

3 Ergebnisse

3.1 Homodimerisierungseigenschaften der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-3 und -5 *in vitro*

3.1.1 Nachweis der Dimerisierung der Fusionsproteine der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-3 und -5 durch Größenausschlusschromatographie

Das in Kapitel 1.3.6 vorgestellte Modell zur Cld-Cld-Interaktion nimmt für die *trans*-Interaktion eine Selbstassoziation der 2.EZS von Claudinen an. Um diese Wechselwirkung zu untersuchen, wurden rekombinante MBP-Fusionsproteine der 2.EZS von Cld3 und Cld5 im bakteriellen Expressionssystem hergestellt. MBP-Cld5₁₄₁₋₁₆₀, MBP-Cld5₁₃₈₋₁₆₇, MBP-Cld3₁₄₁₋₁₆₀, MBP-Cld3₁₃₇₋₁₆₆ und MBP als Negativkontrolle wurden in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Der Reinheitsgrad der Präparationen wurde durch eine SDS-PAGE überprüft (siehe Anhang 8.2). Die fünf gereinigten Proteine (0,5 bis 3 mg/ml) wurden jeweils über eine mit PBS-Puffer (pH 7,4) equilibrierte Superdex 200 HR 10/30 Säule (Amersham Biosciences Europe GmbH) ihrer Größe nach chromatographisch aufgetrennt. Die Chromatogramme der

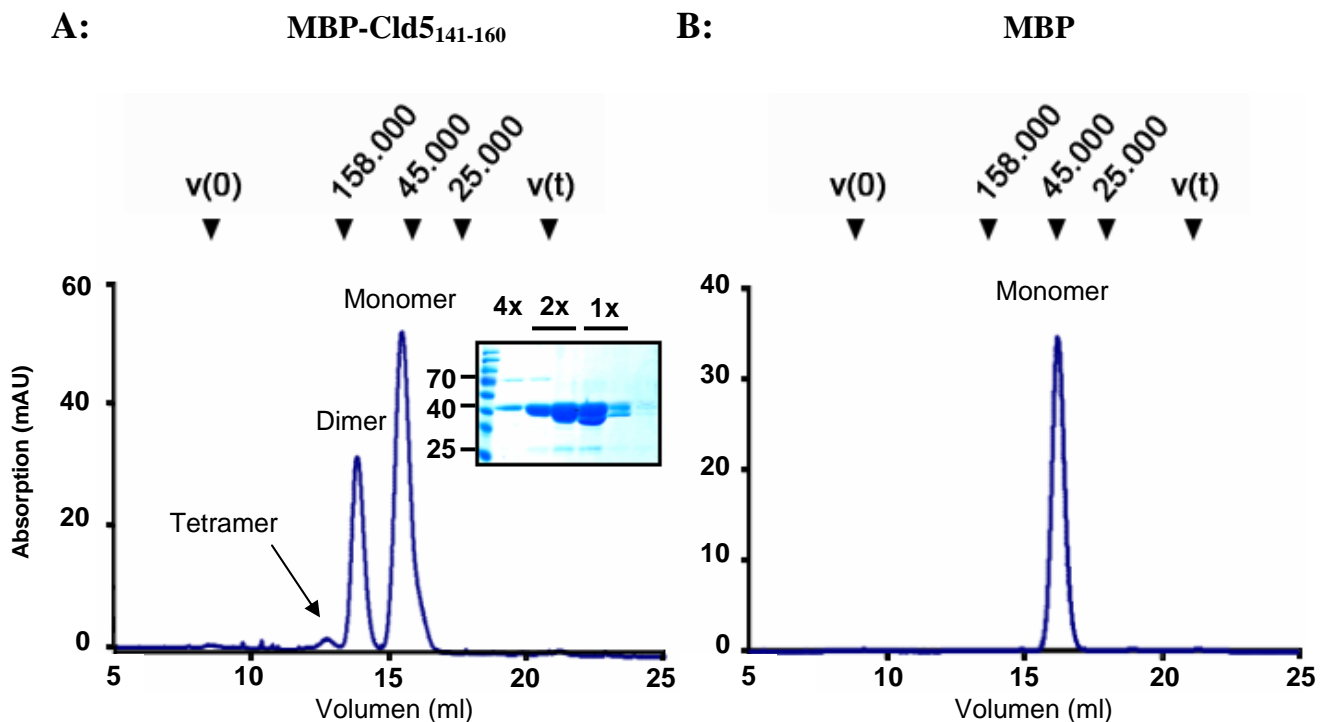


Abb. 3.1: Nachweis der Dimerisierung der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 durch Größenausschlusschromatographie.

Die Abbildungen A und B zeigen Chromatogramme. Die UV-Absorption bei 280 nm (in mAU) ist gegenüber dem Elutionsvolumen (ml) aufgetragen. Mit Pfeilspitzen über den Chromatogrammen sind V_t und V_e , sowie die Elutionsvolumina für ausgewählte Markerproteine (Chymotrypsinogen A: 25 kDa; Ovalbumin: 45 kDa Aldolase: 158 kDa) in Da angedeutet. Chromatogramm A zeigt Absorptions-Maxima von MBP-Cld5₁₄₁₋₁₆₀ bei Elutionsvolumina, die mit monomeren, dimeren bzw. tetrameren Molekulargewicht korrespondieren. Eingefügt ist eine Abbildung der fraktionierten und ausgefällten Proteine aus den Monomer- (1x), Dimer- (2x) und Tetramer (4x) Fraktionen, die durch SDS-PAGE analysiert wurden. MBP allein zeigt in Chromatogramm B ein A_{280} -Maxima dessen kalkulierte Molekulargewicht der eines Monomers entspricht. Bei der verwendeten Säule handelt es sich um eine Superdex 200 HR 10/30 Säule.

3. Ergebnisse

vier 2.EZS Konstrukte zeigten zwei bzw. drei lokale Absorptions-Maxima (A_{280} -Maxima) bei bestimmaren Elutionsvolumina (V_e), während für MBP nur ein A_{280} -Maximum festgestellt werden konnte (Abb. 3.1 B). Abb. 3.1 A zeigt exemplarisch ein solches Chromatogramm für MBP-Cld5₁₄₁₋₁₆₀, das drei A_{280} -Maxima bei 12,6; 13,8 und 15,4 ml aufweist. Die Proteine in den Elutionsfraktionen wurden mit Aceton gefällt und auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Hierbei zeigte sich in den Fraktionen beider dominanter A_{280} -Maxima zwei Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von ca. 45 kDa, welches dem MBP-Cld5₁₄₁₋₁₆₀-Monomer entspricht (Abb. 3.1 A, eingefügte Abbildung).

Die experimentell bestimmten Ausschlussvolumen V_0 und Totalvolumen V_t der Superdex 200-Säule wurden zur Errechnung der K_{av} -Werte verschiedener Größenmarker und Proteinproben aus den V_e verwendet (siehe 2.3.8). Anhand der K_{av} -Werte der A_{280} -Maxima der Proteinproben wurden mit Hilfe der K_{av} -Werte der Markerproteine die Molekulargewichte der A_{280} -Maxima der Proteinproben errechnet. Die experimentell bestimmten Molekulargewichte sind im Vergleich zu den theoretischen Molekulargewichten der MBP-Fusionsproteine in Tab. 3.1 zusammengefasst. Dabei wurden, mit Ausnahme für das tetramere A_{280} -Maxima, die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten pro Konstrukt errechnet. Tetramere A_{280} -Maxima lagen in vielen Experimenten unterhalb der Nachweisgrenze. Der Vergleich der errechneten Molekulargewichte mit den theoretischen Molekulargewichten ergab für die Konstrukte MBP-Cld5₁₄₁₋₁₆₀, MBP-Cld5₁₃₈₋₁₆₇, MBP-Cld3₁₄₁₋₁₆₀ und MBP-Cld3₁₃₇₋₁₆₆ näherungsweise monomere, dimere und für MBP-Cld5₁₄₁₋₁₆₀, MBP-Cld5₁₃₈₋₁₆₇ und MBP-Cld3₁₄₁₋₁₆₀ zusätzlich tetramere Komplexe. MBP hingegen lag ausschließlich als Monomer vor. Demnach lässt sich auf eine spezifische Selbstinteraktion der 2.EZS von Cld3 und Cld5 schließen.

Tab. 3.1: Durch Größenausschlusschromatographie bestimmte Mittelwerte der Elutionsvolumina, K_{av} -Werte und Molekulargewichte von MBP-Cld-Proteinen der zweiten extrazellulären Schleife

Protein	kDa	n	V_e in ml	K_{av}	Kalk. kDa	x-fach wt	
MBP-Cld5 ₁₄₁₋₁₆₀	45,5	23	12,9	0,35	215,3	4,73	Tetramer
		29	13,6	0,43	103,6	2,28	Dimer
		29	15,1	0,55	41,8	0,92	Monomer
MBP-Cld5 ₁₃₈₋₁₆₇	46,5	2	12,8	0,35	220,8	4,75	Tetramer
		4	13,9	0,44	115,2	2,48	Dimer
		4	15,6	0,57	43,1	0,93	Monomer
MBP-Cld3 ₁₄₀₋₁₆₁	45,6	2	13,1	0,37	190,4	4,18	Tetramer
		5	14,2	0,46	99,8	2,19	Dimer
		5	15,6	0,57	43,1	0,94	Monomer
MBP-Cld3 ₁₃₇₋₁₆₆	46,4	3	14,2	0,46	90,2	1,94	Dimer
		3	15,6	0,57	40,7	0,88	Monomer
MBP	42,9	13	15,8	0,59	37,8	0,87	Monomer

n: Anzahl der Experimente; V_e : Elutionsvolumina; wt: Wildtyp; kalk. M_w : kalkuliertes Molekulargewicht

3.1.2 Analyse von synthetischen Peptiden der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-3 und -5 durch Größenausschlusschromatographie

Die Homodimerisierung der MBP-Cld3 und MBP-Cld5 Fusionsproteine der 2.EZS sollte detaillierter anhand von Peptiden untersucht werden. Es wurden drei Peptide der 2.EZS (Aminosäuresequenz 141-160) von Cld5 synthetisiert und in Einzelexperimenten analysiert. Die Peptide und ihre Eigenschaften sind in Tab. 3.2 zusammengefasst. Das Peptid-Cld5₁₄₁₋₁₆₀ beinhaltet die Wildtypsequenz, das Peptid-Cld5_{F147A} enthielt die Aminosäuresubstitution F147A und das Peptid-Cld5_{Mix} hatte bei gleicher Aminosäurezusammensetzung wie das Peptid-Cld5₁₄₁₋₁₆₀, eine wahllose Abfolge der Aminosäuren. Von den Peptiden (1,0 mg/ml in PBS gelöst) wurden jeweils 100 µl auf eine mit PBS equilibrierte Superdex Peptide Tricorn 10/300 GL-Säule (Amersham Biosciences Europe GmbH) aufgetragen. Die Kalibrierung der Säule erfolgte mit Peptiden unterschiedlichen Molekulargewichtes. Für alle drei Peptide zeigten die Chromatogramme jeweils ein dominantes A₂₁₄-Maximum (Abb. 3.2, exemplarisch für Peptid-Cld5₁₄₁₋₁₆₀). Die K_{av}-Werte der A₂₁₄-Maxima der Proben und Markerpeptide wurden errechnet. Die Kalkulation der Molekulargewichte der A₂₁₄-Maxima (kalk. M_w, Tab. 3.2) anhand der Marker-Peptide ergab für alle drei Peptide der 2.EZS von Cld5 ein Molekulargewicht in der Größenordnung eines Monomers (x-fach Monomer, Tab. 3.2). Auf eine Selbstinteraktion der Peptide der 2.EZS von Cld5 kann daher nicht geschlossen werden.

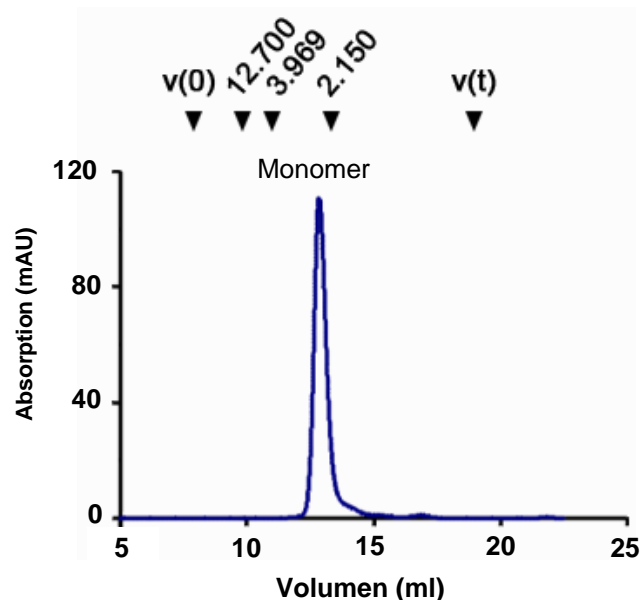


Abb. 3.2: Peptid-Monomer der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5.

Beispielchromatogramm der Superdex Peptide Tricorn 10/300 GL für das Cld5₁₄₁₋₁₆₀-Peptid. Die UV-Absorption bei 214 nm (in mAU) ist gegenüber dem Elutionsvolumen aufgetragen. Über dem Chromatogramm markieren Pfeilköpfe V_b , V_0 und die Elutionsvolumina ausgewählter Markerpeptide in Da. Für das Cld5₁₄₁₋₁₆₀-Peptid zeigt sich ein Chromatogramm mit einem A₂₁₄-Maximum, dessen kalkuliertes Molekulargewicht der des Peptidmonomers entspricht.

3. Ergebnisse

Tab. 3.2: Durch Größenausschlusschromatographie bestimmte Mittelwerte der Elutionsvolumina, K_{av} -Werte und Molekulargewichte verschiedener Peptide der zweiten extrazellulären Schleife

Peptid-bezeichnung	Sequenz	M_w in Da	V_e (ml)	K_{av}	kalk. M_w (Da)	x-fach Monomer
Peptid-Cld5 ₁₄₁₋₁₆₀	NIVVREFYDPTVPVVSQKYEL-NH ₂	2394,3	12,87	0,46	2445,09	1,02
Peptid-Cld5 _{F147A}	NIVVREAYDPTVPVVSQKYEL-NH ₂	2328,2	12,53	0,43	2691,25	1,16
Peptid-Cld5 _{Mix}	EVKVLDIYPQSPVFNTERY-NH ₂	2395,2	13,16	0,49	2259,46	0,94

M_w : Molekulargewicht in Dalton (Da); V_e : Elutionsvolumen; kalk. M_w : kalkuliertes Molekulargewicht

3.2 HEK-293-Zellen als Zellkultursystem für *Tight junction*-Untersuchungen

Für eine Analyse der homophilen Cld-Interaktionen im zellulären System wurde eine Zelllinie benötigt, die keine TJs bildet, jedoch nach Transfektion mit rekombinanten Cld-Konstrukten morphologische Charakteristika TJ-bildender Zellen annimmt. HEK-293-Zellen sind epithelialen Ursprungs, bilden keine TJs aus und sind bereits zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von exogen exprimierten Cld6 beschrieben worden (Turksen *et al.* 2001). Im Zusammenhang mit TJs ist diese Zelllinie über Cld6 hinaus nicht näher charakterisiert worden.

3.2.1 Immunzytochemische Charakterisierung von HEK-293-Zellen

Um die Frage zu klären, ob und welche TJ-Proteine HEK-293-Zellen exprimieren und in wie weit diese die Cld-Cld-Interaktion beeinflussen könnten, wurden HEK-293-Zellen durch Immunfluoreszenzfärbung gegen die TJ-Proteine Cld1, Cld2, Cld3, Cld4, Cld5, Occludin (Occ) und ZO-1 gefärbt und durch konfokale Mikroskopie analysiert. In nicht transfizierten HEK-293-Zellen konnte keine Expression von endogenen Cld1, Cld2, Cld3, Cld4 oder Cld5 (Abb. 3.3 A, C, E, G und H) nachgewiesen werden, da nur sehr schwache, diffuse Signale sichtbar waren. Nach transienter Transfektion von HEK-293-Zellen mit Cld1, Cld3 oder Cld5 reicherten sich die exprimierten Claudine in der Plasmamembran an Zell-Zell-Kontakten zweier Cld-exprimierender Zellen an (Abb. 3.3 B, D und F, Pfeile). Im Folgenden wird ein Zell-Zell-Kontakt zwischen zwei Cld-exprimierenden Zellen als Cld-Kontakt bezeichnet. Für endogenes Occ und ZO-1 ließen sich in HEK-293-Zellen schwache Signale detektieren (Abb. 3.3 I, J, K und L). Endogenes Occ kam sowohl intrazellulär als auch in der Plasmamembran vor, war jedoch nicht an Zell-Zell-Kontakten angereichert, sondern homogen in der Plasmamembran verteilt. Dies wurde an Plasmamembranen einzelner Zellen sichtbar, die keinen Kontakt zur Plasmamembran benachbarter Zellen aufwiesen (Abb. 3.3. I und J; Pfeilköpfe). ZO-1 zeigte hingegen zwischen manchen Zellen diskontinuierliche Kontaktanreicherung (Abb. 3.3 L, Pfeilköpfe). Die ZO-1-Signale erschienen eher granulär und weniger diffus als die Occ-Signale.

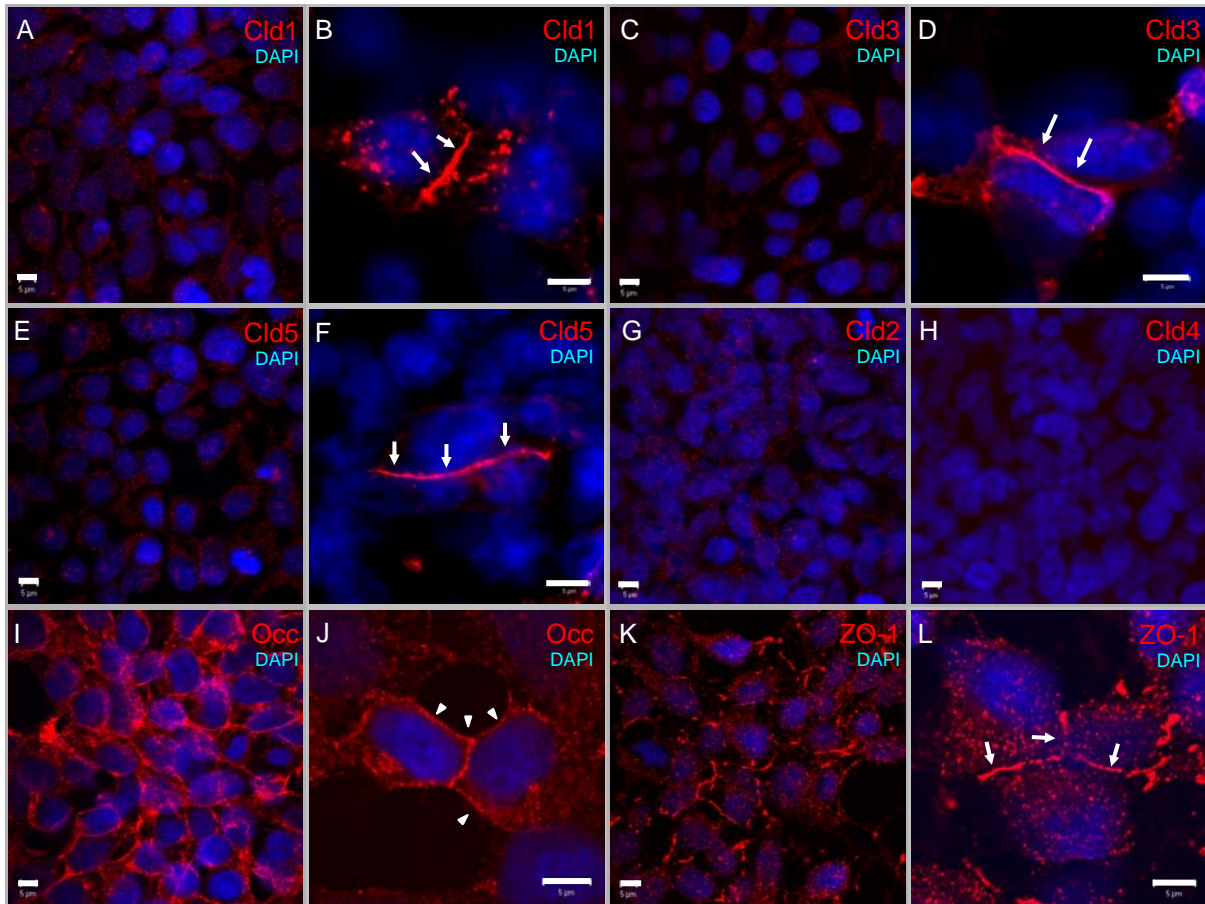


Abb. 3.3: Immunzytochemische Charakterisierung von HEK-293-Zellen.

Konfluente, nicht transfizierte HEK-293-Zellen und mit Cld1, Cld3 oder Cld5 transfizierte HEK-293-Zellen wurden fixiert und immunzytochemisch gegen Cld1 bis Cld5 sowie gegen Occ und ZO-1 gefärbt. Folgende Antikörper wurden verwendet: R α Cld1 (A, B); R α Cld2 (G); R α Cld3 (C, D); M α Cld4 (H), R α Cld5 (E, F), R α Occ (I, J) und M α ZO-1 (K, L). Die primären Antikörper wurden über Cy3-gekoppelte Antikörper (rot) detektiert. Zellkerne wurden durch DAPI angefärbt (blau). Cld-Signale waren in nicht transfizierten Zellen diffus und intrazellulär zu detektieren (A, C, E, G, H). In Zellen, die mit Cld1, Cld3 oder Cld5 transfiziert wurden, lokalisierte der überwiegende Teil der exprimierten Claudine an Cld-Kontakten (B, D, F). Die diffusen Cld-Signale der nicht transfizierten Zellen waren nur bei wesentlich höherer Sensitivität detektierbar. I, J: Bei höherer Sensitivität waren schwache, endogene Occ-Signale in der Plasmamembran und im Zytosol nachweisbar. Pfeilköpfe deuten auf Occ-Lokalisation in Plasmamembranen ohne Zellkontakt zu Nachbarnzellen. K, L: Endogenes ZO-1 zeigt Anreicherung an Zell-Zell-Kontakten (Pfeile). Balken entsprechen 5 μ m.

3.2.2 Expression von Claudin-3 und Claudin-5 in HEK-293-Zellen

Die Transfektion von Cld3_{wt}-CFP- oder Cld5_{wt}-YFP-Konstrukten in HEK-293-Zellen bewirkte eine starke Expression von Cld3_{wt}-CFP (Abb. 3.4 C2, C3) oder Cld5_{wt}-YFP (Abb. 3.4 A2, A3), die in Lebendzellfärbungen durch ihre Eigenfluoreszenz detektiert wurden. Die Plasmamembranen der HEK-293-Zellen wurden durch Trypanblau (rot) angefärbt (Abb. 3.4 A1, A3 und C1, C3). Beide Proteine lokalisierten in der Plasmamembran an Cld-Kontakten, nicht jedoch im Kontaktbereich einer Cld-exprimierenden und einer nicht exprimierenden Zelle. Cld5_{wt}-YFP zeigte an den Cld5-Kontakten weitgehend Kolokalisation mit der Plasmamembran. Die Intensität der Trypanblau-Fluoreszenz im Bereich der Cld5-Kontakte war von gleicher Intensität wie in den übrigen Plasmamembranarealen. In Cld3_{wt}-CFP

3. Ergebnisse

exprimierenden Zellen konnte Trypanblau hingegen nur schwach in den Cld3-Kontaktbereich eindringen. In einigen Cld3-Kontakten war eine Trypanblaufärbung der Plasmamembran kaum mehr nachweisbar (siehe auch Cld3_{N148D}-CFP; Abb. 3.12 D1-B3). Bei hoher Vergrößerung zeigten sich die Cld5-Signale in den Cld5-Kontakten als netzartige Strukturen (Abb. 3.4 B), deren Maschenweite ca. 0,5 µm betrug. Neben der Lokalisation der Claudine in Cld-Kontakten war eine intrazelluläre Lokalisation sichtbar, die besonders stark bei Cld3_{wt}-CFP zu beobachten war. In Kokulturen von Cld5_{wt}-FLAG und Cld5_{wt}-YFP-exprimierenden HEK-293-Zellen kolokalisierten beide Cld5-Konstrukte in Cld5-Kontakten (Abb. 3.4 D). Kofärbungen von exogenen Cld5-YFP mit endogen exprimierten Occ zeigten vereinzelt Kolokalisation von Occ und Cld5 in Cld5-Kontakten (Abb. 3.4 E1, E2). Occ war in diesen Fällen ebenfalls an Cld5-Kontakten angereichert. Eine Interaktion von Cld5-YFP mit

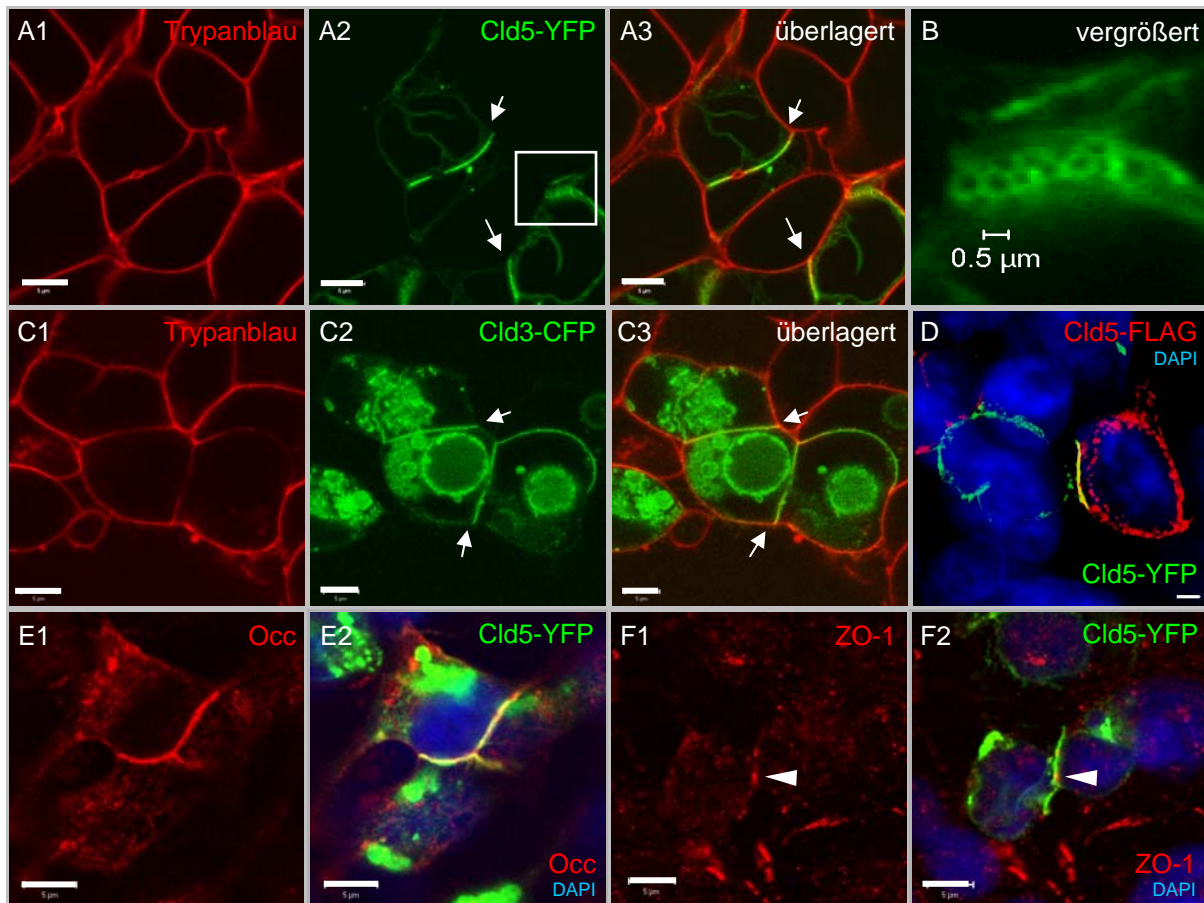


Abb. 3.4: Lokalisation von exprimierten Claudin-Konstrukten in HEK-293-Zellen.

Plasmamembranen in Lebendzellfärbungen von Cld5_{wt}-YFP (A1-A3, B) oder Cld3_{wt}-CFP (C1-C3) exprimierenden HEK-293-Zellen wurden durch Trypanblau (rot) angefärbt (A1, A3, C1, C3) und mit der Eigenfluoreszenz von Cld3_{wt}-CFP (C2, grün) oder Cld5_{wt}-YFP (A2, grün) überlagert dargestellt (A3, G3). Pfeile weisen auf eine Anreicherung an Cld-Kontakten. B: Etwa fünffach vergrößerter Ausschnitt eines Cld5-Kontaktes aus A1. D: Immunfluoreszenzfärbung von Kokulturen Cld5_{wt}-FLAG (rot) und Cld5_{wt}-YFP (grün) transfizierter HEK-293-Zellen. Cld5_{wt}-FLAG wurde durch RαFLAG und GαR-Cy3 markiert. Die Zellkerne wurden durch DAPI (blau) angefärbt. Kolokalisationen im Cld5-Kontaktbereich erscheinen gelb. E1, E2: Kofärbungen von endogenen Occ und transfizierten Cld5_{wt}-YFP, die miteinander in Cld5-Kontakten kolokalisieren (gelb). Occ wurde durch RαOcc und GαR-Cy3 detektiert. F1, F2: Kofärbungen von endogenen ZO-1 und transfizierten Cld5_{wt}-YFP in HEK-293-Zellen zeigten hingegen nur sehr vereinzelt partielle Kolokalisation an Cld5-Kontakten (Pfeilköpfe). ZO-1 wurde durch MαZO-1 und GαM-Cy3 detektiert. Balken entsprechen 5 µm.

endogenen Occ ist daher nicht auszuschließen. Endogenes ZO-1 zeigte nach Expression von Cld-5-YFP keine ausgeprägte Kollokalisierung mit Cld5 (Abb. 3.4 F1, F2).

Die Anreicherung von Cld3 oder Cld5 an Cld-Kontakte wird in dieser Arbeit als indirekter Nachweis der *trans*-Interaktionsfähigkeit der Claudine betrachtet.

3.2.3 *Tight junction*-Strangbildung in HEK-293-Zellen

Durch Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie konnten in nicht transfizierten HEK-293-Zellen keine TJ-ähnlichen Strukturen beobachtet werden. Gefrierbruchelektronen-mikroskopische Aufnahmen wurden in Kooperation mit Dr. Hartwig Wolburg (Universität Tübingen, Deutschland) durchgeführt. Nach transients Transfektion von Cld1 in HEK-293-Zellen bildeten sich ausgedehnte, mit der protoplasmatischen (P)-*face* assoziierte, Netzwerke kontinuierlicher Stränge (Abb. 3.5 B). Diese Stränge entsprachen in ihrer Kontinuität und P-*face*-Assoziation den TJ-Strängen *in situ*, wie der Vergleich mit TJ-Strängen in MDCK-II-Zellen zeigte (Abb. 3.5 A). TJ-Stränge in MDCK-II-Zellen waren jedoch von langgestreckter Ausdehnung, die Cld1-Stränge hingegen nicht. HEK-293-Zellen, die mit Cld5 transient oder stabil transfiziert wurden, bildeten ähnlich wie Cld1 ausgedehnte Netzwerke von Strängen. Diese Stränge wurden jedoch durch exoplasmatisch (E)-*face* assoziierte, intramembranöse Partikel gebildet und erschienen daher diskontinuierlich (Abb. 3.5 C, Abb. 3.17 A).

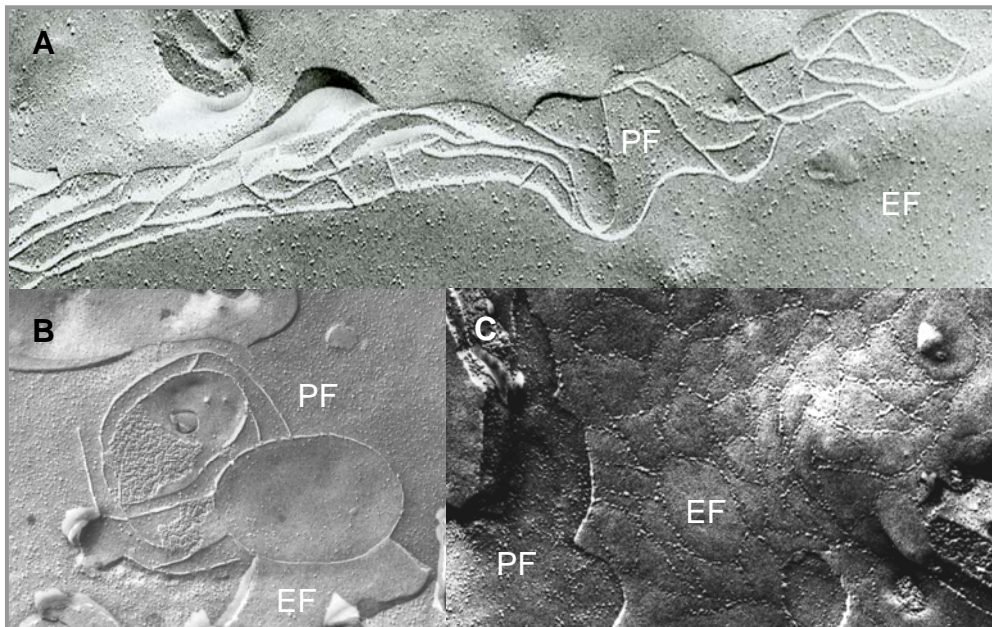


Abb. 3.5: Analyse von *Tight junction*-Strängen in der Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie.

MDCK-II-Zellen deren Plasmamembranen durch Gefrierbruchtechnik gespalten und kontrastiert wurden, zeigen kontinuierliche, P-*face* (PF) assoziierte TJ-Stränge (A). Ähnliche Stränge lassen sich für Cld1 transient transfizierte HEK-293-Zellen beobachten (B). Cld5 transient transfizierte HEK-293-Zellen zeigen hingegen diskontinuierliche, E-*face* assoziierte (EF) TJ-Stränge (C).

3.3 Aminosäuresubstitutionen in der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 blockieren die *trans*-Interaktion

3.3.1 Ortsspezifische Mutagenese der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5

Start- und Endaminosäure der intrazellulären, transmembranalen und extrazellulären Regionen von Cld5 sind experimentell ungeklärt. In der Swiss-Prot-Datenbank wird für die Cld5-Proteinsequenz aus *Mus musculus* unter der *primary accession number* O54942 für die 2.EZS die Sequenz R145 bis L160 vorhergesagt (<http://au.expasy.org/uniprot/O54942>). Auf Basis dieser Aminosäuresequenz wurden systematische Aminosäuresubstitutionen gegen Alanin im kompletten Sequenzbereich vorgenommen. Darüber hinaus wurden Aminosäuresubstitutionen an den Positionen R145, E146, D149, K157 und E159 eingeführt, bei denen geladene Aminosäuren gegen ähnliche, ungeladene Aminosäuren ersetzt wurden. Die Aminosäure Y148 wurde außerdem gegen Leucin ersetzt, um eine größere hydrophobe Seitenkette zu erzeugen. An Position Q156 wurde mit Glutamat eine zusätzliche geladene Aminosäure eingefügt. Die Tabelle 3.3 gibt eine Übersicht über die Wildtypsequenz und die erzeugten Aminosäuresubstitutionen an den entsprechenden Sequenzpositionen.

Tab. 3.3: Übersicht der Aminosäuresubstitutionen in der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5

145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
R	E	F	Y	D	P	T	V	P	V	S	Q	K	Y	E	L
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Q	N		L	N							E	M		Q	

Die roten Buchstaben geben die Aminosäuren der Wildtypsequenz der jeweiligen Aminosäureposition an. In den zwei Zeilen unter der Wildtypsequenz ist die Aminosäure des jeweiligen Aminosäureaustausches angegeben.

3.3.2 Analyse der subzellulären Verteilung der Claudin-5-Mutanten

Nach Transfektion von HEK-293-Zellen mit Cld5-YFP zeigte sich in Lebendzellfärbungen eine gemischte Population aus transfizierten (zwischen 50 % bis 80 %) und nicht transfizierten Zellen. Zwischen zwei Cld5_{wt}-YFP exprimierenden Zellen ließ sich eine Anreicherung von Cld5_{wt} in Cld5-Kontakten beobachten (Abb. 3.4 A1-A3). Die Zellen wiesen vor und nach Cld5-YFP-Expression keine Polarität auf. Daher war die Kontaktanreicherung nicht auf den apikalen Bereich der lateralen Plasmamembran beschränkt, wie es in Epithelien oder Endothelien der Fall ist. Nach der Analyse der Cld5-Mutanten aus Tabelle 3.3 durch Lebendzellfärbungen ließen sich die Mutanten anhand der subzellulären Lokalisation in drei Phänotypen einteilen. Eine Gruppe von Mutanten verhielt sich wie Cld5_{wt} und lokalisierte an Cld5-Kontakten. Diese Mutanten wurden als *Tight junction*-Typ (TJ-Typ) bezeichnet (Abb. 3.6, obere Reihe). Eine zweite Gruppe von

Mutanten zeigte keine Anreicherung an Cld5-Kontakten, jedoch eine starke intrazelluläre Akkumulation, was zur Klassifizierung dieser Mutanten als intrazellulärer Typ führte (Abb. 3.6, untere Reihe). Die Mutanten vom *disjunction*-Typ zeigten eine homogene Verteilung in der Plasmamembran, waren jedoch nicht an Cld5-Kontakten angereichert (Abb. 3.6, mittlere Reihe).

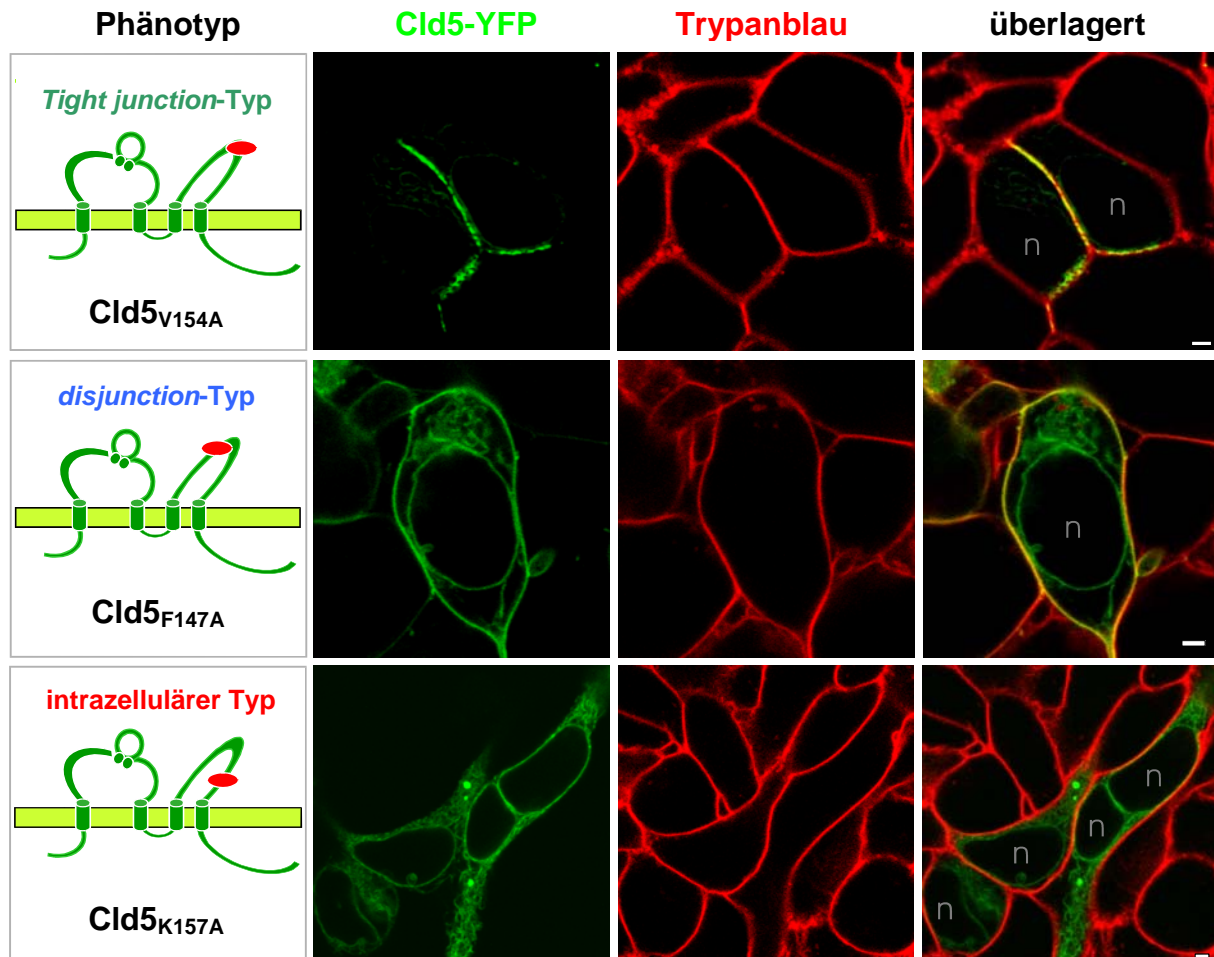


Abb. 3.6: Drei Phänotypen zellulärer Lokalisation von Claudin-5-Mutanten in HEK-293-Zellen.

HEK-293-Zellen wurden mit Cld5-YFP-Konstrukten transfiziert und für zwei bis drei Tage kultiviert. Anschließend wurden in Lebendzellfärbungen die Plasmamembranen durch Trypanblau (rot) visualisiert, Cld5 über die YFP-Fluoreszenz (grün) detektiert und durch konfokale Mikroskopie analysiert. Für die verschiedenen Aminosäuresubstitutionen (rot gefüllte Ellipse im topologischen Schema, linke Spalte) wurden in HEK-293-Zellen drei verschiedene Phänotypen beobachtet. Für jeden Phänotyp ist ein Beispiel gezeigt. *Tight junction*-Typ: Cld5_{V154A} ist an Cld5-Kontakten angereichert, wie auch für den Wildtyp beobachtet werden konnte. *Disjunction*-Typ: Cld5_{F147A} ist in der Plasmamembran lokalisiert, welches durch Kolokalisation mit der Trypanblau-Färbung deutlich wird. Dieser Phänotyp ist homogen über die Plasmamembran verteilt, aber nicht an Cld-Kontakten angereichert. Intrazellulärer Typ: Cld5_{K157A} akkumuliert intrazellulär. Balken entsprechen 2 μm .

Im Folgenden wurden die Phänotypen genauer analysiert. Die Farbcodierung der drei Phänotypen (TJ-Typ = grün, *disjunction*-Typ = blau, intrazellulärer Typ = rot) wird, wie in Abbildung 3.6 eingeführt, für alle folgenden Abbildungen beibehalten. Die Mutanten P150A und Y158A zeigten Merkmale mehrerer Phänotypen und wurden daher als intermediäre

Typen bezeichnet. Eine Subpopulation von Zellen der Mutante P150A lokalisierte intrazellulär. Eine kleinere Zellpopulation verhielt sich wie der TJ-Typ. Y158A zeigte Merkmale des intrazellulären Phänotyps und des *disjunction*-Typs. Eine sehr kleine Subpopulation war zur *trans*-Interaktion befähigt. Die Farbkodierung beider Mutanten ist daher in nachfolgenden Abbildungen gemischtfarbig dargestellt.

3.3.2.1 Quantifizierung der Kollokalisierung der Claudin-5-Mutanten mit der Plasmamembran in Lebendzellfärbungen

In Lebendzellfärbungen wurde der Grad der Kollokalisierung von Cld5_{wt}-YFP oder Cld5-YFP-Mutanten und der Plasmamembran mit Hilfe konfokaler Mikroskopie quantifiziert.

Um Intensitätsprofile der Fluoreszenzen zu generieren, wurden zweidimensionale konfokale Aufnahmen von transfizierten Zellen ausgewertet (Abb. 3.7 A, Zellbild). Im Intensitätsprofil wurde eine Kollokalisierung von Cld5-YFP (grüne Linie, Abb. 3.7 A) mit der Plasmamembran (rote Linie, Abb. 3.7 A) angenommen, wenn das Intensitätsniveau der Plasmamembranfärbung am Ort des Maximums der YFP-Fluoreszenzintensität (schwarzer Pfeil) mindestens 68 % der maximalen Fluoreszenzintensität der Membran beträgt (Abb. 3.7 A). Der Grad der Kollokalisierung der Mutanten wird als relative Plasmamembranlokalisation in Prozent angegeben (Abb. 3.7 B).

Für Cld5_{wt}-YFP ergab sich eine relative Plasmamembranlokalisation von 78 %. Dabei lag die durchschnittliche Plasmamembranlokalisation an Cld5-Kontakten bei 88 % und in allen übrigen Zell-Zell-Kontakten bei 68 %. Da Cld5_{wt}-YFP in der Plasmamembran außerhalb der Cld5-Kontakte in der Mikroskopie kaum zu beobachten war (Abb. 3.6, obere Reihe), wurde der Grenzwert für die Plasmamembranlokalisation auf 68 % gesetzt. Die Cld5-YFP-Mutanten E146A, Y148L, D149A, V152A, K157A, K157M, E159A und L160A lokalisierten im Vergleich zum Wildtyp eindeutig vermindert in der Plasmamembran (Abb. 3.7 B, rote Säulen). Diese Mutanten zeigten in der konfokalen Mikroskopie einen intrazellulären Phänotyp (Abb. 3.6, untere Reihe). Umgekehrt unterschied sich die relative Plasmamembranlokalisation der Intrazellulärtyp-Mutante P153A (74 %) nicht eindeutig von Cld5_{wt}. Alle übrigen Mutanten lokalisierten ähnlich dem Wildtyp in der Plasmamembran (R145A, R145Q, E146N, F147A, Y148A, D149N, P150A, T151A, V154A, S155A, Q156A, Q156E, Y158A und E159Q).

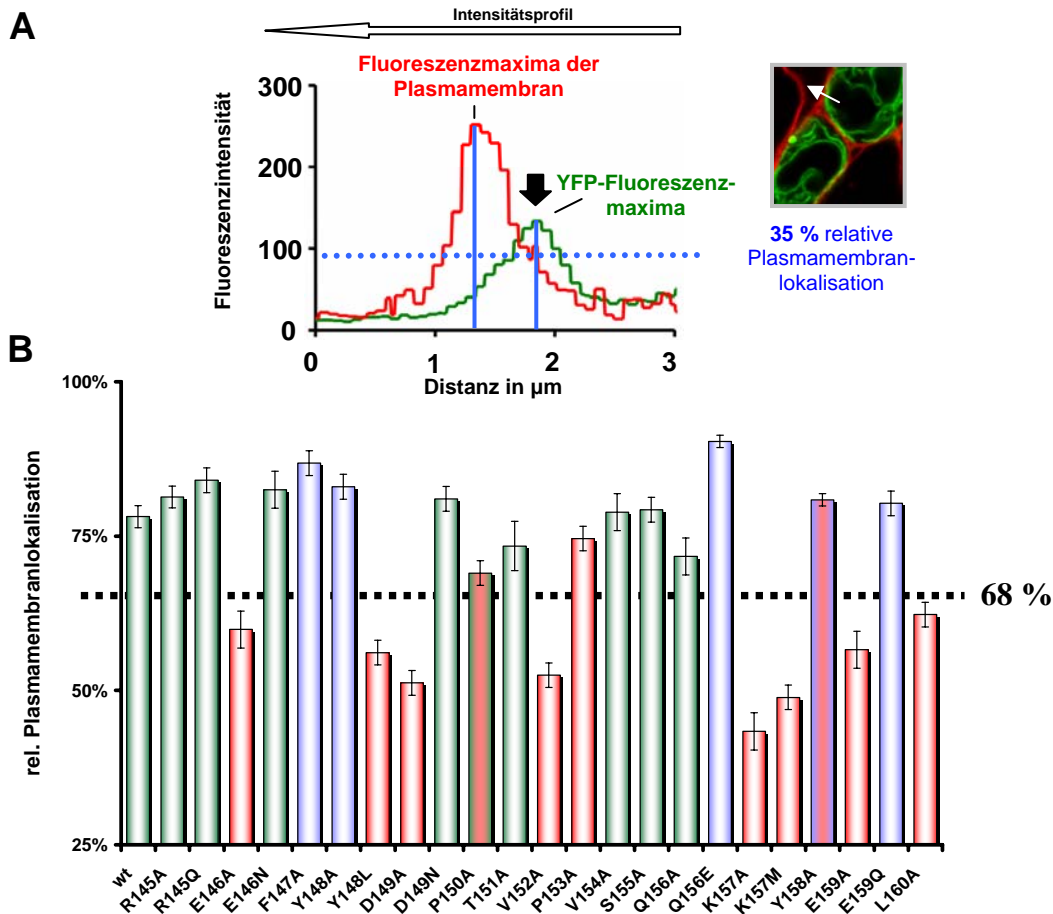


Abb. 3.7: Quantifizierung der Plasmamembranlokalisation durch Lebendzellfärbungen.

A: Schema des Prinzips der quantitativen Bestimmung der relativen Plasmamembranlokalisation. Im Querschnitt durch ein Plasmamembranareal einer Cld5-exprimierenden HEK-293-Zelle (weißer Pfeil im Nebenbild) ergaben sich in Lebendzellfärbungen Fluoreszenzintensitätsprofile der Trypanblau-Fluoreszenz (Plasmamembran, rot) und für Cld5-YFP (grün). In dem Beispiel schneidet das membranächste Maximum der YFP-Fluoreszenz das Intensitätsprofil der Plasmamembranfluoreszenz bei 35 % der maximalen Plasmamembranfluoreszenz. **B:** Durchschnittliche relative Plasmamembranlokalisation in Prozent von mindestens 20 Zellen pro Mutante. Pro Zelle wurden zehn Membranareale ausgewertet. Grüne Säulen: TJ-Typ; rote Säulen: intrazellulärer Typ; blaue Säulen: *disjunction*-Typ. Die intermediären Mutanten P150A und Y158A sind gemischtfarbig dargestellt. Die gepunktete Linie deutet den Grenzwert (68 %) zwischen geringerer und wt-ähnlicher Plasmamembranlokalisation an. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Stichproben-Mittelwertes (SEM) $n \geq 20$.

3.3.2.2 Quantifizierung der Plasmamembranlokalisation der Claudin-5-Mutanten durch Zelloberflächenbiotinylierung

In einem unabhängigen biochemischen Ansatz wurden Plasmamembranproteine durch Zelloberflächenbiotinylierung markiert. Dazu wurden transfizierte HEK-293-Zellen mit plasmamembran-impermeablen Sulfo-NHS-SS-Biotin inkubiert. Die Zellen wurden nach dem Markieren lysiert und die biotinylierten Proteine (Zelloberflächenfraktion) spezifisch aufgereinigt. Zelloberflächenfraktion (100 %) und Zelllysat (10 %) wurden im Immunoblotverfahren mittels α Cld5-Antikörper analysiert. Wie in Abbildung 3.8 zu sehen, konnte Cld5_{wt}-YFP in der Zelloberflächenfraktion nachgewiesen werden, sofern HEK-293-Zellen zuvor mit Cld5-YFP transfiziert und biotinyliert wurden (Abb. 3.8 A, Blot links, Spur 2). Transfizierte,

3. Ergebnisse

nicht biotinylierte Zellen zeigten nur Signale in der Lysatfraktion (Abb. 3.8 A, Blot links, Spur 3). Nicht transfizierte, biotinylierte Zellen zeigten weder Signale in der Lysat- noch Zelloberflächenfraktion (Abb. 3.8 A, Blot links, Spur 1). Der Vergleich der einzelnen Mutanten wies auf Unterschiede im Grad der Biotinylierung. Für die Mutanten R145A, R145Q, E146N, F147A, Y148A, D149N, T151A, V154A und S155A ergab sich eine ähnliche Oberflächenbiotinylierungsrate wie für Cld5_{wt} (Abb. 3.8 B; grüne Säulen, TJ-Typ; blaue Säulen, *disjunction*-Typ). Die Mutanten E146A, Y148L, D149A, V152A, P153A, K157A, K157M, E159A und L160A (Abb. 3.8 B; rote Säulen) zeigten eine deutlich geringere

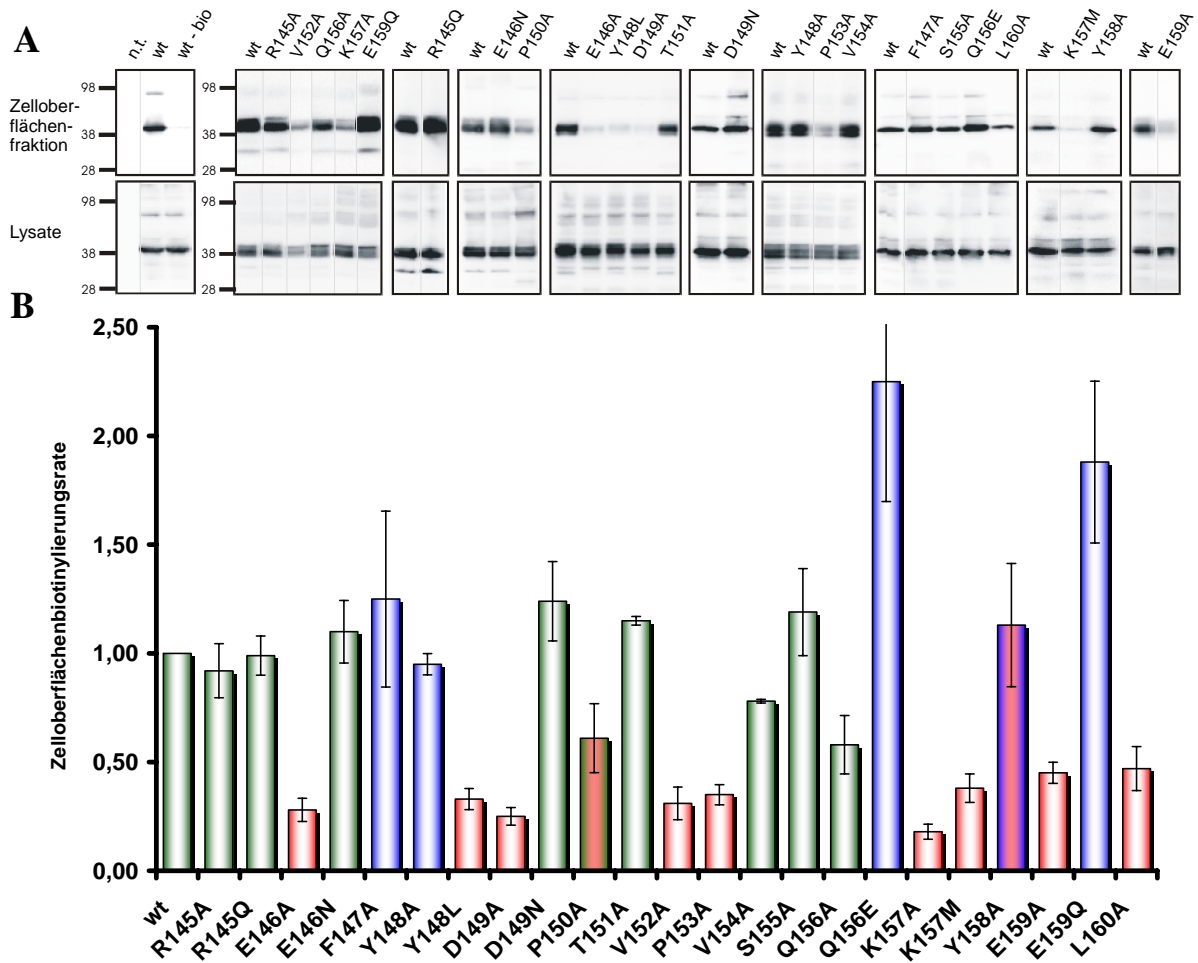


Abb. 3.8: Analyse der Plasmamembranlokalisation von Claudin-5-YFP-Mutanten durch Zelloberflächenbiotinylierung.

HEK-293-Zellen wurden mit verschiedenen Cld5-YFP-Konstrukten transfiziert, biotinyliert, lysiert und die biotinylierten Proteine gereinigt. Gereinigte Proteine (100 %) und Zelllysate (10 %) wurden im Immunoblot-Verfahren mit α Cld5 detektiert. **A:** Repräsentative Immunoblots. Obere Immunoblots: Biotinylierte Claudine in der Zelloberflächenfraktion. Untere Immunoblots: Cld5-Expressionsniveau in den Zelllysaten der Mutanten. Als interner Standard ist Cld5_{wt}-YFP (wt) auf jedem Immunoblot zu finden. Negativ-Kontrollen sind biotinylierte, nicht transfizierte HEK-293-Zellen (n. t.) und Cld5_{wt}-YFP-transfizierte, nicht biotinylierte HEK-293-Zellen (wt-bio). **B:** Quantifizierung der Zelloberflächenbiotinylierungsrate der Immunoblots. Die BLU-Werte in der Zelloberflächenfraktion relativ zu den BLU-Werten in den Lysaten wurden quantifiziert und auf Cld5_{wt} normalisiert. Grüne Säulen: TJ-Typ; rote Säulen: intrazellulärer Typ; blaue Säulen: *disjunction*-Typ. Die intermediären Mutanten P150A und Y158A sind gemischtfarbig dargestellt. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Stichproben-Mittelwertes (SEM), $n \geq 3$.

Zelloberflächenbiotinylierung als Cld-5_{wt} (max. 47 % von Cld5_{wt}). Die Mutanten P150A und Y158A (Abb. 3.8 B; gemischtfarbige Säulen; intermediäre Typen) sowie Q156A (Abb. 3.8 B; grüne Säule, TJ-Typ) ergaben eine intermediäre Biotinylierungsrate. Verglichen mit dem Wildtyp wurde für die Mutanten des *disjunction*-Typs E159Q und Q156E eine deutlich höhere Biotinylierungsrate beobachtet.

Die Ergebnisse der Quantifizierung des Fluoreszenzniveaus in der Plasmamembran und der Zelloberflächenbiotinylierung zusammen ergeben für die Mutanten des TJ-Typs (R145A, R145Q, E146N, D149N, P150A, T151A, V154A, S155A und Q156A) ein Membranlokalisationsniveau ähnlich dem Wildtyps. Eine Ausnahme bildet Q156A, das in den Biotinylierungsexperimenten schwächer in der Plasmamembran vorhanden war als der Wildtyp, aber dennoch stärker als die Mutanten des intrazellulären Typs. Die Mutanten des intrazellulären Typs (E146A, Y148L, D149A, V152A, P153A, K157A, K157M, E159A und L160A) lokalisieren, vermutlich aufgrund von Fehlfaltungen, kaum in der Plasmamembran. Die Mutanten des *disjunction*-Typs (F147A, Y148A, Q156E und E159Q) sind mindestens so stark wie der Wildtyp in der Plasmamembran vorhanden. Q156E lokalisiert in beiden Methoden stärker in der Membran als der Wildtyp. Die Intermediärtyp-Mutante Y158A zeigt im Vergleich zu Cld5_{wt} eine ähnliche Proteinmenge in der Plasmamembran, während P150A schwächer in Plasmamembran lokalisiert als Cld5_{wt}.

3.3.2.3 Quantifizierung der Claudin-5-Kontaktanreicherung: Mutanten vom *disjunction*-Typ stören die *trans*-Interaktion

Mit konfokaler Mikroskopie wurde in HEK-293-Zellen, die transient oder stabil mit Cld5_{wt}-YFP transfiziert waren, die Anreicherung von Cld5 an Cld5-Kontakte quantifiziert und als Intensitätsrate bezeichnet. Die Methode der Quantifizierung der Cld-Kontaktanreicherung ist in Kapitel 2.4.7 beschrieben und in Abbildung 3.9 A dargestellt. Eine Intensitätsrate über 1,5 wurde als Anreicherung an Cld-Kontakte definiert.

Wie in der Abbildung 3.9 B dargestellt, ergab sich für 79 Cld5_{wt}-YFP-exprimierende Zellpaare eine durchschnittliche Intensitätsrate von $3,23 \pm 0,38$. Für die Mutanten vom intrazellulären Typ und vom *disjunction*-Typ (E146A, F147A, Y148A, Y148L, D149A, V152A, P153A, Q156E, K157A, K157M, Y158A, E159A, E159Q und L160A) wurden Intensitätsraten von $1,0 \pm 0,35$ ermittelt. Das ist signifikant ($p < 0,01$) niedriger als die Intensitätsrate des Wildtyps. Demnach wiesen diese Mutanten keine Anreicherung an Cld5-Kontakte auf und sind somit nicht zur *trans*-Interaktion befähigt. Für die Mutanten des TJ-Typs (R145Q, E146N, D149N, T151A, V154A, S155A, und Q156A) wurde eine

3. Ergebnisse

Intensitätsrate von $2,64$ bis $3,54 \pm 0,46$ ermittelt, was der Intensitätsrate des Wildtyps entspricht. Die Fähigkeit zur *trans*-Interaktion ist durch diese Mutationen nicht beeinträchtigt. R145A und P150A zeigten moderate Intensitätsraten ($2,21 \pm 0,29$ bzw. $2,02 \pm 0,28$), die signifikant ($p < 0,01$) niedriger als der Wildtyp sind. Aufgrund der eingeschränkten Fähigkeit zur Cld5-Kontaktanreicherung, die aber im Vergleich zu den Intrazellulärtyp-Mutanten deutlich stärker ist, wurde die intermediäre Mutante P150A dem TJ-Typ zugeordnet.

Da die intermediäre Mutante Y158A keine Cld5-Kontaktanreicherung ($0,95 \pm 0,06$) zeigte, aber in der Plasmamembran angereichert war (siehe Kap. 3.3.2.1 und 3.3.2.2), wurde Y158A als Mutante vom *disjunction*-Typ klassifiziert.

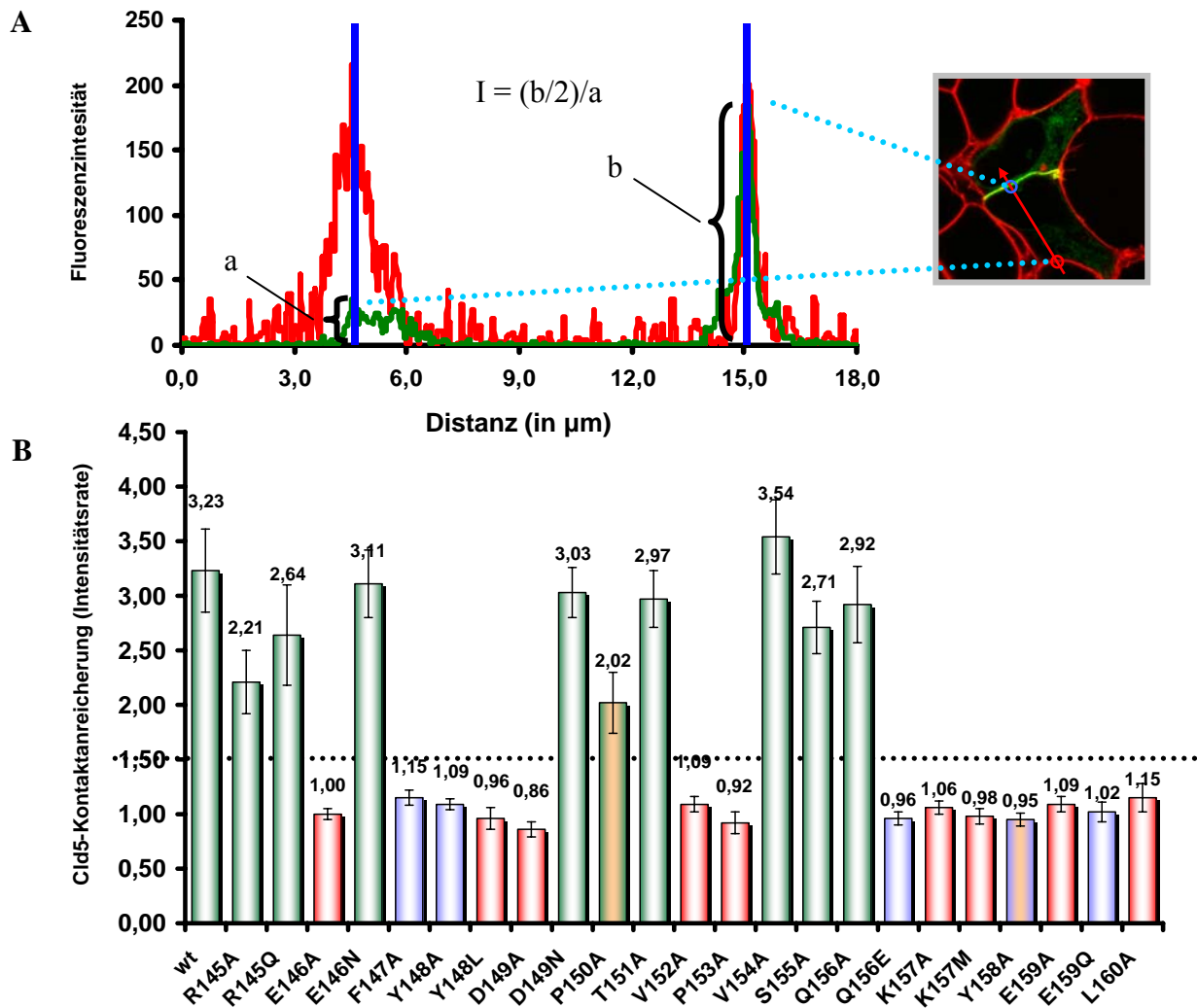


Abb. 3.9: Quantifizierung der *trans*-Interaktion der Claudin-5-YFP-Mutanten.

HEK-293-Zellen wurden mit Cld5-YFP-Konstrukten transfiziert und nach 48 h mit Trypanblau gefärbt. Mittels konfokaler Mikroskopie wurde die Intensitätsrate der Cld5-Kontaktanreicherung bestimmt. **A:** Schematische Darstellung des Prinzips der Ermittlung der Intensitätsrate (I) anhand der Formel $I = (b/2)/a$ aus den Fluoreszenzintensitäten der Cld5-YFP-Fluoreszenz (grün) an Cld-Kontakten [b] und an Zell-Zell-Kontakten zwischen einer Cld exprimierenden und einer nichtexprimierenden Zelle [a]. Die Mittelwerte der Intensitätsraten von mindestens 20 vermessenen Zellen pro Mutante sind im Säulendiagramm (**B**) dargestellt. Die gepunktete Linie bei einer Intensitätsrate von 1,5 deutet den Schwellenwert der Kontaktanreicherung zu keiner Anreicherung an. TJ-Typ: grün; *disjunction*-Typ: blau; intrazellulärer Typ: rot. Die Intermediärtypen Y158A und P150A sind gemischtfarbig dargestellt. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Stichproben-Mittelwertes (SEM), $n \geq 20$; wt: Wildtyp.

3.3.2.4 Einfluss der Koexpression von Claudin-5_{wt} auf die subzelluläre Verteilung von Claudin-5-Mutanten in HEK-293-Zellen

Für Cld5_{R145A}-YFP ließ sich nach Expression in HEK-293-Zellen im Vergleich zu Cld5_{wt}-YFP eine deutlich schwächere Anreicherung an Cld5-Kontakten nachweisen (Abb. 3.9 B). Für die Mutanten Cld5_{Y148L}-YFP und Cld5_{D149A}-YFP wurde keine Cld5-Kontaktanreicherung beobachtet (Abb. 3.9 B). Nach Koexpression von Cld5_{wt}-CFP mit Cld5_{Y148L}-YFP (Abb. 3.10 B1-B4) oder Cld5_{R145A}-YFP (Abb. 3.10 A1-A4) kolokalisierten beide Mutanten an Cld5-Kontakten mit Cld5_{wt}-CFP. Y148L akkumulierte nach Koexpression wesentlich stärker intrazellulär als Cld5_{wt}-CFP und zeigte, verglichen mit der Cld5_{wt}-CFP-Fluoreszenz, nur schwach nachweisbare Signale an Cld5-Kontakten. Nach Koexpression mit dem Wildtyp schien die Anreicherung von Cld5_{R145A}-YFP an Cld5-Kontakten verstärkt und mehr Zellen zeigten Anreicherung (Abb. 3.10 A1-A4). Für die Intrazellulärtyp-Mutante D149A wurde auch nach Koexpression mit dem Wildtyp keine verstärkten Anreicherung an Cld5-Kontakten beobachtet (Abb. 3.10 C1-C4). Diese Experimente belegen, dass Cld5_{wt} durch Koexpression die Anreicherung von Mutanten des intrazellulären Typs an Cld5-Kontakte fördern kann.

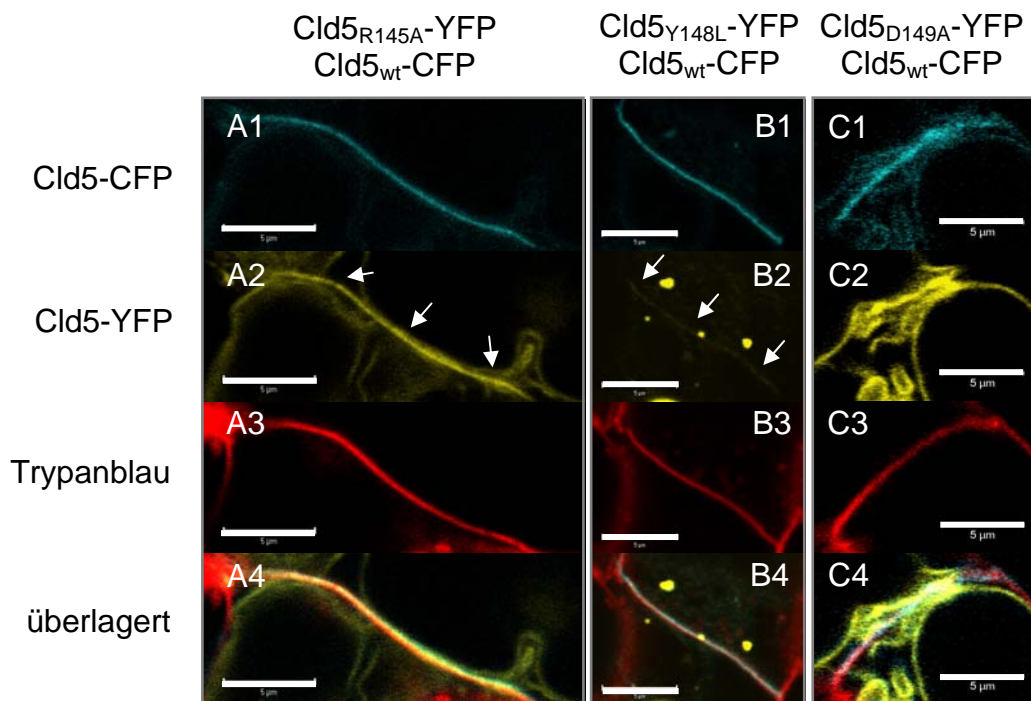


Abb. 3.10: Einfluss der Koexpression von Claudin-5_{wt} auf die subzelluläre Lokalisation der Claudin-5-Mutanten R145A, Y148L und D149A.

HEK-293-Zellen, mit Cld5_{wt}-CFP (blau) und Cld5-YFP-Mutanten (gelb) kotransfiziert, wurden durch Lebendzellfärbung in der konfokalen Mikroskopie untersucht. Die Expression von Cld5_{wt} (**A1**, **B1**, **C1**) und Cld5-Mutanten (**A2**, **B2**, **C2**) wurde durch die CFP- und YFP-Eigenfluoreszenz sichtbar. Plasmamembranen wurden durch Trypanblau (**A3**, **B3**, **C3**) sichtbar gemacht (rot). Die in der Cld5-Kontaktanreicherung eingeschränkte Mutante des TJ-Typs Cld5_{R145A}-YFP kolokalisierte nach Koexpression mit Cld5_{wt}-CFP an Cld5-Kontakten (**A1-A4**). Cld5_{wt}-YFP, mit der Intrazellulärtyp-Mutante Cld5_{Y148L}-YFP koexprimiert, führte zur schwachen Anreicherung der Mutante an Cld5-Kontakte (**B1-B4**), die für die Mutante Cld5_{D149A}-YFP nicht nachzuweisen war (**C1-C4**). Die Pfeile deuten auf die YFP-Fluoreszenz der Mutanten in Cld5-Kontakten. Balken entsprechen 5 μm.

3.3.3 Plasmamembranlokalisation und *trans*-Interaktion weiterer Claudin-5-Konstrukte in HEK-293-Zellen

Neben den Konstrukten mit Mutationen in der 2.EZS wurden Mutationen in anderen Regionen von Cld5 hergestellt. Die Mutation A163G/A185T weist zwei Punktmutationen innerhalb des postulierten dritten Transmembransegments und dem C-Terminus auf. Q44N und L50Q/W51R beinhalten Mutationen in der 1.EZS von Cld5. Q44N führt vermutlich zur posttranslationalen Glykosylierung, die in einem Bandenshift im SDS-Polyacrylamidgel/Immunoblot sichtbar wird (Abb. 3.11 C, oberer Blot, Pfeil). L50Q/W51R beinhaltet gegenüber dem Wildtyp zwei zusätzliche, geladene Seitenketten anstelle der hydrophoben Seitenketten. Zudem wurden ein Cld5-YFP Konstrukt generiert, das die Aminosäuresequenz 1-123 und somit das erste und zweite Transmembransegment sowie die 1.EZS umspannt. Cld5₁₀₃₋₂₁₈-YFP enthält das dritte und vierte Transmembransegment sowie die 2.EZS.

In HEK-293-Zellen wurde für die Mutanten Cld5_{A163G/A185T}-YFP, Cld5_{L50Q/W51R}-YFP, Cld5₀₋₁₂₃-YFP und Cld5₁₀₃₋₂₁₈-YFP keine Plasmamembranlokalisation und Anreicherung an Cld5-Kontakte beobachtet. Demzufolge wurden diese Mutanten dem intrazellulären Typ zugeordnet. Die Mutante Cld5_{Q44N}-YFP ließ keine Anreicherung an Cld5-Kontakte erkennen, lokalisierte jedoch eindeutig in der Plasmamembran und wurde dem *disjunction*-Typ zugeordnet werden (Abb. 3.11 A und B; Abb. 3.12 E1-E3).

In Abb. 3.11 B ist die Quantifizierung der Cld-Kontaktanreicherung für die o. g. Mutanten dargestellt. Im Gegensatz zum Wildtyp ($3,23 \pm 0,38$) zeigten alle Mutanten eine signifikant ($p < 0,01$) niedrigere Intensitätsrate von $1,0 \pm 0,3$ und daher keine Kontaktanreicherung.

Die Fähigkeit der Mutanten in der Plasmamembran zu lokalisieren, wurde durch konfokale Mikroskopie (siehe Kap. 3.3.2.1) ermittelt. Für die vier Mutanten des intrazellulären Typs (A163G/A185T, L50Q/W51R, Cld5₀₋₁₂₃ und Cld5₁₀₃₋₂₁₈) war eine deutlich geringere relative Plasmamembranlokalisation feststellbar ($\leq 54,5$ %), als für den Wildtyp (Abb. 3.11 A). Q44N zeigte hingegen ein deutlich höheres Niveau (93,7 %) der relativen Plasmamembranlokalisation verglichen mit dem Wildtyp. Erste Zelloberflächen-Biotinylierungsexperimente ergaben für Q44N eine deutlich höhere Biotinylierungsrate ($3,72 \pm 0,38$) im Vergleich mit Cld5_{wt} (drei Experimente). Cld5_{A163G/A185T}-YFP zeigte eine Biotinylierungsrate von $0,15 \pm 0,07$ (fünf Experimente) und Cld5₁₀₃₋₂₁₈-YFP eine Biotinylierungsrate von $0,55 \pm 0,30$ (zwei Experimente).

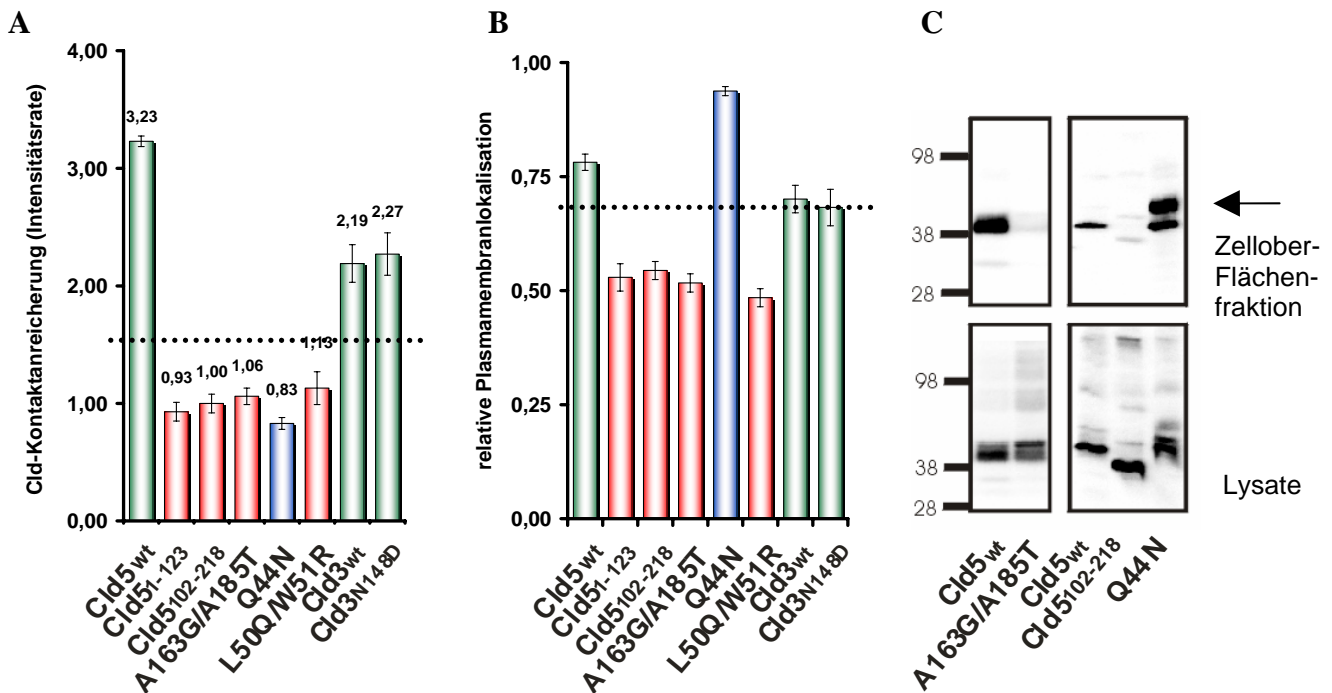


Abb. 3.11: Quantifizierung der Membranlokalisation und Claudin-5-Kontaktanreicherung weiterer Claudin-Konstrukte.

HEK-293-Zellen wurden mit Cld5_{wt}-YFP, Cld5₁₋₁₂₃-YFP, Cld5₁₀₂₋₂₁₈-YFP, Cld5_{A163G/A185T}-YFP, Cld5_{Q44N}-YFP, Cld5_{L50Q/W51R}-YFP, Cld3_{wt}-YFP oder Cld3_{N148D}-YFP transfiziert. Mittels konfokaler Mikroskopie wurden die Cld-Kontaktanreicherung (Intensitätsrate, **A**) und die relative Plasmamembranlokalisation (**B**) der Mutanten in Lebendzellfärbungen quantifiziert. **A:** Die gepunktete Linie bei einer Intensitätsrate von 1,5 zeigt den Schwellenwert der Kontaktanreicherung an. **B:** Der Schwellenwert der relativen Plasmamembranlokalisation lag bei 68 %. In A (n=20) und B (n≥17) geben die Fehlerbalken den Standardfehler des Stichproben-Mittelwertes an. Rote Säulen: Intrazellulärer Typ; blaue Säulen: *disjunction*-Typ; grüne Säulen: TJ-Typ. **C:** Zelloberflächenbiotinylierung der Mutanten A163G/A185T, Q44N und Cld5₁₀₂₋₂₁₈. Oberer Immunoblot: Zelloberflächenfraktion (biotinylierte Proteine). Unterer Immunoblot: Zelllysate (Cld5-Expressionsniveau). Cld5 wurde in den Immunoblots durch α Cld5 nachgewiesen. Der Pfeil verweist auf die höhermolekulare Bande von Q44N, bei der es sich höchstwahrscheinlich um die glykosilierte Form von Q44N (auch in Wen *et al.*, 2004 zu sehen) handelt.

3.3.4 Die zweite extrazelluläre Schleife von Claudin-3

Neben den Cld5-Mutanten wurden einige Cld3-Mutanten generiert. Zwei verschiedene Varianten wurden durch Klonierung und ortsgerechte Mutagenese konstruiert: Cld3_{wt}, Cld3_{N148A} und Cld3_{N148D} ohne Proteinanhänge sowie Cld3_{wt}-CFP und Cld3_{N148D}-CFP. Alle drei Konstrukte ohne CFP wurden anhand von Immunfluoreszenzfärbungen analysiert und waren an Cld3-Kontakten angereichert (Abb. 3.12 A-C).

Cld3_{wt}-CFP und Cld3_{N148D}-CFP wurden durch Lebendzellfärbung mikroskopisch untersucht (Cld3_{wt}-CFP: Abb. 3.4 C1-C3; Cld3_{N148D}-CFP: Abb. 3.12 D1-D3) und die Cld3-Kontaktanreicherung quantifiziert. Beide Konstrukte waren an Cld3-Kontakten angereichert und lagen mit einer Intensitätsrate von $2,19 \pm 0,16$ bzw. $2,27 \pm 0,18$ deutlich über den Schwellenwert von 1,5 (Abb. 3.11 A). Wie für Cld3_{wt}-CFP, war die Plasmamembranfärbung für Cld3_{N148D}-CFP im Bereich der Cld3-Kontakte im Vergleich zu übrigen Membranarealen stark verringert (Abb. 3.12 D1-D3, Pfeilköpfe). Die Fähigkeit zur Plasmamembranlokalisation

3. Ergebnisse

wurde für Cld3_{wt}-CFP und Cld3_{N148D}-CFP durch konfokale Mikroskopie ermittelt. Beide Konstrukte waren im Vergleich zu Cld5_{wt}-YFP etwas geringer in der Plasmamembran ($0,70 \pm 0,03$ bzw. $0,68 \pm 0,04$), jedoch im Vergleich zu den Intrazellulärtyp-Mutanten erhöht (Abb. 3.11 B). Alle drei Cld3-Konstrukte lassen sich dem TJ-Typ zuordnen. Die beiden Cld3_{N148}-Mutanten zeigen im Gegensatz zu der Mutante der äquivalenten Aminosäureposition D149 in Cld5 keinen Effekt auf die subzelluläre Lokalisation des Proteins.

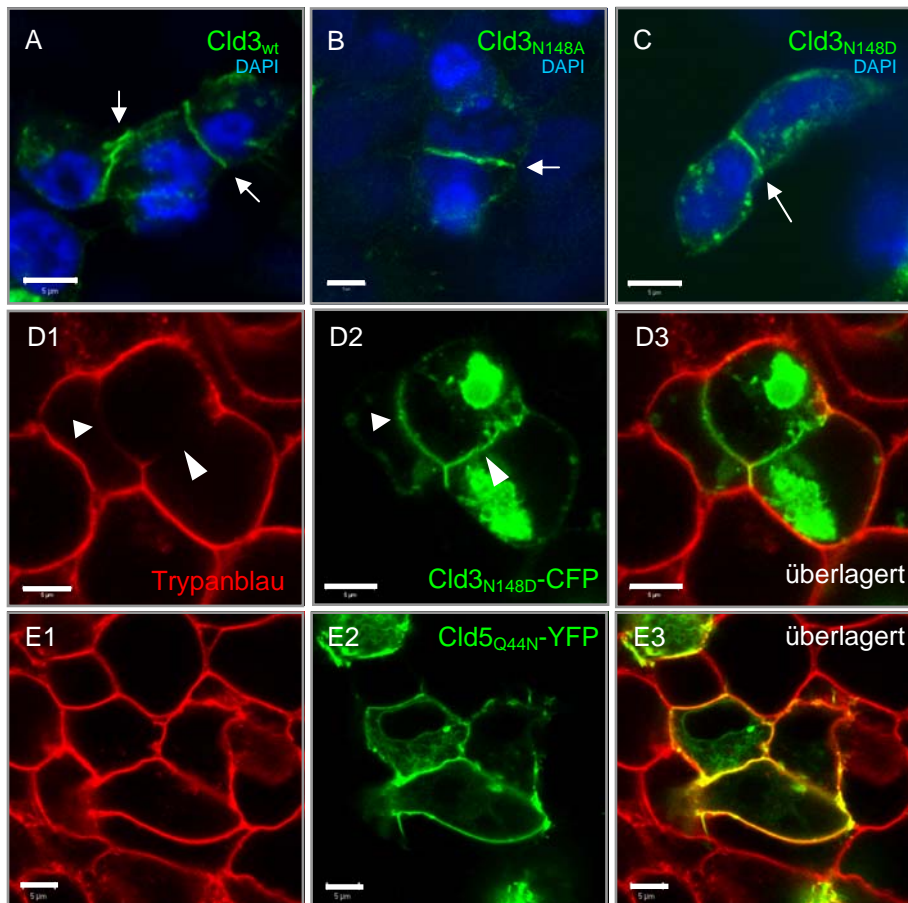


Abb. 3.12: Subzelluläre Lokalisation von Claudin-3-Mutanten und Claudin-5_{Q44N}-YFP.

A1-A3: HEK-293-Zellen wurden mit Cld3_{wt} (A), Cld3_{N148A} (B) und Cld3_{N148D} (C) transfiziert und in der Immunfluoreszenz mit α Cld3 (1. AK) und α R-AlexaFluor488 (2. AK) markiert (grün). Die Zellkerne wurden durch DAPI (blau) gefärbt. **D1-D3:** Lebendzellfärbung von Cld3_{N148D}-CFP exprimierenden HEK-293-Zellen. Pfeilköpfe weisen auf fehlende Trypanblaufärbung an Cld3-Kontakten. **E1-E3:** Lebendzellfärbung von HEK-293-Zellen transfiziert mit Cld5_{Q44N}-YFP. Trypanblaufärbungen visualisieren die Plasmamembran (rot). CFP- und YFP-Konstrukte sind durch die Eigenfluoreszenz sichtbar (grün). Balken entsprechen 5,0 μ m.

3.4 Claudin-5-Mutanten vom intrazellulären Typ akkumulieren im endoplasmatischen Retikulum

Mögliche Ursache für intrazelluläre Akkumulation von Cld5-Mutanten könnten Falschfaltungen sein, die zur Retention im endoplasmatischen Retikulum (ER) führen. Um diese Annahme zu untersuchen, wurden Wildtyp- oder Mutanten-Konstrukte von Cld5-YFP

3. Ergebnisse

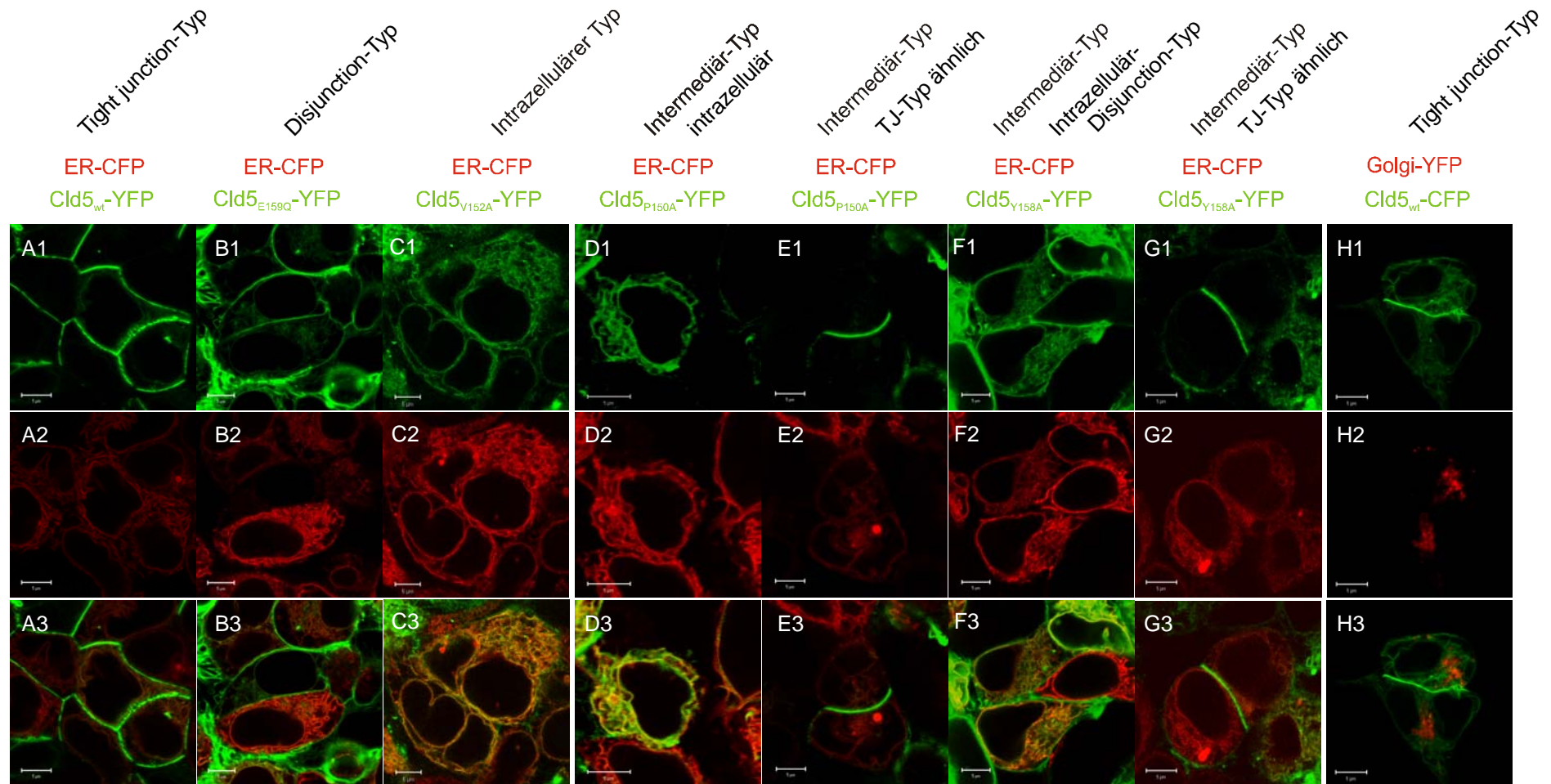


Abb. 3.13: Claudin-5-Mutanten vom intrazellulären Typ akkumulieren im endoplasmatischen Retikulum.

HEK-293-Zellen wurden mit verschiedenen Cld5-YFP-Mutanten (grün) und CFP-ER (Marker für das endoplasmatische Retikulum, rot) kotransfiziert und die Kolokalisation von Cld5 mit dem ER über die Fluoreszenz der exprimierten Proteine durch konfokale Mikroskopie analysiert. Cld5_{wt} befand sich hauptsächlich an Cld5-Kontakten, und eine Kolokalisation mit CFP-ER war vernachlässigbar (**A1-A3**). Cld5_{E159Q}, als ein Beispiel für den *disjunction*-Typ, kolokalisierte ebenfalls nur sehr schwach mit CFP-ER (**B1-B3**). In Gegensatz dazu kolokalisierte Cld5_{V152A}, als Beispiel für den intrazellulären Typ, kolokalisierte stark mit CFP-ER (**C1-C3**). In den meisten Fällen kolokalisierte auch Cld5_{P150A} (intermediärer Typ) stark mit CFP-ER (**D1-D3**). Eine Subpopulation von Cld5_{P150A} war allerdings an Cld5-Kontakten angereichert (**E1-E3**). Cld5_{Y158A} zeigte in den meisten Fällen eine homogene Verteilung in der Plasmamembran (**F1-F3**). Zusätzlich wurden auch Zellen beobachtet, in denen sich Cld5_{Y158A} intrazellulär ansammelte und mit dem ER kolokalisierte (**G1-G3**). Mit Cld5_{wt}-CFP und Golgi-YFP (ein Marker für den Golgi-Apparat) kotransfizierte HEK-293-Zellen wiesen nach Expression keine auffällige Kolokalisation zwischen intrazellulären Cld5_{wt} und Golgi-YFP auf (**H1-H3**). Balken entsprechen 5 µm.

mit einem spezifischen ER-Marker (pECFP-ER, Tab. 2.5) in HEK-293-Zellen kotransfiziert. Die Kolokalisation der YFP-Konstrukte mit dem ER-Marker wurde in lebenden Zellen analysiert. Cld5_{wt}-YFP fand sich hauptsächlich an Cld5-Kontakten und zeigte nur schwache Kolokalisation mit CFP-ER (Abb. 3.13 A1-A3). Cld5_{E159Q}-YFP, als ein Beispiel für den *disjunction*-Typ, war gleichmäßig in der Plasmamembran verteilt und zeigte ebenfalls nur schwache Kolokalisation mit dem CFP-ER-Marker (Abb. 3.13 B1-B3). Demgegenüber kolokalisierte Cld5_{V152A}-YFP (intrazellulärer Typ) hauptsächlich mit dem CFP-ER-Marker (Abb. 3.13 C1-C3). Die Mutante Cld5_{P150A}-YFP kolokalisierte in den meisten Zellen mit dem ER (Abb. 3.13 D1-D3). Eine Subpopulation von Zellen wies allerdings eine Anreicherung an Cld5-Kontakten auf und zeigte darüber hinaus nur wenig Kolokalisation mit dem ER-Marker (Abb. 3.13 E1-E3). Cld5_{Y158A}-YFP war in den meisten Fällen homogen in der Plasmamembran verteilt und kolokalisierte mit dem ER (Abb. 3.12 F1-F3). In einigen Fällen verhielt sich Cld5_{Y158A}-YFP wie der TJ-Typ und zeigte Cld5-Kontaktanreicherung sowie schwache Kolokalisation mit dem ER (Abb. 3.13 G1-G3). Kotransfektionen von Cld5_{wt}-CFP mit einem Golgi-Marker (pEYFP-Golgi) ließen keine Kolokalisation von Cld5 mit dem Golgi-Apparat erkennen (Abb. 3.13, H1-H3).

3.5 Homophile *cis*-Interaktionen werden durch Mutationen in der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 nicht beeinträchtigt

3.5.1 Analyse der *cis*-Interaktion durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer

Es ist die Frage zu klären, ob die 2.ESZ von Cld5 an der *cis*-Interaktion der Claudine beteiligt ist und ob Aminosäuresubstitutionen der 2.EZS die *cis*-Interaktionsfähigkeit beeinträchtigen. Durch die FRET-Methode ließen sich die *cis*-Interaktionen untersuchen.

Zur Bestimmung der FRET-Effizienz wurden HEK-293-Zellen mit Cld5_{wt}-CFP (Donor) und Cld5-YFP (Akzeptor) kotransfiziert. Cld5-Kontakte, in denen YFP- und CFP-Konstrukte nach Expression kolokalisierten, wurden durch konfokale Mikroskopie identifiziert und die FRET-Effizienz (E_F) wurde mit Hilfe der Akzeptor-Bleich-Methode bestimmt. Cld5 zeigte eine spezifische Selbstassoziation. Die ermittelte FRET-Effizienz der Cld5_{wt}-CFP- und Cld5_{wt}-YFP-Kotransfektanden lag mit 18,6 % (Abb. 3.14 A, grüne Säule) unter der FRET-Effizienz eines CFP-YFP-Fusionsproteins (Positivkontrolle; 30,5 %), jedoch deutlich über der von Kotransfektionen von CFP und YFP oder Cld5_{wt}-YFP und CFP, die eine FRET-Effizienz unter 0,5 % aufwiesen (Negativkontrollen, Abb. 3.14 A). Kotransfektionen von Cld5_{wt}-CFP mit den Transmembranproteinen AQP1-YFP (Aquaporin-1) oder dem CRFR1-YFP

3. Ergebnisse

(Corticotropin-releasing factor receptor 1) ergaben FRET-Effizienzen von -3,0 % bzw. -1,6 % (Negativkontrollen; Abb. 3.14 A).

Die Darstellung der FRET-Effizienzen von Cld5_{wt}-CFP/Cld5_{wt}-YFP-Transfektanden in Abhängigkeit von dem YFP/CFP-Verhältnis verdeutlicht die starke Abhängigkeit der FRET-Effizienz vom Akzeptor- zu Donor-Verhältnis (Abb. 3.14 B). Demnach nahm die FRET-Effizienz logarithmisch zu ($f(x) = 0,0527\ln(x) + 0,1452$), wenn das Verhältnis von YFP- zu CFP-Fluoreszenz linear stieg. Es war keine deutlich positive Korrelation zwischen dem YFP- bzw. CFP-Expressionsniveau und den FRET-Effizienzen zu erkennen. Daher kann ausgeschlossen werden, dass eine hohe FRET-Effizienz durch ein hohes Expressionsniveau zu Stande kommt (Abb. 3.14 C und D). Für die Kalkulation der durchschnittlichen FRET-Effizienzen der Mutanten wurden nur Cld5-Kontakte analysiert, deren CFP-Fluoreszenz-

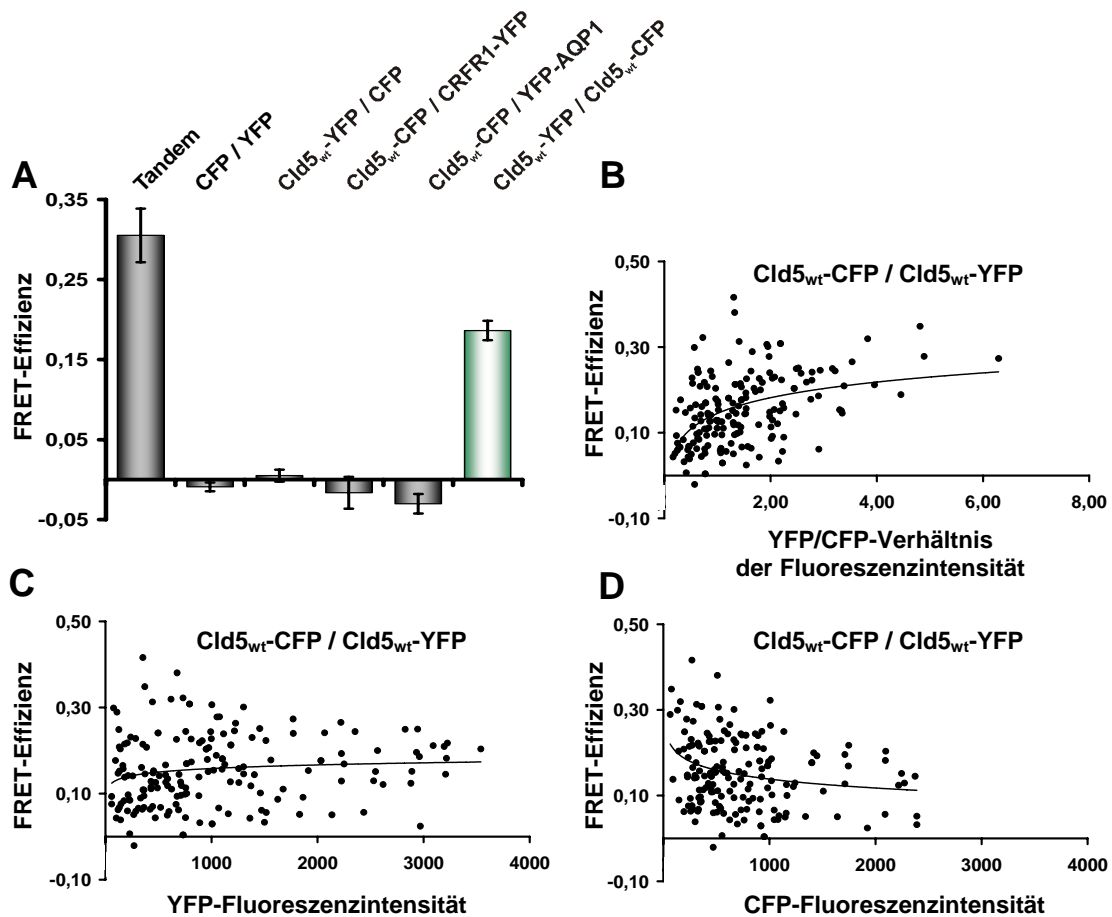


Abb. 3.14: FRET-Kontrollen und die Abhängigkeit der FRET-Effizienz von den YFP- und CFP-Fluoreszenzintensitäten.

A: FRET-Kontrollen. Grüne Säule: FRET-Effizienz von Cld5_{wt}-CFP und Cld5_{wt}-YFP kotransfiziert in HEK-293-Zellen. Schwarze Säulen: Positiv- und Negativkontrollen. Das Tandem-Konstrukt (YFP-CFP-Fusionsprotein) zeigte eine FRET-Effizienz von 30 %. Die FRET-Effizienzen der Negativkontrollen CFP + YFP, Cld5_{wt}-YFP + CFP, Cld5_{wt}-CFP + CFRR1-YFP und Cld5_{wt}-CFP + YFP-AQP1 lagen unter 0,5 %. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Abhängigkeit der FRET-Effizienz von dem YFP/CFP-Verhältnis der Fluoreszenzintensität (**B**); der YFP-Fluoreszenz (**C**) und der CFP-Fluoreszenz (**D**). Insgesamt sind 174 FRET-Effizienzen von Cld5_{wt}-CFP- und Cld5_{wt}-YFP-Kotransfektionen untersucht worden.

intensität zwischen 400 und 2000 relativen Intensitätseinheiten lag und deren YFP-Fluoreszenzintensität zwischen 250 und 3000 relativen Intensitätseinheiten lag. Außerdem musste das Fluoreszenzintensitätsverhältnis von YFP/CFP in den Cld-Kontakten ähnlich dem von Cld5_{wt}-CFP/Cld5_{wt}-YFP (interner Standard, ungefähr 1,5) sein.

3.5.2 Einfluss der Aminosäuresubstitutionen auf die *cis*-Interaktion

Um die *cis*-Interaktionsfähigkeit der Cld5-Mutanten zu bestimmen, wurden die Cld5-YFP-Mutanten mit Cld5_{wt}-CFP in HEK-293-Zellen kotransfiziert und die FRET-Effizienzen an den Cld5-Kontakten bestimmt. In jedem Experiment wurde die FRET-Effizienz von Cld5_{wt}-CFP/Cld5_{wt}-YFP als 1,0 (100 %) definiert und die Mutanten auf den Wildtyp normalisiert. Diese relativen FRET-Effizienzen der Mutanten sind in Abbildung 3.15 dargestellt. Koexpressionen von Cld5_{wt}-CFP mit den Mutanten des TJ- oder *disjunction*-Typs ergaben relative FRET-Effizienzen von $\geq 0,86$, die sich nicht signifikant vom Wildtyp unterschieden. Für die Aminosäuresubstitutionen R145A, R145Q, E146N, F147A, Y148A, D149N, P150A, S155A, Q156A, Q156E und E159Q ist demnach ein Einfluss auf die *cis*-Interaktion auszuschließen (Abb. 3.15, grüne und blaue Säulen).

Demgegenüber wiesen Mutanten des intrazellulären Typs signifikant ($p < 0,001$) niedrigere relative FRET-Effizienzen ($\leq 0,65$) auf. Für die Mutanten V152A, P153A, K157A, E159A, Cld5₁₋₁₂₃ und Cld5₁₀₃₋₂₁₈ wurden relative FRET-Effizienzen (0,06; 0,20; 0,00; 0,32; -0,03 und 0,07) im Bereich der Negativkontrolle (0,09) ermittelt (Abb. 3.15). Für Cld5₁₋₁₂₃ und Cld5₁₀₃₋₂₁₈ existieren allerdings nur Daten für sechs bzw. vier Zellpaare. Eine Aussage über die *cis*-Interaktionsfähigkeit beider Konstrukte gibt deshalb nur eine Tendenz an. Die relativen FRET-Effizienzen der Mutanten E146A, Y148L und D149A (0,48; 0,65; 0,41) lagen ebenfalls unterhalb des Wildtypniveaus, zeigten aber signifikant ($p < 0,001$) höhere relative FRET-Effizienzen als die Negativkontrolle (Abb. 3.15). Ein Vergleich der relativen FRET-Effizienzen der Mutanten des TJ- oder *disjunction*-Typs mit den Mutanten des intrazellulären Typs ist nur eingeschränkt möglich, da die FRET-Effizienzen vom YFP/CFP-Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten abhängt (siehe 3.5.1). Für die Mutanten des intrazellulären Typs war die YFP-Fluoreszenz an den Cld5-Kontakten deutlich niedriger, da die Proteinkonzentration dieser Mutanten in der Plasmamembran generell niedriger ist (siehe 3.3.2.1, 3.3.2.2). Das YFP/CFP-Verhältnis der Mutanten des intrazellulären Typs war daher ebenfalls deutlich geringer als das des Wildtyps (Cld5_{wt}: 1,47; E146A: 0,52; Y148L: 0,79; D149A: 0,63; V152A: 0,61; P153A: 0,63; K157A: 0,52 und E159A: 0,66), demzufolge dürfte die reelle relative FRET-Effizienz für diese Mutanten höher liegen. Für die Mutanten des intrazellulären

3. Ergebnisse

Typs lässt sich daher keine Aussage über die *cis*-Interaktionsfähigkeit an Cld5-Kontakten treffen. Für die intermediäre Mutante Cld5_{Y158A}-YFP war die relative FRET-Effizienz im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert (0,46; Abb. 3.15), was auf eine verringerte, lokale Proteinkonzentration von Cld5_{Y158A}-YFP in Cld5-Kontakten zurückzuführen ist.

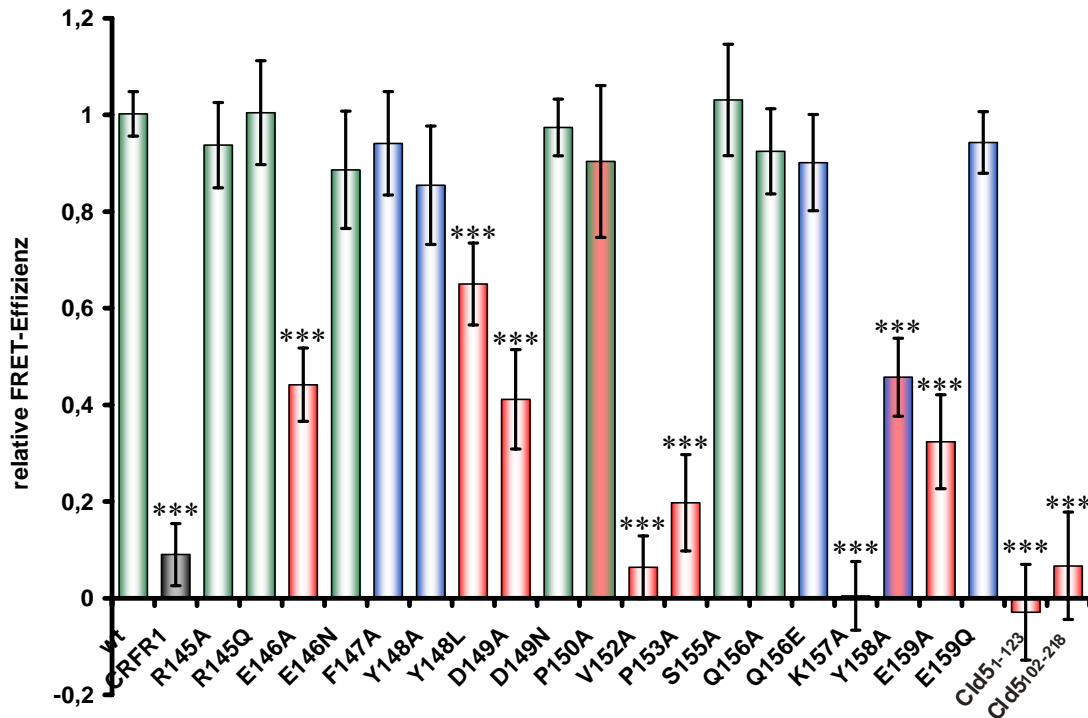


Abb. 3.15: Quantifikation der *cis*-Interaktionen von Claudin-5-Mutanten durch FRET.

HEK-293-Zellen wurden mit Cld5_{wt}-CFP und verschiedenen Cld5-YFP-Mutanten oder CRFR1-YFP als Negativkontrolle kotransfiziert. FRET wurde durch die Akzeptor-Bleich-Methode an Cld5-Kontakten bestimmt und die FRET-Effizienz relativ zur FRET-Effizienz von Cld5_{wt}-CFP/Cld5_{wt}-YFP dargestellt. 20 bis 42 Cld-Kontakte jeder Mutante wurden in mindestens zwei unabhängigen Experimenten analysiert. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Stichproben-Mittelwertes; *** = p<0,001 (signifikant verschieden zum Wildtyp).

3.5.3 Claudin-Oligomere in der SDS-Gelelektrophorese

Mitic *et al.* (2003) postulierten die Existenz von Cld4-Hexameren, die auch von Coyne *et al.* (2003) für Cld3 und Cld5 beobachtet wurden. Dabei wiesen beide Gruppen neben Monomeren auch SDS-resistente Oligomere bis Hexamere in der SDS-PAGE nach. Ähnliche Oligomere waren ebenfalls in einem Gelelektrophoresesystem nachweisbar, indem ein milderes Detergens als SDS, Perfluoro-Oktansäure (PFO), verwendet wurde.

In dieser Arbeit wurden rekombinante Cld5-Konstrukte in *E. coli* exprimiert und gereinigt. In einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunoblot analysiert, zeigten sich für MBP-Cld5 (67 kDa) sechs immunreaktive Banden mit den Molekulargewichten 42, 58, 95, 170 und >191 kDa (Abb. 3.16 B). Bei der 42 kDa-Bande handelt es sich möglicherweise um ein Abbauprodukt. Für His₆-Cld5 (22 kDa) waren vier Banden mit 18, 34, 45 und 63 kDa nachweisbar (Abb. 3.16 A). Auch in *E. coli* werden Cld-Konstrukte scheinbar in die Plasmamembran eingebaut, da bei Membranpräparationen durch differentielle Zentrifugation

3. Ergebnisse

Cld5 aus dem Membranpellet und nicht aus dem Überstand solubilisiert werden konnte (Nikolaj Zuleger, FMP, persönliche Mitteilung).

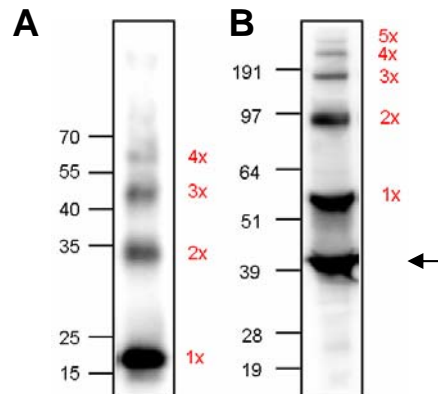


Abb. 3.16: SDS-resistente Claudin-5-Oligomere im Immunoblot.

His₆-Cld5 (22 kDa) und MBP-Cld5 (67 kDa) wurden in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert, in 1 % Triton[®] X-100 in PBS durch die French[®]Press aufgeschlossen und affinitätschromatographisch gereinigt. Gereinigte Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, auf 95 °C erhitzt, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot analysiert. Für His₆-Cld5 ließen sich zumindest vier Banden (A), für MBP-Cld5 fünf Banden (B) nachweisen, die das kalkulierte Molekulargewicht von monomeren Fusionsproteinen überschreiten. Immunreaktive Banden wurden durch α Cld5 detektiert. Der Pfeil deutet auf ein mögliches Abbauprodukt von MBP-Cld5, das das apparente Molekulargewicht von MBP aufweist.

3.6 Veränderte Strangmorphologie der Mutanten der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5

Um den Effekt der Mutationen der 2.EZS von Cld5 auf die Bildung von TJ-Strängen und deren Morphologie zu untersuchen, wurden Gefrierbruchelektronenmikroskopische Untersuchungen an stabil transfizierten HEK-293-Zellen vorgenommen (Kooperation Dr. Hartwig Wolburg, Universität Tübingen). Wie in 3.2.3 für Cld5 ohne Proteinanhang beschrieben (Abb. 3.5 C) bilden auch Cld5_{wt}-YFP exprimierende Zellen ausgedehnte Netzwerke diskontinuierlicher Stränge in der E-face der Plasmamembran (Abb. 3.17 A). Die C-terminale Fusion von Cld5 mit YFP beeinflusst die Strangmorphologie nicht.

Wie aufgrund der eingeschränkten Plasmamembranlokalisation erwartet, zeigten Mutanten vom intrazellulären Typ keine oder sehr wenige TJ-Stränge, die darüber hinaus in der P-/E-face-Assoziation verändert waren. So bildete Cld5_{V152A}-YFP keine TJ-Stränge, hingegen fanden sich für Cld5_{P153A}-YFP wenige Stränge, deren Partikel zu gleichen Teilen mit der E- und der P-face assoziiert waren (Abb. 3.17 G und H). Die Mutanten vom TJ-Typ Cld5_{R145A}-YFP, Cld5_{E146N}-YFP (Abb. 3.17 B), Cld5_{D149N}-YFP (Abb. 3.17 C) und Cld5_{Q156A}-YFP bildeten wie der Wildtyp mit der E-face assoziierte, diskontinuierliche TJ-Stränge. Hingegen waren für die Mutanten vom *disjunction*-Typ Cld5_{F147A}-YFP, Cld5_{Y148A}-YFP (Abb. 3.17 E) und Cld5_{E159Q}-YFP (Abb. 3.17 D) keine oder sehr viel weniger TJ-Stränge nachweisbar. Die

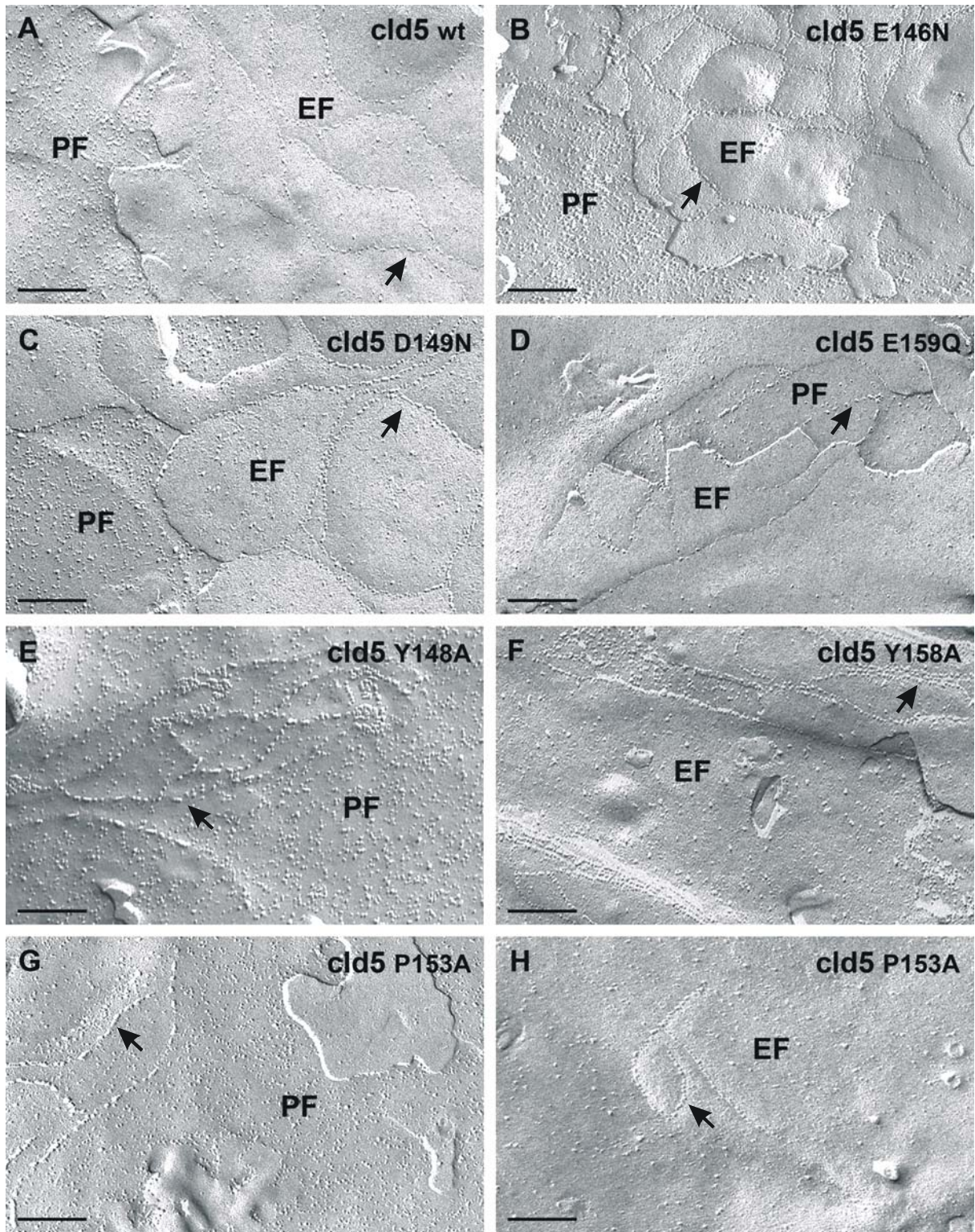


Abb. 3.17: Der Einfluss von Aminosäuresubstitutionen in der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5 auf die TJ-Strangbildung.

HEK-293-Zellen, stabil mit verschiedenen Cld5-Mutanten transfiziert und durch FACS sortiert, wurden fixiert und für die Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie präpariert. (A) Cld5_{wt}-YFP formte diskontinuierliche Netzwerke E-face assoziierter, intramembranöser Stränge. Die Mutanten des *disjunction*-Typs Cld5_{E159Q}-YFP (D) oder Cld5_{Y148A}-YFP (E) zeigten sehr wenige Stränge, die eine geringe Komplexität aufwiesen und stark mit der P-face assoziiert waren. Cld5_{E146N}-YFP- (B) und Cld5_{D149N}-YFP- (C) exprimierende Zellen bildeten Stränge ähnlich Cld5_{wt}-YFP (A). Zellen, die Cld5_{Y158A}-YFP (F) exprimierten, zeigten Doppel- oder Tripel-Strangmorphologie. Cld5_{P153A}-YFP-transfizierte Zellen formten nur sehr wenige Stränge, die sowohl mit der E-face (H) und P-face (G) assoziiert waren. Pfeile weisen auf Cld5-Partikel. Balken: 200 nm. E = exoplasmatisch; P = protoplasmatisch; EF = E-face; PF = P-face.

Aminosäuresubstitution E159Q führte zudem zu *P-face* assoziierten Partikeln (Abb. 3.17 D). Die intermediäre Mutante Cld5_{Y158A}-YFP wies nur wenige TJ-Stränge auf, die doppelt oder dreifach parallel mit der *E-face* assoziiert verliefen (Abb. 3.17 F). Die zweite intermediäre Mutante Cld5_{P150A}-YFP, die vereinzelt zur *trans*-Interaktion befähigt war, bildete deutlich weniger TJ-Stränge, deren Morphologie der TJ-Stränge von Cld5_{wt}-YFP glich.

3.7 Molekulare Monomer- und Dimermodelle der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5

Die experimentellen Daten dieser Arbeit zu den Interaktionseigenschaften von Cld5 wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe „Strukturelle Bioinformatik“ des FMP (Dr. Sebastian L. Müller und Dr. Gerd Krause) zur Erstellung eines molekularen Monomermodells und eines *trans*-Dimermodells herangezogen.

3.7.1 Monomermodell der intramolekularen Interaktionen der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5

Um ein molekulares Monomermodell der 2.EZS von Cld5 zu entwerfen, wurde nach homologen Sequenzen der 2.EZS von Cld5 gesucht, deren bekannte Struktur als strukturelle Vorlage für Cld5 verwendet werden konnte. Ausgehend von diesen strukturellen Vorlagen wurden Modelle generiert. Das beste Modell passte zu der Struktur „2BDV“ aus der PDB-ID-Datenbank (www.pdb.org). Die Struktur entstammt einem hypothetischen Protein BB2244 aus *Bordetella bronchiseptica*. 2BDV beinhaltet eine Helix-*turn*-Helix-Struktur und weist in dem entsprechendem Sequenzabschnitt eine Sequenzähnlichkeit von 80 % zu Cld5₁₄₃₋₁₆₀ auf (Abb. 3.18 A). Von den sieben identischen Aminosäureresten (~40 % homolog) sind insbesondere die beiden Proline P150A und P153A und deren flankierenden Positionen aus der Cld5-Sequenz zu BB2244 homolog. Die beiden Proline bewirken möglicherweise die *turn*-Struktur der 2.EZS von Cld5 wie in 2BDV. Von allen generierten Modellen zeigte das Modell auf der Basis von 2BDV die höchste Zahl an möglichen intramolekularen Seitenketten-Interaktionen und war mit den experimentellen Daten zur intrazellulären Akkumulation der Cld5-Mutanten konsistent (Abb. 3.18 B und C). Sechs der neun Intrazellulärtyp-Mutanten ließen sich mit dem Modell in Übereinstimmung bringen, darunter die Mutanten D149A, P150A, V152A, P153A, K157A, K157M und L160A (Abb. 3.18 B). Die Wildtyp-Aminosäurereste dieser Positionen stabilisieren die *turn*-Konformation. Im Monomermodell bilden D149 und K157 eine Wasserstoffbrücke, die die Schleifen-/*turn*-Struktur stabilisiert. Darüber hinaus bildet D149, zusammen mit den beiden Prolinen, die für

3. Ergebnisse

die Biegung der *turn*-Struktur notwendig sind, den Abschluss der Helices. V152 und L160 bilden den hydrophoben Kern zwischen dem *turn* und den beiden Helices. Die Aminosäurereste E146 und E159, die in den Alaninsubstitutionen ebenfalls einen intrazellulären Phänotyp bewirken, zeigen im Monomermodell nach außen. Möglicherweise interagieren diese Seitenketten mit anderen Teilen von Cld5 (z. B. 1.EZS), was das beobachtete Faltungsproblem erklären würde.

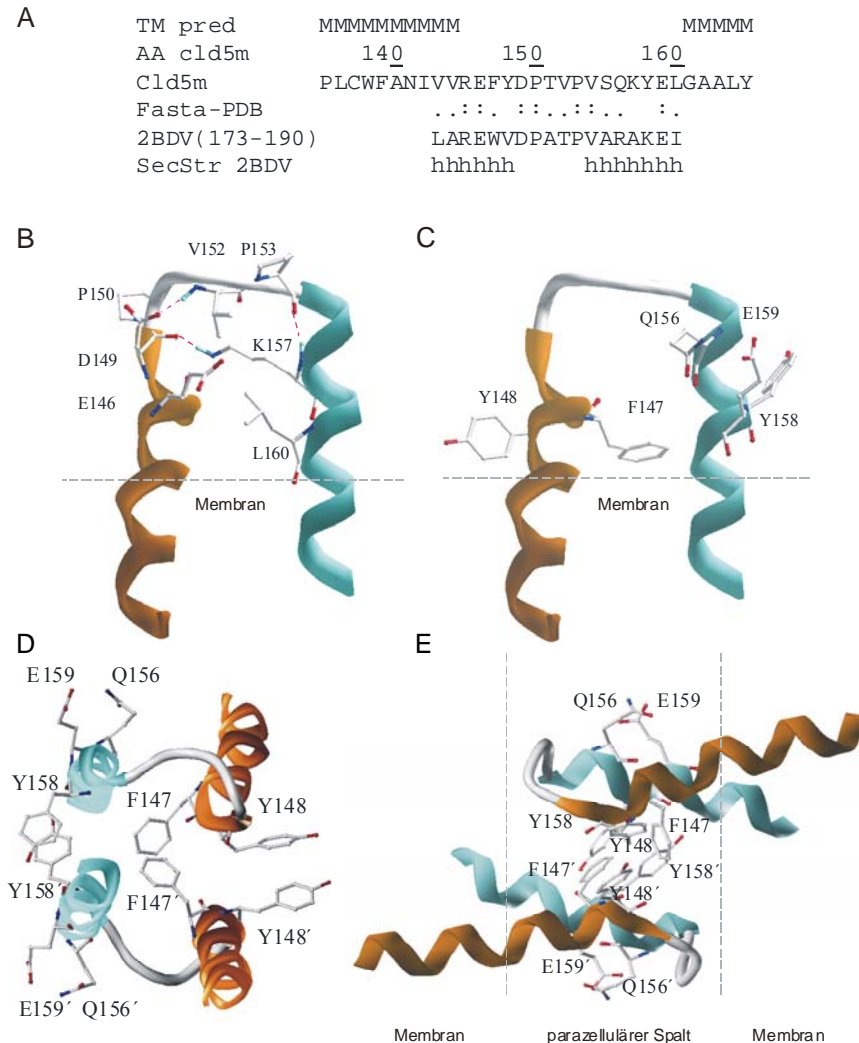


Abb. 3.18: Molekulares Monomer- und Dimermodell der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5.

A: Sequenzalignment der 2.EZS von Cld5 (Cld5-Maus; AS 135-165) und des hypothetischen Proteins BB2244 (AS 173-190) aus *Bordetella bronchiseptica*. Die identifizierte Struktur zeigt eine hohe Sequenzähnlichkeit zu der 2.EZS von Cld5 (Fasta-PDB; (:)= identisch; (.)= ähnlich). Die Transmembranregionen (M) von Cld5 sind den Angaben der Swissprot-Datenbank entnommen (TM pred). Aminosäuren die an der helikalen Sekundärstruktur der Strukturvorlage 2BDV (SecStr 2BDV) beteiligt sind, werden durch ein „h“ gekennzeichnet. **B-E:** Homologie-Modell basierend auf der Helix-*turn*-Helix-Struktur des 2BDV-Fragments. Helix-3 (orange) und Helix-4 (cyan) sind vermutlich extrazelluläre Verlängerungen der Transmembranhelices TMH3 und TMH4 (teilweise unterhalb der gestrichelten Linie in **B**, **C** und **E** angedeutet). Das Monomermodell zeigt die zu 2BDV homologe Orientierung der Seitenketten der Aminosäurereste (**B**), die die *turn*-Konformation stabilisieren und in den Mutanten des intrazellulären Typs die Proteinfaltung stören. Die Reste der fünf Aminosäuren, die in den Mutanten vom *disjunction*-Typ die *trans*-Interaktion stören, sind in dem Modell nach außen gerichteten (**C**). Die drei Aminosäuren F147, Y148 und Y158 bilden auf der einen Seite der 2.EZS eine aromatische Kontaktfläche, die in dem Dimermodell (**D**, **E**) mit der aromatischen Kontaktfläche einer weiteren 2.EZS einen aromatischen Kern ausbilden können. Die Aminosäurereste Q156 und E159 sind auf der gegenüberliegenden Seite der Schleife zu finden. **D:** Aufsicht auf das Dimermodell. **E:** Seitenansicht des Dimermodells.

3.7.2 Dimermodell der intermolekularen Interaktionen der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-5

Das Dimermodell (Abb. 3.18 D, E) wurde aus acht möglichen antiparallelen Orientierungen ausgewählt, da es die höchste Anzahl an intermolekularen Seitenketteninteraktionen aufweist. Experimentell wurden die Mutanten des *disjunction*-Typ für die *trans*-Interaktion der 2.EZS von Cld5 als bedeutend identifiziert. Die Seitenketten dieser Aminosäuren (in der Cld5_{wt}-Sequenz) deuten im Monomermodell nach außen (Abb. 3.18 C). Dabei bilden die hydrophoben Seitenketten von F147, Y148 und Y158 eine aromatische Kontaktfläche auf einer Seite der 2.EZS aus, die im Dimer mit der antiparallel zugewandten aromatischen Kontaktfläche der zweiten Schleife wechselwirkt (Abb. 3.18 D, E). Demgegenüber liegen die hydrophilen Aminosäurereste Q156 and E159 deren Interaktionspartner in einem Dimermodell der 2.EZS nicht erfasst wird und deren Identität ungeklärt ist (Abb. 3.18 D, E).

3.8 Analyse der Bindung von *Clostridium perfringens* Enterotoxin an Claudin-3 und Claudin-5

Für die Claudine 3, 4, 6, 7, 8 und 14 wurde CPE als Interaktionspartner beschrieben, der jedoch nicht an die Claudine 1, 2, 5 und 10 bindet (Fujita *et al.*, 2000). In dieser Arbeit sollte die Analyse der Wechselwirkung zwischen CPE und der 2.EZS von Cld3 und Cld5 Aufschluss über Details dieser Interaktion liefern.

3.8.1 Expression und Reinigung von *Clostridium perfringens* Enterotoxin

GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ (49,3 kDa) und GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ (30,1 kDa), die jeweils die Cld-Interaktionsdomäne nicht jedoch den zytotoxischen Teil von CPE enthalten, sowie GST (26,5 kDa) wurden in *E. coli* BL21 exprimiert, geerntet und lysiert. Nach affinitätschromatographischer Reinigung wurden die Reinigungsfractionen im SDS-Polyacrylamidgel analysiert (siehe Anhang 8.2), CPE-enthaltende Elutionsfractionen ankonzentriert und gegen PBS-CM dialysiert. 50 µg von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉, GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ oder GST wurden zur Molekulargewichtsbestimmung durch Größenausschlusschromatographie analysiert. Die Hauptfractionen beider CPE-Proteine eluierten nahe dem Ausschlussvolumen (V_0) von der Säule. GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ und GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ bildeten Aggregate mit >40-fachen bzw. >60-fachen Molekulargewicht des jeweiligen Monomers (Tab. 3.4). Trotzdem waren die CPE-Proben mit einer Konzentration von 1 mg/ml löslich, da sie nach Zentrifugation (20.000 x g) im Überstand zu finden waren. Neben den Absorptionsmaxima nahe dem Ausschlussvolumen eluierte in Experimenten beider CPE-Proteine eine weitere Fraction bei einem

3. Ergebnisse

Elutionsvolumen von ca. 15,3 ml von der Säule. Da GST bei gleichem Elutionsvolumen die Säule passiert (Tab. 3.4), kann angenommen werden, dass es sich bei den Absorptionsmaxima (bei 15,3 ml) der beiden CPE-Proteine um ein GST-Abbauprodukt handelte. GST eluierte mit dem kalkulierten Molekulargewicht eines Dimers von der Säule.

Tab. 3.4: Durch Größenausschlusschromatographie bestimmte Mittelwerte der Elutionsvolumina, K_{av} -Werte und Molekulargewichte von GST-CPE-Proteinen

Protein	kDa	n	V_e in ml	K_{av}	kalk. kDa	x-fach Monomer
GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉	49,3	6	8,8	0,02	>2000	>40
		5	15,4	0,14	48,5	0,98
GST-CPE ₂₉₀₋₃₁₉	30,1	4	8,7	0,01	>2000	>60
		4	15,3	0,55	50,3	1,67
GST	26,5	7	15,3	0,55	50,1	1,89

n: Anzahl der Experimente; V_e : Elutionsvolumen; kalk. kDa: kalkuliertes Molekulargewicht in kDa

3.8.2 Bindung von *Clostridium perfringens* Enterotoxin an Claudin-3 und -5 transfizierte HEK-293-Zellen

Um die Cld-CPE-Interaktion unabhängig von anderen TJ-Proteinen in Zellen zu analysieren, wurden transfizierte, TJ-lose HEK-293-Zellen durch Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. In Zellen, die mit Cld3_{wt} transfiziert wurden, kam es nach Inkubation der Zellen mit GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ (Abb. 3.19 A1-A3) oder GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ (Abb. 3.19 B1-B3) zur Bindung der CPE-Proteine an die Zelloberfläche Cld-exprimierender Zellen. An nicht Cld-exprimierende Zellen im selben Ansatz wurde keine Bindung von CPE nachgewiesen. Für Cld3_{wt}-transfizierte Zellen war die Intensität der Fluoreszenz von gebundenem GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ (bei gleichen mikroskopischen Einstellungen) deutlich schwächer als die Fluoreszenzintensität von gebundenem GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉. GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ interagiert ebenfalls mit Cld5_{wt}-YFP transfizierten Zellen, jedoch tendenziell schwächer als mit Cld3_{wt}-YFP transfizierten Zellen (Abb. 3.19 C1-C3). Für GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ ließ sich keine oder nur eine sehr schwache Interaktion an Cld5_{wt}-YFP-exprimierende Zellen nachweisen (Abb. 3.19 D1-D3). Die Fluoreszenz, die dennoch für GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ zu sehen ist, stellt ein Überstrahlen starker Cld5-YFP-Signale in den Cy3-Kanal dar, da die Filtersätze nicht optimal gewählt wurden. GST-Bindung wurde weder an Cld3_{wt}- noch an Cld5_{wt}-YFP-transfizierte Zellen nachgewiesen (Abb. 3.19 E1-E3). Die Bindung von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ und GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ erfolgte nicht an die Cld3- oder Cld5-Kontakte, sondern an freies Cld in der Plasmamembran (Abb. 3.19 A1-C3).

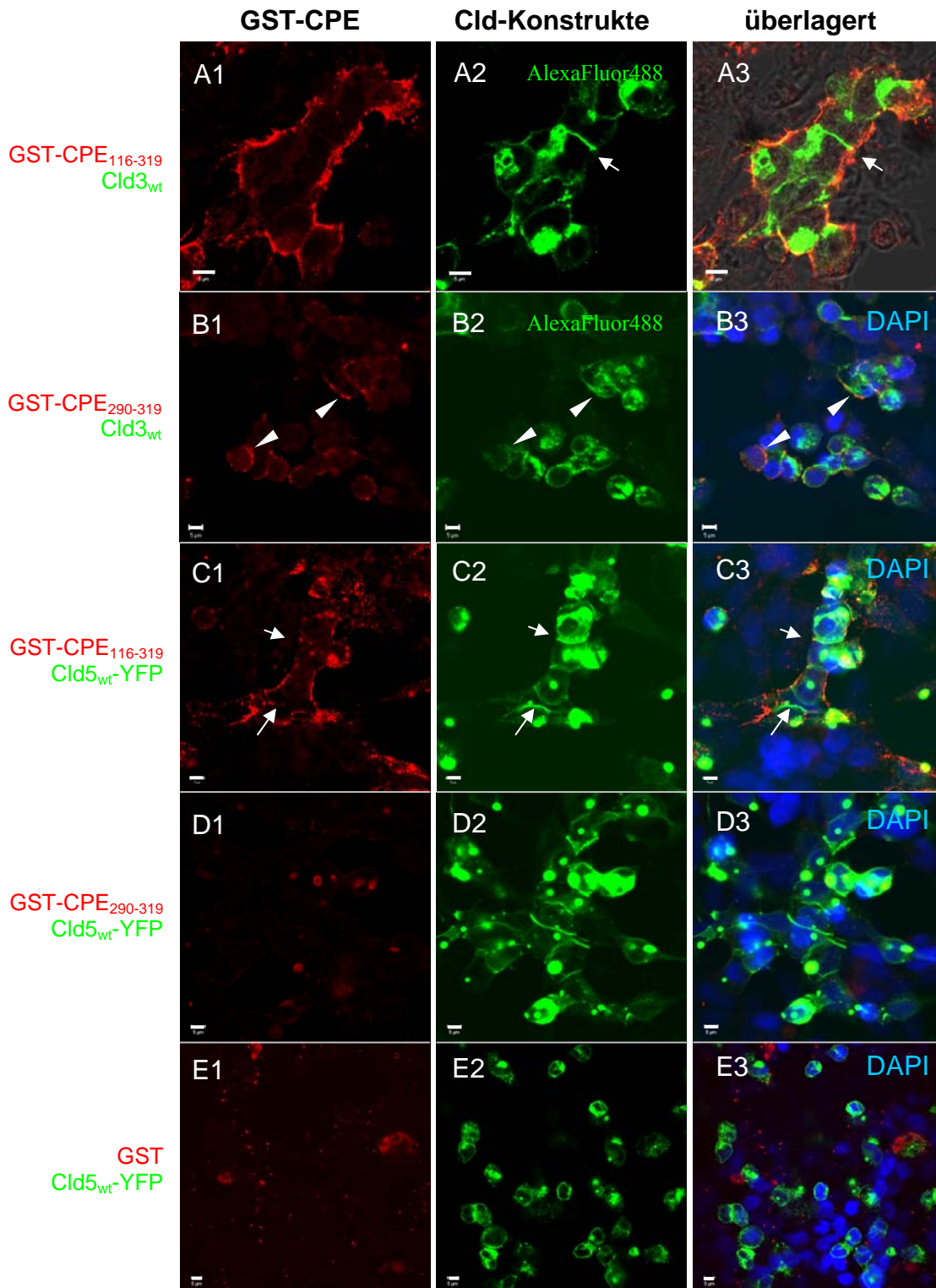


Abb. 3.19: Immunfluoreszenzfärbungen der *Clostridium perfringens* Enterotoxin-Bindung an Claudin-exprimierende HEK-293-Zellen. In HEK-293-Zellen, die mit Cld5_{wt}-YFP oder Cld3_{wt} transfiziert wurden, kam es nach Inkubation mit 10 μg/ml GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ für 1 h bei 37 °C zur Bindung von GST-CPE an alle Cld-exprimierenden Zellen, während Zellen, die keine Expression zeigten, auch keine Bindung aufwiesen (**A1-A3; C1-C3**). GST-CPE band an freies Cld auf der Zelloberfläche nicht jedoch in Cld-Kontakten (Pfeile). Für Cld3_{wt}-transfizierte Zellen konnte eine schwache Bindung von GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ beobachtet werden (**B1-B3**, Pfeilköpfe). GST und GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ zeigten keine Bindung an Cld5_{wt}-YFP-transfizierte Zellen (**E1-E3** bzw. **D1-D3**). Gebundene GST-Proteine wurden durch MaGST/GaM-Cy3 (rot) nachgewiesen (**A1, B1, C1, D1, E1**). Cld5_{wt}-YFP wurde durch die YFP-Eigenfluoreszenz (grün) und Cld3_{wt} durch RαCld3/GaR-AlexaFluor488-Färbung (grün) detektiert (**A2, B2, C2, D2, E2**). Zellkerne, die durch DAPI (blau) markiert wurden, sind im Überlagerungsbild zu sehen (**B3, C3, D3, E3**). Zellen, die kein Cld3_{wt} exprimierten, sind in **A1-A3** durch Phasenkontrast im Überlagerungsbild sichtbar gemacht. Balken entsprechen 5 μm.

3.8.3 Rekombinant exprimierte Konstrukte der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-3 interagieren mit *Clostridium perfringens* Enterotoxin

In weiteren Experimenten sollte die Frage geklärt werden, ob GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ mit der separierten 2.EZS von Cld5 interagiert. Daher wurden gereinigtes MBP-Cld5₁₃₆₋₁₆₇, MBP-Cld3₁₃₇₋₁₆₆, MBP-Cld3₁₄₀₋₁₆₁ und MBP in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abb. 3.20 B) und anschließend mit Coomassie-Färbelösung gefärbt oder auf eine Transfermembran (PVDF) transferiert. Die Membran wurden mit 10 µg/ml gereinigtem GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ inkubiert und gebundenes GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ durch einen MαGST-Antikörper nachgewiesen. Es wurde eine Bindung von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ an MBP-Cld3₁₃₇₋₁₆₆ und MBP-Cld3₁₄₀₋₁₆₁ nicht aber an MBP und MBP-Cld5₁₃₆₋₁₆₇ detektiert (Abb. 3.20 A). In dem Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel ließen sich die vier MBP-Konstrukte bei einem Molekulargewicht von ca. 45 kDa nachweisen (Abb. 3.20 B), welches mit dem Molekulargewicht der Bande im Immunoblot (Abb. 3.20 A, Pfeil) übereinstimmt. Zudem wurde der Immunoblot-Bindungstest in umgekehrter Richtung durchgeführt. Gereinigtes MBP-CPE₁₁₆₋₃₁₉ (65,7 kDa), durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Färbelösung gefärbt, zeigte im Gel eine Bande von ca. 60 kDa (Abb. 3.20 D). MBP-CPE₁₁₆₋₃₁₉ wurde auf eine PVDF-Membran transferiert und mit 10 µg/ml mit GST-Cld3₁₃₇₋₁₆₆ inkubiert. Die Membran zeigte eine durch MαGST-Antikörper hervorgerufene Färbung, die die Interaktion der beiden Proteine belegt (Abb. 3.20 C).

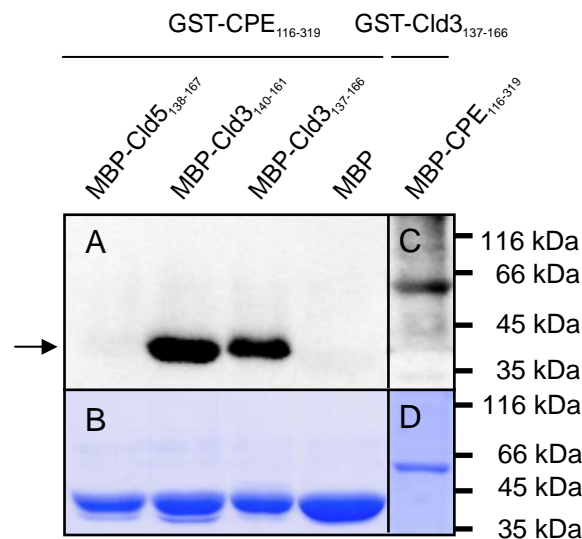


Abb. 3.20: Immunoblot-Bindungstest mit rekombinanten Fusionsproteinen von *Clostridium perfringens* Enterotoxin und der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-3 und Claudin-5.

A: Die Proteine MBP-Cld5₁₃₈₋₁₆₇, MBP-Cld3₁₄₀₋₁₆₁, MBP-Cld3₁₃₇₋₁₆₆ und MBP wurden in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit 10 µg/ml GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ inkubiert. Die Bindung von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ an MBP-Proteine wurde durch MαGST nachgewiesen. CPE bindet an die 2.EZS von Cld3, nicht jedoch an die 2.EZS von Cld5 und MBP. Der Pfeil weist auf die immunreaktiven Signale von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ bei einem Molekulargewicht der MBP-Fusionsproteine der 2.EZS (45 kDa). **C:** Gereinigtes MBP-CPE₁₁₆₋₃₁₉ wurde durch eine SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert, mit 10 µg/ml GST-Cld3₁₃₇₋₁₆₆ inkubiert und die Bindung von GST-Cld3₁₃₇₋₁₆₆ an MBP-CPE₁₁₆₋₃₁₉ mit MαGST nachgewiesen. Die zu A bzw. C korrespondierenden Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgele sind in B bzw. D gezeigt.

3.8.4 Identifikation der mit *Clostridium perfringens* Enterotoxin interagierenden Claudine mittels membrangebundener Peptidbibliotheken

Der Swiss-Prot-Datenbank (<http://www.expasy.uniprot.org>) wurden die Sequenzen der 2.EZS der Claudine 1 bis 16, 18, 19 und 22 der Maus sowie Cld20 des Menschen entnommen. Für Cld20 wurde bisher keine Mausvariante identifiziert. Entsprechend dieser Sequenzen wurden Peptide (20mer) auf eine Zellulosemembran synthetisiert. Die Membranen wurden mit MBP-CPE₁₁₆₋₃₁₉ oder MBP bzw. GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ oder GST inkubiert. Gebundene MBP- oder GST-Proteine wurden durch M α GST bzw. R α MBP nachgewiesen (Abb. 3.21) und die Chemilumineszenz der *Spots* quantifiziert (siehe Kap. 2.3.6). Die Δ BLU-Wert für Cld3 wurde als 1,0 gesetzt und die übrigen *Spots* auf den Cld3-*Spot* bezogen (% Cld3, Tab. 3.5). Sowohl MBP-CPE₁₁₆₋₃₁₉ als auch GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ zeigten eine Bindung an die Peptide der Claudine 3, 6, 7, 9 und 14, wobei Cld6 und Cld9 mit ähnlicher Intensität wie Cld3 mit CPE interagierten. Cld7 und Cld14 wiesen eine schwächere Bindung auf (Tab. 3.5, Abb. 3.21). An alle übrigen Claudine, einschließlich Cld4, Cld5 und Cld8, war keine CPE-Bindung festzustellen. MBP und GST interagierten nicht mit den Cld-Peptiden der *Spots*. Die unspezifische Bindung der CPE-Fusionsproteine an die Zellulosemembran war stärker als die Bindung an die *Spots* der Claudine 4, 5, 8, 10-13 und 15-22, welches durch die stärkere Graufärbung des Hintergrunds sichtbar wurde (Abb. 3.21) und sich in der Quantifizierung durch negative Δ BLU-Werte widerspiegelt (Tab. 3.5). Die Δ BLU-Werte der *Spots* die keine Interaktion mit CPE₁₁₆₋₃₁₉ zeigten, lagen daher teilweise unter Null und erreichten maximal 18 % des Δ BLU-Wertes des Cld3-Spots (Tab. 3.5).

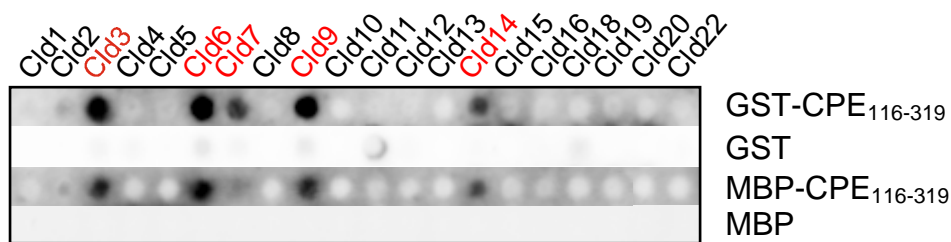


Abb. 3.21: Interaktion von CPE₁₁₆₋₃₁₉ mit Peptiden der zweiten extrazellulären Schleife der Claudine.

Peptide der 2.EZS der Claudine -1 bis -16, -18 bis -20 und -22 wurden auf eine Zellulosemembran synthetisiert, mit 10 μ g/ml GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉, GST, MBP-CPE₁₁₆₋₃₁₉ oder MBP inkubiert und durch M α GST oder R α MBP detektiert. MBP-CPE₁₁₆₋₃₁₉ und GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ banden an die *Spots* der Peptide der 2.EZS von Cld3, Cld6, Cld7, Cld9 und Cld14. MBP oder GST zeigten hingegen keine Bindung an die *Spots*. Die Chemilumineszenz der *Spots* wurde im Lumi-Imager F1TM (Boehringer Mannheim GmbH) detektiert und in Form von *Boehringer light units* (BLU) quantifiziert. Von den BLU-Werten der CPE-inkubierten Membranen wurden die BLU-Werte der Hintergrundintensität der Membranen sowie der GST- bzw. MBP-Kontrollen abgezogen. Die Δ BLU-Werte der *Spots* sind in Tab. 3.5 dargestellt.

3. Ergebnisse

Tab. 3.5: Quantifizierung der CPE₁₁₆₋₃₁₉-Bindung an Peptide der zweiten extrazellulären Schleife der Claudine

Cld-Variante	Art	Peptidsequenz	MBP-CPE ₁₁₆₋₃₁₉		GST-CPE ₁₁₆₋₃₁₉	
			ΔBLU	% Cld3	ΔBLU	% Cld3
Cld1	Maus	NRIVQEFYDPLTPINARYEF	-6967	-0,03	-147010	-0,15
Cld2	Maus	HGILRDFYSPLVPDSMKFEI	49215	0,18	20790	0,02
Cld3	Maus	NTIIRDFYNPLVPEAQKREM	277921	1,00	983804	1,00
Cld4	Maus	HNVIIRDFYNPMVASGQKREM	19950	0,07	6212	0,01
Cld5	Maus	NIVVREFYDPTVPVSQKYEL	23465	0,08	19531	0,02
Cld6	Maus	HSIIQDFYNPLVADAQKREL	349235	1,26	1394354	1,42
Cld7	Maus	HQIVTDFYNPLTPMNVKYEYF	136985	0,49	588956	0,60
Cld8	Maus	NSIIRDFYNPLVDVALKREL	-4215	-0,02	-23636	-0,02
Cld9	Maus	HAIIQDFYNPLVAEALKREL	286353	1,03	1249972	1,27
Cld10	Maus	NKITTEFFDPLYMEQKYELG	-7238	-0,03	-143560	-0,15
Cld11	Maus	WFPVCAHREITIVSFGYSLY	25552	0,09	-271831	-0,28
Cld12	Maus	WAIIFYNSHLNRKFEPVFSFD	3913	0,01	-136329	-0,14
Cld13	Maus	HNI IHGFFNPLLGFSGKKVQM	-15653	-0,06	-159739	-0,16
Cld14	Maus	NDVVQNFYNPLLLPSGMKFEI	198720	0,72	519789	0,53
Cld15	Maus	VNITTDFFNPLYAGTKYELG	9168	0,03	58103	0,06
Cld16	Maus	VDVYVERSSLVHLNIFLGIQ	36124	0,13	-99801	-0,10
Cld18	Maus	MYSGMGGMGMVQTVQTRYT	-6914	-0,02	-142937	-0,15
Cld19	Maus	TLVTQEFFNPSTPVNARYEF	2030	0,01	-27809	-0,03
Cld20	Human	TKEIIANFLDLTVPEESNKHE	-24064	-0,09	-85962	-0,09
Cld22	Maus	HKTVREFWDETMPEIVPRWE	-18729	-0,07	-100866	-0,10

3.8.5 Analyse der Interaktion zwischen *Clostridium perfringens* Enterotoxin und Peptiden von Claudin-3 und -5 durch Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie

Ein Peptid der 2.EZS von Cld3 (Cys-(ACP)-NTIIRDFYNPLVPEAQKREM) wurde an die Dextranschicht eines CM5-Sensorchips (Biacore AB) gebunden. Die immobilisierte Menge des Peptids betrug ~1600 RU (ca. 0,6 pM). In Abbildung 3.22 A bzw. B sind die Assoziations- und Dissoziationsphasen der Bindung von (0,01 μM; 0,10 μM; 0,25 μM; 0,50 μM und 1,00 μM) GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ (Abb. 3.22 B) bzw. GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ (Abb. 3.22 A) an dieses Cld3_{wt}-Peptid dargestellt. Den Sensogrammen ließ sich für jede Konzentration von GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ und GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ die maximale Assoziation (Abb. 3.22 A und B, gepunktete Linien) in ΔRU entnehmen und in Stoffmenge (mol) umrechnen. Im Säulendiagramm wurden die maximal an die Cld3_{wt}-Peptide gebundenen Stoffmengen gegenüber den entsprechenden Konzentrationen von GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ oder GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ aufgetragen (Abb. 3.22 C). GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ (dunkelblaue Säulen) und GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ (hellblaue Säulen) zeigten eine konzentrationsabhängige Bindung an das immobilisierte Peptid der 2.EZS von Cld3. Im Vergleich zu GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ banden bei gleichen Konzentrationen wesentlich höhere Stoffmengen von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ an die Chipoberfläche (Abb. 3.22 C). Die Affinität der Bindung von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ an die 2.EZS von Cld3 ist daher

3. Ergebnisse

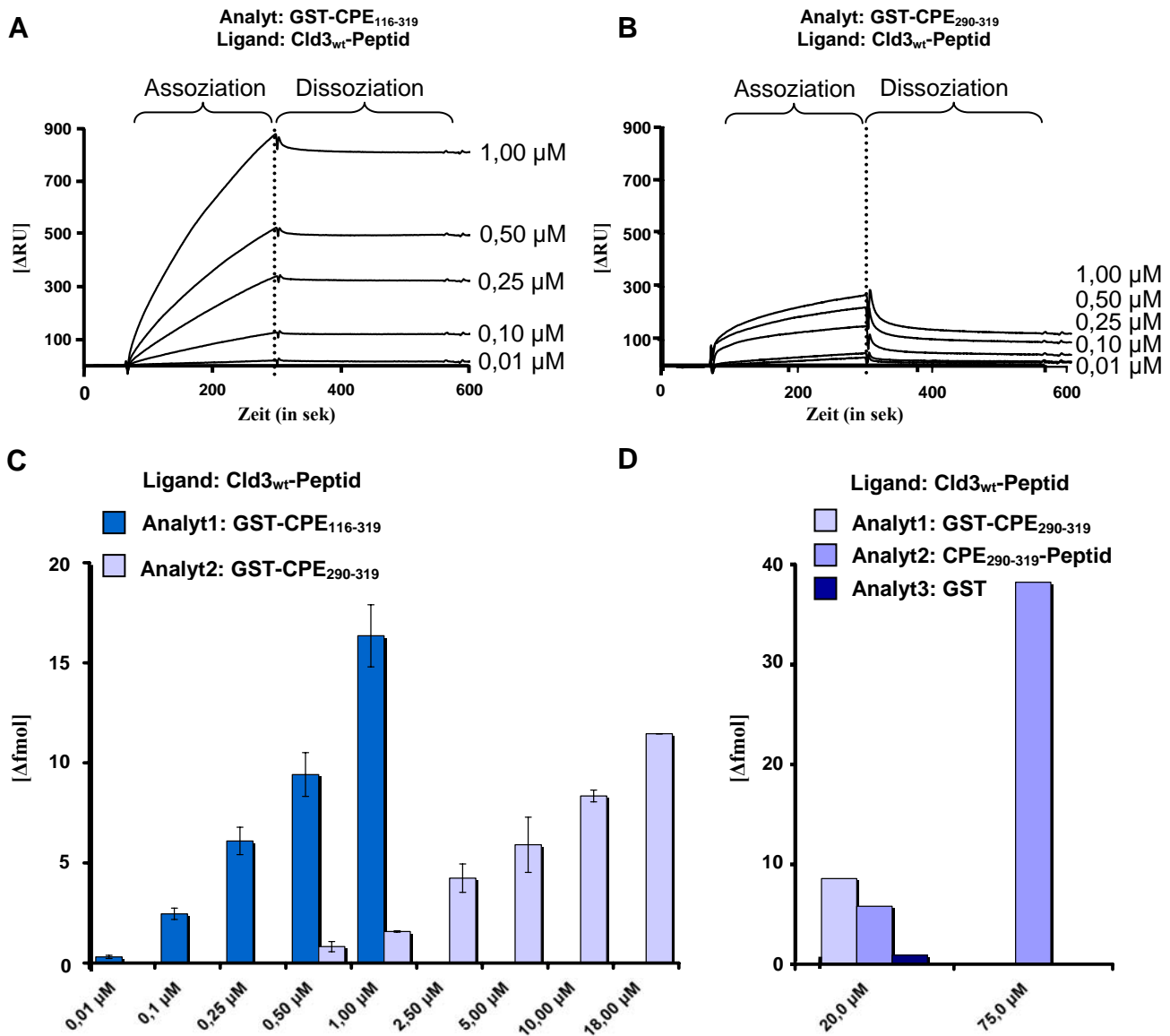


Abb. 3.22: Analyse der Bindung von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ und GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ an Cld3₁₄₀₋₁₅₉ durch Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie.

Cys-(ACP)-Cld3₁₄₀₋₁₅₉ (1600 RU), C-terminal durch Thiolkopplung an einen CM5-Sensorchip gekoppelt, wurde mit GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ (A) oder GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ (B) inkubiert und der zeitliche Verlauf der Bindung im Sensogramm aufgezeichnet. Assoziations- und Dissoziationsphase sind durch eine geschweifte Klammer gekennzeichnet. Die gepunkteten Linien deuten die maximalen Δ RU der Proteinkonzentrationen an. Die durchschnittlichen, maximalen Δ RU von mindestens drei unabhängigen Experimenten für die verschiedenen Proteinkonzentrationen von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ und GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ im Säulendiagramm dargestellt, verdeutlichen die höhere Affinität mit der GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ gegenüber GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ an Cld3₁₄₀₋₁₅₉ bindet (C). Fehlerbalken in C geben die Standardabweichung (SD) an. In D sind die maximalen Δ RU-Werte der Bindung von 20 μ M (bzw. 75 μ M) GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉, CPE₂₉₀₋₃₁₉-Peptid und GST an Cld3₁₄₀₋₁₅₉ dargestellt (zwei Experimente). Die Bindung des CPE₁₁₆₋₃₁₉-Peptids an Cld3₁₄₀₋₁₅₉ war konzentrationsabhängig, wie die Bindung von 20 μ M und 75 μ M zeigte (D). Säulenfarbe: ■ GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉; □ GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ □ CPE₂₉₀₋₃₁₉-Peptid ■ GST.

deutlich höher als die Affinität von GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉. GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ zeigte außerdem eine sehr langsame Dissoziation (Abb. 3.22 A).

Eine Interaktion wurde auch zwischen einem synthetisierten CPE₂₉₀₋₃₁₉-Peptid (3,5 kDa) und dem immobilisierten Cld3_{wt}-Peptid beobachtet (Abb. 3.22 D). Bei einer Konzentration von

3. Ergebnisse

20 μM (20 μM : 5,80 fmol (ΔRU 20,3); 75 μM : 38,21 fmol (ΔRU 133,8); $n = 2$) waren die an das Cld3_{wt}-Peptid gebundenen Stoffmengen des CPE₂₉₀₋₃₁₉-Peptids und von GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ vergleichbar, welches auf eine ähnlich hohe Affinität schließen lässt. GST (22,6 μM) zeigte hingegen keine Bindung an das Cld3_{wt}-Peptid (Abb. 3.22 D).

In Einzelexperimenten wurde die Interaktion von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ und GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ mit immobilisierten Peptiden der 2.EZS von Cld3 (Cys-(ACP)-NTIIRDFYNPLVPEAQKREM), von Cld5 (Cys-(ACP)-NIVVREFYDPTVPVSQKYEL) und einer Cld3-Mutante (Cys-(ACP)-NTIIRDFYDPTVPEAQKREM) verglichen. Die immobilisierte Menge der Peptide betrug für Cld3 ca. 500 RU (0,189 pM) und Cld5 ca. 300 RU (0,111 pM) sowie für die Cld3-Mutante ca. 250 RU (0,094 pM). Während sowohl GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ als auch GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ eine konzentrationsabhängige Bindung an das Cld3_{wt}-Peptid zeigten, ließ sich auch bei einer Konzentration von 20 μM keine Bindung an das Cld5_{wt}-Peptid und das mutierte Cld3-Peptid nachweisen (Abb. 3.23 A und B).

Die Errechnung der Bindungskonstanten für die Interaktion der 2.EZS von Cld3 mit GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ und GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ war allerdings nicht möglich, da die Zahl der Moleküle in den GST-CPE- Oligomeren unbekannt und vermutlich nicht konstant war (siehe Kap. 3.8.1).

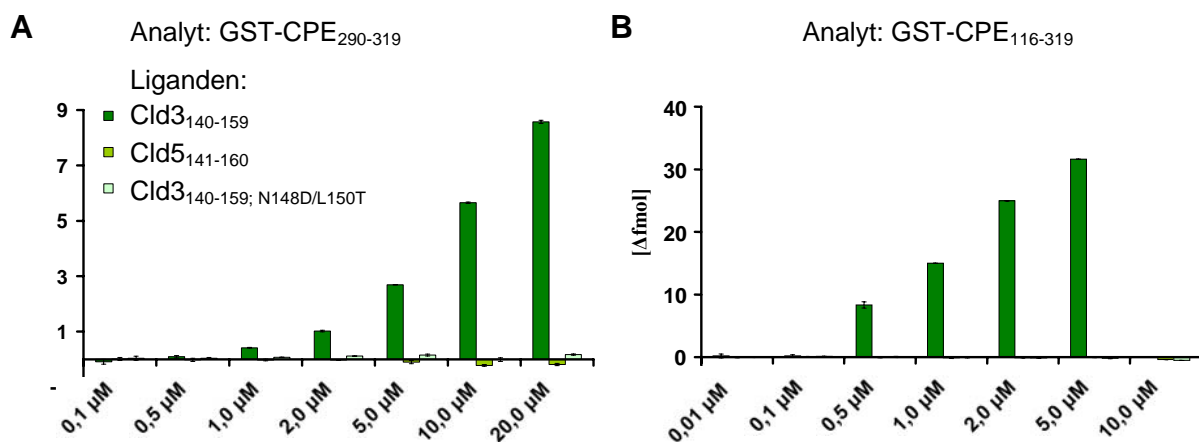


Abb. 3.23: Analyse der Bindung von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ und GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ an Peptide von Claudin-3 und Claudin-5 durch Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie.

Peptide von Cld3₁₄₀₋₁₅₉ (~500 RU), Cld5₁₄₁₋₁₆₀ (~300 RU) und Cld3_{140-159; N148D/L150T} (~250 RU) wurden C-terminal durch Thiolkopplung an einen CM5-Sensorchip gekoppelt. Diese Liganden wurden mit verschiedenen Konzentrationen GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ und GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ inkubiert und der zeitliche Verlauf der Bindung im Sensogramm aufgezeichnet. In **A** sind die maximalen ΔRU -Werte der Bindung von GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ und in **B** von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ verschiedener Konzentrationen an die immobilisierten Peptide dargestellt. Weder GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ noch GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ zeigte eine Bindung an das mutierte Cld3- und an das Cld3_{wt}-Peptid (einführende Experimente, $n \leq 2$). Die Fehlerbalken geben die Schwankungsbreite an.

3.8.6 Molekulare Determinanten der Interaktion zwischen *Clostridium perfringens* Enterotoxin und der zweiten extrazellulären Schleifen von Claudinen

Die vorangegangenen Experimente zeigten keine Bindung von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ und GST-CPE₂₉₀₋₃₁₉ an Peptide und Fusionsproteine der 2.EZS von Claudinen, die in der *turn*-Region

von der Sequenz DFYNPL_{xz} (x = T, L, V; z = P, A) abweichen. Die Bindung von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ an Cld5-exprimierende Zellen (*turn*-Region: DFYDPTVP) deutet jedoch darauf hin, dass zwischen den Peptiden der 2.EZS und dem Cld-Komplettprotein in Zellen ein bindungsrelevanter, struktureller Unterschied besteht. Um Aminosäurepositionen in der 2.EZS von Claudinen zu identifizieren, die direkt in die Cld-CPE-Interaktion involviert sind, wurde nachfolgend die CPE-Bindung an Cld-Peptide mit der Bindung von CPE an Cld-exprimierende HEK-293-Zellen verglichen.

3.8.6.1 Die Bindung von *Clostridium perfringens* Enterotoxin an Mutanten von Claudin-3 und Claudin-5 in HEK-293-Zellen

Für die Analyse der Bindung von CPE an Cld-exprimierende HEK-293-Zellen wurden die Cld3- und Cld5-Konstrukte der Mutanten verwendet, die bereits für die Cld-Cld-Interaktion charakterisiert wurden (3.3.2).

Nach Inkubation mit GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ zeigten HEK-293-Zellen, die mit Cld5-Mutanten des TJ-Typs transfiziert waren, eine ähnlich starke GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Bindung wie Zellen, die mit Cld5_{wt}-YFP (Abb. 3.19 C1-C3) transfiziert waren. Exemplarisch ist in Abbildung 3.24 (A1-A3) die Bindung von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ an Cld5_{Q156A}-YFP-exprimierende Zellen dargestellt. Eine Ausnahme bildete die TJ-Typ-Mutante Cld5_{T151A}-YFP, die nur eine schwache Bindung von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ an die Zelloberfläche zeigte (Abb. 3.24 D1-D3). Die Mutanten des *disjunction*-Typs banden im Vergleich zum Wildtyp hingegen verstärkt GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ (exemplarisch F147A, Abb. 3.24 B1-B3), jedoch auch hier mit einer Ausnahme: Für Cld5_{Q156E}-YFP war lediglich eine schwache Bindung zu detektieren (Abb. 3.24 E1-E3). Die Mutanten des intrazellulären Typs zeigten eine schwache Zelloberflächenbindung von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉. Keine Bindung wurde für Cld5_{K157A}-YFP, Cld5_{K157M}-YFP und Cld5_{A163G/A185T}-YFP beobachtet (exemplarisch K157A, Abb. 3.24 C1-C3). Die Cld3-Mutanten (TJ-Typ) Cld3_{N148D} (Abb. 3.24 G1-G3) und Cld3_{N148A} (Abb. 3.24 F1-F3) interagierten ebenfalls mit GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉.

Die CPE-Bindung an die transfizierten HEK-293-Zellen ließ sich genauer im Immunoblot quantifizieren. Dazu wurden HEK-293-Zelllysate CPE-inkubierter Zellen im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Immunoblot analysiert. Die Cld5-Expressionsniveaus der einzelnen Mutanten wurde mittels eines Cld5-Antikörpers in Form von BLU-Werten im Immunoblot bestimmt (Expressionsniveau; Abb. 3.25 A, unterer Blot). Die gebundene GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Menge wurde mit Hilfe eines GST-Antikörpers im Immunoblot quantifiziert (Abb. 3.25 A; oberer Blot).

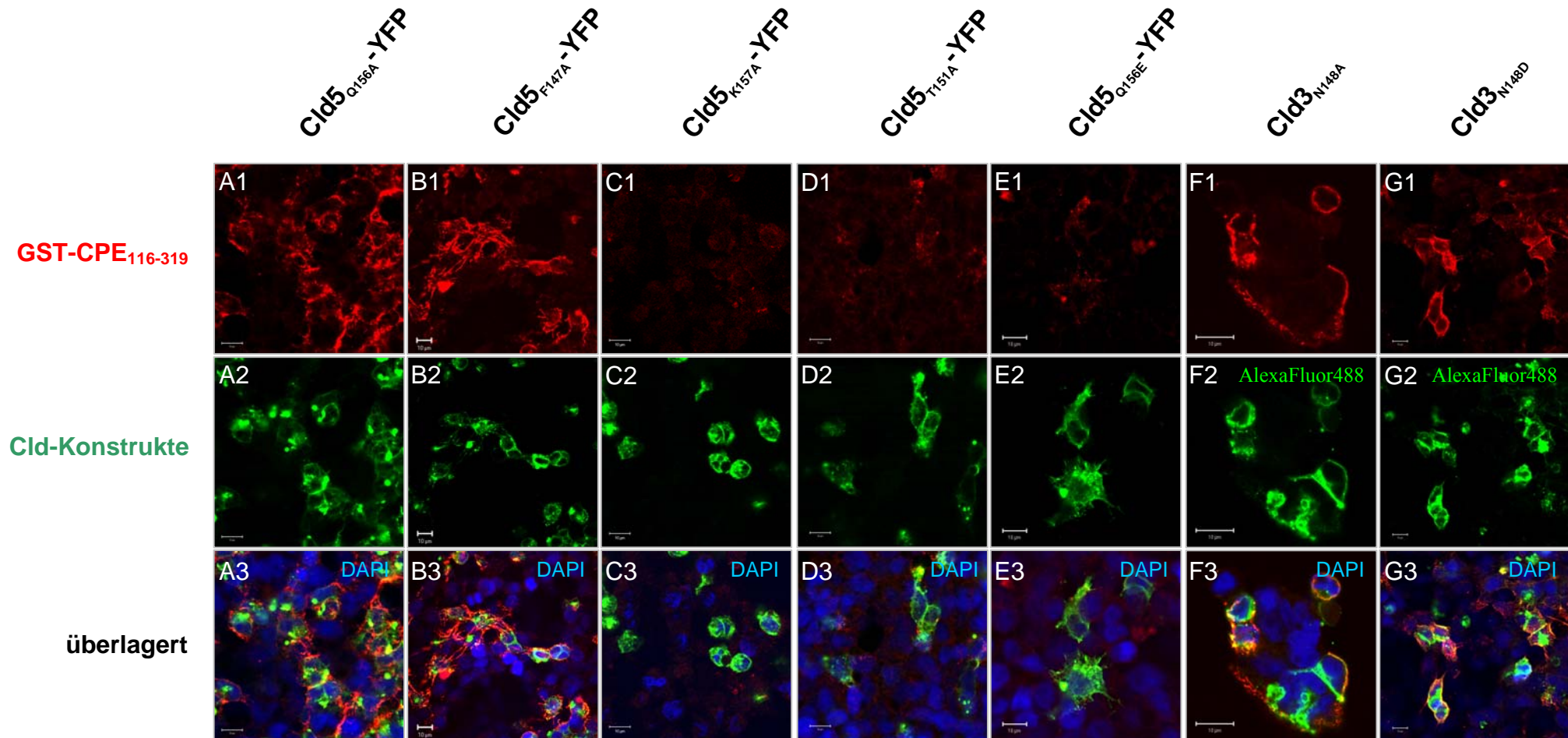


Abb. 3.24: Immunfluoreszenzfärbungen CPE-inkubierter HEK-293-Zellen, die mit Claudin-3- oder Claudin-5-Konstrukten transfiziert wurden.

Exemplarisch ist für jeden Phänotyp die Bindung von 10 µg/ml GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ an HEK-293-Zellen, die mit Konstrukten von Cld5_{Q156A}-YFP (**A1-A3**; TJ-Typ), Cld5_{F147A}-YFP (**B1-B3**; *disjunction*-Typ) und Cld5_{K157A}-YFP (**C1-C3**; Intrazellulärtyp) transfiziert wurden, gezeigt. Für GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ ließ sich eine Bindung an Cld5_{Q156A}-YFP und Cld5_{F147A}-YFP exprimierende Zellen nicht jedoch an Cld5_{K157A}-YFP beobachten. Die beiden Mutanten Cld5_{T151A}-YFP (**D1-D3**; TJ-Typ) und Cld5_{Q156E}-YFP (**E1-E3**; *disjunction*-Typ) zeigten hingegen keine Interaktion mit GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉. Die Cld5-Mutanten wurden durch ihre Eigenfluoreszenz (grün) nachgewiesen. Die Bindung von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ konnte auch an Zellen beobachtet werden, die beide Cld3-Mutanten, N148A (**F1-F3**) und N148D (**G1-G3**), exprimierten. In der Immunfluoreszenz wurden die Cld3-Mutanten durch α Cld3 und α R-AlexaFluor488 (grün) detektiert. Die Bindung von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ wurde durch MaGST und GaM-Cy3 (rot) nachgewiesen. Zellkerne wurden durch DAPI (blau) markiert und sind im Überlagerungsbild zu sehen. Balken entsprechen 10 µm.

3. Ergebnisse

Das Cld5-Expressionsniveau und die CPE-Bindung wurden jeweils auf Cld5_{wt} normalisiert und der Quotient aus beiden normalisierten Werten gebildet (CPE-Bindungsrate = rel. CPE-Bindung/rel. Expressionsniveau). An Mutanten des TJ-Typs banden demnach ähnliche Mengen GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ (1,05- bis 1,59-fach) wie an Cld5_{wt} (Abb. 3.25 A und B; grüne Säulen). Für die Mutanten des *disjunction*-Typs ergab sich eine CPE-Bindungsrate, die 1,4- bis 2,79-fach höher lag als die des Wildtyps. Die intermediäre Mutante Y158A erreichte eine CPE-Bindungsrate von 3,36 (Abb. 3.25 A und B; blaurote Säule). Eine gemischte

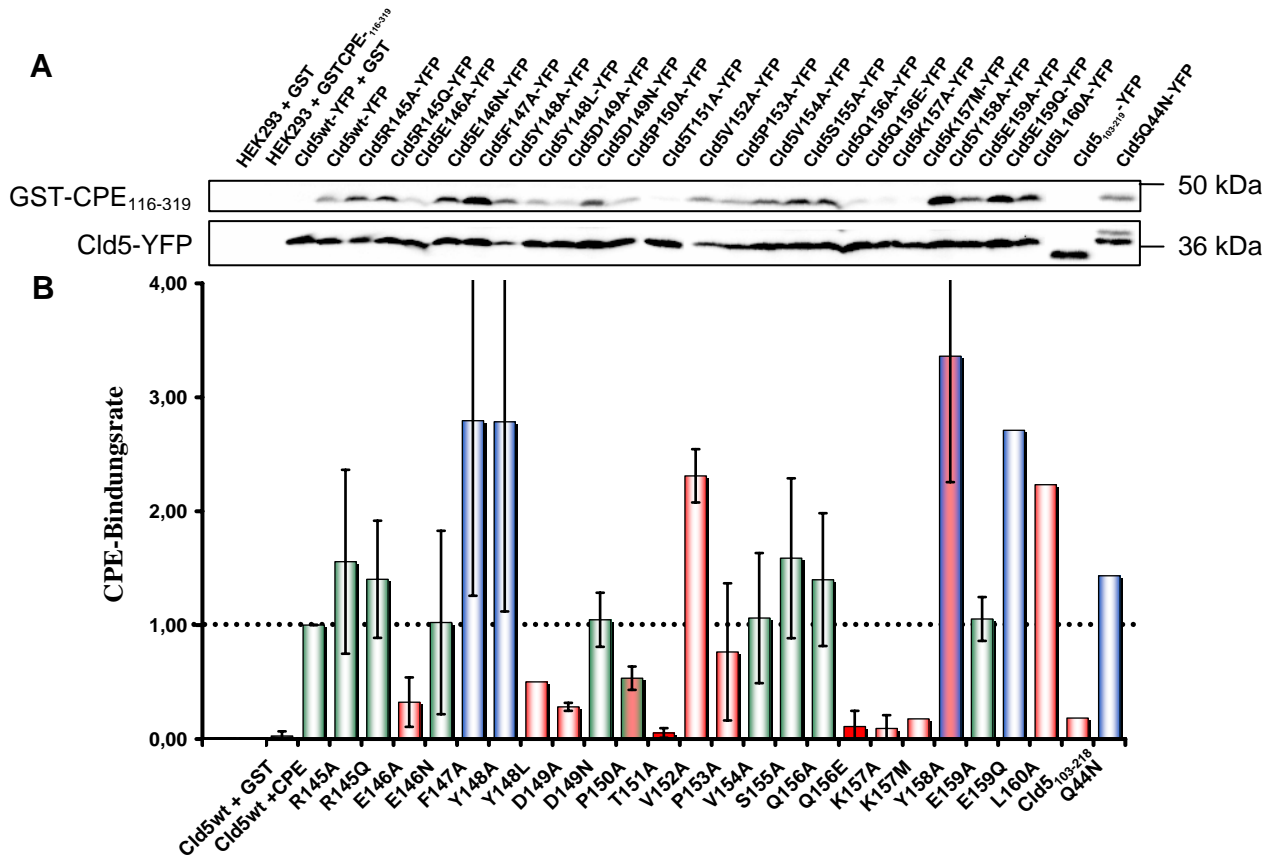


Abb. 3.25: Quantifizierung der Zelloberflächenbindung von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ an Claudin-5-Mutanten in HEK-293-Zellen im Immunoblot.

A: Beispiel eines Immunoblots zur Quantifizierung der Bindung von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ an HEK-293-Zellen. HEK-293-Zellen, die mit Cld5-YFP-Mutanten transfiziert waren, wurden mit GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ für 1 h bei 37 °C inkubiert, mit RIPA-Puffer lysiert und nach Auftrennung in der SDS-PAGE auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. An die Mutanten gebundenes GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ (**A, oberer Blotausschnitt**) wurde durch MαGST detektiert und auf die CPE-Bindung an Cld5_{wt}-YFP normalisiert. Das Cld5-Expressionsniveau der Mutanten wurde durch RαCld5 detektiert (**A, unterer Blotausschnitt**) und auf das Expressionsniveau von Cld5_{wt}-YFP normalisiert. Der Quotient beider relativen Werte ergab die CPE-Bindungsrate. **B:** Im Säulendiagramm ist die durchschnittliche CPE-Bindungsrate aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt, mit Ausnahme für Y148L, K157M, E159Q, L160A, Cld5₁₀₃₋₂₁₈ und Q44N, die Einzelexperimente repräsentieren. Die Bindungsrate von Cld5_{wt}-YFP ist auf 1,0 gesetzt und durch die gepunktete Linie angedeutet. Intrazellulärer Typ: rote Säulen; *disjunction*-Typ: blaue Säulen; TJ-Typ: grüne Säulen. P150A und Y158A sind aufgrund ihres intermediären Charakters gemischtfarbig dargestellt. T151A und Q156E sind durch ausgefüllte, rote Säulen hervorgehoben. Fehlerbalken geben die Schwankungsbreite aller Mutanten an. Als Negativkontrollen wurden nicht transfizierte HEK-293-Zellen verwendet, die mit GST oder GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ inkubiert waren, sowie Cld5_{wt}-YFP transfizierte und mit GST inkubierte HEK-293-Zellen. In den entsprechenden Immunoblots wurde keine CPE-Bindung detektiert (**A**).

CPE-Bindungsrate zeigten die Mutanten des intrazellulären Typs. Die Bindung von CPE₁₁₆₋₃₁₉ an P153A war Wildtyp-ähnlich (0,76) und an die Mutanten V152A und L160A im Vergleich zum Wildtyp erhöht (2,31-fach bzw. 2,23-fach, Abb. 3.25). Die übrigen Mutanten vom intrazellulären Typ und die intermediäre Mutante P150A zeigten verglichen mit dem Wildtyp eine zum Teil deutlich niedrigere CPE-Bindungsrate ($\leq 0,53$, Abb. 3.25 A und B, rote Säulen). Eine der Negativkontrolle (Cld5_{wt}-YFP + GST, Abb. 3.25 A und B) vergleichbare CPE-Bindungsrate wiesen nur die Mutanten K157A, K157M und Cld5₁₀₃₋₂₁₉ sowie T151A und Q156E auf ($< 0,2$) auf. Demnach ließen sich die Aminosäurepositionen T151 und Q156 als für die direkte Interaktion der 2.EZS von Cld5 mit GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ relevant identifizieren.

3.8.6.2 Substitutionsanalyse von Peptiden der zweiten extrazellulären Schleife der Claudine -2, -3, -4 und -5 durch membrangebundene Peptidbibliotheken

Die 2.EZS von Cld3 umfasst die Sequenz DFYNPLVPEAQKREM (AS 145 bis 159). In einem Substitutionsansatz wurden Peptidspots synthetisiert, die in jedem *Spot* eine Aminosäuresubstitution in der Sequenz DFYNPLVPEAQKREM tragen. Dabei wurde jede Aminosäureposition gegen jede der 20 proteinogenen Aminosäuren ausgetauscht, ausgenommen von Cystein, das bei der Peptidsynthese zur kovalenten Vernetzung der Peptide in einem *Spot* führt (Abb. 3.26). Die Zellulosemembran wurde mit GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ oder GST inkubiert und die Bindung pro *Spot* in Form von *Boehringer light units* (BLU) quantifiziert. Von den BLU-Werten der GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ inkubierten *Spots* wurden die BLU-Werte der entsprechenden GST-inkubierten Kontrollspots abgezogen. Der BLU-Durchschnittswert von 30 *Spots* mit der Cld3_{wt}-Sequenz wurde als 100 % CPE-Bindung definiert. Alle anderen *Spots* wurden auf diesen Durchschnittswert bezogen. Die relativen Bindungswerte aus zwei Experimenten wurden für alle *Spots* in einer Tabelle in Anhang 8.3 zusammengefasst.

Wie in Abb. 3.26 zu sehen, führte der Austausch von N148, P149, L150 und P152 in der *turn*-Region (geschweifte Klammer) gegen jede beliebige andere Aminosäure zum Ausbleiben der Interaktion zwischen CPE und den Cld3-Peptiden in den *Spots*. V151 hingegen konnte durch hydrophobe Aminosäuren (A, I, L) oder Q und R ersetzt werden. Die Interaktion von CPE₁₁₆₋₃₁₉ mit V151A und V151Q war nur sehr schwach nachweisbar (Abb. 3.26). Jeder andere Austausch führte zu sehr stark verminderten oder nicht nachweisbaren Interaktionen von CPE₁₁₆₋₃₁₉ mit diesen *Spots*. Die *turn*-Region ist daher für die CPE-Interaktion mit Peptiden der 2.EZS von Cld3 essentiell.

Des Weiteren unterband Prolin an den Positionen E153, A154, Q155, K156 oder R157 die CPE-Interaktion ebenso wie die Einführung einer negativen Ladung (E oder D) an den

3. Ergebnisse

Positionen A154, Q155, K156 und R157 (Abb. 3.26, blau gepunktete Rahmen). Die Bindung von CPE an Peptide mit den Aminosäuren G, H, M, N oder S in Position A154 war stark vermindert oder nicht nachweisbar. Demnach ist neben der *turn*-Region die C-terminale Sequenz EAQKR (AS 153 bis 157) der 2.EZS von Cld3 für die CPE-Interaktion von Bedeutung. Im N-terminalen Bereich (D147, F148 und Y149) nahmen Aminosäuresubstitutionen kaum Einfluss auf die Interaktion mit GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉.

Aminosäuresubstitutionen an der Position E158 gegen G, A, F, W, L, I, M, T, Q, N, R und K sowie Q155 gegen A, L, S, T, N und R führten zu maximal fünffachen, minimal zu doppelten BLU-Werten im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz. Der Austausch von E153 nach R oder D, Y147A oder M159 nach F, L, K, oder R führte zu doppelten bis dreifachen BLU-Werten (Abb. 3.26, Tab. 3.6).

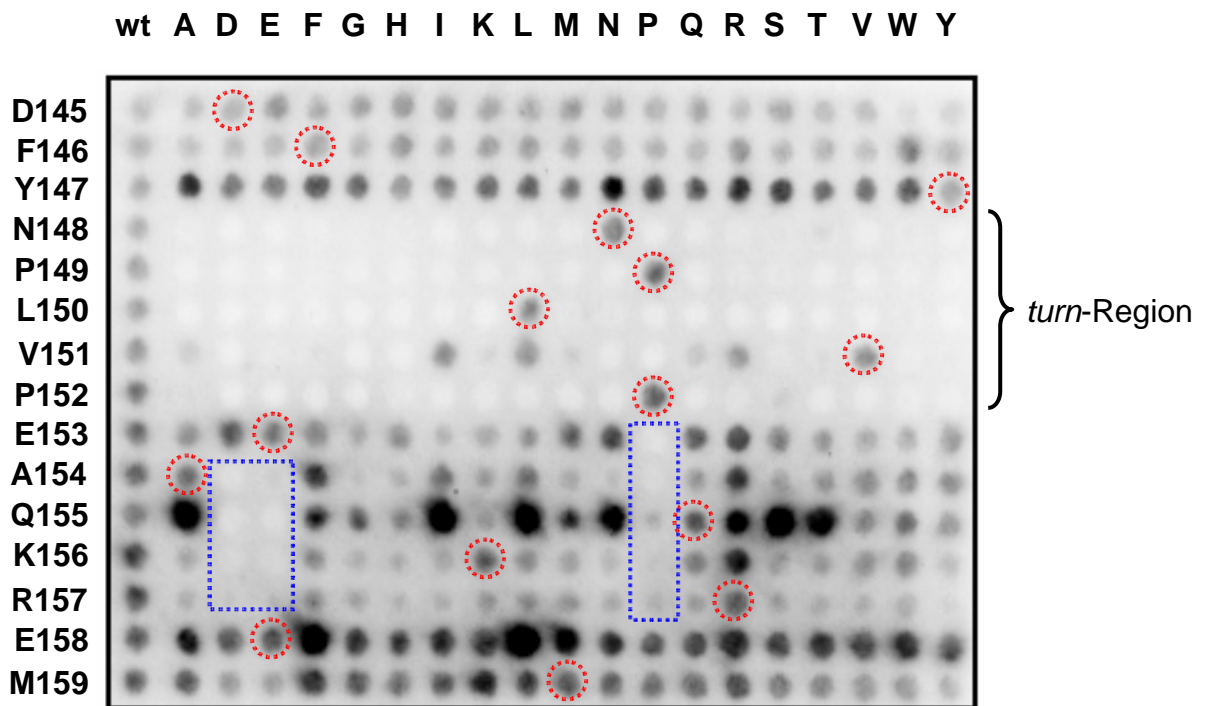


Abb. 3.26: Substitutionsanalyse der Interaktion von *Clostridium perfringens* Enterotoxin mit Peptiden der zweiten extrazellulären Schleife von Claudin-3 durch membrangebundene Peptidbibliotheken.

Ausgehend von der 2.EZS von Cld3 wurden Peptide mit Aminosäuresubstitutionen an jeder Position der Sequenz DFYNPLVPEAQKREM auf eine Zellulosemembran synthetisiert (Aminosäuren der Cld3-Sequenz links neben der Membran). Dabei wurde jede Aminosäure in der Sequenz gegen jede andere Aminosäure ausgetauscht (Cystein ausgenommen). Der Einbuchstabencode (siehe Abkürzungsverzeichnis) der Aminosäuren oberhalb der Peptidbibliothek gibt die Art der Substitution an der entsprechenden Position innerhalb der 2.EZS an. Die erste, linke Spotreihe enthält *Spots* mit der Wildtypsequenz von Cld3 und war, wie auch die rot gepunktet umrandeten *Spots*, eine interne Kontrolle für die Bindung von GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉. Die blau gepunkteten Rahmen sowie die *turn*-Region (NPLVP) weisen auf Aminosäuresubstitutionen, die die GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉-Bindung besonders stark einschränken.

3. Ergebnisse

Tab. 3.6: Substitutionen von Claudin-3-Peptiden, die verstärkt GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉ binden

Peptidsequenz	n-fach	Peptidsequenz	n-fach	Peptidsequenz	n-fach
DFYNPLVPEAQKR FM	5,09	DFYNPLVPEAQKR RM	3,05	DFYNPLVPEAQKR TM	2,36
DFYNPLVPEA AK REM	5,09	DFYNPLVPEA RA QKREM	3,03	DFYNPLVPEAQKR KM	2,24
DFYNPLVPEA LK REM	4,77	DFYNPLVPEAQKR GM	2,96	DFYNPLVPEAQKR EF	2,24
DFYNPLVPEAQKR LM	4,21	DF YN PLVPEAQKREM	2,74	DFYNPLVPEAQKR AM	2,08
DFYNPLVPEA SK REM	3,93	DFYNPLVPEAQKR QM	2,43	DFYNPLVPEAQKR ER	2,08
DFYNPLVPEA TK REM	3,54	DFYNPLVPEAQKR NM	2,73	DFYNPLVPEAQKR EL	2,07
DFYNPLVPEA NK REM	3,49	DFYNPLVPEAQKR EK	2,66	DFYNPLVPEA RK REM	2,07
DFYNPLVPEAQKR WM	3,18	DFYNPLVPEAQKR IM	2,65	DFYNPLVPEA DA QKREM	2,01
DFYNPLVPEAQKR MM	3,17				

n-fach: n-fach erhöhte rel. BLU-Werte der Spots verglichen mit der Cld3_{wt}. Rote Buchstaben kennzeichnen die Position der Aminosäuresubstitution im Peptid.

Peptide mit der Wildtyp-Sequenz der 2.EZS von Cld2, Cld4 und Cld5 zeigten keine Interaktion mit CPE₁₁₆₋₃₁₉ (Abb. 3.21). Alle drei Claudine weichen in der *turn*-Region von der Cld3_{wt}-Sequenz ab (Cld3: NPLVP; Cld2: SPLVP; Cld4: MPNVA und Cld5: DPTVP). Daher wurden Substitutionsanalysen von Peptiden der 2.EZS dieser Claudine durchgeführt, deren CPE₁₁₆₋₃₁₉-Bindung quantifiziert und mit der Bindung des Cld3_{wt}-Peptids verglichen wurde.

Die Tabelle 3.7 nennt im Vergleich zur Bindung von CPE₁₁₆₋₃₁₉ an Cld3_{wt} den Faktor (n-fach) der stärkeren oder schwächeren Bindung der Peptide.

Peptide der 2.EZS von Cld2, in denen im *turn*-Motiv S149 gegen N ausgetauscht wurde, zeigten eine mit der Cld3_{wt}-Sequenz vergleichbare Bindungsintensität (0,99; Tab. 3.7). Der Einzelaustausch von A153 nach P im *turn*-Motiv von Cld4 steigerte die CPE-Bindung an dieses Peptid nicht, erst der Doppelaustausch von A153 nach P und M151 nach L machte eine Bindung von CPE₁₁₆₋₃₁₉ mit der Cld3_{wt}-Sequenz vergleichbar (Tab. 3.7). Auch Peptide von Cld5 zeigten nur eine Interaktion mit CPE₁₁₆₋₃₁₉, wenn das *turn*-Motiv NPLVP regeneriert wurde. Einzelsubstitutionen von D149 nach N oder T151 nach L verstärkten die Interaktion mit CPE₁₁₆₋₃₁₉ nicht. Dies unterstreicht die Bedeutung der *turn*-Sequenz NPLVP für die Interaktion von Peptiden der 2.EZS von Claudinen mit CPE₁₁₆₋₃₁₉. Ein chimäres Cld3/Cld5-Peptid mit der Sequenz NIVVR**DFYNPLVPEAQ**KYEL, bei dem die C- und N-terminale Sequenz (schwarz) von Cld5 und die mittlere Sequenz von Cld3 (rot) stammte, interagierte wie das Cld3_{wt}-Peptid mit GST-CPE₁₁₆₋₃₁₉.

3. Ergebnisse

Tab. 3.7: Substitutionsanalyse der CPE₁₁₆₋₃₁₉-Bindung an Peptide der zweiten extrazellulären Schleife der Claudine -2, -3, -4 und -5

Cld3 _{wt}	Peptid	Cld-Variante	Peptidsequenz	n-fach Cld3 _{wt}
		Cld2	HGILRDFYSPLVPDSMKFEI	0,18
		Cld2	HGILRDFY N PLVPDSMKFEI	0,99
		Cld2	HGILRDFY N PLVPD A MKFEI	1,64
		Cld2	HGILRDFY N PLVPD A MK R EI	1,48
		Cld4	HN V IRDFYNPMVASGQKREM	-0,11
		Cld4	HN V IRDFYNPM V PSGQKREM	-0,04
		Cld4	HN V IRDFYN P L V PSGQKREM	0,84
		Cld3/Cld5	N I V V R D FY N P L V P E A QKYEL	1,10
		Cld5	N I V V R E FYDPTVPVSQKYEL	-0,19
		Cld5	N I V V R E FY N P T VPVSQKYEL	0,00
		Cld5	N I V V R E FYD P L V PVSQKYEL	-0,01
		Cld5	N I V V R E FY N P L V P V S QKYEL	0,62
		Cld5	N I V V R E FYDPTVP E SQKYEL	-0,01
		Cld5	N I V V R E FYDPTVP V AQKYEL	-0,05
		Cld5	N I V V R D FYDPTVPVSQKYEL	-0,03
		Cld5	N I V V R D FYDPTVP V AQKYEL	-0,03
		Cld5	N I V V R D FYDPTVP V AQ R EL	-0,02
		Cld5	N I V V R D FYD P L V P E AQ R EL	0,04
		Cld5-Mix	YDPVIVELSQTVPFKYRENV	0,05
		Cld5-Mix	LEYKQSVPTPDYFERVVIN	0,29
		Cld3-Mix	MERKQAEVLPNYFDRIITN	-0,01
		Cld3-Mix	EMPENPAQRDFYINTKLVRI	-0,04

Rot markierte Buchstaben deuten Aminosäuresubstitutionen in Richtung Cld3-Sequenz an. n-fach: n-fach erhöhte rel. BLU-Werte der Spots verglichen mit der Wildtyp-Sequenz. Von den BLU-Werten der CPE-inkubierten Membranen wurden die BLU-Werte der Hintergrundintensität und der Kontrollen, die mit GST bzw. MBP inkubiert wurden, abgezogen. Der Δ BLU-Wert für Cld3 wurde als 1,0 gesetzt und die übrigen Spots auf den Cld3-Spot bezogen (n-fach Cld3; Tab. 3.5).