, A., Eichner, M., Dinter, S., Rossa, J., Piontek, J. & Krause, G. (2012)

**Poster:** “*Clostridium perfringens enterotoxin and claudins; Insights in the molecular binding mechanism*“

1<sup>st</sup> Symposium on molecular structure and function of the apical junctional complex in epithelia and endothelia, 01.–04. November 2012, Mérida, Mexico

Protze, J., Piontek, A., Eichner, M., Dinter, S., Rossa, J., Piontek, J. & Krause, G. (2013)

**Poster:** “*Clostridium perfringens enterotoxin and claudins; Insights in the molecular binding mechanism*“

3DSIG: Structural Bioinformatics and Computational Biophysics, an ISMB – ECCB satellite meeting, 19.–20. Juli 2013, Berlin, Deutschland

## 7 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 8 Anhang

### 8.1 Interaktion von cCPE mit unterschiedlichen Claudinen

**Tab. 8.1:** Aufstellung der zu Beginn der Arbeit bekannten Daten zur cCPE-Claudin-Interaktion nach (Veshnyakova *et al.*, 2010).

Die EZS2-Sequenz der jeweiligen Claudine ist in der linken Spalte gezeigt. Aminosäuren, die von der Sequenz der CPE-Rezeptor-Claudine (Cld3 und Cld4) abweichen, sind rot hervorgehoben. Farblegende für Bindungskapazitätsangaben: Blau: Peptid-basierende Bindungsassays, gelb: Assays mit detergent-solubilierten Claudinen, grün: zelluläre Bindungsassays. Die Farbschattierungen korrespondieren mit den folgenden Bindungskategorien: 0–10% (-), 10–25% (low), 25–85% (medium) und >85% (high) gebundenes CPE relativ zu Cld3<sub>wt</sub> oder Cld4<sub>wt</sub>. Mit Sternchen markierte Einträge basieren auf Zytotoxizitätsassays und wurden wie folgt klassifiziert: hochsensitiv (high), EC50 < 1 µg/ml; leicht sensitiv (low), 1 µg/ml < EC50 < 30 µg/ml; und insensitiv, 30 µg/ml < EC50. In manchen Fällen war keine weitere Quantifizierung des gebundenen CPEs verfügbar (+). Alle Konstrukte ohne Präfixe sind murinen Ursprungs, die anderen Konstrukte stammen vom Menschen (hu-), von Affen (mk-), oder sind Maus/Mensch-Chimären (muh-), bzw. Affe/Mensch-Chimären (mkh-). (p) zeigt an, dass die Daten mit CPE<sub>290–319</sub> gewonnen wurden, (L) zeigt die Bindung von CPE<sub>116–319</sub>. Alle anderen Werte wurden mit CPE- oder CPE<sub>194–319</sub>-ähnlichen Konstrukten erzeugt.

EZS2-Sequenz	Claudin	Konstruktnamen	Bindungskapazität	Quelle
WYGNRIVQEFYDPLTPINARYEFGQALFTGW	1	wt	- (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WYGNQIVQEFYDPLTPINARYEFGQALFTGW		Cldn1	low *	Kimura <i>et al.</i> , 2010
WYGNRIVQEFYDPMTPVNARYEFGQALFTGW		hu-Cldn1	low *	Kimura <i>et al.</i> , 2010
WYGNRIVQEFYNPLVASGQKREMGASLYVVGW		Cldn1-4-1(A)	high *	Kimura <i>et al.</i> , 2010
WYGNRIVQEFYNPLVASGQKREMGAAALFTGW		Cldn1-4-1(B)	high *	Kimura <i>et al.</i> , 2010
WYGNRIVQEFYDPLVASGQKREMGAAALFTGW		Cldn1-4-1(C)	low *	Kimura <i>et al.</i> , 2010
WYGNRIVQEFYDPMVASGQKREMGAAALFTGW		Cldn1-4-1(D)	low *	Kimura <i>et al.</i> , 2010
WYGNRIVQEFYNPMTTPVNARYEFGQALFTGW		hu-D150N	+	Robertson <i>et al.</i> , 2010
WNLHGILRDFYSPLVPDSMKFEIGEALYLGII	2	wt	low (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WNLHGILRDFYSPLVPDSMKFEIGEALYLGII		Cldn2	low *	Kimura <i>et al.</i> , 2010
WNLHGILRDFYNPLVPDSMKFEIGEALYLGII		S149N	High	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WNLHGILRDFYNPLVPDSMKFEIGEALYLGII		hu-S149N	+	Robertson <i>et al.</i> , 2010
WNLHGILRDFYNPLVPDAMKFEIGEALYLGII		S149N/S155A	high (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WNLHGILRDFYNPLVPDAMKREIGEALYLGII		S149N/S155A/F158R	high (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WNLHGILRDFYSPLVPDSMKFEIGEALYLGII		hu-Claudin-2	-	Robertson <i>et al.</i> , 2010
WTAHNVIIRDFYNPMVASGQKREMGASLYVVGW		hu-Claudin-2/E4	+	Robertson <i>et al.</i> , 2010
WNLHGILRDFYSPLVPDSMKFEIGEALYLGII		hu-Claudin-2 108-230	-	Robertson <i>et al.</i> , 2010
WNLHGILRDFYSPLVPDSMKFEIGEALYLGII		hu-Claudin-2 136-230	-	Robertson <i>et al.</i> , 2010
WSANTIIRDFYNPLVPEAQKREMGAGLYVVGW	3	wt	high (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WSANTIIRDFYNPLVPEAQKREMGAGLYVVGW		msCldn3	high *	Kimura <i>et al.</i> , 2010
WSANTIIRDFANPLVPEAQKREMGAGLYVVGW		Y147A	high (higher than wt) (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WSANTIIRDFYDPLVPEAQKREMGAGLYVVGW		N148D	- (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WSANTIIRDFYDPLVPEAQKREMGAGLYVVGW		N148D	High	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WSANTIIRDFYDPAVPEAQKREMGAGLYVVGW		N148D/L150A	-	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WSANTIIRDFYNPAVPEAQKREMGAGLYVVGW		L150A	- (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WSANTIIRDFYNPLVPVAQKREMGAGLYVVGW		E153V	medium (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WSANTIIRDFYNPLVPEAQKREMGAGLYVVGW		A154N	medium (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WSANTIIRDFYNPLVPEAKREMGAGLYVVGW		Q155E	high (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009

EZS2-Sequenz	Claudin	Konstrukt	Bindungskapazität	Quelle
WTAHNVIRDFYNPMVASGQKREMGASLYVGV	4	wt	- (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WTAHNVIRDFYNPMVASGQKREMGASLYVGV		hu-wt	+	Robertson <i>et al.</i> , 2010
WTAHNVIRDFYNPMVASGQKREMGASLYVGV		wt	high (p)	Ling <i>et al.</i> , 2008
WTAHNVIRDFYNPMVASGQKREMGASLYVGV		wt	High	Takahashi <i>et al.</i> 2008
WTAHNVIRDFYNPMVPSGQKREMGASLYVGV		A153P	- (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WTAHNVIRDFYNPLVPSGQKREMGASLYVGV		M151L/A153P	medium (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WNLHGILRDFYSPLVPDSMKFEIGEAALYLG I		hu-Claudin-4/E2	-	Robertson <i>et al.</i> , 2010
WTAHNI IQDFYNPLVASGQKREMGASLYVGV		hu-Claudin-4 108-209	+	Robertson <i>et al.</i> , 2010
WTAHNI IQDFYNPLVASGQKREMGASLYVGV		hu-Claudin-4 136-209	+	Robertson <i>et al.</i> , 2010
WTAHNI IQDFYSPLVASGQKREMGASLYVGV		hu-N149S	-	Robertson <i>et al.</i> , 2010
WTAHNI IQDFYDPLVASGQKREMGASLYVGV		hu-N149D	-	Robertson <i>et al.</i> , 2010
WTAHNVIRDFYNPMVASGQKREMGASLYVGV		Ecl2	medium (p)	Ling <i>et al.</i> , 2008
WTAHNVIRDFYNPMVASGQKREMGASLYVGV		TM3.Ecl2.TM4	high (p)	Ling <i>et al.</i> , 2008
WTAHNVIRDFYNPMVASGQKREMGASLYVGV		TM3.Ecl2.CT	high (p)	Ling <i>et al.</i> , 2008
WTAHNVIRDFYNPMVASGQKREMGASLYVGV		Ecl2.CT	high (higher than wt) (p)	Ling <i>et al.</i> , 2008
WTAHNVIRDFYNPMVASGQKREMGASLYVGV		Cldn4	high *	Kimura <i>et al.</i> , 2010
WTAHNI IQDFYNPLVASGQKREMGASLYVGV		hu-Cldn4	high *	Kimura <i>et al.</i> , 2010
WTAHNVIRDFYNPMVASGQKREMGASLYVGV		mk-Cldn4	high *	Kimura <i>et al.</i> , 2010
WTAHNI IQDFYNPLVASGQKREFGQALFTGW		Cldn4-1(A)	insensitive *	Kimura <i>et al.</i> , 2010
WTAHNI IQDFYNPLVASGQKREMGQALFTGW		Cldn4-1(B)	high *	Kimura <i>et al.</i> , 2010
WTAHNI IQDFYNPLVASGQKREMGALFTGW		Cldn4-1(C)	high *	Kimura <i>et al.</i> , 2010
WTAHNVIRDFYDPSVPVSQKYELGASLYVGV		hu-Cldn4-5-4	insensitive *	Kimura <i>et al.</i> , 2010
WTAHNI IQDFYDPLVASGQKYEMGASLYVGV		hu-Cldn4NRDY	low *	Kimura <i>et al.</i> , 2010
WFANIVVREFYDPTVPVSQKYELGAALYIGW	5	wt	- (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WFANIVVREFYDPTVPVSQKYELGAALYIGW		wt	-	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WFANIVVREFYDPTVPVSQKYELGAALYIGW		wt	low (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WFANIVVREFYDPTVPVSQKYELGAALYIGW		Cldn5	insensitive *	Kimura <i>et al.</i> , 2010
WFANIVVREFYDPTVPVSQKYELGAALYIGW		hu-Cldn5	insensitive *	Kimura <i>et al.</i> , 2010
WFANIVVREFYNPLVASGQKREMGALYIGW		hu-Cldn5-4-5	high *	Kimura <i>et al.</i> , 2010
WFANIVVREFYNPLTPMNVKYEFGAALYIGW		mh-Cldn5-7-5	high *	Kimura <i>et al.</i> , 2010
WFANIVVREFYNPSVPVSQKRELGAALYIGW		hu-Cldn5DYNR	low *	Kimura <i>et al.</i> , 2010
WFANIVVAEFYDPTVPVSQKYELGAALYIGW		R145A	low (higher than wt) (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WFANIVVQEFYDPTVPVSQKYELGAALYIGW		R145Q	low (higher than wt) (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WFANIVVRNFYDPTVPVSQKYELGAALYIGW		E146N	Low (wt) (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WFANIVVRDFYDPTVPVSQKYELGAALYIGW		E146D	- (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WFANIVVRDFYDPTVPVAQKYELGAALYIGW		E146D/S155A	- (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WFANIVVRDFYDPTVPVAQKRELGAALYIGW		E146D/S155A/Y158R	- (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WFANIVVRDFYDPLVPEAQKRELGAALYIGW		E146D/T151L/V154E/S155A/Y158R	- (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WFANIVVRDFYNPLVPEAQKYELGAALYIGW		E146D/D149N/T151L/V154E/S155A	high (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WFANIVVREAYDPTVPVSQKYELGAALYIGW		F147A	low (higher than wt) (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WFANIVVREFADPTVPVSQKYELGAALYIGW		Y148A	low (higher than wt) (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WFANIVVREFYNPTVPVSQKYELGAALYIGW		D149N	- (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WFANIVVREFYNPTVPVSQKYELGAALYIGW		D149N	low (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WFANIVVREFYNPLVPVSQKYELGAALYIGW		D149N/T151L	medium (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WFANIVVREFYDATVPVSQKYELGAALYIGW		P150A	low (lower than wt) (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WFANIVVREFYDPAVPVSQKYELGAALYIGW		T151A	- (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WFANIVVREFYDPLVPVSQKYELGAALYIGW		T151L	- (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WFANIVVREFYDPTVPASQKYELGAALYIGW		V154A	low (lower than wt) (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WFANIVVREFYDPTVPESQKYELGAALYIGW		V154E	- (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WFANIVVREFYDPTVPVAQKYELGAALYIGW		S155A	- (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WFANIVVREFYDPTVPVAQKYELGAALYIGW		S155A	low (higher than wt) (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WFANIVVREFYDPTVPVSAKYELGAALYIGW		Q156A	low (higher than wt) (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WFANIVVREFYDPTVPVSEKYELGAALYIGW		Q156E	- (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WFANIVVREFYDPTVPVSKAELGAALYIGW		Y158A	low (higher than wt) (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009

EZS2-Sequenz	Claudin	Konstrukt	Bindungskapazität	Quelle
WFANIVVREFYDPTVPVSQKYQLGAALYIGW		E159Q	low (higher than wt) (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WTAHSIIQDFYNPLVADAQKRELGASLYLW	6	wt	high (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WIGHQIVTDFYNPLTPMNVKYEFGPAIFIGW	7	wt	medium (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WIGHQIVTDFYNPLTPMNVKYEFGPAIFIGW		Cldn7	high *	Kimura <i>et al.</i> , 2010
WIGHQIVTDFYDPSVPVSQKYELGPAIFIGW		mh-Cldn7-5-7	insensitive *	Kimura <i>et al.</i> , 2010
WVANSIIRDFYNPLVDVALKRELGEALYIGW	8	wt	- (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WVANSIIRDFYNPLVDVALKRELGEALYIGW		Cldn8	high *	Kimura <i>et al.</i> , 2010
WTAHAI IQDFYNPLVAEALKRELGASLYLW	9	wt	high (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
LYANKITTEFFDPLYME-QKYELGAALF IGW	10	wt	- (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
LYANKITTEFFDPLFVE-QKYELGAALF IGW		hu-Cldn10	insensitive *	Kimura <i>et al.</i> , 2010
WFPVCAHREITIVSF-----GYSLYAGW	11	wt	- (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WAI FYNSHLNRKFEFVFTFDYAVFVTIASSG	12	wt	- (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WVTHNIIHGFFNPLLGFSKQVQMGSSLSLAW	13	wt	- (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WTTNDVVQNFYNPLLPSGMKFEIGQALYLGW	14	wt	medium (L)	Winkler <i>et al.</i> , 2009
WTTNDVVQNFYNPLLPSGMKFEIGQALYLGW		Cldn14	low *	Kimura <i>et al.</i> , 2010

**Tab. 8.2:** Zusammenfassung der Ergebnisse der zellulären Bindungsassays von cCPE-Varianten mit Cld1, Cld3–Cld9

cCPE-Konstrukt	Cld1	Cld3	Cld4	Cld5	Cld6	Cld7	Cld8	Cld9
cCPEwt vs Cld3wt	+	+++	+++	-(+)	+++	+	+	+++
CCPEwt	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
L223A		++	+(+)		+++	++	+	+++
D225A		+++	++(+)		+++	+++	+	+++
R227A		+(+)	+		+(+)	++	+	++
L223A/D225A/R227A		++(+)	+		+(+)	+(+)	+	+++
L254A		++	++(+)		+(+)	+(+)	+(+)	++
S256A		++(+)	+++		++(+)	+++	+++	+++
K257A		++(+)	+++					
I258A		++(+)	++(+)		++	++	+(+)	++
L254A/S256A/I258A		+(+)	++(+)		++	++	+	++
D284A		++(+)	+++		++(+)	+(+)	+(+)	+++
L254A/S256A/I258A/D284A		(+)	++(+)		+(+)	+(+)	+	+(+)
D284N		++	+++					
Y310F		+++	+++	++				
Y306A		+	+		+	+	+	+
S313H	++++	+++	++	+++++	+++	+++	+(+)	+++
Y306W/S313H	+++(+)	++	+	++++(+)	+(+)	++(+)	(+)	++
S305P/S307R/S313H	++++	+++	+++	++++(+)	+++	+++	+++	+++
Y306A/L315A	+	(+)	(+)	+	(+)	(+)	(+)	(+)

(+) 0–10%, + 10–30%, +(+) 30–50%, ++ 50–70%, ++(+)  
70–90%, +++ 90–120%, +++(+)  
120–200, ++++ 200–300%, ++++(+)  
300–400%, +++++ 400–500%, +++++(+)  
500–600%, ++++++ > 600%

**Tab. 8.3:** Zusammenfassung der Ergebnisse der zellulären Bindungsassays von cCPE-Varianten mit Cld3, Cld4 und der Cld3-ähnlichen Mutante von Cld4 (Cld4<sub>A152P/S153E/G154A</sub>)

cCPE-Konstrukt	Cld3	Cld4	Cld4 A152P/S153E/G154A
cCPEwt vs Cld3wt	+++	+++	++(+)
cCPEwt	+++	+++	+++
R227A	++(+)	++	++(+)
L223A/D225A/R227A	+++	++	+++
L254A/S256A/I258A	++	++(+)	++(+)
L254A/S256A/I258A/D284A	+	++(+)	++(+)

(+) 0–10%, + 10–30%, ++ 30–50%, +++ 50–70%, +++(+) 70–90%, ++++ 90–120%, ++++(+)120–200, +++++ 200–300%, +++++(+) 300–400%, ++++++ 400–500%, ++++++(+) 500–600%, ++++++ > 600%

**Tab. 8.4:** Zusammenfassung der Ergebnisse der zellulären Bindungsassays von cCPE-Varianten mit Cld3 und Cld4 sowie mit Konstrukten mit substituierten Aminosäuren an Position P+1

cCPE-Konstrukt	Cld3	Cld3 <sub>L150A</sub>	Cld3 <sub>L150F</sub>	Cld4	Cld4 <sub>L151F</sub>
cCPEwt vs Cld3wt	+++	+	+++	+++	++(+)
cCPEwt	+++	+++	+++	+++	+++
L223A/D225A/R227A	++(+)		++(+)	+	+(+)
L254A	++		++(+)	++(+)	
L254A/S256A/I258A	+(+)		++(+)	++(+)	
D284A	++(+)			+++	++(+)
Y306A	+	(+)	+++	+	++(+)

(+) 0–10%, + 10–30%, ++ 30–50%, +++ 50–70%, +++(+) 70–90%, ++++ 90–120%, ++++(+)120–200, +++++ 200–300%, +++++(+) 300–400%, ++++++ 400–500%, ++++++(+) 500–600%, ++++++ > 600%

**Tab. 8.5:** Zusammenfassung der Ergebnisse der zellulären Bindungsassays von cCPE-Varianten mit Cld3 und Cld3-Varianten mit geänderter Ladung in der EZS2

cCPE-Konstrukt	Cld3	Cld3N148D	Cld3E153V	Cld3K156A	Cld3R157Y
cCPEwt vs Cld3wt	+++	+	++(+)	+++	++(+)
cCPEwt	+++		+++	+++	+++
D284A	++(+)		++(+)	+++	+++
Y306A	+		+	+	+
L254A/S256A/I258A	++		++	++(+)	++

(+) 0–10%, + 10–30%, ++ 30–50%, +++ 50–70%, +++(+) 70–90%, ++++ 90–120%, ++++(+)120–200, +++++ 200–300%, +++++(+) 300–400%, ++++++ 400–500%, ++++++(+) 500–600%, ++++++ > 600%

**Tab. 8.6:** Zusammenfassung der Ergebnisse der zellulären Bindungsassays von cCPE-Varianten mit Cld1, Cld5 und den Cld3 imitierenden Mutanten von Cld1 und Cld5

cCPE-Konstrukt	Wildtyp		Cld-Mutanten					
	Cld1	Cld5	Cld1 <sub>D150N</sub>	Cld1 <sub>T153V</sub>	Cld1 <sub>D150N/T153V</sub>	Cld5 <sub>D149N</sub>	Cld5 <sub>T151L</sub>	Cld5 <sub>D149N/T151L</sub>
cCPEwt vs Cld3wt	+	-(+)	+++	+++(+)	++	-(+)	(+)	++
cCPEwt	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
L238F	+	++						
I258K	+(+)	++(+)						
V259Y	+(+)	++(+)						
A302M	+(+)	++						
A302Y	+	+(+)						
Y306W	++(+)	++(+)						
Y310H	++	++(+)						
Y310K	+(+)	++						
S313M		++(+)						
S305P	+++	+++	+++(+)	+++	+++(+)	+++	+++	+++
S307R	+++(+)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S305P/S307R	+++(+)	+++	+++(+)	+++	+++(+)	+++	+++	+++
S313H	++++	+++++	+++	+++	+++(+)	++++(+)	+++++	+++(+)
S305P/S307R/S313H	++++	++++(+)	+++	+++	++++	++++(+)	++++(+)	+++(+)
Y306W/S313H	+++(+)	++++(+)				++++(+)	++++	++(+)
D225A/I258K	+(+)	+++						
A302Y/Y306S	++	++						
V259F/Y306W		+(+)						
A302Y/S313H	+++	++++						
A302Y/Y306S/S313H	(+)	+(+)						
L238F/S313H	++++	++++						
V259Y/S313H	+	+(+)						
V259F/S313H		+(+)						
V259I/S313H		++++(+)						
V259L/S313H		++++(+)						
L223Q/Y306W/S313H		+(+)						
S256C/Y306W/S313H		+						
V259A/Y306W/S313H		++(+)						
V259F/Y306W/S313H		++						
V259L/Y306W/S313H		++++						
V259M/Y306W/S313H		++++(+)						
D284L/Y306W/S313H		+(+)						
A302Y/Y306W/S313H		++						
TK LDR		++						
TK LSID		++(+)						
Y306A/L315A	+	+	(+)	(+)	(+)	+	+	(+)

(+) 0–10%, + 10–30%, +(+) 30–50%, ++ 50–70%, ++(+)  
70–90%, +++ 90–120%, +++(+)  
120–200, ++++ 200–300%, ++++(+) 300–400%, +++++ 400–500%, +++++(+)  
500–600%, ++++++ > 600%

**Tab. 8.7:** Zusammenfassung der Ergebnisse der zellulären Bindungsassays von cCPE-Varianten mit Cld5 und Cld5<sub>Q145R</sub>

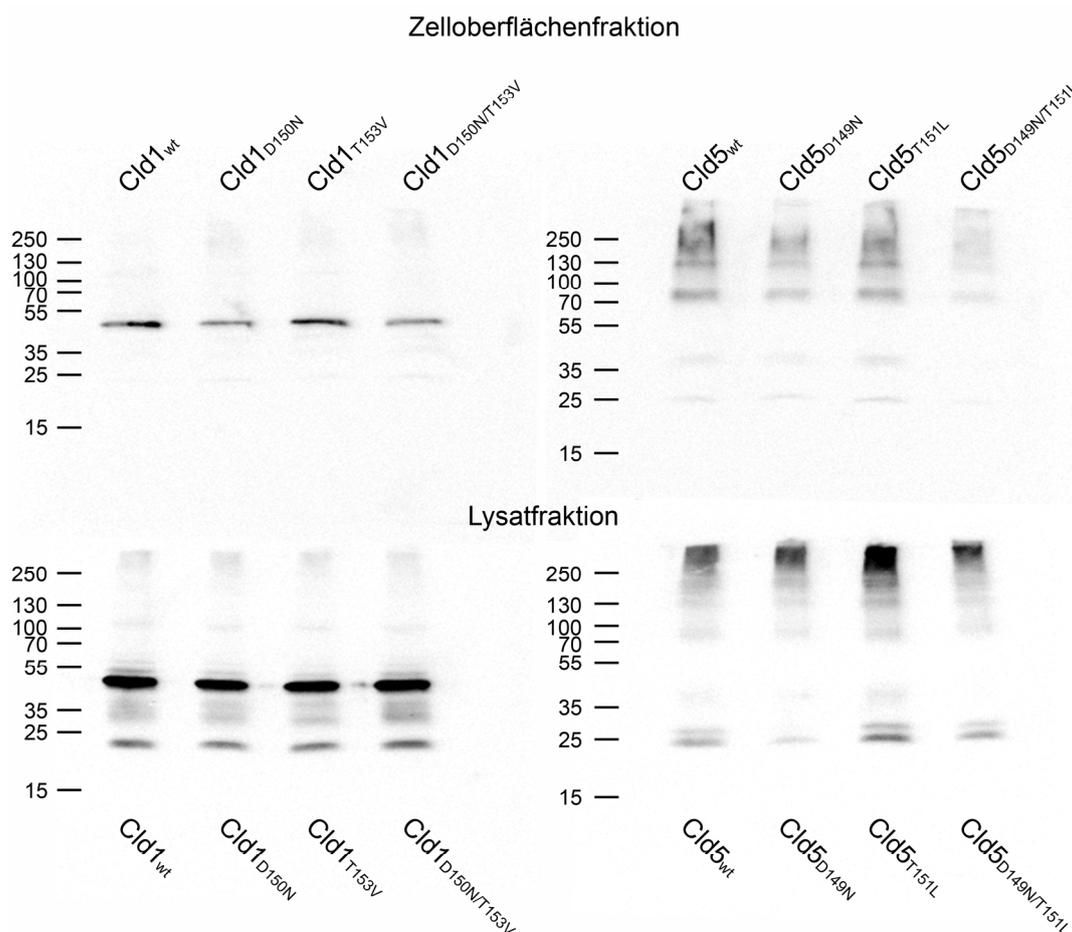
cCPE-Konstrukt	Cld5 <sub>wt</sub>	Cld5 <sub>Q145R</sub>
cCPE <sub>wt</sub> vs Cld5 <sub>wt</sub>	+++	+++
cCPE <sub>wt</sub>	+++	+++
S307R	++(+)	++(+)
S313H	++++	++++(+)
S305P/S307R/S313H	++++(+)	++++
Y306A/L315A	+	+

**Tab. 8.8:** Zusammenfassung der Ergebnisse der zellulären Bindungsassays von cCPE-Varianten mit cEND-Zellen

	cCPE <sub>wt</sub>	cCPE <sub>S313H</sub>	cCPE <sub>Y306W/S313H</sub>	cCPE <sub>S305P/S307R/S313H</sub>	cCPE <sub>Y306A/L315A</sub>
cEND-Zellen	+++	++++(+)	++++(+)	++++	++

(+) 0–10%, + 10–30%, ++ 30–50%, +++ 50–70%, +++(+) 70–90%, ++++ 90–120%, ++++(+) 120–200%, +++++ 200–300%, +++++(+) 300–400%, ++++++ 400–500%, ++++++(+) 500–600%, +++++++ > 600%

## 8.2 Zelloberflächenbiotinylierung



**Abb. 8.1: Repräsentative Immunoblots zur Zelloberflächenbiotinylierung.** Die Zelloberflächenbiotinylierung wurde wie unter 2.4.10 beschrieben durchgeführt. Obere Reihe: biotinylierte Claudine der Zelloberflächenfraktion. Untere Reihe: Cld-Expressionsniveau in den Zelllysaten. Als interner Standard ist das jeweilige Cld<sub>wt</sub>-YFP gezeigt.

### 8.3 Alignment der Sequenz des Helix-Caps aus 1W5C mit Cld3

**Tab. 8.9:** Alignment zwischen PDB ID: 1W5C (Biesiadka *et al.*, 2004) und Cld3. Rot umrandet ist der im Modell der EZS2 von Cld3 verwendete Abschnitt von 1W5C.

```
>lc1|60760 1W5C:I|PDBID|CHAIN|SEQUENCE
Length=473
```

Identities = 6/13 (46%), Positives = 9/13 (69%), Gaps = 0/13 (0%)

```
mCld3 145 DFYNPLVPEAOKRE 158
      +FY P PEA + +
1W5C 300 EFGPTGPEASQAQ 313
```

### 8.4 Sekundärstruktur- und Topologievorhersage

**Tab. 8.10:** Vorhergesagte Sekundärstrukturelemente von Cld3

Sekundärstruktur	Anzahl der Vorhersagen	Mittelwert ± Standardabweichung*			Konsensus		
		N	C	Länge	N	C	Länge
Helix	5	2 ± 1	25 ± 1	23 ± 2	3	24	21
Strand <sup>‡</sup>	2	30	34	4	31	33	2
Helix <sup>‡</sup>	3	30 ± 1	32 ± 1	3 ± 2	30	32	2
Helix	5	41 ± 2	51 ± 4	10 ± 6	43	48	5
Helix	3	51 ± 0	58 ± 2	7 ± 2	51	56	5
Strand	3	61 ± 1	65 ± 0	4 ± 1	62	65	3
Helix	5	75 ± 1	101 ± 2	27 ± 3	76	100	24
Strand	3	105 ± 0	107 ± 0	2 ± 0	105	107	2
Helix	5	114 ± 3	146 ± 0	32 ± 3	118	146	36
Helix	5	160 ± 4	182 ± 2	22 ± 6	163	179	16
Strand	1	180	183	3	180	183	3

\* nur wenn Anzahl der Vorhersagen ≥ 3

‡ widersprüchliche Vorhersage

**Tab. 8.11:** Vorhergesagte Sekundärstrukturelemente von Cld5

Sekundärstruktur	Anzahl der Vorhersagen	Mittelwert ± Standardabweichung*			Konsensus		
		N	C	Länge	N	C	Länge
Helix	5	2 ± 1	27 ± 3	25 ± 4	3	24	21
Strand	2	30	35	5	30	34	4
Helix	5	41 ± 1	50 ± 6	9 ± 7	43	45	2
Helix	3	50 ± 0	54 ± 1	4 ± 1	50	54	4
Strand	3	59 ± 1	64 ± 0	5 ± 1	60	64	4
Helix	1	69	72	3	69	72	3
Helix	5	74 ± 1	101 ± 3	27 ± 4	75	99	24
Strand	3	103 ± 0	107 ± 0	4 ± 0	103	107	4
Strand	1	116	119	3	116	119	3
Helix	5	114 ± 4	146 ± 1	33 ± 5	120	145	25
Helix	5	160 ± 3	181 ± 2	21 ± 5	162	179	17
Strand	1	182	184	2	182	184	2

\* Nur wenn Anzahl der Vorhersagen ≥ 3

**Tab. 8.12:** Ergebnisse der Topologievorhersagen für Cld3

Vorhersage-Server	TMH1		TMH2		TMH3		TMH4	
	C	N	C	N	C	N	C	N
Sosui	13	35	79	101	116	138	162	182
TMHMM	7	29	78	100	121	143	163	185
TMPred*	11	29	81	99	118	137	166	182
TMPred*	12	29	81	99	118	137	166	182
TopPred	9	29	81	101	116	136	165	185
PredictProtein	11	28	81	98	120	138	163	180
DAS**	11	28	80	101	117	136	167	180
DAS***	12	26	81	99	118	134	174	179
Memsat-SVM	6	28	78	103	117	141	161	182
Mittelwert ± Standardabweichung	10 ± 2	29 ± 2	80 ± 1	100 ± 2	118 ± 2	138 ± 2	164 ± 2	182 ± 2
Konsensusregion	13	28	81	98	121	137	167	180

\* TMPred gibt 2 unterschiedliche Modelle der Transmembran-Topologie an

\*\*lockerer (1,7) und \*\*\* strikter (2,2; nicht für Berechnung von Mittelwert und Konsensus herangezogen) Schwellenwert des "DAS profile scores" für Wertung als TMH

**Tab. 8.13:** Ergebnisse der Topologievorhersagen für Cld5

Vorhersage-Server	TMH1		TMH2		TMH3		TMH4	
	C	N	C	N	C	N	C	N
Sosui	5	27	81	103	124	146	164	186
TMHMM	9	31	79	101	122	144	164	186
TMPred*	8	27	82	102	117	139	165	187
TMPred*	8	27	82	100	123	144	160	181
TopPred	8	28	82	102	122	142	169	189
PredictProtein	12	29	82	99	121	139	164	181
DAS**	7	28	83	100	122	141	165	184
DAS***	8	27	84	99	123	139	172	182
Memsat-SVM	7	29	79	103	119	144	162	183
Mittelwert ± Standardabweichung	8 ± 2	28 ± 1	81 ± 1	101 ± 1	121 ± 2	142 ± 3	164 ± 3	185 ± 3
Konsensusregion	12	27	83	100	124	139	169	181

\* TMPred gibt 2 unterschiedliche Modelle der Transmembran-Topologie an

\*\*lockerer (1,7) und \*\*\* strikter (2,2; nicht für Berechnung von Mittelwert und Konsensus herangezogen) Schwellenwert des "DAS profile scores" für Wertung als TMH

## 8.5 Experimentelle Daten zum Modeling von Claudin-5

**Tab. 8.14:** Zusammenfassung der Effekte von Aminosäuresubstitutionen in Cld3/Cld5-Konstrukten nach Rossa *et al.*, 2014.

*trans*-Interaktion: LSM-Analyse der Kontaktenreicherung; Plasmamembran: LSM-Analyse der Kolo-kalisation mit Plasmamembranmarkern; *cis*-Dimer: Dimerisierung wie in der Blue-Native-PAGE detek-tiert; TJ-Stränge: Detektion von TJ-Strängen in der freeze fracture EM; = nicht verändert; --,-- un-ter-schiedliche Stärke der Abnahme; (+),+,++,+++ unterschiedliche Stärke der Zunahme; n.b. nicht be-stimmbar

Substitution	Segment	Konstrukt	<i>trans</i> -Interaktion	Plasma-membran	<i>cis</i> -Dimer	TJ-Stränge
		<b>Cld3</b>	<b>ja</b>	<b>ja</b>	<b>nein</b>	<b>ja</b>
108QDET/APGP111	IZS	Cldn3	(+)	=	=	
A127C	TMH3	Cldn3	=	=	=	
S136C	TMH3	Cldn3	=	=	=	
S138F	TMH3	Cldn3	+	=	=	
T141I	EZS2/TMH3	Cldn3	+	=	=	
		<b>Cldn5</b>	<b>ja</b>	<b>ja</b>	<b>ja</b>	<b>ja</b>
C14A	TMH1	Cldn5	=	=	=	
109APGP/QDET112	IZS	Cldn5	=	=	=	
109APGP/QDET+ C128S	IZS+TMH3	Cldn5	=	=	=	
A132T	TMH3	Cldn5	=	=	=	
C128S	TMH3	Cldn5	(+)	+	=	=
C137S	TMH3	Cldn5	-	-	=	
F139S	TMH3	Cldn5	-	-	=	(=)
I142T	EZS2/TMH3	Cldn5	-	++	-	(=)
V143I	EZS2/TMH3	Cldn5	=	=	=	
V144I	EZS2/TMH3	Cldn5	=	=	=	
D149N	EZS2	Cldn5	=	=		=
T151L	EZS2	Cldn5	=	=		
D149N/T151L	EZS2	Cldn5	-	-	=	
V154E/S155A	EZS2	Cldn5	=	=		
D149N/T151L+ V154E/S155A	EZS2	Cldn5	-	-		
		<b>ChA</b>	<b>nein</b>	<b>ja</b>	<b>nein</b>	<b>nein</b>
T141I/I142V/I143V	EZS2/TMH3	ChA	=	=	=	
T141I	EZS2/TMH3	ChA	=	=	=	
S138F/T141I	TMH3	ChA	+	=	=	
S136C/S138F	TMH3	ChA	+++	=	=	++
S136C	TMH3	ChA	=	=	=	
S138F	TMH3	ChA	+++	=	=	

Substitution	Segment	Konstrukt	<i>trans</i> - Interaktion	Plasma- membran	<i>cis</i> - Dimer	TJ- Stränge
S136C+ T141I/I142V/I143V	EZS2/TMH3	ChA	=	=	=	
S136C/S138F+ T141I/I142V/I143V	EZS2/TMH3	ChA	+	=	=	
		<b>ChB</b>	<b>nein</b>	<b>nein</b>	<b>nein</b>	<b>nein</b>
C127S	TMH3	ChB	+++	++	+	++
C127S/I141T	TMH3	ChB	+++	++	+(+)	
C136S	TMH3	ChB	=	=	=	
C127S /C136S	TMH3	ChB	+	+	+	
		<b>ChF</b>	<b>nein</b>	<b>ja</b>	<b>nein</b>	<b>nein</b>
T141I/I142V/I143V	EZS2/TMH3	ChF	+	=	=	
T141I	EZS2/TMH3	ChF	+	=	=	
D148N/T150L	EZS2	ChF	=	=	=	
V153E/S154A	EZS2	ChF	=	=	=	
Y157R/L159M	EZS2	ChF	+	=	=	
Y157R	EZS2	ChF	+	=	=	
L159M	EZS2	ChF	=	=	=	
T141I/I142V/I143V+ Y157R/L159M	EZS2/TMH3	ChF	++	=	=	
T141I/Y157R	EZS2/TMH3	ChF	++	=	=	
S136C/S138F	TMH3	ChF	+++	=	=	++
S136C	TMH3	ChF	=	=	=	
S138F	TMH3	ChF	+++	=	=	++
S136C/S138F+ T141I/I142V/I143V	EZS2/TMH3	ChF	+++	=	=	++
		ChE	<b>nein</b>	<b>nein</b>	<b>n.b.</b>	

## 8.6 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Å	Ångström = $1 \times 10^{-10}$ Meter
Ab	Antikörper ( <i>Antibodies</i> )
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BBB	Blut-Hirn-Schranke ( <i>blood-brain barrier</i> )
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (Bicinchoninsäure)
BLU	Boehringer Light Units
BSA	Rinder Serumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CPE	<i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin
cCPE	C-terminale Domäne von <i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin
CH-1	CPE-Hexamer 1
CH-2	CPE-Hexamer 2
Ch	Chimäre
Cld	Claudin
Cm	Chloramphenicol
CPE	<i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin
CT	Computertomographie
CV	Säulenvolumen ( <i>column volume</i> )
ddH <sub>2</sub> O	doppelt deionisiertes Wasser
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EC(s)	evolutionäre Kontakt(e) ( <i>evolutionary contacts</i> )
EGFP	verbessertes grün fluoreszierendes Protein ( <i>enhanced green fluorescent protein</i> )
EtOH	Ethanol
EYFP	verbessertes gelb fluoreszierendes Protein ( <i>enhanced yellow fluorescent protein</i> )
EZS	extrazelluläre Schleife(n)
g	Gramm
GF	Gelfiltration, Größenausschluss-Chromatographie
GPCRs	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ( <i>G-protein coupled receptors</i> )
h	Stunde(n)
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEK293-Zellen	<i>Human Embryonic Kidney 293 cells</i>
HTH	Helix-Turn-Helix
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JAM	<i>Junctional Adhesion Molecules</i>
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
l	Liter

---

μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
m	milli (10 <sup>-3</sup> )
M	molar (Mol/Liter)
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
MRT	Magnetresonanztomographie
n	nano (10 <sup>-9</sup> )
nCPE	N-terminale Domäne von <i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin
OD	optische Dichte
p	piko (10 <sup>-12</sup> )
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol
pH	pontus hydrogenii
pI	isoelektrischer Punkt
PLL	poly-L-Lysin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RT	Raumtemperatur (~20 °C)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
sec	Sekunde(n)
TCA	Trichloressigsäure
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	Tetramethyldiamin
TM	Transmembran
TMH	Transmembranhelix
TJ(s)	<i>Tight Junction(s)</i>
upm	Umdrehungen pro Minute
UZ	Ultrazentrifuge
UV	Ultraviolett
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )
ZO	<i>Zonula Occludens</i>

## 8.7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Kristallstruktur eines CPE-Monomers (PDB ID: 3AM2, Kitadokoro <i>et al.</i> , 2011), dargestellt als vereinfachter Cartoon mit Oberfläche (weiß).	15
Abb. 1.2:	Topologie von cCPE und Vergleich mit den Strukturen von CPE.	17
Abb. 1.3:	Schematische Skizze der Claudin-Topologie.	19
Abb. 1.4:	Sequenzalignment der EZS2 von humanem und murinem Cld1, Cld3–Cld9 mit schematischer Darstellung der EZS2.	24
Abb. 1.5:	Lage der putativen Claudin-Bindungstasche in der Struktur von cCPE.	26
Abb. 3.1:	Abhängigkeit des gemessenen Signals (Anregungswellenlänge 545 nm) von der eingesetzten Antikörperverdünnung.	57
Abb. 3.2:	Abhängigkeit des gemessenen Signals von der eingesetzten cCPE-Konzentration im zellulären Bindungsassay.	58
Abb. 3.3:	Kristallstruktur von cCPE (2QUO) mit putativer Claudin-Bindungstasche.	59
Abb. 3.4:	Die Bindung von cCPE an Cld3 und Cld4 wird von Aminosäuresubstitutionen in cCPE unterschiedlich beeinflusst.	61
Abb. 3.5:	Sequenzalignment der EZS2 von humanem und murinem Cld3 und Cld4 mit schematischer Darstellung der EZS2.	63
Abb. 3.6:	Die Cld3-ähnliche Mutante Cld4 <sub>A153P/S154E/G155A</sub> zeigt eine stärkere Bindung von GST-cCPE <sub>R227A</sub> und GST-cCPE <sub>L223A/D225A/R227A</sub> als Cld4 <sub>wt</sub> .	64
Abb. 3.7:	Homologiemodelle der EZS2 von (A) Cld3 und (B) Cld4. EZS2 gezeigt als Cartoon mit detaillierter Darstellung der Aminosäuren der Turn-Region (Kugel-Stab-Darstellung).	65
Abb. 3.8:	Kristallstruktur von cCPE (2QUO) mit Claudin-Bindungstasche.	66
Abb. 3.9:	Schematische Darstellung der Claudin-Bindungstasche von cCPE (schwarz) mit den unterschiedlichen Orientierungsmöglichkeiten der EZS2 von Cld3 oder Cld 4 (grau).	67
Abb. 3.10:	Bindung von cCPE an Cld3 <sub>L150F<sup>(P+1)</sup></sub> und Cld4 <sub>L151F<sup>(P+1)</sup></sub> .	68
Abb. 3.11:	Detailliertes Interaktionsmodell der EZS2 von Cld3 (A, orange, Cartoon) und Cld4 (B, grün, Cartoon).	69
Abb. 3.12:	Überlagertes Interaktionsmodell der EZS2 von Cld3 (orange) und Cld4 (grün) mit cCPE (als Oberfläche, weiß).	70
Abb. 3.13:	Bindung von cCPE an Cld-Konstrukte mit Ladungsänderung.	71
Abb. 3.14:	Sequenzalignment der EZS2 von humanem und murinem Cld1, Cld3–Cld5 mit schematischer Darstellung der EZS2 und deutlichen Sequenzunterschieden in der Turn-Region (rote Kästen).	72
Abb. 3.15:	Bindung von cCPE an Cld3 nachahmende Mutanten von Cld1.	73
Abb. 3.16:	Bindung von cCPE an Cld3 nachahmende Mutanten von Cld5.	74
Abb. 3.17:	Quantifizierung der anreicherungspositiven Zell-Zell-Kontakte für Cld1 <sub>wt</sub> (A) und Cld5 <sub>wt</sub> (B) und die Cld3 imitierenden Mutanten von Cld1 und Cld5.	75
Abb. 3.18:	Analyse der Plasmamembranlokalisation von Cld3 imitierenden Mutanten von Cld1 (A) und Cld5 (B).	76
Abb. 3.19:	„Virtuelle Interaktionsmodelle“ der EZS2 von Cld1 (A, rot, Cartoon) und Cld5 (B, grün, Cartoon).	77
Abb. 3.20:	Schematische Darstellung der Interaktion von cCPE mit Cld3, Cld1 und Cld5.	78

Abb. 3.21: Einfluss von eingeführten positiven Ladungen am Rand der Tripel-Tyr-Tasche auf die Bindung von cCPE an Cld1 und Cld5.	80
Abb. 3.22: Bindung von cCPE <sub>S305P/S307R/S313H</sub> an Cld1, Cld3, Cld4 und Cld5.	81
Abb. 3.23: Einfluss der einzelnen Substitutionen von cCPE <sub>S305P/S307R/S313H</sub> auf die Bindung an Cld1 und die Cld3 imitierenden Mutanten von Cld1.	82
Abb. 3.24: Einfluss der einzelnen Substitutionen von cCPE <sub>S305P/S307R/S313H</sub> auf die Bindung an Cld5 und die Cld3 imitierenden Mutanten von Cld5.	83
Abb. 3.25: Sequenzalignment der EZS2 von humanem und murinem Cld1, Cld3–Cld5 mit schematischer Darstellung der EZS2.	84
Abb. 3.26: Einfluss der Aminosäure an Position P-5 auf die Bindung von cCPE an Cld5.	85
Abb. 3.27: Einfluss von Substitutionen in der Tripel-Tyr-Tasche auf die Bindung von cCPE an Cld1 und Cld5.	86
Abb. 3.28: Einfluss von Substitutionen in der Tripel-Tyr-Tasche in Kombination mit der Substitution S313H auf die Bindung von cCPE an Cld1 und Cld5.	87
Abb. 3.29: Bindung von cCPE <sub>Y306W/S313H</sub> an Cld5 und die Cld3 imitierenden Mutanten von Cld5.	88
Abb. 3.30: Sequenzalignment der EZS2 von humanem und murinem Cld1, Cld3–Cld9 mit schematischer Darstellung der EZS2.	89
Abb. 3.31: Bindung von cCPE <sub>Y306W/S313H</sub> an Cld1 und Cld3–Cld9.	90
Abb. 3.32: Bindung von cCPE <sub>Y306W/S313H</sub> an endogen Cld5 exprimierende cEND-Zellen.	91
Abb. 3.33: cCPE <sub>Y306W/S313H</sub> bindet mit einer nanomolaren $K_d$ and Cld5.	91
Abb. 3.34: Die Bindung von cCPE an Cld6 wird unterschiedlich von Aminosäuresubstitutionen in cCPE beeinflusst.	93
Abb. 3.35: Die Bindung von cCPE an Cld7 wird unterschiedlich von Aminosäuresubstitutionen in cCPE beeinflusst.	94
Abb. 3.36: Die Bindung von cCPE an Cld8 wird unterschiedlich von Aminosäuresubstitutionen in cCPE beeinflusst.	94
Abb. 3.37: Die Bindung von cCPE an Cld9 wird unterschiedlich von Aminosäuresubstitutionen in cCPE beeinflusst.	95
Abb. 3.38: Sequenzalignment von murinem Cld3 und Cld5 mit Annotation der Sekundärstruktur (gelb: $\beta$ -Faltblätter, pink: Helices, orange: widersprüchliche Vorhersagen) und Topologievorhersage.	96
Abb. 3.39: Homologiemodell der die EZS2 verlängernden TMH3 und TMH4 von Cld5 (Modell S-1) als Cartoondarstellung.	98
Abb. 3.40: Homologiemodell der TMH3 und TMH4 von Cld3 als Cartoondarstellung.	99
Abb. 3.41: <i>I-TASSER</i> -Modelle der TMH3 und TMH4 einschließlich der EZS2 von Cld5 als Cartoondarstellung.	100
Abb. 3.42: Überlagerung des Modells I-2 (grün) mit dem auf “ <i>comparative-modeling</i> “ basierendem Modell S-1 (weiß).	100
Abb. 3.43: Ausschnitt aus dem Rosetta-Modell (Modell R-1), das die TMH3 und TMH4 einschließlich der EZS2 von Cld5 als Cartoondarstellung zeigt.	102
Abb. 3.44: Überlagerung des TMH3-EZS2-TMH4-Bereichs von Modell R-1 (beige) mit dem auf “ <i>comparative-modeling</i> “ basierendem Modell S-1 (weiß).	103
Abb. 3.45: Modell R-1 zeigt eine rhombische Anordnung der 4 Transmembranhelices.	103
Abb. 3.46: Bindung von Alexa647-cCPE an Cld4 exprimierende HEK293-Zellen.	105

Abb. 3.47: Bindung von Alexa Fluor <sup>®</sup> 647-gekoppeltem GST-cCPE <sub>K257A</sub> (rot) an Cld3-EYFP (grün) auf der Oberfläche von lebenden HEK293-Zellen.	105
Abb. 3.48: (A) Bindung von Alexa Fluor <sup>®</sup> 647-gekoppeltem GST-cCPE <sub>K257A</sub> (rot) an Cld5 <sub>D149N/T151L</sub> -EYFP (grün) auf der Oberfläche von lebenden HEK293-Zellen.	106
Abb. 3.49: Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf die Bindungsfähigkeit von cCPE an Cld4 exprimierende HEK293-Zellen.	107
Abb. 3.50: Einfluss von Cryptophan A auf die Bindung von cCPE <sub>wt</sub> an Cld4 exprimierende HEK293-Zellen.	108
Abb. 3.51: Bindung von Cryptophan-cCPE <sub>K257A</sub> an Cld4 <sub>wt</sub> exprimierende HEK293-Zellen im Vergleich zur Bindung von cCPE <sub>K257A</sub> .	109
Abb. 3.52: Cryptophan-cCPE zeigt hochmolekulare Banden im SDS-Gel und im Western Blot.	109
Abb. 4.1: Detailliertes Interaktionsmodell der EZS2 von Cld3 <sub>L150F</sub> (orange, Cartoon) mit cCPE <sub>wt</sub> im Querschnitt.	114
Abb. 4.2: Querschnitt der Claudin-Bindungstasche von (A) cCPE <sub>wt</sub> (PDB ID: 2QUO) und (B) cCPE <sub>Y306A</sub> (Modell basierend auf 2QUO) als Cartoon (weiß).	115
Abb. 4.3: Detailliertes Interaktionsmodell der EZS2 (orange, Cartoon) von (A) Cld3 <sub>wt</sub> bzw. (B) Cld3 <sub>L150F</sub> mit cCPE <sub>Y306A</sub> (Modell basierend auf 2QUO) im Querschnitt.	116
Abb. 4.4: Unterschiedliche Bindungsmodi von cCPE an Cld3 und Cld4 werden durch Interaktionsdaten bestätigt.	120
Abb. 4.5: Interaktionsmodell der EZS2 von Cld1 (rot, Cartoon) mit cCPE <sub>S307R</sub> (Modell basierend auf 2QUO) im Querschnitt.	123
Abb. 4.6: Querschnitt der Claudin-Bindungstasche von (A) cCPE <sub>wt</sub> (PDB ID: 2QUO) und (B) cCPE <sub>S313H</sub> (Modell basierend auf 2QUO) als Cartoon (weiß).	126
Abb. 4.7: Einfluss der Aminosäure an Position P-1 auf die Struktur des Turns der EZS2.	127
Abb. 4.8: Mögliche Wasserstoffbrückenbindungen von N <sup>(P-1)</sup> oder D <sup>(P-1)</sup> in der EZS2 von Cld1, Cld3, Cld4 und Cld5.	128
Abb. 4.9: Querschnitt der Claudin-Bindungstasche von (A) cCPE <sub>wt</sub> (PDB ID: 2QUO) und (B) cCPE <sub>Y306W/S313H</sub> (Modell basierend auf 2QUO) sowie detaillierte Interaktionsmodelle mit der EZS2 von Cld5 (beige).	131
Abb. 4.10: W <sub>306</sub> in cCPE <sub>Y306W/S313H</sub> bildet im Gegensatz zu Y <sub>306</sub> in cCPE <sub>wt</sub> keine Wasserstoffbrückenbindung zu Y <sub>232</sub> aus.	132
Abb. 4.11: Mögliche Arrangements der Transmembranhelices in einem 4-Helixbündel.	142
Abb. 4.12: Lage der Aminosäuren C128, F139 und I142 in den möglichen 4-Helixbündeln.	142
Abb. 4.13: Kristallstruktur von CPE mit gebundenem modifiziertem Peptid der EZS2 von Cld2 (PDB ID: 3ZJ3).	145
Abb. 4.14: Das von cCPE gebundene modifizierte Cld2-Peptid zeigt eine den Modellen der EZS2 ähnliche Struktur.	146
Abb. 8.1: Repräsentative Immunoblots zur Zelloberflächenbiotinylierung.	173

Abb. 3.3, Abb. 3.4, Abb. 3.6, Abb. 3.7, Abb. 3.9, Abb. 3.10, Abb. 3.11, Abb. 3.12, Abb. 3.13, Abb. 4.1, Abb. 4.3 B und Abb. 4.4 wurden so oder ähnlich im Journal of Biological Chemistry veröffentlicht. Veshnyakova, A., Piontek, J., Protze, J., Waziri, N., Heise, I. & Krause, G. Mechanism of *Clostridium perfringens* Enterotoxin Interaction with Claudin-3/-4 Protein Suggests Structural Modifications of the Toxin to Target Specific Claudins. Journal of Biological Chemistry. 2012; 287 (3): 1698-1708 ©the American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

## 8.8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	Assoziationskonstanten von CPE für unterschiedliche Cld-Subtypen	23
Tab. 2.1:	PCR-Ansatz und Programme der ortsgerichteten Mutagenesen	40
Tab. 2.2:	PCR-Ansatz und Programm der restriktionsfreien Klonierung	41
Tab. 2.3:	Ansatz und Programm der linearen Amplifikationsreaktion für die RF-Klonierung	41
Tab. 2.4:	Zusammensetzung der Transfektionsansätze (jeweils 1x)	47
Tab. 2.5:	Extinktions- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluorophore	49
Tab. 3.1:	Aufstellung der GST-cCPE-Konstrukte für Bindungsstudien mit Cld3 und Cld4	60
Tab. 3.2:	Aufstellung der GST-cCPE-Konstrukte für Bindungsstudien mit Cld1 und Cld5	79
Tab. 3.3:	Heptaden-Motive in den Transmembranhelices von Cld3 und Cld5	97
Tab. 3.4:	Evolutionäre Kontakte im Bereich der TM-Region von Cld5	101
Tab. 4.1:	Sequenzvergleich zwischen Cld2 und dem modifizierten Cld2-Peptid sowie Cld3	145
Tab. 8.1:	Aufstellung der zu Beginn der Arbeit bekannten Daten zur cCPE-Claudin-Interaktion nach (Veshnyakova <i>et al.</i> , 2010).	168
Tab. 8.2:	Zusammenfassung der Ergebnisse der zellulären Bindungsassays von cCPE-Varianten mit Cld1, Cld3–Cld9	170
Tab. 8.3:	Zusammenfassung der Ergebnisse der zellulären Bindungsassays von cCPE-Varianten mit Cld3, Cld4 und der Cld3-ähnlichen Mutante von Cld4 (Cld4 <sub>A152P/S153E/G154A</sub> )	171
Tab. 8.4:	Zusammenfassung der Ergebnisse der zellulären Bindungsassays von cCPE-Varianten mit Cld3 und Cld4 sowie mit Konstrukten mit substituierten Aminosäuren an Position P+1	171
Tab. 8.5:	Zusammenfassung der Ergebnisse der zellulären Bindungsassays von cCPE-Varianten mit Cld3 und Cld3-Varianten mit geänderter Ladung in der EZS2	171
Tab. 8.6:	Zusammenfassung der Ergebnisse der zellulären Bindungsassays von cCPE-Varianten mit Cld1, Cld5 und den Cld3 imitierenden Mutanten von Cld1 und Cld5	172
Tab. 8.7:	Zusammenfassung der Ergebnisse der zellulären Bindungsassays von cCPE-Varianten mit Cld5 und Cld5 <sub>Q145R</sub>	173
Tab. 8.8:	Zusammenfassung der Ergebnisse der zellulären Bindungsassays von cCPE-Varianten mit cEND-Zellen	173
Tab. 8.9:	Alignment zwischen PDB ID: 1W5C (Biesiadka <i>et al.</i> , 2004) und Cld3. Rot umrandet ist der im Modell der EZS2 von Cld3 verwendete Abschnitt von 1W5C.	174
Tab. 8.10:	Vorhergesagte Sekundärstrukturelemente von Cld3	174
Tab. 8.11:	Vorhergesagte Sekundärstrukturelemente von Cld5	174
Tab. 8.12:	Ergebnisse der Topologievorhersagen für Cld3	175
Tab. 8.13:	Ergebnisse der Topologievorhersagen für Cld5	175
Tab. 8.14:	Zusammenfassung der Effekte von Aminosäuresubstitutionen in Cld3/Cld5-Konstrukten nach Rossa <i>et al.</i> , 2014.	176